



<i>Titill / Title</i>	Magngreiningu fitu		
<i>Höfundar / Authors</i>	Margrét Bragadóttir		
<i>Skýrsla Rf / IFL report</i>	81	<i>Útgáfudagur / Date:</i>	apríl 1995
<i>Lykilorð á íslensku:</i>	Fita, Bligh & Dyer, Folch, sjálfvirkur fituúrdráttur.		

## EFNISYFIRLIT

1. INNGANGUR	2
2. FRAMKVÆMD	2
2.1. Efni og aðferðir	2
3. NIÐURSTÖÐUR OG UMRÆÐUR	4
3.1. Folch fituúrdráttur	4
3.2. Sjálfvirkur fituúrdráttur	4
3.3. Bligh og Dyer fituúrdráttur	5
3.4. Samanburður á Bligh og Dyer aðferðum	6
5. ÁLYKTANIR	7
6. HEIMILDIR	8

## 1. INNGANGUR

Á Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins (Rf) hefur um árabil verið gerður fituúrdráttur með aðferð Bligh og Dyer (1). Sú aðferð sameinar milda sýnameðferð og er talin nálgast hvað best að mæla heildarfituinnihald í sýni. Á Rf er einnig notaður hefðbundinn fituúrdráttur með Soxhlet aðferð, þar sem sýnið er soðið í ether. Soxhlet fituúrdráttur er viðurkennd aðferð, sem nær úr sýninu aðgengilegri fitu, eins og þríglýseríðum, en síður fitu sem bundin er í frumum eins og fosfólípíðum. Bligh og Dyer aðferðin er einkum notuð við fituúrdrátt á sýnum ef nota á fituna áfram í fleiri mælingar og mikilvægt er að fitan hafi fengið milda meðferð og sé sem líkust því sem og hún var í sýninu. Þessi aðferð var í byrjun notuð á Rf þegar ná átti fitu úr litlu magni af sýni (2-4 g) til að greina fitusýrur í fiski og fiskmjöli. Árangurinn var góður og heimtur á fitu hærri en með Soxhlet-aðferðinni. Í seinni tíð hefur Bligh og Dyer aðferðin verið notuð meira við fituúrdrátt á stærri sýnum (allt að 100 g) þegar mæla á þránun í fiski eða öðru hráefni. Mælingar á þránun hafa einkum verið peroxíðgildi, óbundnar fitusýrur og anisidingildi. Í þessum mælingum var lítill gaumur gefinn að heimtum fitu úr sýninu, þar sem þránunarmælingarnar voru aðalatriðið, en fituinnihaldið aukaatriði. Þegar nota átti niðurstöður fitumælinganna kom í ljós að heimtur fitunnar voru ekki viðunandi. Þá hófst vinna við að reyna að bæta úr fituheimtum í heildarfituúrdrætti, m.a. með því að kaupa sjálfvirkt fituúrdráttartæki frá Tecator. Í tengslum við QASIMEME fjölpjódaverkefnið um efnagreiningar á mengandi efnum í hafi og lífríki þess, sem Rf er aðili að, var haldinn vinnufundur um ákvörðun á heildarfitumagnni í sýnum fyrir mengunarefna-mælingar (2). Á þeim fundi kom fram að margar af þeim rannsóknastofum sem tóku þátt í verkefninu notuðu Bligh og Dyer heildarfituúrdrátt með breytingum. Helstu breytingarnar voru, auk þess að nota mun minna sýni, að fasaaðskilnaður var gerður í skilvindu í stað þess að láta fasana skiljast að í skiltrekt yfir nótt og voru í því sambandi tilgreindar margar heimildir (3), (4), (5). Í framhaldi af því var kannað hvernig nokkrar erlendar rannsóknastofur framkvæmdu heildarfituúrdrátt. Í þessari skýrslu eru teknar saman helstu niðurstöður þeirrar vinnu sem gerð var á Rf við heildarfituúrdrátt með það að markmiði að auka heimtur fitu við úrdráttinn.

