

Д. М. ВИТЮК

К МЕТОДИКЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЫРОГО ЖИРА В ПЛАНКТОНЕ

При оценке кормовой ценности различных видов планктона необходимо знать содержание в нем сырого жира. Под термином «сырой жир» подразумевают сумму веществ, извлекаемых сухим серным эфиром из веществ растительного или животного происхождения, предварительно высушенных и измельченных. Широко известно, что при экстракции в эфирную вытяжку переходят не только сложные эфиры глицерина и жирных кислот, т. е. собственно жиры, но и другие эфирорастворимые вещества. Так, из наземных растений, кроме глицеридов жирных кислот, экстрагируются эфиром свободные жирные кислоты, воскообразные вещества, фосфатиды, хлорофилл, углеводороды, алкоголи, альдегиды, кетоны, летучие сложные эфиры, смолы, алкалоиды, различные красящие и другие вещества. Следует ожидать, что в составе организмов планктона также будет найдено большое число разнообразных эфирорастворимых соединений, но, по-видимому, количество их по сравнению с количеством глицеридов жирных кислот, как и у наземных растений, невелико. Последнее обстоятельство до некоторой степени оправдывает замену термина «сырой жир» термином «жир», допускаемую в некоторых работах, посвященных исследованию химического состава планктона (З. А. Виноградова, 1959; Е. М. Маликова, 1956; Л. А. Ланская и Т. И. Пшенина, 1961; и др.).

Для количественного определения содержания сырого жира разработаны разнообразные модификации метода экстракции, которые могут быть разделены на две группы: 1) экстрагирование путем обработки исследуемого вещества сменяющимися порциями свежего растворителя в аппаратах, работающих по принципу экстракционного аппарата Сокслета; 2) экстрагирование путем настаивания. Е. М. Маликова (1956) определяла жир в планктонных организмах одновременным экстрагированием нескольких проб в аппарате Сокслета. Предварительно проводилась длительная экстракция сухим эфиром пустых пакетов из фильтровальной бумаги. Пакеты высушивали до постоянного веса, взвешивали в бюксах, после чего в сухие пакеты помещали навески исследуемого вещества. Экстракцию жира из навесок, помещенных в пакеты, проводили не менее 10—12 часов, после чего пакеты вместе с их содержимым высушивали до постоянного веса и вновь взвешивали в тех же бюксах. По убыли в весе определяли количество жира. Описанным методом пользовались Л. А. Ланская и Т. И. Пшенина (1961) для определения жира в планктонных водорослях, выращенных в культурах, и З. А. Виноградова (1959) — для определения жира в фито- и зоопланктоне Черного моря.

Экстракция путем настаивания применяется в основном при работах с макронавесками, в частности при определении жира в рыбе и продуктах ее переработки (рекомендовано ГОСТ, 1955). Данных по определению сырого жира в планктонных организмах методом настаивания в литературе не было.

При определении содержания сырого жира в планктонных водорослях экстракцией из навесок, помещенных в бумажные пакеты, наблюдаются значительные расхождения между параллельными определениями, связанные с колебанием веса бумажных пакетов. Колебание веса бумажного пакета, взвешенного в стеклянном бюксе на аналитических весах, обычно составляет 0,0001—0,0002 г, а иногда 0,0004 г. Как правило, при работе с монокультурами фито- и зоопланктона количество материала весьма ограничено. Обычно навески для определения жира не превышают 3—5 мг. Если принять, что содержание жира в сухом веществе планктонных организмов составляет около 5%, то абсолютное количество жира в навеске 3—5 мг будет 0,00015—0,00025 г, т. е. составит величину одного порядка с колебанием веса бумажного пакета. Расчет показывает, что для избежания ошибки за счет колебания веса бумажных пакетов нужны навески порядка 0,5 г. При работе с монокультурами планктонных организмов это условие практически невыполнимо. При навесках порядка 3—5 мг ошибка анализа достигает 100% и даже более от искомой величины. В подобных случаях следует отказаться от экстракции в аппаратах Сокслета с использованием бумажных пакетов.

