



МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

им. М. В. Ломоносова

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Перминова Ирина Васильевна

**АНАЛИЗ, КЛАССИФИКАЦИЯ И ПРОГНОЗ СВОЙСТВ
ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ**

02.00.02 – Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени

доктора химических наук

Москва-2000

СОДЕРЖАНИЕ

СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ	5
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ: ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ (ЛИТЕРАТУРНЫЕ ДАННЫЕ)	11
1.1 Элементный состав гумусовых кислот.....	15
1.1.1 Элементный состав гумусовых кислот различного происхождения.....	15
1.1.2 Методические аспекты элементного анализа гумусовых кислот	17
1.2 Структурно-групповой состав гумусовых кислот.....	21
1.2.1 Функциональный состав гумусовых кислот	21
1.2.2 Методические аспекты титриметрического анализа гумусовых кислот	25
1.2.3 Исследование структурно-группового состава углеродного скелета деструктивными методами анализа	29
1.2.4 Исследование структурно-группового состава гумусовых кислот методами спектроскопии ЯМР	31
1.3 Структурно-групповой состав гумусовых кислот различного происхождения по данным ¹³ C ЯМР	35
1.4 Проблемы количественной ¹³ C ЯМР-спектроскопии гумусовых кислот.....	37
1.5 Спектроскопия ПМР гумусовых кислот	45
1.6 Молекулярно-массовый состав гумусовых кислот.....	50
1.6.1 Исследование молекулярно-массового распределения гумусовых кислот методом эксклюзионной хроматографии.....	52
1.6.2 Методические аспекты определения молекулярных масс гумусовых кислот методом эксклюзионной хроматографии.....	54
1.7 Описание строения гумусовых кислот и проблемы классификации.....	56
1.7.1 Использование блок-схем и структурных формул для описания строения гумусовых кислот.....	56
1.7.2 Численное описание строения гумусовых кислот	61
1.8 Комплексообразующие и детоксицирующие свойства гумусовых кислот по отношению к тяжелым металлам	64
1.8.1 Подходы к описанию стехиометрии взаимодействия гумусовых кислот с тяжелыми металлами.....	66
1.8.2 Установление концентрации металлсвязывающих центров в растворах гумусовых кислот.....	67
1.8.3 Влияние кислотной диссоциации ГФК и ионной силы раствора на константу устойчивости комплексов металл-ГФК.....	70
1.8.4 Методы исследования комплексообразования гумусовых кислот с тяжелыми металлами.....	72
1.8.5 Комплексообразование гумусовых кислот с Hg(II)	73
1.8.6 Исследование детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к тяжелым металлам методом биотестирования	76

1.9	Связывающие и детоксицирующие свойства гумусовых кислот по отношению к органическим экотоксикантам.....	77
1.9.1	Связывание органических экотоксикантов гумусовыми кислотами.....	77
1.9.2	Методические аспекты определения констант связывания органических экотоксикантов гумусовыми кислотами	81
1.9.3	Исследование детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к органическим экотоксикантам.....	82
2.	ГЛАВА 2. ФОРМИРОВАНИЕ ВЫБОРОК ПРЕПАРАТОВ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ	88
2.1	Выделение препаратов гумусовых кислот из природных объектов	88
2.2	Описание использованных в работе препаратов	91
3.	ГЛАВА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ	97
3.1	Определение элементного состава препаратов гумусовых кислот в расчете на беззольную безводную пробу	97
3.1.1	Определение CHN, S и O	98
3.1.2	Определение влажности	100
3.1.3	Определение общей зольности и состава зольных элементов ..	101
3.1.4	Схема обработки данных элементного анализа для расчета элементного состава гумусовых кислот.....	107
3.2	Элементный состав препаратов гумусовых кислот, использованных в работе	110
4.	ГЛАВА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРНО-ГРУППОВОГО СОСТАВА ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ	115
4.1	Одномерная спектроскопия ЯМР ^{13}C и ПМР	115
4.1.1	Качественная характеристика ^{13}C ЯМР- и ПМР-спектров гумусовых кислот	115
4.1.2	Выбор условий регистрации количественных ^{13}C ЯМР-спектров гумусовых кислот.....	118
4.1.3	Структурно-групповой состав исследованных препаратов гумусовых кислот по данным ^{13}C ЯМР	121
4.1.4	ПМР-определение водорода в составе скелетных фрагментов и функциональных групп гумусовых кислот	125
4.1.5	Структурно-групповой состав исследованных препаратов гумусовых кислот по данным ПМР	135
4.1.6	Определение кислотных групп гумусовых кислот титриметрическими методами	140
4.1.7	Сопоставление результатов определения кислотных групп методами ПМР-спектроскопии и титриметрии	143
4.1.8	Расчет фрагментного состава и его применение для характеристики закономерностей строения гумусовых кислот.....	145
4.2	Двумерная корреляционная спектроскопия ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C	148
4.2.1	Общая характеристика использованных в работе двумерных гомо- и гетероядерных ЯМР-экспериментов	149
4.2.2	$^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY-спектры	151
4.2.3	$^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY спектры	153

4.2.4 ^1H , ^{13}C HSQC спектры.....	156
4.2.5 Сравнительный анализ результатов двумерных ЯМР-экспериментов	160
4.3 Определение структурно-группового состава негидролизуемой и гидролизуемой части гумусовых кислот	162
4.3.1 Одномерная спектроскопия ЯМР ^{13}C	163
4.3.2 Двумерная спектроскопия ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C	166
4.3.3 Определение углеводного состава гидролизуемой части гумусовых кислот методом ВЭЖХ.....	167
5. ГЛАВА 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-МАССОВОГО СОСТАВА ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ	173
5.1 Выбор оптимальных условий анализа	173
5.2 Обоснование выбора образца сравнения для определения молекулярных масс гумусовых кислот.....	178
5.3 Характеристика молекулярно-массового состава исследованных препаратов гумусовых кислот	182
6. ГЛАВА 6. КЛАССИФИКАЦИЯ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ ПО ПРОИСХОЖДЕНИЮ И ФРАКЦИОННОМУ СОСТАВУ	195
6.1 Характеристика полученного массива данных.....	195
6.2 Классификация с использованием интегральных дескрипторов состава.....	201
6.3 Классификация с использованием расширенного набора дескрипторов молекулярно-массового состава.....	206
6.3.1 Классификация по методу <i>K</i> -ближайших соседей	207
6.3.2 Классификация с использованием нейросетей	212
7. ГЛАВА 7. ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗЫВАЮЩИХ И ДЕТОКСИЦИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ.....	217
7.1 Исследование комплексообразующих свойств гумусовых кислот по отношению к Hg(II)	218
7.1.1 Определение содержания ртуть-связывающих центров в гумусовых кислотах	222
7.1.2 Определение кажущихся констант устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II)	226
7.2 Исследование связывающих свойств гумусовых кислот по отношению ПАУ и атразину	235
7.2.1 Определение констант связывания гумусовых кислот с ПАУ.....	236
7.2.2 Определение констант связывания пирена гидролизованными препаратами гумусовых кислот.....	240
7.2.3 Зависимость констант связывания ПАУ гумусовыми кислотами от pH и ионной силы среды	241
7.2.4 Определение констант связывания гумусовых кислот с атразином	247
7.3 Концепция константы детоксикации как количественной характеристики детоксицирующих свойств гумусовых кислот	250
7.4 Исследование детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к Hg(II)	253
7.4.1 Выбор условий биотестирования для изучения детоксикации Hg(II) гумусовыми кислотами	253

7.4.2	Определение констант детоксикации Hg(II) гумусовыми кислотами.....	258
7.5	Исследование детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к ПАУ.....	262
7.5.1	Выбор условий биотестирования для изучения детоксикации ПАУ гумусовыми кислотами.....	263
7.5.2	Определение констант детоксикации ПАУ гумусовыми кислотами.....	264
7.5.3	Сравнение связывающих и детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к ПАУ.....	266
7.6	Исследование детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к атразину.....	268
7.6.1	Выбор условий биотестирования для изучения детоксикации атразина гумусовыми кислотами.....	268
7.6.2	Определение констант детоксикации атразина гумусовыми кислотами.....	271
7.6.3	Сравнение связывающих и детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к атразину.....	273
8.	ГЛАВА 8. ПРОГНОЗ СВОЙСТВ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЕСКРИПТОРОВ СОСТАВА.....	276
8.1	Корреляционная взаимосвязь дескрипторов состава и прогнозируемых свойств.....	277
8.2	Прогностические модели, полученные методом множественной регрессии.....	281
8.3	Прогностические модели, полученные методами многокомпонентного анализа.....	284
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	295
	ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ.....	298
	ВЫРАЖЕНИЕ ПРИЗНАТЕЛЬНОСТИ.....	300
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	301
	ПРИЛОЖЕНИЯ.....	319

СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

- ААСХП – атомно-адсорбционная спектрометрия холодного пара
 АЭС-ИСП – атомно-эмиссионная спектрометрия индуктивно-связанной плазмы
 ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
 ГВ – гуминовые вещества
 ГК – гуминовые кислоты
 ГФК – нефракционированная смесь гуминовых и фульвокислот (препарат)
 ГФК – гумусовые кислоты (общее название для гуминовых и фульвокислот)
 Да – Дальтон, единица измерения молекулярной массы
 ДМНК – дробный метод наименьших квадратов
 ДМСО-d₆ – дейтерированный диметилсульфоксид
 КБС – метод К-ближайших соседей
 КССВ, J – константа спин-спинового взаимодействия
 Л – серые лесные почвы
 ЛДА – линейный дискриминантный анализ
 ММ – молекулярная масса, Дальтон
 ММР – молекулярно-массовое распределение
 МР – множественная регрессия
 МСЦ – металлсвязывающий центр
 П^Д – дерново-подзолистые почвы
 ПАУ – полиядерные ароматические углеводороды
 ПА – полиакрилаты
 ПД – полидекстраны
 ПМА – полиметакрилаты
 ПМР – спектроскопия ядерного магнитного резонанса на ядрах ¹H
 ПСС – полистиролсульфонаты
 ПЭГ – полиэтиленгликоли
 РГК – метод регрессии на главных компонентах
 РОВ – растворенное органическое вещество
 РСЦ – ртуть-связывающий центр
 РСЦⁱ – ртуть-связывающий центр i-го типа
 Т – токсичность
 ФК – фульвокислоты
 ЭК₀ – концентрация, выше которой начинается снижение тест-отклика
 ЭК₅₀ – концентрация, вызывающая 50%-ное снижение тест-отклика
 ЭК₁₀₀ – концентрация, вызывающая полное подавление тест-функции
 ЭЛАН – элементный анализ
 ЭТ – экотоксикант
 ЭХ – эксклюзионная хроматография
 ЯМР ¹³C – спектроскопия ядерного магнитного резонанса на ядрах ¹³C
 ЯЭО – ядерный эффект Оверхаузера

- A – коэффициент асимметрии
 A_n – антрацен
 BCF – фактор биоконцентрирования
 Chl – биомасса водорослей *Chlorella Pyrenoidosa*
 $C_L(\dots)$ – общая молярная концентрация вещества в жидкой фазе
 C_i^m – число комбинаций
 D – эффект детоксикации
 E – эксцесс
 ϵ^* – массовый коэффициент поглощения, л/(мг С × см)
 F – интенсивность флуоресценции
 F_0 – постоянная флуоресценция
 F_m – максимальная флуоресценция
 F_v – переменная флуоресценция
 Flt – флуорантен
 $^1H, ^1H$ COSY – гомоядерная корреляционная двумерная спектроскопия ЯМР
 $^1H, ^1H$ TOCSY – гомоядерная корреляционная двумерная спектроскопия ЯМР
 $^1H, ^{13}C$ HSQC – гетероядерная корреляционная двумерная спектроскопия ЯМР
 I – ионная сила
 $I_{0-10, 20-30\dots}$ – поинтервальные интегралы
 j_{max} – возможное число комбинаций занятых и свободных центров в комплексе Hg_i ГФК
 k – микроскопическая константа связывания $Hg(II)$ с ГФК при условии идентичности всех РСЦ
 $k_{i,j,h}$ – микроскопическая константа связывания характеризующую образование j -й комбинации Hg_i ГФК из h -й комбинации Hg_{i-1} ГФК
 K – константа равновесия
 $K_{[A]}$ – условная константа равновесия, в которую включена $[A]$
 K_d – коэффициент распределения
 ΔK_d – неэксклюзивный эффект
 K_H – константа Генри
 $K(L^1/L^2)$ – константа лигандного обмена
 $K(РСЦ)$ – кажущаяся константа устойчивости гуматов ртути, выраженная через концентрацию РСЦ
 $K(РСЦ)^B$ – кажущаяся константа устойчивости комплексов гумусовых кислот с $Hg(II)$, рассчитываемая из данных по бионакоплению
 $K(РСЦ)^D$ – кажущаяся константа устойчивости комплексов гумусовых кислот с $Hg(II)$, рассчитываемая из данных по детоксикации
 K_{OC} – константа связывания, л/кг С
 K_{OC}^D – константа детоксикации, л/кг С
 K_{ow} – коэффициент распределения октанол-вода
 K_{sorb} – константа сорбции
 $I_{i,j}$ – комплекс Hg_i ГФК с определенной комбинацией свободных и занятых РСЦ

- L – лиганд
- m – индекс; число ртути-связывающих центров в молекуле гумусовых кислот
- M – металл
- M_n – среднечисловая молекулярная масса
- M_w – средневзвешенная молекулярная масса
- M_{nz} – z-средняя молекулярная масса
- M_w/M_n – полидисперсность
- P – уровень доверительной вероятности
- Py – пирен
- q_i – доля ионогенных групп i-го типа в общем количестве ионогенных групп
- Q – сорбция
- Q_{max} – максимальная сорбция
- $Q_{25, 50, 75}$ – квантили
- Q^2 – доля предсказанной дисперсии (оценка прогностической способности модели)
- r – коэффициент корреляции
- R – тест-отклик
- R^2 – доля объясненной дисперсии
- s – стандартное отклонение
- s_r – относительное стандартное отклонение
- V – объем
- T_d – время задержки между импульсами
- V_R – объем удерживания, мл
- V_0 – объем эксклюзии (мертвый объем колонки), мл
- V_t – общий объем колонки, мл
- X_{dir} – содержание элемента в препарате без коррекции на влажность и зольность пробы
- X_{corr} – содержание элемента в расчете на беззольную безводную пробу гумусовых кислот
- $Y(I)$ – параметр уравнения Дэвиса
- α – отношение концентрации несвязанной формы экотоксиканта к его общей концентрации
- $\beta_i(ML_i)$ – общая константа устойчивости комплекса ML_i
- θ – степень заполнения ртути-связывающих центров
- λ – коэффициент распределения вещества между раствором и сорбентом
- v – количество вещества
- v_{sorb} – количество вещества на сорбенте
- ν – молярное содержание компонента (моль/г)

ВВЕДЕНИЕ

Одним из интенсивно развивающихся направлений современной аналитической химии является анализ сложных органических матриц – продуктов жизнедеятельности и распада живых организмов. Важным представителем таких объектов являются гуминовые вещества (от латинского “humus” – земля, почва). Они составляют один из самых обширных резервуаров органического углерода, образуясь в результате распада отмерших организмов. Спецификой гуминовых веществ является стохастический характер, обусловленный особенностями их образования в результате естественного отбора устойчивых структур. Как следствие, к фундаментальным свойствам гуминовых веществ относятся нестехиометричность состава, нерегулярность строения, гетерогенность структурных элементов и полидисперсность. Тем самым для них понятие молекулы трансформируется в молекулярный ансамбль, каждый параметр которого описывается распределением. Поэтому к ним неприменим и традиционный способ численного описания строения органических соединений, характеризующий количество атомов в молекуле, число и типы связей между ними.

Отсутствие методологических подходов к анализу органических объектов стохастического характера и численному описанию их строения привело к тому, что несмотря на двухсотлетнюю историю изучения, определение класса гуминовых веществ до сих пор базируется на способе извлечения из природных объектов (темноокрашенные, азотсодержащие высокомолекулярные соединения, извлекаемые водными растворами щелочей из почв и каустобиолитов: торфа, угля и др.), а их общепринятая классификация – на процедуре фракционирования. Так, *гуминовые вещества* подразделяют на *гумин* (нерастворим во всем диапазоне pH), *гуминовые кислоты* (нерастворимы при $\text{pH} < 2$) и *фульвокислоты* (растворимы во всем диапазоне pH). Последние два класса объединяют под общим названием *гумусовые кислоты*.

Указанная ситуация определяет **актуальность** постановки систематических исследований по изучению строения гуминовых веществ, результаты которых могли бы служить основой для создания классификации по закономерностям их химического строения. Получение соответствующих данных возможно только на основании методологических подходов, которые бы учитывали специфику анализа объектов стохастического характера: отсутствие адекватных образцов сравнения и суммарный вклад погрешности метода, процедуры выделения и естественной изменчивости источника в

воспроизводимость результатов анализа. Кроме того, необходима адаптация методик к полидисперсности и гетерогенности объекта. Методологического обоснования требует и численное описание строения гуминовых веществ, необходимое для определения классификационных признаков и прогностического моделирования свойств. Особо актуальным является предсказание макролигандных свойств гумусовых кислот, благодаря которым они играют важнейшую роль в процессах самоочищения водных и почвенных экосистем, связывая как ионы тяжелых металлов, так и органические экотоксиканты. Умение предсказывать связывающие свойства гумусовых кислот будет способствовать их направленному использованию в качестве детоксицирующих агентов для рекультивации загрязненных сред.

Указанные подходы не могли сложиться в рамках предыдущего этапа развития анализа гуминовых веществ – в исследованиях “от вещества”, для которых метод служил средством достижения другой главной цели – получения новых сведений о веществе. Такая расстановка приоритетов была абсолютно оправданной в условиях весьма ограниченных знаний о природе объекта и способствовала их скорейшему накоплению усилиями целой плеяды блестящих ученых – М. Шнитцера (Канада), Д.С. Орлова (Россия), М. Вильсона (Австралия), Р. Малколма и П. МакКарти (США) и др. Однако постановка данных проблем весьма актуальна и полностью отвечает потребностям современного этапа развития анализа гуминовых веществ, который знаменуется сменой парадигмы “анализ от вещества” на “анализ от метода” (расширение сферы применения метода путем введения нового объекта). Это связано с существенно возросшим интересом к сложным многокомпонентным объектам со стороны химиков-аналитиков как следствие развития компьютерной техники, сделавшего доступным широкое применение статистических методов для интерпретации результатов анализа сложных систем.

Цель настоящей работы состояла в разработке общей методологии анализа гумусовых кислот и численного описания их строения, позволяющего определять классификационные признаки таких объектов и моделировать их свойства.

В работе были поставлены следующие основные задачи:

- создать представительную выборку препаратов гумусовых кислот с *широким* разнообразием состава и свойств, адекватную стохастическому характеру объекта;
- адаптировать существующие или разработать новые методики анализа для получения достоверных данных о составе гумусовых кислот при отсутствии адекватных образцов сравнения;

- определить элементный, структурно-групповой и молекулярно-массовый состав представительной выборки препаратов гумусовых кислот;
- разработать способы обработки данных для получения дескрипторов элементного, структурно-группового и молекулярно-массового состава гумусовых кислот;
- выявить дескрипторы состава, позволяющие классифицировать препараты гумусовых кислот по происхождению и фракционному составу;
- количественно охарактеризовать связывающие и детоксицирующие свойства гумусовых кислот по отношению к различным классам экотоксикантов;
- разработать подходы к получению прогностических моделей “строение – свойство”, позволяющие использовать весь комплекс полученных дескрипторов состава.

Глава 1. СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ: ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ (ЛИТЕРАТУРНЫЕ ДАННЫЕ)

Гуминовые вещества (ГВ) – это сложные смеси устойчивых к биодеструкции высокомолекулярных темноокрашенных органических соединений природного происхождения, образующихся при разложении растительных и животных остатков под действием микроорганизмов и абиотических факторов среды [Орлов и др., 1996]. ГВ представляют собой макрокомпоненту органического вещества почвенных и водных экосистем, а также твердых горючих ископаемых. Их содержание в почвах и водах составляет 60-80 % от общего органического вещества, в торфах и углях оно колеблется от 20 до 90 % [Thurman, 1985]. Общепринятая классификация ГВ [Stevenson, 1982; Орлов, 1992] основана на различии в растворимости в кислотах и щелочах. Согласно этой классификации ГВ подразделяют на три составляющие: гумин – неизвлекаемый остаток, нерастворимый ни в щелочах, ни в кислотах; гуминовые кислоты (ГК) – фракция ГВ, растворимая в щелочах и нерастворимая в кислотах (при $\text{pH} < 2$); фульвокислоты (ФК) – фракция ГВ, растворимая и в щелочах, и в кислотах. В качестве обобщающего названия, обозначающего как гуминовые, так и фульвокислоты, применяют термин "гумусовые кислоты". Гумусовые кислоты являются наиболее подвижной и реакционноспособной компонентой ГВ, активно участвующей в химических процессах, протекающих в экосистемах [Stevenson, 1982; Орлов, 1992, 1993]. Поэтому в дальнейшем наше внимание будет в основном сосредоточено на рассмотрении именно этой фракции ГВ.

История изучения ГВ насчитывает уже более двухсот лет. Впервые эти вещества были выделены из торфа и описаны немецким химиком Ахардом в 1786 году [Ahard, 1786]. Немецкой школе исследователей принадлежит разработка первых схем выделения и классификации ГВ [Stevenson, 1982]. Ими же был введен и сам термин – гуминовые вещества (Huminstoffe), произведенный от латинского "humus", что в переводе на русский означает "земля" или "почва". В исследование химических свойств ГВ наиболее весомый вклад был внесен в середине прошлого столетия шведским химиком Я. Берцелиусом и его учениками.

В двадцатом веке значительный вклад в исследование ГВ внесли российские и советские ученые. Всемирно известными стали имена М.А. Кононовой, Л.А. Христовой, Л.Н. Александровой, Т.А. Кухаренко, Д.С. Орлова и других. Однако в отличие от европейской традиции, в нашей стране исследование ГВ осуществлялось преимущественно в рамках почвоведения и химии горючих ископаемых. К числу немногих исключений

относятся работы Г.М. Варшал – крупнейшего специалиста в области форм миграции фульвокислот и металлов в природных водах, защитившей в 1994 г докторскую диссертацию по этой теме [Варшал, 1994]. Справедливости ради стоит отметить, что в это время и в других странах интерес химиков к данному объекту резко упал. Основной причиной этому явился тот факт, что к началу двадцатого столетия было достоверно установлено, что ГВ представляют собой объекты стохастического характера, сложность строения которых хорошо иллюстрирует модель структурного фрагмента гумусовых кислот почв, опубликованная в 1970 году Кляйнхемпелем [Kleinhempel, 1970] (рис. 1.1).

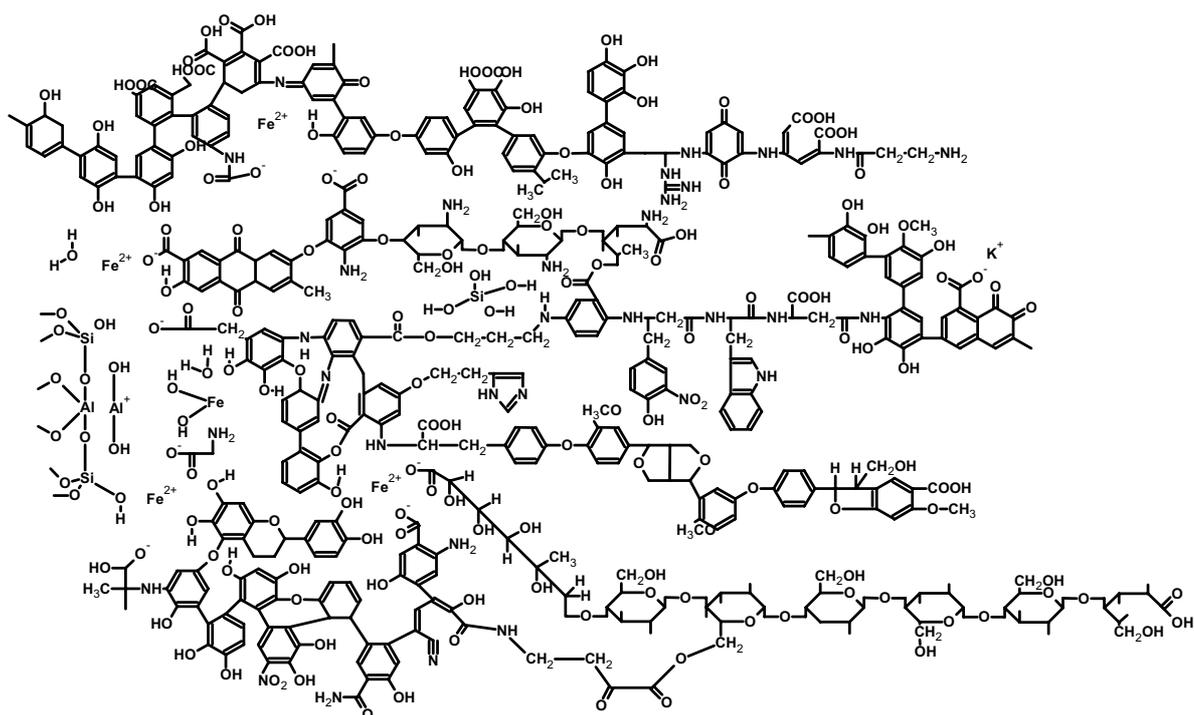


Рис. 1.1. Гипотетический структурный фрагмент гумусовых кислот почв [Kleinhempel, 1970].

Стохастический характер ГВ является следствием специфики процесса их образования, который, в отличие от биохимического синтеза живого вещества, не имеет генетического кода. Синтез ГВ происходит по принципу естественного отбора наиболее устойчивых к биоразложению структур: их время жизни в окружающей среде исчисляется сотнями и тысячами лет [Орлов, 1992; Орлов, 1993]. Как видно из приведенного структурного фрагмента, по своей химической природе они представляют собой нерегулярные сополимеры ароматических оксиполикарбоновых кислот с включениями азотсодержащих и углеводных фрагментов. Указанное строение – наличие каркасной части, т.е. ароматического углеродного скелета, замещенного алкильными и функциональными группами, среди которых преобладают карбоксильные, гидроксильные и метоксильные, и периферической части, обогащенной полисахаридными и полипептидными

фрагментами, – является общим для ГВ всех источников происхождения. По этой причине ГВ занимают одну из самых высоких ступенек в иерархии сложности строения природных органических соединений, превосходя нефти, лигнины и угли.

В силу сложности строения, уникально широк спектр взаимодействий, в которые могут вступать ГВ и, в особенности, их наиболее реакционноспособная часть – гумусовые кислоты (ГФК). Наличие таких групп как карбоксильная, гидроксильная, карбонильная в сочетании с присутствием ароматических структур обеспечивает способность гумусовых кислот вступать в ионные и донорно-акцепторные взаимодействия, образовывать водородные связи, активно участвовать в сорбционных процессах. Так, гумусовые кислоты хорошо связывают воду, способны к ионному обмену, образуют комплексы с металлами и аддукты с различными классами органических соединений.

Обладая указанными свойствами, гумусовые кислоты выполняют целый набор важных биосферных функций. К их числу относятся структурирование почвы [Martin and Waksman, 1941; Chaney and Swift, 1984], накопление питательных элементов и микроэлементов в доступной для растений форме [Tate, 1980], регулирование геохимических потоков металлов в водных и почвенных экосистемах [Варшал, 1973, Варшал, 1979; Линник и Набиванец, 1986; Орлов, 1993]. К концу двадцатого века, одной из основных проблем которого является химическое загрязнение окружающей среды, добавилась еще и протекторная функция. Под протекторным действием гумусовых кислот подразумевают их способность связывать в прочные комплексы как ионы металлов, так и органические экотоксиканты в загрязненных водных и почвенных средах [Орлов, 1993]. Экологические последствия такого связывания – изменение форм существования экотоксикантов и их миграционной способности [Варшал и др., 1983], уменьшение биодоступности [Landrum et al, 1987; Black and McCarthy, 1988] и токсичности [Bollag and Mayers, 1992]. Последнее обстоятельство весьма важно и связано с тем, что максимальной активностью обладает свободная форма токсиканта. Связанное вещество свою токсичность теряет. На этом основании гумусовые кислоты можно рассматривать как природные детоксиканты.

Таким образом, создание моделей биогеохимических циклов загрязняющих веществ, прогностические оценки их опасности, скорости накопления и времени жизни в окружающей среде невозможны без учета их взаимодействия с гумусовыми кислотами, которое коренным образом меняет как химическое, так и токсикологическое поведение экотоксикантов. Это обусловило настоятельную потребность в получении количественных

характеристик взаимодействия гумусовых кислот с различными экотоксикантами.

Химики, вооруженные новейшими инструментальными методами исследования, с энтузиазмом восприняли новый социальный заказ. Только за 1999 год в Chemical Abstracts отрецензировано более 1200 статей, в которых так или иначе рассматриваются проблемы изучения строения и свойств гумусовых кислот. В результате на сегодняшний день накоплен колоссальный экспериментальный материал. Однако его теоретическому обобщению препятствует то, что большинство данных получено путем “параллельного переноса” методик, разработанных для индивидуальных соединений. Это справедливо и для способов интерпретации данных. Кроме того, непредставительны используемые выборки препаратов (их размер не превышает 10-15 препаратов), что не отвечает стохастическому характеру объекта.

Указанные моменты связаны с отсутствием работ по методологии аналитического исследования и численного описания строения органических объектов стохастического характера. Так, несмотря на небывалый прогресс в области получения новых данных о гумусовых кислотах, за последние десять лет вышел единственный труд – монография профессора Московского университета Д.С. Орлова “Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации” [Орлов, 1990], в котором интенсивно прорабатываются методологические проблемы исследования и идентификации гумусовых кислот, делаются глубокие философские обобщения об их биосферной роли и симбиозе с живым веществом, вводится понятие о гумусовых кислотах как саморегулирующихся системах. При этом в силу специфики научных интересов автора основной упор в монографии делается на выявление факторов, детерминирующих генезис гумусовых кислот, на понимание их химической природы и биосферных функций. В то же время без ответа осталось большинство проблем, связанных со стратегией аналитического исследования гумусовых кислот, и способами численного описания их строения.

В связи с изложенным, в предлагаемом кратком обзоре литературы особое внимание уделялось рассмотрению аналитических методов и подходов, которые наиболее часто используются для исследования строения и свойств гумусовых кислот, а также способам свертки получаемой информации для ее дальнейшего использования для классификации и прогноза свойств гумусовых кислот.

1.1 Элементный состав гумусовых кислот

1.1.1 Элементный состав гумусовых кислот различного происхождения

Обычно под элементарным составом гумусовых кислот понимают состав их органической части, образованной сравнимыми количествами атомов углерода, водорода и кислорода. Обязательным минорным элементом является азот, почти во всех препаратах определяется и сера. Однако помимо органической части, в состав всех выделенных препаратов гумусовых кислот входит и неорганическая часть. Она состоит из зольных элементов (преимущественно, ионов металлов, оксидов кремния и алюминия) и гигроскопической влаги, содержание которой достигает 10%. Поэтому в общем виде брутто-формулу гумусовых кислот можно записать следующим образом:



где M – ионы металлов,

x, y, z, p, q, l, m, n – стехиометрические коэффициенты.

Средний элементный состав органической части гумусовых кислот различного происхождения приведен в табл. 1.1, заимствованной из работы [Rice and MacCarthy, 1991]. Авторы этой публикации подвергли статистической обработке данные по элементному составу 650 препаратов гумусовых кислот, опубликованные в более чем 400 литературных источниках. Поэтому приводимая ими сводка является наиболее представительной. Сравнимы с ней могут быть только данные, собранные Д.С. Орловым [Орлов, 1991], но, к сожалению, они относятся только к гумусовым кислотам почв.

Как видно из табл. 1.1, содержание углерода в ГК различного происхождения варьирует от 50 до 60 %, кислорода – от 30 до 40 %. В целом, для ГК характерны более низкие значения атомного соотношения Н/С, чем для ФК, что указывает на их большую ненасыщенность. Данный показатель убывает в ряду: морские донные отложения > пресные воды > торфа ≈ почвы. ФК характеризуются более низким содержанием углерода и более высоким – кислорода. Это предполагает большую степень замещения ароматического каркаса ФК кислородсодержащими функциональными группами. Максимальное содержание кислорода характерно для ФК пресных вод.

Средний элементный состав гумусовых кислот различного происхождения (в расчете на беззольную навеску, n – число препаратов, \pm стандартное отклонение) [Rice and MacCarthy, 1991]

Препарат	Содержание элементов, % (масс)					Атомные отношения	
	C	H	O*	N	S	O/C	H/C
ГК почв (n=215)	55.4 \pm 3.8	4.8 \pm 1	36.0 \pm 3.7	3.6 \pm 1.3	0.8 \pm 0.1 (n=67)	0.50 \pm 0.09	1.04 \pm 0.25
ФК почв (n=127)	45.3 \pm 5.4	5.0 \pm 1	46.2 \pm 5.2	2.6 \pm 1.3	1.3 \pm 0.5 (n=45)	0.78 \pm 0.16	1.35 \pm 0.34
ГК торфа (n=23)	57.1 \pm 2.5	5.0 \pm 0.8	35.2 \pm 2.7	2.8 \pm 1.0 (n=21)	0.4 \pm 0.2 (n=12)	0.47 \pm 0.06	1.04 \pm 0.17
ФК торфа (n=12)	54.2 \pm 4.3	5.3 \pm 1.1	37.8 \pm 3.7	2.0 \pm 0.5	0.8 \pm 0.2 (n=11)	0.53 \pm 0.09	1.20 \pm 0.33
ГК вод (n=56)	51.2 \pm 3	4.7 \pm 0.6	40.4 \pm 3.8	2.6 \pm 1.6	1.1 \pm 0.3 (n=13)	0.6 \pm 0.08	1.12 \pm 0.17
ФК вод (n=63)	46.7 \pm 4.3	4.2 \pm 0.7	45.9 \pm 5.1	2.3 \pm 1.07	1.2 \pm 0.7 (n=14)	0.75 \pm 0.14	1.10 \pm 0.13
ГК морских д.о.** (n=95)	56.3 \pm 6.6	5.8 \pm 1.4	31.7 \pm 7.8	3.8 \pm 1.5	3.1 \pm 1.4 (n=66)	0.45 \pm 0.18	1.23 \pm 0.23
ФК морских д.о. (n=12)	45.0 \pm 4.0	5.9 \pm 0.9	45.1 \pm 6.0	4.1 \pm 2.3	0.8 \pm 0.6 (n=11)	0.77 \pm 0.17	1.56 \pm 0.13

* подавляющее большинство данных по содержанию кислорода получено по разности; ** д.о. – донные отложения

Следует отметить, что наиболее узкими диапазонами стандартных отклонений (5-10% (отн) от среднего) характеризуются содержания C и O. Разброс значений для H гораздо больше (10-20% от среднего), но максимальные значения стандартных отклонений достигаются для содержаний N и S. По-видимому, это связано с большими ошибками в определении N и S как следствие их низкого содержания по сравнению с C, H и O. Нельзя исключать и того, что содержание N и S в гумусовых кислотах не подчиняется устойчивым закономерностям, а является довольно случайным.

Авторы процитированного выше обзора склонны относить наблюдающиеся вариации элементного состава гумусовых кислот различного происхождения к специфике их генезиса, отводя возможным погрешностям методического характера второстепенную роль. С нашей точки зрения, это может быть справедливо в отношении содержания углерода (особенно для низкочольных проб), тогда как содержание кислорода, водорода и азота

весьма существенно зависит как от метода определения (особенно кислород), так и способа корректировки первичных данных анализатора на содержание зольных элементов в пробе и гигроскопическую влажность. Наличие воды наиболее существенно влияет на результаты определения водорода. Поэтому именно данным фактором, с нашей точки зрения, объясняется то, что даже в пределах выборок препаратов сходного происхождения и фракционного состава величина относительного стандартного отклонения по водороду достигает 20 %, тогда как для двух других макроэлементов – кислорода и углерода – она не превышает 10 %. Присутствие в составе зольных элементов ионов щелочных и щелочноземельных металлов может приводить к образованию термостойких карбонатов и, как следствие, вызывать занижение результатов определения углерода. Несмотря на исключительно широкое использование элементного анализа для характеристики препаратов гумусовых кислот, его методическим аспектам посвящены лишь единичные работы [Kuwatsuka et al., 1978; Huffman et al., 1985; Rise and Sulbu, 1989; Abbt-Braun et al., 1990]. Поэтому мы сочли необходимым более подробно рассмотреть основные методы, применяемые для определения содержания элементов в гумусовых кислотах, и возможные источники систематических ошибок.

1.1.2 Методические аспекты элементного анализа гумусовых кислот

Определение CHN и S. Для определения C, H, N в гумусовых кислотах, как правило, используют метод автоматического полумикроанализа, позволяющего определять содержание всех трех элементов из одной навески 1.5-2 мг [Huffman et al., 1985]. Процесс определения можно схематично разбить на три стадии: окислительный пиролиз образца при 950-1100°C, разделение продуктов пиролиза (CO_2 , H_2O и N_2) и их детектирование [Kuwatsuka, 1978].

Для гумусовых кислот автоматическое определение не всегда дает правильные результаты, особенно для образцов, содержащих значительное количество минеральных компонентов [Huffman et al., 1985]. Причиной этому может быть неполное сгорание вещества при быстром пиролизе и/или связывание части диоксида углерода в термостойкие карбонаты щелочных металлов. По данным Д.С. Орлова [Орлов, 1990] занижение результатов по углероду может достигать 1-7% на каждые 10 % золы. Однако при наличии в препаратах окиси кремния щелочные металлы будут предпочтительнее связываться в более устойчивые силикаты. В таком случае присутствие металлов в меньшей степени влияет на результаты определения углерода.

Наименьшая точность данных C, H, N-анализа гумусовых кислот характерна для азота [Rice and MacCarthy, 1991]. Причиной этому может быть

то, что содержание азота в гумусовых кислотах мало и сильно варьирует от образца к образцу. Поэтому сложно подобрать подходящий стандарт для одновременного определения С, Н и N в гумусовых кислотах. Несоответствие же между содержанием элемента в образце и стандарте всегда приводит к значительным ошибкам определения [Методы количественного органического элементного микроанализа, 1987].

Серу в гумусовых кислотах определяют как с помощью анализаторов, так и вручную. Автоматическое определение серы включает те же стадии, что и анализ на С, Н, N, при этом детектируемой формой является SO₂. Ручное определение, как правило, включает сожжение пробы в колбе с кислородом, поглощение SO₂ слабым раствором H₂O₂ (доокисление SO₂ до SO₃) и последующее определение сульфат-иона с помощью ионной хроматографии или титрованием Ba²⁺ в присутствии металлоиндикатора [Huffman et al., 1985]. Низкие содержания серы приводят к необходимости использовать значительные количества вещества, что делает ручной анализ предпочтительнее.

Определение кислорода. Для определения кислорода используют два основных подхода. Во-первых, определение по разности между массой образца и суммарной массой всех других элементов, входящих в его состав:

$$O_{\Delta} = 100 \% - \Sigma(\% \text{ C}, \% \text{ H}, \% \text{ N}, \dots, \% \text{ зольность})$$

Недостатком этого метода является то, что на полученную величину накладываются ошибки определения всех остальных элементов и зольности.

Во-вторых, прямое определение. Основные стадии этого метода [Коршун и Гельман, 1949] включают в себя восстановительный пиролиз пробы и дальнейшую конвертацию продуктов пиролиза (CO, CO₂, H₂O, NO₂, SO₂) в CO путем их пропускания через слой сажи. При этом для правильного определения содержания кислорода в органическом веществе необходимо количественное превращение всех продуктов восстановительного пиролиза в CO. Однако в слое сажи возможно образование комплексов углерода и кислорода состава C_xO_y (x >> y [Методы количественного органического элементного микроанализа, 1987]), медленно разлагающихся с выделением CO. Поэтому для получения правильных результатов требуется постоянство условий анализа и близость содержания кислорода в образцах сравнения и анализируемых пробах.

Преимущественным методом определения кислорода в гумусовых кислотах является определение по разности. Хотя нельзя не отметить, что за последние годы растет количество работ, использующих прямое определение кислорода [Humic substances in the Suwannee river, 1994; Abbt-Braun et al., 1990]. Стандартным способом приведения данных по содержанию кислорода (как, впрочем, и других элементов) в статьях является массовое

процентное содержание, о котором говорится, что оно скорректировано на влажность и зольность. При этом за исключением двух специальных публикаций, посвященных проблемам элементного анализа гумусовых кислот [Huffman and Stuber, 1985; Abbt-Braun et al., 1990], ни в одной работе не описывается способ коррекции данных по содержанию кислорода на влажность и зольность. Поэтому нам остается только предположить, что исследователи осуществляют коррекцию данных согласно способу [Huffman and Stuber, 1985], описанному в монографии, выпущенной Международным обществом по изучению гумусовых веществ (IHSS). Он состоит в том, что в пробе гумусовых кислот определяют кислород (либо прямым методом, либо по разности), затем в ней же определяют содержание гигроскопической влаги, и коррекцию на влажность для варианта прямого определения кислорода осуществляют, вычитая кислород воды из найденного общего содержания кислорода в пробе. Описанную схему коррекции авторы верифицировали, проводя соответствующий анализ четырех препаратов гумусовых кислот, один из которых был заведомо высокозольный (зольность выше 50 %), а три других – низкозольные.

С нашей точки зрения, данная процедура требует дальнейшей верификации. Так, те же авторы [Huffman and Stuber, 1985] указывают, что процедура автоматического анализа на содержание кислорода включает в себя продувку пиролитической камеры горячим инертным газом после внесения пробы для удаления следов кислорода воздуха. При этом, отмечают они, вместе с воздухом может улетучиваться непрочно связанная вода из пробы. Тем не менее, в качестве стандартной процедуры коррекции результатов прямого определения кислорода предлагается простое вычитание кислорода гигроскопической воды. Этот факт заслуживает особого внимания в свете результатов, полученных в нашей работе.

Определение влажности. Для определения воды обычно используют два основных метода: титриметрический метод Фишера [Фритц и Шенк, 1978] и по потере веса образца при высушивании [Huffman et al., 1985]. Метод Фишера основан на окислительно–восстановительной реакции между SO_2 и I_2 в присутствии воды в среде метанола. Достоинством метода является то, что определяется только не входящая в структуру вещества вода. К недостаткам можно отнести малую устойчивость реагента, необходимость изолировать установку от влаги воздуха, а также мешающее влияние примесей, которые могут реагировать с иодом. К числу последних относятся активные карбонильные соединения, хиноны и меркаптаны [Huffman et al., 1985], т.е. группировки, которые могут присутствовать и в гумусовых кислотах. Еще одна причина, ограничивающая применимость метода Фишера

для гумусовых кислот, – их недостаточная растворимость в безводном метаноле.

