

ОПТИКА И СПЕКТРОСКОПИЯ. ЛАЗЕРНАЯ ФИЗИКА

Анализ растворенного органического вещества пресноводных озер Карелии обратно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией с одновременной регистрацией оптической плотности и флуоресценцииД. А. Хунджуа¹, С. В. Пацаева^{1,a}, О. А. Трубецкой^{2,b}, О. Е. Трубецкая³¹Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет, кафедра общей физики. Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2.²Институт фундаментальных проблем биологии РАН. Россия, 142290, Московская обл., г. Пушкино.³Филиал Института биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН. Россия, 142290, Московская обл., г. Пушкино.E-mail: ^aspatsaeva@mail.ru, ^bolegi03@yahoo.com

Статья поступила 21.06.2016, подписана в печать 01.08.2016.

Спектрально-оптические свойства фракционированных компонентов растворенного органического вещества (РОВ) трех пресноводных озер Карелии были изучены с использованием обратно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) с одновременным детектированием спектров поглощения и флуоресценции в режиме реального времени. Было показано, что препараты РОВ качественно сходны, но различаются количественным соотношением составных компонентов и содержат по крайней мере три типа флуорофоров: 1) гидрофильный «гуминоподобный» флуорофор(ы) с максимумом испускания в области 420 нм и полосой поглощения 260–270 нм; 2) гидрофобный «гуминоподобный» флуорофор(ы) с максимумом испускания в области 450 нм, в спектре поглощения данного флуорофора не было выявлено характеристических максимумов в области от 220 до 400 нм; 3) флуорофор со спектром «протеиноподобного» типа с максимумом испускания в области 340–350 нм, характерным для белков и пептидов, содержащих триптофан.

Ключевые слова: обратно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ ВЭЖХ), абсорбционная спектроскопия, флуоресцентная спектроскопия, растворенное органическое вещество (РОВ) природной воды, гидрофобные и гидрофильные флуорофоры.

УДК: 535.37. PACS: 42.25.Bs, 82.80.Bg.

Введение

Растворенное органическое вещество (РОВ) — обязательный и стабильный органический компонент природных водных источников (морей, океанов, рек, озер, болот и т. д.) — является одним из основных экотекторов нашей планеты [1, 2]. Поглощение РОВ солнечной энергии экспоненциально увеличивается с уменьшением длины волны падающего света [3–5], в значительной мере обеспечивая защиту живых организмов от воздействия ультрафиолетовой радиации в воде и на суше. Одновременно РОВ выполняет токсикотекторные функции водных экосистем, связывая и инактивируя пестициды, гербициды, тяжелые металлы, полициклические углеводороды и другие загрязнители [6, 7]. Флуоресценция РОВ природной воды в течение десятков лет используется для контроля динамики состояния природных водных экосистем и очистки технологических водных сред [8–14]. Метод флуоресцентной спектроскопии может использоваться в дистанционном режиме и обладает определенной селективностью за счет возможности

изучать эмиссию разных типов флуорофоров, варьируя длину волны возбуждения. Сочетание абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии может дать важную информацию о структуре индивидуальных флуорофоров и хромофоров. Однако при изучении таких сложных природных комплексов, каковыми являются РОВ, необходимо их использование в совокупности с другими методами исследований. В последние тридцать лет для анализа препаратов РОВ различного происхождения используется гидрофобная хроматография низкого давления [15–17] и обратно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ ВЭЖХ) [18–23], где фракционирование вещества осуществляется на основании различий в гидрофобности/гидрофильности. Наиболее информативным является фракционирование РОВ методом ОФ ВЭЖХ с одновременной регистрацией спектров оптической плотности и флуоресценции фракционируемого материала в режиме реального времени [23, 24]. Такой подход стал возможным в связи с применением для ВЭЖХ современных фотодиодных абсорбционных и флуоресцентных детек-

торов последнего поколения, позволяющих не только вести регистрацию хроматографии при различных длинах волн поглощения и/или флуоресцентной эмиссии, но и анализировать спектры поглощения и флуоресценции в каждой точке хроматограммы.

Целью настоящей работы было использование ОФ ВЭЖХ с одновременным детектированием спектров поглощения и флуоресценции в режиме реального времени для изучения спектрально-оптических свойств фракционированных компонентов РОВ из нескольких пресноводных озер Карелии.

