

HUMINIŲ RŪGŠČIŲ IR FULVORŪGŠČIŲ NUSTATYMAS *MULTISKAN MS* ADAPTAVUS PROGRAMĄ *GENESIS LITE*

Alvyra ŠLEPETIENĖ, Inga LIAUDANSKIENĖ

Lietuvos žemdirbystės institutas
Akademija, Dotnuva, Kėdainių rajonas
El. p. alvyra@lzi.lt

Santrauka

Tyrimai atlikti 2002-2004 m. LŽI Analitinėje (nuo 2004 m. Cheminių tyrimų) laboratorijoje siekiant įvertinti Multiskan MS instaliuotos programos Genesis Lite galimybes humuso medžiagoms nustatyti. Atliktos huminių rūgščių ir fulvorūgščių ištraukos 25 dirvožemio mėginiuose. Oksidacija atlikta pagal Tiurino metodo Nikitino modifikaciją. Fotometravimui 300 μ l matuojamo tirpalo pilta į 96 vietų plokšteles ir fotometruota naudojant programą Genesis Lite su šviesos filtrais $\lambda = 590$ ir 620 nm. Pagrindinis standartinis tirpalas ruoštas iš gliukozės (1 ml / 1 mg C), standartinius tirpalus deginant ir skiedžiant kaip ir tiriamus mėginius. Tyrimais nustatyta huminių rūgščių ir fulvorūgščių pakartojimų skaičiaus plokštelėje, praskiedimo laipsnio, filtro šviesos bangos ilgio įtaka duomenų standartinam nuokrypiui ir variacijos koeficientui. Taip pat buvo nustatytas huminių rūgščių ir fulvorūgščių kiekis ne vien tik pagal organinės C kiekį, bet ir naudojant standartinius huminių rūgščių preparatų tirpalus. Iširta, kaip su programa Genesis Lite operatyviai keisti matavimo parametrus, redaguoti, įvesti praskiedimus, daryti standartų atranką, įrašyti kelias matavimo programas, eliminuoti duomenis, atlikti pakartotinį matavimą, gautus analizės duomenis įrašyti elektroninėje formoje arba atspausdinti. Įvertinus gautų duomenų V_x % ir SD, rekomenduotinas optimalus pakartojimų skaičius plokštelėje – 3, filtro bangos ilgis – 590 nm; praskiedimas 2-10 kartų. Atlikus metodinius tyrimus, aprašytas huminių rūgščių ir fulvorūgščių nustatymas naudojant Multiskan MS ir programą Genesis Lite.

Reikšminiai žodžiai: Multiskan MS, Genesis Lite, fotometrinis nustatymas, huminės rūgštys, fulvorūgštys.

Įvadas

Humuso medžiagų nustatymas automatinio fotometru turi tam tikrų pranašumų: didesnis darbo našumas, taupomi cheminiai reagentai, mažiau teršiama aplinka, palyginus su kitais metodais. Šis metodas labai tinkamas nustatyti mažus medžiagos kiekius. Metodo greitis, tikslumas labai priklauso nuo turimos techninės įrangos šiam darbui atlikti. Paplitęs humuso bendrojo kiekio nustatymas naudojant rankomis valdomus spektrofotometrus su duomenų apskaičiavimu iš kalibracinio grafiko, sudaryto iš standartinius C kiekius turinčių tirpalų analizės duomenų /Janušienė, 1997; Wąchalewski, 1999/ arba naudojant elektrofotokolorimetrą pagal CINAO rekomendaciją¹. Daugiakanalio fotometro su programine įranga naudojimas humuso medžiagų kiekiui dirvožemyje nustatyti iki 2000 m. buvo nežinomas ir neaprašytas. 1999-2000 m. LŽI Analitinėje laboratorijoje atliktais tyrimais humusui nustatyti išbandyta daugiakanaliame fotometre instaliuota programa /Šlepetienė, Butkutė, 2001/. Tačiau ši programa yra ribotų galimybių. 2001 m. iš LMSF lėšų įsigyta kompiuterinė pro-

¹ Opređenje gumusa po metodu Taurina v modifikaciji CINAO. - 1984, GOST 2613-84

grama Genesis Lite (*ThermoLabsystem*) skirta darbo automatiniams fotometrais galimybėms išplėsti^{2,3}.