## 2. FRAMKVÆMD

### 2.1. Efni og aðferðir

Hefðbundinn Bligh og Dyer fituúrdráttur var gerður við herbergishita á 100 g af hökkuðum sýnum. Sýnið á að innihalda 80% vatn, eða jafngildi þess, með því að bæta út í vatni og minnka jafnframt sýnamagnið. Síðan var 100 ml af klóróformi og 200 ml af methanóli bætt saman við og hrært með mixara (Ultra-turraxT25 frá IKA-Labortechnik) í 4 mín. Þessi blanda var síuð í gegnum síupappír, með eða án sogs, yfir í skiltrekt. Síupappírinn var undinn vel og hratið var hrært aftur með 100 ml af

klóróformi í 4 mín. og síðan síað aftur yfir í sömu skiltrekt. Út í skiltrektina var bætt 100 ml af 0,88% KCl-lausn og hrist vel saman. Þetta var látið aðskiljast yfir nótt og þá var neðri klóróformfasinn, sem inniheldur fituna, síaður í gegnum vatnsfrítt natríum-súlfat. Ef notað er minna en 100 g af sýni er magn annarra efna minnkað hlutfallslega og þess gætt að halda hlutfalli af klóróformi, methanóli og vatni 5:10:4 í byrjun og 10:10:9 í lokin. Fituákvörðun var gerð með því að gera klóróformfasann að ákveðnu rúmmáli (hér 200 ml) og taka hlutfall af því (3 ml) yfir í forvigtaða 25 ml erlenmayerflösku. Klóróformið var látið gufa upp á sandbaði við 60°C í 15 mín. og áfram í ofni við 105°C í 10-12 mín. Erlenmayerflaskan var síðan kæld í dessikator og vigtuð. Mismunur á vigt tómu flöskunnar og vigt flöskunnar eftir uppgufun á klóróforminu er magn fitu í þessum 3 ml. Síðan er margfaldað með heildarrúmmáli af klóróformi og deilt með vigt sýnis.

Bligh og Dyer fituúrdráttur með aðskilnaði í skilvindu var gerður með sama hlutfalli af leysum og hefðbundinn úrdráttur en notuð voru 5 g af hökkuðu fóðri og 20 ml af vatni bætt út í (25 g sýni). Síðan var 25 ml af klóróformi og 50 ml af methanóli bætt saman við og hrært með mixara (Ultra-turraxT25 frá IKA-Labortechnik) í 2 mín. í ísbaði. Þá var 25 ml af klóróformi bætt út í og hrært í 1 mín. og loks 25 ml af 0,88% KCl-lausn og hrært áfram í 1 mín. Þetta var skilið í 250 ml glerskilvinduglasi í skilvindu (Sorwall RC-5B, GSA rotor) við 2500 rpm (1017 x g) í 20 mín við 0-5°C. Neðri klóróformfasinn sem inniheldur fituna var síðan soginn undan með pípettu, síaður í gegnum vatnsfrítt natríum súlfat.

Sjálfvirkur fituúrdráttur með fituúrdráttartæki frá Tecator, sem nefnist 1048 Equilibrium Extractor var gerður við herbergishita eins og hefðbundinn Bligh og Dyer fituúrdráttur. Sýnið (1-25 g) var blandað sandi (1/5 af sýnavigt) og komið fyrir í síuhosum (43 mm x 123 mm) og að því loknu var síuhosan fyllt með bómull. Síuhosan var síðan fest á meðfylgjandi úrdráttarflösku og leysunum (methanól/klóróform) sem nota átti í úrdráttinn hellt í flöskuna. Úrdrátturinn var hafinn með því að stilla fjölda hringja sem tækið snýr flöskunum og biðtíma milli hringja. Að loknum úrdrætti var leysunum sem innihalda fituna hellt í skiltrekt og haldið áfram eins og í hefðbundnum Bligh og Dyer fituúrdrætti.

Folch fituúrdráttur var gerður skv. Christie (6) á 1 g af hökkuðu sýni. Síðan var 10 ml af methanóli bætt saman við sýnið og hrært með mixara (Ultra-turraxT25 frá IKA-Labortechnik) í 1 mín. og svo 20 ml af klóróformi og hrært áfram í 2 mín. Þessi blanda var síuð í gegnum glersíu með sozi og síuvökvanum hellt yfir í skiltrekt. Hratið var hrært aftur með 20 ml af klóróformi og 10 ml af methanóli í 3 mín, síað aftur í gegnum glersíu og loks var hratið þvegið með 20 ml af kóróformi og 10 ml af methanóli og síuvökvanum hellt yfir í sömu skiltrekt. Út í skiltrektina var bætt 22,5 ml af 0,88% KCl-lausn og hrist vel saman. Þetta var látið skiljast að yfir nótt og þá var neðri klóróformfasinn, sem inniheldur fituna, síaður í gegnum vatnsfrítt natríum súlfat. Hér var fituákvörðun gerð með því að láta allan klóróformfasann yfir í forvigtaða suðufloösku, klóróformið eimað af í hverfieimara við 30°C og áfram við 105°C í 20-30 mín í ofni. Suðufloaskan var kæld í dessikator og vigtuð.