1. Эксперимент

1.1. Отбор проб воды и приготовление образцов РОВ

Образцы приповерхностного слоя воды отбирали в августе 2013 г. в трех пресноводных озерах Карелии: Онежском в районе Кондопожской губы, Верхнем и Водопроводном в районе Беломорской биологической станции им. Н. А. Перцова МГУ им. М. В. Ломоносова. Онежское озеро — второй по величине пресноводный водоем в Европе. В последнее время антропогенное воздействие на экосистему Онежского озера возрастает, особенно в северо-западной части озера, где расположены Петрозаводский, Кондопожский и Медвежьегорский промышленные районы. Два небольших ультрапресных озера, Верхнее и Водопроводное, расположены вдалеке от промышленных объектов и могут служить в качестве источника РОВ в отсутствие антропогенной нагрузки. Они служат реперными точками для отбора проб при изучении водоемов, находящихся на разной стадии изоляции от Белого моря [25, 26]. Пробы воды хранили в плотно закрытых пластиковых бутылках в темноте при температуре + 4 °С. Фильтрацию проб воды проводили с помощью одноразовых целлюлозных фильтров (Millipore) с размером пор 0.45 мкм. По 100 мл каждого образца отфильтрованной природной воды высушивали с помощью лиофильной сушки (Hetosicc), сухое вещество растворяли в 10 мМ фосфатном буфере, рН 6.5, приготовленном путем смешивания трех объемов раствора 10 мМ Na_2HPO_4 (рН 9.8) и семи объемов раствора 10 мМ NaH_2PO_4 (рН 4.5). Маточные концентрированные растворы озерных РОВ хранили в темных стеклянных пузырьках при температуре + 4 °С до последующих спектральных и хроматографических анализов.

1.2. Спектры поглощения и флуоресценции исходных препаратов РОВ

Спектры поглощения образцов исходной и фильтрованной воды, а также РОВ трех пресноводных озер Карелии измеряли на спектрофотометре Cary 3 (Varian) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см в спектральном диапазоне 200–600 нм, образцы природной воды — относительно дистиллированной H_2O , образцы РОВ — относительно 10 мМ фосфатного буфера, рН 6.5, в котором были

растворены образцы РОВ. Спектры испускания флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian) в кварцевой кювете длиной 1 см при длине волны возбуждения 270 нм. Для исключения влияния эффекта внутреннего фильтра, приводящего к кажущемуся снижению интенсивности флуоресценции и сдвигу максимума испускания в длинноволновую область, небольшую аликвоту маточных растворов РОВ перед измерениями спектров поглощения и флуоресценции разбавляли 10 мМ фосфатным буфером, рН 6.5, до оптической плотности 0.05 отн. ед. при длине волны 270 нм. Контрольный спектр флуоресценции фосфатного буфера вычитали из спектра образца.

1.3. Аналитическая обратно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ ВЭЖХ) с одновременной регистрацией спектров поглощения и флуоресценции в режиме реального времени

Аналитическую ОФ ВЭЖХ образцов РОВ трех пресноводных озер Карелии проводили на приборе Waters ACQUITY™ UltraPerformance Liquid Chromatographic system на колонке UPLC® ВЕН C₁₈ размером 2.1 × 100 мм (Waters) с привитыми линейными алкильными насыщенными углеводородными цепями C₁₈H₃₇. Скорость элюции составляла 0.3 мл/мин. Метанол и 10 мМ фосфатный буфер с рН 6.5 использовали для формирования ступенчатого градиента: от 0 до 2.22 мин через колонку пропускали фосфатный буфер, на 2.22 мин хроматографии концентрацию метанола сделали равной 10%, на 3.33 мин — 20%, на 4.45 мин — 30%, на 5.56 мин — 40%, на 6.67 мин — 50%, на 7.7 мин — 60%, на 11.12 мин — 70%, на 13.89 мин — 100%, на 20 мин концентрацию метанола снизили до 0% и колонку промывали 100%-м фосфатным буфером в течение 10 мин. Регистрацию оптической плотности и флуоресценции проводили с помощью фотодиодных детекторов поглощения и флуоресценции (оба прибора фирмы Waters). Флуоресцентный детектор был присоединен последовательно к детектору поглощения, при этом задержка регистрации флуоресценции по сравнению с поглощением составляла 0.12 мин. Детектор поглощения осуществлял регистрацию абсорбции в диапазоне длин волн 210–400 нм, а флуоресцентный детектор — в диапазоне испускания 300–600 нм при длине волны возбуждения 270 нм.

Спектры поглощения и флуоресценции для каждого отдельного хроматографического пика извлекали из данных фотодиодных детекторов поглощения и флуоресценции. Для исключения возможных искажений в спектрах, связанных с влиянием подвижной фазы (смеси фосфатного буфера и метанола), проводили контрольную хроматографию без РОВ и из спектра каждого пика вычитали соответствующий спектр буфера с аналогичным временем выхода с колонки.

Степень гидрофобности исследуемых образцов РОВ оценивали по двум критериям: 1) по степени относительной необратимой адсорбции РОВ на гидрофобной колонке. Для этого каждый образец наносили на колонку в одинаковом объеме 0.005 мл с одинаковой оптической плотностью 6.0 отн. ед. при 270 нм, степень необратимой адсорбции оценивали на основании сравнения общих площадей хроматограмм: чем больше площадь, тем меньше вещества необратимо адсорбировалось на колонке; 2) на основании соотношения площадей гидрофобных и гидрофильных пиков хроматограмм РОВ: чем больше доля гидрофильного пика, тем выше гидрофильность исследуемого образца. Площадь отдельных пиков и общую площадь хроматограмм определяли с помощью программы Excel. Различия в хроматограммах нескольких повторений одного и того же образца РОВ были пренебрежимо малы, разброс амплитуд пиков хроматограмм не превышал 2% от измеренной величины оптической плотности или интенсивности флуоресценции.