Для определения влажности вторым методом образец гумусовых кислот высушивают при повышенной температуре (40-60°C) над P₂O₅ до постоянного веса или вакуумируют при нагревании до тех же температур в течение длительного времени (~24 часа), регистрируя потерю веса [Huffman et al., 1985]. Применяют этот метод и в несколько модифицированном виде. После тщательного высушивания образец экспонируют атмосферной влаге, и регистрируют зависимость набора веса образца от времени [Abbt-Braun et al., 1990]. Экстраполируя график данной зависимости на момент времени $t = 0$, определяют вес абсолютно-сухого образца. По разности между весом воздушно- и абсолютно-сухого образца находят его влажность.

Методы потери–набора веса менее трудоемки, чем метод Фишера, и не чувствительны к присутствию веществ, активных по отношению к иоду. Основная трудность – подбор оптимальной температуры для высушивания проб гумусовых кислот, поскольку зависимость потери веса образца гумусовых кислот от температуры не имеет плато [Huffman et al., 1985]. Потери веса медленно возрастают при повышении температуры до 800 С, после чего наблюдается некоторый скачок. По-видимому, происходит десорбция все более прочно связанной с веществом воды с плавным переходом к элиминированию воды, входящей в структуру гумусовых кислот. При сравнении результатов определения по потере веса с данными метода Фишера было установлено, что между ними наблюдается достаточно хорошее соответствие при температурах высушивания 40-60°C [Huffman et al., 1985].

Определение зольности. Зольность препаратов гумусовых кислот определяют по весу несгораемого остатка после полного сжигания образца на воздухе или в токе кислорода. Однако далеко не всегда критерий полноты сжигания обоснован. Так, в работе [Huffman et al., 1985] приведены результаты определения зольности образцов гумусовых кислот, полученные четырьмя различными лабораториями. Определение зольности выполняли, придерживаясь индивидуальных регламентов. В результате для одного и того же высокозольного образца разброс значений составил более 20% от величины. Следовательно, для высокозольных образцов некорректно определенная величина зольности может привести к существенному искажению значений содержаний основных элементов.

Таким образом, для определения элементного состава гумусовых кислот в расчете на беззольную безводную пробу необходимо провести определение CHN, S, влажности и зольности. При этом определение содержания гигроскопической воды в пробах гумусовых кислот и способ учета ее влияния на результаты определения Н и О требуют более глубокого методического

обоснования. Нерешенную проблему представляет собой и анализ высокозольных препаратов, в частности, характер влияния состава зольных элементов на определяемое содержание углерода.

1.2 Структурно-групповой состав гумусовых кислот

1.2.1 Функциональный состав гумусовых кислот

В настоящее время в гумусовых кислотах обнаружено более десяти различных типов кислород-, азот- и серусодержащих функциональных групп: карбоксильные, фенольные и спиртовые гидроксильные, карбонильные, хинонные, метоксильные, сложноэфирные, енольные, амино-, амидо- и имидогруппы, сульфо-, тиольные и дисульфидные группы [Schnitzer and Khan, 1972].

Кислородсодержащие группы. Кислород входит как в состав каркасной, так и периферической части гумусовых кислот. В последнем случае он находится преимущественно в углеводных фрагментах [Schnitzer and Khan, 1972; Stevenson, 1982; Орлов, 1992]. Обобщенные сведения о распределении кислорода по различным функциональным группам в гумусовых кислотах почв приведены в табл. 1.2.

Таблица 1.2

Распределение кислорода между функциональными группами в гумусовых кислотах почв, по данным [Schnitzer and Khan, 1972; Stevenson, 1982; Орлов, 1992]

Общее содержание кислорода,	COOH	C _{Ar} OH	C _{Alk} OH	C=O	Учтенный кислород,
%	% кислорода				%
Почвенные гуминовые кислоты					
37.2	24	33	10	8	75
36.8	26	25	15	7	74
35.4	18	38	13	4	73
Почвенные фульвокислоты					
47.3	58	19	12	6	95
44.8	65	12	13	9	99
47.7	61	9	16	4	90

Как видно из табл. 1.2, около 75% кислорода в молекулах ГК и около 95% – в ФК распределено между четырьмя типами функциональных групп: карбоксильными, фенольными и спиртовыми гидроксильными, и карбонильными, причем вклад этих групп в общее содержание кислорода различен для ГК и ФК. Вышеперечисленные функциональные группы (в первую очередь, карбоксильные и фенольные), определяют комплексообразующую способность гумусовых кислот по отношению к тяжелым металлам.

Хинонные и семихинонные. Методом ЭПР показано, что гумусовых кислотах содержание неспаренных электронов составляет $(0.1-40) \times 10^{16}$ спин/г [Senesi, 1990]. Присутствие данных групп обуславливает возможность протекания реакций с участием гумусовых кислот по свободнорадикальному механизму, в частности, восстановления ионов металлов в их присутствии и декарбоксилирование отдельных фрагментов гумусовых кислот.

Азотсодержащие группы. Содержание азота в гумусовых кислотах составляет 1-5% (табл. 1.1). Часть (40-60% [Орлов, 1990; Senesi, 1990]) азота входит в состав каркасной (негидролизуемой) части. Остальной азот находится в составе периферической (гидролизуемой) части.

По данным, опубликованном в монографии Д.С. Орлова [Орлов, 1990], азот периферической части распределяется следующим образом: 20-45% входит в состав аминокислотных остатков, 2-8% – в состав аминсахаров, 8-15% присутствует в гумусовых кислотах в виде солей аммония, до 20% – в неустановленных фрагментах. При этом азот каркасной части находится в составе следующих групп: NH_2 - группы, связанные с ароматическими кольцами; $-\text{NH}-$ и $=\text{N}-$ группы в открытых цепях; индольные, пиррольные и пиридиновые кольца; мостиковые NR -группы, связывающие хинонные кольца; аминокислоты, связанные с ароматическими ядрами через N.

Из приведенных фрагментов алифатические амины, аминокислоты и гетероциклы способны образовывать комплексные соединения с тяжелыми металлами. Таким образом, указанные группы, наряду с кислородсодержащими, могут влиять на комплексообразующие свойства гумусовых кислот по отношению к тяжелым металлам.

Серусодержащие группы. Согласно единственной найденной публикации, посвященной данной проблеме [Lowe, 1993], распределение серы в торфяных гумусовых кислотах можно представить следующим образом (в % от общей сетки): 8-12% – лабильные сульфонатные группы, 3-6% – аминокислоты, 4-19% – эфиры серной кислоты, 54-70% – тиолы, S-гетероциклы, стабильные сульфонаты, 3-23% – алифатические сульфиды. К сожалению, авторы работы [Lowe, 1992] не исследовали распределение серы между тиолами, S-гетероциклами и сульфонатами, а также не учитывали

возможность наличия дисульфидов и негидролизующих сульфидов. Между тем, эти группы заметно различаются по способности связывать Hg(II).

Результаты различных методов по **определению функционального состава** гумусовых кислот обобщены в табл. 1.3.

Таблица 1.3

Функциональный состав гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава

Группы	Метод определения		Содерж., ммоль/г	Литература
	реагент	колич. метод		
ГК почв				
COOH	CH ₃ OH+HCl	Цейзеля*	2.1-3.1	Драгунов, 1951
	–	Потенциометрия	3.4	Brunelot et al., 1989
	CH ₃ COOCa	Титрование	1.5-4.7	Schnitzer and Khan, 1972 Piccolo and Camici, 1990
COOH+ ArOH	CH ₂ N ₂	Цейзеля	4.7-7.2	Right and Schnitzer, 1960
	CH ₂ N ₂		5.7-8.7	Stevenson and Butler, 1969
	CH ₃ I+Ag ₂ O		6-9	Schnitzer and Desjardins, 1970
	–	Потенциометрия	3-6	Piccolo and Camici, 1990, Herbert et al., 1993
ArOH+ ROH	(CH ₃) ₂ SO ₄	Цейзеля	3.7-8.3	Ruffaldi and Schnitzer, 1972
	(CH ₃) ₂ SO ₄		7.8-10.1	Stevenson and Butler, 1969
	Ac ₂ O+Py	Титрование	6.9-9.2	Wright and Schnitzer, 1959
ГК торфа				
COOH	CH ₃ COOCa	Титрование	2.3-4.6	Драгунов, 1951
COOH+ ArOH	Ba(OH) ₂	Титрование	6.2-8.5	"–"
COOH	CH ₃ OH+HCl	Цейзеля	2.0-3.2	Кухаренко, 1937
ГК угля				
COOH	CH ₃ COOCa	Титрование	2.0-3.6	Кухаренко, 1937 Кухаренко, 1937а
ArOH+ ROH	(CH ₃) ₂ SO ₄	Цейзеля	3.8-4.3	Кухаренко, 1937
ArOH+ ROH	Ba(OH) ₂	Титрование	7.2-8.7	Сысков, 1936
ГК донных отложений				
COOH	CH ₃ COOCa	Титрование	2.2-3.9	Gillam and Riley, 1982
COOH+ ArOH		Титрование	3.7-5.8	"–"
COOH	CH ₃ OH+HCl	Цейзеля	2.6-3.0	Драгунов, 1951
	CH ₃ COOCa	Титрование	8.5-9.1	Stevenson, 1982 Schnitzer and Gupta, 1965

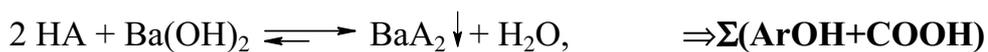
Группы	Метод определения		Содерж., ммоль/г	Литература
	реагент	колич. метод		
ФК почв				
COOH+ ArOH	CH ₂ N ₂ Ba(OH) ₂	Цейзеля Титрование	5.3-5.8 9-14	Драгунов, 1951 Stevenson, 1982 Schnitzer and Gupta, 1965
ArOH+R OH	Ac ₂ O+Py	Титрование	6.7-10	Wright and Schnitzer, 1959
ФК поверхностных вод				
COOH	CH ₂ N ₂	ГЖХ	3.8-4.3	Arsenie et al., 1992
	CH ₂ N ₂	¹ H-ЯМР	6.8-7.6	Noyes and Leenheer, 1994
	(CH ₃ Si) ₂ NH	²⁹ Si-ЯМР	5.8	Herzog et al., 1996
	-	Потенциометрия	4.7-4.8	Ephraim et al., 1989
ArOH+R OH	CH ₃ COOCa	Титрование	4.6-10.1	Gillam and Riley, 1982
	Ac ₂ O+Py	ГЖХ	13	Ephraim et al., 1989
	Ac ₂ O+Py	¹ H-ЯМР	4.4	Noyes and Leenheer, 1994
	(CH ₃ Si) ₂ NH	²⁹ Si-ЯМР	6.6	Herzog et al., 1996
ArOH	-	Потенциометрия	6.1-6.7	Ephraim et al., 1989
	CH ₃ COOCa	Титрование	12.2	Gillam and Riley, 1982
ArOH	Ac ₂ O+NaHCO ₃	¹ H-ЯМР	1.4	Schnitzer and Desjardins, 1962
ФК грунтовых вод				
COOH	-	Потенциометрия	4.2-5.6	Ephraim et al., 1989
COOH+ ArOH	-	Потенциометрия	4.8-8.1	"_"
ФК морских вод				
COOH	CH ₃ COOCa	Титрование	4.4-8.9	Gillam and Riley, 1982
COOH+ ArOH	Ba(OH) ₂	Титрование	5.3-13.4	"_"

* Метод Цейзеля основан на расщеплении метиловых эфиров иодной кислотой с последующим окислением образующегося метилиодида до иода, который затем оттитровывается тиосульфатом.

Из сравнения приведенных в таблице данных можно сделать вывод о том, что методы, основанные на химической модификации, дают в среднем более низкие результаты по сравнению с титриметрическими. По-видимому, это связано с тем, что стерические факторы препятствуют количественному протеканию реакций с органическими реагентами в большей степени, нежели с ионами металлов. Методы химической модификации в работе не использовали, поэтому ниже будут обсуждены методические аспекты только титриметрических методов анализа гумусовых кислот.

1.2.2 Методические аспекты титриметрического анализа гумусовых кислот

Обратное и заместительное титрование. Гумусовые кислоты образуют с ионами щелочноземельных металлов малорастворимые соли [Schnitzer and Khan, 1972, Кухаренко, 1937]. Данное свойство используется в традиционных методах определения общего содержания кислотных групп в образцах гумусовых кислот по реакциям с гидроксидом бария и ацетатом кальция (заместительное титрование):



(A – кислотный остаток гумусовых кислот)

В обоих случаях реагент берется в избытке. Для оценки числа прореагировавших групп после осаждения гуматов в баритовом методе избыток $\text{Ba}(\text{OH})_2$ титруется HCl (обратное титрование), в Са-ацетатном – определяется количество уксусной кислоты, высвободившейся в результате реакции. Удаление гумусовых кислот из раствора в виде осадка гуматов бария или кальция приводит к сдвигу равновесия диссоциации вправо и, следовательно, более полному определению групп по сравнению с потенциометрическим титрованием. Однако, несмотря на образование малорастворимых соединений, обе реакции в значительной степени обратимы [Perdue, 1985], и для достижения полноты превращения необходим существенный избыток реагента.

Баритовый и Са-ацетатный методы были разработаны в 30-х годах Стадниковым и сотр. [Кухаренко, 1937а; Кухаренко, 1937б; Ёóòàðáíêî, 1948; Стадников и др., 1934; Сысков, 1936; Ñîñêîâ и Ёóòàðáíêî, 1947; Кухаренко и Бороздина, 1949] для анализа препаратов ГК углей. Авторами было показано, что предельное количество бария, поглощаемого гумусовыми кислотами из раствора гидроксида, эквивалентно количеству метоксильных групп, определяемых в ГК после исчерпывающего метилирования. Это говорит о том, что в реакцию с $\text{Ba}(\text{OH})_2$ вступают все кислотные группы ГК [Стадников и др., 1934; Сысков, 1936]. Предельное количество Са, поглощаемого из раствора $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ и, соответственно, количество выделившейся уксусной кислоты хорошо согласуется с содержанием карбоксильных групп, определенным метилированием образца метанолом в присутствии HCl [Кухаренко, 1937а, Кухаренко, 1937б].

Позднее было предложено множество модификаций данных методов, направленных на анализ малых количеств препаратов [Perdue, 1978; Perdue et al., 1980; Brooks and Sternhell, 1957; Schnitzer and Gupta, 1964; Schnitzer and

Gupta, 1965; Gillam and Riley, 1982; Bonn and Fish, 1991]. Однако не были решены основные проблемы баритового и Са-ацетатного методов – четко не определены условия количественного протекания реакций разных препаратов с обоими реагентами [Perdue, 1985].

Можно выделить три фактора, оптимизация которых необходима для получения достоверных результатов определения с помощью указанных методов (1) выбор количественных соотношений реагент/субстрат – в различных вариантах методик рекомендуются различные соотношения [Schnitzer and Khan, 1972; Кухаренко, 1937а, Bonn and Fish, 1991]; (2) правильность определения точки эквивалентности при количественном определении избытка $\text{Ba}(\text{OH})_2$ или выделившейся уксусной кислоты [Perdue, 1985; Perdue et al., 1980]; (3) влияние на результаты определения образования растворимых гуматов и фульватов Ва и Са [Davis, 1982; Perdue, 1978; Perdue et al., 1980].

В целом, баритовая и Са-ацетатная методики являются доступными и достаточно универсальными для анализа гуминовых кислот почв и углей, тогда как определение границ и условий их применимости для анализа водных и других образцов должны составить предмет специального исследования.

Потенциометрическое титрование. Потенциометрическое титрование является общепринятым методом определения содержания кислотных групп [Сиггиа и Ханна, 1983]. Однако его использование для анализа гумусовых кислот сопряжено со значительными трудностями. Во-первых, кривые титрования гумусовых кислот не содержат четких перегибов, поэтому для установления конечной точки титрования требуется их математическая обработка [Bowles et al., 1994], во-вторых, для полноты определения слабокислотных групп требуется достижение очень высоких концентраций щелочи, при которых точные измерения рН раствора затруднены [Perdue, 1985; Скуг и Уэст, 1979]. Несмотря на указанные проблемы, данный метод широко используется для оценки кислотности гумусовых кислот [Buffle and Delodoeu, 1978; Davis, 1982; Herbert et al., 1993].

Наиболее распространенный способ определения точки эквивалентности заключается в титровании до фиксированного значения рН [Frimmel et al., 1985; Davis, 1982; Herbert et al., 1993; Piccolo and Camici, 1990]. Обычно рН 7.0 считают окончанием титрования карбоксильных групп, а рН 10.2-10.3 – всех кислотных групп [Frimmel et al., 1985; Buffle and Delodoeu, 1978; Pattersson et al., 1989]. Очевидно, что такой способ определения вклада карбоксильных групп весьма условен, т.к. рН точки эквивалентности при титровании многих органических кислот лежит выше 7 [Скуг и Уэст, 1979], а слабых фенольных гидроксидов – выше 11.

Другой способ предусматривает использование методов математического моделирования для обработки кривой титрования гумусовых кислот. Количественная интерпретация кривых титрования гумусовых кислот, обычно не содержащих явных перегибов, является весьма сложной и неоднозначной задачей из-за наличия большого числа химически неидентичных кислотных групп (химическая гетерогенность) и полиэлектролитных эффектов [Perdue, 1985; Gamble and Underdown, 1980; Gamble, 1972].

Существуют два основных подхода к описанию протолитических свойств полиэлектролитов (ПЭ). Согласно одному из них [Тенфорд, 1965; Katchalsky and Gillis, 1950; Katchalsky et al., 1954] рассчитывают характеристические константы диссоциации pK^0 индивидуальных ионогенных групп путем экстраполяции зависимости pK от α (степени диссоциации) к нулевой степени диссоциации. Однако точность получаемых значений зачастую невелика. При определении характеристических констант каждого типа ионогенных групп ПЭ со сложным химическим составом часто приходится прибегать к искусственным приемам [Dubin and Straus, 1970], что дополнительно снижает точность рассчитываемых значений. Поэтому использование рассматриваемого подхода оправдано, главным образом, для простых по составу полиэлектролитов. Несмотря на упомянутые ограничения, метод характеристических констант достаточно часто используется для описания титрования карбоксильных групп гумусовых кислот [Fukushima et al., 1995].

Второй подход заключается в максимально адекватном описании кривой титрования с помощью минимально возможного числа констант диссоциации и концентраций ионогенных групп в рамках заданной модели.

Модель химических реакций

Модель представляет собой наиболее общий случай, когда задают некоторый набор произвольных химических форм и реакций [Бугаевский и Холин, 1989; Варшал и др., 1990]. Учтя все уравнения связи (уравнения материального баланса и электронейтральности), записывают уравнение для pH в каждой точке кривой титрования и решают полученную систему уравнений. Достоинство данной модели в простоте – максимальное соответствие эксперименту можно достичь при учете минимума равновесий. Недостаток – трудность физической интерпретации полученных равновесий и констант.

Модель смеси одноосновных кислот

В 1926 г. Симмсом [Simms, 1926] было показано, что в ряде случаев протолитические равновесия в растворах ПЭ можно описать моделью смеси

одноосновных кислот. Уравнение кривой титрования смеси N одноосновных кислот может быть записано в виде:

$$\alpha = \sum_{i=1}^N \frac{q_i K_i}{K_i + [H^+]} \quad (1.1)$$

где α – средняя степень диссоциации, q_i – мольная доля кислоты с константой диссоциации K_i в смеси.

Набор пар значений (q_i, pK_i) называется pK -спектром, а метод моделирования протолитических свойств с помощью pK -спектра – pK -спектроскопией [Leuenberger and Schindler, 1986]. При небольших N расчет приводит к дискретному pK -спектру. Для описания протолитических свойств гумусовых кислот дискретный pK -спектр использовали в работах [Paxeus and Wedborg, 1985; Eberle and Feuerstein, 1979; Paxeus, 1985].

При $N \rightarrow \infty$ уравнение (1.1) принимает интегральный вид:

$$\alpha = \int_{-\infty}^{+\infty} p(pK) \frac{K}{K + [H^+]} dpK = 0.4343 \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{p(pK)}{K + [H^+]} dpK \quad (1.2)$$

Кислотно-основные свойства ПЭ в этом случае описываются непрерывными функциями распределения констант диссоциации (модель непрерывного pK -спектра). Главным достоинством данной модели является возможность учета совместного влияния химической гетерогенности ПЭ и электростатических эффектов. Модель непрерывного pK -спектра для описания протолитических свойств гумусовых кислот использовали многие исследователи [Perdue et al., 1984; Bonn and Fish, 1991; Gamble and Underdown, 1980; Gamble, 1972; Fukushima et al., 1995; Бугаевский и Холин, 1989; Варшал и др., 1990; Leuenberger and Schindler, 1986].

Существуют разные методы численного решения интегрального уравнения (1.2), но наиболее часто используют четыре основных метода: 1) *априорный выбор вида распределения* [Sips, 1948]; 2) *аппроксимация интегрального уравнения суммой* [Leuenberger and Schindler, 1986]; 3) *метод конечных разностей* [Варшал и др., 1990; Leuenberger and Schindler, 1986; Thakur et al., 1980; Turner et al., 1986]; 4) *метод регуляризации* [Варшал и др., 1990; Triay and Rundberg, 1987].

Подводя итог можно сказать, что все существующие способы описания протолитических свойств гумусовых кислот имеют свои ограничения. Тем не менее, наиболее перспективным представляется метод построения непрерывного pK -спектра из-за его большей универсальности.

Применение метода pK -спектроскопии позволяет определить набор кислотных групп и их концентраций, удовлетворительно описывающих экспериментальную кривую титрования [Perdue, 1985]. Суммарное содержание групп с более низкими значениями pK полагают равным содержанию карбоксильных групп [Perdue et al., 1984]. Достоверность

получаемых значений зависит от адекватности использованной математической модели.

Количественное описание протолитических свойств гумусовых кислот представляет собой одну из наиболее трудных задач аналитической химии гумусовых кислот. Дальнейший прогресс в этом направлении может быть достигнут по мере совершенствования методов компьютерного моделирования и их использования для выявления фундаментальных дескрипторов протолитических свойств гумусовых кислот.

1.2.3 Исследование структурно-группового состава углеродного скелета деструктивными методами анализа

Деструктивные методы анализа весьма интенсивно использовались для изучения строения углеродного скелета гумусовых кислот [Norwood, 1988; Орлов, 1990]. Благодаря применению данных методов анализа, в широкий обиход вошли понятия “каркас” и “периферия”, которые изначально использовались для обозначения негидролизуемой и гидролизуемой части гумусовых кислот в условиях кислотного гидролиза. На сегодняшний день в них вкладывают вполне конкретный химический смысл, понимая под каркасом ароматический углеродный скелет, а под периферией – углеводно-пептидный комплекс гумусовых кислот [Орлов, 1990]. Данные о структурно-групповом составе указанных строительных блоков позволяют существенно повысить уровень детализации описания строения гумусовых кислот.

Состав гидролизуемой части препаратов гумусовых кислот. Согласно [Орлов, 1990], при гидролизе 6М HCl в раствор переходит 30-45% массы ГК почв и 60-75% ФК. Гидролизуемость гуминовых кислот торффов и бурых углей несколько ниже. Состав гидролизатов изучен довольно подробно и дает ясное представление об основных компонентах, образующих гидролизуемую периферию гумусовых кислот (табл. 1.4).

Таблица 1.4

Состав гидролизуемой части ГК и ФК почв, % масс.
(по данным [Орлов, 1990])

Структурные фрагменты	ГК		ФК
	чернозем	дерново-подзолистая почва	
Аминокислоты	13	18	11
Аминосакхара	4	4	6
NH ₃	2	3	3
Вещества типа фульвокислот	14	15	–
Углеводы	66	59	80
Бензолкарбоновые кислоты	1	1	0

Как видно из таблицы, основной частью гидролизатов ГК и ФК почв являются углеводы, массовое содержание которых в гумусовых кислотах достигает, по различным источникам, 20-40%. Более детальное исследование их состава показало, что углеводная часть гумусовых кислот представлена, в основном, гексозами (30-60%, с преобладанием глюкозы), в меньших количествах присутствуют метилпентозы и пентозы [Орлов, 1990; Ogner, 1970; Hayashi and Nagai, 1962]. 5-20% суммы сахаров обычно представлено уроновыми кислотами [Орлов, 1990]. Экспериментальные данные позволяют предполагать, что моно- и полисахариды связаны с каркасной частью гумусовых кислот посредством сложноэфирных мостиков [Clark and Tan, 1969].

Выход аминокислот при гидролизе препаратов ГК почв обычно составляет 6-10% от их массы, при этом наиболее высоким содержанием аминокислот характеризуются черноземы. Содержание аминокислот в ФК почв несколько ниже (5-7%) [Орлов, 1990]. Их состав характеризуется постоянством: наблюдается заметное преобладание аспарагиновой и глутаминовой аминокислот, глицина и аланина. Применение ферментативного гидролиза показывает, что значительная часть аминокислот присутствует в составе пептидных связей [Орлов, 1990; Зырин, 1964]. Кроме того, имеются данные [Stevenson, 1985; Орлов, 1990] о наличии в составе гидролизатов гуминовых кислот фенолов (до 5%) и ФК-подобных соединений (10-15%).

Состав негидролизуемого каркаса гумусовых кислот. Для деструкции гумусовых кислот чаще всего используют окисление перманганатом калия или оксидом меди в щелочной среде [Орлов, 1953; Орлов, 1990]. Образующиеся бензолполикарбоновые кислоты составляют 5-20% от массы ГФК почв, однако при этом следует отметить неколичественность метода [Орлов, 1974]. Периферическая часть ГК почв практически не содержит неокисляемых перманганатом ароматических фрагментов, в то время как в случае ФК почв гидролизуемая часть может служить источником 30-35% всех бензолкарбоновых кислот. На этом основании в работе [Орлов, 1990] сделано заключение, что в ФК ароматические структурные единицы распределены более равномерно, чем в ГК, где они почти полностью сосредоточены в негидролизуемом ядре молекул.

Главными компонентами продуктов деструкции являются три-, тетра- и пентакарбоновые кислоты и некоторые оксибензойные кислоты [Григорьева и Кухаренко, 1968; Kumada, 1988]. Данный факт не указывает на присутствие таких кислот в исходных молекулах, но свидетельствует о том, что для ароматических колец гумусовых кислот наиболее характерно именно такое число С-заместителей в ароматических кольцах.

Применение пиролитической масс-спектрометрии позволяет детально исследовать продукты распада гумусовых кислот в отсутствие окислителей. Показано [Schulten, 1994], что в результате пиролиза в образующейся смеси можно идентифицировать наряду с замещенными ароматическими структурами некоторые количества алканов и олефинов с длиной цепи 4-30, а также алкилзамещенные бензолы $\text{Ar}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, с длиной цепи до $n = 17$. Это может служить доказательством того, что связи между ароматическими кольцами представлены не только короткими мостиками типа $-\text{O}-$, $-\text{NH}-$, $-\text{N}=\text{}$, и $-\text{CH}_2-$, но и протяженными полиметиленовыми цепочками $(-\text{CH}_2-)_n$, где n может достигать 30 звеньев. Однако вопрос о содержании таких структур в молекулах гумусовых кислот по сегодняшний день является предметом дискуссий [Beyer, 1996; Stevenson, 1982].

Получение новой информации о составе каркасной и периферической частей гумусовых кислот с помощью деструктивных методов анализа – важнейший инструмент для более глубокого понимания принципов строения гумусовых кислот. Однако использование данной информации для численного описания строения гумусовых кислот весьма проблематично из-за трудностей соблюдения материального баланса при проведении деструкции препаратов гумусовых кислот. С этих позиций гораздо более перспективным представляется использование недеструктивных методов структурного анализа. Применению самого мощного из них – спектроскопии ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C – для исследования строения гумусовых кислот посвящен следующий раздел.

1.2.4 Исследование структурно-группового состава гумусовых кислот методами спектроскопии ЯМР

Спектроскопия ^{13}C ЯМР. Трудно переоценить роль спектроскопии ^{13}C ЯМР в получении информации о структуре гумусовых кислот. В 50-х - 70-х годах нынешнего столетия принципы строения углеродного скелета гумусовых кислот оставались предметом оживленной дискуссии, в которой часть исследователей придерживалась концепции об алифатическом характере структуры гумусовых кислот, а другая часть рассматривала структуру гумусовых кислот как исключительно ароматическую. Получение в 1976 г. первого спектра ^{13}C ЯМР ФК почв [Stuermer, 1976] позволило дать однозначный ответ на вопрос о строении углеродного скелета этих соединений, показав, что в нем в сопоставимых количествах содержатся как ароматические, так и алифатические фрагменты. Впоследствии эти данные были подтверждены для гумусовых кислот различного происхождения многочисленными исследованиями. В ^{13}C ЯМР спектрах гумусовых кислот были обнаружены сигналы, отнесенные к разным фрагментам структуры этих

веществ, что позволило существенно углубить качественные знания о фрагментном составе гумусовых кислот [Ricca, 1993; Skjemstad, 1983].

Типичный ^{13}C ЯМР спектр гумусовых кислот приведен на рис. 1.2. Как видно из рисунка, полидисперсность и химическая гетерогенность гумусовых кислот приводит к тому, что ^{13}C ЯМР спектры этих соединений не содержат разрешенных пиков, относимых к ядрам ^{13}C определенного типа, а представляют собой суперпозицию большого числа слабовыраженных сигналов.

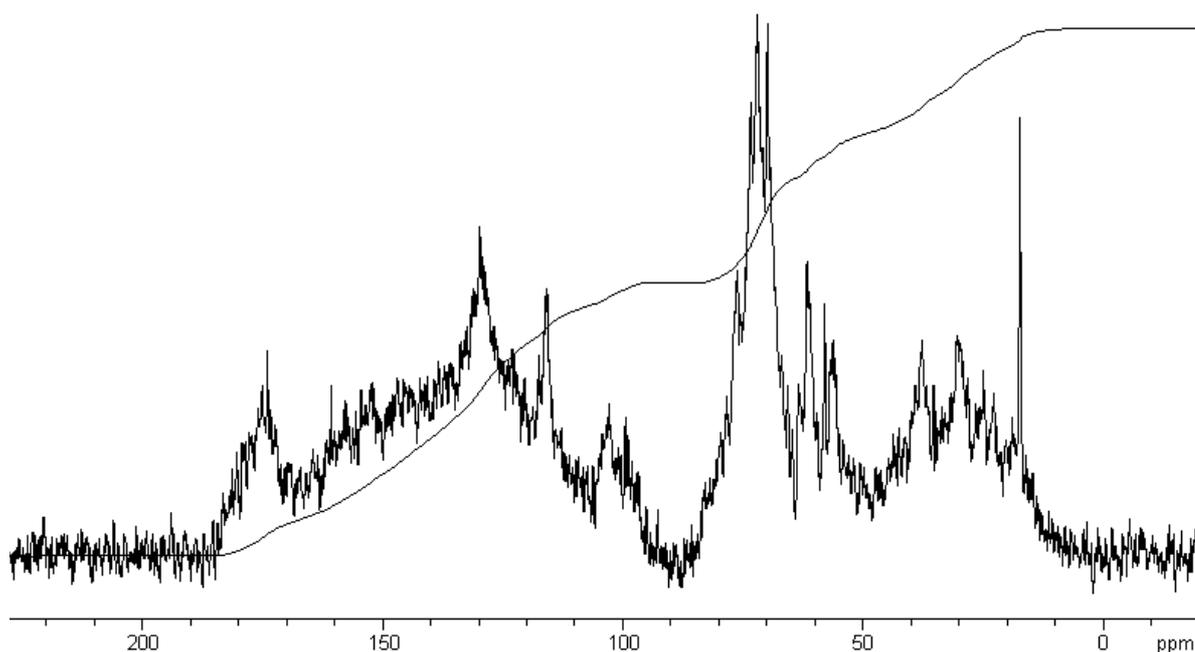


Рис. 1.2. Типичный ^{13}C ЯМР спектр ГК почв.

В связи с этим традиционная в спектроскопии ЯМР задача отнесения индивидуальных сигналов не является актуальной в случае спектров гумусовых кислот [Wershaw, 1985]. Общий подход к анализу такого рода спектров предусматривает выделение в них групп сигналов или спектральных областей, соответствующих атомам углерода со сходным химическим окружением, и определение сравнительной интенсивности этих областей. Как видно из рис. 1.2, в типичном ^{13}C ЯМР спектре гумусовых кислот наблюдается лишь один отчетливый минимум с нулевой интенсивностью сигнала при 90 м.д., в остальных случаях невозможно провести точное разделение различных групп сигналов из-за их частичного перекрывания. Выбор разбиения спектров гумусовых кислот на группы сигналов представляет собой неоднозначную задачу. Для выбора границ разбиения анализируют положение локальных минимумов в спектрах гумусовых кислот

и привлекают табличные данные по химическим сдвигам ядер ^{13}C в органических соединениях в сочетании с имеющейся информацией об основных структурных элементах гумусовых кислот [Wilson, 1987a; Wilson, 1990].

Наиболее распространенным является выделение в ^{13}C ЯМР спектре гумусовых кислот пяти наиболее удовлетворительно разделенных диапазонов химических сдвигов, соответствующих незамещенным и О-замещенным алифатическим, ароматическим, карбоксильным и карбонильным атомам углерода (табл. 1.5).

Таблица 1.5

Основные диапазоны сигналов в спектре гумусовых кислот
[Sotak, 1983]

Тип атомов углерода	Обозначение	Диапазон сигналов, м.д.
С- и Н-замещенные алифатические атомы углерода	C_{Alk}	0-50
О-замещенные алифатические атомы углерода	$\text{C}_{\text{Alk-O}}$	50-110
Ароматические атомы углерода	C_{Ar}	110-165
Атомы углерода карбоксильных групп и их производных	C_{COOH}	165-180
Атомы углерода карбонильных групп	$\text{C}_{\text{C=O}}$	180-220

В зависимости от цели исследования и желаемой детализации получаемой информации перечисленные в табл. 1.5 основные спектральные диапазоны часто подразделяют на более узкие (табл. 1.6). При этом детализация спектральной информации сопровождается снижением достоверности количественных характеристик определяемого состава [Skjemstad, 1983; Wilson, 1987]. Это обуславливает проблему оптимизации выбора соотношения информативности и достоверности при обработке ^{13}C ЯМР спектров гумусовых кислот, которая в настоящее время решается каждым исследователем сугубо индивидуально.

Выделение узких диапазонов сигналов в спектрах ^{13}C ЯМР
гумусовых кислот [Ricca, 1993]

Диапазон, м.д.	Отнесение сигналов
10-25	Концевые метильные группы алкильных цепей
15-50	Метиленовые группы алкильных цепей
25-50	Метиновые группы алкильных цепей
29-33	Углерод метиленовых групп в β - и γ -положении к COOH -группе
35-50	Углерод метиленовых групп разветвленных алкильных цепей
41-42	Метиленовые группы в α -положении к COOH -группе
51-61	Углерод метоксильных и этоксильных групп
57-65	Углерод $\text{CH}_2\text{-OH}$ групп
65-85	Углерод CH(OH) групп, углерод полисахаридных колец, метиновый углерод простых и сложных эфиров
90-110	ацетальный углерод
118-122	Углерод ароматических колец в орто-положении к O-заместителю
120-140	Незамещенный или алкил-замещенный углерод ароматических колец
140-162	O- и N-замещенный углерод ароматических колец
162-190	Углерод карбоксильных групп, сложных эфиров и амидов
190-220	Углерод кетонных и альдегидных групп

Важно отметить принципиальную нестрогость количественного анализа спектра гумусовых кислот при разбиении на диапазоны в связи с невозможностью количественного учета перекрывания групп сигналов. В случае низкомолекулярных соединений для разделения набора перекрывающихся сигналов используют аппроксимацию пиков лоренцевыми кривыми [Sotak, 1983]. Для спектров полимеров описаны подходы к такому разделению, основанные на аппроксимации гауссовыми кривыми [Михайленко, 1987]. Однако в связи с тем, что в спектрах гумусовых кислот форма пиков в общем случае не является ни лоренцевой, ни гауссовой, а в ряде случаев невозможно определить и положение пиков при детальном разбиении, применение такого подхода не позволяет получить существенного повышения точности и надежности количественного анализа спектров.

Следует отметить, что отнесение некоторых групп сигналов до сих пор является предметом дискуссии. Так, группу сигналов в области 90-110 м.д.

длительное время относили к незамещенным ароматическим атомам С в орто-положении к гидроксильной группе. Однако в последние годы преобладает мнение, что большая часть этих сигналов обусловлена атомами углерода ацетального типа в полисахаридных циклах периферии гумусовых кислот. В области 44-60 м.д. некоторые исследователи выделяют группу сигналов N-замещенного углерода метиленовых групп, однако отделить эти сигналы от находящихся в этой же области находится сигналов метоксильных и незамещенных СН-групп представляется невозможным.

Химические сдвиги большинства сигналов ядер ^{13}C не зависят от выбора условий регистрации спектра и растворителя. Однако сигналы карбоксильных групп и атомов ароматического углерода, замещенного ОН-группой, при переходе от органических апротонных растворителей к воде и растворам щелочей смещаются в слабое поле в связи с ионизацией соответствующих групп. По данным [Preston, 1987], химические сдвиги ядер ^{13}C COOH групп и Ar-ОН фрагментов в спектрах гумусовых кислот в ДМСО и NaOD/D₂O могут различаться на величину до 5 м.д.

1.3 Структурно-групповой состав гумусовых кислот различного происхождения по данным ^{13}C ЯМР

На протяжении двух десятилетий основной областью применения спектроскопии ^{13}C ЯМР для анализа гумусовых кислот остается количественная характеристика относительного содержания углерода в составе различных структурных фрагментов молекул гумусовых кислот.

Анализ данных ^{13}C ЯМР дает возможность установить различия в структуре ГК и ФК различных природных источников. Так, согласно данным исследования [Krosshavn, 1990], ГК дерново-подзолистых и серых лесных почв содержат примерно в два раза больше ароматических фрагментов по сравнению с ФК. Аналогичные данные получены в работе [Preston, 1985]. В работах [Shin, 1996; Михайленко, 1987; Cook, 1998; Preston, 1987; Ricca, 1993; Conte, 1997] помимо этого отмечается, что ФК почв характеризуются в целом более высоким (на 2-10% абс.) содержанием COOH групп, в то время как содержание алифатических фрагментов в них несколько ниже по сравнению с ГК. Для ГК и ФК черноземов наблюдаются сходные закономерности [Wilson, 1987]. Согласно большей части опубликованных данных, содержание карбогидратных структур в ФК почв превышает таковое для ГК в 1.5-3 раза, однако в ряде работ [Shin, 1996; Cook, 1998; Ricca, 1993; Conte, 1997] приводятся результаты исследования, говорящие о том, что содержание карбогидратов в ГК и ФК почв практически идентично.

Одна из возможных причин противоречивости приводимых данных была показана в работе [Malcolm, 1990]. Автором было проведено исследование

структуры ФК почв, выделенных по двум различным общепотребительным методикам, первая из которых включала выделение в качестве фракции ФК части щелочного экстракта почв, остающейся при осаждении ГК в кислом растворе, а вторая включала стадию сорбции на амберлите XAD-8. Было показано, что в ФК почв, выделенных на XAD-8, содержание карбогидратных структур снижается в 1.5-2 раза. Автором сделан вывод о необходимости стадии сорбции на амберлите при выделении ФК для очистки от полисахаридных примесей.

Косвенным подтверждением такого вывода являются результаты сравнительного исследования структуры ГК и ФК природных вод, выделение которых в обоих случаях включает сорбцию на XAD-8. По данным [Malcolm, 1990; Humic substances in the Suwannee river, 1994; Михайленко, 1987; Knulst, 1998] содержание карбогидратных структур в ФК природных вод находится на уровне такового в ГК или несколько ниже. В то же время прочие закономерности, обнаруженные для ГК и ФК почв, сохраняются для ГК и ФК природных вод. Так, содержание COOH групп в ФК природных вод выше, чем в ГК, а содержание ароматических фрагментов – ниже. Согласно [Malcolm, 1990; Humic substances in the Suwannee river, 1994], ФК содержат больше алкильных фрагментов, однако данные [Михайленко, 1987; Knulst, 1998] находятся в противоречии с этим выводом.

В ряде работ было выполнено сопоставление фрагментного состава гумусовых кислот различного происхождения. Так, на основании сопоставления результатов ^{13}C ЯМР исследования структуры препаратов ФК дерново-подзолистых почв и природных вод, [Malcolm, 1990] показал, что последние характеризуются более высоким содержанием алифатических фрагментов, в то время как фрагментный состав ГК этих природных сред довольно близок. Сходные данные были получены в работе [Shin, 1996].

[Wilson, 1983; Wershaw, 1981] проводили сопоставление гумусовых кислот торфа и дерново-подзолистых почв. По представленным ими данным гумусовые кислоты торфа характеризуются более высоким содержанием ароматических и карбогидратных фрагментов, нежели гумусовые кислоты почв, а содержание карбоксильных и алкильных групп в случае гумусовых кислот торфа несколько ниже.

Сравнительные исследования структуры ГК бурых углей, ФК и ГК дерново-подзолистых почв, выполненное [Choudhry, 1989; Shin, 1996], показало, что содержание COOH групп в ГК угля ниже, чем в ФК почв, однако выше, нежели в ГК почв. По сравнению с ГФК почв ГК угля характеризуются значительно более высокой ароматичностью, и очень низким содержанием карбогидратных структур.

В работе [Frund, 1994] было показано существование значимой обратной корреляции между содержанием ароматических и карбогидратных структур в молекулах гумусовых кислот почв.

В то же время, несмотря на прослеженные во многих работах закономерности, сопоставление данных, полученных различными авторами, практически невозможно. Анализ литературных данных показал очень широкий диапазон изменения фрагментного состава, определяемого методом ^{13}C ЯМР в различных работах, что едва ли может быть объяснено только структурными различиями препаратов. По-видимому, результаты различных исследований существенно расходятся из-за недостоверности получаемых количественных данных. Подтверждением этому тезису может служить сопоставление приводимых в разных работах результатов исследования структуры коммерческого препарата ГК бурого угля производства фирмы Aldrich и ФК реки Суваннее (табл. 1.7).

Таблица 1.7

Фрагментный состав ГК "Aldrich" и ФК р. Суваннее
по данным ^{13}C ЯМР

CO	COOH	Ar	Alk-O	Alk	Источник
ФК р. Суваннее					
6	18	33	21	21	Shin, 1996
6	19	28	20	27	Humic substances in the Suwannee river, 1994
7	22	27	13	31	Preston, 1987
ГК "Aldrich"					
1	9	39	4	48	Choudhry, 1989
	15	59	9	17	Shin, 1996
6	9	26	12	44	Malcolm, 1986

Как видно из табл. 1.7, приводимые данные резко различаются между собой, при этом отличия значительно превышают возможную погрешность измерения. Столь высокий разброс экспериментально получаемых характеристик фрагментного состава заставил нас провести анализ факторов, влияющих на достоверность получаемых спектральных данных, и различий в экспериментальных условиях регистрации спектров ^{13}C ЯМР гумусовых кислот.

1.4 Проблемы количественной ^{13}C ЯМР-спектроскопии гумусовых кислот

В ряду проблем получения количественной структурной информации из спектров ЯМР гумусовых кислот можно выделить три основные группы, соответствующие различным стадиям получения и обработки спектральных данных:

Корректное разделение спектров гумусовых кислот на интегрируемые диапазоны, минимизация случайных погрешностей при интегрировании.

