

УДК 543.062:[547.915.5+547.917:556.531.4]

Лозовик П.А., Ефремова Т.А., Сабылина А.В.
Институт водных проблем Севера КарНЦ РАН
(г. Петрозаводск)

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ УГЛЕВОДОВ И ЛИПИДОВ В ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДАХ

P. Lozovik, T. Efremova, A. Sabylina
Northern Water Problems Institute of the Karelian Research Center,
Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk

QUANTITATIVE DETERMINATION OF CONTENT OF CARBOHYDRATES AND LIPIDS IN SURFACE WATERS

Аннотация. Для количественного определения содержания общих углеводов и липидов в поверхностных водах модифицированы методики их определения (углеводов с L-триптофаном и липидов с фосфованилиновым реактивом), принятые для морских вод. В связи с жесткими условиями проведения реакций, положенных в основу методов, для получения воспроизводимых результатов анализ проводился по методу добавки при одновременном термостатировании проб и стандартных растворов.

Ключевые слова: углеводы, липиды, органическое вещество, поверхностные воды, спектрофотометрия.

Abstract. Methods for quantitative determination of total carbohydrates and lipids in marine waters have been modified for surface waters (carbohydrates with L-tryptophan and lipids with phosphovanillin reagents). Analysis was carried out by using the addition technique and simultaneous thermostating of standard and water samples that allowed us to obtain reproducible data.

Key words: carbohydrates, lipids, organic matter, surface water, spectrophotometry.

Органическое вещество (ОВ) в природных водах имеет в основном два источника происхождения. Это аллохтонное ОВ, поступающее с водосбора как продукт разложения наземной растительности и автохтонное ОВ, которое образуется в результате протекания продукционно-деструкционных процессов в самих водоемах. Углеводы и липиды являются составной частью автохтонного ОВ, а гумусовые вещества – аллохтонного.

Для определения углеводов и липидов в поверхностных водах были взяты за основу методики, широко применяемые в морской гидрохимии [2, с. 123]: L-триптофановый – для углеводов [3, с. 385-395], фосфованилиновый – для липидов [4, с. 1-13]. Выяснилось, что использование их напрямую для поверхностных вод не представляется возможным в связи с получением невоспроизводимых результатов анализа. По всей видимости, это связано с мешающим влиянием аллохтонного ОВ, которое, как известно, отсутствует в морских водах.

Следует отметить, что выделение и прямое определение сложных углеводов, содержащихся в биологических образцах, связано с большими экспериментальными трудностями. В настоящее время в биохимии не существует прямых методов определения углеводов. Об их содержании судят по количеству продуктов кислотного гидролиза, в результате которого происходит расщепление сложных углеводов до простейших с дальнейшим их превращением в производные фурфурола, которые затем определяют количественно.

В нашем случае использование методики [3, с. 385-395], показало, что в некоторых про-

© Лозовик П.А., Ефремова Т.А., Сабылина А.В., 2013.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований № 11 ОНЗ РАН «Вода и водные ресурсы: системообразующие функции в природе и экономике».

бах воды с низким содержанием углеводов оптическая плотность растворов была меньше, чем в холостой пробе. Следующее обстоятельство, которое имело место, – это зачастую разный угол наклона градуировочного графика, но при этом высокая степень корреляции оптической плотности с концентрацией углеводов. При этом значение оптической плотности для холостой пробы было всегда за пределами графика. Причины таких отличий, по-видимому, связаны с особенностями химической реакции, положенной в основу метода, и с условиями ее проведения.

При анализе липидов по методике [4, с. 1-13] было установлено, что при построении градуировочных графиков на стандартных растворах олеиновой кислоты получалось постоянное значение ctg угла наклона графика, но разное его положение относительно начала координат. Как и в случае углеводов, была попытка осуществить анализ по градуировочному графику с добавкой и без добавки стандартного раствора олеиновой кислоты к анализируемому образцу. Выяснилось полное несоответствие результатов анализа: расчетное количество добавленной олеиновой кислоты оказывалось иногда в 2 раза больше, чем истинное.

В результате проведенной работы было выявлено, что использование напрямую методик, которые широко используются в морской гидрохимии для определения углеводов и липидов в поверхностных водах, невозможно, и потребовалась модификация методов их анализа, что и являлось целью работы.