2. Результаты и обсуждение

2.1. Спектры поглощения и флуоресценции РОВ трех пресноводных озер Карелии

Спектры поглощения воды приповерхностного слоя из трех пресноводных озер Карелии не обладают характерными особенностями, как и все исследованные ранее нами и другими исследователями образцы природной воды различного генезиса и географического происхождения [4, 10, 12, 18]. Форма спектров не меняется как после фильтрации природной воды, так и после лиофилизации и растворения РОВ в фосфатном буфере: спектры поглощения остаются бесструктурными с монотонно убывающей оптической плотностью в направлении увеличения длины волны, при этом в области 260–270 нм все образцы имеют слабо выраженное «плечо» (рис. 1, а). В то же время спектры поглощения исследованных препаратов отличаются наклоном кривой, в качестве количественной характеристики степени наклона было использовано отношение оптических плотностей на длине волн 270 и 400 нм — A_{270}/A_{400} . Наибольшая степень крутизны была отмечена для РОВ Онежского озера (таблица), что может являться результатом наличия в нем ароматических соединений, поглощающих в области спектра 270–280 нм.

Спектры флуоресценции исходных препаратов РОВ трех пресноводных озер Карелии с возбуждением на 270 нм состоят из двух полос с перекрывающимися эмиссионными максимумами (λ_{\max}) в синей видимой и ультрафиолетовой (УФ) областях спектра (рис. 1, б и таблица). Интенсивную широкую полосу испускания в синей области называют «гуминоподобной» флуоресценцией, так как эмиссия с длиной волны максимума $\lambda_{\max} > 380$ нм, зависящей как

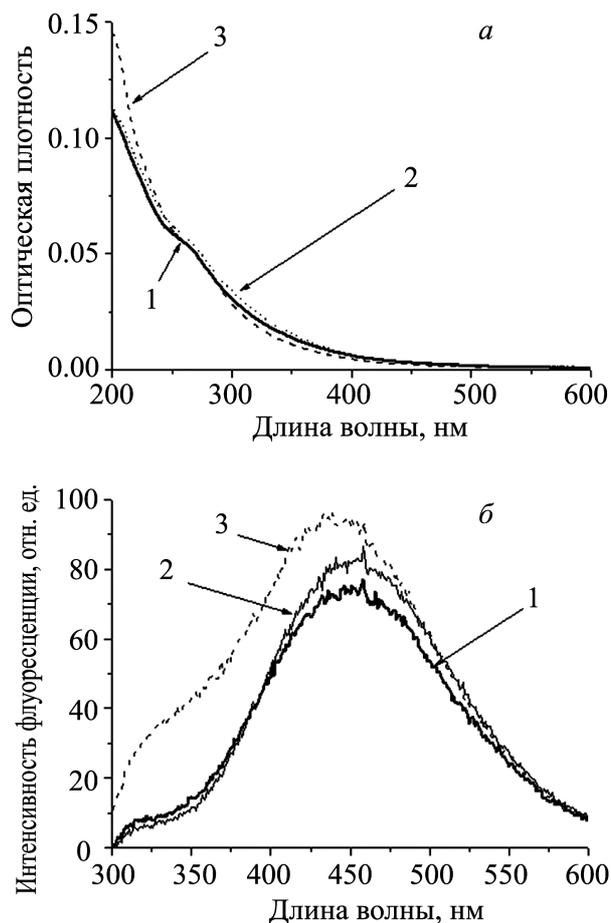


Рис. 1. Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) РОВ оз. Верхнего (1), Водопроводного (2) и Онежского (3) после лиофилизации и растворения образцов в 10 мМ фосфатном буфере, рН 6.5, $\lambda_{\text{ex}} = 270$ нм

от происхождения образца, так и от длины волны возбуждения [4, 10, 12, 14, 18], характерна для всех без исключения препаратов, называемых гуминовыми веществами. Менее интенсивную полосу с эмиссией в УФ-области, более выраженную в водных образцах РОВ, чем в почвенных, называют «протеиноподобной» в связи с тем, что максимум испускания приходится на диапазон 300–350 нм и максимальная интенсивность испускания соответствует длинам волн возбуждения 230 и 270–280 нм. Для данной полосы λ_{\max} не зависит от длины волны возбуждения. Такие параметры характерны для флуоресценции белков, пептидов или индивидуальных ароматических аминокислот триптофана, тирозина или фенилаланина [4, 10, 12, 27]. В препарате РОВ Онежского озера как «протеиноподобная», так и «гуминоподобная» полосы флуоресценции были несколько более интенсивны по сравнению с таковыми у РОВ Верхнего и Водопроводного озер. Кроме того, у препарата РОВ Онежского озера «гуминоподобная» полоса флуоресценции сдвинута в более коротковолновую область ($\lambda_{\max} = 435$ нм) по сравнению с двумя другими образцами РОВ из Верхнего и Водопроводного озер с $\lambda_{\max} = 450$ нм (таблица).