Регистрация спектров гумусовых кислот в условиях, обеспечивающих соответствие интегральных интенсивностей сигналов различных типов ядер в ЯМР спектре их содержанию в образце.

Перечисленные проблемы, характерные для спектроскопии ЯМР гумусовых кислот на любых ядрах, будут подробно рассмотрены на примере спектроскопии ^{13}C ЯМР, так как в данном случае они приобретают наибольшую значимость.

Проблемы, возникающие на стадии обработки и преобразования спектров. Высокая полидисперсность гумусовых кислот, приводящая к «рассеиванию» интенсивности сигналов по всему спектру, оказывает негативное влияние на соотношение сигнал/шум. Этот факт, в сочетании с невысоким природным содержанием изотопа ^{13}C , низкой чувствительностью данного ядра и ограниченной растворимостью гумусовых кислот (20-50 г/л в растворах щелочей), заставляет проводить весьма длительное накопление для получения удовлетворительных с точки зрения соотношения сигнал/шум спектров [Steelink, 1989]. Малое значение отношения сигнал/шум приводит, с одной стороны, к возрастанию случайной ошибки интегрирования, с другой – к снижению точности учета искажений базовой линии, ответственных за систематические отклонения [Кушнарев, 1997]. Очевидно, что при интегрировании широких диапазонов перекрывающихся сигналов в спектре гумусовых кислот вклад второй ошибки значительно выше.

Величина отношения сигнал/шум для различных областей спектра гумусовых кислот, как правило, составляет от 5 до 30 [Wilson, 1987, Steelink, 1989], что в соответствии с данными [Кушнарев, 1997] приводит к теоретической величине погрешности интегрирования 5-13% отн.

Ошибка интегрирования, связанная с искажением базовой линии зависит одновременно от особенностей спектрометра, условий эксперимента и исследуемого объекта. Точность ее учета зависит от величины шума, размера участков интерполяции и правильности выбора аппроксимирующей функции при коррекции базовой линии [Sotak, 1983; Hoult, 1983; Pearson, 1977]. Коррекция линейных фазовых искажений представляет собой в случае

спектров ^{13}C ЯМР гумусовых кислот неоднозначную операцию в связи с отсутствием в спектре выраженных индивидуальных сигналов лоренцевой формы. Данная процедура выполняется оператором вручную и может служить источником последующих ошибок интегрирования.

Анализ используемых различными авторами условий регистрации количественных ^{13}C ЯМР спектров гумусовых кислот. Принципиальная возможность получения корректной количественной информации из спектров ЯМР ^{13}C может быть реализована только в условиях, обеспечивающих пропорциональность спектральных интенсивностей сигналов атомов углерода различным типам их реальным содержанию в образце. Для установления таких условий определяющее значение имеет информация о релаксационных характеристиках ядер ^{13}C гумусовых кислот [Steelink, 1989]. Основными эффектами, вызывающими систематические искажения истинных количественных соотношений между интенсивностями сигналов, являются **насыщение** [Humic substances in the Suwannee river, 1994; Steelink, 1989; Ernst, 1971] и **ядерный эффект Оверхаузера** [Skjemstad, 1983; Noggle, 1971].

Насыщение возникает в случае, если энергия, прилагаемая к спиновой системе, в среднем превышает энергию, рассеиваемую ей в окружающую среду путем релаксации [Knight, 1967]. Мерой подаваемой энергии в импульсной спектроскопии ЯМР служит угол поворота намагниченности спиновой системы Θ , а мерой эффективности спин-решеточной релаксации – характеристическое время (T_1) экспоненциального восстановления намагниченности M_z :

$$M_z = M_0 (1 - \exp(-t/T_1)), \quad (1.3)$$

где t – время,

M_0 – равновесное значение намагниченности спиновой системы.

При заданной относительной погрешности σ и угле $\Theta = \pi/2$ время необходимой релаксационной задержки (T_d) должно удовлетворять условию [Кушнарев, 1997]:

$$T_d \geq \ln(100/\sigma)T_1 \quad (1.4)$$

Очевидно, что в случае использования недостаточного времени задержки спины ядер атомов углерода, характеризующихся более длительной релаксацией, не успевают восстановить первоначальную ориентацию, и относительная интенсивность их сигналов в спектре будет занижена [Steelink, 1989]. Для получения количественных спектров рекомендуется использовать T_d не менее $3T_1$.

Следует отметить, что корректное определение времени релаксации различных типов ядер в препаратах гумусовых кислот представляет собой трудную экспериментальную задачу по причине значительного перекрывания сигналов. В связи с этим, с точки зрения поиска экспериментальных условий

количественного определения ядер ^{13}C более корректно говорить лишь об оценке относительных скоростей релаксации ядер [Skjemstad, 1983; Steelink, 1989; Conte, 1997; Wilson, 1983b].

Времена релаксации ядер ^{13}C для большинства обычных органических молекул в отсутствие кислорода воздуха измеряются десятками секунд, достигая для четвертичных атомов, удаленных от протонированной периферии молекулы, величин более 120 с. В связи с этим регистрация спектров при использовании достаточного для полной релаксации всех типов ядер ^{13}C времени задержки импульса практически неосуществима при анализе сложных смесей, требующих длительного накопления сигнала [Кушнарев, 1997].

Величину T_1 можно искусственно уменьшить добавлением в образец парамагнитного вещества (релаксанта) [Freeman, 1971], в качестве которого обычно используют ацетилацетонаты хрома или железа [Levy, 1974]. Такой метод широко применяют для анализа нефтей и нефтепродуктов, что позволяет на несколько порядков снизить T_1 для наиболее медленно релаксирующих ядер четвертичных атомов углерода [Shoolery, 1977]. Однако в водных растворах применение ацетилацетонатов невозможно, а использование вместо них свободных солей переходных металлов вызывает образование нерастворимых гуматов вследствие специфического комплексообразования гумусовых кислот с ионами металлов. В литературе не удалось обнаружить работ по использованию релаксантов в спектроскопии ^{13}C ЯМР гумусовых кислот. С другой стороны, специфика гумусовых кислот заключается в наличии в самих молекулах этих веществ парамагнитных центров, преимущественно семихинонов, а также ионов железа [Schnitzer, 1986; Humic substances in the Suwannee river, 1988]. Локализация этих центров вблизи наиболее медленно релаксирующих ядер ^{13}C оказывает нивелирующее воздействие на релаксационные характеристики различных типов ядер ^{13}C в гумусовых кислотах [Schnitzer, 1986]. Кроме того T_1 для всех типов ядер в структуре гумусовых кислот снижается из-за низкой подвижности макромолекул этих соединений. Эти факторы делают возможным получение количественных спектров ^{13}C ЯМР гумусовых кислот без добавок релаксанта. При этом определяющим фактором, влияющим на количество получаемых данных остается время задержки между импульсами. Существует ряд работ, посвященных исследованию данной проблемы.

Так, в работе [Newman, 1980] было выполнено исследование влияния T_d в интервале 0.03-5 с на спектральные интенсивности основных диапазонов ^{13}C ЯМР спектра ГК почв, полученного при использовании 90° импульса. Согласно полученным данным, для получения количественных спектров величина T_d должна быть не ниже 5 с.

Влияние времени задержки импульса (T_d) на интенсивность четырех диапазонов ^{13}C ЯМР спектра гумусовых кислот было исследовано в интервале времен задержки 0.1-2 с при ширине импульса 45° [Preston, 1985] (рис. 1.3).

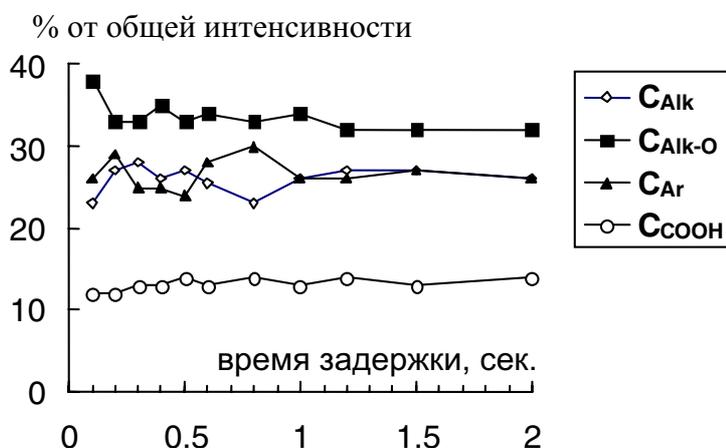


Рис. 1.3. Влияние времени задержки на интенсивность спектральных диапазонов в спектре ^{13}C ЯМР гумусовых кислот. [Preston, 1985].

Согласно данным, полученным в этой работе, увеличение времени задержки свыше 1 с не вызывало изменений в относительной интенсивности указанных спектральных диапазонов. Аналогичные данные были получены в работе [Schnitzer, 1986]. Авторы сделали вывод, что использование $T_d = 0.5-1\text{c}$ позволяет получать количественные ^{13}C ЯМР спектры гумусовых кислот. При этом подчеркивалось, что дальнейшее увеличение времени задержки невыгодно, так как при этом возрастают временные затраты на регистрацию спектров.

Следует отметить, что спектры с максимальной задержкой, полученные в перечисленных работах, имели крайне невысокое качество. Этот факт не позволяет однозначно оценить достоверность сделанных заключений и безоговорочно принять рекомендации авторов.

Наиболее подробное исследование влияния релаксационной задержки на интегральные интенсивности различных областей спектра было выполнено в работе [Humic substances in the Suwannee river, 1994]. Авторами были получены спектры растворов препаратов ГК и ФК речных вод в ^{12}C ДМСО в интервале T_d от 0.2 до 10 с при использовании 90° импульса. Полученные данные позволили оценить величину T_1 для различных типов углерода в обоих препаратах (табл. 1.8).

Времена спин-решеточной релаксации для ядер ^{13}C в структуре ФК и ГК речных вод [Humic substances in the Suwannee river, 1994]

	C=O	COOH	Ar	Alk-O	Alk
ФК	$1.4 \leq T_1 \leq 1.8$	$1.4 \leq T_1 \leq 1.8$	$0.7 \leq T_1 \leq 1.4$	$0.2 \leq T_1 \leq 0.4$	$0.1 \leq T_1 \leq 0.2$
ГК	$T_1 \approx 1.4$	$0.7 \leq T_1 \leq 1.8$	$0.7 \leq T_1 \leq 1.4$	$T_1 \approx 0.4$	$T_1 \approx 0.2$

Авторы рекомендовали для получения количественных ^{13}C ЯМР спектров гумусовых кислот использовать T_d порядка 6 с. Однако данные о скорости релаксации, полученные для растворов гумусовых кислот в ДМСО, вряд ли корректно переносить на водные растворы. Одной из причин, осложняющих применение вышеизложенной информации может быть различное содержание парамагнитных центров в растворах гумусовых кислот в воде и органических растворителях [Preston, 1987].

Серьезная проблема, возникающая при интерпретации подобного рода данных, связана с фрагментной неоднородностью исследуемых областей спектра. В работе [Skjemstad, 1983] был проведен анализ изменения высоты 12-ти наиболее интенсивных пиков в спектре ГК почв при увеличении времени задержки от 0.5 до 20 с. При этом было показано, что сигналы в пределах одной спектральной области имеют значительно различающиеся скорости релаксации.

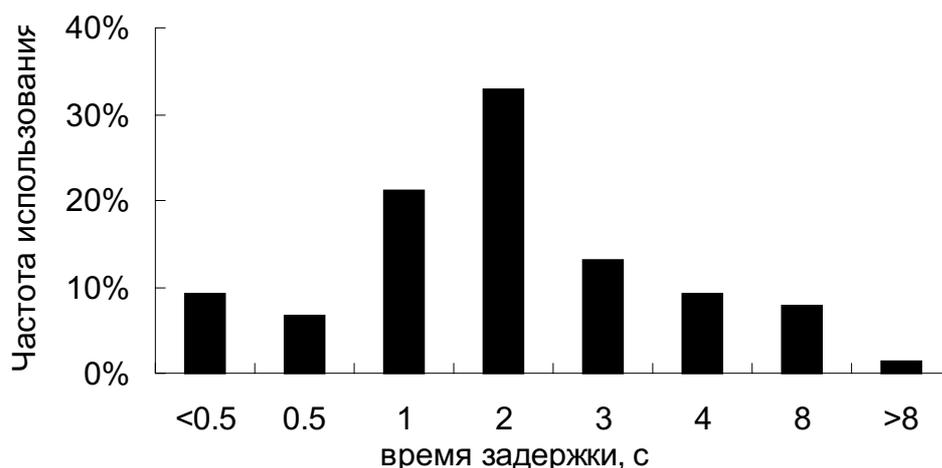


Рис. 1.4. Статистика использования различных времен в ^{13}C ЯМР гумусовых кислот задержки в 56 работах (1984-1999 г.г.).

Таким образом, в настоящий момент не существует единого мнения относительно величины оптимального времени задержки между импульсами, позволяющего получать количественные спектры ^{13}C ЯМР гумусовых кислот с высоким соотношением сигнал/шум при разумных затратах времени на

регистрацию спектра, а используемый различными исследователями диапазон времен релаксационной задержки крайне широк (рис. 1.4).

Как видно из данного рисунка, подавляющее большинство исследователей использовали времена задержки 2 с и менее. При этом авторы, как правило, ссылаются на полученные данные как на результаты количественного исследования, что, к примеру, для экспериментов с $T_d < 0.5$ с. является сомнительным в свете вышеизложенных результатов.

Наиболее важный для количественного анализа гумусовых кислот случай проявления **ядерного эффекта Оверхаузера** – регистрация спектров ЯМР ^{13}C в условиях полной развязки от протонов [Noggle, 1971].

Величина фактора ЯЭО для ядер углерода может достигать максимального значения 1.988, если доминирующий вклад в спин-решеточную релаксацию вносит диполь-дипольный механизм [Ricca, 1993]. Благодаря присутствию в молекулах гумусовых кислот парамагнитных центров, обеспечивающих эффективный электронно-ядерный механизм релаксации, эта величина в случае гумусовых кислот должна быть существенно ниже.

Оценка величины фактора ЯЭО для ГК и ФК почв была проведена в работе [Preston, 1985]. Согласно полученным данным, величина фактора ЯЭО для различных типов ядер ^{13}C в структуре гумусовых кислот не превышает 1. При этом фактор ЯЭО уменьшается в ряду алифатические – карбогидратные – ароматические – карбоксильные атомы ^{13}C . Аналогичная закономерность обнаружена в работе [Humic substances in the Suwannee river, 1994], выполненной для ГК и ФК речных вод (табл. 1.9).

Таблица 1.9

Факторы ЯЭО для различных областей спектра гумусовых кислот речных вод [Humic substances in the Suwannee river, 1994]

Спектральная область, м.д.	220-180	180-160	160-90	90-60	60-0
ФК	0.2	0.35	0.31	0.67	0.9
ГК	0.11	0.14	0.19	0.48	0.66

Для устранения ядерного эффекта Оверхаузера широко используемым приемом является выключение шумовой развязки от протонов на период релаксационной задержки [Humic substances in the Suwannee river, 1994; Steelink, 1989]. Указано, что при этом ядерный эффект Оверхаузера снимается полностью.

Существует метод количественного анализа без сохранения истинных соотношений интенсивностей в спектре – метод весовых факторов,

предусматривающий калибровку сигналов по образцам известной концентрации [Кушнарев, 1997]. Этот метод экспрессен, поскольку не требует подавления ядерного эффекта Оверхаузера и позволяет использовать оптимальное соотношение между углом Θ и временем повторения импульсов. Существуют работы, обосновывающие применение метода весовых факторов для анализа нефтепродуктов [Смирнов, 1985]. Однако применение данного метода для анализа гумусовых кислот представляется на настоящий момент неразрешимой задачей, в первую очередь, с точки зрения выбора адекватных калибровочных стандартов.

Твердофазная спектроскопия ^{13}C ЯМР гумусовых кислот.

В настоящее время общепринятой техникой получения твердофазных ^{13}C ЯМР спектров является сочетание кросс-поляризации с вращением под «магическим углом» (Cross Polarisation Magic Angle Spinning, CPMAS) [Ricca, 1993; Skjemstad, 1983; Steelink, 1997]. Поскольку при регистрации ^{13}C ЯМР спектров в твердой фазе достигается максимальная концентрация гумусовых кислот, то по сравнению с ЯМР растворов получение спектров аналогичного качества требует значительно меньше времени [Kinchesh, 1995]. В связи со сравнительной дешевизной и экспрессностью данный метод широко применяется для исследования гумусовых кислот. Однако, выигрыш в качестве получаемых спектров за счет увеличения соотношения сигнал/шум нивелируется существенно большим уширением сигналов [Frund, 1994]. Данный фактор приводит к еще более значительному перекрытию спектральных областей, что увеличивает погрешность за счет разбиения спектра на интегрируемые диапазоны.

Существенным недостатком твердофазной спектроскопии ^{13}C ЯМР считается то, что в для этого метода высока доля непроявляющихся в спектре ядер углерода. По некоторым оценкам количество невидимых ядер может достигать 50-70% общего содержания углерода в структуре гумусовых кислот [Ricca, 1993, Kinchesh, 1995], что вызывает обоснованные сомнения в адекватности получаемой структурной информации [Beyer, 1996].

Помимо этого, при регистрации CPMAS спектров может возникать значительная непропорциональность интенсивностей групп сигналов содержанию соответствующих атомов углерода в образце. Причинами этого для гумусовых кислот могут являться неблагоприятные соотношения времен, характеризующих скорости кросс-поляризации T_{CH} и спин-решеточной релаксации протонов $T_{1\text{H}}$, а также присутствие парамагнитных центров и особенности молекулярного движения [Humic substances in the Suwannee river, 1994]. В случае, если каждая интенсивная полоса в CPMAS спектре гумусовых кислот характеризуется отличным от остальных оптимальным временем кросс-поляризационного импульса, то получение количественного

спектра может оказаться неосуществимым [Steelink, 1997; Humic substances in the Suwannee river, 1994].

Хотя широко используемые параметры регистрации СРМАС спектров, основанные на времени контакта 1 мс и релаксационной задержке 1 с позволяют получать количественные ^{13}C ЯМР спектры большинства простых органических молекул, вопрос о возможности получения в этих условиях количественных спектров гумусовых кислот остается предметом дискуссии. В ряде работ [Wilson, 1983c; Hatcher, 1987; Frund, 1989] утверждалось, что в этих условиях получены количественные СРМАС спектры лигнина, гумусовых кислот почв и морских седиментов. Однако, в работе [Conte, 1997] указывается, что оптимальное время контакта необходимо подбирать индивидуально для каждого препарата гумусовых кислот, при этом оно, как правило, ниже 1 мс.

Несколькими группами исследователей опубликованы данные, доказывающие, что определяемое из СРМАС спектров гумусовых кислот содержание ароматических ядер ^{13}C обычно ниже такового из спектров растворов гумусовых кислот [Preston, 1985; Newman, 1980; Schnitzer, 1986; Earl, 1987]. При этом содержание ароматических фрагментов, определенное из СРМАС спектра в стандартных условиях, может быть ниже полученного из спектра раствора этого препарата с длительной релаксационной задержкой на 50% и более [Humic substances in the Suwannee river, 1994; Conte, 1997]. Таким образом, количественность многочисленных данных, полученных методом СРМАС вызывает серьезные сомнения.

В работе [Conte, 1997c] была высказана противоположная гипотеза, объясняющая получаемую диспропорцию занижением результатов определения алифатического углерода при регистрации спектров гумусовых кислот в растворе. Гипотеза предполагает существование в структуре гумусовых кислот больших углеводородных радикалов, которые в щелочном растворе оказываются внутри "мицелл" гумусовых кислот в связи с конформационными изменениями и могут быть "экранированы" от излучения гидрофильной частью молекул. Однако с точки зрения теории ЯМР, такое объяснение представляется крайне неубедительным.

Таким образом, результаты спектроскопии ^{13}C растворов позволяют получать более полную и корректную структурную информацию как в качественном, так и в количественном аспектах. В связи с этим данный метод представляется предпочтительным, несмотря на требуемые большие затраты приборного времени.

1.5 Спектроскопия ПМР гумусовых кислот

Задача структурного исследования гумусовых кислот методом ПМР спектроскопии, также как и в случае спектроскопии ^{13}C ЯМР, сводится к выделению групп сигналов, по возможности относящихся к атомам водорода сходного структурного типа и их количественному анализу [Steelink, 1997, Skjemstad, 1993]. Однако спектроскопия ПМР гумусовых кислот имеет ряд специфических проблем, в числе которых можно выделить следующие:

- сильная зависимость сигналов протонов функциональных групп от растворителя и условий (наличия/отсутствия протонного обмена)
- присутствие в спектрах ПМР гумусовых кислот сигналов остаточных протонов растворителя, перекрывающихся с малоинтенсивными сигналами протонов гумусовых кислот.

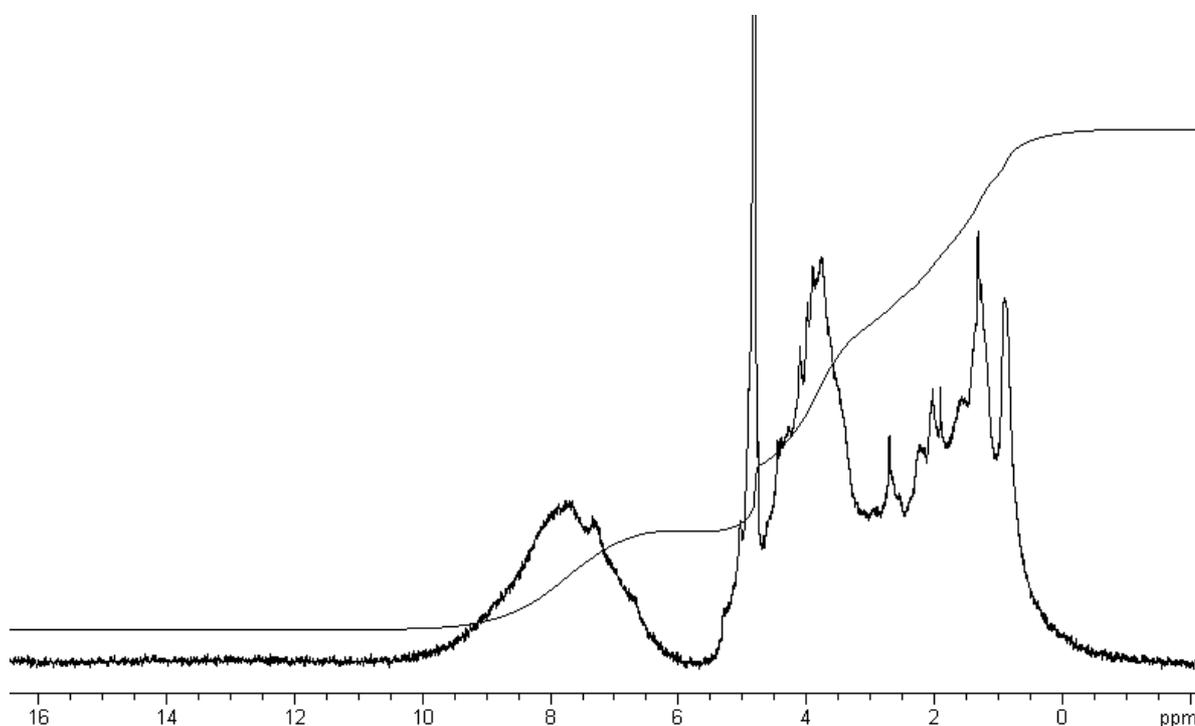


Рис. 1.5. Спектр ПМР ГК почв. Растворитель 0.1 М NaOD/D₂O.

Обычно растворителем в спектроскопии ПМР гумусовых кислот является 0.1 М NaOD/D₂O. Из органических растворителей для немодифицированных гумусовых кислот описано использование ДМСО-d₆, ДМФА-d₇ и метанола-d₄ [Ruggiero, 1979a]. Общий вид спектров в NaOD/D₂O приведен на рис. 1.5.

В структуре гумусовых кислот можно выделить два типа протонов – С-Н протоны, связанные с углеродным скелетом, и протоны функциональных групп. Положение сигналов скелетных С-Н протонов идентично в водных растворах и органических растворителях. Принципиально отлично поведение протонов функциональных групп, способных к быстрому обмену, положение

которых в спектре может изменяться в широких пределах. В связи с этим такие протоны часто называют подвижными.

В спектрах гумусовых кислот наблюдаются две хорошо разрешенные группы сигналов С-Н протонов, соответствующие алифатическим (0-6 м.д.) и ароматическим (6-9 м.д.) протонам, при этом интенсивность сигналов последних значительно ниже. В алифатической области спектра обычно выделяют диапазон химических сдвигов протонов О-замещенных алифатических фрагментов, большая часть которых относится к карбогидратным структурам (3-5 м.д.) (далее карбогидратные протоны), и протонов незамещенных алифатических структур (далее алифатические протоны) при 0-3 м.д.

В водных растворах происходит быстрый в шкале времени ЯМР обмен подвижных протонов с дейтерием воды, все их сигналы сливаются с пиком Н₂О (около 4.6 м.д.). В связи с этим невозможно не только отдельное, но и суммарное их определение [Humic substances in the Suwannee river, 1994]. Поэтому авторы определяют только распределение С-Н протонов в молекулах гумусовых кислот. Имеющиеся данные для препаратов различного происхождения обобщены в табл. 1.10.

Таблица 1.10

Распределение скелетных протонов в структуре гумусовых кислот различного происхождения

	C_{Ar-H}/C_{Alk-H}	CH_n-O/CH_n
ФК почв	0.15±0.04	0.42±0.25
ГК почв	0.30±0.09	1.02±0.39
ГК торфа	0.25±0.07	н/д
ГФК речных вод	0.09±0.02	0.77±0.27
ГФК грунтовых вод	0.14±0.05	0.34±0.22
ГФК морских вод	0.02±0.01	н/д

Как видно из табл. 1.10, гумусовые кислоты различного происхождения характеризуются отличающимся распределением водорода, связанного с углеродным скелетом молекул. В связи с этим такие соотношения могут быть использованы для идентификации препаратов гумусовых кислот наряду с другими параметрами. Так, ГК почв и торфа характеризуются более высокими значениями соотношения C_{Ar-H}/C_{Alk-H} , а ГФК морских вод практически не содержат ароматических протонов.

Применение апротонных органических растворителей позволяет наблюдать в спектре группы сигналов протонов основных функциональных групп гумусовых кислот. Так, в растворе в сухом ДМСО-d₆, протонный обмен

протекает медленно в шкале времени ЯМР, давая возможность наблюдать разделенные пики протонов карбоксильных групп (14-10.5 м.д.), фенольных (10.5-7 м.д.) и спиртовых (3.5-5 м.д.) гидроксильных [Ruggiero, 1979b]. Однако в этом случае широкие пики протонов функциональных групп перекрываются с сигналами скелетных С-Н протонов, не позволяя проводить их отдельное определение. Так, пик спиртовых ОН-протонов накладывается на сигналы „карбогидратных С_n-О, а сигнал фенольных ОН-протонов закрывает часть области ароматических. Это не позволяет проводить отдельное определение протонов углеродного скелета и функциональных групп в данных областях.

Положение сигналов подвижных протонов гумусовых кислот в спектре ПМР крайне чувствительно к присутствию даже следовых количеств воды вследствие ее каталитического действия на процессы протонного обмена [Ruggiero, 1979c]. Увеличение количества воды в образце приводит к уширению и сближению сигналов протонов функциональных групп вплоть до полного их слияния. Обычно в спектрах гумусовых кислот в органических растворителях наблюдается широкий пик подвижных протонов при 6.5-8.5 м.д. Чувствительность к присутствию воды является крайне неблагоприятным фактором для спектроскопии ПМР гумусовых кислот в связи с упоминавшейся выше высокой гигроскопичностью этих соединений. При этом химический сдвиг результирующего сигнала подвижных протонов ν определяется соотношением количества протонов функциональных групп и воды [Ruggiero, 1979b]:

$$\nu = \chi_{\text{H}_2\text{O}} \nu_{\text{H}_2\text{O}} + \sum (\chi_{\text{COOH}} \nu_{\text{COOH}})_i + \sum (\chi_{\text{ArOH}} \nu_{\text{ArOH}})_i + \sum (\chi_{\text{ROH}} \nu_{\text{ROH}})_i \quad (1.5),$$

где χ и ν – доля и химический сдвиг подвижных протонов с различным химическим окружением.

В работе [Ruggiero, 1978] вызывали смещение сигналов подвижных протонов и воды в слабое поле, добавляя к раствору ФК в ДМСО-d₆ дейтеротрифторуксусную кислоту. Кислота аналогично воде ускоряет протонный обмен, при этом положение результирующего сигнала при избытке кислоты смещено в слабое поле. Аналогичный эффект дает применение DCl [Wershaw, 1985]. Авторы обеих работ использовали добавление кислоты для удаления интенсивного сигнала воды из карбогидратной области спектра гумусовых кислот.

В настоящее время наиболее надежным способом удаления сигналов подвижных протонов и воды из спектров ПМР гумусовых кислот в органических растворителях считается предварительный обмен этих протонов на дейтерий при предварительном растворении гумусовых кислот в D₂O с последующим высушиванием [Ruggiero, 1980; Wershaw, 1985].

Таким образом, несмотря на то, что для гумусовых кислот описан ряд методов удаления сигналов водорода функциональных групп из спектра, метода их количественного определения на сегодняшний день не существует.

В работах [Кушнарев, 1997; Kanitskaya, 1996a; Kanitskaya, 1996b] было выполнено определение количеств COOH- и фенольных OH-групп в продуктах гидролиза лигнинов, основанное на сопоставлении их ПМР спектров в гексаметилфосфортриамиде-d₁₈ (ГМФА) и дейтерохлороформе. Согласно приводимым данным, использование ГМФА в качестве растворителя позволяет разделить сигналы фенольных гидроксильных и ароматических протонов в спектрах гидролизатов лигнина. Однако, данный метод не может быть напрямую применен к анализу гумусовых кислот в связи с нерастворимостью последних в хлороформе и ограниченной растворимостью в ГМФА.

Второй серьезной проблемой осуществления количественной интерпретации ПМР спектров гумусовых кислот является присутствие сигнала остаточных протонов растворителя, который даже при использовании растворителей высокой чистоты обычно является самым интенсивным пиком в спектре. При использовании как NaOD/D₂O, так и ДМСО-d₆, пик остаточных протонов растворителя закрывает часть сигналов протонов гумусовых кислот. Пик остаточных протонов ДМСО накладывается на сигналы протонов гумусовых кислот в алифатической области спектра, а широкий сигнал HDO в NaOD/D₂O спектре закрывает некоторую часть сигналов карбогидратных протонов. В связи с этим невозможно количественное определение C-H протонов указанных типов.

Широко используемым приемом для решения данной проблемы является подавление сигнала HDO в ПМР спектрах гумусовых кислот в NaOD/D₂O при помощи облучения дополнительным узкополосным импульсом на соответствующей частоте. При этом крайне важно тщательно подбирать интенсивность облучения, так как при избыточной мощности импульсов возникают значительные искажения базовой линии. Основным недостатком использования такой методики является то, что вместе с сигналом растворителя частично происходит подавление сигналов протонов гумусовых кислот, находящихся вблизи частоты облучения. По данным [Wilson, 1987, Steelink, 1987] недоопределение карбогидратных протонов гумусовых кислот при подавлении пика HDO может составлять 5-15% отн. Тем не менее, данная методика получило широкое распространение при регистрации спектров гумусовых кислот в NaOD/D₂O. В спектрах ПМР гумусовых кислот в ДМСО-d₆ подавление пика растворителя не может быть рекомендовано в связи с наличием достаточно интенсивных сигналов гумусовых кислот в области 2-3 м.д.

Из вышесказанного следует проблема определения суммарной интегральной интенсивности протонов гумусовых кислот. Как уже упоминалось, при регистрации спектров гумусовых кислот в водных растворах в спектре наблюдаются только сигналы С-Н протонов. В связи с неизвестной общей интенсивностью сигналов протонов гумусовых кислот в спектре, возможно определять только их относительные содержания.

Совокупность указанных проблем является причиной того, что на настоящий момент задача количественного определения протонов гумусовых кислот при помощи спектроскопии ПМР остается нерешенной. Она используется только для определения соотношений количества ароматических, карбогидратных и алифатических протонов из спектров в NaOD/D₂O. Такие данные трудно сопоставимы с результатами других методов структурного исследования гумусовых кислот. В результате сложилось мнение о низкой информативности данного метода применительно к количественному исследованию структуры гумусовых кислот. Отсутствие метода количественного определения полного распределения водорода в структуре гумусовых кислот вызвало потерю интереса к спектроскопии ПМР среди исследователей этих веществ, и за последние 10 лет появлялись лишь единичные работы, посвященные этому вопросу.

На основании проанализированных литературных данных можно сделать вывод, что несмотря на широкое применение спектроскопии ЯМР для исследования структуры гумусовых кислот, вопросам получения количественной информации уделяется недостаточно внимания как в случае спектроскопии ¹³C ЯМР, так и ПМР. В то же время назрела настоятельная необходимость получения достоверных данных по структурно-групповому составу гумусовых кислот.

К основным методическим проблемам определения структурно-группового состава гумусовых кислот методами спектроскопии ЯМР ¹³C и ПМР на момент постановки настоящих исследований можно отнести: выбор условий регистрации количественных спектров ¹³C ЯМР; определение полного распределения водорода в молекулах гумусовых кислот, включающего как скелетные протоны, так и протоны функциональных групп, при помощи спектроскопии ПМР; разработку комплексного способа обработки данных ¹³C ЯМР и ПМР для расчета детального структурно-группового состава гумусовых кислот.

Для решения задач классификации и прогнозирования свойств гумусовых кислот с использованием ¹³C ЯМР и ПМР дескрипторов структурно-группового состава необходимо было создать соответствующую базу данных, полученных с позиций единых методических подходов, для

представительной выборки препаратов гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава. Указанные проблемы и определили основные направления исследования структурно-группового состава методами спектроскопии ЯМР ^{13}C и ПМР в рамках представленной работы.

1.6 Молекулярно-массовый состав гумусовых кислот

Молекулярная масса (ММ) – фундаментальная характеристика любого химического вещества. ММ определяет растворимость гумусовых кислот, их способность к миграции в природных экосистемах, возможность поглощения микроорганизмами и высшими растениями [Орлов, 1992]. В отличие от простых органических веществ, характеризующихся единственным значением ММ, гумусовые кислоты полидисперсны, то есть обладают набором молекулярных масс. Поэтому их характеризуют молекулярно-массовым распределением (ММР), на основании которого рассчитывают среднюю ММ. В зависимости от способа усреднения получают три вида средних молекулярных масс: среднечисловую (M_n), средневесовую (M_w) и среднюю (M_z) [Swift, 1989; Орлов, 1992].

Среднечисловая ММ – усреднение по числу молекул в полимере – рассчитывается как:

$$\bar{M}_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} \quad (1.6)$$

где n_i – число i -тых молекул с молекулярной массой M_i .

Средневесовая ММ – усреднение по массе молекул в полимере – может быть рассчитана в соответствии со следующей формулой:

$$\bar{M}_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i} \quad (1.7)$$

Средняя ММ выражается уравнением:

$$\bar{M}_z = \frac{\sum n_i M_i^3}{\sum n_i M_i^2} \quad (1.8)$$

Если в монодисперсных системах все способы усреднения приводят к получению одной и той же величины молекулярной массы, то в полидисперсных системах выполняется соотношение:

$$M_z > M_w > M_n,$$

при этом отношение M_w/M_n используется как показатель степени полидисперсности. Для характеристики гумусовых кислот наиболее часто используют их средневесовую молекулярную массу [Орлов, 1992; Swift, 1989].

Вследствие нерегулярности строения, высокой полидисперсности и полиэлектролитных свойств гумусовых кислот, все существующие

экспериментальные методы определения ММ лишь ограниченно применимы для анализа данных соединений. Так, методы определения ММ, основанные на измерении коллигативных свойств полимера (осмометрия, криоскопия, эбулиоскопия), чрезвычайно чувствительны к присутствию низкомолекулярных примесей в анализируемом образце. Поэтому их применение для анализа препаратов гумусовых кислот, которые практически всегда содержат низкомолекулярные зольные компоненты, может приводить к существенному занижению ММ (M_n) [Aiken and Gillam, 1989]. Использование метода скоростной седиментации, напротив, приводит к завышенным значениям ММ (M_z) [Swift, 1989]. На определяемые методом ультрафильтрации величины ММ (M_w) большое значение оказывает взаимодействие гумусовых кислот с мембранами [De Nobili et al., 1989]. При этом следует отметить, что все указанные методы позволяют определять либо среднюю ММ полидисперсного образца, либо распределение массы вещества по фракциям, соответствующим диапазонам пропускания фильтрующих мембран. В тоже время гораздо более фундаментальной ММ характеристикой полидисперсного вещества является кривая его ММР. Наиболее доступным и широко распространенным способом исследования ММР полимеров и, в частности, гумусовых кислот, является эксклюзионная гель-хроматография.

1.6.1 Исследование молекулярно-массового распределения гумусовых кислот методом эксклюзионной хроматографии

Метод эксклюзионной хроматографии основан на различной способности молекул разного размера проникать в поры неионогенного геля, который служит неподвижной фазой, и используется для анализа гумусовых кислот уже с 1963 г. [Posner, 1963]. Тем не менее, до сих пор весьма слабо разработан интерпретационный аппарат данного метода в применении к гумусовым кислотам. Как свидетельствуют данные табл. 1.11, где приводятся результаты исследования гумусовых кислот методом эксклюзионной хроматографии, наиболее часто используемый для сравнения препаратов параметр – содержание и ММ преобладающей фракции. В то же время, величины, характеризующие собственно ММР гумусовых кислот (M_n , M_w , M_z), практически не используются.

Молекулярные массы гумусовых кислот различного происхождения, определенные методом эксклюзионной хроматографии

ММ преобл. фракции		Калибр. в-ва	Литературный источник
ММ, КДа	сод., %		
ФК природных вод			
0.7-10	100	ПД	Ghassemi and Christman, 1968
5-10	48	ПД	Ishiwatari et al., 1980
0.7-5	68	ПД	Varney et al., 1981
>50	40	ПД	Giessing, 1973
<1.5	50	–	Сироткина и др., 1973
0.7-1.5	70	–	Сироткина и др., 1974
0.3-5	60	–	Варшал и др., 1975
0.3-0.7	31	–	Варшал и др., 1980
<0.3	41	–	"_"
0.4	21	ПД	Кауричев и др., 1977
0.58	23	ПД	"_"
РОВ водных экстрактов почв			
>10	не указ.	ПД	Khan, 1970
0.4	17	ПД	Кауричев и др., 1977
ФК почв			
≤ 7	не указ.	ПД	Фокин и Карпухин, 1972
0.48	28	ПД	Карпухин и Фокин, 1977
2.04	31	ПД	"_"
0.48	43	ПД	"_"
0.17	43	ПД	"_"
0.17	32	ПД	"_"
4-22	100	ПД	Piccolo and Mirabella, 1987
1-60	100	ПД	"_"
ГК почв			
10-20	52	ПД	Аммосова и Балаганская, 1991
100-700	47	ПД	"_"
10-20	47	ПД	"_"
100-700	63	ПД	"_"
>100	31	ПД	Назарова, 1978
17.9 ¹	100	ПД	Анисимова и др., 1998

ММ преобл. фракции		Калибр. в-ва	Литературный источник
ММ, КДа	сод., %		
50-70	45	ПД	Вишнякова и др., 1996
24.3 ¹	100	ПД	Анисимова и др., 1998
50-70	45	ПД	Вишнякова и др., 1996
100	57	ПД	"–"
15.5 ¹	100	ПД	Анисимова и др., 1998
100-200	62	ПД	Dell'Agnola et al., 1964
ФК торфа			
5.0 ¹	100	ПД	Mantoura and Riley, 1975
Гуминовые кислоты угля			
2.33 ¹	100	ПССК	Chin et al., 1994
4.1 ¹	100	ПССК	"–"

¹ в работе приведены значения пиковых ММ.

Установлено, что ММ. закономерно изменяется для гумусовых кислот разного происхождения. Согласно существующим литературным данным, гумусовые кислоты можно расположить в следующий ряд по возрастанию их ММ: ФК природных вод < ФК почв < ГК почв (табл. 1.11). С другой стороны, обращает на себя внимание большой разброс приводимых различными исследователями величин ММ гумусовых кислот, выделенных из сходных источников. Например, по данным Анисимовой и др. [1998] ММ ГК черноземно-луговой почвы составила 15.5 КДа, тогда как Вишнякова и др. [1996] для аналогичных ГК в качестве ММ преобладающей фракции ГК указывает 100 КДа, то есть приводимые величины различаются в 6 раз.

Наиболее ярким примером низкой достоверности абсолютных величин ММ гумусовых кислот, получаемых методом эксклюзионной хроматографии, являются данные Карпухина и Фокина [1977], согласно которым ММ преобладающих фракций ФК чернозема и краснозема составили всего 170 Да. Очевидно, что данная величина существенно занижена, так как ММ глюкозы и фталевой кислоты – простейших строительных блоков гумусовых кислот – составляют 180 и 160 КДа, соответственно. Кроме того, согласно Орлову [1992], нижний предел M_n , вычисленный на основе простейших формул гуминовых и фульвокислот в расчете на фрагмент, содержащий 1 атом азота, для ГК составляет 308, а для ФК – 381 Да. Указанные расхождения свидетельствуют о существенной зависимости получаемых абсолютных значений ММ гумусовых кислот от условий проведения гелехроматографического анализа.

Таким образом, анализ гумусовых кислот методом эксклюзионной хроматографии вследствие отсутствия разработанной методики характеризуется не только низкой достоверностью абсолютных значений ММ, но и является малопригодными для сравнительного анализа. Таким образом, назрела настоятельная необходимость в систематическом исследовании ограничений и возможностей метода эксклюзионной хроматографии в применении к гумусовым кислотам.

1.6.2 Методические аспекты определения молекулярных масс гумусовых кислот методом эксклюзионной хроматографии

Вследствие полиэлектролитной природы гумусовых кислот использование метода эксклюзионной хроматографии для определения их ММ существенно осложняется из-за неэксклюзионных эффектов, а именно сверхэксклюзии и специфической адсорбции [Беленький и Виленчик, 1978; De Nobili et al., 1989]. Гидрофильные гели (декстрановые, полиметакрилатные) содержат остаточные количества карбоксильных групп, ионизация которых приводит к образованию отрицательного заряда на частицах геля. Вследствие этого полианион гумусовых кислот исключается из пор по законам значительно более сильной ионной эксклюзии [De Nobili et al., 1989]. Этот эффект хорошо изучен для синтетических полиэлектролитов. Для его устранения гель-хроматографический анализ полиэлектролитов обычно проводят в среде низкомолекулярного электролита. Данный прием широко применяется и при анализе гумусовых кислот, однако использование солевых растворов в качестве элюентов приводит к адсорбции гумусовых кислот на геле [Posner, 1963; De Nobili et al., 1989]. Величина указанного эффекта зависит от свойств геля и анализируемых гумусовых кислот.