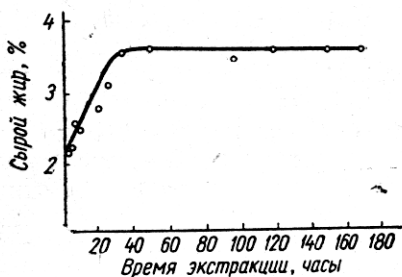
Изложенные соображения побудили нас искать другие пути определения сырого жира в планктоне. Способ экстракции настаиванием исключает применение бумажных пакетов. Исходя из этого, была разработана модификация метода настаивания для определения сырого жира в микронавесках.

Ход определения. Анализируемое вещество высушивают при 50° до постоянного веса. Высушивание необходимо, во-первых, для извлечения посторонних примесей, которые из влажного вещества удаляются легче, чем из сухого и, во-вторых, содержание сырого жира рассчитывается на сухой вес. Сухое вещество, подлежащее анализу, растирают до порошкообразного состояния в ступке из нержавеющей стали, после чего оно может храниться до анализа в стеклянных бюксах в эксикаторе с хлористым кальцием.

Навеску сухого растертого вещества в 3—10 мг берут на микроаналитических весах с точностью до $1 \cdot 10^{-5}$ г, помещают в пикнометр емкостью 5 мл и заливают сухим серным эфиром (на $\frac{2}{3}$ — $\frac{4}{5}$ объема пикнометра). В таком виде пробу оставляют для экстракции в плотно закрытом пикнометре (с резинкой, герметизирующей притертую стеклянную пробку) на 7 суток. В течение этого времени содержимое пикнометра не менее двух раз в день тщательно перемешивают. По истечении недели пикнометр доливают эфиром до метки, закрывают пробкой и снова перемешивают содержимое пикнометра. Затем дают отстояться осадку в течение четырех часов (до полного осветления раствора), после чего очень осторожно пипеткой отбирают из пикнометра 2 мл жидкости. Для этой цели применяется градуированная пипетка емкостью 2 мл с носиком, оттянутым в капилляр, свободно проходящий через горлышко пикнометра. Засасывание жидкости в пипетку и ее вытеснение производят с помощью пневматического устройства (резиновая груша, помещенная в зажим с микрометриче-

ским винтом). Из пипетки жидкость выливают в предварительно взвешенную чашечку для выпаривания, которую затем помещают в термостат и высушивают до постоянного веса при температуре 40° С. В данном случае применяли алюминиевые чашечки емкостью 2 мл и весом 0,9 г (во всех случаях взвешивание производили на микроаналитических весах СМД-1000, рассчитанных на максимальную нагрузку 1000 мг).

Параллельно проводили определение содержания нелетучих примесей в эфире. Для этого 2 мл этилового эфира выпаривали во взвешенной чашечке в термостате при 40° до полного удаления эфира и достижения постоянного веса. Хорошего качества эфир не должен при этом давать привеса, регистрируемого в пятом знаке. Расчет содержания сырого жира производят по формуле:



Извлечение сырого жира в зависимости от экспозиции.

$$\text{Процент сырого жира} = \frac{(a-b-c) \cdot 100,5}{2H},$$

где a — вес чашечки с нелетучим остатком, b — исходный вес чашечки, c — вес нелетучего остатка этилового эфира (из 2 мл), H — навеска.

При экстрагировании сырого жира путем настаивания необходимо знать время, достаточное для возможно более полного извлечения эфирорастворимых соединений. Согласно прописи Н. Я. Демьянова (1923), экстракцию сырого жира из макронавесок веществ растительного происхождения следует проводить в течение 8 суток. Для определения минимальной экспозиции при экстракции из планктона было проведено 12 определений сырого жира в планктонной водоросли *Coscinodiscus granii*. Время экстракции при этом изменялось от 2 до 168 часов. Результаты анализов представлены на рисунке, где по оси абсцисс отложено время экстракции в часах, а по оси ординат — найденное содержание сырого жира в процентах. Как видно из рисунка, минимальное время, которое достаточно для максимального извлечения сырого жира, в данном случае соответствует 32 часам. Отклонение точки, соответствующей экстракции в течение 96 часов, по-видимому, является случайным.