Экспериментальная часть

Методика определения общих углеводов с L-триптофаном. Для получения воспроизводимых результатов анализа при определении углеводов в поверхностных водах одновременно осуществляется их анализ в исходной воде и в стандартных растворах глюкозы. Две пробы воды объемом 2 мл помещают в термостойкие колбы ($V=50$ мл), затем добавляют по 3 мл L-триптофанового реактива, смесь тщательно перемешивают и

ставят в термостат ($105\text{ }^{\circ}\text{C}$). Параллельно с пробой воды аналогичным образом обрабатывают 3 стандартных раствора (10, 15, 20 мг/л) и две пробы с добавкой стандартного раствора (10 мг/л). Через 30 минут растворы снимают, охлаждают до комнатной температуры и измеряют оптическую плотность образцов при $\lambda = 540$ нм относительно дистиллированной воды, в кюветах толщиной 2 см.

Реактивы: L-триптофановый реактив. В небольшом объеме концентрированной серной кислоты (около 100 мл) растворяют 25 г борной кислоты. Отдельно в 100 мл концентрированной H_2SO_4 растворяют 5 г L-триптофана. После полного растворения реактивов оба раствора сливают вместе и объем доводят концентрированной H_2SO_4 до 1 л. Реактив готовили на серной кислоте марки ос.ч. Его можно использовать только на третьи сутки и не более 1 месяца.

Основной стандартный раствор глюкозы (10 г/л). 1 г глюкозы растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Промежуточный раствор глюкозы (100 мг/л). Основной раствор разбавляют в 100 раз дистиллированной водой. Рабочий раствор глюкозы (10 мг/л) получают путем 10-кратного разбавления промежуточного раствора.

Методика определения общих липидов с фосфованилиновым реактивом. Липиды из воды ($V = 400$ мл) экстрагируют три раза по 20 мл смесью Фолча (хлороформ-метанол-этанол, 2:1:1). Объединенные экстракты центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин, что позволяет добиться хорошего расслоения жидких фаз. Переносят центрифугат в делительную воронку, отделяют слой хлороформа от воды. Промывают остаток воды 2 мл CHCl_3 и присоединяют его к основному раствору. После этого экстракт выпаривают досуха на песчаной бане, и липиды растворяют в 5 мл CHCl_3 . Далее берут 7 пробирок из термостойкого стекла. В каждую из них приливают по 1 мл концентрированной H_2SO_4 марки ос.ч. В первую пробирку добавляют – 2 мл CHCl_3 ; во вторую, третью и четвертую пробирки – по 1 мл CHCl_3 и по 1 мл стандартного раствора олеиновой кислоты (30,

60, 90 мкг/мл); в 5 пробирку – 1 мл CHCl_3 и 1 мл экстракта, а в 6,7 пробирки – по 1 мл экстракта и по 1 мл стандартного раствора (30 и 60 мкг/мл). Содержимое пробирок перемешивают и ставят в термостат (105 °С) на 30 мин. Затем пробирки охлаждают и добавляют в них по 5,0 мл фосфованилинового реактива. Тщательно перемешивают растворы и ставят в темное место на 40 мин. После чего содержимое пробирок снова перемешивают и фотометрируют при $\lambda = 530$ нм и $\lambda = 460$ нм в кюветах толщиной 2 см относительно дистиллированной воды.

Реактивы:

- концентрированная серная кислота, марки ос.ч.;
- концентрированная ортофосфорная кислота, марки ос.ч.;
- ванилин (пищевой), перекристаллизованный из дистиллированной воды;
- оливковое масло, пропущенное через колонку с оксидом алюминия;
- фосфованилиновый реактив: 2 г ванилина растворяют в 150 мл воды, затем объем доводят до 1 л концентрированной H_3PO_4 (его можно использовать только на третьи сутки, устойчив в течение 1 месяца).

Стандартный раствор оливкового масла в хлороформе: взвешивают 0.0750 г оливкового масла на аналитических весах и количественно переносят в мерную колбу на 25 мл, доводят объем до метки хлороформом. Концентрация раствора равна 3,0 мг/мл. Рабочий раствор оливкового масла: 5 мл стандартного раствора доводят хлороформом до 100 мл. Его концентрация равна 150 мкг/мл.