Влияние рН пробы, вводимой в колонку, на результаты фракционирования гумусовых кислот, а именно, уменьшение объема эксклюзии с возрастанием рН, также было отмечено рядом исследователей [Söchtig, 1972; Sapek, 1973]. Наблюдаемый эффект объясняется, с одной стороны, изменением состояния молекул гумусовых кислот (например, их ассоциацией в кислых условиях), а, с другой, вышеупомянутым влиянием ионной силы. Необходимо также отметить, что при несоответствии ионной силы вводимой пробы и используемого элюента вид получаемой гель-хроматограммы искажается из-за так называемого “солевого пика” [De Nobili et al., 1989; Frimmel et al., 1992].

Помимо описанного выше влияния неэксклюзионных эффектов на результаты фракционирования гумусовых кислот, не менее сложной проблемой является отсутствие адекватных стандартных веществ, необходимых для калибровки гель-хроматографической колонки. В идеальном случае калибровочное вещество должно иметь такую же

структуру, как и анализируемое. Однако для гумусовых кислот это условие невыполнимо, поэтому в качестве стандартов при анализе гумусовых кислот обычно используют наборы полидекстранов (ПД) [Dell'Agnola et al., 1964; Mantoura and Riley, 1975; Piccolo and Mirabella, 1987; Вишнякова и др., 1996 и др.] или полистиролсульфоновых кислот (ПСС) [Chin et al., 1994]. Учитывая, что ПСС представляют собой синтетические полиэлектролиты, их гель-хроматографические характеристики могут также существенно меняться под влиянием неэкслюзионных эффектов. Поэтому нужно проявлять особую осторожность при сопоставлении абсолютных величин ММ, рассчитанных при использовании различных калибровочных веществ. Очевидно, что определяемая величина ММ будет непосредственно зависеть от плотности удельного заряда полимеров, используемых в качестве калибровочных веществ. Таким образом, можно предположить, что колебания величин ММ гумусовых кислот, приводимых в литературе, определяются во многом условиями проведения гель-хроматографического анализа.

Неразработанность методических основ использования экслюзионной хроматографии для определения молекулярных масс гумусовых кислот привела к тому, что на основании работ проф. А. Пикколо (Сельхоз. ф-т, Неаполитанский ун-т, Италия), опубликованных рядом ведущих журналов [Piccolo et al., 1996; Piccolo, 1997], в настоящее время в литературе развернута серьезная кампания по пересмотру теории о макромолекулярной природе гумусовых кислот и замене ее на “мицеллярную”. Поводом для этого послужила неадекватная интерпретация результатов гель-хроматографических экспериментов, проведенных в неэкслюзионных условиях. Автором настоящей диссертации опубликована соответствующая критическая статья, заказанная журналом Soil Science для спец. выпуска [Perminova, 1999], посвященного данному вопросу.

В связи с изложенным, назрела настоятельная необходимость в систематическом исследовании ограничений и возможностей метода в применении к объекту, обладающему целым рядом специфических свойств, которые могут приводить к появлению неэкслюзионных эффектов, что вызывает существенные сложности при интерпретации экспериментальных данных.

1.7 Описание строения гумусовых кислот и проблемы классификации

1.7.1 Использование блок-схем и структурных формул для описания строения гумусовых кислот

Вплоть по настоящее время одним из основных способов использования информации об элементном, структурно-групповом и молекулярно-массовом составе для описания строения гумусовых кислот является расчет средних структурных формул на их основе. Для демонстрации достоинств и недостатков такого способа представления структурной информации ниже будут рассмотрены примеры таких формул.

Развитие представлений о специфике строения периферической и негидролизуемой частей молекул гумусовых кислот нашло свое выражение в описании их структуры при помощи блок-схем. Одна из первых блок-схем была предложена Мистерски и Логиновым в 1959 г. для ГК почв. Согласно этой схеме молекула ГК содержит “ядро”, в которое входят ароматические кольца, хиноны, кислород и азотсодержащие гетероциклы, гидроксильные, карбоксильные и карбонильные группы. Ядро окружено периферическими алифатическими цепями, в том числе углеводного и полипептидного характера. За счет комплексообразования и сорбции частица ГК содержит также минеральные компоненты, в первую очередь оксид кремния, железа, алюминий, кальций и фосфаты. Серьезным недостатком этой схемы является заострение внимания на “ядре” молекулы, вследствие чего структура подвергалась критике [Орлов, 1990, Ephraim et al., 1989].

Несколько более корректно этот вопрос решается в блок-схеме, предложенной Паули [Pauli, 1967]. Согласно данной схеме в основе ГК лежат микроячейки, несущие функциональные группы и боковые мостики. Микроячейки соединены в основные структурные единицы – мононы, которые в свою очередь образуют полиноны.

С нашей точки зрения, схема строения структурной ячейки, предложенная Орловым [Орлов, 1990] на настоящий момент может рассматриваться как оптимальный вариант блок-схемы (рис. 1.6). Данная структурная ячейка представляет собой минимальную по размеру часть молекулы, которая содержит все важнейшие структурные фрагменты. Подробно приводятся характерные фрагменты негидролизуемой части молекулы и типичные способы их соединения, а гидролизуемая периферия дана в виде набора структурных компонентов, количество и характер сочленения которых варьируется. Состав и строение структурных ячеек, из которых сложена вся молекула, могут также варьировать. Схема

удовлетворительно объясняет конформационные особенности молекул, интенсивную окраску и другие свойства ГК.

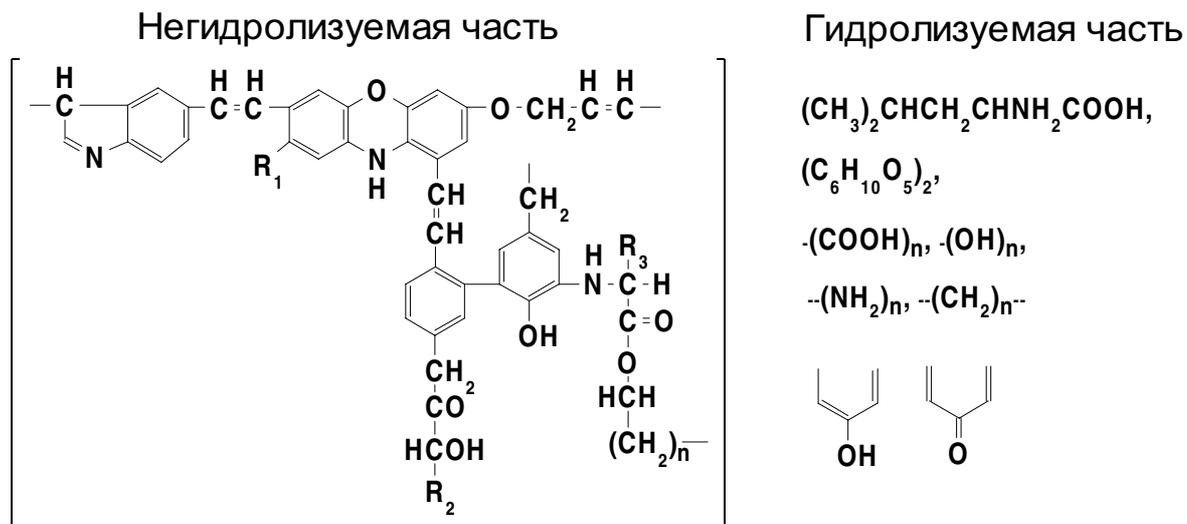


Рис. 1.6. Структура структурной ячейки ГК почв [Орлов, 1990].

В работах [Орлов, 1974; Ziechmann, 1988] были предприняты попытки количественного описания структуры гумусовых кислот на уровне “каркас-периферия”. Однако баланс структурных компонентов показал, что не идентифицированной остается от 12 до 45% массы гумусовых кислот. Это, по всей видимости, связано с частичным разрушением каркасной части гумусовых кислот до CO_2 при жесткой деструкции.

Блок-схемы весьма удобны для общей характеристики статистического строения гумусовых кислот, однако они не позволяют описывать и прогнозировать конкретные механизмы участия гумусовых кислот в химических реакциях. В связи с этим в значительном числе работ предпринимались попытки перехода к молекулярному уровню описания структуры, т.е. характеристике строения среднестатистической молекулы гумусовых кислот.

Одной из первых таких формул, является формула Касаточкина (1953 г.), предложенная для описания структур ГК, выделенных из окисленного угля [Орлов, 1990]. В данной формуле представлен только углеродный скелет ГК, опущены все остальные подробности строения. Согласно формуле Касаточкина, для ГК характерна плоская атомная сетка циклически полимеризованного углерода с боковыми радикалами в виде молекулярных цепей линейно-полимеризованного углерода, несущими на себе различные атомы и атомные группы.

Комиссаровым и Логиновым, также исследовавшими структуры ГК угля, предложена в 1970 г. структурная формула мономерного звена молекулы ГК, содержащая конденсированное ядро. При этом наличие конденсированного

ароматического углерода подтверждено исследованием продуктов окисления [Комиссаров и Логинов, 1971]. Однако наличие плоского конденсированного ядра противоречит экспериментальным данным о строении гумусовых кислот других природных сред, хотя следует отметить, что для ГК угля доля конденсированных структур может быть весьма велика.

Структурные формулы с линейным расположением ядер были предложены Драгуновым (рис. 1.7) и Стивенсоном (рис. 1.8).

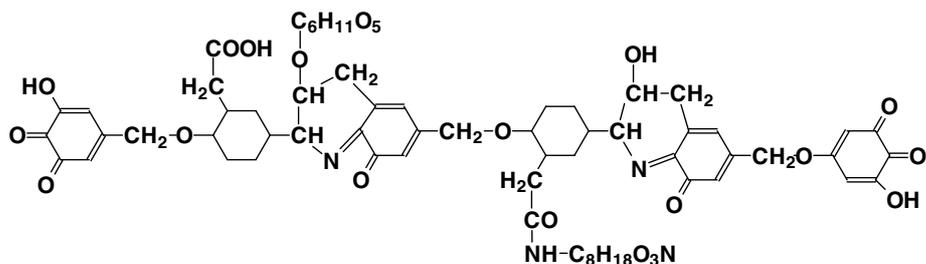


Рис. 1.7. Строение молекулы ГК почв (по Драгунову) (цит по [Ziechmann, 1988]).

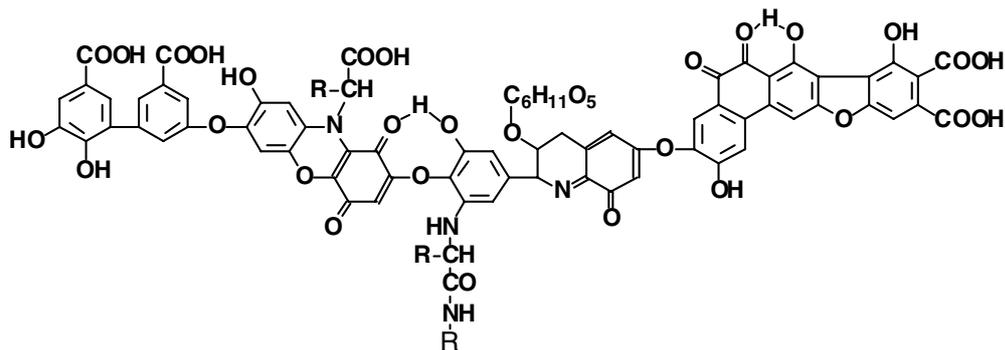


Рис. 1.8. Строение молекулы ГК почв [Stevenson, 1982].

Достоинством данных структурных формул является присутствие в них практически всех важнейших составляющих структуры ГК. Однако при этом данные формулы плохо согласуются с результатами окислительной деградации, т.к. все бензолные кольца в них имеют кислородные заместители. Помимо этого, использование данных формул может привести к слишком упрощенной трактовке структуры ГК, что неоднократно отмечалось многими исследователями [Орлов, 1990; Beyer, 1996].

Другая точка зрения на строение гумусовых кислот отражена в структурной схеме “строительного блока” Шнитцера [Schnitzer and Khan, 1972]. Согласно данной схеме основу гумусовых кислот составляют фенол- и бензолполикарбоновые кислоты, связанные за счет ван-дер-ваальсовых сил и водородных связей. Однако, такая система не может быть устойчива к действию детергентов и кислот и должна легко распадаться на

простые мономерные единицы, что не подтверждается экспериментальными данными. В то же время содержание основных структурных фрагментов в данной структуре хорошо согласуется с результатами различных методов исследования.

Гипотетическая модель структурного фрагмента гумусовых кислот почв, предложенная Кляйнхемпелем [Kleinhempel, 1970] (рис. 1.1) представляет собой попытку одновременно сохранить детальное описание структуры ГК и показать ее статистический характер. Это достигается за счет чрезмерной громоздкости формулы, в которой автор приводит практически все возможные элементы структуры и способы их сочленения. Возможно, данная формула наиболее полно отражает набор структурных фрагментов гумусовых кислот, хотя она неоднократно подвергалась критике, в частности, в связи с чрезмерно высоким содержанием азота.

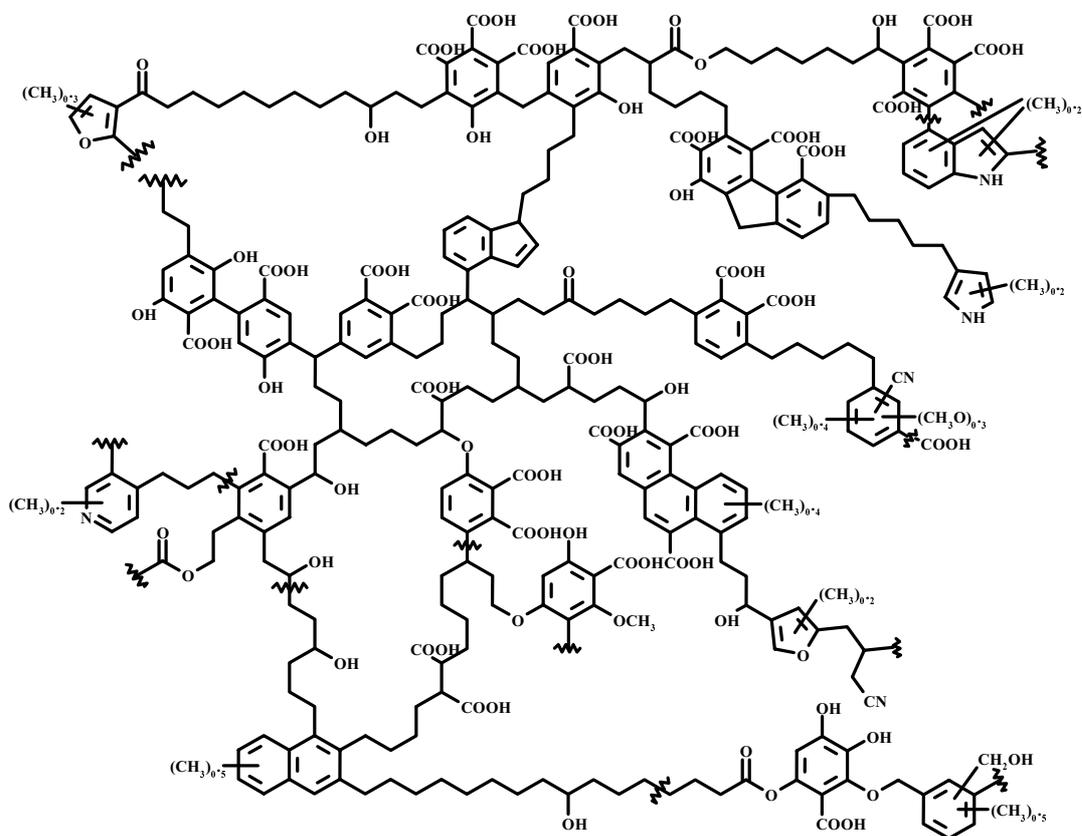


Рис. 1.9. Строение негидролизуемой части молекулы ГК почв [Schulten, 1994].

Структурная формула ГК почв, включающая в себя длинноцепочечные алифатические мостики, была предложена Шультеном [Schulten, 1994] (рис. 1.9). Данная структурная модель была подвергнута обширной критике в связи с тем, что автор не учитывал в расчетах возможные ошибки метода пиролитической масс-спектрометрии [Stevenson, 1972]. Помимо этого,

следует отметить, что данная формула, наравне с предыдущей, представляется слишком громоздкой для восприятия.

Основным достоинством описанного способа представления информации о строении гумусовых кислот является наглядность. К числу недостатков относится невозможность ее использования в указанном виде для выработки классификационных признаков гумусовых кислот и решения задач прогноза их свойств. Для этого необходимо численное описание структуры, которые бы позволило описать основные закономерности и специфику строения гумусовых кислот в виде набора характеристических параметров. Для этого необходимо снижение уровня детализации информации. Существующие подходы к решению данных проблем описаны в следующем разделе

1.7.2 Численное описание строения гумусовых кислот

Один из наиболее широко распространенных способов, применяющихся для численного описания строения гумусовых кислот с целью выявления закономерностей их образования и трансформации, является построение диаграмм Ван-Кревелена. Способ основывается на графическом представлении данных в координатах Н/С – О/С и служит удобным приемом для демонстрации вклада процессов окисления и конденсации в изменение элементного состава препаратов [Kleinhempel, 1970]. На основании диаграмм Ван-Кревелена было установлено, что процесс гумификации растительных остатков вызывает снижение как соотношения Н/С, так и О/С [Kleinhempel, 1970; Rise and Sulbu, 1989], то есть сопровождается увеличением доли конденсированных структур в молекулах гумусовых кислот. Резко обособленное положение ФК на диаграмме позволило автору работы [Kleinhempel, 1970] предположить, что механизм их образования из растительных остатков принципиально иной, нежели чем для ГК. К недостаткам данного подхода относится довольно низкая дискриминирующая способность используемых дескрипторов элементного состава, которые описывают самый низкий уровень – атомный – структурной организации гумусовых кислот.

В литературе описано и совместное использование результатов элементного и функционального анализа для численного описания строения гумусовых кислот. Так, на использовании данных элементного анализа и известного содержания COOH и C=O групп основывается эмпирическая формула расчета степени бензоидности α , предложенная Д.С. Орловым [Орлов, 1990]:

$$\alpha = C_{\text{бенз}} / (C_{\text{бенз}} + C_{\text{ал}}) \quad (1.9)$$

При этом

$$C_{\text{бенз}} = C - C_{\text{ал}} - \text{COOH} - \text{CO},$$

$$C_{\text{ал}} = (\text{H/C} + 2\text{K} \cdot \text{O/C}) / 1.67 - 0.2$$

K – “коэффициент учета кислородных функций”, рассчитываемый из данных функционального анализа.

Развитием такого подхода является метод M. Perdue, позволяющий статистически оценивать наиболее вероятное распределение углерода между ароматическими и алифатическими фрагментами [Perdue, 1984]. Исходными данными для расчета являются элементный состав и содержание карбоксильных и хинонных групп. Схема расчета основана на решении системы уравнений,

$$\begin{vmatrix} 1 & 1 & 1 \\ (\text{H/C})_{\text{ал}} & (\text{H/C})_{\text{ар}} & (\text{H/C})_{\text{xs}} \\ (\text{U/C})_{\text{ал}} & (\text{U/C})_{\text{ар}} & (\text{U/C})_{\text{xs}} \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} C_{\text{total}} - [\text{COOH}] - [\text{C=O}] \\ \text{H}_{\text{total}} - [\text{COOH}] \\ \text{U}_{\text{total}} - [\text{COOH}] - [\text{C=O}] \end{vmatrix} \quad (1.10)$$

в которой $(\text{H/C})_{\text{ал}}$, $(\text{H/C})_{\text{ар}}$, $(\text{H/C})_{\text{xs}}$ – “парциальные” соотношения H/C, а $(\text{U/C})_{\text{ал}}$, $(\text{U/C})_{\text{ар}}$, $(\text{U/C})_{\text{xs}}$ – “парциальные” количества двойных связей и циклических структур варьируются случайным образом в заданных пределах. (C_{xs} представляет собой sp^2 -гибридизованный углерод, не включенный в [COOH] и [C=O].) Получаемый в результате массив решений $\{C_{\text{ал}}, C_{\text{ар}}, C_{\text{xs}}\}$ характеризует распределение возможных с точки зрения начальных условий параметров строения углеродного скелета.

Помимо этого, решение системы уравнений позволяет определить наиболее вероятные соотношения H/C и U/C для каждого из рассчитанных параметров C_i . По данным автора, рассчитанные параметры углеродного скелета $C_{\text{ал}}$ и $C_{\text{ар}}$ в ряде случаев согласуются с данными ^{13}C ЯМР [Perdue, 1984]. Данный подход может быть перспективен как с точки зрения расчета дескрипторов строения гумусовых кислот, так и для верификации структурных данных, предоставляемых элементным анализом и ^{13}C ЯМР спектроскопией.

В связи с развитием метода ^{13}C ЯМР-спектроскопии и постепенного превращения ее в рутинный метод анализа, в настоящее время все больше исследователей используют данные по содержанию углерода в составе основных структурных фрагментов в качестве дескрипторов строения гумусовых кислот при установлении взаимосвязи между структурой и свойствами данных соединений [Gauthier et al., 1987; Chin et al, 1994; Haitzer et al, 1999]. Помимо данных ^{13}C ЯМР для этих целей используют также атомные соотношения H/C и O/C и массовый коэффициент оптического поглощения ϵ^* при 254 или 280 нм [Traiana, 1989; Paolis and Kukkonen, 1997]. Выбор указанных параметров в качестве дескрипторов, как правило,

обусловлен заранее предполагаемым характером взаимосвязи между структурным параметром и свойством. Так, все описанные выше дескрипторы использовались для описания содержания ароматических фрагментов в составе гумусовых кислот, – показателя гидрофобности их углеродного скелета, – с целью установления взаимосвязи со связывающей способностью гумусовых кислот по отношению к ПАУ – высокогидрофобным органическим соединениям. Таким образом, выбор дескрипторов строения гумусовых кислот осуществлялся с позиций предполагаемой физической модели, обуславливающей взаимосвязь структура-свойство.

Более сложная задача состоит в том, чтобы иметь набор численных параметров, которые бы характеризовали не заранее заданную взаимосвязь со свойством, а несли бы в себе информацию о строении гумусовых кислот такого уровня, который необходим для решения задач классификации и прогноза свойств гумусовых кислот.

На основании обработки обширного массива данных по строению и свойствам гумусовых кислот почв, Д.С. Орловым были предложены в качестве такого набора признаков следующие [Орлов, 1990]:

(1) элементный состав: для ГК содержание С должно составлять 46-62% (масс), для ФК – 36-44% (масс). Содержание N при этом должно составлять 3-6% (для ФК может быть меньше);

(2) выход бензолкарбоновых кислот при окислении KMnO_4 (% масс) – для серых ГК – 7-35% , для бурых – 5-8%;

(3) наличие негидролизующего азота, который составляет 25-55% от общего;

(4) характер электронных спектров поглощения при значениях $E^{0.001\%ГВ}_{l=1\text{см}, 465\text{нм}}$ порядка 0.01-0.02;

(5) характер ИК-спектров поглощения, наличие специфических полос поглощения в интервале от 2 до 10 мкм.

Комплекс указанных признаков, без сомнения, обеспечивает довольно высокий уровень информативности о структуре описываемых гумусовых кислот и может быть использован в целях диагностики препаратов гумусовых кислот неизвестного происхождения. Однако он не предназначен для решения задач прогноза свойств гумусовых кислот, цель которых не ограничивается установлением тождества между тестируемым веществом и эталонным, а состоит в выявлении внутренних взаимосвязей между спецификой строения и проявляемыми свойствами вещества.

В связи с изложенным, одна из основных задач настоящего исследования состояла в разработке подходов к численному описанию строения гумусовых кислот с целью получения дескрипторов строения, обладающих высокой описательной и прогностической способностью в отношении свойств

гумусовых кислот. При этом в качестве наиболее приоритетных мы рассматривали прогноз связывающих и детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к различным классам экотоксикантов. Постановка такой задачи определяется актуальностью проблемы поиска эффективных детоксикантов природного происхождения для рекультивации загрязненных сред, использование которых не сопровождалось бы опасностью их вторичного загрязнения.

Для решения данной проблемы необходимо было также оценить существующие подходы к количественному описанию связывающих и детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к тяжелым металлам и органическим экотоксикантам. Особое внимание в представленном обзоре уделяли характеристике комплексообразующих свойств гумусовых кислот по отношению к Hg(II) – наиболее токсичному из тяжелых металлов, и их связывающих свойств по отношению к высокогидрофобным органическим экотоксикантам – ПАУ. В обзоре также приведены сведения о взаимодействии гумусовых кислот с важнейшим представителем гербицидов класса симм-триазинов – атразином.

1.8 Комплексообразующие и детоксицирующие свойства гумусовых кислот по отношению к тяжелым металлам

Гумусовые кислоты взаимодействуют с тяжелыми металлами, главным образом, за счет карбоксильных и фенольных групп [Stevenson, 1985]. Взаимодействие происходит с образованием растворимых и нерастворимых гуматов [Stevenson, 1985]. Возможна сорбция металлов на твердых гумусовых кислотах [Marinsky et al., 1980; Ashley, 1996; Орлов и др., 1995]. Образование нерастворимых гуматов характерно для всех металлов, начиная со II группы, и протекает при больших соотношениях металл:ГФК [Rashid, 1974; Schmitt et al., 1996; Онуфриенок, Солодовникова, 1961; Гончарова и др.]. Так, согласно [Schmitt et al., 1996], нерастворимые гуматы Fe(III) и Cu(II) начинают выпадать при добавлении 1 мг-экв Fe и 1.9 мг-экв Cu на 1 г ГК почв с одновременным понижением pH раствора. В [Гончарова и др.] показано, что образование осадка наблюдается при соотношении металл:ГФК 12; 9 и 1.5 ммоль/г для Ni²⁺, Co²⁺ и Cu²⁺ соответственно.

Однако для тяжелых металлов в природных средах характерны соотношения металл:ГФК намного меньшие, чем 1 ммоль/г. При таких соотношениях металлы с гумусовыми кислотами образуют растворимые комплексы. Константа устойчивости данных комплексов является основной характеристикой взаимодействия гумусовых кислот с тяжелыми металлами. Эта величина представляет собой весьма важный параметр для моделирования поведения тяжелых металлов в окружающей среде. Однако

задача ее определения осложняется рядом специфических особенностей гумусовых кислот, а именно:

Непостоянство состава и полидисперсность гумусовых кислот приводят к невозможности корректного расчета молярной концентрации ГФК, которая необходима для вычисления термодинамической константы равновесия процессов с их участием.

Химическая гетерогенность гумусовых кислот приводит к невозможности установления стехиометрии взаимодействия металл-ГФК, в связи с наличием в гумусовых кислотах различающихся по силе металлсвязывающих центров.

Полиэлектролитная природа гумусовых кислот приводит к зависимости константы устойчивости комплекса от количества металла, связавшегося с ГФК, а также к осложнению комплексообразования кислотной диссоциацией гумусовых кислот.

Указанные особенности делают практически невозможным прямое определение термодинамической константы комплексообразования гумусовых кислот с металлами. Поэтому для расчета распределения тяжелых металлов по формам в присутствии гумусовых кислот приходится определять эффективные константы, которые не всегда имеют строгий термодинамический смысл. Описание используемых в литературе подходов к решению указанных проблем приводится ниже.

В общем случае реакция комплексообразования металла M с лигандом L описывается следующим уравнением (без учета зарядов):



где m и n – стехиометрические коэффициенты Термодинамическая константа этого равновесия при условии, что концентрации равны активностям, имеет вид:

$$\beta_{m,n} = \frac{[M_mL_n]}{[M]^m \cdot [L]^n}, \quad (1.12)$$

где в квадратных скобках приведены равновесные молярные концентрации соответствующих компонентов.

Для расчёта константы (1.12) необходимо определить m , n , $[M]$, $[L]$, $[M_mL_n]$. При этом определение n и m является принципиальным, поскольку от них зависит размерность константы устойчивости. Для простых лигандов m и n , как правило, легко определяется, поэтому для вычисления константы достаточно определить соответствующие равновесные молярные концентрации. Однако, если в качестве лиганда выступают гумусовые кислоты ($L = \text{ГФК}$), то, как указывалось выше, ни стехиометрию взаимодействия, ни молярную концентрацию ГФК корректно определить невозможно. Следует отметить, что некорректно определенная стехиометрия

взаимодействия может привести к тому, что полученные значения констант будут несопоставимы друг с другом и с константами, полученными другими авторами в силу их разных размерностей.

Кроме того, при сложной стехиометрии взаимодействия в растворе могут сосуществовать несколько различных комплексов, поэтому определение равновесных концентраций, необходимых для расчета константы (1.12) нередко представляет дополнительные трудности.

1.8.1 Подходы к описанию стехиометрии взаимодействия гумусовых кислот с тяжелыми металлами

Как следует из предыдущего раздела, для определения констант устойчивости комплексов металлов с гумусовыми кислотами необходимо определить концентрацию ГФК и стехиометрию их взаимодействия с металлом. Также необходимо учесть влияние кислотной диссоциации гумусовых кислот на константы устойчивости и неравноценность металлсвязывающих центров гумусовых кислот. Для решения этих задач используют несколько подходов:

- гумусовые кислоты представляют как монодисперсную фракцию с ММ, равной средней, и исходя из этого определяют молярную концентрацию ГФК [Mantoura et al., 1978; Schnitzer and Hansen, 1970; Bresnahan et al., 1978; Махарадзе и др., 1982];
- гумусовые кислоты представляют как набор тех функциональных групп в растворе гумусовых кислот, которые, по мнению автора, ответственны за связывание металла, и подставляют их концентрацию в константу (1.12) в качестве [L] [Gamble et al., 1970; Pinhero et al., 1994];
- гумусовые кислоты представляют как твердую фазу и описывают взаимодействие металл-ГФК в терминах адсорбции, причем в данном случае используют массовую концентрацию ГФК (г/л) [Wit, 1996; Benedetti et al., 1996];
- гумусовые кислоты представляют как набор независимых металлсвязывающих центров (МСЦ) и подставляют их концентрацию (она еще называется металл-эквивалентной концентрацией ГФК) в качестве [L] [Линник и Набиванец, 1986; Guy and Chackrabarti, 1976; Berg and Kramer, 1979; Ricart et al., 1996; Yin et al., 1997].

Если представлять ГФК как монодисперсную фракцию, то существует два метода, позволяющий установить стехиометрию данного взаимодействия — метод изомолярных серий [Schnitzer and Hansen, 1970; Gamble et al., 1970; MacCartney and Mark, 1976] и метод Шуберта [Schubert and Richter, 1948; Shubert et al., 1950; Schubert, 1952].

Метод изомолярных серий очень чувствителен к погрешностям определения ММ при большом соотношении m:n (а, как будет показано ниже,

это соотношение весьма велико). Кроме того, использование метода изомолярных серий осложняется образованием нерастворимых гуматов. Согласно методу Шуберта постулируют образование моноядерного комплекса состава $M \cdot ГФК_n$ (что, как будет показано ниже, не всегда корректно) и из экспериментальной зависимости

$$\lg \frac{[M \cdot ГФК_n]}{[M]} = \lg \beta_n + n \cdot \lg [ГФК]. \quad (1.13)$$

находят β_n и n . Однако экспериментальное определение n (которое вполне может оказаться дробным), приводит к появлению констант с дробными размерностями. Кроме того, как в методе изомолярных серий, так и в методе Шуберта величина n , а значит и размерность константы, чувствительна к ошибкам определения ММ, которые, как показано в разделе 1.3, могут быть весьма велики.

При рассмотрении ГФК как набора функциональных групп, связывающих металл, то в случае, если металл связывается несколькими такими группами (а это скорее всего так, поскольку координационные числа металлов превышают 1) возникает проблема: сколько таких групп и считать ли каждую группу отдельным лигандом или считать их все вместе за один лиганд.

При рассмотрении гумусовых кислот в виде твердой фазы размерность параметров взаимодействия зависит от выбранной модели описания адсорбции. Размерности полученных параметров различаются, что делает их несопоставимыми между собой, а также с константами устойчивости комплексов с низкомолекулярными лигандами.

В противоположность вышеперечисленному, рассмотрение гумусовых кислот в виде набора металлсвязывающих центров задает как однозначную стехиометрию взаимодействия (1:1), так и размерность константы устойчивости комплексов (л/моль). Поэтому данное представление кажется нам наиболее предпочтительным.

Если рассматривать ГФК как набор металлсвязывающих центров, то основной проблемой становится корректное определение их концентрации, т.е. металл-эквивалентной концентрации ГФК. В дальнейшем мы будем по возможности использовать термин “концентрация металлсвязывающих центров” и обозначать как $[МСЦ]$ или $C(МСЦ)$ в отличие от $[ГФК]$ и $C(ГФК)$ — молярной концентрации ГФК, рассчитанной из ее молекулярной массы.

1.8.2 Установление концентрации металлсвязывающих центров в растворах гумусовых кислот

Известно три способа определения концентрации МСЦ в растворе ГФК. Первый заключается в определении максимальной комплексообразующей способности гумусовых кислот в растворах той или иной концентрации [Линник, Набиванец, 1986]. Для этой цели определяют концентрацию связанного металла при больших отношениях металл:ГФК и считают эту концентрацию равной концентрации металлсвязывающих центров. Основным недостатком этого способа является образование нерастворимых гуматов металлов при большом соотношении металл:ГФК. С другой стороны, образование нерастворимых гуматов позволяет модифицировать указанный способ определения концентрации МСЦ, а именно, определять содержание металла в насыщенных им твердых гуматах и считать, что это содержание соответствует содержанию МСЦ. Однако использование данной модификации в литературе не отмечено.

Второй способ заключается в моделировании концентрационных зависимостей тех или иных компонентов в системе металл-ГФК друг от друга и подборе таких значений констант и концентраций МСЦ, чтобы модель наиболее близко описывала экспериментальную зависимость. Чтобы пояснить этот способ, запишем выражение для константы устойчивости гумата металла, выраженного через [МСЦ]

$$K(\text{МСЦ}) = \frac{[\text{М} \cdot \text{МСЦ}]}{[\text{М}] \cdot [\text{МСЦ}]} \quad (1.14)$$

Для полного описания системы необходимо ввести уравнения материального баланса:

$$C(\text{М}) = [\text{М}] + [\text{М} \cdot \text{МСЦ}] \quad (1.15)$$

$$C(\text{МСЦ}) = [\text{МСЦ}] + [\text{М} \cdot \text{МСЦ}] \quad (1.16)$$

Система из трех последних уравнений содержит три уравнения. В случае, если аналитические концентрации МСЦ и М известны, система содержит четыре неизвестных (три равновесные концентрации и константу). Поэтому, чтобы рассчитать константы, достаточно экспериментально определить одну из равновесных концентраций, сократив таким образом число неизвестных до трех и решив полученную систему. Однако, как указывалось выше, $C(\text{МСЦ})$ часто бывает неизвестна. Тогда из системы (1.14)-(1.16) какую-либо из концентраций аналитически выражают через другие концентрации и константу. После этого рассчитанную зависимость определяют экспериментально. Далее, минимизируя отклонения экспериментальной и аналитической зависимости, подбирают K и $C(\text{МСЦ})$.

Для использования вышеописанного способа необходимо получить соответствующую зависимость для большого диапазона соотношений металл-лиганд. Это является недостатком данного способа, поскольку в этом случае, как правило, проявляется неравноценность МСЦ гумусовых кислот. В результате появляются отклонения экспериментальной зависимости от аналитической, которые трудно интерпретировать. В работе [Тао, 1992] на этот счет указывается, что получаемые таким образом константы можно считать скорее описательными параметрами, чем реальными характеристиками центров связывания. Кроме того, описанный способ нахождения $K(\text{МСЦ})$ и $S(\text{МСЦ})$ требует весьма точных методов определения соответствующих компонентов равновесных смесей.

Третий способ был применен для установления металл-эквивалентной концентрации ГФК при их реакции с Fe(III) авторами [Pandeya, 1993]. Для этого было проведено титрование ГФК хлоридом железа (III) с турбидиметрической индикацией конечной точки. В работе [Tan et al., 1971] с целью определения концентрации МСЦ так же титровали раствор ГФК солью алюминия. Данный способ нельзя признать удачным, так как флокуляция гуматов трехвалентных металлов может наступить гораздо раньше, чем будут заняты все центры связывания.

Ниже приведены литературные данные по содержанию МСЦ в ГФК, определенные различными методами.

Таблица 1.12

Содержание МСЦ в различных препаратах ГФК

Тип ГФК	pH	Содержание МСЦ, ммоль/г ГФК	Способ определения	Источник
Cu^{2+}				
Фирмы "Aldrich"	?	2.5	*МКС	Guy and Chackrabarti, 1976
Природные воды (6 образцов)	6-8	0.5-1.8 ммоль/г С	Моделирование	Ryan and Weber, 1982
Почвенные ФК	5	1.6	МКС (диализ)	Truitt and Weber, 1981
Hg^{2+}				
Почвенные ГФК	4-6	2.6	Моделирование	Yin et al, 1997

*Максимальная комплексообразующая способность

Из табл. 1.12 видно, что содержание медь-связывающих центров в различных препаратах ГФК различается не более, чем в 4 раза, при том, что оно определялось принципиально разными методами, для разных препаратов и при разных рН. Следует заметить, что содержание медь-связывающих центров в ГФК близко к максимальному содержанию меди в нерастворимых гуматах (1.5-2.8 ммоль/г [Rashid, 1974]). Содержание ртути-связывающих центров лежит в том же диапазоне, что и медь-связывающих центров.

Данные табл. 1.12, а также величины средних ММ гумусовых кислот (табл. 1.11) и содержанию кислотных групп в гумусовых кислотах (табл. 1.3) позволяют сопоставить константы, выраженные разными способами. Если константу, рассчитанную через массовую концентрацию ГФК (г/л) принять за 1, то для того же препарата ГФК константа, определенная через среднюю молярную массу будет в 10^3 - 10^6 раз больше, через металл-эквивалентную концентрацию ГФК – в 10^3 раз больше, через молярную концентрацию карбоксильных групп – в 10^2 - 10^4 раз больше.

Сопоставление данных по содержанию МСЦ и ММ гумусовых кислот (табл. 1.11 и 1.12) показывает, что в среднем одна молекула ГФК содержит до нескольких десятков МСЦ, т.е. гумусовые кислоты, скорее всего, будут образовывать полиядерные комплексы с тяжелыми металлами. С другой стороны, методами ультрафильтрации показано, что металлы способствуют агрегированию фульвокислот с ММ < 5000 [Ephraim, Marinsky, 1990]. Этот факт свидетельствует либо в пользу существования моноядерных комплексов, либо в пользу образования агрегатов $M_mГФК_n$ (образование которых изучено в [MacCarthy and Mark, 1975]). Видимо, образование моно- и полиядерных комплексов зависит от соотношения металл:ГФК и ММ гумусовых кислот. Можно предположить, что при малых (меньше 1 иона металла на «среднюю» молекулу ГФК) соотношениях будут образовываться комплексы состава 1:1, а при повышении этого соотношения фракции с малой ММ образуют агрегаты $M_mГФК_n$, а с большой – полиядерные комплексы $M_mГФК$. Образование комплексов $M_mГФК$ в любом случае маловероятно.

1.8.3 Влияние кислотной диссоциации ГФК и ионной силы раствора на константу устойчивости комплексов металл-ГФК

Кислотно-основные равновесия с участием ГФК выражаются уравнением:



где L – ГФК или МСЦ (его реальный заряд может отличаться от 0, важно, что он на 1 меньше, чем у HL^+). Этот процесс описывается константой кислотной диссоциации:

$$K_a = \frac{[H^+] \cdot [L]}{[HL^+]} \quad (1.18)$$

При значении $pH = pK_a + 1$ степень диссоциации кислоты составляет примерно 90% и уменьшается по мере снижения pH , что приводит к заметному уменьшению $[L]$. В этом случае нужно при расчете константы (1.18) учитывать это уменьшение, или рассчитывать условную константу комплексообразования для данного значения pH (далее – pH -условную константу). В случае стехиометрии 1:1 она записывается следующим выражением:

$$K_y = \frac{[ML]}{[M] \cdot C_f(L)}, \quad (1.19)$$

где $C_f(L)$ – концентрация всех форм L , не связанных с металлом.

Если L представляет собой h -основную кислоту, то pH -условная константа связана с реальной следующим выражением:

$$K_y = K \cdot \left(1 + \sum_{i=1}^h \left([H^+]^{h-i+1} \cdot \prod_{j=i}^h (K_a)_j \right) \right)^{-1}, \quad (1.20)$$

где $(K_a)_j$ – константа диссоциации кислоты по j -й ступени.

В некоторых работах [Махарадзе и др., 1982] для пересчета pH -условной константы устойчивости фульвата меди в реальную использовали данные по константам диссоциации соответствующих фульвокислот, определенным потенциометрически. В связи с полиэлектролитной природой ГФК (см. раздел 1.2.1) такие расчеты можно считать в достаточной степени приближенными, однако в большинстве работ вообще ограничиваются определением pH -условной константы.

Зависимость констант устойчивости комплексов гумусовых кислот с металлами от ионной силы раствора [Saar and Weber, 1979; Gamble and Schnitzer, 1973] может быть обусловлена двумя эффектами. Во-первых, зависимостью коэффициентов активности электролитов от ионной силы [Кумок, 1977]. Во-вторых, изменением заряда полианиона ГФК в процессе комплексообразования.

Как правило, при определении констант устойчивости гуматов металлов специального внимания влиянию ионной силы не уделяют. Обычно ограничиваются определением условной константы при постоянной ионной силе или константы, экстраполированной на $I = 0$. Последняя константа имеет гораздо больший термодинамический смысл [Кумок, 1977], однако требует получения экспериментального материала при разных значениях ионной силы.

Для преодоления указанной проблемы (приведения констант устойчивости к разным ионным силам) можно воспользоваться уравнением Дэвиса [Кумок, 1977]. Для константы равновесия реакции

$$A+B=AB \quad (1.21)$$

уравнение имеет вид

$$\lg K = \lg K_1 + 2 \cdot Z_A \cdot Z_B \cdot Y(I), \quad (1.22)$$

где

$$Y(I) = -0.5 \cdot \left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - 0.3 \cdot I \right), \quad (1.23)$$

где I – ионная сила, K – константа устойчивости АВ при $I = 0$, K_1 – константа устойчивости АВ при данной ионной силе, Z_A и Z_B – заряды соответствующих ионов.

Для учета полиэлектролитного эффекта предложен ряд моделей [Wit, 1996; Marinsky and Ephraim, 1986; Masini, 1993], однако все они весьма громоздки. Кроме того, они нередко рассматривают ГФК как отдельную фазу, поэтому получаемые константы несопоставимы с константами гомофазного комплексообразования. С другой стороны, если количество связанного металла составляет менее 5% от количества ионизованных групп (что, как правило, соблюдается при взаимодействии тяжелых металлов с гумусовыми кислотами в окружающей среде), вклад полиэлектролитного эффекта можно не учитывать [Takamutsu and Yoshida, 1978].