Soxhlet aðferð var gerð samkvæmt AOAC, 15. útg., 1990, 960.39, en kaldur ehterúrdráttur samkvæmt svokallaðri Aliquot aðferð eða Hlutfallsaðferð.

### 3. NIÐURSTÖÐUR OG UMRÆÐUR

#### 3.1. Folch fituúrdráttur

Niðurstöður fituákvörðunar með Folch úrdrætti á síldarflökum sem innihéldu 13,7% fitu og kræklingi sem innihélt 1,44% fitu skv. Soxhlet aðferð eru teknar saman í töflu 1.

Tafla 1. Folch-úrdráttur á 1 g sýnum af síldarflökum og kræklingi.

Sýni	Sýun á hrati		Sýun á klóróform-fasa		Niðurstöður		
	Súpappír	Glersía með sozi	Súpappír + Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Glersía + Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Folch-fita (%)	Soxhlet-fita (%)	Heimtur (%) mv. Soxhlet
Síld 1	x				13,4±0,6	13,7	98
Síld 2		x			13,7±0,2	13,7	100
Síld 3		x			14,2±0,6	13,7	104
Síld 4		x			15,4±0,7	13,7	112
Síld 5		x	x		12,8±0,1	13,7	93
Síld 6		x		x	14,5±0,6	13,7	106
Kræklingur		x			1,6±0,0	1,4	108

Niðurstöður eru gefnar upp sem meðaltal ± staðalfrávik af þremur mælingum.

Folch fituúrdráttur er í rauninni forveri Bligh og Dyer fituúrdráttarins, en nota þarf minna sýni og meira af leysum. Í töflu 1 kemur fram að fituheimtur eru meiri ef notuð er glersía við að skilja hratið frá leysunum frekar en súpappír. Ef neðri klóróformfasinn sem inniheldur fituna er ekki síaður eru niðurstöður fituinnihalds á bilinu 13,7-15,4%. Þessar breytilegu niðurstöður skýrast sennilega af því að hætta er á að agnir af föstu efni geti flotið með klóróform-fasanum ef hann er ekki síaður og valdið því að fitan mælist of mikil í einhverjum tilvikum. Ef neðri klóróformfasinn er síaður í gegnum natríum sulfat (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) og súpappír fást niðurstöður sem eru lægri en Soxhlet, en ef notuð er glersía fást hærri niðurstöður en í Soxhlet.

#### 3.2. Sjálfvirkur fituúrdráttur

Fituákvörðun með sjálfvirkum úrdrætti er tekin saman í töflu 2. Í þeirri tilraun voru notuð síldarflök sem innihéldu 13,7-18,3% fitu skv. Soxhletmælingu. Sýnamagn var á bilinu 3-20 g. Ekki reyndist unnt að nota vatn í leysablönduna við úrdráttinn, því þá varð síuhosan of þung og datt af stútnum á úrdráttarflöskunni. Prófað var að nota einungis klóróform og síðan blöndu af klóróformi og methanóli. Tækið var látið snúa sýninu í 25 og 35 hringi, en biðtími var í byrjun 5 mín, en síðan 3 mín. milli snúninga. Reiknaðar voru út heimtur fitu eftir einn til fjóra úrdrætti.

Tafla 2. Fitumælingar á síldarflökum með sjálfvirkum fituúrdrætti.

Síld		Leysar (ml)		Tækja- stilling		Heimtur (%) m.v. Soxhlet				
Soxhlet fituinni- hald (%)	Magn sýnis (g)	Klóró- form	Meth- anól	Fj. snú- ninga	Bið- tími	1- úrdr.	2- úrdr.	3- úrdr.	4- úrdr.	Alls
13,7	20	150		25	5	28				28
13,7	20	150		25	5	24				24
18,3 <sup>a</sup>	5	2x100	2x50	25	3	-	75			75
18,3 <sup>a</sup>	5	2x100	2x50	25	3	-	66			66
18,3 <sup>a</sup>	3	2x100	2x50	25	3	-	81			81
18,3 <sup>a</sup>	3	2x100	2x50	25	3	-	84			84
18,3 <sup>a</sup>	5	100	50	25	3	29	29	10	27	95
18,3 <sup>a</sup>	5	100	50	35	3	24	40	25	10	99

<sup>a</sup>: saltsíldarflök.

