

УДК 547. 912: 594. 1

Н. В. Поспелова, Н. Т. Берберова, М. В. Нехорошев

МЕТОД ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ МИДИЙНОГО ХОЗЯЙСТВА

Комплексное исследование гидробионтов – объектов марикультуры – необходимо для оптимизации процесса культивирования и оценки влияния марихозяйства на прибрежные экосистемы [5]. Конечной же целью балансовых исследований является определение количественной и качественной роли марихозяйства в трансформации вещества и энергии в сообществе и экосистеме, и следовательно выявление экологической значимости мидийных хозяйств в Крыму. Поэтому взаимосвязанными оказываются различные методы гидробиологии, популяционной экологии и химии. Чисто химические методы анализа, положенные в основу экологических исследований, должны отвечать следующим требованиям: быстрота и простота исполнения, максимальная точность результатов, а также многоэлементность как основа экономичности.

Целью данной работы послужила разработка комплексного метода оценки: кормовой базы мидий, самих моллюсков (*Mytilus galloprovincialis*) и их биоотложений с учетом содержания витаминов А и Е, каротиноидов, холестерина и некоторых металлов. Для этого подобраны эффективные и современные методы исследования: спектрофотометрия, высокочувствительная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), беспламенная атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС). Также нами предложен электрохимический метод определения антиоксидантов в липидах морских организмов; определяемая концентрация 1-15 М³/л. Этот метод предложен после обнаружения авторами методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) стабильных радикалов при окислении липидных экстрактов морских организмов [9].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мидии *Mytilus galloprovincialis* были выращены на экспериментальном марихозяйстве на базе ИнБЮМ НАН Украины. Взвешенное вещество собирали в районе марихозяйства в 20 – литровые бутылки и фильтровали через стекловолоконные фильтры GF/C. Биоотложения собирали непосредственно на ферме в специально сконструированных приборах [10]. Каротиноиды определяли спектрофотометрически [6, 11], тяжелые металлы – с помощью беспламенной атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС). Для биологически активных веществ предлагается методика одновременного определения стероидов, витаминов А и Е с использованием высокочувствительной жидкостной хроматографии.

Пробы на биологически активные вещества и на металлы готовились отдельно. В первых пробах определяли омыляемые и неомыляемые каротиноиды, причем количество неомыляемых каротиноидов (каротинов) в тканях мидий в несколько раз меньше, чем омыляемых (ксантофиллов). Из проб – взвешенного вещества,

осажденного на фильтре, различных тканей мидий, биоотложений мидий – были получены спиртовые экстракты. После определения в них смеси каротиноидов, экстракты омыляли с 60% КОН и аскорбиновой кислотой на водяной бане при температуре 78°C в течение 30 мин. Затем неомыляемые вещества переводили в гексан, куда предварительно добавляли ионол (2,6-дитрет-бутил-4-метилфенол, перекристаллизованный из спирта) в качестве антиоксиданта с целью предотвращения перекисного окисления исследуемых веществ. Гексановые экстракты промывали водой до исчезновения следов щелочи, сушили над безводным NaSO_4 и определяли в них неомыляемые каротиноиды. Непосредственно перед хроматографией пробу упаривали досуха и растворяли в 0,1 – 0,5 мл элюента (в зависимости от предполагаемой концентрации определяемых веществ в пробе). Элюентом служил 1,5% раствор изопропанола в гексане. Хроматографическое разделение веществ производилось на «Милюхроме – 4» с использованием стандартной колонки с силикагелем при длине волны 292 нм. Время выхода ретинола составило 1 – 1,5 мин., α – токоферола – 3,3 – 3,4 мин.

Стандартная методика одновременного определения витаминов А и Е [12] была дополнена возможностью определения в этой же пробе смеси стероидов (основной компонент – холестерин), время выхода которых составило 9,8 – 10,7 мин. Таким образом, данная методика позволяет в одной пробе определить количественное содержание ксантофиллов, каротинов, α – токоферола, ретинола и смеси стероидов (в мидии – холестерина и 24-метилхлестерина [4]).

