

УДК 631.417.2:535.363

## АНАЛИЗ ФЛУОРОФОРОВ РАСТВОРЕННОГО ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА ВОД РЕКИ СУВАНИ МЕТОДОМ ОБРАТНО-ФАЗОВОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ<sup>1</sup>

© 2019 г. О. А. Трубецкой<sup>1,\*</sup>, О. Е. Трубецкая<sup>2,\*\*</sup>

<sup>1</sup>Институт фундаментальных проблем биологии РАН  
Россия 142290 Пущино

<sup>2</sup>Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
Россия 142290 Пущино

\*e-mail: olegi03@yahoo.com, \*\*e-mail: trub@bibch.ru

Поступила в редакцию 05.07.2017 г.

После доработки 28.08.2017 г.

Принята к публикации 29.09.2017 г.

Обратно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с мультиволновым детектором флуоресценции использована для анализа растворенного в природной воде р. Сувани органического вещества и его стабильных электрофоретических фракций *A*, *B* и *C+D*, предварительно полученных сочетанием препаративной эксклюзивной хроматографии с аналитическим электрофорезом в полиакриламидном геле. Фракция *A* имела наибольший молекулярный размер, а фракция *C+D* — наименьший. С помощью трехмерного флуоресцентного анализа гуминоподобная флуоресценция обнаружена как в исходном препарате, так и во всех фракциях, а белковоподобная флуоресценция практически полностью локализована во фракциях *A* и *B* наибольшего и среднего молекулярного размера. Обнаружено, что широкий пик гуминоподобной флуоресценции расщепляется на несколько групп флуорофоров, различающихся как максимумами испускания (435, 455, 460, 465 нм), так и степенью гидрофобности. Полученный результат рассматривается в свете современных теорий формирования гуминоподобной флуоресценции растворенного органического вещества. В составе фракций *A* и *B* наибольшего молекулярного размера идентифицированы низкомолекулярные свободные ароматические аминокислоты тирозин и триптофан, обуславливающие >50% белковоподобной флуоресценции растворенного органического вещества из воды реки Сувани. Полученные данные помогают лучше понять молекулярную природу белково- и гуминоподобной флуоресценции растворенного органического вещества природной воды.

**Ключевые слова:** растворенные в природной воде органические вещества, белковоподобная и гуминоподобная флуоресценция, сочетание препаративной эксклюзивной хроматографии с аналитическим электрофорезом, обратно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с мультиволновым детектором флуоресценции.

**DOI:** 10.31857/S0321-0596464428-437

Растворенные органические вещества (РОВ) природной воды представляют собой сложную смесь органических биомолекул, подвергшихся разнообразным преобразованиям в процессе диагенеза [1, 12, 14]. Считается, что 50–70% РОВ составляют водные гуминовые вещества, образующие частицы наноразмерного диапазона. Кроме того, в природной воде растворены низкомолекулярные органические и неорганические соединения [1, 7]. Одно из важнейших свойств РОВ — флуоресценция, обусловленная наличием двух основных групп флуорофоров

[8, 10, 11, 13, 16]. Первую группу флуорофоров РОВ, вызывающих флуоресценцию с длиной волны возбуждения ( $\lambda_{\text{воз}}$ ) < 305 нм и длиной волны испускания ( $\lambda_{\text{исп}}$ ) < 380 нм, принято называть белковоподобной, т.е. характерной для флуоресцирующих ароматических аминокислот фенилаланина, тирозина и триптофана, входящих в состав белков и имеющих максимумы испускания в районе 280–380 нм [3]. Вторую группу флуорофоров с  $\lambda_{\text{воз}}/\lambda_{\text{исп}}$  — 220–360/380–470 нм называют гуминоподобной, т.е. характерной для водных и сухопутных гуминовых веществ [19]. Гуминоподобная флуоресценция — важнейшая характеристика любого препарата РОВ, в то время как белковоподобную флуоресценцию не

<sup>1</sup> Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-05-00056).

всегда удается идентифицировать в исходных препаратах РОВ.

Впервые белковоподобная флуоресценция обнаружена в РОВ воды Черного моря [13], впоследствии ее идентифицировали в других образцах морской [8, 16], речной воды [24] и поровой воды донных отложений [11]. На основании различий максимумов испускания белковоподобные флуорофоры РОВ разделены на тирозиноподобные ( $\lambda_{\text{исп}}$  в области 300 нм) и триптофаноподобные ( $\lambda_{\text{исп}}$  в области 350 нм) [11]. Установлена корреляция между интенсивностью триптофаноподобной флуоресценции и концентрацией аминокислот, высвобождающихся после кислотного гидролиза РОВ [15, 17, 25, 26]. Поскольку данный тип флуоресценции может быть обусловлен как свободными аминокислотами, так и короткими пептидами или длинными белками, вопрос о молекулярной природе белковоподобных флуорофоров до сих пор остается открытым. Кроме того, тирозиноподобная флуоресценция может быть вызвана и простыми монофенолами, имеющими сходный с тирозином спектр флуоресценции [9].

Природа гуминоподобной флуоресценции РОВ также неясна. Существуют две основные концепции, согласно которым широкий спектр гуминоподобной флуоресцентной эмиссии РОВ объясняется либо простой суммой многочисленных не взаимодействующих между собой флуорофоров (superposition model) [2, 12, 19, 20], либо образованием внутренних комплексов между донорами и акцепторами электронов (“optical charge-transfer model”) [8, 10]. В недавно опубликованной работе [18] получены данные, подвергающие сомнению существование донорно-акцепторных комплексов в составе РОВ. Авторы показали, что восстановление боргидридом натрия предполагаемых акцепторов электронов (ароматических кетонов, альдегидов или хинонов), которое предотвращает образование донорно-акцепторных комплексов, никак не повлияло на интенсивность и максимумы эмиссии нескольких различных препаратов РОВ. В то же время для подтверждения первой суперпозиционной модели необходимо провести разделение широкого гуминоподобного пика флуоресценции на узкодисперсные субфракции, обладающие различными физико-химическими, в том числе флуоресцентными, параметрами. Однако до настоящего времени не было идентифицировано ни одного индивидуального флуорофора в составе РОВ.