Ljóst er að fituheimtur eru mjög lélegar með þessari aðferð og einn úrdráttur nær eingöngu út 24-29% af fitunni miðað við Soxhlet. Svo virðist sem fjölgun snúninga úr 25 í 35 auki ekki heimturnar í fyrsta úrdrætti. Tveir úrdrættir ná út 60-75% fitunnar miðað við 5 g sýni en 81-84% fitunnar miðað við 3 g sýni. Þetta getur engan veginn talist nógu góður árangur, sérstaklega vegna þess að þessi úrdráttur er mjög seinvirkur. Þannig tekur einn 25 snúninga úrdráttur um 100 mínútur.

### 3.3. Bligh og Dyer fituúrdráttur

Í töflu 3 eru teknar saman niðurstöður Bligh og Dyer fituúrdráttar á saltsíldarflökum sem mældust með 18,3% fitu skv. Soxhlet.

Tafla 3. Bligh &amp; Dyer fituúrdráttur á misstórum sýnum af saltsíldarflökum.

Magn sýnis (g)	Hrat sýun		Filtrun á klóróform-fasa		Niðurstöður	
	Súpappír með sozi	Glersía með sozi	Súpappír + Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Glersía + Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Fita (%)	Heimtur (%) mv. Soxhlet
1		x		x	18,1	99
1	x			x	16,0	87
20	x			x	17,3	94
20	x			x	17,3	94

Saltsíldin reyndist vera mjög erfið í meðförum og treglega gekk að síá hратиð frá leysunum. Hér kemur fram að fituheimturnar með Bligh og Dyer fituúrdrætti á þessu sýni eru lakari en með Soxhlet aðferð, hvort sem sýnið er lítið eða stórt, nema ef notuð er glersía í stað súpappírs. Svo virðist sem súpappírinn dragi í sig fituna og þá hlutfallslega meira þegar sýnið er lítið.

### 3.4. Samanburður á Bligh og Dyer aðferðum

Fyrirspurn til nokkurra rannsóknastofa, sem nota Bligh og Dyer fituúrdrátt reglulega til að mæla þrúnun í sýnum, leiddi í ljós að allar rannsóknastofurnar sem svöruðu reyndust nota skilvindu við fasaðskilnað. Þrjár af þessum rannsóknastofum létu í té nákvæma aðferðalýsingu á fituúrdrættinum og þær eru teknar saman í töflu 4 og bornar saman við hefðbundna Bligh og Dyer aðferð, miðað við 2 g sýni.

*Tafla 4. Samanburður á Bligh & Dyer fituúrdráttaraðferðum við fiskmjöl.*

	Hefðbundin	FF Danmörku	CLS Torry	ALL Bretlandi
Sýni (g)	2	2	2	2
Vatn (ml)	8	8	16	16
Klóróform (ml)	10	10	20	20
Methanol (ml)	20	20	40	40
Hrært (mín)	4	0,5	2	2
Síun	já	nei	nei	nei
Klóróform (ml)	10	10	20	20
Hrært (mín)	4	0,5	0,5	0,5
Síun	já	nei	nei	nei
Vatn (KCl) (ml)	10	10	20	20
Hrært (mín)	-	0,5	0,5	0,5
Aðskilnaður	skiltrekt	3000 rpm í 10 mín	2000 rpm í 20 mín	2000-3000 rpm í 10 mín
CHCl <sub>3</sub> :Me-OH:H <sub>2</sub> O		10:10:09	10:10:09	10:10:09
Heildarrúmmál (ml)	60	60	118	118

FF: Fiskeriministeriets forsøgslaboratorium (1), (7), (8).

CLS: Central Science Laboratory, Aberdeen (1), (9).

ALL: Aynsome Laboratories Limited, St. Helens (10).

Rannsóknastofurnar ALL og CLS nota helmingi meira af leysum og vatni en segir í Bligh og Dyer aðferðinni, en FF heldur sig við upphafleg hlutföll. Engin þessara rannsóknastofa síar vökvann frá hratinu milli þess sem hrært er, heldur hrærir öllu saman í áföngum. Rannsóknastofan ALL vitnar í Pearson's Composition and Analysis of Foods (10), en þar er einmitt vitnað í Hansen & Olley (9) sem árið 1963 birtu breytta Bligh og Dyer aðferð, sem allar þrjár rannsóknastofurnar í töflu 4 virðast styðjast við. Pearson's Composition and Analysis of Foods fullyrðir að þetta sé besta aðferðin við fituúrdrátt fyrir greiningu með gasgreini, þrúnunarmælingar o.fl.