В подготовке проб на металлы (Zn, Cu, Cd, Pb) особое внимание уделялось подготовке посуды. Известно, что при анализе низких концентраций элементов все методы подвержены систематическим ошибкам, основным источником которых является влияние матрицы [3]. Так как навески взвешенного вещества были минимальны (1 – 11 мг), а чувствительность прибора достаточно высока, незначительное загрязнение извне приводит к недостоверности результатов. В связи с этим посуду и фильтры предварительно очищали от следов металлов 0,5% раствором дитизона в ацетоне. Для подготовки проб для ААС использовали озоление при температуре 450°C (для тканей мидий и биоотложений) и кислотную минерализацию (для взвешенного вещества). Использованная методика опробована нами при исследовании тканей мидий.

Для определения антиоксидантов в липидах электрохимическим методом использовали липиды, полученные экстракцией свежей печени черноморской акулы – катран, различных тканей мидий смесью хлороформ : метанол, соответственно, по объему реагентов 2 : 1, с последующей очисткой от примесей по методике [7]. Количество антиоксидантов определяли, на потенциостате ПИ-50С и полярографе ОН-103. Чувствительность анализа составила $1 \cdot 10^{-6}$ А/мл. Оборудование: ячейка стеклянная объемом до 2 мл с тремя электродами:

- 1 - платиновый диск диаметром 2 мм;
- 2 - вспомогательный - нихромовая спираль;
- 3 - электрод сравнения (хлорсеребряный электрод с водонепроницаемой ножкой).

В качестве растворителя применяли безводный метилхлорид, фоновым электролитом служил 0,1 М тетрабутиламмоний перхлорат ($(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{NClO}_4$). Калибровочные графики строили по известным концентрациям ионора и ферроцена относительно высоты волны окисления антиоксиданта. Линейность сохраняется в

пределах концентрации антиоксиданта $1-15 \text{ M}^{-3}$ /л. Потенциал окисления антиоксидантов – 1,2 – 1,4 В.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам предварительных исследований средняя концентрация общих каротиноидов в мягких тканях мидий составила 0,7 – 8,1 мг/100 г сырого веса тканей, неомыляемых – до 7 мг/100 г сырого веса в печени и следы (0,06 – 0,08 мг/100 г сырого веса) в других органах. Содержание α – токоферола в гонадах, жабрах и печени составила от 0,08 до 0,19 мг/г сырого веса ткани. Концентрация общих каротиноидов во взвешенном веществе составила 0,23 – 1,4 мкг/л или 34 – 150 мг/100 г сухой массы взвеси, в биоотложениях – 80 – 140 мг/100 г сухой массы. Таким образом, концентрации пигментов в кормовой базе и биоотложениях различаются незначительно. Анализ содержания металлов показал значительное концентрирование цинка, кадмия, свинца и меди в биоотложениях мидий – в 10-70 раз по сравнению с тканями. При этом ПДК этих металлов в тканях мидий Севастопольской бухты не превышала нормы.

Исследуемые в настоящей работе вещества (α – токоферол, каротиноиды, цинк) обладают выраженной антиоксидантной активностью, причем известно, что каротиноиды проявляют эту активность в 35 – 500 раз сильнее, чем α – токоферол, общеизвестный антиоксидант в животных и растительных тканях [14]. Известные методы определения антиоксидантов, которыми пользуются в настоящее время в морской биохимии, имеют существенные недостатки. Так, в работе [13] количество биоантиоксидантов в морских водорослях определяли изменением во времени массы непредельных эталонных соединений, что делало определение весьма длительным; другие методы с использованием липоксигеназы сои и микросом печени крыс, которые применяли для идентификации антиоксидантов в оболочниках, достаточно сложны [15]. Найденные нами ранее методом ЭПР стабильные радикалы при окислении липидов морских рыб и беспозвоночных, послужили основой для разработки электрохимического метода определения биоантиоксидантов. Недавно показано, что электрохимическое окисление биологических субстратов может служить моделью важнейших биологических реакций, таких, например, как дегидрирование НАДН и его аналогов [1].

В предлагаемом нами методе, в отличие от перечисленных, достигается не только количественное определение биоантиоксидантов, но и их качественная идентификация [2], поскольку потенциалы окисления антиоксидантов не лежат в области окисления других соединений липидной природы. Молекулярная масса изучаемых биоантиоксидантов не известна (в расчетах мы принимали за 200), тем не менее мы можем утверждать, что процесс электрохимического окисления изучаемых биологических субстратов в метилхлориде одноэлектронен. Это, в первую очередь, подтверждается появлением описанного нами ранее сигнала ЭПР при электролизе липидных экстрактов мидий, печени катрана, артемии и других объектов в резонаторе ЭПР-спектрометра при потенциале пика окисления. Скорость окисления антиоксидантов ограничена диффузией: соблюдается прямолинейная зависимость в координатах ток-корень квадратный из скорости сканирования потенциала ($v = 0.5-2.0, \text{ V} \cdot \text{сек}^{-1}$). Диффузный характер окисления указывает на отсутствие кинетических, каталитических и других эффектов при окислении липидных экстрактов изучаемых морских организмов.