Отношение оптических плотностей при 270 и 400 нм (A270/A400), длина волны максимума флуоресценции λ_{\max} при $\lambda_{\text{ex}} = 270$ нм для РОВ трех пресноводных озер Карелии и их хроматографических пиков 1–6 при регистрации флуоресценции, относительная площадь хроматографических пиков 1–6, подсчитанная при регистрации оптической плотности для длин волн $\lambda_{\text{reg}} = 220, 270$ и 370 нм

Образец РОВ	A270/A400	λ_{\max} , нм, при $\lambda_{\text{ex}} = 270$ нм		Отн. площадь пиков, %, при разных λ_{reg}		
		«Протеиноподобная» полоса	«Гуминоподобная» полоса	220 нм	270 нм	370 нм
Озеро Верхнее	7.57	плечо 330	450			
Гидрофильный пик 1	15.12	—	420 (плечо 450)	49.6	50.6	39.9
Пик 2	6.81	—	450 (плечо 420)	13.9	14.0	16.1
Пик 3	6.50	—	450 (плечо 420)	16.9	16.7	20.0
Пик 4	5.88	—	450 (плечо 420)	10.6	10.3	13.0
Пик 5	5.87	плечо 330	450 (плечо 420)	5.8	5.5	7.1
Пик 6	5.99	плечо 330	450 (плечи 420 и 380)	3.2	2.9	3.9
Σ гидрофобных пиков 2–6				50.4	49.4	60.1
Озеро Водопроводное	7.91	плечо 330	450			
Гидрофильный пик 1	12.96	—	420 (плечо 450)	50.5	51.7	43.1
Пик 2 (14.3%)	6.05	—	450 (плечо 420)	14.2	14.4	16.5
Пик 3 (16.3%)	6.06	—	450 (плечо 420)	16.7	16.5	19.3
Пик 4 (9.8%)	5.67	—	450 (плечо 420)	10.3	9.8	11.9
Пик 5 (5.0%)	5.88	—	450 (плечо 420)	5.5	5.1	6.1
Пик 6 (2.5%)	6.32	плечо 330	450 (плечи 420 и 380)	2.9	2.5	3.0
Σ гидрофобных пиков 2–6				49.5	48.3	56.9
Озеро Онежское	9.65	плечо 330	435			
Гидрофильный пик 1	21.17	—	420 (плечо 450)	55.4	57.4	45.7
Пик 2 (11.7%)	9.21	—	430 (плечо 450)	10.6	11.7	14.2
Пик 3 (13.5%)	9.00	—	430 (плечо 450)	13.2	13.5	17.3
Пик 4 (8.7%)	9.70	340	плечи 420 и 450	9.6	8.7	11.6
Пик 5 (5.5%)	12.85	345	—	7.0	5.5	7.0
Пик 6 (3.1%)	16.01	345	—	4.3	3.1	4.2
Σ гидрофобных пиков 2–6				44.6	42.6	54.3

2.2. Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ ВЭЖХ) РОВ трех пресноводных озер Карелии

Исходные образцы РОВ, растворенные в фосфатном буфере, были фракционированы с помощью ОФ ВЭЖХ в ступенчатом градиенте метанола. На рис. 2, а, б, в представлены хроматограммы РОВ трех озер Карелии с регистрацией поглощения при 270 нм. Каждая хроматограмма содержит 6 пиков, вышедших с колонки в первые 9 мин фракционирования. Первый, не адсорбирующийся на ОФ-колонке пик, смываемый водным фосфатным буфером, является наиболее гидрофильным.

Остальные пики с номерами 2–6 были названы гидрофобными, так как были элюированы фосфатным буфером с добавлением более гидрофобного по отношению к воде метанола со ступенчатым увеличением его концентрации от 10 до 50%. Дальнейшее повышение содержания метанола в подвижной фазе не приводило к дополнительной элюции РОВ с колонки во всех исследованных образцах. Форма хроматограммы (т.е. количество и времена выхода элюированных пиков) не менялась в зависимости от длины волны регистрации поглощения (от 210 до 400 нм). Независимо от длины волны регистрации поглощения в процессе хроматографии,