В настоящей работе поставлена цель провести фракционирование образца РОВ природной воды и попытаться идентифицировать хотя бы некоторые индивидуальные флуорофоры. Для решения данной задачи использована обратно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ-ВЭЖХ) в сочетании с мультиволновым детектором, позволяющим регистрировать спектры флуоресценции анализируемых соединений в любой момент времени выхода с колонки. В качестве объектов исследования взяты препарат РОВ, выделенный из р. Сувани, — стандарт Международного общества гуминовых веществ 1R101N, а также его фракции различного молекулярного размера и электрофоретической подвижности, полученные по ранее разработанной авторами статьи методике фракционирования с использованием сочетания препаративной эксклюзивной хроматографии с аналитическим электрофорезом в полиакриламидном геле [5]. Общая схема эксперимента представлена на рис. 1.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Препарат РОВ, выделенный методом обратного осмоса из воды р. Сувани (СРОВО), использован в качестве объекта исследования. Элементный состав препарата СРОВО: С — 52.5, Н — 4.2, N — 1.1, зольность — 7.0, содержание воды — 8.2%. Препараты свободных аминокислот тирозина и триптофана (Sigma) имели  $\leq 2\%$  примесей.

Сочетание препаративной эксклюзивной хроматографии на сефадексе G-75 в 7М мочевины с аналитическим электрофорезом в 10%-ном полиакриламидном геле (ЭХ–ЭПАГ) применяли для разделения препарата СРОВО на фракции, различающиеся по электрофоретической подвижности и молекулярным размерам с использованием ранее разработанной методики [5]. Получены фракции *A*, *B* и *C+D*, причем фракция *A* обладала наибольшим молекулярным размером (MP), а фракция *C+D* — наименьшим. После хроматографии каждую фракцию диализовали на целлюлозных мембранах (“Sigma-Aldrich”) с номинальным диаметром пор 10 кДа в течение семи дней против дистиллированной воды, лиофилизировали и хранили в сухом виде в темноте при комнатной температуре для последующих физико-химических анализов. В процессе диализа потерян 51% исходного СРОВО с номинальным MP <10 кДа [21]. Фракция *A* составляла 4% от исходной массы фрак-

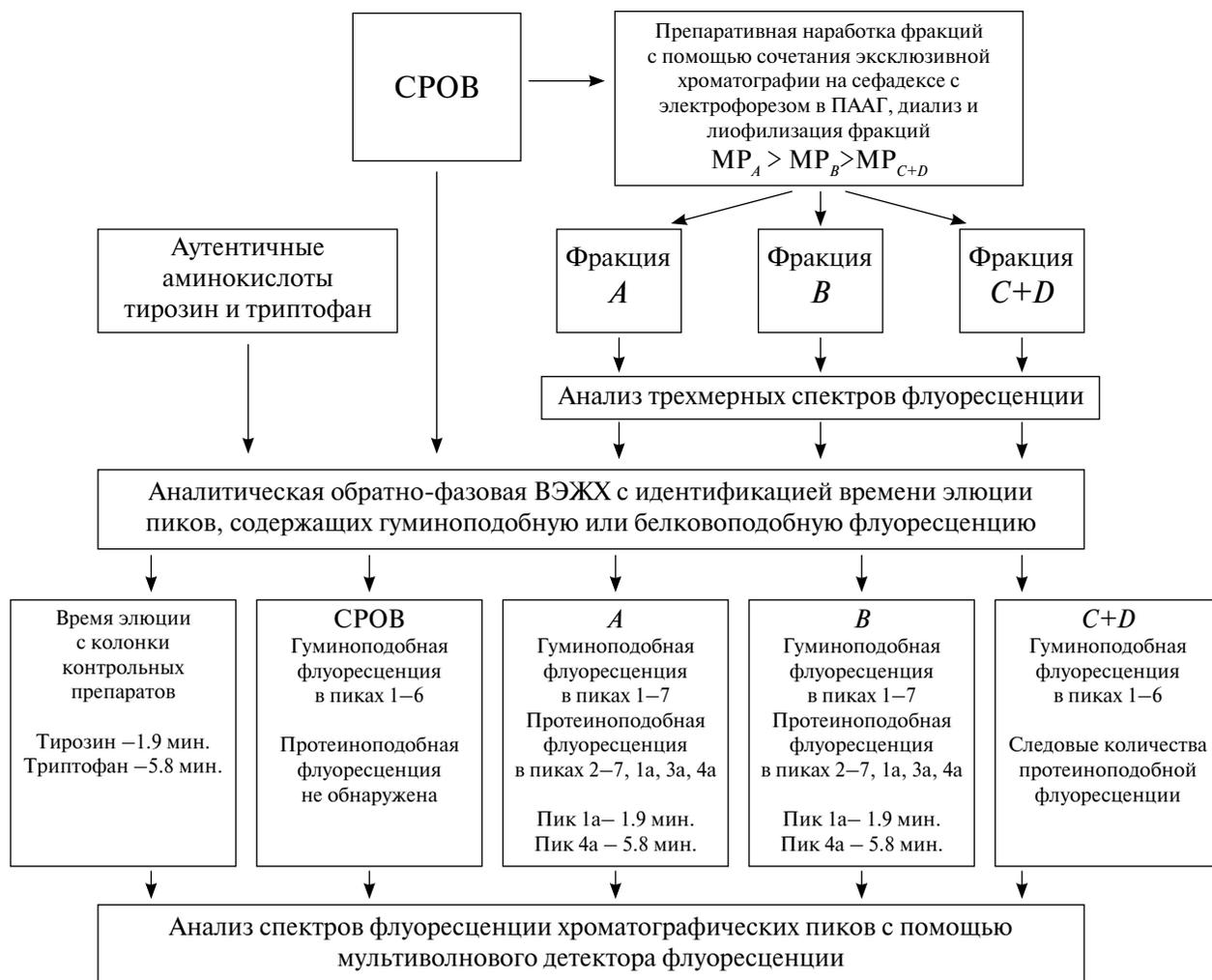


Рис. 1. Многостадийная схема фракционирования и анализа СРОВ.

ционированного препарата СРОВ, фракция *B* — 10%, а фракция *C+D* — 35%.