Используя предложенную методику мы нашли, что в свежеприготовленных липидных экстрактах черноморской акулы – катран и мидий, выращенных на искусственных коллекторах в Крыму, концентрация биоантиоксиданта составляет 0.3-0.4% от массы липидов, что соответствует данным, полученным с использованием ВЭЖХ при определении α -токоферола в тканях мидий [8].

Метод можно применять и для определения антиоксидантов в липидных экстрактах из различных природных объектов, а также ионола и родственных ему синтетических аналогов, для которых потенциал окисления лежит в пределах от 0.5 до 2.0 V; определение занимает около 5 минут.

ВЫВОДЫ

Предложен комплексный метод оценки химических параметров в системе: кормовая база – мидии – биоотложения мидий. При этом возможно одновременное определение каротиноидов, жирорастворимых витаминов и холестерина в одной пробе.

Список литературы

1. Берберова Н.Т., Кибизова А.Ю., Охлобыстин О.Ю. Рибофлавин как катализатор аутодегидрирования НАДН // Ж. общ. хим. - 1990, №5. - С. 1012.
2. Берберова Н.Т., Поспелова Н.В., Новоселова Ю.В., Нехорошев М.В. Определение антиоксидантов в липидных экстрактах морских организмов // Тез. докл. научно – практ. конф. «Прикладная физическая химия» (Алушта, Крым, Украина, 27 – 30 октября 2002 г.) – Симферополь, 2002. – С. 12 – 14.
3. Ветров В. А., Кузнецова А. М. Микроэлементы в природных средах региона озера Байкал. – Новосибирск: ИГХСОРАН, 1997. – 530 с.
4. Еляков Г. Б., Стоник В. А. Стероиды морских организмов. – М.: Наука, 1988. – 208 с.
5. Иванов В. Н., Холодов В. И., Сеничева М. И., Пиркова А. В., Булатов К. В. Биология культивируемых мидий. – Киев: Наукова думка, 1989. – 100 с.
6. Карнаухов В. Н. Биологические функции каротиноидов. – М.: Наука, 1988. – 223 с.
7. Кейтс М. Техника липидологии. – М.: Наука, 1975. – 322 с.
8. Нехорошев М.В., Иванов В.Н., Дробецкая И.В. Содержание биоантиоксидантов в черноморских мидиях // Тез. докл. 5 Междунар. конф. «Биоантиоксидант» (Москва, Россия, 18-20 ноября 1998г.) – Москва, 1998. – С. 67-68.
9. Нехорошев М.В., Усс Ю.А., Климов Е.С., Берберова Н.Т., Охлобыстин О.Ю. Стабильный радикал из морских организмов // Докл. АН УССР. – 1989. - Сер. «Б», №10. - С. 78.
10. Нехорошев М.В., Усс Ю.А., Шаляпин А.К. Химический состав биоотложений и скорость их выделения культивируемыми мидиями // Экология моря. – 1990. – В. 36. – С. 37-41.
11. Сапожников В. В., Агатова А. И., Аржанова Р. В. и др. Методы гидрохимических исследований основных биогенных элементов. – М.: ВНИРО, 1988. – 120 с.
12. Якушина Л. М., Бендер Е. Д., Вешиков В. В., Рындакова И. А. Определение некоторых жирорастворимых витаминов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии // Теоретические и клинические аспекты науки о питании. – 1987. – Т 111. - С. 134-144.
13. Fujimoto K., Kameda T. Separation of Antioxigenic (antioxidant) compounds from marine algae // Hidrobiologia. – 1984. - V 116\117. - P. 111.
14. Nobuyoshi Shimidzu, Masafumi Goto, Wataru Miki. Carotenoids as Singlet Oxygen Quenchers in Marine Organisms // Fisheries Science. – 1996. – V 62. – № 1. – P. 134-137.
15. Sato A., Shindo T., Kasanuki N., Nasedawa K. Antioxidant metabolites from the tunicate amaroucium multiplicatum // J. Nat. Prod. – 1989. - № 5. - P. 975.

Поступила в редакцию 12.08.2002 г.