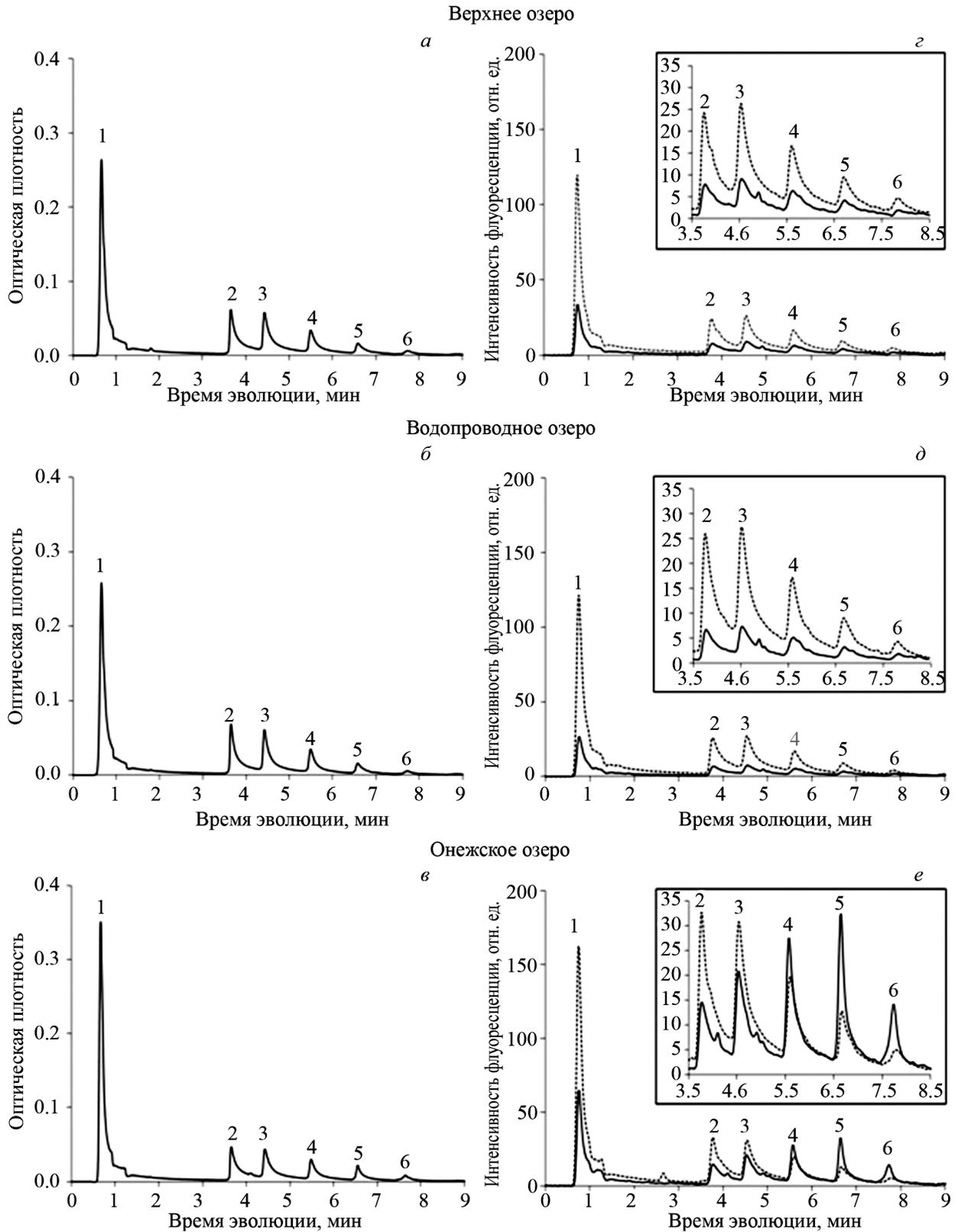


Рис. 2. ОФ ВЭЖХ РОВ трех пресноводных озер Карелии с регистрацией поглощения при 270 нм (а, б, в) и флуоресценции (г, д, е) при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 270\text{нм}/450\text{нм}$ (штриховая линия) и $270\text{нм}/350\text{нм}$ (сплошная линия). Вставки на графиках г, д, е — области хроматограмм в интервале от 3.5 до 8.5 мин в увеличенном масштабе

все три препарата РОВ показали одинаковую степень необратимой адсорбции на ОФ-колонке (т.е. общая площадь хроматограмм, подсчитанная при любой длине волны регистрации поглощения от 210 до 400 нм, была одинакова для всех трех

образцов). В то же время препараты различались по соотношению гидрофильного и суммы гидрофобных пиков. В таблице представлены результаты расчетов площадей (т.е. суммарной оптической плотности) под гидрофильным пиком 1 и гидрофобными пика-