Pagrindinė paruošimo fotometravimui procedūra – organinių medžiagų oksidavimas pagal Tiurino metodo Nikitino modifikaciją, praskiedimas, tirpalo nusistovėjimas. Pagal kalio bichromato kiekį, sunaudotą oksidacijai, sprendžiama apie humuso medžiagų kiekį dirvožemyje. Oksidacijos metu šešiavalentis chromas redukuojasi iki trivalenčio, turinčio žalią spalvą. Tiurino tūrinis (titrimetrinis) humuso nustatymo metodas dažniausiai naudojamas masinėms analizėms, nes jis yra pakankamai tikslus, paprastas ir greitas /Orlov, Grišina, 1981; Ponomareva, Plotnikova, 1980/. Vietoj titravimo pritaikius fotometrinių procedūrą, patobulėja metodas, nes nebereikia ruošti titravimui tirpalų, juos nuolat tikrinti, o vietoj titravimo matuojamas optinis tankis.

Darbo tikslas – adaptuoti programą *Genesis Lite* huminėms rūgštims ir fulvorūgštims nustatyti pagal literatūros šaltiniuose aprašytą metodiką ir gautus naujus tyrimų duomenis, sukurti darbo programas (vadinamus protokolus) huminių rūgščių ir fulvorūgščių kiekiui nustatyti, aprašyti metodą bei įvertinti jo galimybes.

Tyrimų sąlygos ir metodai

Dirvožemis. Tyrimams buvo naudoti dirvožemio ėminiai, imti 2002-2003 m. iš 0-10, 10-20, 20-30 cm sluoksnių, $n = 25$, išrinkus akimis matomas augalų liekanas, susmulkinti ir persijoti per 0,25 mm sietą.

Huminių rūgščių ir fulvorūgščių išskyrimas. Humuso medžiagos buvo tirpinamos 0,1 M natrio šarmo tirpalu, gautose (**a**) ištraukose huminės rūgštys nuo fulvorūgščių atskiriamos, nusodinant humines rūgštis (**ah**) sieros rūgšties tirpalu /Šlepetienė, Butkutė, 2003/.

a tirpalas. Pasverti 4 g dirvožemio, užpilta 40 ml 0,1 M NaOH, 10 ml sotaus natrio sulfato, periodiškai maišyta kas valandą. Kitą dieną centrifuguota ($3750 \text{ aps min}^{-1}$). 15ml **a** ištraukos išgarinta, pilta 5 ml chromo mišinio, sudeginta per 30 min., skaičiuojant nuo to laiko, kai temperatūra pasieks $+160^\circ\text{C}$ /Nikitin, 1983; Opređenje gumusa..., 1984; Orlov, Grišina, 1981/. Atvėsus, kolbučių turinys suplautas distiliuotu vandeniu į 100 ml matavimo kolbutes, išmaišytas ir paliktas per naktį pastovėti. Ne anksčiau kaip kitą dieną matuota fotometru Multiskan MS naudojant programą Genesis Lite.

ah tirpalas. Į 20 ml **a** ištraukos įpilta 1n H_2SO_4 tiek, kad tirpalo pH būtų 1,3-1,5, nusodintos huminės rūgštys, kurios vėl tirpintos 0,1 M NaOH. Pilta 5 ml chromo mišinio, sudeginta šlapiu būdu ir skiesta kaip ir **a** tirpalas (žr. aukščiau).

Standartų ruošimas fotometriniams nustatymui. 2,5000 g gliukozės (arba atitinkamai sacharozės) matavimo kolboje ištirpinta 1 litre distiliuoto vandens. Gautas standartinis tirpalas, 1 ml turintis 1 mg C. Standartų serija ruošta iš pagrindinio standartinio tirpalo: į Erlenmejerio kolbutes pilta 0,0 ml, 0,5 ml, 1 ml, 2,0 ml, 3 ml ir 10 ml pagrindinio standartinio tirpalo (1 ml / 1 mg C). Šie standartiniai tirpalai taip, kaip ir tiriamieji, išgarinti ant plytelės lengvai verdant ir baigti džiovinti termostate (iki 70°C). Stebėti, kad turinys neparuoduotų. Standartai deginti įprastai, pridėdant tą patį chromo mišinio tūrį, kaip ir tiriamiems mėginiams sudeginant šlapiu būdu. Gauti tirpalai skiesti iki 100 ml matavimo kolbute. Išmaišyta ir naudota fotometravimui. Antrajam huminių rūgščių nustatymo būdui, naudojant kaip standartus huminių rūgščių preparatus, oksidavimas buvo nereikalingas, matuoti geltonai rudos spalvos tirpalai, pasirinkus optimalų filtrą su šviesos bangos ilgiu 450 nm. Standartiniai tirpalai iš huminių rūgščių preparatų buvo ruošiami 0,00; 0,0625, 0,125, 0,250, 0,500 ir 1,00 % koncentracijos.