1.8.4 Методы исследования комплексообразования гумусовых кислот с тяжелыми металлами

В системе металл-ГФК современные аналитические методы позволяют напрямую определять либо концентрацию свободного иона $[M]$, либо концентрацию связанного металла $[ML]$, либо их отношение. Напрямую определять равновесные концентрации ГФК или МСЦ затруднительно по причинам, изложенным в разд. 1.3.2. Нередко концентрацию ГФК задают постоянной, проводя эксперименты в большом избытке ГФК.

Методы, которые наиболее часто использовались для определения констант устойчивости комплексов гумусовых кислот с металлами [Линник и Набиванец, 1986], перечислены ниже (табл. 1.13).

Главными проблемами многих методов первой группы являются возможный сдвиг равновесия в процессе отделения свободных форм от закомплексованных и потери за счет адсорбции на мембранах или материалах хроматографических колонок. В ультрацентрифугировании, ультрафильтрации и диализе также сложно добиться полноты разделения, т.к. никакие мембраны и ультрацентрифуги не могут полностью отделить ГФК [Weber, 1988]. Что касается метода ионного обмена, то при его использовании может наблюдаться сорбция ГФК и гуматов на катионите [Sarek, 1970].

Экспериментальные методы исследования комплексообразования
гумусовых кислот с тяжелыми металлами

Метод	Металл	Что изм.*	Достоинства	Недостатки	Литература
Эксклюзионная хроматография + ААС	любые	[ML]/[M]	низкий предел обнаружения	адсорбция на твердой фазе	Mantoura and Riley, 1975; Mantoura et. al., 1978
Ионный обмен + ААС	любые	[ML]/[M]	низкий предел обнаружения, экспрессность	адсорбция ГФК и гуматов на катионите	Berg and Kramer, 1979; Shubert et al., 1950; Schubert, 1952
Ультрафильтрация + ААС	любые	[M]	низкий предел обнаружения	адсорбция на мембране	Ephraim and Marinsky, 1990; Weber, 1988
Потенциометрия с ионселективными электродами	Ca, Cu, Cd, Pb	[M]	точность, экспрессность	требуется высокая концентрация металла; сорбция ГФК на электроде	Bresnahan et al., 1978; Guy and Chackrabarti, 1976; Yin et al., 1997
Полярография	Cu, Cd, Pb, Zn	[M]	высокая чувствительность	адсорбция ГФК на электроде	Weber, 1988; Pandeya, 1993
Растворимости + ААС	любые	[ML]/[M]	точность	трудность подбора твердой фазы	Махарадзе и др., 1982; Варшал и др., 1993

* [M], [ML] и [L] – равновесные концентрации свободного металла, комплекса и свободного лиганда, соответственно

** Включая обращенно-фазовую и гель-фильтрацию

*** Атомно-абсорбционная спектроскопия

Главным недостатком методов второй группы является ограниченная применимость. Некоторые из них также не свободны от проблем адсорбции: ГФК адсорбируются на ионселективных и ртутных электродах [Weber, 1988]. Итак, выбор метода для исследования комплексообразования ГФК с ионами ТМ, как и для исследования функционального состава, всегда является компромиссом между целями работы и ограничениями метода.

1.8.5 Комплексообразование гумусовых кислот с Hg(II)

Как и для других металлов, при взаимодействии ГФК с Hg²⁺ наблюдали адсорбцию Hg²⁺ на твердых ГФК (0.23 ммоль/г, [Savant and Pandey, 1995]), образование нерастворимых гуматов [Онуфриенок и Солодовникова, 1961; Pang and Zhao, 1983] и комплексообразование. Кроме того, в связи с рядом особенностей Hg(II), наряду с описанными для нее возможно протекание таких специфических процессов, как восстановление и метилирование. При этом, как показывают многочисленные исследования, абиотическое метилирование Hg(II) гумусовыми кислотами не играет принципиальной роли по сравнению с биотическим [Зырин и Обуховская, 1980]. Поэтому ниже

будут подробно рассмотрены только процессы комплексообразования и восстановления.

Количественные параметры процесса комплексообразования гумусовых кислот с Hg(II) приведены в (табл. 1.14).

Таблица 1.14

Константы устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II)
(литературные данные)

ГФК	pH	μ	Выражение [ГФК]	Метод	Стехиометрия	lgK	Источник
ГК морских отложений	5	?	ГФК твердые	Ионообменный	(1:n)	5.2 (β_2)	Strohal and Huljev, 1970
Морские ГФК Речные ГФК Озерные ГФК Торфяные ФК	8		моль/кг р-ра из $M_w = 4600 \div 32000$	Гель-фильтрации	(1:1)	18.1 19.3-19.7 18.4-20.1 18.3	Mantoura et al., 1978
ФК Москвы-реки	6.5	0.1	моль/л из $M_w(\text{ФК})=4100$	Растворимости HgO	1:1	11	Варшал и Буачидзе, 1983
Почвенные	4-6	0.1	МСЦ, 2.6 ммоль/г С	Потенциометрический	1:1	4.7 (средн.)	Yin et al, 1997
ГФК фирмы "Aldrich"	7	?	МСЦ, 1.9 ммоль/г ГФК	Сорбции на полиэтилене	1:1	13.7-15.0	Heiden and Aikens, 1983*

* Константа устойчивости рассчитана нами по данным о влиянии ГФК адсорбцию Hg(II) на полиэтилене в дистиллированной воде, приведенным в [Heiden, Aikens, 1983]. Содержание ртути-связывающих центров в ГФК фирмы "Aldrich" было определено на основе наших экспериментов (разд. 7.1.1). pH в системе, содержащей ГФК и Hg(II), авторы не определяли, поэтому ей был приписан pH дистиллированной воды. Считали, что на полиэтилене сорбируется Hg(OH)₂ и рассчитывали $[\text{HgPC}]/[\text{Hg(OH)}_2]$, где РСЦ – ртуть-связывающий центр (аналогично разд. 7.1.2). На основании данных по pH и С(РСЦ) рассчитывали константу устойчивости гумата ртути. Константа уменьшалась по мере увеличения соотношения ГФК:Hg(II), что могло быть обусловлено как неравноценностью центров связывания, так и закислением раствора за счет введения ГФК, сопровождающимся увеличением $[\text{Hg}^{2+}]/[\text{Hg(OH)}_2]$. Проведенные нами модельные расчеты показали, что за счет этого эффекта при снижении pH с 7 до 5.5, кажущаяся константа устойчивости гумата ртути должна была снизиться на 3 порядка.

Как видно из табл. 1.14, приводимые в литературе данные различаются на 15 порядков. Этот факт требует подробного анализа всех работ с тем, оценить адекватность полученных констант процессам комплексообразования гумусовых кислот с Hg(II).

В первую очередь обращают на себя внимание низкие значения констант в работах [Yin et al., 1997; Strohal and Huljev, 1970]. Авторы работы [Strohal and Huljev, 1970] проводили эксперименты с твердыми препаратами ГФК, что заставляет сомневаться в адекватности полученных значений констант

процессам, протекающим в растворах. Результаты работы [Yin et al., 1997], с нашей точки зрения, довольно противоречивы. Авторы определяли константы устойчивости гуматов ртути, исходя из измерений концентрации свободного иона Hg^{2+} . Однако при $\lg K(\text{HgPCЦ}) = 4.7$ ГФК практически не влияют на $[\text{Hg}^{2+}]$, поскольку в этих условиях ртуть будет преимущественно связана в гидроксокомплекс, и изменение ее концентрации в присутствии ГФК будет незначительным. На основании вышеизложенного, значения $\lg \beta_2(\text{HgГФК}) = 5.2$ и $\lg K(\text{HgPCЦ}) = 4.6$ следует рассматривать как не адекватные исследуемому процессу.

Анализ остальных работ не выявил факторов, которые могли бы существенно исказить значения констант устойчивости, приводимых авторами. Таким образом, можно с достаточной уверенностью говорить о том, что гумусовые кислоты образуют весьма устойчивые комплексы с Hg(II) , со значениями $\lg K(\text{HgPCЦ})$ не меньше, чем 10^{11} .

Вследствие большого окислительно-восстановительного потенциала пары $\text{Hg}^{2+}/\text{Hg}^0$ ($E^0 = 0.850$ В) ртуть способна легко восстанавливаться даже в присутствии слабых восстановителей. Наличие в ГФК гидрохинонных групп, а также других фрагментов, несущих неспаренные электроны, позволяет предположить возможность восстановления Hg(II) до элементарной под действием ГФК. С другой стороны, связывание Hg(II) в комплексные соединения с ГФК должно понижать потенциал восстановления ртути, и, как следствие, препятствовать восстановлению. Поэтому зависимость скорости восстановления Hg(II) от концентрации ГФК может иметь весьма сложный вид. Кроме того, процесс абиотического восстановления Hg(II) конкурирует с биотическим, причем последний доминирует в почвах и донных отложениях [Skogerboe and Wilson, 1981]. Таким образом, возможность абиотического восстановления Hg(II) ГФК труднопредсказуема, и зависит от различных факторов (концентрация ГФК и других лигандов, содержание кислорода, наличие света).

Так, в работе [Allard and Arsenie, 1991] показано наличие абиотического восстановления Hg(II) ГФК до элементарной, которое, однако, протекает очень медленно (при $2 \cdot 10^{-6}$ М ртути (II) и 10 мг/л ГФК в течение 50 ч восстанавливается не более 25% введенной ртути), причем хлориды подавляют этот процесс.

В отличие от предыдущей работы, данные [Skogerboe and Wilson, 1981; Matthiessen, 1996] указывают на очень быстрое (несколько десятков десятки секунд) восстановление Hg(II). Однако эти данные противоречат работам [Mantoura et al., 1978] и [Heiden and Aikens, 1983], в которых не наблюдалось потерь ртути из растворов с гумусовыми кислотами, причем в последней работе раствор, содержащий 50 мг/л ГФК выдерживался в течение 15 дней. Кроме того, представляется маловероятным, что окислительно-восстановительная реакция в очень разбавленных растворах с участием весьма слабого восстановителя способна полностью пройти за несколько десятков секунд.

Таким образом, несмотря на наличие данных о быстром восстановлении Hg(II) гумусовыми кислотами, протекание такого процесса представляется маловероятным, и его можно не учитывать при описании взаимодействия гумусовых кислот с Hg(II).

1.8.6 Исследование детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к тяжелым металлам методом биотестирования

Тот факт, что ГФК способствуют снижению токсичности и накопления большинства тяжелых металлов, подтверждается многочисленными исследованиями [Winner, 1984; Vymazal, 1984; Gjessing, 1981; Winner, 1985; Buchwalter et al., 1996]. Указанный эффект объясняется снижением равновесной концентрации свободных ионов металлов [Buchwalter et al., 1996; Pommeroy et al., 1985].

К сожалению, прямых исследований влияния ГФК на токсическое действие Hg(II) почти нет. Однако существует ряд полевых исследований, посвященных влиянию цветности воды (обусловленной, в первую очередь, содержанием ГФК) на бионакопление ртути. Данные по этому вопросу весьма противоречивы. Так, авторы [Mannio et al., 1986] утверждают, что существует прямая взаимосвязь между концентрацией ГФК и содержанием Hg(II) в рыбах [Степанова и Комов, 1996; Simonin et al., 1994]. С другой стороны, авторы [Nilsson and Hakanson, 1992] выявили наличие весьма умеренных корреляций между содержанием Hg(II) в рыбах и цветностью только для глубоких (средняя глубина >5 м) озер. Для мелких озер взаимосвязь практически отсутствовала. Однако из приведенных данных неясно, в какой мере содержание Hg(II) в рыбах коррелирует с ее концентрацией в воде, и не обусловлено ли влияние ГФК увеличением концентрации растворенных форм Hg(II). Таким образом, роль ГФК в процессах накопления Hg(II) в рыбах остается невыясненной.

Результаты лабораторных исследований, направленных на изучение влияния ГФК на токсичность и бионакопление Hg(II), говорят о снижении

обоих эффектов. Так, ГФК снижали токсичность Hg(II) по отношению к *Daphnia magna* [Oikari et al., 1992]. В экспериментах с рыбами было показано падение коэффициента биоаккумуляции ^{203}Hg в *Oryzias latipes* в 20 раз за счет введения 20 мг/л ГФК (0.5 мг/л Hg(II); 40 ч экспозиция) [Oh et al., 1986]. Сходные результаты получили авторы [Ramamoorthy and Blumhagen, 1984] для рыб *Salmo gairdneri*.

Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют о том, что гумусовые кислоты обладают детоксицирующими свойствами по отношению к Hg(II), однако это было показано на весьма ограниченном наборе тест-объектов. Кроме того, модно констатировать и отсутствие разработанных подходов к предсказанию детоксицирующих свойств гумусовых кислот на основании информации об их строении.

1.9 Связывающие и детоксицирующие свойства гумусовых кислот по отношению к органическим экотоксикантам

Гумусовые кислоты оказывают существенное влияние на формы существования органических экотоксикантов (ЭТ) в экосистемах. Связывание ЭТ гумусовыми кислотами равносильно процессу его выведения из свободно растворенного состояния. Это может приводить к изменению равновесия между взвешенной и растворенной формами ЭТ [Herbes, 1977; Landrum et al., 1994; Wilcke and Zech, 1997; Nam et al., 1998; Voice and Weber, 1983; Karickhoff et al., 1979; Suffet and MacCarthy, 1989], сопровождаться увеличением их растворимости в воде [Chiou et al., 1986; Chiou et al., 1987], уменьшением летучести [Swan and Eschenroeder, 1983] ускорением фотолиза [Guna et al., 1998; Wang et al., 1995]. и биодоступности [Suffet and MacCarthy, 1989, Guna et al., 1998]. В связи с изложенным, для расчета форм существования ЭТ в экосистемах и прогноза их опасности необходимо получение количественных характеристик их взаимодействия с гумусовыми кислотами.

1.9.1 Связывание органических экотоксикантов гумусовыми кислотами

Связывание органических экотоксикантов (ЭТ) гумусовыми кислотами можно упрощенно описать следующим уравнением реакции [Johnsen, 1987]:



Количественной характеристикой такого взаимодействия является константа связывания:

$$K = \frac{[\text{ЭТ-ГФК}]}{[\text{ЭТ}][\text{ГФК}]} \quad (1.25),$$

где [ЭТ-ГФК] – равновесная концентрация молекулярного аддукта ЭТ-ГФК; [ГФК] и [ЭТ] – равновесные концентрации свободнорастворенных ГФК и ЭТ, соответственно.

Ввиду стохастического характера гумусовых кислот, реакция (1.24) не отражает истинной стехиометрии их взаимодействия с ЭТ. Весьма вероятно, что одна макромолекула гумусовых кислот способна связывать несколько молекул ЭТ. Поэтому уравнение (1.24) описывает, скорее, взаимодействие одной молекулы ЭТ с одним реакционным центром гумусовых кислот.

В связи с тем, что количество реакционных центров, приходящееся на единицу массы гумусовых кислот неизвестно, то обычно для расчета константы связывания используют не молярную, а массовую концентрацию гумусовых кислот, выраженную в кг органического углерода (кг С) на л раствора. В этом случае процесс (1.24) можно рассматривать как сорбцию ЭТ гумусовыми кислотами. Такую константу обозначают с помощью подстрочного индекса ОС ($K_{\text{ОС}}$), при этом ее размерность – л/кг С, совпадает с размерностью константы сорбции [Khan, 1978; Gauthier et al., 1986]. Как правило, в природных средах общая концентрация гумусовых кислот ($C_{\text{ГФК}}$) намного больше концентрации ЭТ ($C_{\text{ЭТ}}$). Поэтому равновесную концентрацию гумусовых кислот можно принять равной общей: $[\text{ГФК}] \cong C_{\text{ГФК}}$. Тогда выражение для константы связывания преобразуется к следующему виду:

$$K_{\text{ОС}} = \frac{1 - \alpha}{\alpha} \times \frac{1}{C_{\text{ГФК}}} \quad (1.26)$$

где $K_{\text{ОС}}$ – константа связывания ЭТ гумусовыми кислотами в расчете на массовую концентрацию ГФК, выраженную в кг органического углерода (кг С) на л, $\alpha = [\text{ЭТ}]/C_{\text{ЭТ}}$ – доля свободного ЭТ.

Как видно из уравнения (1.26), для определения $K_{\text{ОС}}$ необходимо определить долю свободнорастворенного ЭТ в присутствии гумусовых кислот. Для этой цели в литературе описано применение следующих методов: гель-хроматографии [Suffet and MacCarthy, 1989; Hasset and Milicic, 1985], ультрафильтрации [Wang et al., 1990; Wang et al., 1991; Suffet and MacCarthy, 1989], тонкослойной хроматографии [Suffet and MacCarthy, 1989], обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) [Landrum et al., 1984; Morehead et al., 1986], равновесного диализа [Hesketh et al., 1996; Devitt and Weisner, 1998; McCarthy et al., 1989; McCarthy, 1985], жидкостной экстракции [Carlberg and Martinsen, 1982; Johnsen, 1987; Johnsen and Gribbestad, 1991]. В ряде случаев, когда концентрация гумусовых кислот достаточно высока (десятки граммов на литр

и больше), возможно разделение свободного и связанного ЭТ центрифугированием (применение данной методики описано для атразина) [Celis et al., 1997]. Для ПАУ возможно также использование методов тушения [Gauthier et al., 1986; Morra et al., 1990] и поляризации флуоресценции [Roemelt and Seitz, 1982]. Кроме того, применяют методы, основанные на регистрации изменения водной растворимости [Danielsen et al., 1995] и биоусвояемости [Landrum et al., 1985; Landrum et al., 1987] ПАУ в присутствии гумусовых кислот, а также изменении концентрации ПАУ в газовой фазе над раствором ПАУ-ГФК [Suffet and MacCarthy, 1989].

В табл. 1.15 и 1.16 приведены литературные значения констант связывания ПАУ и атразина – экотоксикантов, на примере которых проводилось исследование взаимодействия гумусовых кислот с органическими экотоксикантами в представленной работе, определенные с помощью различных методов.

Таблица 1.15

Константы связывания ПАУ гумусовыми кислотами, определенные различными методами

ГФК	lg K _{OC}	Метод определения K _{OC}	Источник
Антрацен			
ФК почв	4.21; 4.51	Тушение флуоресценции	Gauthier et al., 1986
ГК почв	4.57; 4.93; 4.81	"_"	"_"
ГК Aldrich	4.15; 3.95	ОФ-ВЭЖХ (SepPak)	Landrum et al., 1984
	4.46; 4.39	Диализ	"_"
	4.72	Тушение флуоресценции	Gauthier et al., 1986
	3.75	Твердофазная экстракция	Kopinke and Lebelt, 1997
Бенз(а)пирен			
ГК Aldrich	6.56	Диализ	Kukkonen and Oikari, 1991
	6.21	"_"	Paolis and Kukkonen, 1997
	5.23	ОФ-ВЭЖХ (SepPak)	Morehead et al., 1986
	5.95	"_"	Bakhus and Gschwend, 1990
	6.30	Тушение флуоресценции	Black and McCarthy, 1988
Нафталин			
ГК почв	4.45	Тушение флуоресценции	Morra et al., 1990
ФК почв	3.10	Диализ	Kukkonen and Pellinen, 1994
ГК Aldrich	3.5	Твердофазная экстракция	Kopinke and Lebelt, 1997

ГФК	lg K _{OC}	Метод определения K _{OC}	Источник
Пирен			
ФК почв	4.01	Увеличение растворимости	Danielsen et al., 1995
	4.51; 5.10	Тушение флуоресценции	Gauthier et al., 1986
ГК почв	4.81; 4.57; 5.23	"_"	"_"
	4.33	Увеличение растворимости	Danielsen et al., 1995
ГК Aldrich	5.01	Тушение флуоресценции	Gauthier et al., 1986
	4.6	Твердофазная экстракция	Traina et al., 1988
Фенантрен			
ФК почв	4.88	Тушение флуоресценции	Gauthier et al., 1986
ГК почв	4.70	"_"	"_"
ГК Aldrich	3.92	"_"	Landrum et al., 1984
	4.78	"_"	Gauthier et al., 1986
	3.92; 3.99	ОФ-ВЭЖХ (SepPak)	Bakhus and Gschwend, 1990
Флуорантен			
ГК почв	4.96	Тушение флуоресценции	Chen et al., 1994
ФК вод	4.59	Увеличение растворимости	Danielsen et al., 1995
	3.80; 3.90	Твердофазная экстракция	Traina et al., 1988

Таблица 1.16

Константы связывания (K_{OC}) атразина гумусовыми кислотами

ГФК	lgK _{OC}	Метод разделения	Источник
ГК+ФК почвы	1.61	центрифугирование	Grover and Hance, 1970
ГК+ФК седиментов	2.33	центрифугирование	Brown and Flagg, 1981
ФК почвы	1.40*	ультрафильтрация	Wang et al., 1990
ГК почвы	2.24	ультрафильтрация	Gamble and Khan, 1988
	2.11*	диализ	Clapp et al., 1997
	2.49	центрифугирование	Celis et. al., 1997
Fluka ГК	2.78	центрифугирование	"_"

* lgK_{OC} рассчитан автором диссертации на основании графического материала, представленного в работе.

Как видно из представленных результатов, величины lgK_{OC} для ПАУ варьируют в пределах от 3.10 до 6.56 и существенно различаются в зависимости от используемого метода определения. Для атразина значения lgK_{OC}, приводимые в литературе, составляют от 1.40 до 2.78, что свидетельствует о низком средстве гумусовых кислот к атразину. В связи с

тем, что литература по количественным аспектам взаимодействия гумусовых кислот с атразином весьма скудна, то в дальнейшем мы ограничимся обсуждением методологических проблем, возникающих при исследовании взаимодействий в системе ПАУ – ГФК.

1.9.2 Методические аспекты определения констант связывания органических экотоксикантов гумусовыми кислотами

Согласно приведенным данным (табл. 1.15), наиболее часто используемыми методами определения констант связывания ПАУ гумусовыми кислотами являются диализ, тушение флуоресценции и ОФ-ВЭЖХ, при этом метод тушения флуоресценции и диализ дают более высокие значения K_{OC} , тогда как константы связывания, полученные с помощью ОФ-ВЭЖХ имеют более низкие значения. Большинство из вышеперечисленных методов предполагает разделение свободной и связанной форм ПАУ как стадию, предшествующую определению, что может вносить существенные погрешности в получаемые значения K_{OC} .

Так, применение ОФ-ВЭЖХ позволяет разделить свободную и связанную с ГФК формы ПАУ с помощью адсорбции на колонке с обращенной фазой. Согласно [Landrum et al., 1984], свободный ПАУ полностью сорбируется, в то время как ПАУ, связанный с ГФК, проходит через колонку, не сорбируясь. Методы диализа и ультрафильтрации позволяют разделить свободную и связанную формы ПАУ с помощью мембран. Однако, согласно данным [Landrum et al., 1984; Kukkonen and Pellinen, 1994], эти методы неприменимы для высокогидрофобных ПАУ (с высокими значениями коэффициентов распределения октанол-вода) вследствие потенциальной сорбции на мембранах. Это может приводить к завышению значений определяемых K_{OC} [Suffet and MacCarthy, 1989].

Более предпочтительными для определения K_{OC} являются методы, позволяющие определять концентрацию свободного и связанного с гумусовыми кислотами ПАУ без их предварительного разделения. Использование подобных методов исключает появление артефактов, вызываемых смещением равновесия в системе ПАУ-ГФК.

Одним из наиболее широко применяющихся для этой цели методов является метод тушения флуоресценции, основанный на измерении уменьшения интенсивности флуоресценции флуорофора (ПАУ) в присутствии тушителя (ГФК). В случае статического тушения между флуорофором и тушителем в основном состоянии образуется комплекс, который не флуоресцирует.

Исследованию механизмов тушения ПАУ гумусовыми кислотами посвящен целый ряд работ [Morra et al., 1990; Danielsen et al., 1995, Chin and Gschwend, 1992; Chen et al., 1994; Kumke, 1994; Bakhus and Gschwend, 1990]. Ввиду сложности изучаемой системы их выводы зачастую противоречивы, но большинство авторов приходит к выводу о преобладании статического механизма гипотезе тушения ПАУ гумусовыми кислотами [Chen et al., 1994, Gauthier et al., 1986; Morra et al., 1990, Kumke, 1994]. Этими же исследователями было показано, что квантовый выход флуоресценции аддуктов ПАУ-ГФК практически равен нулю для широкого набора исследованных препаратов [Gauthier et al., 1986; Kumke, 1994; Shlautman and Morgan, 1993].

В связи с этим для количественной оценки константы связывания ПАУ гумусовыми кислотами с использованием метода тушения флуоресценции применяли уравнение Штерна-Фольмера [Gauthier et al., 1986];, которое представляет собой выражение для константы связывания (1.26) при условии, что α записывается в виде отношения флуоресценции раствора ПАУ в присутствии и отсутствие гумусовых кислот:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{oc} \times C_{ГФК} \quad (1.27)$$

где F_0 и F – интенсивности флуоресценции ПАУ в отсутствие и в присутствии ГФК, соответственно.

При исследовании кинетики взаимодействия антрацена, пирена и перилена с ГФК методом тушения флуоресценции, авторами [Shlautman and Morgan, 1993] было показано, что равновесие между ПАУ и ГФК устанавливается в течение 3-4 минут, что позволяет рассматривать данный метод как экспрессный.

Приведенные данные позволяют охарактеризовать метод тушения флуоресценции как наиболее перспективный для определения констант связывания ПАУ гумусовыми кислотами. На этом основании именно данным методом проводились все определения K_{oc} для ПАУ в представленной работе.

1.9.3 Исследование детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к органическим экотоксикантам

Изучение детоксицирующего влияния гумусовых кислот по отношению к органическим ЭТ представляет большой интерес как для получения прогностических оценок опасности ЭТ в присутствии гумусовых кислот, так и для поиска новых детоксицирующих агентов природного происхождения, использование которых не сопряжено с опасностью вторичного загрязнения. Наконец, сопоставление связывающих и детоксицирующих свойств гумусовых кислот позволило бы вплотную подойти к исследованию

механизма детоксикации экотоксикантов гумусовыми кислотами, под которым в настоящее время понимают главным образом переход ЭТ в нетоксичную форму при его связывании с гумусовыми кислотами.

Способность гумусовых кислот нивелировать отрицательное действие целого ряда органических ЭТ, включая ПАУ и пестициды различных классов, показана многими авторами [Bender et al., 1970; Gachrer et al., 1978; Fisher and Frood, 1980; Luoma, 1983; Landrum et al., 1985; McCarthy and Jimenez, 1985; Pommeroy et al., 1985; Winner, 1985]. Так, в настоящее время установлено, что взаимодействие ГФК с ПАУ является одним из основных факторов, влияющих на биоаккумуляцию ПАУ водными организмами. О снижении накопления ПАУ амфиподами, рыбами, дафниями в присутствии гумусовых кислот различного происхождения и РОВ сообщается в работах [Landrum et al., 1985; Landrum et al., 1987; Leverssee, 1983; McCarthy, 1983; McCarthy, 1985; Grainer et al., 1999; Kukkonen and Oikari, 1997; Maruya, 1997]. Авторы [Weinstein and Oris, 1999] сообщают об уменьшении коэффициента биоаккумуляции BCF (отношение равновесных концентраций ПАУ в тканях гидробионтов и в водной среде) флуорантена рыбами от 33 до 70% в присутствии различных концентраций РОВ (0.5-5.0 мг С/л). На рис. 1.10 показана типичная зависимость снижения BCF в присутствии ГФК для различных ПАУ.

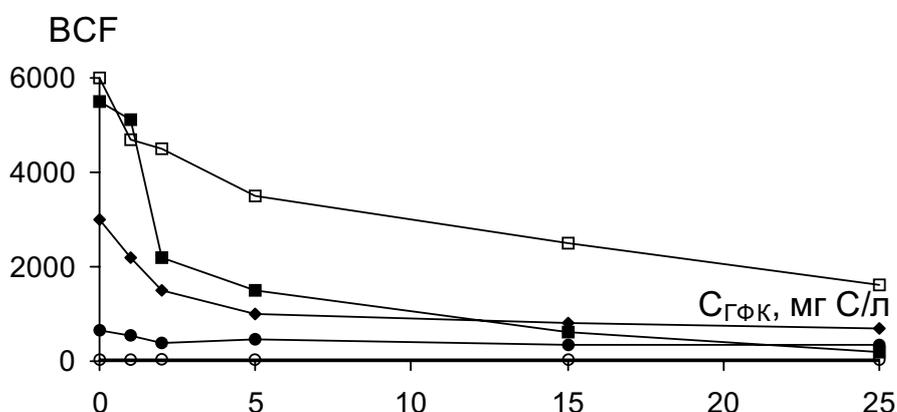


Рис. 1.10. Коэффициенты биоаккумуляции некоторых ПАУ в присутствии ГК Aldrich (тест-объект – дафнии): ■ – бенз(а)пирен, ◆ – бензантрацен, ● – антрацен, ● – нафталин; □ – бенз(а)пирен в присутствии РОВ торфяных болот. По данным [McCarthy, 1985].

Как видно из рис. 1.10, BCF уменьшается по мере увеличения концентрации ГФК. При этом степень воздействия ГФК на накопление ПАУ тем выше, чем больше гидрофобность исследуемого ПАУ. Для наименее гидрофобных нафталина и антрацена не наблюдается изменения BCF в

присутствии ГК Aldrich во всем диапазоне концентраций ГК. Обращает на себя внимание тот факт, что присутствие ГК Aldrich вызывает в три раза большее уменьшение BCF бенз(а)пирена по сравнению с РОВ болотных вод. Авторы [Landrum et al., 1987; McCarthy, 1985] также отмечали снижение аккумуляции нафталина дафниями всего на 2-6% в присутствии 15, 30 и 60 мг С/л ГК Aldrich, тогда как для бенз(а)пирена эффект составлял 97% при 20 мг С/л ГК.

Показано и детоксицирующее действие гумусовых кислот по отношению к ПАУ. Так, авторы работы [Oris et al., 1990] отмечали уменьшение токсичности антрацена для дафний и некоторых видов рыб в присутствии различных концентраций ГФК. При этом эффект проявлялся даже при таких низких концентрациях ГФК как 0.1-3 мг С/л. Уменьшение LT_{50} с увеличением содержания ГК Aldrich от 0.5 до 5 мг С/л было отмечено в работе [Weinstein and Oris, 1999] при исследовании влияния данных ГК на токсичность флуорантена для рыб в диапазоне концентраций данного ПАУ от 4.8 до 34 мкг/л.

Детоксицирующее действие гумусовых кислот по отношению к атразину (гербицид класса симм-триазинов, специфический ингибитор фотосинтеза) также является достоверно установленным. При этом исследования проводили не только в водных средах [Genevini et al., 1994], но и непосредственно на почве [Кулик и Гороя, 1980; Приходько и др., 1980; Булгакова и Приходько, 1983]. В работе [Приходько и др., 1980] исследовали также возможность применения гуминовых и минеральных удобрений для снижения токсического действия и последствий атразина в почве по отношению к культурам овса, ячменя и кукурузы. Результаты проведенных экспериментов показали эффективность предлагаемых авторами способов очистки почвы (табл. 1.17).

Как видно из табл. 1.17, внесение гумофоса оказалось более эффективным, чем минеральных удобрений. Высота и сухой вес надземной биомассы растений овса при его внесении превысили как показатели варианта с внесением атразина, так и контрольные. Авторы отмечают, что даже в случаях, когда внесение гуминовых удобрений не изменяло величину урожая (ячмень), поступление остаточных количеств гербицида в растения было значительно ниже, чем в вариантах без удобрений. Например, в варианте с гумофосом в листьях ячменя было обнаружено 595 мкг/кг остаточного количества атразина, а в варианте без удобрений – 3533 мкг/кг сухого вещества.

Влияние гумофоса* и его минерального эквивалента на рост овса
[Приходько и др., 1980]

Варианты опыта	Высота растений, см	Сухой вес, г на сосуд	
		надземной массы	корней
Почва (контроль)	26.3	0.212	0.142
Почва+атразин	20.7	0.049	0.013
Почва+атразин+гумофос 20 т/га	27.4	0.228	0.100
Почва+атразин+минеральный эквивалент к 20 т/га гумофоса	25.9	0.215	0.089

* удобрение, представляющее собой смесь гумата Na с минеральными добавками.

Таким образом, детоксицирующая способность гумусовых кислот по отношению как к ПАУ, так и атразину, достоверно установлена. В качестве непосредственной причины наблюдаемого снижения эффективности действия ЭТ в присутствии гумусовых кислот большинством авторов высказывается гипотеза о связывании токсикантов гумусовыми кислотами [Khan, 1978; Giesy et al., 1983; Vymazal, 1984; Landrum et al., 1985; McCarthy and Jimenez, 1985; Линник и Набиванец, 1986; Oris et al., 1990]. В настоящее время положение о недоступности комплекса ЭТ-ГФК для живых организмов общепринято, что связывают с невозможностью проникновения в живые организмы агрегатов столь большого размера. Это подтверждается работами по снижению биоаккумуляции ПАУ водными организмами в присутствии гумусовых кислот [McCarthy and Bartell, 1988; Servos et al., 1989; Landrum et al., 1985]., где авторами была продемонстрирована прямая взаимосвязь между связывающими свойствами гумусовых кислот по отношению к исследованным ПАУ и их детоксицирующей способностью.

Однако существует целый ряд работ, авторами которых показано, что гумусовые кислоты, по крайней мере их фракция с ММ меньше 500 Да, могут проникать через биологические мембраны [Логинов и Комиссаров, 1971; Dell'Agola and Nardi, 1986]. Это свидетельствует о возможности поступления связанного с гумусовыми кислотами токсиканта в организмы. Так, в [Соколов и Галиулин, 1987] показано, что образование комплекса пестицид-гумус приводит к увеличению персистентности и сохранению токсических свойств препарата. В работе Стюарта [Stewart, 1984] приводятся данные об увеличении токсичности о-крезола, 2,4-динитрофенола и 2,3,6-

тринитрофенола в присутствии низкомолекулярных водорастворимых гумусовых кислот.

Открытым остается вопрос о природе детоксицирующего действия гумусовых кислот в тех случаях, когда значительного взаимодействия гумусовых кислот с токсикантом (например, атразином) не происходит. Христовой [Христева, 1973] была высказана гипотеза, что “физиологически активные гуминовые кислоты повышают сопротивляемость растений не к каким-то определенным факторам внешней среды, а поднимают их общую резистентность. Или другими словами – физиологически активные ГВ повышают общую неспецифическую сопротивляемость организма”. Основой такого представления послужили экспериментальные данные о том, что стимулирующее действие ГВ на жизнедеятельность растений эффективнее проявляется в экстремальных условиях. В дальнейшем были опубликованы многочисленные работы, подтверждающие эту гипотезу [Христева и др., 1974; Христева, 1977; Ткаченко и др., 1977].

Таким образом, процесс детоксикации ЭТ гумусовыми кислотами может быть обусловлен, по крайней мере, двумя причинами: непосредственным связыванием ЭТ и повышением общей сопротивляемости организмов в присутствии ГФК. Для установления и доказательства механизма детоксикации необходимо проведение комплексных исследований, включающих оценку как детоксицирующих, так и связывающих свойств по отношению к выбранному ЭТ, а также их сопоставление. К сожалению, в настоящее время согласно предложенной схеме были проведены только единичные исследования [McCarthy and Bartell, 1988; Servos et al., 1989; Landrum et al., 1985]. При этом для корректного сопоставления получаемых оценок детоксицирующих и связывающих свойств ГФК необходима также разработка подхода численного описания процесса детоксикации с целью получения количественных характеристик, аналогичных константам связывания.

Таким образом, рассмотрение существующих подходов к исследованию строения и свойств гумусовых кислот, и способов представления получаемых результатов позволило выявить отсутствие единой методологии анализа и численного описания строения и свойств гумусовых кислот, которое позволило бы решать задачи классификации и прогнозирования свойств данного класса соединений. Кроме того, сформулирован целый ряд нерешенных проблем методического плана.

В связи с изложенным, в представленной работе в качестве подхода, адекватного стохастической природе объекта, предложено **численное описание структуры гумусовых кислот с помощью комплекса**

интегральных дескрипторов состава, характеризующего три иерархических уровня структурной организации органических соединений: элементный, структурно-групповой и молекулярно-массовый. Под интегральными дескрипторами понимали: для элементного состава – процентное содержание (от 100 % органического вещества) основных элементов – С, Н, N, О, S и их атомные соотношения, для структурно-группового состава – процентное содержание С и Н (в процентах от общего содержания С и Н в веществе) в составе основных структурных групп, для молекулярно-массового состава – средние молекулярные массы и их отношения (полидисперсности).

Использование **интегральных дескрипторов состава** для описания бесконечного разнообразия парциальных структур молекулярного ансамбля гумусовых кислот имело своей целью обеспечить **фундаментальность** (общность) характеризуемого признака и **воспроизводимость** соответствующего параметра, а использование их комплекса – повысить уровень **специфичности** описания структуры в терминах состава. Расчету указанных дескрипторов предшествовал этап оптимизации соответствующих экспериментальных методик анализа гумусовых кислот, верификации полученных данных с использованием независимых методов и свертка информации. Комплекс полученных интегральных дескрипторов состава использовали затем для решения задач классификации и прогноза связывающих и детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к различным экотоксикантам.

Глава 2. ФОРМИРОВАНИЕ ВЫБОРОК ПРЕПАРАТОВ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ

Принцип формирования рабочих выборок препаратов гумусовых кислот был ориентирован на выявление возможных корреляций между строением и свойствами гумусовых кислот. Поэтому при создании каждой выборки стремились к максимальному разнообразию строения и свойств гумусовых кислот за счет включения препаратов различного происхождения (уголь, торф, почва, природные воды) и фракционного состава (нефракционированная смесь гуминовых и фульвокислот – ГФК, фракции гуминовых кислот – ГК и фульвокислот – ФК). Принимая во внимание стохастический характер объекта, нижний предел размера выборки устанавливали на уровне 20 препаратов. При этом для повышения прогностической способности получаемых корреляционных соотношений в каждую группу гумусовых кислот определенного типа (сходный источник происхождения и/или фракционный состав) включали, по возможности, не меньше шести препаратов.

Всего в работе для исследования было использовано около ста препаратов гумусовых кислот, выделенных из всех основных источников их происхождения – торфов, почв, природных вод и углей. При этом выделение гумусовых кислот из всех источников, за исключением угля, было проведено студентами, аспирантами и сотрудниками рабочей группы согласно стандартным методикам, краткое описание которых приводится далее.

2.1 Выделение препаратов гумусовых кислот из природных объектов

Гумусовые кислоты торфа. Препараты торфяных гумусовых кислот выделяли щелочной экстракцией из торфа согласно [Lowe, 1992]. С целью сохранения водорастворимой фракции ГФК была опущена начальная стадия обработки торфа горячей водой. Согласно выбранной методике измельченный торф несколько раз обрабатывали смесью бензол-этанол (1:1) в соотношении торф:экстрагент 1:3. Обработку проводили до тех пор, пока экстрагируемый раствор не становился почти бесцветным. После экстракции торф высушивали при температуре 40-60°C в течение ~8 часов до исчезновения запаха бензола. Затем торф заливали раствором 0.1 М NaOH в соотношении 1:3 и оставляли на ночь. Щелочной раствор сливали и отфильтровывали, экстракцию повторяли несколько раз до тех пор пока экстракт не становился слабо окрашенным. Порции щелочного экстракта объединяли и обессоливали пропусканием через катионит КУ-23 в Н-форме (рН полученных таким образом растворов составлял 2.95-3.4). Для разделения полученного водного

концентрата на ГК и ФК его подкисляли с помощью HCl до pH 2 и оставляли на ночь. Затем декантированием отделяли раствор ФК от осадка ГК. Осадок ГК растворяли в 0.1 М КОН и добавляли твердый KCl из расчета получить суммарную концентрацию 0.3 М [K⁺]. Полученный раствор фильтровали и снова подкисляли до pH 2, отделяли осадок ГК центрифугированием и очищали при помощи электродиализа, используя целлофановые мембраны. Фракцию ФК сорбировали на смоле Амберлит XAD-2, промывали дистиллированной водой до отрицательной реакции выходящего с колонки элюата на ионы Cl⁻, а затем элюировали ФК 0.1 М раствором NaOH. Полученный щелочной экстракт обессоливали пропусканием через катионит КУ-2-8 в Н-форме.

РОВ торфа. Тщательно перетертый воздушно-сухой торф, просеянный через сито 2-мм, заливали дистиллированной водой (1:30; масс.) и оставляли на ночь. Затем вытяжку отфильтровывали через фильтр "синяя лента". Процедуру обработки навески торфа дистиллированной водой повторяли дважды. Отфильтрованные вытяжки объединяли и обессоливали на катионообменнике КУ-23, предварительно переведенном в Н-форму пропусканием 30-ти объемов 1 М HCl. Обессоленный экстракт концентрировали на роторном испарителе при 600°C.

Гумусовые кислоты почв. Из почвенного образца отбирали крупные корни, затем почву растирали и пропускали через сито с диаметром отверстий 1 мм. Экстракцию гумусовых кислот, включающую предварительное декальцирование почвы, проводили согласно [Орлов и Гришина, 1981]. Для декальцирования навеску почвы заливали 0.05 М H₂SO₄ или 2.7 М HCl (в случае карбонатных почв, т.е. черноземов) в отношении почва:раствор 1:5. После отстаивания суспензии раствор сливали и операцию повторяли, пока качественная проба на кальций не обнаруживала только следы последнего в растворе. После декальцирования почву промывали 1-2 раза дистиллированной водой и приливали 0.1 М раствор NaOH в соотношении почва:раствор 1:6. Щелочной раствор гумусовых кислот сливали и отфильтровывали; экстракцию повторяли до заметного осветления щелочного экстракта. В полученный раствор гумусовых кислот почвы добавляли NaCl для коагулирования минеральных примесей. После отстаивания раствор центрифугировали для отделения минеральных коллоидов. Для выделения препаратов ГФК почвы проводили обессоливание полученного супернатанта на катионообменнике КУ-23, предварительно переведенном в Н-форму. Для осаждения гуминовых кислот к супернатанту при осторожном перемешивании добавляли 1 М H₂SO₄ из расчета 20-25 мл на литр экстракта до появления первых признаков коагуляции (значение pH устанавливалось в пределах 1-2). После отстаивания осадка ГК надосадочную жидкость,

содержащую ФК, сливали, а рыхлый осадок ГК центрифугировали для полного отделения от надосадочной жидкости. Обессоливание препаратов ГК проводили методом электродиализа до отсутствия положительной реакции на Cl^- и SO_4^{2-} во внешнем растворе. Выделение ФК из полученного после отделения ГК кислого раствора проводили аналогично ФК торфа, описанному выше.

Гумусовые кислоты почвенного раствора. Выделение данной группы препаратов гумусовых кислот проводили по оригинальной методике, разработанной в нашей рабочей группе и основанной на классических методах получения почвенного РОВ [Когут, 1996] и выделения препаратов ГФК из природных вод [Mantoura and Riley, 1975]. Навеску воздушно-сухой почвы, просеянной через сито с размером ячеек 1 мм, заливали дистиллированной водой в соотношении почва:вода 1:2, тщательно взбалтывали и оставляли на ночь. Полученную водную вытяжку отфильтровывали через бумажный фильтр “синяя лента” и мембранный фильтр с диаметром пор 0.45 мкм для отделения истинно растворенного органического вещества от коллоидного. Отфильтрованные вытяжки подкисляли до pH 1-2 с помощью 0.1 М HCl и пропускали через стеклянную колонку, заполненную смолой XAD-2, для осаждения ГФК. Процедуры элюирования препарата ГФК почвенного раствора с колонки и последующего обессоливания были аналогичны описанным для выделения ФК торфов и почв.