Трехмерную флуоресценцию исходного образца СРОВ и полученных фракций проводили на спектрофлуориметре “Cary Eclipse” (“Varian”) в четырехсторонней кварцевой кювете длиной 1 см на длинах волн возбуждения в диапазоне от 200 до 600 нм с шагом 10 нм, спектры эмиссии регистрировали с шагом 1 нм. Образцы растворяли в 1 мМ фосфатном буфере, pH 6.5, до одинаковой оптической плотности (0.05 о.е.) на длине волны 270 нм. Оптическую плотность образцов измеряли на спектрофотометре “Cary 3” (“Varian”) в кварцевой кювете длиной 1 см.

Аналитическую ОФ-ВЭЖХ исходного препарата СРОВ, фракций *A*, *B*, *C+D* и аутентичных аминокислот тирозина и триптофана проводили на приборе “Waters ACQUITY™ Ultra-Performance Liquid Chromatographic System” на колонке  $C_{18}$  размером 2.1×100 мм (“Waters”)

с привитыми линейными алкильными насыщенными углеводородными цепями  $C_{18}H_{37}$ . Скорость элюции составляла 0.3 мл/мин. Метанол и 10 мМ фосфатный буфер с pH 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%, 13.89 мин — 100%, на 20-й мин — 0% и колонку промывали 100%-м фосфатным буфером в течение 10 мин. Регистрацию флуоресценции проводили с помощью мультиволнового детектора флуоресценции (“Waters”), осуществляющего регистрацию испускания в диапазоне 290–580 нм на длине волны возбуждения 270 нм.

Спектры флуоресценции для вершины каждого хроматографического пика извлекали из данных мультиволнового детектора флуорес-

ценции. Для исключения возможных искажений в спектрах, связанных с влиянием подвижной фазы (смеси фосфатного буфера и метанола различной концентрации), проводили контрольную хроматографию без РОВ, и из спектра каждого пика вычитали соответствующий спектр буфера с аналогичным временем элюции с колонки. Различия в хроматограммах нескольких повторностей одного и того же образца РОВ были пренебрежимо малы, разброс амплитуд хроматографических пиков не превышал 2% от измеренной величины интенсивности флуоресценции.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первоначально с помощью сочетания ЭХ–ЭПАГ образец СРОВ был разделен на три фракции – *A*, *B* и *C+D*, различающиеся МР и электрофоретической подвижностью. Молекулярные размеры фракций убывали в порядке  $MP_A > MP_B > MP_{C+D} > 10\text{кДа}$ . В процессе электрофореза фракция *A* формировала стартовую зону, не проникающую в поры 10%-го полиакриламидного геля, а фракция *B* — узкую зону в средней части геля, фракция *C+D* представляла собой несколько узких зон с близкими электрофоретическими подвижностями в нижней части геля. Детали первого этапа фракционирования СРОВ с помощью ЭХ–ЭПАГ подробно описа-

ны в работе [5], там же приведены электрофоретические картинки фракций и их типичные спектры поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях света. На рис. 2 представлены результаты исследования исходного препарата СРОВ и фракций *A*, *B* и *C+D* с помощью трехмерной флуоресцентной спектроскопии. Для минимизации эффектов внутреннего фильтра и получения интенсивности испускания, пропорциональной количеству центров эмиссии, препараты анализировали при одинаковой низкой оптической плотности ( $A_{270} = 0.05$  о.е.). Исходный препарат СРОВ имел два широких максимума гуминоподобной флуоресценции с  $\lambda_{\text{воз}}/\lambda_{\text{исп}} = 230\text{ нм}/450\text{ нм}$  и  $330\text{ нм}/450\text{ нм}$ , причем интенсивность флуоресценции первого максимума с  $\lambda_{\text{воз}} = 230\text{ нм}$  была вдвое больше второго с  $\lambda_{\text{воз}} = 330\text{ нм}$  (табл.). Аналогичные данные с близкими длинами волн возбуждения и испускания получены другими исследователями для данного стандартного образца СРОВ [7]. Следует отметить, что с изменением длины волны возбуждения от 230 до 270 нм максимум эмиссии СРОВ смещался в длинноволновую (красную) область, от 270 до 310 нм — в коротковолновую (голубую) область, а от 310 до 330 нм — вновь переходил в красную область (таблица). Сходный эффект наблюдали другие исследователи для образцов РОВ различного генезиса [2]. Такое скач-

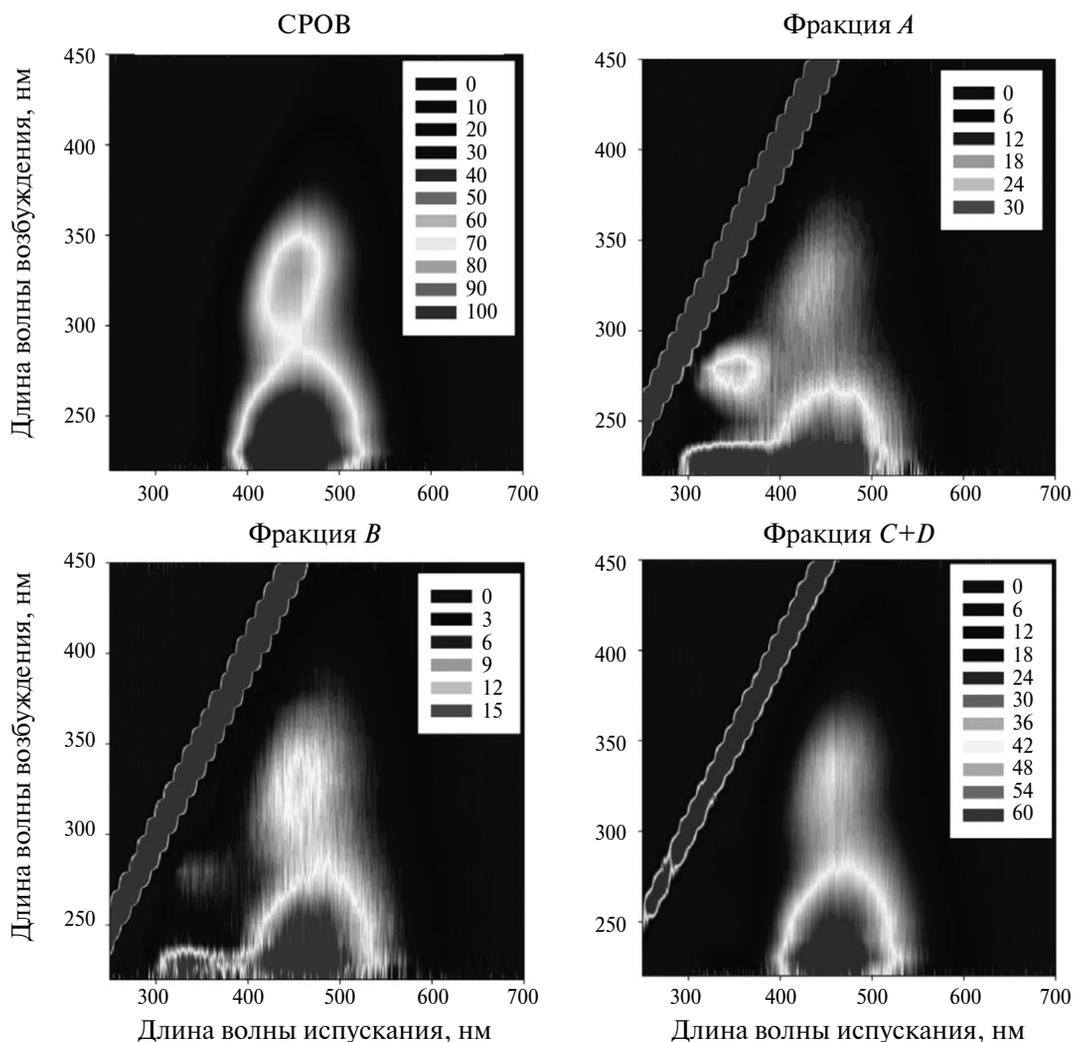
**Таблица.** Локализация максимумов ( $\lambda_{\text{воз}}/\lambda_{\text{исп}}$ ) и интенсивность (ИФ) протеиноподобной и гуминоподобной флуоресценции исходного препарата СРОВ и фракций *A*, *B* и *C+D*, а также массовый выход (%) очищенных диализом фракций после ЭХ–ЭПАГ фракционирования