² Introduction to Labsystems Genesis Lite Windows based microplate software. - 97 p.

³ Multiskan MS EX. Labsystems prietaisų instrukcijos (Rinkinys). - 1998

Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Darbas Multiskan MS su programa *Genesis Lite* atliktas pagal pagrindinį darbo procedūrų aprašymą: sukuriamas protokolai; nurodoma plokštelė; parenkami matavimo parametrai; išmatuojama, įrašomi duomenys ir spausdinama. 1 lentelėje pateiktas standartinių tirpalų, matuotų fotometru Multiskan MS analogiškai kaip ir mėginiai, aprašymas fotometravimui supylus atitinkama tvarka plokštelėje. Vienoje plokštelėje 1-3 pozicijoje sudėti 3 standartinių tirpalų pakartojimai, o kituose – tiriamų bandinių tirpalai.

1 lentelė. Standartiniai C tirpalai **a**, **ah** nustatymui ir jų vertės programoje

Table 1. Standard C solutions for **a**, **ah** determination and their values in the programme

Standartas Standard	mg C	C % programoje C% in the programme		Standarto vieta plokštelėje Place of standard in the plate		
		a	ah			
STD 1	0,0	0,0000	0,0000	A ₁	A ₂	A ₃
STD2	0,5	0,0417	0,0312	B ₁	B ₂	B ₃
STD 3	1,0	0,0834	0,0624	C ₁	C ₂	C ₃
STD 4	2,0	0,1668	0,1248	D ₁	D ₂	D ₃
STD 5	3,0	0,2502	0,1872	E ₁	E ₂	E ₃
STD 6	10,0	0,8340	0,6240	F ₁	F ₂	F ₃

Optinio filtro, matavimų pakartojimų skaičiaus plokštelėje įtaka. Palyginti duomenys, gauti naudojant 590 nm ir 620 nm prietaise įmontuotus filtrus (2 lentelė). Variacijos koeficientas (Vx %) gautas prietaise, matuojant atskirų mėginių **a** ištraukas su 620 nm filtru, buvo nuo 0,000 % iki 14,2, vidutiniškai 3,1 %. Variacijos koeficientas, matuojant **a** ištraukas trimis pakartojimais atskirų mėginių su 590 nm filtru, buvo nuo 0,000 % iki 11,4 %, vidutiniškai 2,8 %. Taigi nežymiai mažesnė variacija buvo matuojant 590 nm filtru. Mažiausias standartinis nuokrypis (SD), matuojant 590 nm filtru, gautas 0,111-0,553, su 620 nm filtru – atitinkamai 0,049-0,324. Tolesni tyrimai atlikti su 590 nm filtru.

2 lentelė. Šviesos filtro parinkimo įtaka matavimo parametrams (**a** tirpalas): skaitiklyje – min-max reikšmės / vardiklyje – vidutinės; dirvožemio mėginių skaičius (n = 25), pakartojimų skaičius plokštelėje – 3

Table 2. The effect of choice of light filtre on the measuring parameters (**a** solution); in the numerator – min-max values / in the denominator – mean values; number of soil samples (n = 25), number of replications per plate – 3

Rodiklis / Parameter	Šviesos filtras / Filter of light	
	590 nm	620 nm
Vx %	<u>0,000-11,4</u> 2,8	<u>0,000-14,2</u> 3,1
SD	0,111-0,553	0,049-0,324

Pilant tirpalus fotometravimui 3-imis pakartojimais, plokštelėje Vx % buvo mažesnis, negu pilant 2-iem arba 6-iais pakartojimais. Pilant tirpalus daugiakanale pipete rankomis 6 pakartojimais įsiveda žmogiškasis faktorius, didinantis matavimo duomenų variaciją (rankos nuovargis), be to, didėja darbo laiko sąnaudos, todėl optimalus pasirinktas pakartojimų skaičius plokštelėje 3 (3 lentelė).