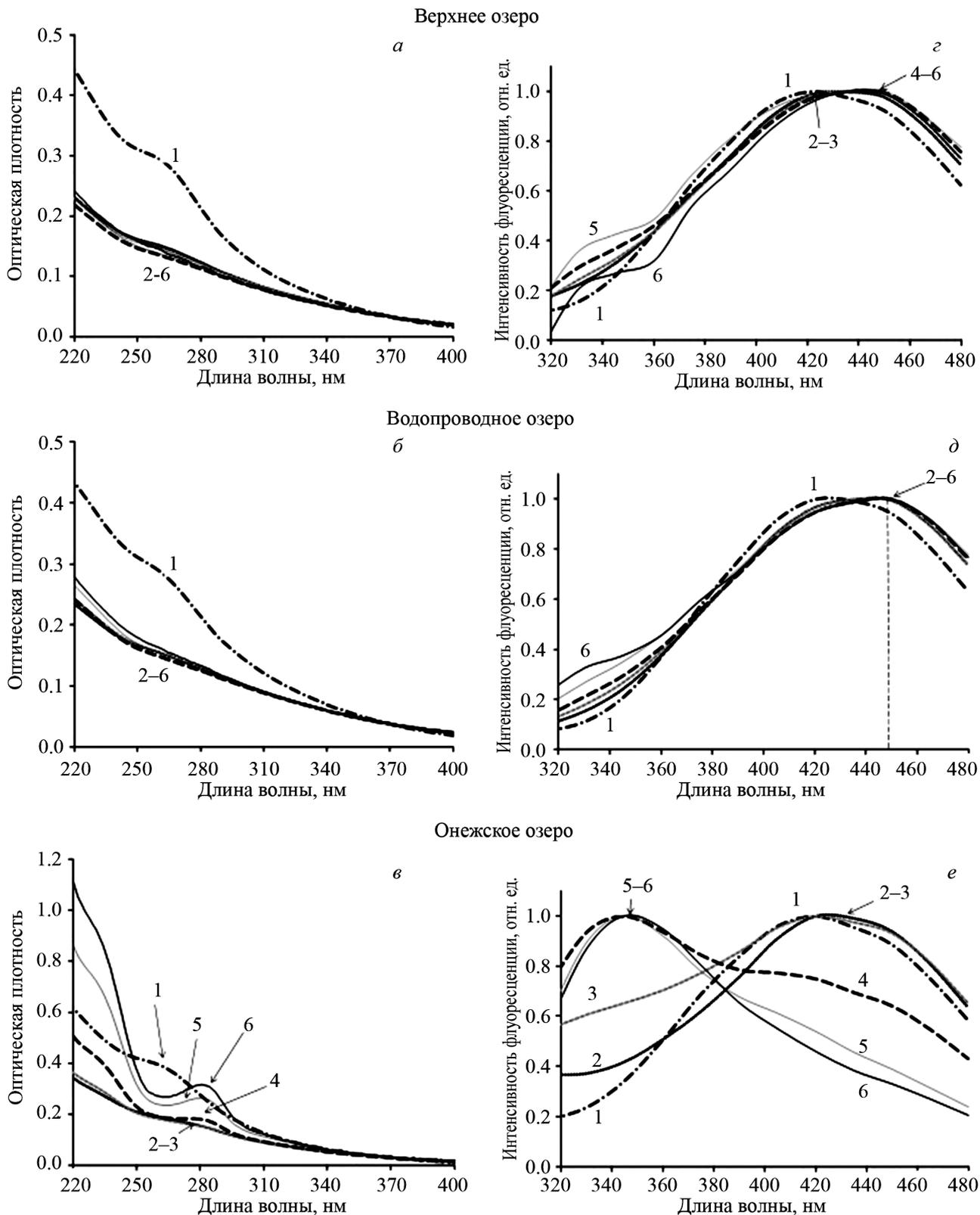


Рис. 3. Спектры поглощения, нормированные на оптическую плотность при 370 нм (а, б, в) и нормированные на амплитуду главного максимума спектра флуоресценции при $\lambda_{ex} = 270$ нм (з, д, е) пиков 1–6, полученных в процессе ОФ ВЭЖХ РОВ трех пресноводных озер Карелии

ми 2–6 в процентах от общей площади хроматограммы с регистрацией оптической плотности на длинах волн 220, 270 и 370 нм. Наиболее гидрофильным оказалось РОВ оз. Онежского, так как у этого препарата гидрофильный пик 1 составлял наиболь-

шую долю от общей площади хроматограммы по сравнению с двумя другими озерами независимо от длины волны регистрации поглощения.

На рис. 3, а, б, в представлены спектры оптической плотности пиков 1–6 РОВ трех исследованных

озер, извлеченные из данных фотодиодного детектора поглощения (см. раздел «Эксперимент»). Очевидно, что характерное «плечо» в области 260–270 нм, наблюдаемое в спектрах всех исходных препаратов РОВ (рис. 1, а), ярко выражено у гидрофильных пиков 1 и практически отсутствует у пиков 2–6 РОВ Верхнего и Водопроводного озер, а также пиков 2–3 РОВ Онежского. Пики 4–6 РОВ Онежского озера имеют явный максимум на длине волны в области 280 нм и резкое увеличение поглощения в более коротковолновой области (рис. 3, в). Такая форма спектра характерна для белков или пептидов, содержащих ароматическую аминокислоту триптофан.

Для подтверждения локализации «протеиноподобных» и «гуминоподобных» флуорофоров в том или ином хроматографическом пике была проведена детекция флуоресценции при длине волны возбуждения 270 нм с одновременной регистрацией свечения обоих типов флуорофоров ($\lambda_{em} = 350$ нм для регистрации «протеиноподобной» и $\lambda_{em} = 450$ нм — для «гуминоподобной» флуоресценции). Для всех исследуемых озер хроматограммы с параметрами $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 270$ нм/450 нм имели сходное распределение пиков 1–6: была отмечена наибольшая амплитуда флуоресценции в гидрофильном пике 1 и ее дальнейшее уменьшение с ростом гидрофобности от 2 до 6 пика (рис. 2, г, д, е), причем у РОВ оз. Онежского интенсивность флуоресценции первого гидрофильного пика была наибольшей (165 отн. ед. против 130 отн. ед. у РОВ двух других озер).