Название образца	Массовый выход фракции, %	Флуоресценция			
		Протеиноподобная		Гуминоподобная	
		$\lambda_{\text{воз}}/\lambda_{\text{исп}}$	ИФ, отн. ед.	$\lambda_{\text{воз}}/\lambda_{\text{исп}}$	ИФ, отн. ед.
СРОВ	100	-	-	230/450	170
				270/455	90
				310/442	75
				330/450	84
Фракция <i>A</i>	4	230/335	45	230/440	44
		270/350	21	270/440	20
				310/425	19
				330/440	19
Фракция <i>B</i>	10	230/330	17	230/460	23
		270/340	7	270/465	13
				310/445	10
				330/460	11
Фракция <i>C+D</i>	35	-	-	230/455	81
				270/465	42
				310/455	37
				330/460	39

кообразное изменение максимумов испускания можно объяснить наличием нескольких гуминоподобных флуорофоров, образующих суммарный широкий максимум испускания исходного препарата СРОВ, что служит косвенным подтверждением суперпозиционной модели формирования гуминоподобной флуоресценции РОВ.

Трехмерные флуоресцентные спектры фракций *A*, *B* и *C+D* существенно отличались от исходного препарата как по интенсивности флуоресценции и значениям максимумов эмиссии, так и по количеству флуоресцирующих центров. Фракция *A* наибольшего МР, помимо двух гуминоподобных флуоресцентных максимумов с  $\lambda_{\text{воз}}/\lambda_{\text{исп}} = 230 \text{ нм} / 440 \text{ нм}$  и  $330 \text{ нм} / 440 \text{ нм}$ , интенсивность которых была в 4 раза ниже, чем в исходном препарате, дополнительно содержала два белковоподобных максимума с  $\lambda_{\text{воз}}/\lambda_{\text{исп}} = 230 \text{ нм} / 335 \text{ нм}$  и  $270 \text{ нм} / 350 \text{ нм}$ .

Фракция *B* среднего МР также содержала гуминоподобные ( $\lambda_{\text{воз}}/\lambda_{\text{исп}} = 230 \text{ нм} / 460 \text{ нм}$  и  $330 \text{ нм} / 460 \text{ нм}$ ) и белковоподобные ( $\lambda_{\text{воз}}/\lambda_{\text{исп}} = 230 \text{ нм} / 330 \text{ нм}$  и  $270 \text{ нм} / 340 \text{ нм}$ ) флуоресцентные максимумы, однако их интенсивность примерно вдвое ниже, чем во фракции *A*. Фракция *C+D* наименьшего МР содержала только два гуминоподобных флуоресцентных максимума с  $\lambda_{\text{воз}}/\lambda_{\text{исп}} = 230 \text{ нм} / 455 \text{ нм}$  и  $330 \text{ нм} / 460 \text{ нм}$ , причем интенсивность их флуоресценции вдвое ниже по сравнению с исходным препаратом СРОВ. Как и в исходном образце СРОВ, во всех фракциях наблюдали эффект голубого и красного сдвига максимумов испускания флуоресценции (таблица). Существенное снижение интенсивности гуминоподобной флуоресценции и обнаружение протеиноподобных флуорофоров во фракциях *A* и *B* наибольшего и среднего МР (рис. 2) можно объяснить как удалением значи-