3 lentelė. Matavimų pakartojimų skaičiaus įtaka matavimo parametrui (**ah tirpalas**): skaitiklyje – min-max reikšmės, vardiklyje – vidutinės; dirvožemio mėginių skaičius (n = 8)
Table 3. The influence of the number measuring repetitions on the measuring parameters (**ah solution**); in the numerator – min-max values / in the denominator – mean values; number of soil samples (n = 8)

Rodiklis / Parameter	Pakartojimų plokštelėje skaičius Number of repetitions per plate		
	2	3	6
	Filtro bangos ilgis 590 nm / Wavelength of filter 590 nm		
Vx %	<u>0.00-5.55</u> 2,02	<u>0.00-3.74</u> 1,38	<u>2.95-7.24</u> 4,93
SD	<u>0.000-0.005</u> 0,008	<u>0.000-0.012</u> 0,003	<u>0.003-0.009</u> 0,006

Tirpalų praskiedimo laipsnis. Prieš matuojant tirpalai praskiesti ir į programą įvestas praskiedimo koeficientas. Standartiniai tirpalai matavimui buvo naudojami pradiniai, nepraskiesti. Labiau praskiedus, nustatomos koncentracijos turėjo tendenciją mažėti (4 lentelė). Tačiau matuojant tirpalus su koncentracijomis C % > 0,5 %, tendencija mažėti buvo nežymi.

4 lentelė. Praskiedimo įtaka a tirpalo matavimo parametrui; Point to point skaičiavimo būdas; 3 pakartojimai plokštelėje
Table 4. The influence of dilution on a solution's measurement parameters. Point to point calculation mode; 3 replicates per plate

Mėginys / Sample	C %		
	2 *	5 *	10*
U1	0,260-0,270	0,212-0,237	0,084-0,084
U2	0,221-0,299	0,188-0,212	0,084-0,187
U3	0,270-0,289	0,181-0,237	0,230-0,250
U4	0,289-0,308	0,230-0,261	0,181-0,230
U5	0,270-0,279	0,261-0,261	0,181-0,233
U7	0,328-0,328	0,285-0,334	0,279-0,304
U8	0,542-0,513	0,473-0,528	0,473-0,522

* Praskiedimo koeficientas (2, 5, 10)
Dilution coefficient (2, 5, 10)

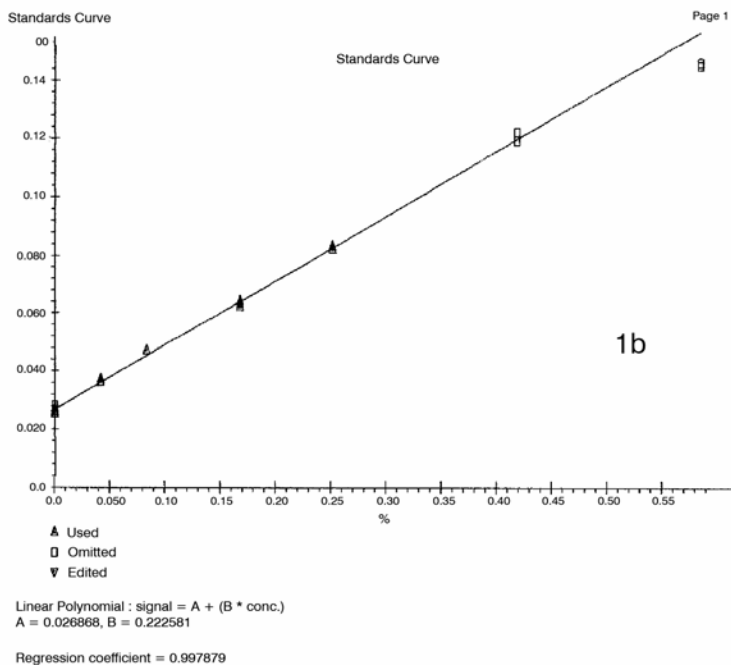
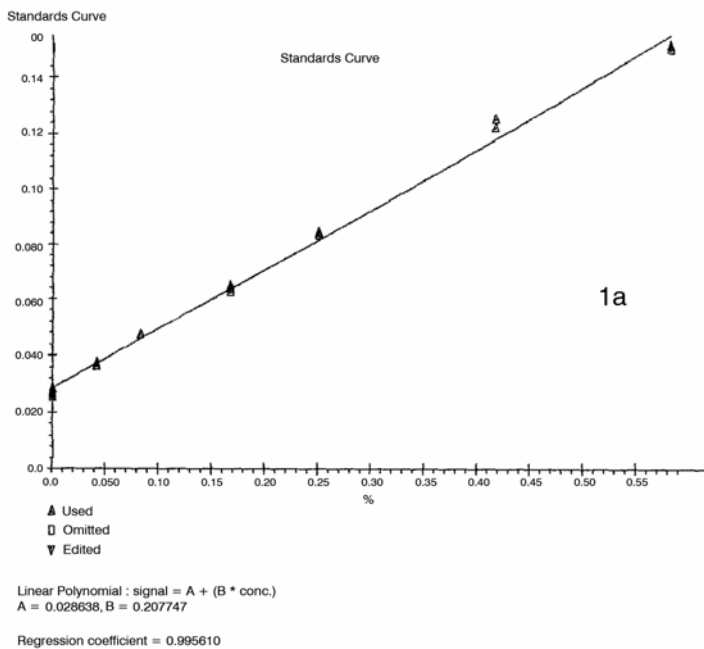
5 lentelėje pateikti duomenys absorbcijos verčių, variacijos koeficientai ir standartinis nuokrypis matuojant plokštelėje tiriamus tirpalus lyginant su standartais, paruoštais iš huminių rūgščių preparatų. Vx % buvo 0,255-1,479, SD 0,001-0,007.