Хроматограммы с параметрами регистрации $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 270$ нм/350 нм образцов РОВ оз. Верхнего и Водопроводного повторяют тенденцию снижения интенсивностей пиков хроматограммы с $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 270$ нм/450 нм, только с меньшей амплитудой (рис. 2, г, д). Однако на хроматограмме РОВ оз. Онежского с $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 270$ нм/350 нм амплитуда гидрофобных пиков увеличивается с ростом гидрофобности (рис. 2, е), что, возможно, связано с иным распределением флуорофоров между пиками в данном образце РОВ. Спектры испускания пиков 1–6 трех фракционированных РОВ, представленные на рис. 3, г, д, е, подтверждают данное предположение. Во всех трех образцах гидрофильному пику 1 соответствует «гуминоподобный» $\lambda_{max} = 420$ нм с плечом в области 450 нм. У оз. Верхнего и Водопроводного гидрофобные пики 2–6 имеют «гуминоподобный» $\lambda_{max} = 450$ нм с плечом в области 420 нм, причем с ростом гидрофобности вклад коротковолнового плеча уменьшается и спектры флуоресценции постепенно сдвигаются в длинноволновую область (рис. 3, г, д, е и таблица). Следует отметить, что слабая «белковоподобная» полоса в виде плеча в области 330 нм была обнаружена лишь в 5 и 6 пиках РОВ оз. Верхнего и пике 6 оз. Водопроводного. Для РОВ оз. Онежского «протеиноподобная» полоса флуоресценции отсутствует только в гидрофильном пике 1, в пиках 2–3 она присутствует в следовых

количествах, в пике 4 — в виде главного пика с $\lambda_{max} = 340$ нм и плечами «гуминоподобной» флуоресценции при 420 и 450 нм, в пиках 5 и 6 «белковоподобная» полоса флуоресценции является основной с $\lambda_{max} = 345$ нм, а «гуминоподобная» флуоресценция присутствует лишь в качестве незначительной примеси.

Заключение

Анализ РОВ трех пресноводных озер Карелии различного происхождения с использованием ОФ ВЭЖ с одновременным детектированием поглощения света и флуоресценции показал, что препараты РОВ качественно сходны, но различаются количественным соотношением составных компонентов и содержат, по крайней мере, три типа флуорофоров: 1) гидрофильный «гуминоподобный» флуорофор(ы) с максимумом испускания в области 420 нм, данный флуорофор имеет спектр поглощения с плечом в области 260–270 нм; 2) гидрофобный «гуминоподобный» флуорофор(ы) с максимумом испускания в области 450 нм, спектр поглощения данного флуорофора не имеет характеристических максимумов в области от 220 до 400 нм — по-видимому, максимум поглощения локализован в области более коротких длин волн; 3) флуорофор со спектром «протеиноподобного» типа с максимумом испускания в области 340–350 нм, характерным для белков и пептидов, содержащих триптофан. «Протеиноподобный» флуорофор проявляется только в гидрофобных фракциях РОВ оз. Онежского, скорее всего, как результат метаболизма микроорганизмов в воде с большим количеством биогенных веществ. В оз. Верхнее и Водопроводное с ультрапресной водой, не подверженных антропогенному влиянию, «протеиноподобная» флуоресценция зарегистрирована лишь как незначительная примесь в наиболее гидрофобных фракциях.

ОФ ВЭЖХ представляет собой мощный метод, не только позволяющий отделить протеиноподобную материю от гуминоподобной, но и дающий перспективу фракционирования гуминоподобной флуоресценции на индивидуальные флуорофоры, имеющие характерные спектральные свойства. Полученные данные о степени гидрофобности РОВ могут быть также полезны для количественного анализа емкости инактивации гидрофобных антропогенных органических загрязнителей водной средой.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 13-05-00241а и 15-04-00525а).

Список литературы

1. Hedges J.I. // *Mar. Chem.* 1992. **39**. P. 67.
2. Ogawa H., Tanoue E. // *J. Oceanogr.* 2003. **59**, N 2. P. 129.
3. Пацаева С.В., Фадеев В.В., Филиппова Е.М. и др. // *Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астр.* 1991. № 6. С. 71.