Гумусовые кислоты природных вод. Препараты водных ГФК выделяли согласно методике [Mantoura and Riley, 1975]. Природную воду фильтровали через сложенную в несколько слоев стеклоткань (предварительно тщательно промытую метанолом) или пропускали через фильтр 0.45 мкм и подкисляли до pH 2 конц. HCl. После этого раствор пропускали через колонку, заполненную макроситовой смолой Amberlite XAD-2 или XAD-8 до насыщенно-желтого окрашивания смолы (в отдельных случаях использовали ДЭАЭ-целлюлозу согласно [Першина и др., 1989]). Затем колонку промывали дистиллированной водой до отрицательной реакции на ионы Cl^- . ГФК десорбировали с колонки 0.1 М NaOH до обесцвечивания элюата. Щелочной концентрат ГФК природных вод обессоливали аналогично препаратам ГФК торфа и почв.

Выделение всех препаратов в твердом виде осуществляли выпариванием (препараты 1994 г.) или методом лиофильной сушки. Лيوфильную сушку проводили на установке Института фундаментальных проблем биологии (г. Пущино), любезно предоставляемой нам в течение многих лет проф. А.А. Поздновским. Твердые препараты ГФК использовали для элементного анализа и ЯМР-спектроскопии; для проведения гель-хроматографического

анализа, титрования и токсикологических экспериментов – обессоленные растворы, точный титр которых определяли упариванием аликвотной части раствора и высушиванием над P_2O_5 до постоянного веса.

2.2 Описание использованных в работе препаратов

Шифры всех выделенных препаратов приведены в табл. 2.2. В основу названия препаратов был положен источник их происхождения (торф, уголь, почва, поверхностные воды, донные отложения) и фракционный состав. Под фракциями понимали ГК и ФК. Сумму ГК и ФК обозначали ГФК, а нефракционированное растворенное органическое вещество природных вод и почвенного раствора – РОВ. Во избежание разночтений при публикации результатов в русско- и англоязычной литературе, для составления шифров использовали латинские аббревиатуры. **Шифр** состоит из **классификационной части**, которая включает в себя обозначение **источника происхождения** и **фракционного состава** препарата, и **специальной части**, состоящей из обозначения **конкретного источника** и (в большинстве случаев) **года выделения препарата**. Классификационная часть отделяется от специальной части дефисом. Схема образования классификационной части шифра:

- **первая буква** (*A, B, C, P, S*) обозначает **источник происхождения** (*aqua/вода, bottom sediments/донные отложения, coal/уголь, peat/торф, soil/почва*, соответственно);
- **две (три) последующие буквы** (*DOM, FA, HA, HF*) обозначают **фракционный состав** (*dissolved organic matter/РОВ, fulvic acids/ФК, humic acids/ГК, sum of humic and fulvic acids/ГФК*, соответственно).

Например, шифр *PHF-T198* означает, что это препарат ГФК, выделенный из торфа **T1** в **1998** г., *SHA-Pw96* – препарат ГК почв, выделенный из дерново-подзолистой почвы (*Podzol*), участок под лесом (*woods*) в **1996** г., *ADOM-SwMu4* – препарат нефракционированного РОВ болота (*Swamp* – болото), расположенного на острове Мудьюг (**Mudyug**), станция отбора **4**.

В состав природных объектов, из которых осуществлялось выделение препаратов гумусовых кислот, вошли верховые и низинные торфа различного геоботанического состава (группы моховая, травяная, древесная, древесно-травяная), почвы различной зональности (дерново-подзолистые, серые лесные и черноземы) и вида использования (лесные, пахотные и огородные участки), поверхностные воды (болота и реки). Помимо выделенных в нашей группе, в работе было использовано 6 препаратов ГК угля, 3 из которых были предоставлены доц. Пономаренко (КазГУ, Казахстан) и 3 коммерческих препарата ГК угля. В работе использовался также 1 коммерческий препарат

ГК торфа (РНА-НТО), водные препараты – ГК и ФК болотных вод, ГК грунтовых вод и ФК почвенного раствора были любезно предоставлены Др. G. Abbt-Braun (кафедра водной химии, Университет Карлсруэ, ФРГ).

Краткая сводка препаратов, использованных в работе, приведена в табл. 2.1, их полное перечисление и наименование источников дано в табл. 2.2.

Таблица 2.1

Источники происхождения и количество использованных
препаратов гумусовых кислот

Источник происхождения	Фракционный состав					ВСЕГО
	ГФК (HF)	ГК (HA)	ФК (FA)	РОВ (DOM)	РГФК (DHF)	
Торфа (P)						
верховые	11	4	3	1	–	19
низинные	5	3	4	1	–	13
другое	2	–	–	–	–	2
Почвы (S)						
дерново-подзолистые	9	8	3	–	3	23
серые лесные	3	3	–	–	–	6
черноземы	3	6	5	–	–	13
другое	1	1	1	–	1	4
Угли (C)	6	–	–	–	–	6
Природные воды (A)	11	1	2	2	–	16
Донные отложения (B)	3	–	–	–	–	3
ВСЕГО	54	26	18	4	4	106

Таблица 2.2.

Шифры и описание использованных в работе препаратов
гумусовых кислот

Препарат	Описание	Год выделения
ГФК торфа (PHF)		
Верховые торфа		
PHF-T1H94	Сфагновый торф (Тверская обл.)	1994
PHF-T4H94	Сфагновый торф (Тверская обл.)	1994
PHF-T4H98	Сфагновый торф (Тверская обл.)	1998
PHF-T5H94	Сфагновый торф (Тверская обл.)	1994
PHF-T5H98	Сфагновый торф (Тверская обл.)	1998

Препарат	Описание	Год выделения
RHF-T6H94	Пушицево-сфагновый торф (Тверская обл.)	1994
RHF-T6H98	Пушицево-сфагновый торф (Тверская обл.)	1998
RHF-T7L94	Пушицевый торф (Тверская обл.)	1994
RHF-T7L98	Пушицевый торф (Тверская обл.)	1998
RHF-TНH94	Сосново-пушицевый торф (Тверская обл.)	1994
RHF-TНMи4	Сфагновый торф (о. Мудьюг, Архангельская обл.)	1994
Низинные торфа		
RHF-T3L98	Осоковый торф (Твеская обл.)	1998
RHF-T10L94	Осоково-гипновый торф (Тверская обл.)	1994
RHF-T10L98	Осоково-гипновый торф (Тверская обл.)	1998
RHF-TTL94	Тростниково-осоковый торф (Тверская обл.)	1994
RHF-TTL98	Тростниково-осоковый торф (Тверская обл.)	1998
ГК торфа (РНА)		
Верховые торфа		
RНА-T4H98	Сфагновый торф (Тверская обл.)	1998
RНА-T5H98	Сфагновый торф (Тверская обл.)	1998
RНА-T6H98	Пушицево-сфагновый торф (Тверская обл.)	1998
RНА-T7H98	Пушицевый торф (Тверская обл.)	1998
Низинные торфа		
RНА-T3L98	Осоковый торф (Тверская обл.)	1998
RНА-T10L98	Осоково-гипновый торф (Тверская обл.)	1998
RНА-TTL98	Тростниково-осоковый торф (Тверская обл.)	1998
Другое		
RНА-TНТО	ГК торфа, коммерческий препарат НПО Биолар	
RНА-TН8	ГК торфа UFZ (ФРГ)	
ФК торфа (peat FA => PFA)		
Верховые торфа		
PFA-T4H98	Сфагновый торф (Тверская обл.)	1998
PFA-T5H98	Сфагновый торф (Тверская обл.) “–“	1998
PFA-T6H98	Пушицево-сфагновый торфа (Тверская обл.)	1998
PFA-T7H98	Пушицевый торф (Тверская обл.)	1998
Низинные торфа		
PFA-T3L98	Осоковый торф (Тверская обл.)	1998
PFA-T10L94	Осоково-гипновый торф (Тверская обл.)	1998
PFA-TTL98	Тростниково-осоковый торф (Тверская обл.)	1998

Препарат	Описание	Год выделения
РОВ торфа (peat dissolved organic matter => PDOM)		
PDOM-TНН	Верх. сосново-пушицевый торф (Тверская обл.)	1994
PDOM-TTL	Низ. тростниково-осоковый торф (Тверская обл.)	1994
ГФК почв (soil HF => SHF)		
SHF-Co94	Чернозем обыкновенный (Ставропольский кр.)	1994
SHF-Cm98	Чернозем луговой (Ставропольский кр.)	1998
SHF-PMu9	Лугово-глеевая почва (о. Мудьюг, Архангельская обл.)	
SHF-TMu12	Торфяная почва (о. Мудьюг, Архангельская обл.)	
ГК почв (soil HA => SHA)		
Дерново-подзолистые почвы		
SHA-Pw94	Целинная (Московский обл.)	1994
SHA-Pw96	Целинная (Московский обл.)	1996
SHA-Pw98	Целинная (Московский обл.)	1998
SHA-PwN	Целинная (Новгородская обл.)	
SHA-Pp94	Окультуренная (Московская обл.)	1994
SHA-Pp96	Окультуренная (Московская обл.)	1996
SHA-Pg94	Культурная (Московская обл.)	1994
SHA-Pg96	Культурная (Московская обл.)	1996
SHA-Pg98	Культурная (Московская обл.)	1998
Серые лесные почвы		
SHA-Gw94	Целинная (Тульская обл.)	1994
SHA-Gp94	Окультуренная (Тульская обл.)	1994
Черноземы		
SHA-Cm94	Чернозем луговой (Воронежская обл.)	1994
SHA-Cm98	Чернозем луговой (Воронежская обл.)	1998
SHA-CtV94	Чернозем типичный (Воронежская обл.)	1994
ФК почв (soil FA => SFA)		
Дерново-подзолистые почвы		
SFA-Pw94	Целинная (Московская обл.)	1994
SFA-Pw96	Целинная (Московская обл.)	1996
SFA-Pw98	Целинная (Московская обл.)	1998
SFA-Pp94	Культурная (Московская обл.)	1994
SFA-Pp96	Культурная (Московская обл.)	1996
SFA-Pg94	Окультуренная (Московская обл.)	1994
SFA-Pg96	Окультуренная (Московская обл.)	1996
SFA-Pg98	Окультуренная (Московская обл.)	1998

Препарат	Описание	Год выделения
Серые лесные почвы		
SFA-Gw94	Целинная (Тульская обл.)	1994
SFA-Gp94	Культурная (Тульская обл.)	1994
Черноземы		
SFA-Cm94	Чернозем луговой (Воронежская обл.)	1994
SFA-CtV94	Чернозем типичный (Воронежская обл.)	1994
ГФК почвенного раствора (soil dissolved HF => SDHF)		
Дерново-подзолистые почвы		
SDHF-Pw96	Целинная (Московская обл.)	1996
SDHF-Pp96	Культурная (Московская обл.)	1996
SDHF-Pg96	Окультуренная (Московская обл.)	1996
ГК углей (coal HA => CHA)		
CHA-K1	Карагандинская обл.	
CHA-K2	Джезказганская обл.	
CHA-K3	Павлодарская обл.	
CHA-AGK	Коммерческий препарат АО Спецбиотех (Россия)	
CHA-ALD	Коммерческий препарат Aldrich (ФРГ)	
CHA-RO	Коммерческий препарат (ФРГ) UFZ	
ГФК природных вод (aquatic HF=> AHF)		
AHF- RMX8	р. Москва (XAD-8) (Московская обл.)	1995
AHF- RMX2	р. Москва (XAD-2) (Московская обл.)	1995
AHF-RMX	р. Москва (XAD-2/8) (Московская обл.)	1997
AHF-RMC	р. Москва (DEAE-целлюлоза) (Московская обл.)	1996
AHF- RI	р. Истра (XAD-8) (Московская обл.)	1997
AHF- RND3	р. Сев. Двина (XAD-2) (Архангельская обл.)	1995
AHF-RND11	р. Сев. Двина (XAD-2) (Архангельская обл.)	1995
AHF-RND14	р. Сев. Двина (XAD-2) (Архангельская обл.)	1995
AHF-MMu7	Белое море (XAD-2) (о. Мудьюг, Архангельская обл.)	1995
AHF-MMu8	Белое море (XAD-2) (о. Мудьюг, Архангельская обл.)	1995
AHF-SSh1	Болотные воды (XAD-2) (Московская обл.)	1994
ГК природных вод (aquatic HA => АНА)		
АНА-SHo13	Болотные воды (XAD-8) (оз. Hohlosee, ФРГ), EBI	
ФК природных вод (aquatic FA => АФА)		
АФА-SHo10	Болотные воды (XAD-8) (оз. Hohlosee, ФРГ), EBI	
АФА-GFg1	Грунтовые воды (XAD-8) (Fuhrberg, ФРГ), EBI	

Препарат	Описание	Год выделения
РОВ природных вод (aquatic DOM => ADOM)		
ADOM-SMu4	Болотные воды (о. Мудьюг, Архангельская обл.)	1995
ADOM-SMu8	Болотные воды (о. Мудьюг, Архангельская обл.)	1995
ГФК донных отложений (bottom sediments HF => BHF)		
BHF-SMu2	Озеро на о. Мудьюг (Архангельская обл.)	1995
BHF-RND13	Эстуарий Сев. Двина (Архангельская обл.)	1995
BHF-RLuh	р. Лух (Владимирская обл.)	1995

Глава 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ

3.1 Определение элементного состава препаратов гумусовых кислот в расчете на беззольную безводную пробу

Принимая во внимание изложенные в обзоре литературы методические проблемы элементного анализа гумусовых кислот, связанные с отсутствием адекватных образцов сравнения и наличием неорганической части в составе выделяемых препаратов, в нашей работе было проведено специальное межлабораторное исследование для оценки воспроизводимости данных прямого определения элементов (CHN). Для этой цели тринадцать выделенных препаратов с различным содержанием зольных элементов были проанализированы в трех независимых лабораториях – кафедры органической химии Химического факультета МГУ, аналитического отдела Института высокомолекулярных соединений РАН (ИВС) и кафедры водной химии Технического университета Карлсруэ (ТУК, ФРГ)*.

Для пересчета получаемых данных на беззольную безводную пробу было проведено определение равновесной влажности препаратов и содержания в них минеральных компонентов (зольности). Правильность результатов определения зольности контролировали, сопоставляя экспериментально определенную общую зольность с рассчитанной из данных ИСП-АЭС по компонентному составу минеральной части гумусовых кислот.

Полученные результаты были использованы для разработки схемы обработки данных элементного анализа гумусовых кислот, позволяющей определять элементный состав в расчете на беззольную безводную пробу гумусовых кислот. Несмотря на кажущуюся тривиальность данной задачи, подобная экспериментально обоснованная схема предложена нами впервые. При ее разработке принимали во внимание две наиболее употребимые схемы анализа гумусовых кислот. Одна из них включает определение кислорода по разности массы беззольной, безводной пробы и суммы CHNS, а другая – его прямое определение. Оба варианта предложенной схемы обработки данных были в дальнейшем использованы для расчета элементного состава использованных в работе препаратов. Правильность всех прямых

* Все анализы в Техническом университете Карлсруэ были выполнены автором данной работы.

определений оценивали по близости получаемой для каждого препарата суммы (СНН, S, O, зола, гигроскопическая вода) к 100 %.

3.1.1 Определение СНН, S и O

Определение СНН во всех использованных в работе препаратах гумусовых кислот проводили методом автоматического полумикроанализа. 13 препаратов гумусовых кислот было проанализировано на трех анализаторах – Carlo Erba-Strumentazione (МГУ), Vario EL (ИВС), Heraeus-Rapid-O (ТУК). В качестве образца сравнения во всех лабораториях использовали ацетанилид. Сводные данные по внутри и межлабораторной воспроизводимости приведены в табл. 3.1.

Таблица 3.1

Характеристики внутрилабораторной ($s_r^{\text{лаб}}$) и межлабораторной ($s_r^{\text{межлаб}}$) воспроизводимости данных по прямому определению элементов в составе препаратов гумусовых кислот

Элемент	$s_r^{\text{лаб}}$, % отн.			$s_r^{\text{межлаб}}$, % отн
	МГУ	ТУК	ИВС	
С	1.9	0.9	1.7	2.4
Н	3.8	1.6	2.5	7.1
N	4.6	4.6	5.5	19.7
O	2.0	–	–	–
S	9.3	–	–	–

Определение S проводили по методу Шенигера (сжиганием в колбе с кислородом) на 11 препаратах. (МГУ).

Прямое определение O проводили в ТУК на анализаторе Heraeus-Rapid. Использовали два образца сравнения – ацетанилид и сульфаниловую кислоту.

Как видно из данных, приведенных в табл. 3.1, наилучшая воспроизводимость наблюдалась для данных по углероду: значения s_r составляли от 1 до 2 (%отн). Для водорода этот показатель существенно выше, достигая 10-13%. Наихудшей воспроизводимостью характеризуются данные по содержанию азота и серы. Полученные результаты в целом согласуются с тенденциями, описанными в литературе [Huffman and Stuber, 1985; Rice and MacCarthy, 1990].

Сопоставимость данных по СНН характеризовали попарно по t-критерию. В случае определения С и N она была удовлетворительной для всех трех лабораторий, для Н сопоставимыми были только данные ИВС и

ТУК, в то время как между данными МГУ и двумя другими сериями наблюдались статистически значимые различия.

Основная причина плохой воспроизводимости данных по содержанию водорода – значительный вклад водорода гигроскопической воды, присутствующей в пробе, в определяемую величину. Так, при влажности пробы 10 % водород воды составляет около 1 % (масс.) или 20-25 % от абсолютной величины общего содержания водорода в пробе гумусовых кислот. При этом следует отметить, что коррекция первичных данных по общему содержанию водорода на влажность пробы, выполненная для результатов ИВС и ТУК, практически не повлияла ни на диапазон изменения, ни на среднюю величину s_r (6 % для скорректированных данных по сравнению с исходными 4.5 %). Это может быть связано с тем, что содержание гигроскопической воды, в свою очередь, существенно зависит от атмосферной влажности. Поскольку определение влажности и CHN весьма редко выполняется одновременно, изменение атмосферной влажности может приводить к значительным погрешностям результатов анализа. Для улучшения воспроизводимости данных по содержанию водорода определение CHN и влажности пробы нужно выполнять в один день.

Наиболее вероятная причина низкой воспроизводимости данных по содержанию азота и серы – отсутствие адекватных образцов сравнения, связанное с низким содержанием этих элементов в гумусовых кислотах.

Использование для прямого определения O двух разных образцов сравнения – ацетанилида и сульфаниловой кислоты – показало систематическое занижение результатов, рассчитанных по ацетанилиду, на 14 % (отн.). Для оценки адекватности использованных образцов сравнения было проведено сопоставление с данными по содержанию кислорода, рассчитанным по разности (масса безводной беззольной пробы за вычетом CHNS). Оказалось, что данные, рассчитанные по разности, гораздо ближе к найденным по сульфаниловой кислоте. Это позволяет сделать вывод о неприменимости ацетанилида в качестве образца сравнения для определения O в гумусовых кислотах и целесообразности использования образцов сравнения с содержанием O на уровне 20-30%, что соответствует его содержанию в гумусовых кислотах.

Для результатов прямого определения O s_r лежит в пределах 1-10% (отн). Разброс данных, как и в случае с водородом, связан с наличием гигроскопической воды в образце, однако диапазон значений s_r гораздо уже. Это объясняется высоким массовым содержанием O в органической части гумусовых кислот, что делает данные по содержанию O менее чувствительными к величине колебаний содержания гигроскопической воды.

3.1.2 Определение влажности

Влажность исследуемых препаратов гумусовых кислот определяли по обратному набору веса предварительно высушенной пробы согласно [Abbt-Braun et al., 1990]. Навески препаратов гумусовых кислот высушивали в вакууме при нагревании (45°C) в течение 24 часов. Типичная кривая набора массы высушенным препаратом гумусовых кислот приведена на рис. 3.1. Результаты определения влажности для одиннадцати препаратов приведены в табл. 3.2.

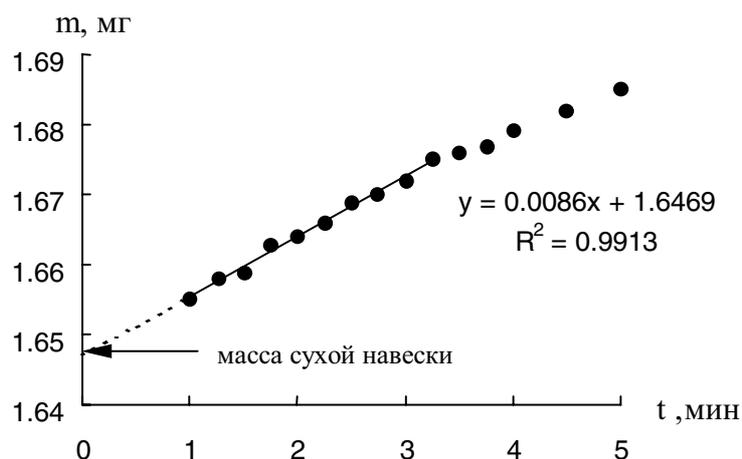


Рис. 3.1. Набор массы высушенным препаратом SHF-Co94 на воздухе.

Результаты определения влажности в 30 препаратах гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава приведены в Приложении 3.1. Во всех исследованных препаратах она колебалась в довольно узких пределах от 6 до 12%. Данные характеризовались хорошей воспроизводимостью: значения s_r находились в диапазоне от 1 до 7% (отн). При этом наблюдалась довольно отчетливая взаимосвязь между содержанием зольных элементов и влажностью препаратов. Так, максимальная влажность (10-12%) была характерна для наиболее зольных (7-22%) препаратов ГК почв, в то время как для низкозольных препаратов она не превышала 6-8%. Особо следует отметить, что обратный набор воды высушенными образцами происходит очень быстро – до 30% за 5 минут. Это говорит о том, что анализ высушенных образцов без уравнивания их с влагой атмосферного воздуха может приводить к существенным ошибкам из-за разного количества воды, поглощаемой пробой из воздуха в процессе ее подготовки к анализу. По-видимому, более целесообразным является использование воздушно-сухих образцов с дальнейшим учетом влажности, как рекомендовано авторами [Huffman and Stuber, 1985; Abbt-Braun et al., 1990]. Однако данный

подход имеет другой недостаток – зависимость получаемых результатов от влажности атмосферного воздуха. Особенно чувствительны к этому фактору результаты определения водорода, как это уже отмечалось при обсуждении сопоставимости данных, полученных разными лабораториями.

Принимая во внимание, что весь диапазон колебания содержания воды составляет 6-12%, нам представляется целесообразным использовать найденное среднее значение – 8% для корректировки результатов прямого определения CHNSO, если нет экспериментальных данных по влажности препаратов. С нашей точки зрения, корректировка на “среднюю влажность” позволит получать гораздо более достоверные данные по элементному составу гумусовых кислот, чем при игнорировании влажности в расчетах из-за отсутствия результатов соответствующего анализа.

Изложенный выше подход мы использовали в своей работе, проводя обязательную корректировку данных элементного анализа на экспериментально определенную влажность или на “среднюю влажность” 8% для препаратов с неизвестным содержанием гигроскопической воды.

3.1.3 Определение общей зольности и состава зольных элементов

Наличие зольных элементов во всех выделенных препаратах гумусовых кислот делает обязательным их анализ на зольность. Полученную величину затем используют при расчете элементного состава беззольной пробы гумусовых кислот.

Зольность всех исследованных в работе препаратов гумусовых кислот определяли методом ручного сжигания в лаборатории полумикроанализа МГУ. Оптимальность условий определения контролировали, проводя для нескольких проб сжигание по различным регламентам. Это позволило установить, что стандартные условия анализа металлоорганических соединений (750°C, 20 минут, [Гельман, 1987]) не обеспечивают полноту сгорания гумусовых кислот – необходимо “дожигание” до постоянного веса еще в течение 20 минут. Для сравнения в табл. 3.3. приведены результаты определения зольности по стандартной методике и с доведением до постоянного веса для трех исследуемых образцов гумусовых кислот.

Учитывая приведенные данные, зольность всех препаратов гумусовых кислот определяли по регламенту, предусматривающему сжигание пробы в течение 40 минут. Содержание золы в исследованных препаратах составляло от 0.1 до 60 % (Приложение 3.1).

Результаты определения зольности препаратов гумусовых кислот
(приведены средние величины) по различным регламентам
сожжения пробы ($n = 3$, $P = 0.95$)

Препарат	Зольность, %	
	по станд. методике	с дожиганием
PHF-T1H94	11 ± 1.7	4.7 ± 0.5
SHF-Co94	18.6 ± 1.5	8.7 ± 0.7
AHF-SSh2	30 ± 2.5	23 ± 1.5

Данные по содержанию золы во всех исследованных препаратах приведены в Приложении 3.1. Они характеризуются довольно плохой воспроизводимостью: величина s_r лежит в диапазоне 10-20% (отн.). Это может быть связано с тем, что оба использованных регламента сожжения пробы не обеспечивают полного сгорания органического вещества. Кроме того, как уже указывалось при анализе литературных данных, определяемая масса несгораемого остатка может существенно зависеть от качественного состава зольных элементов. В частности, присутствие щелочных металлов может приводить к образованию термостойких карбонатов, вызывая недоопределение углерода органической части гумусовых кислот.

Для выяснения данного вопроса нами было проведено определение состава зольных элементов. При этом учитывали, что высокая зольность могла быть обусловлена двумя причинами. Во-первых, неполным обессоливанием препаратов (в данном случае преобладающим зольным элементом будет натрий). Во-вторых, наличием минеральных компонентов, неотделимых от органической части гумусовых кислот при помощи процедур, использованных при выделении препаратов.

Расчет компонентного состава минеральной части был проведен для 43 препаратов гумусовых кислот различного происхождения на основании данных АЭС-ИСП. Для этой цели определяли содержание элементов в растворах препаратов известной концентрации. Из полученных данных рассчитывали молярное содержание соответствующего элемента в исходном препарате. Затем на основании химических свойств элемента делали предположение о форме, в которой он присутствует в золе. Для каждого элемента определяли массу зольной формы в расчете на единицу массы препарата гумусовых кислот и рассчитывали суммарную массу золы по данным АЭС-ИСП. Полученные величины соотносили с результатами прямого определения зольности.

Учитывая трудность разложения соответствующих карбонатов, считали, что все щелочные металлы в условиях определения превращаются в карбонаты, а остальные элементы – в оксиды. Однако необходимо было принять во внимание наличие в золе кислотных оксидов (SiO_2 , TiO_2 , V_2O_5 , Al_2O_3), которые могут реагировать с карбонатами с выделением углекислого газа:



Поэтому содержание золы (Ash) в гумусовых кислотах из данных АЭС-ИСП рассчитывали для двух крайних случаев: (1) реакция кислотных оксидов с карбонатами отсутствует (Ash_{max}) и (2) кислотные оксиды реагируют с карбонатами в соотношении 1:1 (Ash_{min}). Полученные результаты приведены в табл. 3.3.

Проведенные исследования показали, что основными зольными элементами в исследованных препаратах гумусовых кислот являются Na, K, Ca, Si. При этом Ca преобладает в ряде нефракционированных препаратов гумусовых кислот торфа, донных отложений и почв, в ФК лугово-черноземной и дерново-подзолистой почв, тогда как Si – в препаратах гумусовых кислот вод и водных вытяжек из почв. Принимая во внимание, что процедура выделения препаратов гумусовых кислот почвенного раствора включала в себя фильтрование через 0.45 мкм мембранный фильтр, можно сделать вывод о том, что кремнеземные фрагменты прочно связаны с гумусовыми кислотами, а не являются механическими примесями. Это может указывать на то, что значительная часть экстрагирующихся гумусовых кислот представлена их комплексами с глинистыми минералами.

Относительно высокое содержание Na оказалось характерно для препаратов РОВ природных вод. Для остальных препаратов содержание карбоната натрия в золе (в расчете на определенную зольность) составляло 0-10% (высокозольные препараты) и 20-53% (низкозольные торфяные препараты). Это говорит о том, что обессоливание прошло достаточно полно, а зольность препаратов преимущественно обусловлена элементами, прочно связанными с гумусовыми кислотами и не отделяющимися в ходе использованных процедур выделения.

Таблица 3.3

Состав и содержание зольных форм элементов, входящих в минеральную часть препаратов гумусовых кислот

Элемент	Содержание зольной формы элемента в препарате ГФК, мг/г ОВ												Ash, %	
	Na	K	Ca	Mg	Al	Fe	Si	Ti	Mn	Zn	B	Cu	мин.-	экс.
Форма	Na ₂ CO ₃	K ₂ CO ₃	CaCO ₃	MgCO ₃	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	SiO ₂	TiO ₂	MnO ₂	ZnO	B ₂ O ₃	CuO	макс.	
ГФК торфа														
PHF-TMu4L	4.5	1.5	0.4	0.1	1.1	1.3	5		0.13	0.0		0.03	1.1-1.4	0.0
PHF-T4H94	4.4	22	34	6.4	5.9	3.3	24		0.23	2.0	0.9	0.31	8.6-10	1.5
PHF-T5H94	10.3	5	32	6.9	2.9	2.6	22		0.35	0.6		0.10	6.7-8.3	3.0
PHF-T6H94	17.4	17	73	16.4	7.6	2.7	45		0.32	1.1	3.4	0.23	15-18	3.3
PHF-TH94	2.9	5	32	2.8	2.2	0.8	18		0.26	0.4		0.10	5.2-6.5	1.4
PHF-TTL94	5.2	10	15	2.9	2.5	3.6	12		0.27	0.5		0.17	4.4-5.3	2.1
ГК торфа														
PHA-THTO	71.4	н/о	0.9	0.2	1.0	0.3	6	0.1	0.36	0.03	0.5	0.02	8.1-8.9	12.3
PHA-TH8	30.2	н/о	0.6	0.1	1.0	0.2	3		0.14	0.01	0.2	0.01	3.4-3.5	4.8
РОВ торфа														
PDOM-TT	6.1	20.2	2.6	0.4	0.3	0.1	5		0.11	0.05	0.8	0.01	1.5-3.5	3.3
ГФК почв														
SHF-PMu9	0.7	14	9	12.5	15.7	18.7	107	1.2	0.29	0.4	2.1	0.14	17.-18	27.5
SHF-TMu12	0.08	14	53	15.3	5.5	16.8	18	1.2	0.47	0.5		0.15	11-12	5.9
SHF-Co94	2.5	8	24	2.2	1.9	0.6	18		0.19	0.3		0.10	4.0-5.7	5.3
ГК почв														
SHA-Pw94	14.9	н/о	0.3	0.1	1.4	2.2	1	0.2	0.05	0.01	0.0	0.02	2.0-22	11.7
SHA-Pw96	39.0	н/о	0.8	0.3	2.9	3.1	5	0.4	0.24	0.03	0.2	0.03	5.2-7.9	9.4
SHA-Pp96	58.8	н/о	1.6	1.4	6.8	2.5	16	0.3	0.30	0.15	0.3	0.05	8.8-22	21.2
SHA-Pg94	14.1	н/о	0.5	1.0	5.9	3.0	11	0.2	0.06	0.02	0.1	0.03	3.3-3.6	22.2
SHA-Pg96	49.8	н/о	0.9	0.7	4.4	1.5	11	0.1	0.28	0.06	0.3	0.05	6.9-15	11.2
SHA-Gw94	45.2	н/о	1.2	0.3	2.0	0.9	4	0.1	0.21	0.04	0.2	0.04	5.4-5.5	0.9
SHA-Cm94	83.6	н/о	1.7	0.4	1.8	0.6	8	0.1	0.46	0.05	0.6	0.10	9.7-9.8	4.5
SHA-CtV94	48.4	н/о	0.9	0.2	0.7	0.2	5		0.23	0.03	0.4	0.04	5.5-5.6	7.4
ФК почв														
SFA-Pw96	6.2	170.0	1.3	0.2	0.8	0.4	14	0.1	0.17	0.07	1.2	0.02	1.4-19	8.4
SFA-Pp96	18.6	963.1	13.9	0.4	1.7	0.6	47	0.1	0.52	0.10	3.3	0.16	4.9-10	2.4
SFA-Pg96	25.5	21.5	9.4	0.5	2.9	1.9	100	0.2	0.56	0.29	9.6	0.09	10-17	6.9
SFA-Gw94	9.5	330.5	10.5	2.0	2.2	1.8	9	0.1	0.36	0.46	6.3	0.10	1.1-37	16.9
ГФК почвенного раствора														
SDHF-Pw96	72.3	1.8	8.6	1.2	3.5	1.9	2328	0.4	1.37	0.39	2.7	0.13	233-255	60.4
SDHF-Pp96	29.2	1.9	4.8	1.5	1.6	0.7	618	0.2	0.95	0.15	1.6	0.14	62-66	46.7
SDHF-Pg96	30.4	1.6	7.1	1.0	3.9	1.6	921	0.3	2.12	0.28	3.2	0.22	92-97	30.8

Элемент	Содержание зольной формы элемента в препарате ГФК, мг/г ОВ												Ash, %	
	Na	K	Ca	Mg	Al	Fe	Si	Ti	Mn	Zn	B	Cu	мин.-	экс.
Форма	Na ₂ CO ₃	K ₂ CO ₃	CaCO ₃	MgCO ₃	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	SiO ₂	TiO ₂	MnO ₂	ZnO	B ₂ O ₃	CuO	макс.	
ГК углей														
CHA-AGK	18.5	16	18	0.8	16.6	33.4	27	2.4	0.38	0.4		0.19	11-13.4	14.6
CHA-ALD	3.9	17	24	3.5	4.6	11.7	24		0.54	1.3	8.2	0.61	8.2-9.9	27.0
CHA-RO	46.9	n/o	1.7	0.3	1.4	1.8	5	0.1	0.27	0.02	0.3	0.02	5.7-5.8	9.5
ГФК природных вод														
AHF-RND11	19.4	61	130	19.4	8.6	2.4	89		1.36	2.3		0.71	27-33	19.2
AHF-RND14	4.2	52	50	18.7	20.0	15.1	1141		1.30	1.3	15.6	0.63	127-132	57.6
AHF-MMu7	8.9	31	82	10.8	5.9	2.1	424		0.77	1.8	5.0	0.64	52-57	48.0
AHF-MMu8	16.8	39	64	10.5	6.6	1.9	139		1.43	1.4	18.7	0.70	25-30	18.0
AHF-SSh1	4.7	31	111	7.4	4.9	1.0	412		0.81	2.0	3.8	0.55	51-58	19.6
РОВ природных вод														
ADOM-SMu4	94.0	67	78	57.8	0.9	7.2	84		1.16	1.4		0.63	33-39	19.6
ADOM-SMu8	86.8	181	113	47.1	15.4	10.0	170		2.60	5.0		2.14	51-63	30.7
ГФК донных отложений														
BHF-SMu2	0.0	12	9	2.2	6.9	19.8	23		0.40	0.5		0.28	6.5-7.4	6.0
BHF-RND13	2.7	17	24	4.0	3.2	2.4	26		0.51	0.9		0.33	6.2-8.0	4.0
BHF-RLuh	0.6	57	65	12.7	12.4	90.3	151		2.77	3.8	11.8	0.82	35-41	35.0

n/o – содержание К не определяли, т.к. образцы для ИСП готовили в растворе КОН.

Как уже указывалось выше, полученные результаты по составу минеральной части гумусовых кислот были использованы для расчета содержания их зольных форм, что позволило оценить величину минимальной (Ash_{\min}) и максимальной (Ash_{\max}) зольности препаратов. Сопоставление полученных величин с экспериментально определенной зольностью (Ash_{\exp}) приведено на рис. 3.2.

Как показывают регрессионные уравнения, приведенные на рис. 3.2, величина минимальной зольности (рассчитанной с учетом реакции с SiO_2) хорошо аппроксимирует экспериментальную зольность, в то время как расчет Ash_{\max} дает завышенные значения зольности, особенно для высокозольных образцов с повышенным содержанием кремния. Это может указывать на предпочтительность второго пути образования несгораемого остатка, – с разложением карбонатов при реакции их с SiO_2 .

Наблюдаемая хорошая сходимость экспериментальных и расчетных данных по определению зольности позволяет сделать вывод о правильности метода ручного сжигания при использовании регламента МГУ,

предусматривающего прокаливание пробы гумусовых кислот при 850°C в течение 40 минут.

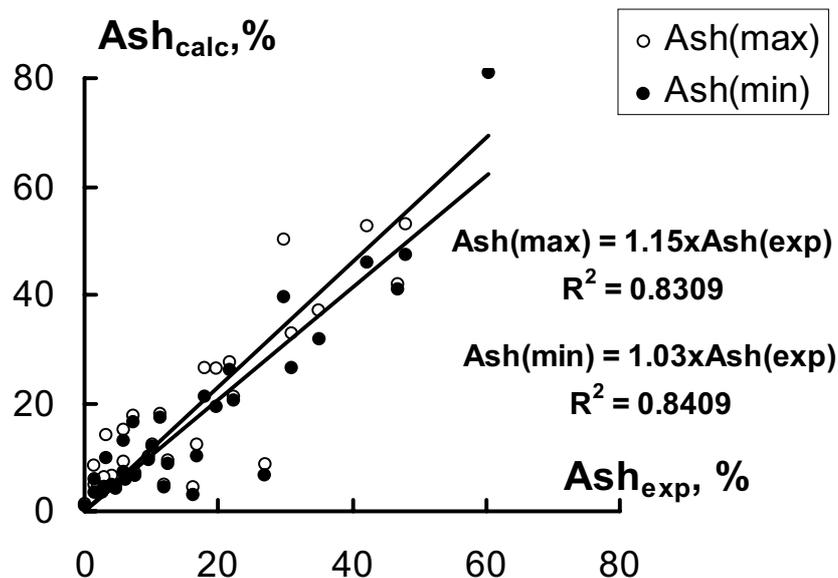


Рис. 3.2. Зависимость между экспериментально определенной зольностью (Ash_{exp}) 43 препаратов гумусовых кислот и рассчитанной двумя способами из данных ИСП-АЭС (Ash_{calc}) – с учетом реакции с SiO_2 (Ash_{min}) и без (Ash_{max}).

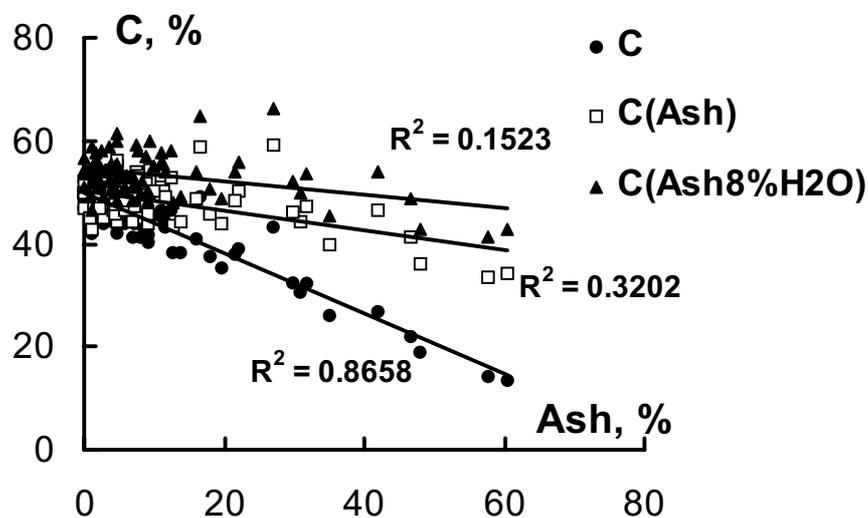


Рис. 3.3. Зависимость содержания углерода от зольности препаратов:

C – содержание углерода, определяемое на анализаторе,
C(Ash) – скорректированное на зольность,
C(Ash8%H₂O) – скорректированное на зольность и среднюю влажность 8 %.

Для подтверждения данного вывода была проанализирована зависимость содержания углерода, определяемого на анализаторе (C), от зольности пробы и сопоставлена с таковыми для содержания углерода, скорректированного только на зольность пробы (C(Ash)) и на зольность и среднюю влажность 8 % (C(Ash8% H_2O)) (рис. 3.3).

Предполагалось, что если масса несгораемого остатка обусловлена в основном оксидами и силикатами металлов и оксидом кремния, то коррекция на зольность должна устранять корреляцию между содержанием углерода и зольностью. Если же в процессе сжигания пробы происходит недоопределение углерода из-за образования термостойких карбонатов или имеет место недожигание органического вещества, то корреляция между содержанием углерода и зольностью должна сохраняться и для скорректированных значений.

Как видно из рис. 3.3, введение коррекции на зольность практически устраняет зависимость содержания углерода от зольности (квадрат коэффициента корреляции снижается от 0.87 до 0.32). Еще большего эффекта удастся добиться при коррекции не только на зольность, но и на влажность (R^2 уменьшается до 0.15), что свидетельствует о статистической незначимости корреляции между скорректированным содержанием углерода и зольностью пробы.

3.1.4 Схема обработки данных элементного анализа для расчета элементного состава гумусовых кислот

Применение описанного выше комплекса методик, включая прямое определение кислорода, для анализа представительной выборки препаратов гумусовых кислот различного происхождения (~30 препаратов) позволило выполнить весьма важное условие для разработки корректной процедуры расчета элементного состава гумусовых кислот, а именно, сформировать “переопределенный” блок данных. Это означает, что благодаря использованию метода прямого определения кислорода, все элементы органической части (CHNOS) удалось определить напрямую, не прибегая к стандартной процедуре расчета содержания кислорода по разности. Данное обстоятельство позволяет независимо определить – рассчитать по разности – содержание каждого из элементов при известной зольности и влажности препаратов. При этом одной из самых сложных проблем, как будет показано ниже, является корректный учет влияния влажности пробы на результаты прямого определения кислорода.

При разработке схемы обработки первичных данных элементного анализа исходили из тех соображений, что масса анализируемого препарата

гумусовых кислот складывается из массы органической части, состоящей из CHNOS, и массы неорганической части, состоящей из гигроскопической воды и зольных элементов. Математически это можно записать с помощью простого выражения:

$$100 \% = C \% + H \% + N \% + O \% + S \% + H_2O \% + Ash \% \quad (3.3)$$

Следовательно, критерием правильности результатов элементного анализа гумусовых кислот может служить близость суммы прямых определений всех элементов, зольности и влажности к 100 %. Однако до проведения такого суммирования необходимо учесть, что в условиях автоматического микроанализа водород гигроскопической воды определяется вместе с водородом органической части, то есть $H_{dir} = H_{org} + H_{H_2O}$. Теоретически, то же самое справедливо и для определения кислорода, то есть $O_{dir} = O_{org} + O_{H_2O}$. Следовательно, данные анализатора по содержанию Н и О нужно сначала скорректировать на влажность, то есть вычесть из них содержание H_{H_2O} и O_{H_2O} , соответственно.