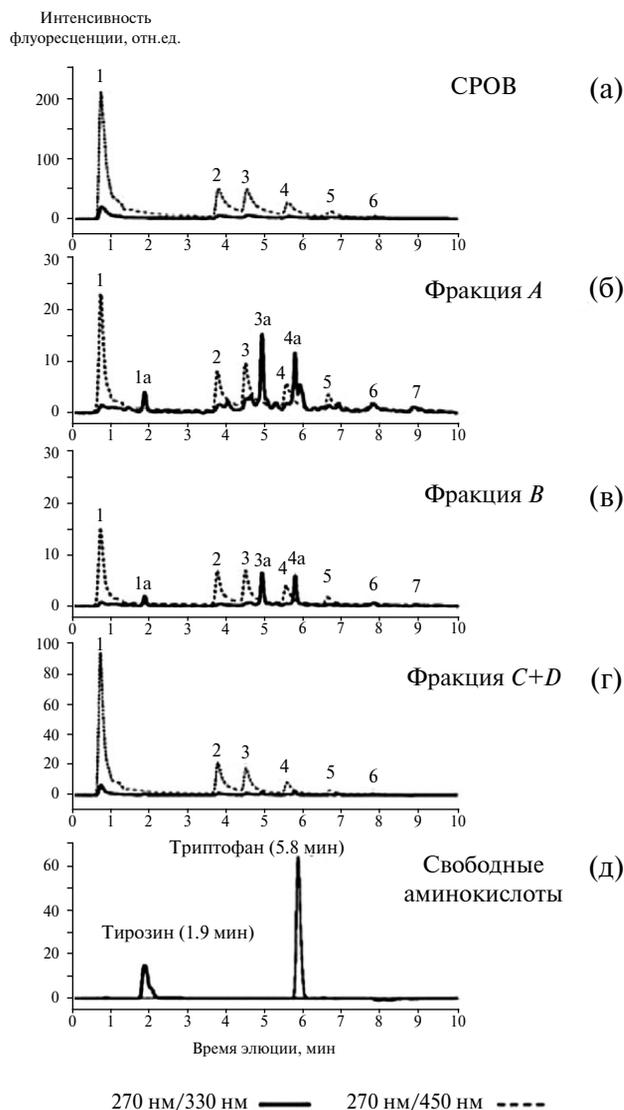
**Рис. 2.** Трехмерные спектры флуоресценции исходного препарата СРОВ и фракций *A*, *B* и *C+D*, полученных с помощью ЭХ-ЭПАГ. Интенсивность флуоресценции обозначена различными цветами в правом верхнем углу каждого рисунка.

тельной части вещества фракций при их очистке диализом от мочевины (суммарная потеря составляет 51% по весу от исходного СРОВ), так и преимущественной локализацией протеиноподобных флуорофоров в названных фракциях. Следует отметить, что на фракцию *A* приходится 4%, а на фракцию *B* ~10% общего веса препарата СРОВ (таблица). Диализ оказался весьма эффективным методом, позволяющим не только обнаружить в составе СРОВ ранее не идентифицированную белковоподобную флуоресценцию, но и отделить фракции наноразмерного диапазона с МР >10 кДа от низкомолекулярных органических и неорганических примесей, которые неизбежно присутствуют в природной воде [21].

Для дальнейшего анализа природы гуминоподобной и белковоподобной флуоресценции фракции *A*, *B* и *C+D*, а также исходный препарат СРОВ фракционированы с помощью ОФ–ВЭЖХ на колонке С18 в ступенчатом градиенте метанола и фосфатного буфера. Данный тип хроматографии позволяет разделять фракционируемые компоненты на основе их различий в гидрофобности. Метод успешно применен авторами статьи ранее для анализа степени гидрофобности и идентификации гуминоподобных флуорофоров почвенных гуминовых кислот [4, 22, 23], а также препаратов РОВ из нескольких озер Карелии [6].

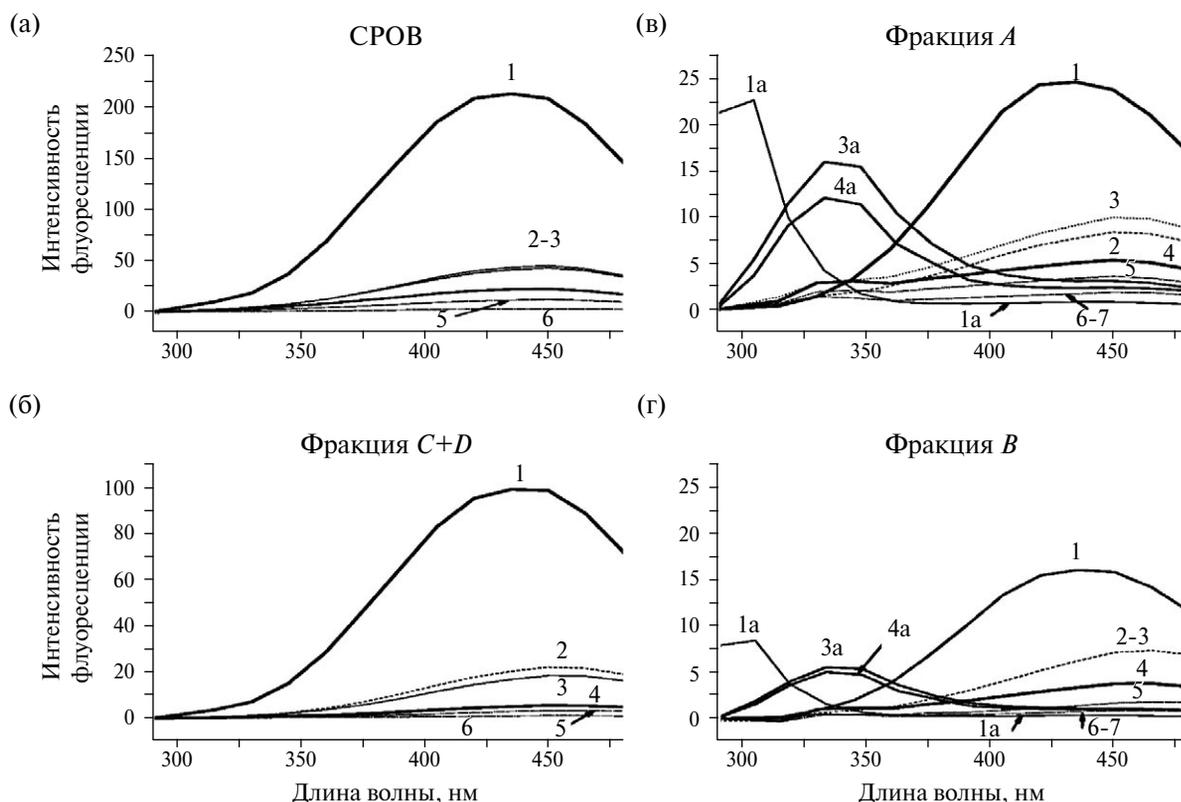
На основании описанного выше анализа трехмерных спектров флуоресценции исходного препарата СРОВ и фракций, для одновременной идентификации белковоподобной и гуминоподобной флуоресценции в процессе ОФ–ВЭЖХ мультиволновой флуоресцентный детектор был настроен на длину волны возбуждения 270 нм. Для каждого препарата было получено по две хроматограммы, отражающие профиль эмиссии при  $\lambda_{\text{воз}}/\lambda_{\text{исп}} = 270 \text{ нм}/330 \text{ нм}$  для идентификации белковоподобной флуоресценции и 270 нм/450 нм для идентификации гуминоподобной флуоресценции (рис. 3а–г).