5 lentelė. Matavimo parametrai **ah** tirpalų, naudojant standartiniams tirpalams huminių rūgščių preparatus; šviesos filtras 450 nm;

Table 5. *Measuring parameters of ah solutions using preparations of humic acids for standard solutions; light filter 450 nm*

Tirpalo Nr. <i>Solution No.</i>	Absorbcijos vertės <i>Values of absorbance</i>			Koncentracijos vertės <i>Values of concentration</i>			Vx %	SD
	min.	max.	Vidurkis <i>Average</i>	min.	max.	Vidurkis <i>Average</i>		
U1	0,539	0,543	0,540	0,440	0,443	0,441	0,377	0,002
U8	0,241	0,247	0,243	0,181	0,186	0,183	1,195	0,002
U9	0,605	0,623	0,610	0,497	0,513	0,502	1,479	0,007
U10	0,170	0,172	0,171	0,119	0,121	0,120	0,591	0,001
U11	0,323	0,328	0,325	0,252	0,256	0,254	0,739	0,002
U51	0,537	0,540	0,539	0,438	0,441	0,439	0,255	0,001
U59	0,621	0,631	0,626	0,511	0,520	0,515	0,771	0,004
U61	0,327	0,330	0,329	0,256	0,258	0,257	0,425	0,001

Kitos Genesis Lite galimybės. Taikant Genesis Lite programą, galima ne vieną kartą naudoti tuos pačius standartinių tirpalų matavimus, jų pagrindu paruoštą kalibracinę grafiką, įrašytą į kompiuterio atmintį, naudoti kitų plokštelių matavimams, nors ten ir nepilami standartiniai tirpalai. Tai leidžia sutaupyti medžiagas ir darbo laiką, jei įsitikinta, kad prietaisas matuoja patikimai. Naudojant Genesis Lite kinetinę funkciją, galima stebėti matavimus tam tikrais laiko intervalais, pradedant 10 sek. Genesis Lite programa numato pasirinkimą kelių lygčių tipus duomenims skaičiuoti. Dažniausiai naudojama linijinė polinominė lygtis (signalas = A+B * konc.), kurios pavidalas tiesinis ir tiesė eina per didžiausią taškų skaičių kalibraciniame grafike. Point to point (nuo taško iki taško) vadinama lygtis, kurios pavidalas yra laužyta linija: jungia nuosekliai visus standartų pamatuotus taškus. Pamatavus standartinius tirpalus, gaunamas regresijos koeficientas tarp standarto teorinių reikšmių ir pamatuotųjų. Labiausiai nutolusius taškus kalibraciniame grafike galima eliminuoti ar pakeisti. 1 ir 2 paveiksluose matyti, kai eliminavus dviejų standartinių tirpalų (6 ir 7) matavimų reikšmes, kalibraciniame grafike regresijos koeficientas padidėjo nuo buvusio 0,9956 (visos reikšmės panaudotos) iki 0,9979 (po eliminavimo). Labiausiai nutolusius standartinio tirpalo taškus galima eliminuoti, nes matuojamų tiriamų mėginių koncentracijos buvo mažesnės už 6 ir 7 standarto reikšmes (pav.).