Результаты и их обсуждение

Определение углеводов. Время и температура нагрева были несколько изменены по сравнению с оригинальной методикой [3, с.385-395]. Нагрев осуществлялся при 105°С в течение 30 минут. По методике [3, с.385-395] температура составляет 100°С, а время 15 минут. Увеличение температуры и времени позволило существенно повысить чувствительность метода. Так, при экспозиции проб

в термостате при 105°С в течение 10, 15, 20 и 30 минут уменьшалось значение ctg угла наклона градуировочного графика зависимости оптической плотности от концентрации глюкозы в следующей последовательности: 79, 71, 61, 48. В тоже время увеличение продолжительности реакции не приводило к изменению содержания углеводов в пробе в результате их термического разложения. Как уже отмечалось, для получения воспроизводимых данных анализ углеводов в исходной воде и с добавкой к ней раствора глюкозы осуществлялся одновременно со стандартными растворами. Обработка данных результатов анализа углеводов осуществлялась следующим образом. По оптической плотности стандартных растворов глюкозы строится градуировочный график и определяется уравнение линейной регрессии (рис. 1).

Относительно графика на рис. 1 наносятся две точки: одна, отвечающая оптической плотности пробы (A_1), а вторая – пробы с добавкой (A_2). Через эти точки проводится прямая линия таким образом, чтобы она проходила параллельно калибровочному графику, а точки A_1 и A_2 были равноудаленными от нее. Это позволяет найти среднее значение оптической плотности, связанной с поглощением света продуктов реакции углеводов с L-триптофаном. Далее используют коэффициент, полученный по градуировочному графику для стандартных растворов глюкозы, и рассчитывается количество углеводов в пробе воды. Непосредственно для пробы, представленной на рис. 1, расчет выполняется следующим образом:

$$\bar{A}_1 = A_1 - A_{\text{хол}} = 0,230 - 0,115 = 0,115$$

$$\bar{A}_2 = A_2 - A_{\text{стандарта}} = 0,413 - (0,023 \cdot 10 + 0,115) = 0,068.$$

Поскольку A_2 получена для образца воды с добавкой стандартного раствора глюкозы, необходимо учесть кратность разбавления. В нашем случае она составляла 1,05, поэтому значение \bar{A}_2 должно быть увеличено в 1,05 раза. Тогда среднее значение $\bar{A} = (\bar{A}_1 + 1,05 \bar{A}_2) / 2 = 0,115 + 1,05 \cdot 0,068) / 2 = 0,093$. Далее

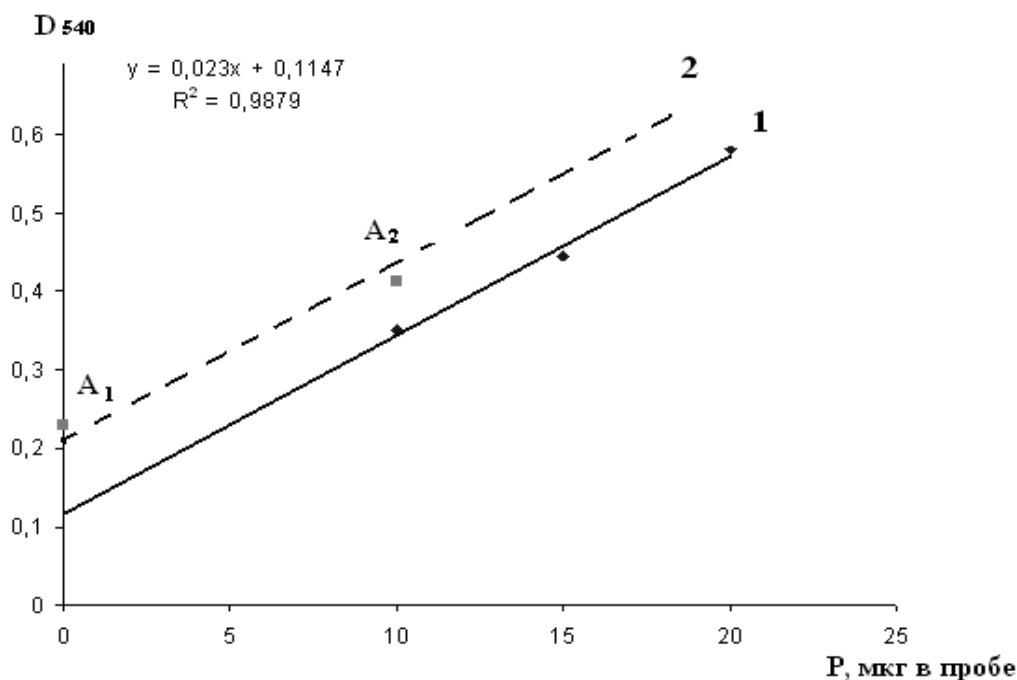


Рис. 1. Градуировочный график для определения углеводов:

1 -- стандартные растворы; 2 – проба воды с добавкой (A_2) и без добавки стандартного раствора (A_1)

необходимо ввести поправку на поглощение пробы воды в результате обработки ее серной и борной кислотами ($A_{\text{хол.пробы}}$). Для данной пробы, $A_{\text{хол.пробы}} = 0,024$. В таком случае истинное количество углеводов в пробе составит:

$$P = (\bar{A} - A_{\text{хол.пробы}}) \text{ctg } \varphi = (0,093 - 0,024) * 43,5 = 3,00 \text{ мкг в пробе.}$$

С учетом того, что для анализа использовалось 2 мл пробы, истинная концентрация углеводов составит $C = 3,0 / 2 = 1,5$ мг/л. Необходимость проведения такой процедуры анализа связана с тем, что $\text{ctg } \varphi$ для градуировочных графиков не является постоянной величиной. Его изменение за весь период анализов составил от 40 до 54 (среднее 48,0). С одной стороны, это связано с жесткими условиями проведения реакции, а с другой – со старением L-триптофанового реактива.

Для установления метрологических характеристик метода был проведен 6 раз анализ одной и той же пробы природной воды с добавкой к ней воды с планктоногенным ОВ. Были получены следующие данные по содержанию углеводов в ней: 8,6; 9,0; 9,8; 10,6; 9,7;

9,6 (среднее 9,6 мг/л). Стандартное отклонение составило 0,7 мг/л, а границы интервала относительной погрешности определения $\pm \delta - 5,8\%$ ($n = 6, P = 0,95$).

Определение липидов. Анализ спектров поглощения продуктов реакции липидов с фосфованилиновым реактивом как на стандартных растворах олеиновой кислоты, так и на экстрактах из природной воды показал, что их положение для растворов с одной и той же концентрацией липидов не является постоянным. Для исключения этого фактора использовалось не абсолютное значение оптической плотности в максимуме спектра поглощения ($\lambda_{\text{max}} = 530$ нм), а разность A_{max} и A_{min} . Последняя величина оптической плотности соответствует минимуму в спектре поглощения продуктов реакции ($\lambda_{\text{min}} = 460$ нм). При этом нет необходимости осуществлять подготовку холостого экстракта, как это принято в оригинальной методике [4, с. 1-13]. Кроме того, для устранения мешающего влияния примесей и получения воспроизводимых результатов анализа, определение ли-