4. Patsayeva S., Reuter R. // Proc. SPIE. 1995. **2586**. P. 151.
5. Чайковская О.Н., Соколова И.В. // Оптика атмосферы и океана. 2006. **19**, № 2, 3. С. 244.
6. Якименко О.С., Терехова В.А. // Почвоведение. 2011. **44**, № 11. С. 1222.
7. Терехова В., Гладкова М. // Почвоведение. 2014. **47**, № 1. С. 82.
8. Пацаева С.В., Филиппова Е.М., Чубаров В.В., Южаков В.И. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астр. 1991. **32**, № 4. С. 76.
9. Fiorani L., Fantoni R., Lazzara L., Nardello I. et al. // EARSel eProceedings. 2006. **5**, N 1. P. 89.
10. Blough N.V., Del Vecchio R. // Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter / Ed. by D. A. Hansel, C. A. Carlson. San Diego, California: Academic Press, 2002. P. 509.
11. Пацаева С.В., Фадеев В.В., Филиппова Е.М. и др. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астр. 1992. № 5. С. 38.
12. Coble P.G. // Chem. Rev. 2007. **107**, N 2. P. 402.
13. Trubetskoy O.A., Trubetskaya O.E., Richard C. // Water Resources. 2009. **36**, N 5. P. 518.
14. Lübben A., Dellwig O., Koch S., Beck M. et al. // Ocean Dynamics. Special Issue — WATT. 2009. **59**, N 2. P. 263.
15. Thurman E.M., Malcolm R.L. // Environ. Sci. Technol. 1981. **15**, N 4. P. 463.
16. Blondeau R., Kalinowski E. J. // Chromatogr. 1986. **351**. P. 585.
17. Louchouart P., Opsahl S., Benner R. // Anal. Chem. 2000. **72**, N 13. P. 2780.
18. Parlanti E., Morin B., Vacher L. // Organic Geochem. 2002. **33**, N 3. P. 221.
19. Stenson A.C. // Environ. Sci. Technol. 2008. **42**, N 6. P. 2060.
20. Hutta M., Gra R., Halko R., Chalanyova M. // J. Chromatogr. A. 2011. **1218**, N 49. P. 8946.
21. Trubetskaya O.E., Trubetskoy O.A. // Environ. Sci. Pollut. Res. 2015. **22**, N 13. P. 9989.
22. Trubetskoy O.A., Trubetskaya O.E. // Eurasian Soil Science. 2015. **48**, N 2. P. 148.
23. Wu F.C., Evans R.D., Dillon P.J. // Environ. Sci. Technol. 2003. **37**, N 16. P. 3687.
24. Trubetskoy O.A., Richard C., Guyot G., Voyard G. et al. // J. Chromatogr. A. 2012. **1243**. P. 62.
25. Краснова Е.Д., Пантюлин А.Н., Белевич Т.А., Воронов Д.А. и др. // Океанология. 2013. **53**, № 5. С. 1.
26. Krasnova E.D., Kharcheva A.V., Milyutina I.A., Voronov D.A. et al. // J. Mar. Biol. Ass. UK. 2015. **95**, N 8.
27. Lakowicz J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd edition. N. Y.: Springer US, 1006. P. 530.

An analysis of dissolved organic matter from freshwater Karelian lakes using reversed-phase high-performance liquid chromatography with online absorbance and fluorescence analysis

D. A. Khundzhua¹, S. V. Patsaeva^{1,a}, O. A. Trubetskoy^{2,b}, O. E. Trubetskaya³

¹ Department of General Physics, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia.

² Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences. Pushchino, Moscow Region 142290, Russia.

³ Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences. Pushchino, Moscow Region 142290, Russia.

E-mail: ^aspatsaeva@mail.ru, ^bolegi03@yahoo.com.

The spectral and optical properties of the fractionated components of dissolved organic matter (DOM) of three freshwater lakes in Karelia were studied using reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) with online detection of fluorescence and absorption spectra. It is shown that the DOM fractions are qualitatively similar, but differ quantitatively in the ratio of components and consist of at least three types of fluorophores: (1) hydrophilic “humic-like” fluorophore(s) with the emission maximum in the region of 420 nm and an absorption band at 260–270 nm; (2) hydrophobic “humic-like” fluorophore(s) with the emission maximum at approximately 450 nm that has no characteristic absorption maxima in the region from 220 to 400 nm; and (3) a “protein-like” fluorophore with the emission maximum in the region of 340–350 nm, which is typical of proteins and peptides containing tryptophan.

Keywords: reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), absorption and fluorescence spectroscopy, dissolved organic matter (DOM) of natural water, hydrophobic and hydrophilic fluorophores.

PACS: 42.25.Bs, 82.80.Bg.

Received 21 June 2016.

English version: *Moscow University Physics Bulletin*. 2017. **71**, No. 1. Pp. 68–75.

Сведения об авторах

1. Хунджиа Дарья Александровна — мл. науч. сотрудник; e-mail: dasha.ok@list.ru.
2. Пацаева Светлана Викторовна — канд. физ.-мат. наук, доцент; e-mail: spatsaeva@mail.ru.
3. Трубецкой Олег Анатольевич — доктор биол. наук, вед. науч. сотрудник; e-mail: olegi03@yahoo.com.
4. Трубецкая Ольга Евгеньевна — канд. хим. наук, руководитель подразделения (группа молекулярной экологии); e-mail: trub@bibch.ru.