Хроматограммы исходного препарата СРОВ (рис. 3а) независимо от регистрируемой длины волны испускания флуоресценции (330 или 450 нм) формировали 6 пиков различной интенсивности, совпадающих по времени выхода со ступенчатым увеличением концентрации метанола. Пик 1, смываемый фосфатным буфером, — наиболее гидрофильный. Степень гидрофобности пиков увеличивается по мере увеличения концентрации метанола в подвижной фазе от 10 до 50% (пики 2–6). Спектры флуоресценции пиков 1–6 СРОВ, полученные



**Рис. 3.** ОФ–ВЭЖХ препаратов СРОВ, фракций *A*, *B*, *C+D* и аутентичных аминокислот тирозина и триптофана с регистрацией интенсивности флуоресценции при  $\lambda_{\text{воз}}/\lambda_{\text{исп}} = 270 \text{ нм}/330 \text{ нм}$  (сплошная линия) и  $\lambda_{\text{воз}}/\lambda_{\text{исп}} = 270 \text{ нм}/450 \text{ нм}$  (прерывистая линия).

с помощью мультиволнового флуоресцентного детектора, представляли собой гуминоподобные флуорофоры, причем гидрофильный пик 1 имел максимум эмиссии 435 нм, а гидрофобные пики 2–6 — 450 нм, т.е. максимум эмиссии гидрофобных пиков смещен на 15 нм по сравнению с гидрофильным пиком 1. Белковоподобная флуоресценция не была идентифицирована (рис. 4а). Сходные результаты расщепления гуминоподобной флуоресценции на гидрофильный пик с максимумом испускания 420 нм и несколько гидрофобных пиков с максимумами испускания 450 нм, смещенными в длинноволновую область на 30 нм, получены авторами недавно для РОВ из воды двух автохтонных озер Карелии [6]. Сле-



**Рис. 4.** Спектры флуоресценции пиков 1–7, 1а, 3а и 4а, полученных в процессе ОФ–ВЭЖХ препаратов СРОВ и фракций А, В, С+D. Спектры извлечены из данных мультиволнового флуоресцентного детектора на времени элюции, соответствующей вершине соответствующего пика.

дует отметить, что в случае анализа исходных препаратов РОВ без предварительного фракционирования по размерам с использованием эксклюзивной хроматографии и диализа пики 2–6 различной гидрофобности имели один и тот же максимум эмиссии. Значительно больше информации получено при ОФ–ВЭЖХ гуминоподобной и протеиноподобной флуоресценции фракций СРОВ, различающихся по МР.

Гуминоподобные хроматограммы фракций А, В и С+D (рис. 3б–г, прерывистая линия) сходны с хроматограммой исходного СРОВ, однако во фракциях А и В идентифицировано по одному дополнительному наиболее гидрофобному пику 7, элюируемому 60%-м метанолом. Во всех фракциях, как в исходном образце СРОВ, наиболее гидрофильные пики 1 имели одинаковый максимум эмиссии 435 нм (рис. 4б–г). Существенные различия обнаружены в спектрах эмиссии вещества гидрофобных пиков фракций. Гидрофобные пики 2–3 фракции А имели максимумы эмиссии 455 нм, а пики 4–7 — 460 нм, во фракции В все гидрофобные пики 2–6 имели максимум эмиссии — 465 нм, а гидрофобные пики 2–6 фракции С+D — 455 нм (рис. 4б–г). Таким образом, после последовательного фракциони-

рования двумя хроматографическими методами удалось идентифицировать как минимум четыре флуорофора различной степени гидрофобности с максимумами эмиссии 435, 455, 460 и 465 нм. Расщепление широкой гуминоподобной флуоресценции на несколько пиков с максимумами эмиссии, различающимися на 30 нм, — веский аргумент в пользу формирования гуминоподобной флуоресценции РОВ в соответствии с суперпозиционной моделью.

Помимо главных гуминоподобных максимумов в районе 455–465 нм, гидрофобные пики 2–6 фракций А и В наибольшего и среднего МР имели второй дополнительный менее интенсивный максимум эмиссии в районе 340–350 нм, соответствующий белковоподобной флуоресценции (рис. 4в, 4г). Кроме того, ОФ–ВЭЖХ-анализ флуоресцентной эмиссии фракций А, В и С+D при 330 нм для исследования протеиноподобной флуоресценции (рис. 3б–г, сплошные линии) выявил во фракциях А и В новые пики 1а, 3а, 4а, наиболее интенсивные во фракции А. Следы этих пиков также отмечены во фракции С+D. Спектры эмиссии пиков 1а, 3а, 4а представлены на рис. 4в, 4г. Спектр флуоресценции пика 1а соответствует спектру аминокислоты ти-

розина с максимумом эмиссии в районе 300 нм, а спектры флуоресценции пиков 3а и 4а идентичны спектру эмиссии триптофана. Однако подобные спектры флуоресценции могут иметь как свободные аминокислоты, так и короткие пептиды или более длинные белковые молекулы.