При определениях сырого жира в некоторых планктонных водорослях мы исходили из допущения, что эфирорастворимые вещества могут экстрагироваться из них медленнее, чем из *Coscinodiscus granii*. Поэтому экстракцию проводили не в течение минимального времени, найденного экспериментально, а в течение 7 суток, т. е. время экстракции брали со значительным (4—5-кратным) запасом.

В таблице приведены результаты параллельных определений сырого жира в различных образцах фитопланктона, выращенного в культурах (Ланская, Витюк, Рожанская, 1964). Все определения проводили в микронавесках, величина которых изменялась в довольно широких пределах — от 2,34 до 19,09 мг.

Из данных таблицы следует, что расхождения между результатами параллельных анализов при определении сырого жира в планктоне путем настаивания с эфиром, как правило, бывают невелики.

Отклонения в содержании сырого жира при параллельных определениях (в %)

Наименование	Навеска, мг	Содержание сырого жира, %	Отклонение от среднеарифметического значения, %
<i>Chroomonas</i> sp.	6,47	11,18	+0,58
»	6,64	11,05	-0,58
<i>Chlorella vulgaris</i>	2,34	5,34	+3,1
»	18,95	5,02	-3,1
<i>Chlorella vulgaris</i>	16,43	6,08	+0,33
»	6,21	6,04	-0,33
<i>Chlorella ellisoidea</i>	3,74	6,69	+0,15
»	3,37	6,67	-0,15
<i>Cryptomonadaceae</i>	7,26	8,61	-2,21
»	6,93	9,00	+2,21
<i>Cryptomonadaceae</i>	19,09	4,06	-0,49
»	6,69	4,10	+0,49
<i>Chlamydomonas depayperata</i>	9,44	7,22	+2,63
»	8,77	6,85	-2,63
<i>Chlamydomonas depayperata</i>	10,94	5,27	+0,57
»	10,60	5,21	-0,57
<i>Cryptomonas</i> sp.	14,36	5,04	-3,36
»	5,79	5,39	+3,36
<i>Cryptomonas</i> sp.	7,10	7,52	-1,38
»	10,88	7,73	+1,38

В данном случае из 20 анализов в 10 они отклонились от среднеарифметического значения не более чем на 0,6% и только в 4 анализах отклонение от среднеарифметического значения оказалось более 3%, однако не превышало 3,36%.

Изменение величины навески от 2,34 до 19,09 мг не оказывает существенного влияния на результаты определения. Так, содержание сырого жира в *Chlorella vulgaris*, найденное при навеске 2,34 мг, составляет 5,34%, а при навеске 18,95 мг оно составляет 5,02%. Еще более близкие результаты получены для проб *Cryptomonadaceae*, где при навесках 19,09 и 6,69 мг найденное содержание сырого жира составило 4,06 и 4,10% соответственно.

Выводы

1. Разработана методика определения сырого жира в планктоне, основанная на экстрагировании этиловым эфиром путем настаивания микронавесок порядка 3—10 мг.

2. Величина отклонений при параллельных определениях сырого жира в планктоне описанным методом колеблется в пределах 0,15—3,36% относительно среднеарифметического значения.

3. Изменение величины навески в пределах 2,34—19,09 мг не влияет на результат определения.

4. Минимальная экспозиция, необходимая для возможно более полного извлечения этиловым эфиром сырого жира из *Coscinodiscus granii*, равна 32 часам.

ЛИТЕРАТУРА

- Виноградова З. А., 1959, Біохімічний склад планктону північно-західної частини Чорного моря, Наук. зап. Одеської біол. ст. АН УРСР, вип. 1.
- Ланская Л. А., Витюк Д. М., Рожанская Л. И., 1963, Некоторые данные о химическом составе культур морских планктонных водорослей, выращенных в условиях естественного и искусственного освещения, Тр. Севаст. биол. ст., т. XVII.
- Демьянов Н. Я., 1923, Общие приемы анализа растительных веществ, Госуд. изд-во, М.—Пг.
- Ланская Л. А., Пшенина Т. И., 1961, Содержание белка, жира, углеводов и зола в некоторых массовых планктонных водорослях Черного моря, выращенных в культурах, Тр. Севаст. биол. ст., т. XIV.
- Маликова Е. М., 1956, Пищевая ценность некоторых беспозвоночных как корма для рыб, Биохимия, т. XXV, вып. 2.
-