Standartinė kreivė: 1a) naudojant 7 standartinius tirpalus; 1b) naudojant 5 standartinius tirpalus
Standard curve: 1a) using 7 standard solutions; 1b) using 5 standard solutions

Išvados

1. Nustatytas Genesis Lite tinkamumas huminėms rūgštims ir fulvorūgštims nustatyti prietaisu Multiskan MS. Įvertinus gautų duomenų V_x % ir SD, kuriant darbo protokolus, rekomenduotinas optimalus pakartojimų skaičius plokštelėje – 3, filtro bangos ilgis – 590 nm; praskiedimas – 2-10 kartų. Aprašyta kalibracinio grafiko redagavimo, išsaugojimo ir kitos programos galimybės.

2. Nustatyta, kad huminių rūgščių kiekį galima įvertinti ir pagal C kiekį huminių rūgščių (ah) tirpaluose (0,1 M NaOH) ir naudojant huminių rūgščių preparatų standartinius tirpalus.

Gauta 2005 02 07

Pasirašyta spaudai 2005 03 24

LITERATŪRA

1. Janušienė V. Huminių rūgščių kiekio spektrofotometrinis nustatymas vyraujančiuose Lietuvos dirvožemiuose // Žemdirbystė: mokslo darbai / LŽI, LŽŪU - Akademija, 1997, t.60, p.60-67

2. Nikitin B. A. Utočnenija k metodike opredelenija gumusa v počve // Agrochimija. - 1983, No.8, s.101-106

3. Orlov D.S., Grišina L.A. Praktikum po chimii gumusa. - Moskva: izd. Mosk. u-ta. - 1981, s. 24-38

4. Ponomareva V.V., Plotnikova T.A. Gumus i počvoobrazovanie. - Moskva: Nauka, 1980. - 220 s.

5. Šlepetienė A., Butkutė B. Use of multichannel photometer (Multiskan MS) for determination of humic materials in soil after dichromate oxidation // Analytical & Bioanalytical Chemistry. - 2003, vol.75, p.1260-1264

6. Šlepetienė A., Butkutė B. Humuso ir organinės anglies nustatymas programuojamu daugiakanaliu fotometru Multiskan MS // Žemdirbystė: mokslo darbai / LŽI, LŽŪU. - 2001, t.75, p.95-109

7. Wąchalewski T. Spektrofotometryczne wyznaczenie składu frakcyjnego próchnicy // W: Chemia środowiska: ćwiczenia i seminary: praca zbiorowa. Cz.2 / pod red. Elżbiety Szczepaniec-Cięciak, Pawła Kościelniaka. - Kraków: Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, 1999, s.39-44

**DETERMINATION OF HUMIC AND FULVIC ACIDS BY *MULTISKAN MS*
HAVING ADAPTED THE PROGRAMME *GENESIS LITE***

A. Šlepetienė, I. Liaudanskienė

S u m m a r y

Laboratory tests conducted at the LIA's chemical research laboratory during the period 2002-2004 were designed to estimate the feasibility of use of Genesis Lite Windows software installed in Multiskan MS for the determination of humic substances. Humic and fulvic acids were extracted from 25 soil samples. Oxidation was performed by wet chemistry following Tyurin's method as modified by Nikitin. Channels of the microplate used for photometry were filled with 300 μl of the solutions by an 8-channel automatic micropipette. Standard glucose solution (1 mg C ml^{-1}) was used. The software Genesis Lite with light filters $\lambda = 590$ and 620 nm was used for photometry. The chief standard solution was prepared from glucose (1 mg C ml^{-1}), the standard solutions were oxydised and diluted in the same way as the soil samples. The tests revealed the effects of the number of repetitions of humic and fulvic acids per plate, dilution degree, wavelength of filter on the standard deviation and variation coefficient of the data. We also measured the content of humic and fulvic acids not only according to organic C content, but also by using standard solutions of humic acids preparations. We also ascertained how Genesis Lite can be used for rapid change of measuring parameters, editing, entering of dilution coefficient, selection of standards, application of several measuring programmes, data elimination, performance of repeated measurement, recording the analysis data in an electronic form or printing. Assessment of $V \times \%$ and SD of our data suggests that the recommended optimal number of repetitions per plate is 3, wavelength of the filter 590 nm; dilution 2-10 times. Having conducted methodological tests, a description was prepared for the determination of humic and fulvic acids using Multiskan MS and Genesis Lite software.

Key words: Multiskan MS, Genesis Lite, photometric determination, humic acids, fulvic acids.