Результаты предложенной процедуры, выполненной с учетом и без учета кислорода воды для тридцати препаратов, проанализированных в МГУ и ТУК, приведены на рис. 3.4. Обращает на себя внимание, что коррекция данных прямого определения О на влажность путем вычитания кислорода экспериментально определенной гигроскопической воды приводит в среднем к занижению результатов анализа, – среднее суммы определений составляет 95%. Исключение процедуры коррекции на кислород воды дает завышенные результаты – среднее суммы определений составляет 104%.

Для дальнейшего выяснения корректности процедуры вычитания кислорода гигроскопической воды из данных прямого определения кислорода было проведено сопоставление содержания кислорода, определяемого на анализаторе (O_{dir}), и рассчитанного по разности (O_{Δ}) (рис. 3.5). Оказалось, что данные прямого определения кислорода превышают рассчитанные по разности в среднем на 3.3% абс. При этом данные прямого определения, скорректированные на кислород гигроскопической воды ($O_{dir} - O(H_2O)$), ниже рассчитанных по разности в среднем на 4.7% абс.

Это свидетельствует о некорректности процедуры учета влияния гигроскопической воды на результаты прямого определения кислорода путем арифметического вычитания кислорода воды. Наиболее вероятной причиной этому может быть обстоятельство, которое мы особо подчеркивали при рассмотрении методических аспектов прямого определения кислорода, а

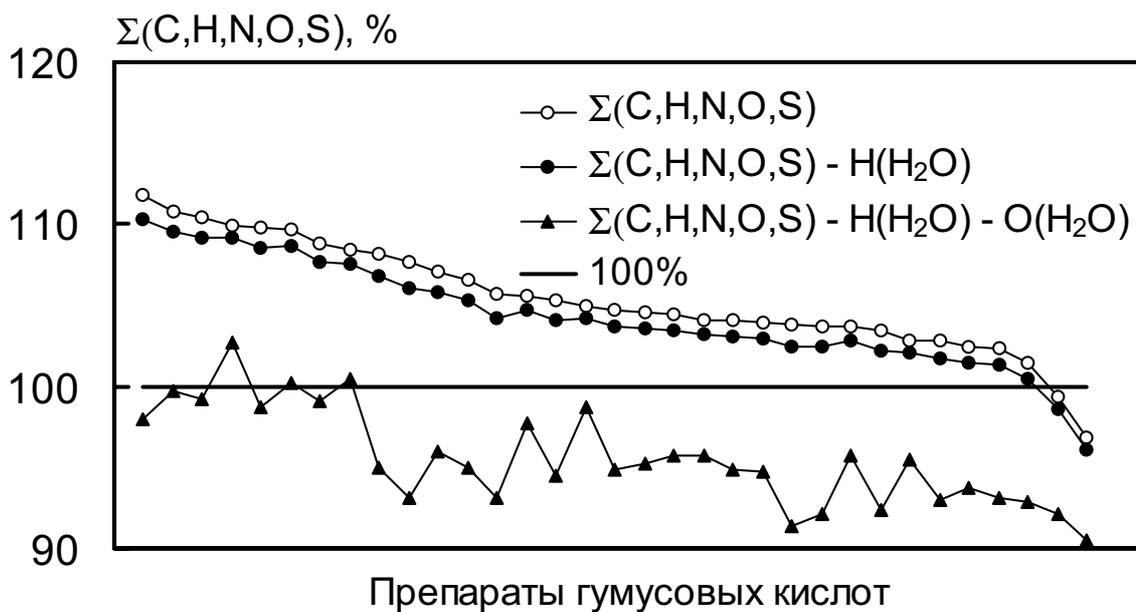


Рис. 3.4. Суммарное содержание элементов в беззольной безводной пробе гумусовых кислот;
 $\Sigma(\text{C,H,N,O,S})$ – без коррекции на Н и О воды;
 $\Sigma(\text{C,H,N,O,S}) - \text{H}(\text{H}_2\text{O})$ – за вычетом Н воды;
 $\Sigma(\text{C,H,N,O,S}) - \text{H}(\text{H}_2\text{O}) - \text{O}(\text{H}_2\text{O})$ – за вычетом Н и О воды.

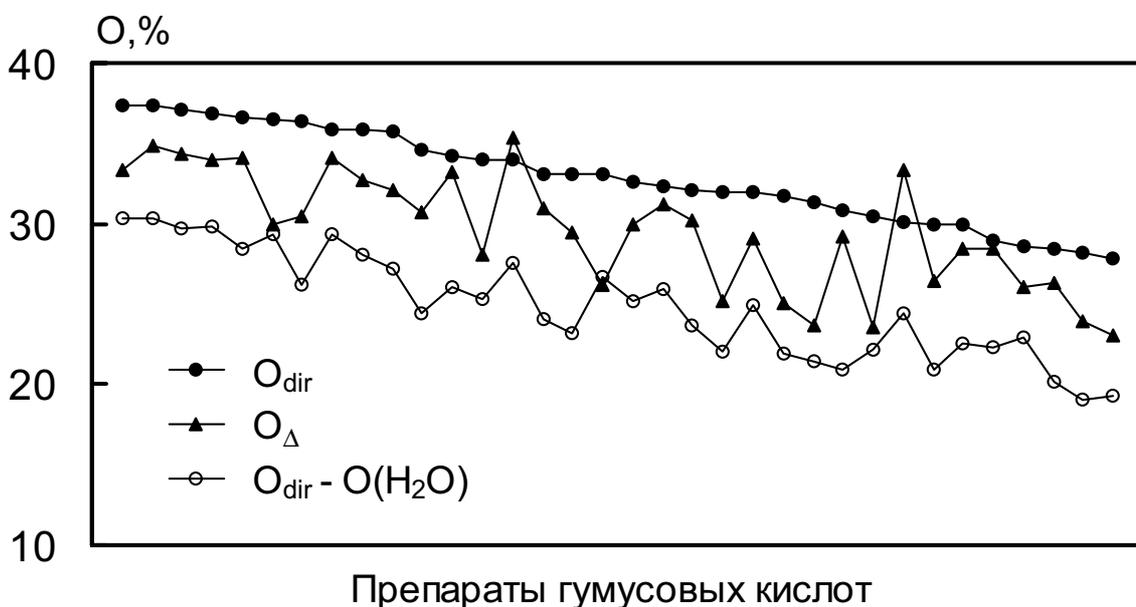


Рис. 3.5. Результаты прямого определения кислорода в препаратах гумусовых кислот (с коррекцией на содержание гигроскопической воды и без) и найденные по разности.

именно, возможное удаление слабо связанной воды из пробы при продувке анализатора. В данном случае на анализаторе будет определяться кислород не всей гигроскопической воды пробы, а только ее наиболее прочно удерживаемой части. Согласно нашим оценкам, наилучшая сходимость с данными определения кислорода по разности наблюдается, если допустить 50-60% потерю от начального (равновесного с атмосферной влажностью) содержания гигроскопической воды в пробе.

Полученные результаты говорят о том, что проблема прямого определения кислорода в гумусовых кислотах требует специального аналитического исследования. При этом наиболее важным представляется вопрос о влиянии влажности пробы на результаты анализа. Кроме того, дополнительного исследования требует выбор оптимальных образцов сравнения для получения правильных результатов по содержанию кислорода в органической части гумусовых кислот.

На основании проведенного исследования для расчета элементного состава гумусовых кислот в нашей работе была выбрана схема корректировки данных анализаторов на зольность и влажность препаратов по формулам (3.4) – (3.6), включающая определение кислорода по разности. При этом содержание воды в препаратах, для которых не было выполнено прямое определение влажности, принималось равным 8 %.

Для $X=C, N, S$:

$$X_{\text{corr}} = \frac{X_{\text{dir}}}{100 - \text{Ash} - \text{H}_2\text{O}} \times 100\% \quad (3.4)$$

$$H_{\text{corr}} = \frac{H_{\text{dir}} - H_{\text{H}_2\text{O}}}{100 - \text{Ash} - \text{H}_2\text{O}} \times 100\% \quad (3.5)$$

$$O_{\Delta} = 100 - C_{\text{corr}} - H_{\text{corr}} - N_{\text{corr}} - S_{\text{corr}} \quad (3.6)$$

где X_{corr} – скорректированное содержание элемента,

X_{dir} – непосредственно определенное содержание элемента,

$H_{\text{H}_2\text{O}}$ – содержание водорода воды,

Ash – зольность препарата,

H_2O – влажность препарата.

3.2 Элементный состав препаратов гумусовых кислот, использованных в работе

Для расчета элементного состава гумусовых кислот в качестве первичных данных использовали результаты прямого определения CHNS и зольности, полученные в лаборатории органического микроанализа Химфака МГУ.

С целью сохранения максимальной информативности полученного блока данных по элементному составу использованных в работе препаратов, в Приложение 3.2 вынесены все данные по содержанию С, Н, N, O, S (% масс), скорректированные на общую зольность и влажность. Для препаратов, в которых определение влажности и серы не проводили, в соответствующих графах стоят прочерки. На основании скорректированных данных по массовому содержанию элементов, для всех препаратов были рассчитаны атомные соотношения – Н/С, О/С, С/N (Приложение 3.2). В табл. 3.4 приведены описательные статистики для данных по элементному составу препаратов, сгруппированных по источнику происхождения и фракционному составу. В последней графе приводятся значения критерия Уилка-Шапиро, который применяется для оценки нормальности распределения при малых объемах выборок [Дмитриев, 1995]. Жирным шрифтом выделены значения критерия, меньшие критических, что свидетельствует об отклонении распределения значений данного дескриптора по указанной выборке препаратов от нормального.

Как следует из приведенных данных, подавляющее большинство выборок (за исключением ГФК вод) характеризовалось нормальным распределением значений интегральных дескрипторов элементного состава. Для всей исследованной выборки препаратов гумусовых кислот диапазон значений Н/С составил 0.35-1.15, О/С – 0.3-0.97, С/N – 11-167. При этом для препаратов РОВ торфа (PDOM) была характерна величина Н/С (1.27), существенно превосходящая указанную верхнюю границу, что свидетельствует о большом вкладе углеводов в состав водных вытяжек торфа. Средние значения Н/С, О/С и С/N для всей охарактеризованной выборки, состоящей из 81 препаратов гумусовых кислот, составили 0.90, 0.52 и 37, соответственно. При этом следует отметить довольно узкий диапазон изменения атомных соотношений Н/С и О/С ($s^2 = 0.02$ и 0.01 , соответственно). Наиболее близкие Н/С и О/С были характерны для всех трех подвыборок препаратов торфа (17 нефракционированных ГФК, 10 ГК и 8 ФК) и подвыборки ФК почв. В тоже время наибольшая изменчивость наблюдался для подвыборок препаратов ГК угля, нефракционированных ГФК почв и ГФК вод. Среднее значение атомного соотношения С/N по всей выборке составляло 37, однако, в отличие от обсужденных выше показателей Н/С и О/С, для него был характерен исключительно широкий диапазон вариаций – значение s^2 по всей выборке составило 1047.

Описательные статистики данных по элементному составу
препаратов гумусовых кислот, сгруппированных по источнику
происхождения и фракционному составу
(содержание элементов дано в % масс.)

	\bar{x}	Med	X_{\min}	X_{\max}	Q_{25}	Q_{75}	s^2	A	E	W
ГФК торфа (n = 16)										
C	55.2	54.4	52.8	61.5	53.8	55.8	4.9	1.84	3.61	0.809
H	4.2	4.3	3.5	4.8	3.9	4.5	0.1	-0.28	-0.54	0.979
N	2.1	2.1	1.3	3.6	1.7	2.5	0.4	0.68	0.41	0.938
O	36.8	37.6	30.9	39.2	36.4	38.5	6.8	-1.55	1.63	0.794
O/C	0.50	0.52	0.38	0.55	0.49	0.5	0.007	-1.71	2.23	0.769
H/C	0.92	0.89	0.76	1.03	0.86	0.99	0.01	-0.13	-1.04	0.924
C/N	33	31.11	18.81	53.04	25.66	37.21	99.42	0.69	-0.16	0.938
ГК торфа (n = 10)										
C	56.7	56.2	54.0	60.0	54.6	58.9	5.3	0.33	-1.66	0.903
H	4.3	4.2	3.9	4.9	4.1	4.4	0.1	1.23	2.37	0.901
N	2.3	2.3	1.4	3.2	2.0	2.6	0.3	0.10	-0.21	0.963
O	35.7	37.0	31.6	39.3	32.9	37.9	7.6	-0.44	-1.51	0.898
O/C	0.48	0.49	0.40	0.55	0.43	0.52	0.003	-0.28	-1.58	0.923
H/C	0.91	0.91	0.83	0.99	0.87	0.96	0.003	0.10	-1.40	0.948
C/N	30	28.30	22.03	46.25	25.87	35.51	57.26	1.11	0.94	0.892
ФК торфа (n = 8)										
C	51.6	51.97	47.1	55.9	49.9	52.9	7.3	-0.13	0.39	0.978
H	3.8	3.7	3.2	4.8	3.3	4.3	0.4	0.58	-1.02	0.897
N	1.1	1.0	0.5	2.0	0.6	1.7	0.4	0.61	-1.29	0.856
O	42.5	42.5	37.6	46.4	41.4	44.2	6.9	-0.55	1.14	0.979
O/C	0.62	0.61	0.50	0.74	0.59	0.66	0.005	0.03	0.70	0.984
H/C	0.88	0.87	0.74	1.03	0.77	1.01	0.01	0.14	-1.97	0.881
C/N	71	61.57	27.18	126.5	37.74	110.18	1593.0	0.32	-1.75	0.896
ГФК почв (n = 6)										
C	51.1	51.0	48.4	53.4	49.7	52.8	3.6	-0.12	-1.32	0.967
H	4.0	4.3	2.7	5.0	3.0	4.7	0.9	-0.62	-1.67	0.893
N	3.2	3.1	2.4	4.3	2.5	4.1	0.7	0.45	-2.00	0.887
O	38.3	38.8	29.0	45.1	34.3	43.7	35.7	-0.54	-0.39	0.955
O/C	0.56	0.57	0.39	0.70	0.49	0.66	0.01	-0.42	-0.46	0.962
H/C	0.93	0.99	0.65	1.11	0.75	1.10	0.04	-0.70	-1.44	0.882
C/N	19	19.69	14.58	23.67	14.66	23.27	16.02	-0.23	-1.97	0.880
ГК почв (n = 14)										
C	57.3	56.8	50.5	64.4	55.2	60.7	15.9	0.25	-0.38	0.970
H	4.0	4.3	2.7	5.1	3.0	4.5	0.7	-0.46	-1.11	0.891
N	4.7	4.7	3.0	5.8	4.4	5.4	0.6	-0.53	0.77	0.948
O	33.2	31.9	25.1	44.5	30.7	35.3	21.5	0.86	1.59	0.936
O/C	0.45	0.44	0.33	0.63	0.40	0.48	0.01	0.93	0.97	0.909
H/C	0.89	0.95	0.54	1.11	0.66	1.06	0.04	-0.80	-0.99	0.837
C/N	14	13.89	11.37	24.99	12.21	15.91	12.14	2.10	5.90	0.780

	\bar{x}	Med	X_{\min}	X_{\max}	Q_{25}	Q_{75}	s^2	A	E	W
ФК почв (n = 12)										
C	52.8	51.8	50.6	59.6	50.9	53.6	7.0	1.87	3.46	0.773
H	4.0	4.0	3.6	4.5	3.8	4.3	0.1	0.19	-0.79	0.949
N	3.6	3.7	1.5	5.4	3.1	4.1	1.1	-0.36	0.50	0.969
O	38.6	39.3	32.1	42.9	37.3	40.6	8.7	-0.84	0.91	0.950
O/C	0.55	0.57	0.40	0.63	0.52	0.60	0.004	-1.19	1.34	0.908
H/C	0.92	0.90	0.81	1.06	0.86	0.96	0.01	0.77	-0.24	0.921
C/N	19	16.83	11.25	39.17	15.01	20.74	57.96	1.92	4.19	0.804
ГК углей (n = 6)										
C	63.7	64.7	57.2	68.8	59.8	67.0	20.4	-0.47	-1.44	0.936
H	3.5	3.8	2.0	4.5	2.5	4.1	0.9	-0.76	-1.17	0.897
N	1.1	1.0	0.5	1.8	0.7	1.3	0.2	0.71	0.46	0.956
O	30.6	29.7	25.8	37.1	27.1	34.1	19.9	0.49	-1.47	0.923
O/C	0.37	0.35	0.30	0.49	0.31	0.43	0.01	0.76	-0.98	0.884
H/C	0.66	0.77	0.35	0.81	0.48	0.79	0.04	-1.12	-0.80	0.764
C/N	86	73.26	41.22	166.8	54.77	111.98	2105.9	1.21	1.11	0.903
ГФК природных вод (n = 9)										
C	49.9	50.7	41.4	54.9	48.3	53.6	24.3	-0.97	-0.37	0.866
H	4.3	4.3	3.7	4.7	4.0	4.6	0.1	-0.39	-1.03	0.930
N	1.3	1.1	0.3	2.7	0.7	1.6	0.6	0.62	-0.22	0.954
O	41.4	39.3	36.4	53.7	37.7	40.1	36.7	1.55	1.18	0.754
O/C	0.63	0.57	0.48	0.97	0.52	0.59	0.03	1.49	0.98	0.768
H/C	1.03	1.04	0.88	1.15	0.97	1.07	0.01	-0.08	-0.53	0.986
C/N	62	54.61	20.78	166.1	38.28	74.32	1920.6	1.87	4.16	0.816
Объединенная выборка (n = 81)										
C	54.8	54.2	41.4	68.8	51.8	56.9	22.6	0.42	1.43	-
H	4.1	4.2	2.0	5.1	3.9	4.5	0.4	-1.01	1.28	-
N	2.6	2.3	0.3	5.8	1.5	3.9	2.1	0.43	-0.76	-
O	36.9	37.4	25.1	53.7	34.1	39.3	25.9	0.23	1.02	-
O/C	0.52	0.52	0.30	0.97	0.45	0.57	0.01	1.01	3.28	-
H/C	0.90	0.92	0.35	1.15	0.85	1.00	0.02	-1.17	2.09	-
C/N	37	27	11	167	17	43	1047	2.34	5.84	-

\bar{x} , X_{\min} , X_{\max} и Med – средние, мин. и макс. значения и медиана, соответственно. Q_{25} и Q_{75} – нижние и верхние квартили, A и E – коэффициенты асимметрии и эксцесса, W – значение критерия Уилка-Шапиро, * жирным шрифтом выделены $W < (W_{0.05})_{\text{крит}}$.

Указанные закономерности изменения Н/С и О/С в исследованных препаратах гумусовых кислот в зависимости от источника происхождения и фракционному составу хорошо согласуются с результатами [Rice and MacCarthy, 1991], полученными в процессе статистической обработки большого блока данных (650 препаратов) по элементному составу гумусовых кислот различного происхождения. При этом авторы данной обзорной работы указывали на отсутствие отчетливой взаимосвязи между источником происхождения и содержанием азота в препарате. В то же время, согласно

нашим данным, по среднему содержанию азота препараты различного происхождения можно расположить в следующий ряд:

$$\text{ГК почв} > \text{ФК почв} > \text{ГФК торфа} \cong \text{ГК торфа} > \text{ФК торфа} > \\ > \text{ГК угля} \cong \text{ГФК вод.}$$

Приведенные в табл. 3.4 содержания элементов и закономерности их изменения для почвенных препаратов хорошо согласуется с данными, опубликованными в монографии Д.С. Орлова [Орлов, 1990]. При сопоставлении полученных нами данных с обзорными [Rice and MacCarthy, 1991] (табл. 1.1) необходимо отметить хорошее соответствие с литературными данными по содержанию углерода и кислорода, тогда как для результатов по содержанию водорода наблюдается систематическое расхождение. При этом содержание водорода по [Rice and MacCarthy, 1991] превышает определенное нами в среднем на 1% абс. Данное расхождение хорошо объясняется влиянием влажности препаратов, которое не учитывалось при расчете элементного состава авторами обзора. Рассчитанное значение средней влажности образцов, вызывающей такую ошибку, составляет 8.6%, что хорошо согласуется с величиной средней влажности, полученной автором данной работы (табл. 3.2).

Таким образом, на основании проведенных систематических исследований по воспроизводимости и правильности прямых определений элементов, зольности и влажности препаратов гумусовых кислот разработана схема обработки первичных данных элементного анализа для определения элементного состава препаратов гумусовых кислот в расчете на беззольную безводную пробу. Данная схема применена для расчета элементного состава представительной выборки препаратов гумусовых кислот (более 80), что позволило получить обширный массив данных по элементному составу гумусовых кислот различного происхождения и фракционному составу. Для каждого из классов (сходный источник происхождения и фракционный состав) проведена свертка информации – рассчитаны описательные статистики по каждому дескриптору. Полученный массив интегральных дескрипторов элементного состава может быть использован для решения задач классификации и прогноза свойств гумусовых кислот.

В результате проведенного исследования вскрыты нерешенные проблемы элементного анализа гумусовых кислот, к которым следует отнести определение кислорода и содержания гигроскопической воды в пробе. Показана необходимость дальнейших исследований по определению общей зольности и состава зольных элементов с целью установления оптимальных условий анализа высокзольных проб гумусовых кислот.

Глава 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРНО-ГРУППОВОГО СОСТАВА ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ

При определении структурно-группового состава гумусовых кислот в качестве основной задачи рассматривали установление набора структурных фрагментов, полностью описывающих распределение скелетообразующих элементов – углерода и водорода – в структуре гумусовых кислот, содержание которых поддавалось бы количественному определению. Оптимальным методом для решения указанной проблемы является одномерная спектроскопия ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C .

Учитывая, что спектроскопия ЯМР является самым мощным методом структурного анализа, то наряду с определением интегральных дескрипторов состава, полученную спектроскопическую информацию использовали и для углубленного анализа особенностей строения гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава. Тем самым добивались наполнения абстрактной формы – набора интегральных дескрипторов структурно-группового состава – реальным химическим содержанием в виде информации о парциальных структурах, наличие или отсутствие которых определяет принадлежность гумусовых кислот к тому или иному классу. В области идентификации парциальных структур не имеет себе равных метод двумерной спектроскопии ЯМР, который и был широко использован для этой цели в нашей работе. Для дальнейшей детализации информации о строении гумусовых кислот проводили их гидролитическое расщепление с последующей идентификацией продуктов гидролиза методами одномерной и двумерной спектроскопии ЯМР и ВЭЖХ. Тем самым отвечали на вопрос о специфике строения каркасной и периферической частей макромолекул гумусовых кислот. Конечным выходом такого рода исследований может стать расшифровка структуры гумусовых кислот (с нашей точки зрения, это уже вопрос недалекого будущего), тогда как в рамках представленной работы основной приоритет отдавался проблемам извлечения количественной (численной) информации о строении гумусовых кислот из спектральных данных, что позволило бы использовать ее для решения задач классификации и прогностического моделирования свойств гумусовых кислот.

4.1 Одномерная спектроскопия ЯМР ^{13}C и ПМР

4.1.1 Качественная характеристика ^{13}C ЯМР- и ПМР-спектров гумусовых кислот

Типичные ^{13}C ЯМР- и ПМР-спектры гумусовых кислот (на примере ФК торфа) приведены на рис. 4.1 (а, б), на рис. 4.2 показаны также ^{13}C ЯМР спектры гумусовых кислот различного происхождения и фракционного

состава. Как ^{13}C ЯМР, так и ПМР спектры характеризуются широкими полосами поглощения, обусловленными перекрыванием большого количества сигналов. Максимумы интенсивности достигаются в области незамещенных алифатических фрагментов (НС), в “карбогидратной” (НСО – фрагменты) и ароматической (Ar) области спектра. Особенно интенсивные, сильно перекрывающиеся пики наблюдаются в “карбогидратной” области. Такое распределение спектральной плотности согласуется с априорной информацией о наличии в структуре гумусовых кислот высокозамещенного ароматического каркаса и углеводно-пептидной периферии. Ввиду сильного перекрывания, отнесение сигналов в подобных спектрах возможно только “поинтервально” – согласно положению резонансов атомов со сходным химическим окружением, как это показано в табл. 4.1.

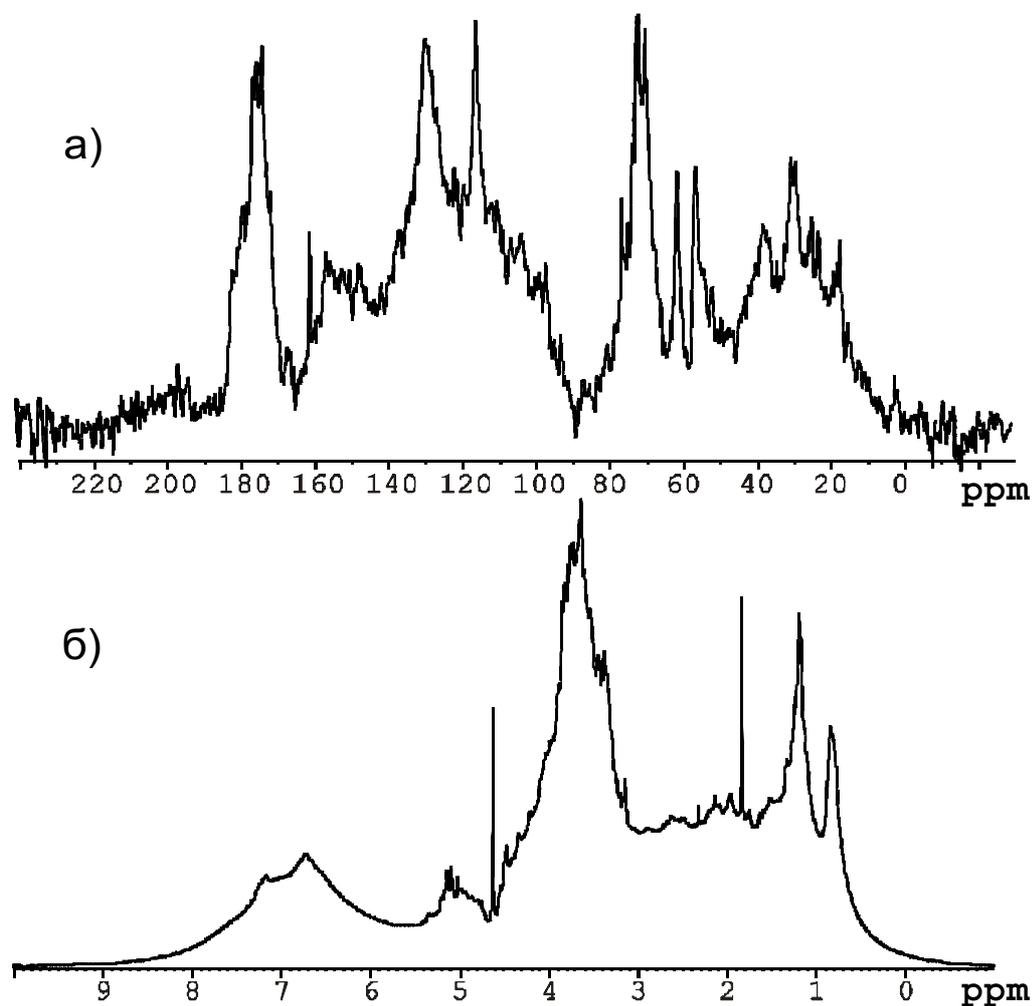


Рис. 4.1. Спектры ^{13}C ЯМР(а) и ПМР (б) ФК верхового торфа в 0.1 М NaOD.

Отнесения в ПМР- и ^{13}C ЯМР-спектрах гумусовых кислот
(0.1 M NaOD)

Фрагмент	Интервал, м.д.		Описание
	ПМР	^{13}C ЯМР	
СН-Н,С	0.5-1.95	5-48	С, Н-замещенные алифатические фрагменты
α -СН	1.95-3.1		алифатические фрагменты в α -положении к электроотр. группе или ароматическому кольцу
СН ₃ -О	3.1-4.7	48-58	метоксильные и О-, N-замещенные алифатические фрагменты (“карбогидратные”)
СН ₂ -О,N		58-64	
СН-О,N		64-90	
О-СН-О,N	4.7-6.0	90-108	алифатические фрагменты, дважды замещенные гетероатомами (“аномерные”)
Ar-Н,С	6.0-10.0	108-145	Н-, С-замещенные ароматические фрагменты
Ar-О,N	–	145-165	О, N-замещенные ароматические фрагменты
СОО-Н,С	–	165-187	карбоксильные группы и их производные
С=О	–	187-220	кетонные и хинонные группы

Максимальный уровень детализации позволяет выделить в ^{13}C ЯМР спектре 9 интервалов, интегрирование которых может быть осуществлено с необходимой точностью. Величины указанных парциальных интегралов, сумма которых описывает полный интеграл спектра, могут быть использованы как интегральные дескрипторы структурно-группового состава, если они пропорциональны содержанию атомов С в соответствующих фрагментах. Из-за различия времен релаксации ядер С разного типа, пропорциональность величины интеграла количеству атомов С в ^{13}C ЯМР спектре достигается только в количественных условиях его регистрации. Они включают в себя (1) использование времени задержки между импульсами (T_d), достаточного для полной релаксации третичных и четвертичных ядер углерода, и (2) устранение ядерного эффекта Оверхаузера. Поэтому выбору таких условий регистрации ^{13}C ЯМР спектра будет уделено особое внимание, как и получению информации о 100 % распределении водорода с помощью спектроскопии ПМР.

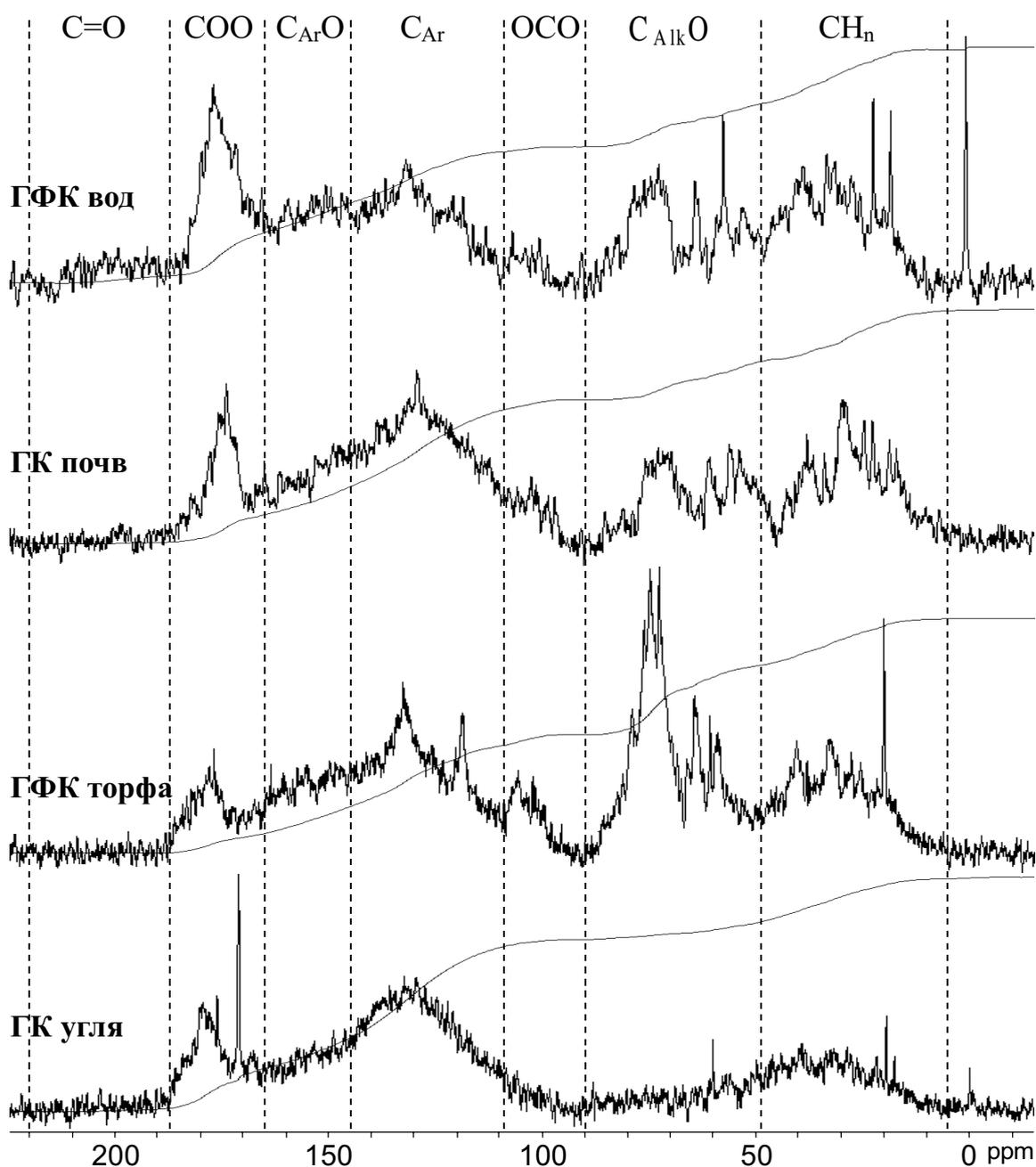


Рис. 4.2. Типичные спектры ^{13}C ЯМР гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава.

4.1.2 Выбор условий регистрации количественных ^{13}C ЯМР-спектров гумусовых кислот

Для обеспечения условий регистрации количественных ^{13}C ЯМР-спектров гумусовых кислот необходимо было исключить насыщение и ядерный эффект Оверхаузера (ЯЭО). Теоретические аспекты данной проблемы были обсуждены в обзоре литературы. В нашей работе влияние ЯЭО на количество получаемой информации оценивали путем регистрации спектра при полном отсутствии ЯЭО (без развязки от протонов) и сопоставления его со спектром, полученным в рекомендуемых в литературе условиях (генератор развязки включен при считывании сигнала и выключен

на период релаксационной задержки, импульсная последовательность INVGATE). Сопоставление этих спектров для ряда препаратов не выявило различий в интенсивностях всех спектральных областей. Это свидетельствует о том, что использование последовательности INVGATE позволяет полностью устранить влияние ЯЭО.

Для решения второй проблемы необходимо было определить время задержки (T_d) между импульсами, достаточное для релаксации всех ядер углерода (включая третичные и четвертичные). Систематические исследования по определению времен релаксации гумусовых кислот отсутствуют, а приводимые в литературе величины T_d , для регистрации спектров гумусовых кислот варьируют от 0.5 до 10 с. В связи с этим были проведены эксперименты по оценке времени релаксационной задержки, использование которого позволило бы достичь пропорциональности интегральной интенсивности сигналов числу атомов углерода. Для этого были получены спектры 12 препаратов гумусовых кислот различного происхождения с задержкой между импульсами 1, 2, 3, 4 и 8 с. Спектры интегрировали в пределах семи диапазонов химсдвигов (“карбогидратную” область интегрировали целиком, без разбиения на более узкие диапазоны). Для каждой спектральной области рассчитывали отношение интенсивности в спектре при $T_d = 1, 2, 3, 4$ и 8 (I_T) к интенсивности этой же области спектра при $T_d = 1$ с (I_1). Такое представление данных позволяет проследить изменения, происходящие в спектрах различных препаратов гумусовых кислот при увеличении T_d . На рис. 4.3 показаны зависимости относительной интенсивности спектральных областей от времени задержки. Результаты интегрирования спектров приведены в Приложении 4.1.

Как видно из рис. 4.3, все зависимости I_T/I_1 от T_d выходят на плато при $T_d = 4$ с. Это дает основание предполагать, что при таких временах релаксационной задержки спектры гумусовых кислот близки к количественным. Использование меньших времен задержки может привести к переопределению доли алифатических и карбогидратных фрагментов и недоопределению четвертичных ароматических и карбоксильных атомов углерода. В связи с этим в нашей работе все спектры гумусовых кислот регистрировали при $T_d = 4$ с.

Следует отметить еще одну методическую проблему – фазирование спектра гумусовых кислот. Она связана с отсутствием узких пиков и нулевой линии практически во всем спектральном диапазоне. С целью уменьшения субъективной ошибки при фазовой коррекции нулевой линии спектра, фазирование каждого преобразованного сигнала спада свободной индукции

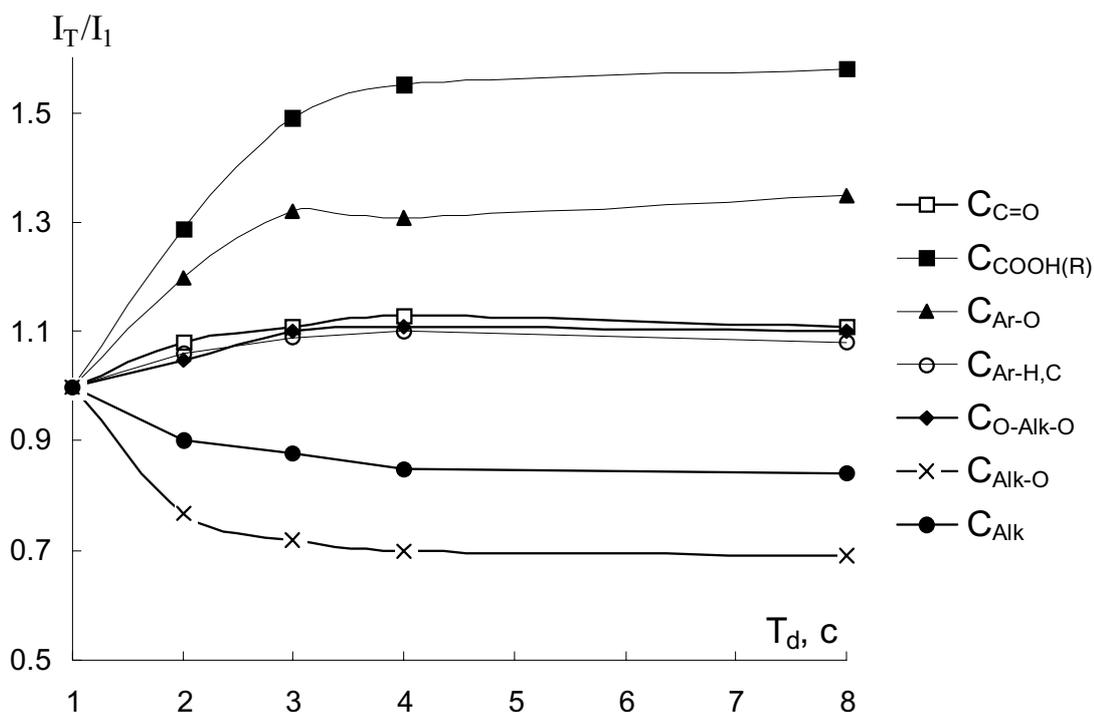


Рис. 4.3. Зависимость относительной интегральной интенсивности сигнала различных спектральных областей от времени задержки (приведены величины, усредненные для 12 препаратов различного происхождения).

(ССИ) проводили семикратно вручную по стандартной процедуре. Каждое фазирование начинали с нулевых значений множителей фазовой коррекции. Полученные результаты интегрирования усредняли. Максимальная ошибка интегрирования наблюдалась для интервалов 90-108 м.д. и 185-220 м.д. в связи с низкой интенсивностью сигналов в этих областях. Обработка спектров 67 препаратов гумусовых кислот показала, что при 7-кратном фазировании для этих интервалов в среднем ошибка составляет около 20 отн.%, а для остальных не превышает 5%.

Оценку воспроизводимости полученных величин проводили путем регистрации нескольких спектров для 5-ти препаратов ГК торфа, спектры которых характеризовались наличием достаточно интенсивных сигналов во всех спектральных областях. Эксперимент включал повторное растворение пробы, регистрацию спектров в идентичных условиях и интегрирование по вышеуказанным диапазонам с усреднением по 7 фазированиям. Интегралы спектральной интенсивности для большинства диапазонов характеризовались хорошей воспроизводимостью ($s_T = 6\%$ отн.), тогда как для диапазонов карбонильных и ацетальных фрагментов она была существенно хуже ($s_T = 23\%$ отн) в связи с низкой интенсивностью сигналов.

4.1.3 Структурно-групповой состав исследованных препаратов гумусовых кислот по данным ^{13}C ЯМР

В описанных выше условиях были зарегистрированы ^{13}C ЯМР спектры 67 препаратов гумусовых кислот. Все ^{13}C ЯМР спектры регистрировали на ЯМР спектрометре VXR-400 (Varian) на рабочей частоте 400 МГц. Навеска препарата – 100 мг, растворитель – 0.1 М NaOD (3 мл), 8 мм датчик. Результаты количественной обработки спектров всех исследованных препаратов приведены в таблице 4.1. На рис. 4.4 показано распределение углерода по девяти основным структурным фрагментам для восьми классов гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава: торфяные ФК, ГК и ГФК, почвенные ГК и ФК, ГК угля, ГК чернозема и ГФК природных вод, – в виде редуцированных спектров. Такое представление данных позволяет выделить характерные черты той или иной группы препаратов, создать их зрительный образ. В Приложении 4.2 приведены основные статистические характеристики полученных данных по распределению углерода в структуре гумусовых кислот для выборок препаратов, сгруппированных по сходному источнику происхождения и фракционному составу.