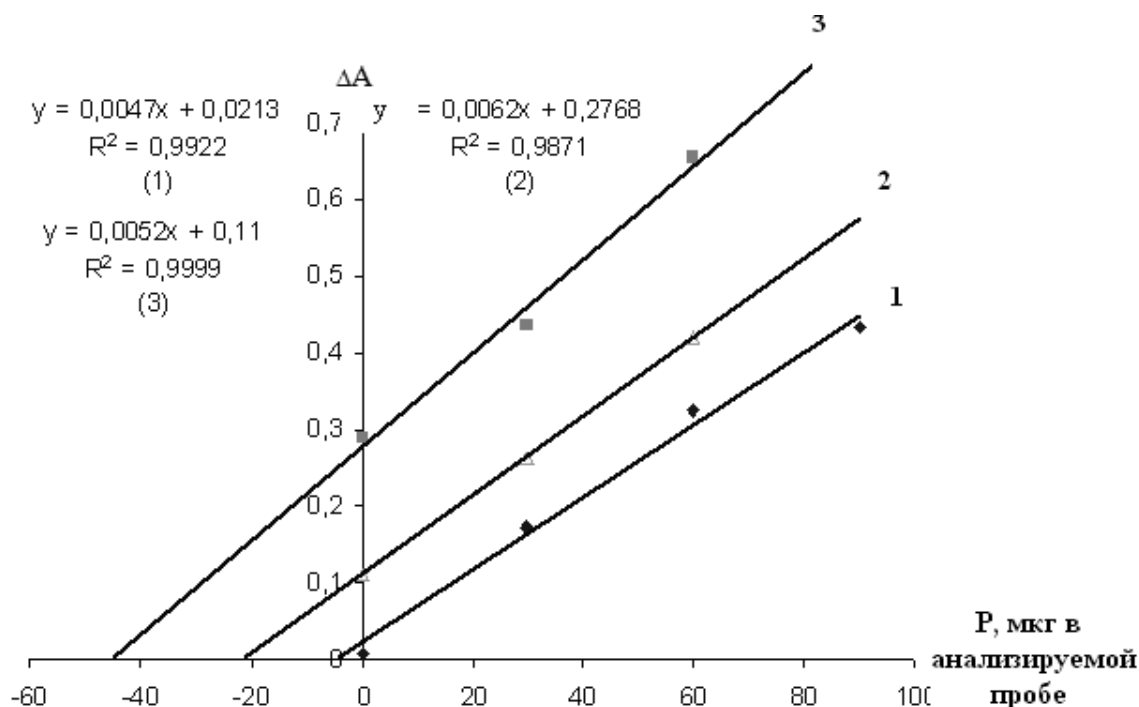


Рис. 2. Градуировочные графики для определения липидов:
1 – стандартные растворы; 2, 3 – экстракты из воды природных объектов

пидов осуществляли по методу добавки [1, с. 544]. Для этого получали 2 уравнения линейной регрессии (для трех стандартных растворов, исходной пробы и с добавками к ней олеиновой кислоты). По разности концентрации, отвечающих нулевому значению $\Delta A = A_{530} - A_{460}$ для двух указанных выше градуировочных графиков, находили количество липидов в исходной пробе (см. рис. 2).

Непосредственно для проб, представленных на рис. 2, расчет выполнялся следующим образом:

$$Y_1 = 0.0047x + 0.0213 = 0, \quad X_1 = -4.53,$$

$$Y_2 = 0.0052x + 0.110 = 0, \quad X_2 = -21.15,$$

$$P_2 = -4.53 - (-21.15) = 16.6 \text{ мкг липидов в } 1 \text{ мл экстракта,}$$

$$C_2 = \frac{16.6 * 5}{400} = 0,21 \text{ мкг/мл или } 0,21 \text{ мг/л,}$$

$$Y_3 = 0.0062x + 0.277 = 0, \quad X_3 = -44.65,$$

$$P_3 = -4.53 - (-44.65) = 40.1 \text{ мкг липидов в } 1 \text{ мл экстракта,}$$

$$C_3 = \frac{40.1 * 5(V_{\text{экстракта, мл}})}{400(V_{\text{пробы, мл}})} = 0,50 \text{ мкг/мл или } 0,50 \text{ мг/л.}$$

В конечном итоге приведенная выше процедура анализа липидов в поверхностных водах позволила добиться получения воспроизводимых данных по их содержанию в образцах воды. Последнее подтверждается и результатами метрологических испытаний. Для этого был проведен 5 раз анализ одной и той же пробы природной воды с добавкой к ней воды с планктоногенным ОВ. В итоге были получены следующие результаты по содержанию липидов в ней: 0,56; 0,49; 0,62; 0,61; 0,59 мг/л (среднее 0,57 мг/л). Стандартное отклонение составило 0,05 мг/л, границы интервала относительной погрешности $\pm \delta$ - 8,8 % ($n = 5, P = 0,95$).

Таким образом, используя при определении углеводов и липидов одновременно метод градуировочной зависимости и метод добавок, удалось добиться получения воспроизводимых результатов анализа. Стандартное отклонение для углеводов при их

содержании 9,6 мг/л составило 0,7 мг/л, а относительная погрешность определения – 5,8 %, для липидов при их содержании 0,57 мг/л – 0,05 мг/л и 8,8 % соответственно.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Отто М. Современные методы аналитической химии. – 3-е изд. – М.: Техносфера, 2008. – 544 с.
2. Руководство по современным биохимическим методам исследования водных экосистем, перспективных для промысла и марикультуры. – М.: ВНИРО, 2004. – 123 с.
3. Josefsson B., Uppström Z., Östling Y. Automatic spectrophotometric procedures for the total amount of dissolved carbohydrates in sea water // Deep-Sea Res. – 1972. – V. 19. – P. 385–395.
4. Johnson K.M., Sieburth J., McN. Dissolved carbohydrates in seawater // Mar. Chem. – 1977. – V. 5. – P. 1-13.