Для выяснения того, как создаются пики 1а, 3а и 4а — сигналами индивидуальных аминокислот или иными соединениями (например, пептидами, белками, комплексами белков, пептидов или аминокислот с нефлуоресцирующими компонентами РОВ и т.д.), был проведен в идентичных условиях ОФ—ВЭЖХ анализ аутентичных ароматических аминокислот тирозина (ММ-181 Да) и триптофана (ММ-204 Да). Из 20 аминокислот, входящих в состав белков, флуоресценцией обладают только 3 — тирозин, триптофан и фенилаланин, причем квантовый выход фенилаланина на порядок ниже такового у двух других, что делает невозможным его идентификацию в условиях данного эксперимента. Поэтому только тирозин и триптофан могут быть источниками обнаруженной белковоподобной флуоресценции РОВ, что и служит предметом особого внимания к этим аминокислотам в настоящей работе. Оказалось, что времена элюции тирозина и триптофана (1.9 и 5.8 мин соответственно) полностью совпадают со временами элюции пиков 1а и 4а соответственно (рис. 3б, 3в, 3д). В то же время флуоресцентные спектры пиков 1а и 4а имеют максимумы 300 и 350 нм (рис. 4в, 4г), соответствующие флуоресцентным максимумам тирозина и триптофана [3]. Совпадение времени элюции тирозина и триптофана и пиков 1а и 4а, а также схожесть их флуоресцентных спектров служит подтверждением того, что большая часть (>50%) белковоподобной флуоресценции фракций РОВ обусловлена свободными ароматическими аминокислотами — тирозином и триптофаном. Следует подчеркнуть, что обогащение низкомолекулярными аминокислотами фракций *A* и *B* наноразмерного диапазона удалось обнаружить только после предварительного фракционирования СРОВ методом ЭХ—ЭПАГ и диализа фракций через мембрану 10 кДа, что показано выше. Скорее всего, при эксклюзивной хроматографии СРОВ свободные аминокислоты сохраняются в составе фракций *A* и *B* наибольшего и среднего МР за счет гидрофобных взаимодействий, в противном случае, согласно принципам эксклюзивной хроматографии, свободные аминокислоты должны были бы элюироваться в общем объеме колонки как компоненты наименьшего размера и далее удаляться в процессе диализа. Следу-

ет отметить, что свободные аминокислоты обнаружены только на втором этапе при анализе фракций *A* и *B* с помощью ОФ—ВЭЖХ, разрушающего гидрофобные связи, благодаря которым свободные аминокислоты удерживаются в составе наноразмерных фракций с номинальным МР более 10 кДа. Триптофаноподобную флуоресценцию, обнаруженную в пиках 2—7 и 3а фракций *A* и *B* (рис. 4в—д), можно объяснить взаимодействием аминокислот, пептидов или белков с отдельными небелковыми компонентами РОВ.

Обнаружение в природной воде частиц РОВ наноразмерного диапазона, содержащих свободные аминокислоты, изолированные от прямого внешнего воздействия и дальнейшей деградаци, важно для понимания значения РОВ в качестве природного архива аминокислот и, следовательно, потенциального источника структурных компонентов белка.

## ВЫВОДЫ

На основании комплексного анализа препарата СРОВ, включающего в себя первоначальное препаративное фракционирование исходного образца СРОВ с помощью ЭХ—ЭПАГ, диализ и лиофилизацию полученных фракций различного МР; анализ полученных фракций с помощью трехмерной флуоресценции; ОФ—ВЭЖХ в сочетании с мультиволновым детектором флуоресценции полученных фракций различного МР, обнаружено, что гуминоподобная флуоресценция присутствует в исходном РОВ и всех фракциях, а белковоподобная флуоресценция практически полностью локализована во фракциях *A* и *B* наибольшего и среднего МР.

Гуминоподобная флуоресценция разделяется на несколько флуорофоров, различающихся как степенью гидрофобности, так и максимумами эмиссии, что указывает на формирование гуминоподобной флуоресценции РОВ согласно суперпозиционной модели.

Сравнение времени элюции и флуоресцентных спектров индивидуальных ароматических аминокислот тирозина и триптофана с соответствующими параметрами нескольких хроматографических пиков показало, что большая часть (>50%) белковоподобной флуоресценции СРОВ обусловлено свободными ароматическими аминокислотами тирозином и триптофаном, удерживаемыми во фракции наибольшего и среднего МР за счет гидрофобных связей.