Á Rf var borinn saman fituúrdráttur á fódri með hefðbundinni Bligh og Dyer aðferð, skilvinduadferð og etherúrdrætti eða svokallaðri Aliquot aðferð. Í ljós kom að heimtur á fitu voru mjög svipaðar með Bligh og Dyer aðferðunum, en heldur lægri með etherúrdrættinum. Niðurstöður mælinga á Peroxíðgildi í fitunni eru líka talsvert frábrugðnar. Lægstu Peroxíðgildin mælast í sýnunum með etherúrdrætti, sem stafar sennilega af verri heimtum á frumubundinni fitu eins og fosfólípíðum. Hærri

Peroxíðgildi úr hefðbundinni Bligh og Dyer aðferð en skilvindu aðferðinni eru væntanlega vegna þess að skilvindu aðferðin er gerð við mildari sýnameðferð, þ.e. á fljótvirkari hátt og við lægra hitastig, sem gerir það að verkum að fitan í sýninu þránar síður meðan á sýnameðferðinni stendur.

*Tafla 5.* Samanburður á fituinnihaldi og Peroxíðgildi í fóðri út frá mismunandi fituúrdráttaraðferð.

Fituúrdráttur	Fóður 1		Fóður 2	
	Fita (%)	Peroxíðgildi (meq/kg)	Fita (%)	Peroxíðgildi (meq/kg)
Bligh og Dyer				
-hefðbundinn	16,8±0,7	5,4±1,0	20,0±0,2	14,6±2,3
-skilvinda	16,8±0,1	2,2±0,3	20,0±0,3	10,8±1,2
Etherúrdráttur	16,4±0,0	2,8±0,1	19,4±0,1	7,7±0,3

Niðurstöður eru gefnar upp sem meðaltal ± staðalfrávik af tveimur mælingum.

## 5. ÁLYKTANIR

Athuganir sem gerðar voru á Folch fituúrdrætti benda til að síupappírinn dragi úr heimtum fitu, því heimturnar eru betri þegar notuð er glersía í stað síupappírs. Hins vegar er ekki óhætt að sleppa því að sía klóróformfasann sem inniheldur fituna, því hætta er á að fast efni geti flotið með og hækkað þannig niðurstöður fituákvörðunar. Sjálfvirka fituúrdráttaraðferðin með Equilibrium Extractor notar stóra og þykka síuhosu, sem þátt fyrir margar skolanir felur greinilega í sér talsvert magn af fitu, sem meðal annars sést á lélegum heimtum með þessari aðferð.

Breytt Bligh og Dyer aðferð, sem notar skilvindu við fasaaðskilnað, var sú aðferð sem reyndist einföldust í framkvæmd og skilaði einnig góðum heimtum á fitu. Þessarar fituúrdráttaraðferðar er mjög víða getið í heimildum og samkvæmt fyrirspurnum okkar tíðkast víða að nota hana þar sem stundaðar eru þjónustumælingar á matvælum og fóðri.



## 6. HEIMILDIR

1. Bligh, E.G. and Dyer, W.S. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. and Physiol.* 37, 911.
2. QUASIMEME. 1994. Report on the proceedings of a workshop on the measurement of lipids as a co-factor for organic contaminants in biota. Dublin, 13-16 October 1994.
3. Booij, K and van den Berg, C. 1994. Comparison of techniques for the extraction of lipids and PCBs from Benthic invertebrates. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 71.
4. Randall, R.C., Lee II, H. and Ozretich, R.J. 1991. Evaluation of selected lipid methods for normalizing pollutant bioaccumulation.
5. de Boer, J. Chlorobiphenyls in bound and non-bound lipids of fishes; Comparison of different extraction methods. *Chemosphere*, Vol. 17, No. 9, 1803.
6. Christie, W.W. 1982. *Lipid analysis, Isolation, separation, identification and structural analysis of lipids.* 2nd ed. Pergamon press, Oxford.
7. Reimers, K.H. og Dalsgaard, D.V. 1978. Analyser nr. 42, intern rapport. Fiskeriministeriets Forsøgslaboratorium.
8. Knudsen, L, Berner, L, Reimers, K & Jensen, N.C. Analyser nr 46, intern rapport. Fiskeriministeriets Forsøgslaboratorium.
9. Hanson, S.W.F & Olley, J. 1963. *Biochem. J.* 89, 101.
10. *Pearson's Composition and Analysis of Foods.* 9th Edition. Longman Scientific and Technical.