Полученные данные помогают лучше понять молекулярную природу гуминоподобной и белковоподобной флуоресценции РОВ природной воды.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Варшал Г.М., Велюханова Т.К., Кощеева И.Я.* Геохимическая роль гумусовых кислот в миграции элементов // Гуминовые вещества в биосфере. М. Наука, 1993. С. 97–116.
2. *Дроздова А.Н., Пацаева С.В., Хунджуа Д.А.* Флуоресценция растворенного органического вещества как маркер распространения пресных вод в Карском море и заливах архипелага Новая Земля // Океанология. 2017. Т. 57. № 1. С. 49–56.
3. *Лакович Дж.* Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир, 1986. 496 с.
4. *Трубецкой О.А., Трубецкая О.Е.* Обратнo-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография стабильных электрофоретических фракций почвенных гуминовых кислот // Почвоведение. 2015. № 2. С. 166–174. (Перевод: *Trubetskoj O.A., Trubetskaya O.E.* Reversed-phase high-performance liquid chromatography of the stable electrophoretic fractions of soil humic acids // Eurasian Soil Sci. 2015. V. 48. P. 48–156.
5. *Трубецкой О.А., Трубецкая О.Е., Ришар К.* Фотохимическая активность и флуоресценция электрофоретических фракций водных гуминовых веществ // Вод. ресурсы. 2009. Т. 36. № 5. С. 543–550. (Перевод: *Trubetskoj O.A., Trubetskaya O.E., Richard C.* Photochemical activity and fluorescence of electrophoretic fractions of aquatic humic matter // Water Res. 2009. V. 36. P. 518–524.)
6. *Хунджуа Д.А., Пацаева С.В., Трубецкой О.А., Трубецкая О.Е.* Анализ растворенного органического вещества пресноводных озер Карелии обратнo-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией с одновременной регистрацией оптической плотности и флуоресценции // ВМУ. Сер. 3. ФИЗИКА. АСТРОНОМИЯ. 2017. № 1. С. 66–73. (Перевод: *D.A. Khundzhua, S.V. Patsaeva, Trubetskoj O.A., Trubetskaya O.E.* An Analysis of dissolved organic matter from freshwater Karelian lakes using reversed-phase high-performance liquid chromatography with online absorbance and fluorescence analysis // Moscow Univ. Physics Bull. 2017. V. 72. № 1. P. 68–75.
7. *Alberts J.J., Takács M.* Total luminescence spectra of IHSS standard and reference fulvic acids, humic acids and natural organic matter: comparison of aquatic and terrestrial source terms // Org. Geochem. 2004. V. 35. P. 243–256.
8. *Andrew A.A., Del Vecchio R., Subramaniam A., Blough N.V.* Chromophoric dissolved organic matter (CDOM) in the Equatorial Atlantic Ocean: Optical properties and their relation to CDOM structure and source // Mar. Chem. 2013. V. 148. P. 33–43.
9. *Barsotti F., Ghigo G., Vione D.* Computational assessment of the fluorescence emission of phenol oligomers: A possible insight into the fluorescence properties of humic-like substances (HULIS) // J. Photochemistry and Photobiol. Aю Chem. 2016. V. 315. P. 87–93.
10. *Boyle E., Guerriero N., Thiallet A., Del Vecchio R., Blough N.* Optical properties of humic substances and CDOM: relation to structure // Environ. Sci. Technol. 2009. V. 43. P. 2262–2268.
11. *Coble P.* Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy // Mar. Chem. 1996. V. 51. P. 325–346.
12. *Coble P.G.* Marine optical biogeochemistry: the chemistry of ocean color // Chem. Rev. 2007. V. 107. P. 402–418.
13. *Coble P., Green A.S., Blough N.V., Gagosian B.R.* Characterization of dissolved organic matter in Black Sea by fluorescence spectroscopy // Nature. 1990. V. 348. P. 432–435.
14. *Hedges J.I.* Global biogeochemical cycles: progress and problems // Mar. Chem. 1992. V. 39. P. 67–93.
15. *Hubberten U., Lara R.J., Kattner G.* Refractory organic compounds in polar waters: relationship between humic substances and amino acids in the Arctic and Antarctic // J Mar Res. 1995. V. 53. P. 137–149.
16. *Huguet A., Vacher L., Saubusse S., Etcheber H., Abril G., Relexans S., Ibalot F., Parlanti E.* New insights into the size distribution of fluorescent dissolved organic matter in estuarine waters // Org. Geochem. 2010. V. 41. P. 595–610.
17. *Keil R.G., Kirchman D.L.* Abiotic transformation of labile protein to refractory protein in sea water // Mar. Chem. 1994. V. 45. P. 187–196.
18. *McKay G., Couch K.D., Mezyk S.P., Rosario-Ortiz F.L.* Investigation of the coupled effects of molecular weight and charge-transfer interactions on optical and photochemical properties of dissolved organic matter // Environ. Sci. Technol. 2016. V. 50. P. 8093–8102.
19. *Senesi N., Miano T.M., Provenzano M.R., Brunetti G.* Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy // Soil Sci. 1991. V. 152. P. 259–271.
20. *Stedmon C.A., Markager S., Bro R.* Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy // Marine Chem. 2003. V. 82. P. 239–254.
21. *Trubetskaya O.E., Richard C., Voyard G., Marchenkov V.V., Trubetskoj O.A.* RP-HPLC and spectroscopic characterization of Suwannee River water NOM after concentrated urea treatment and dialysis // Desalination and Water Treatment. 2016. V. 57. P. 5358–5364.
22. *Trubetskaya O.E., Trubetskoj O.A., Voyard G., Richard C.* Determination of hydrophobicity and optical properties of soil humic acids isolated by different methods // J. Geochem. Explor. 2013. V. 132. P. 84–89.
23. *Trubetskoj O.A., Richard C., Guyot G., Voyard G., Trubetskaya O.E.* Analysis of electrophoretic soil humic ac-

- ids fractions by reversed-phase high performance liquid chromatography with on-line absorbance and fluorescence detection // *J. Chromatography A*. 2012. V. 1243. P. 62–68.
24. Wu F.C., Evance R.D., Dillon P.J. Separation and characterization of NOM by high-performance liquid chromatography and on-line three-dimensional excitation emission matrix fluorescence detection // *Environ. Sci. Technol.* 2003. V. 37. P. 3687–3693.
25. Yamashita Y., Fichot C.G., Shen Y., Jaffe R., Benner R. Linkage among fluorescent dissolved organic matter, dissolved amino acids and lignin-derived phenols in a river-influenced ocean margin // *Frontiers in Marine Sci.* 2015. V. 2. P. 1–14.
26. Yamashita Y., Tanoue E. Chemical characterization of protein-like fluorophores in DOM in relation to aromatic amino acids // *Mar. Chem.* 2003. V. 82. P. 255–271.

## ANALYSIS OF FLUOROPHORES OF ORGANIC SUBSTANCES DISSOLVED IN SUVANI RIVER WATER USING REVERSED-PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY

© 2019 O. A. Trubetskoj<sup>1,\*</sup>, O. E. Trubetskaya<sup>2,\*\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Basic Biological Problems of the Russian Academy of Sciences  
Russia 142290 Pushchino*

<sup>2</sup>*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences  
Russia 142290 Pushchino*

\*e-mail: olegi03@yahoo.com, \*\*trub@bibch.ru

Received: 05.07.2017

Revised version received: 28.08.2017

Accepted: 29.09.2017

Reversed-phase high-efficiency liquid chromatography was used in combination with detection by multi-wave fluorescence for analysis of organic substances dissolved in natural water of the Suwannee River. Also analyzed were the stable electrophoretic fractions *A*, *B*, and *C+D*, obtained by a combination of preparative size-exclusion chromatography and analytical electrophoresis in a polyacrylamide gel. Fraction *A* has the largest molecular size, and fraction *C+D*, the smallest. Using 3D fluorescent analysis, humic-like fluorescence was detected both in the original sample and in all fractions; protein-like fluorescence is almost fully localized in fractions *A* and *B* of the largest and middle molecular sizes. The wide peak of humic-like fluorescence is split into several groups of fluorophores with different emissions maxima (435, 455, 460, and 465 nm) and degrees of hydrophobicity. The obtained results were analyzed in relation to contemporary theories of formation of humic-like fluorescence of dissolved organic substances. The low-molecular free aromatic amino acids tyrosine and tryptophan were identified in fractions *A* and *B* of the highest molecular size and constitute >50% of the protein-like fluorescence of the organic substances dissolved in the Suwannee River water. The data obtained ensure better understanding of the molecular nature of protein-like and humic-like fluorescence of organic substance dissolved in natural water.

**Keywords:** organic substances dissolved in natural water, protein-like and humic-like fluorescence, combination of preparative exclusive chromatography with analytical electrophoresis, reversed-phase high efficiency liquid chromatography in combination with multiwave fluorescent detection.

**DOI:** 10.31857/S0321-0596464428-437