Как видно из приведенных в табл. 4.2 и на рис. 4.4 данных, наиболее сильно исследованные препараты гумусовых кислот различаются по соотношению ароматических и углеводных фрагментов, входящих в состав углеродного скелета. Наиболее уникальный структурно-групповой состав характерен для ГК угля – максимальное содержание ароматического углерода (до 70 %) при практически полном отсутствии углеводных фрагментов. Это позволяет предположить наличие поликонденсированных структур в составе данных соединений и их высокую гидрофобность. Высокое содержание ароматического углерода (иногда сопоставимое с ГК угля) характерно для ГК черноземов. Однако, в отличие от угля, в них присутствуют углеводные фрагменты, в состав которых входит от 8 до 13% углерода. ГК дерново-подзолистых ($\text{П}^{\text{д}}$) и серых лесных (Л) почв существенно отличаются от черноземов. Содержание ароматического углерода в них не превышает 45%, тогда как содержание углерода углеводных фрагментов достигает 15-20%. Почвенным ГК весьма близки по распределению углерода ГК и ГФК торфа. ФК почв весьма отличны от ГК и характеризуются самым высоким содержанием углерода карбоксильных (сложноэфирных) групп – до 22%, содержание ароматического углерода не превышает 40%, а в состав углеводных фрагментов входит 20-25% углерода. ФК торфа содержат еще больше углеводных фрагментов, чем ФК почв: для верховых торфов величина $S_{\text{АККО}}$ достигает максимума – 40%. В тоже время для низинных торфов

Распределение углерода по структурным фрагментам (в % от общего содержания углерода) в препаратах гумусовых кислот

Препарат	Распределение углерода, % от общего С										
	C=O	COO	C _{Ar} O	C _{Ar}	OCO	CNO	CH ₂ O	CH ₃ O	CH _n	ΣC _{Ar}	ΣC _{Carb}
ГФК торфа											
PHF-T10L94	2.4	17.3	15.3	32.0	1.2	9.0	2.1	4.2	16.6	47.3	12.3
PHF-T10L98	2.6	17.0	6.9	27.5	3.7	13.0	3.9	4.4	20.9	34.3	20.7
PHF-T1H94	2.1	15.1	12.1	33.2	4.3	12.5	2.5	2.1	16.1	45.4	19.3
PHF-T3L98	4.8	14.2	8.0	38.3	1.6	7.5	2.3	3.7	19.8	46.2	11.4
PHF-T4H94	0.5	13.4	17.2	29.4	2.9	16.1	2.8	2.6	15.9	46.6	21.8
PHF-T4H98	5.1	12.3	8.2	25.9	6.0	17.1	3.3	2.4	19.7	34.1	26.4
PHF-T5H94	2.0	15.7	17.3	28.9	4.6	8.6	2.3	2.4	18.2	46.2	15.4
PHF-T6H94	1.9	15.3	13.3	34.8	2.9	10.5	2.0	3.1	16.2	48.1	15.4
PHF-T6H98	4.7	10.8	8.6	24.8	6.9	19.1	5.5	1.7	17.9	33.4	31.5
PHF-T7H94	2.5	15.0	14.3	35.3	3.4	9.8	1.3	2.7	16.0	49.5	14.5
PHF-T7H98	3.6	12.0	9.2	26.3	0.5	22.7	4.3	3.2	18.1	35.5	27.5
PHF-TH94	1.3	15.5	13.8	33.0	3.5	10.7	1.8	3.6	16.8	46.9	16.0
PHF-TMu4H	2.0	16.6	12.7	25.8	6.8	16.2	3.0	3.0	13.8	38.5	26.1
PHF-TTL94	2.4	17.0	16.1	29.5	3.0	8.4	2.6	4.5	17.4	45.5	14.0
PHF-TTL98	7.3	15.4	10.5	24.9	5.6	11.0	2.7	3.5	19.1	35.4	19.3
ГК торфа											
PHA-T10L98	4.0	16.1	8.1	25.0	2.3	14.1	3.3	4.4	22.7	33.1	19.6
PHA-T5H98	2.3	12.8	6.7	32.2	4.3	12.4	3.4	3.9	22.0	38.8	20.1
PHA-T6H98	1.7	8.6	7.2	35.4	2.6	12.3	2.7	4.0	25.7	42.5	17.6
PHA-T7H98	4.1	11.0	9.4	31.7	3.7	14.2	2.7	3.4	19.8	41.1	20.7
PHA-TH8	1.6	17.5	20.6	37.9	1.7	3.7	1.0	2.6	13.3	58.6	6.4
PHA-THTO	2.6	15.0	16.5	32.1	1.1	11.6	2.2	4.1	14.8	48.6	15.0
PHA-TTL98	4.5	14.1	9.2	32.7	1.7	8.2	2.5	6.5	20.5	42.0	12.4
ФК торфа											
PFA-T10L98	3.5	9.8	8.8	30.2	3.7	12.7	2.3	4.1	24.9	38.9	18.8
PFA-T4H98	1.1	12.1	4.9	21.6	5.8	24.7	5.6	2.6	21.6	26.5	36.1
PFA-T5H98	3.0	15.2	8.1	24.3	6.2	26.6	2.2	1.2	13.2	32.3	35.1
PFA-T6H98	1.6	10.9	6.9	24.4	6.9	26.1	3.1	1.8	18.3	31.3	36.1
PFA-T7H98	2.2	11.8	10.9	24.0	9.6	24.1	3.5	2.0	11.9	34.9	37.2
PFA-TTL98	3.9	18.9	7.0	25.1	5.4	12.3	2.8	3.2	21.4	32.1	20.5
ГФК почв											
SHF-Co94	0.8	18.4	13.1	31.9	4.0	11.0	3.0	4.0	14.2	45.0	18.0
SHF-CtV98	2.2	15.4	7.4	41.7	7.4	10.5	2.6	0.7	12.1	49.1	20.5
SHF-PMu9	3.8	16.8	14.0	26.2	3.0	11.0	2.7	3.6	18.7	40.3	16.7
SHF-Pw98	1.5	12.9	8.2	35.8	3.0	4.8	1.7	3.2	28.9	44.0	9.5
SHF-TMu12	1.7	9.0	4.4	32.6	3.0	12.0	3.7	7.4	26.1	36.9	18.7

Препарат	Распределение углерода, % от общего С										
	C=O	COO	C _{Ar} O	C _{Ar}	OCO	CHO	CH ₂ O	CH ₃ O	CH _n	ΣC _{Ar}	ΣC _{Carb}
ГК почв											
SHA-Cm94	1.5	14.3	8.7	48.1	2.0	6.0	0.8	4.6	14.2	56.8	8.8
SHA-Cmg	2.2	15.3	9.8	45.8	2.0	4.0	1.6	4.6	15.0	55.7	7.6
SHA-CtV94	3.0	15.0	11.0	43.0	3.0	7.0	2.0	3.0	13.0	54.0	12.0
SHA-CtV98	3.2	15.6	11.4	40.8	2.0	8.0	2.8	3.6	12.6	52.3	12.7
SHA-Gp94	2.0	15.0	12.0	34.0	3.0	10.0	1.0	4.0	19.0	46.0	14.0
SHA-Gw94	1.0	19.0	13.0	35.0	2.0	8.0	2.0	4.0	16.0	48.0	12.0
SHA-Gw98	2.1	17.9	7.1	30.0	2.1	10.3	2.3	6.6	21.4	37.1	14.8
SHA-Pg94	1.1	15.2	12.8	32.8	3.0	10.0	2.1	5.8	17.5	45.6	15.1
SHA-Pg96	2.0	17.0	11.0	31.0	2.0	10.0	2.0	4.0	22.0	42.0	14.0
SHA-Pg98	2.5	14.4	9.7	28.6	2.8	12.2	3.1	4.9	21.8	38.3	18.0
SHA-Pp94	1.9	15.6	11.7	32.1	4.0	9.3	2.5	5.6	17.3	43.8	15.8
SHA-Pp96	3.0	17.0	10.0	21.0	4.0	12.0	3.0	5.0	25.0	31.0	19.0
SHA-Pw94	1.0	17.0	13.0	33.0	2.0	8.0	2.5	5.5	17.0	46.0	12.5
SHA-Pw96	4.0	19.0	9.0	25.0	2.0	8.0	2.0	4.0	26.0	34.0	12.0
SHA-Pw98	2.5	17.7	7.0	26.7	4.1	10.2	3.5	5.3	23.1	33.7	17.8
SHA-PwN	2.0	15.0	13.0	30.0	3.0	11.0	2.0	5.0	19.0	43.0	16.0
ФК почв											
SFA-Pg96	3.1	18.0	13.1	28.2	2.0	11.0	2.4	4.2	17.6	41.3	15.4
SFA-Pp96	2.0	23.0	7.0	19.0	3.0	15.0	3.0	4.0	22.0	26.0	21.0
SFA-Pw96	4.0	19.5	9.8	23.5	2.0	10.0	2.5	3.5	25.1	33.3	14.5
SFA-Pw98	3.4	19.8	7.6	25.5	2.3	9.9	2.0	4.5	25.1	33.1	14.2
ГФК почвенного раствора											
SDFA-BS1	3.0	16.0	11.0	38.0	2.0	8.0	2.0	4.0	16.0	49.0	12.0
ГК углей											
CHA-AGK	0.5	16.9	10.0	47.8	0.0	0.0	1.0	3.0	20.8	57.8	1.0
CHA-ALD	1.0	15.0	13.0	43.0	0.0	0.0	1.0	6.0	21.0	56.0	1.0
CHA-RO	2.9	17.7	17.9	48.0	0.0	1.1	0.1	1.6	10.8	65.9	1.2
CHA-K1	3.1	15.2	19.3	38.0	4.8	6.9	1.0	2.7	8.9	57.3	12.7
CHA-K3	2.7	16.6	19.0	52.8	2.1	1.1	0.1	0.2	5.2	71.9	3.3
ГФК природных вод											
AHF-RI	2.0	18.3	11.8	26.2	3.0	11.0	2.1	3.9	22.0	38.1	16.1
AHF-RM	3.3	18.9	10.0	24.7	3.0	7.0	2.7	6.1	24.0	34.7	12.7
ФК природных вод											
AFA-HO10	1.0	18.0	13.0	30.0	4.0	12.0	1.0	3.5	17.5	43.0	17.0
AFA-FG1	0.8	15.9	8.5	24.6	4.0	9.4	3.4	7.2	26.1	33.1	16.8
РОВ природных вод											
ADOM-SMu4	1.9	16.9	10.7	18.9	6.0	9.0	15.0	4.1	17.7	29.6	30.0
ГФК донных отложений											
BHF-SMu4	2.0	16.5	12.5	26.0	5.0	20.0	3.0	2.0	13.0	38.5	28.0

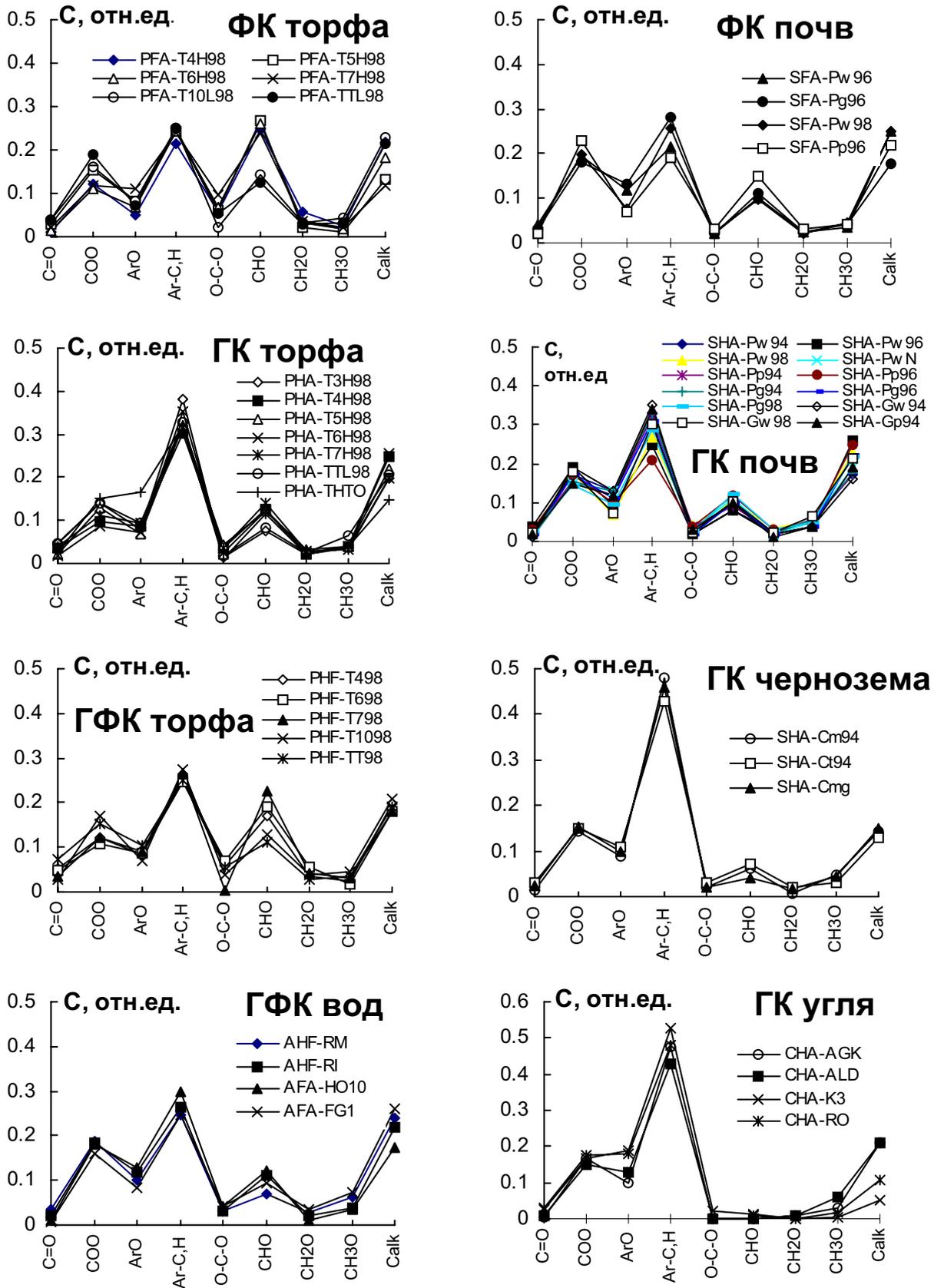


Рис. 4.4. Распределение углерода в гумусовых кислотах различного происхождения и фракционного состава.

(PFA-T10L98 и PFA-TTL98) этот показатель составляет 24-25%, будучи на уровне почвенных ФК. Тем самым ФК верхового торфа образуют второй экстремум – по содержанию углеводного углерода, и должны характеризоваться высокой гидрофильностью. Следовательно, можно сделать вывод о том, что ГК угля и ФК торфа представляют собой два граничных класса гумусовых кислот с максимальным содержанием ароматических и углеводных фрагментов, соответственно. Все остальные классы гумусовых кислот занимают по этим показателям промежуточное положение. Для ГК вод наблюдается самое высокое содержание алкильного углерода (до 25%), довольно высокие значения этой величины (до 22%) характерны и для двух других низкомолекулярных, гидрофильных классов гумусовых кислот – для ФК почв и торфа.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что в структуре ГК угля, почв и торфа преобладают каркасные (ароматические) фрагменты с относительно небольшим вкладом углеводной периферии (в ГК угля она отсутствует полностью). При этом наличие аномального углерода свидетельствует о том, что, по крайней мере, часть углеводной периферии представлена олигосахаридными фрагментами. В тоже время вклад углеводной компоненты в структуру ФК почв и, особенно, верхового торфа, значительно выше. По-видимому, именно с этим связана гораздо более высокая растворимость данных соединений, в частности, тот факт, что они остаются в растворе даже при протонировании ионогенных групп. Можно предположить, что аналогичным образом меняется и гидрофобность гумусовых кислот, достигая максимума для ГК угля и минимума – для ФК торфа.

Таким образом, в результате выполненного исследования установлены условия регистрации количественных ^{13}C ЯМР спектров гумусовых кислот. Получен обширный массив (67 препаратов) интегральных дескрипторов структурно-группового состава гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава. Выявлены закономерности строения гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава.

4.1.4 ПМР-определение водорода в составе скелетных фрагментов и функциональных групп гумусовых кислот

Водород является следующим по значимости структурообразующим элементом гумусовых кислот после углерода. Поэтому определение интегральных характеристик его распределения между фрагментами структуры гумусовых кислот могло бы существенно дополнить набор ^{13}C ЯМР дескрипторов структурно-группового состава. Для спектроскопии ПМР не существует проблемы регистрации количественных спектров. Основными препятствием для получения информации о содержании атомов Н

с данным химическим окружением в процентах от общего их содержания в препарате из ПМР спектра гумусовых кислот является, во-первых, трудность регистрации разделенных сигналов подвижных ОН-протонов функциональных групп (COOH, ArOH, AlkOH); во-вторых, определение вклада остаточных протонов дейтерорастворителя в величину общего интеграла спектра ПМР. Это связано с трудностью регистрации в ПМР-спектре сигналов протонов функциональных групп (подвижных ОН-протонов) из-за процессов быстрого (в шкале времени ЯМР) обмена между протонами функциональных групп, гигроскопической воды и остаточными протонами растворителя. Поэтому на момент постановки данных исследований использование спектроскопии ПМР для анализа гумусовых кислот ограничивалось, в основном, определением распределения водорода углеродного скелета. Соответствующие публикации подробно обсуждены в обзоре литературы. Для преодоления указанных проблем нами был проведен ПМР-эксперимент, результаты которого легли в основу ПМР-методики определения функциональных групп немодифицированных препаратов гумусовых кислот, разработанной нами впервые. Данная часть работы подробно изложена в соответствующей публикации [Ковалевский и др., 2000].

Разработку ПМР методики определения Н в составе скелетных фрагментов (С-Н протоны) и функциональных групп (ОН-протоны) основывали на трех основных предпосылках: (1) о возможности регистрации разделенных сигналов подвижных протонов в ПМР спектре гумусовых кислот в условиях медленного (в шкале времени ЯМР) обмена, (2) о возможности полного сдвига сигналов ОН-протонов в область слабого поля путем создания условий ускоренного обмена (кислотный катализ), и (3) об отсутствии Н-D обмена скелетных протонов в условиях ускоренного обмена.

В случае справедливости этих предпосылок можно предложить следующую схему совместного определения подвижных и скелетных протонов:

(1) создать условия медленного обмена (путем использования безводного апротонного растворителя), получить спектр гумусовых кислот, где сигналы COOH, ArOH и AlkOH протонов разделены;

(2) создавать условия ускоренного обмена (путем добавления сильной кислоты), получить спектр, в котором сигналы ОН-протонов сдвинуты в область слабого поля, и не перекрываются с сигналами скелетных протонов;

(3) с помощью сопоставления полученных спектров оценить соотношение ОН и СН протонов в областях перекрывания первого спектра;

(4) определить величину общего интеграла протонов гумусовых кислот путем регистрации третьего спектра этого же препарата в

дейтерорастворителе, остаточные протоны которого имеют существенно различный химсдвиг (например, NaOD/D₂O), и определить соотношение интеграла области протонов гумусовых кислот, включающей сигнал остаточных протонов растворителя, к интегралу этой области, обусловленной только протонами гумусовых кислот.

Предложенную схему реализовывали следующим образом. Замедления обмена протонов в растворе гумусовых кислот добивались за счет (1) использования апротонного растворителя, (2) удаления гигроскопической влаги из образца и растворителя, (3) изолирования безводного образца и растворителя от контакта с атмосферной влагой.

При этом в качестве апротонного растворителя использовали ДМСО-d₆. Его выбор был обусловлен двумя причинами. Во первых, максимальной растворимостью гумусовых кислот в ДМСО-d₆ по сравнению с другими органическими растворителями, что позволяет уменьшить вклад сигнала остаточных протонов растворителя в общий интеграл спектра и повысить точность интегрирования. Во-вторых, единственный сигнал остаточных протонов ДМСО, в отличие от ДМФА, в котором также растворяются гумусовые кислоты, находится в области высокого поля (2.49 м.д.), не перекрываясь с сигналами подвижных протонов. Удаление гигроскопической влаги из ДМСО-d₆ (99% D, “Изотоп”, Санкт Петербург) проводили путем кипячения с СаН₂. ДМСО-d₆ производства фирмы “Merck” изотопной чистоты 99.95% с содержанием воды не более 0.02% использовали без предварительной очистки.

Гигроскопическую влагу из образца гумусовых кислот удаляли, откачивая твердый образец в глубоком вакууме (10⁻² мм Hg) при 40 °С в течение 6 часов. Данные условия были выбраны на основании нашего опыта работы по определению влажности гумусовых кислот методом обратного набора веса (глава 3), их соблюдение позволяет практически полностью удалить гигроскопически связанную воду из образца. Во избежание контакта с атмосферной влагой растворы гумусовых кислот в ДМСО-d₆ готовили в сосудах Шленка с применением стандартной вакуумной техники. Приготовленные растворы запаивали в ЯМР ампулы и регистрировали ПМР-спектры в условиях медленного обмена (рис. 4.5а).

После съемки спектра ампулы вскрывали и на воздухе вносили CF₃COOD для создания условий ускоренного обмена. При этом количество кислоты, необходимое для полного сдвига подвижных протонов в область слабого поля, зависело от зольности проб и составляло для низкозольных проб 20 мкл, а для высокозольных – 40 мкл. Соответствующий спектр приведен на рис. 4.5б.

Для определения вклада остаточных протонов ДМСО-d₆ в общий интеграл спектра гумусовых кислот проводили регистрацию того же образца в 0.1 М NaOD/D₂O. Сигнал остаточных протонов данного растворителя (пик HDO) располагается при 4.2 м.д., не перекрываясь с сигналом CD₂H-групп ДМСО, и не маскирует α-СН протоны гумусовых кислот (рис. 4.5в).

Все ПМР-спектры гумусовых кислот различного фракционного состава и происхождения регистрировали в 0.1 М NaOD в 5 мм ампулах на ЯМР спектрометре VXR-400 (Varian), с рабочей частотой 400 МГц для ядра ¹H.

Типичный набор полученных согласно вышеизложенной схеме ПМР-спектров гумусовых кислот в ДМСО-d₆; ДМСО-d₆ с добавкой CF₃COOD и в 0.1 М NaOD/D₂O для препарата PFA T5 приведен на рис. 4.5. Отнесение сигналов дано в табл. 4.3.

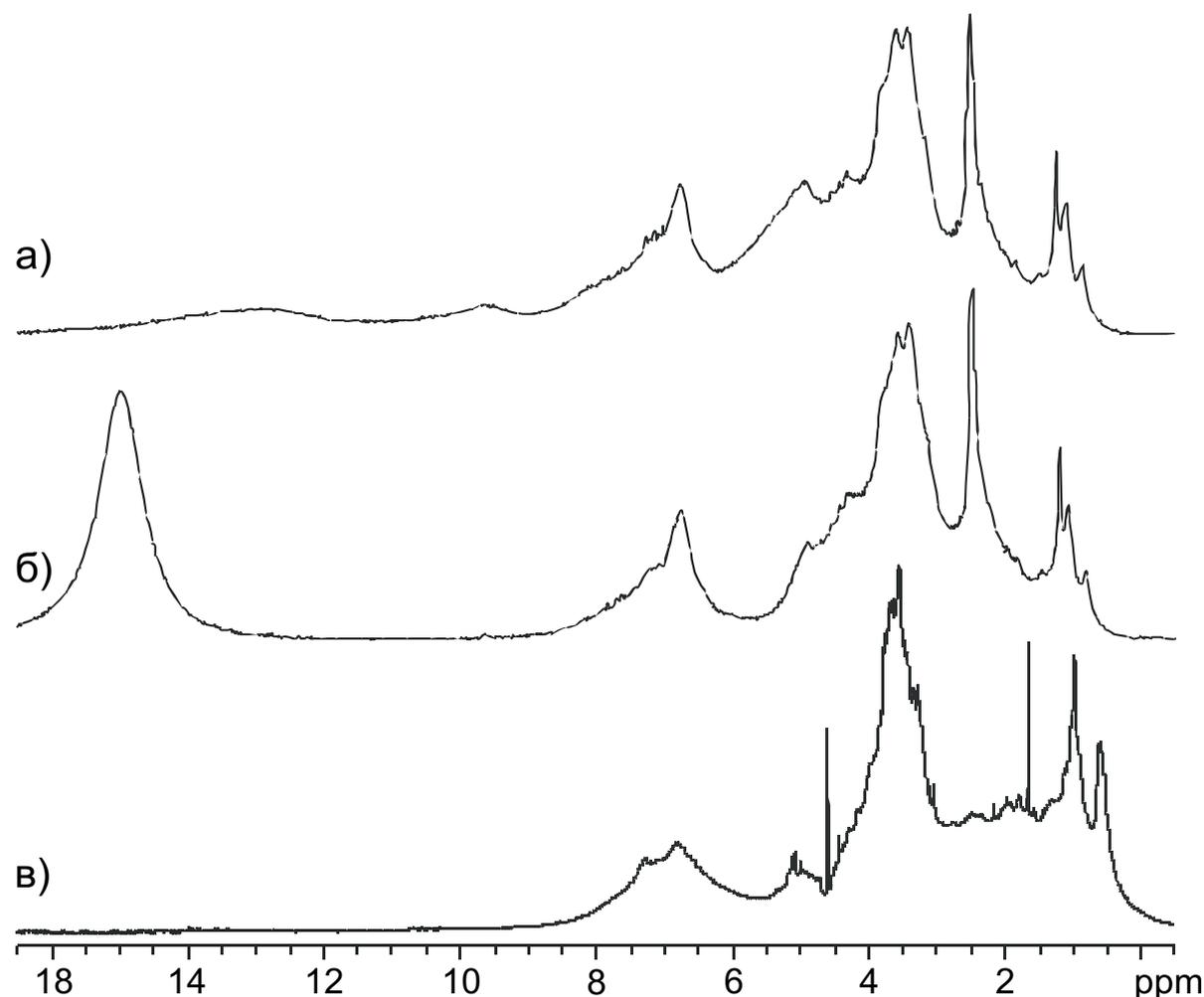


Рис. 4.5. Набор спектров ПМР для препарата PFA T5.

- а) ДМСО-d₆,
- б) ДМСО-d₆ + CF₃COOD,
- в) D₂O/NaOD.

Отнесение сигналов в спектрах ПМР гумусовых кислот в различных растворителях

Спектр	Спектральные области, м.д.					
	16.5-11.5	11.5-6	6-4.48	4.48-3.2	3.2-2.05	2.05-0.5
DMCO-d ₆	COOH	ArOH +ArH	AlkOH+ CHO		α-CH+DMCO	AlkH
DMCO-d ₆ + CF ₃ COOD	COOH	ArH	CHO		α-CH+DMCO	AlkH
0.1M NaOD/D ₂ O	–	ArH	HDO*	CHO*	α-CH	AlkH

* пики частично перекрываются.

В первом спектре (рис. 4.5a) отчетливо виден сигнал COOH в области 10-12 м.д., что говорит о достижении в растворе условий медленного обмена. При этом сигналы протонов фенольных гидроксидов ArOH перекрываются со скелетными ArH протонами, сигналы AlkOH протонов – со скелетными HCO протонами карбогидратных фрагментов, а пик остаточных протонов DMCO частично закрывает область α-CH-протонов. Соответствующие отнесения даны табл. 4.3.

Непосредственное наблюдение сигналов подвижных протонов возможно при помощи H, H EXSY двумерной спектроскопии. Данная методика позволяет регистрировать корреляционные сигналы связанных спиновых систем благодаря ЯЭО или химическому обмену. В спектре H, H EXSY ФК в DMCO-d₆ (рис. 4.6) благодаря замедленному обмену можно наблюдать корреляционные пики COOH и спиртовых OH в области 12.5/4.5 м.д., спиртовых и фенольных OH в области 4.5/8 м.д., а также COOH и фенольных OH при 12.5/8 м.д. Помимо этого, в приведенном спектре можно отметить выраженные узкие сигналы иона аммония при 7 м.д., также дающие корреляционные пики с подвижными протонами. Следует отметить низкую интенсивность корреляционных сигналов протонов фенольных гидроксидов, которая может свидетельствовать об отличающейся для этих групп скорости протонного обмена. Таким образом, отнесение протонов функциональных групп, приведенное в табл. 4.3 было доказано непосредственным их наблюдением в двумерном спектре. Однако такие двумерные спектры априори не количественны, поэтому для количественного определения функциональных групп требуется обработка одномерных ПМР спектров по изложенной ниже схеме.

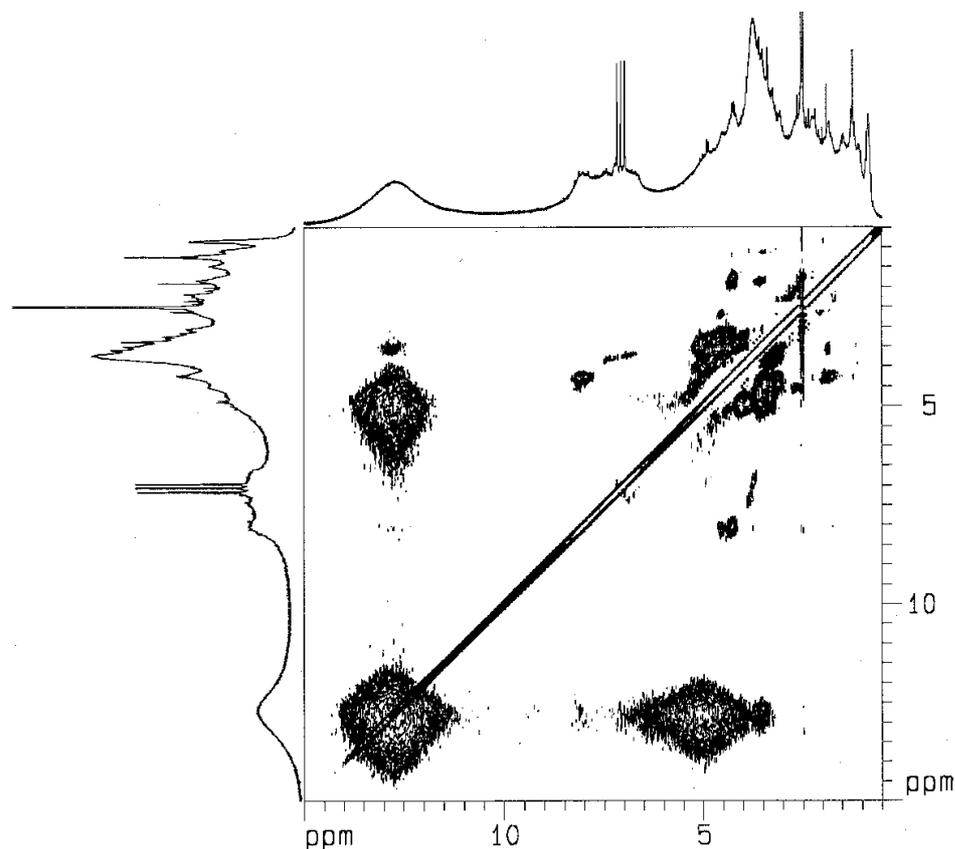


Рис. 4.6. Двумерный спектр ^1H , ^1H EXSY препарата SFA-Pw96 в DMSO-d_6 .

Характер изменения спектра при добавлении CF_3COOD (рис. 4.5б) указывает на условия ускоренного обмена: наблюдается возрастание интенсивности области 16.5-14 м.д. за счет областей 11.5-6 м.д. и 6-3.2 м.д., а также добавления остаточных протонов CF_3COOD . Пик в области 16.5-14 м.д. обусловлен протонами ArOH и AlkOH , которые в условиях ускоренного обмена дают с остаточными протонами кислоты общий пик, смещенный в слабое поле из-за наличия избытка кислоты. При условии полноты сдвига в областях 11.5-6 и 6-4.48 м.д. остаются только скелетные протоны ArH и HCO , соответственно. Интенсивность сигналов алифатических протонов (часть которых закрыта пиком остаточных протонов DMSO) остается неизменной.

В спектре гумусовых кислот в 0.1M $\text{NaOD/D}_2\text{O}$ (рис. 4.5в) максимум пика остаточных протонов растворителя (HDO) располагается при 4.8 м.д. Это позволяет наблюдать $\alpha\text{-CH}$ -протоны гумусовых кислот в области 3.2-2.05 м.д., закрытые остаточными протонами DMSO-d_6 . При этом интегральная интенсивность пика HDO (6-4.48 м.д.) включает в себя все подвижные протоны и частично закрывает область HCO -протонов.

Обработка ПМР спектров для расчета распределения водорода в структуре гумусовых кислот. Сопоставление спектров в ДМСО-d₆ и ДМСО-d₆ с добавкой CF₃COOD открывает возможность отдельного определения вклада скелетных и подвижных протонов в интегральные интенсивности интервалов 11.5-6 и 6-3.2 в спектре гумусовых кислот в ДМСО-d₆ (рис. 4.5а). Для проведения такого сопоставления необходимо выполнить нормирование интегральных интенсивностей данных областей спектров на интенсивность сигналов областей, остающихся неизменными в данных условиях. Необходимость данной процедуры вызвана тем, что общее количество протонов в образце увеличивается за счет добавления остаточных протонов CF₃COOD. В качестве реперных областей можно использовать AlkH, α-CH или всю алифатическую область. С нашей точки зрения, использование для этой цели области 2.05-3.2 м.д. (α-CH) более обосновано, так как в ней находится интенсивный пик остаточных протонов ДМСО. В связи с этим результаты интегрирования указанной области меньше зависят от качества фазирования и установки нулевой линии. Формулы расчета относительных содержаний подвижных и скелетных протонов в данных областях приведены ниже.

$$\frac{\text{ArOH}}{\text{ArH}} = \frac{I_{11.5-6}^{\text{DMSO}} \cdot I_{3.2-2.05}^{\text{DMSO}+\text{CF}_3\text{COOD}}}{I_{11.5-6}^{\text{DMSO}+\text{CF}_3\text{COOD}} \cdot I_{3.2-2.05}^{\text{DMSO}}} - 1 \quad (4.1)$$

$$\frac{\text{AlkOH}}{\text{HCO}} = \frac{I_{6-3.2}^{\text{DMSO}} \cdot I_{3.2-2.05}^{\text{DMSO}+\text{CF}_3\text{COOD}}}{I_{6-3.2}^{\text{DMSO}+\text{CF}_3\text{COOD}} \cdot I_{3.2-2.05}^{\text{DMSO}}} - 1 \quad (4.2)$$

где I_{Δ}^{DMSO} и $I_{\Delta}^{\text{DMSO}+\text{CF}_3\text{COOD}}$ – относительные интенсивности диапазонов в спектрах в ДМСО-d₆ и ДМСО-d₆ + CF₃COOD, соответственно.

Применение описанной выше процедуры нормирования позволяет рассчитать соотношения ArOH/ArH и AlkOH/HCO. Однако из-за присутствия остаточных протонов ДМСО-d₆ в обоих спектрах невозможно вычислить абсолютные количества соответствующих протонов в структуре гумусовых кислот. Данную проблему можно решить путем сопоставления спектров в ДМСО-d₆ и NaOD/D₂O, вычисляя отношение интенсивностей сигналов α-CH-протонов и остаточных протонов ДМСО, перекрывающихся в первом спектре. При этом нормирование проводится на область CH-протонов, которая не изменяется при переходе от одного растворителя к другому:

$$\frac{H_{\text{DMSO}}}{\alpha\text{-CH}_n} = \frac{I_{3.2-2.05}^{\text{DMSO}} \cdot I_{2.05-0.5}^{\text{NaOD}/\text{D}_2\text{O}}}{I_{3.2-2.05}^{\text{NaOD}/\text{D}_2\text{O}} \cdot I_{2.05-0.5}^{\text{DMSO}}} - 1 \quad (4.3)$$

Описанная процедура дает возможность вычесть из спектра в ДМСО-d₆ сигнал остаточных протонов растворителя и рассчитать абсолютные величины содержаний каждого из рассмотренных типов протонов в структуре гумусовых кислот.

При использовании ДМСО-d₆ высокой изотопной чистоты, характеризующегося постоянством изотопного состава (например, использовавшегося нами ДМСО-d₆ производства фирмы Merck, 99.95 ат.%D) можно избежать необходимости регистрации спектров в NaOD/D₂O. В этом случае долю сигналов α остаточных протонов ДМСО в интегральной интенсивности спектра можно рассчитать как

$$\alpha_{\text{ДМСО}} = (m_{\text{ДМСО}} \times N_{\text{ДМСО}}) / (m_{\text{ДМСО}} \times N_{\text{ДМСО}} + m_{\text{ГФК}} \times N_{\text{ГФК}}) \quad (4.4)$$

где $m_{\text{ДМСО}}$ и $m_{\text{ГФК}}$ – масса ДМСО-d₆ и навески препарата гумусовых кислот, соответственно;

$N_{\text{ДМСО}}$ и $N_{\text{ГФК}}$ – массовое содержание протонов в ДМСО-d₆ и препарате гумусовых кислот, соответственно.

В условиях нашего эксперимента – навеска гумусовых кислот 10-15 мг с содержанием водорода 3.5-5% и количество ДМСО-d₆ 0.7 мл 99.95 ат.%D – сигнал остаточных протонов ДМСО составлял от 2 до 5% общей интенсивности спектра.

Основные этапы предложенной схемы ПМР-определения протонов в составе скелетных фрагментов и функциональных обобщены на рис. 4.7.

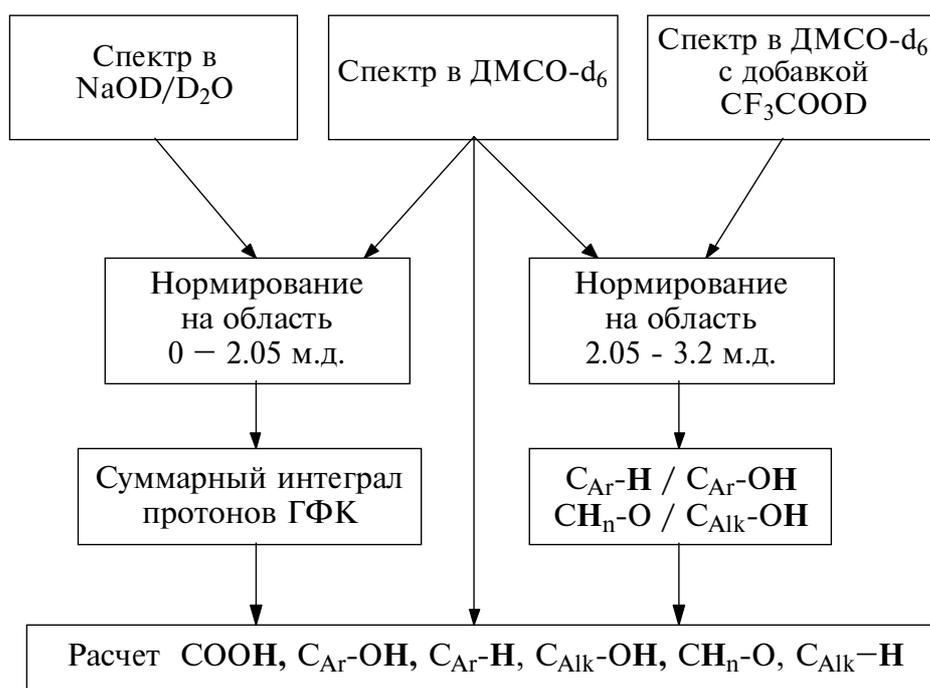


Рис. 4.7. Схема ПМР-определения протонов в составе скелетных фрагментов и функциональных групп гумусовых кислот.

До применения описанной схемы на практике для определения распределения водорода в структуре гумусовых кислот необходимо было проверить справедливость основных предпосылок, на которых базируется предложенная схема, а именно, о возможности полного разделения сигналов скелетных и подвижных протонов путем добавления избытка сильной кислоты и отсутствии H/D обмена для скелетных протонов в условиях

ускоренного обмена. Для этой цели проводили эксперименты, описанные ниже.

Проверка полноты разделения сигналов подвижных и скелетных протонов при добавлении CF_3COOD и отсутствия Н-Д обмена для скелетных протонов. Для доказательства полноты сдвига подвижных протонов при добавлении CF_3COOD были проведены эксперименты на модельных соединениях, в качестве которых были выбраны 2,4-дигидроксibenзойная кислота (содержащая COOH , ArOH и ArH протоны) и полидекстран (AlkOH и HCO).

В спектре 2,4-дигидроксibenзойной кислоты в отсутствие CF_3COOD наблюдались три сигнала подвижных протонов: при 12.2 м.д. (COOH), 11.3 м.д. (орто-ОН) и 10.3 м.д. (пара-ОН). При последовательном добавлении аликвотных частей (10 мкл) кислоты эти сигналы смещались в слабое поле, и в итоге сливались в один пик при 13.4 м.д.. При этом рассчитанная по приведенной выше схеме доля фенольных протонов в области 11.5-6 м.д. составила 40%, что точно соответствует теоретическому значению.

В спектре полидекстрана присутствовало несколько пиков спиртовых ОН-протонов в области 4.2-5.2 м.д., которые при добавлении CF_3COOD аналогичным образом смещались в область слабого поля. Рассчитанная доля спиртовых протонов составила 32.5%, что хорошо согласуется с расчетным значением для идеальной структуры полидекстрана (30%).

Таким образом, эксперименты на модельных соединениях подтвердили, что:

- в DMCO-d_6 протоны COOH , ArOH и AlkOH находятся в условиях медленного (в шкале времени ЯМР) обмена, что позволяет наблюдать их разделенные сигналы;
- добавление избытка CF_3COOD вызывает количественный переход сигналов подвижных протонов в слабое поле, что позволяет провести определение перекрывающихся с ними сигналов скелетных протонов.

Корректность предложенного метода разделения сигналов подвижных и скелетных протонов путем добавления избытка CF_3COOD была также проверена с помощью регистрации спектра препарата гумусовых кислот, предварительно обмененного с D_2O . При этом сопоставляли количество протонов, обменивающихся на дейтерий при взаимодействии с D_2O , и количество протонов, сигналы которых сдвигаются в слабое поле при добавлении CF_3COOD . Путем сопоставления спектров исходного и дейторообмененного препарата рассчитывали соотношения ArOH/ArH и AlkOH/HCO , которые составили 0.48 и 0.38, соответственно. Рассчитанные соотношения были сопоставлены с полученными при расчете по уравнениям (4.1, 4.2), которые для этого препарата составили 0.45 и 0.37, соответственно.

Это показывает, что при добавлении CF_3COOD к раствору гумусовых кислот в DMCO-d_6 слабый сдвиг претерпевают только сигналы подвижных протонов, а положение и интенсивность сигналов скелетных протонов гумусовых кислот не изменяются.

Количество кислоты, обеспечивающее полный сдвиг подвижных протонов в область слабого поля, определяли последовательным добавлением аликвотных частей (10 мкл) CF_3COOD к раствору препарата гумусовых кислот в DMCO-d_6 . Установлено, что для навески 15 мг для большинства препаратов полнота сдвига достигается при внесении 20 мкл кислоты. При дальнейшем добавлении кислоты в области спектра 10.5-0.5 м.д. изменений не происходит. Однако для наиболее зольных препаратов (7-12%) внесение 20 мкл CF_3COOD оказалось недостаточным. По-видимому, это связано с образованием солей с зольными компонентами гумусовых кислот. В данном случае происходит неполный сдвиг подвижных протонов в слабое поле и их общий широкий сигнал наблюдается при 8-11 м.д. Для достижения полноты сдвига дополнительно вносили 20 мкл CF_3COOD .

Таким образом, проведенные эксперименты показали справедливость исходных предпосылок о возможности полного разделения сигналов скелетных и подвижных протонов путем добавления избытка сильной кислоты, а также об отсутствии Н-Д обмена для скелетных протонов в условиях ускоренного обмена. Это позволяет использовать указанную методику для определения водорода в составе скелетных фрагментов и функциональных групп гумусовых кислот.

В качестве возможных источников ошибок при определении содержания основных типов протонов гумусовых кислот вышеописанным методом можно отметить следующие. Во-первых, определяемое содержание протонов спиртовых гидроксильных групп может быть завышено в связи с присутствием в растворителе следовых количеств воды, поскольку при регистрации спектров гумусовых кислот в DMCO-d_6 слабый сигнал таких количеств H_2O неотличим от сигналов спиртовых ОН протонов. Для предотвращения возникновения значительных погрешностей необходимо проводить оценку содержания влаги в чистом растворителе, регистрируя его спектр ПМР. Сигнал H_2O в спектре использованного в данной работе DMCO-d_6 составлял около 2% от сигнала остаточных протонов растворителя. Поскольку сигнал спиртовых ОН протонов гумусовых кислот составлял от 50 до 100% от сигнала остаточных протонов растворителя, в результате завышение содержания спиртовых ОН групп могла составлять не более 2-4% (отн). Во-вторых, присутствие в препарате гумусовых кислот ионов металлов, обусловленное неполным обессоливанием, влечет за собой недоопределение карбоксильных групп, находящихся в солевой форме. Анализ состава

зольности использовавшихся препаратов гумусовых кислот показал, что содержание металлов не превышало 0.0005 моль на моль водорода, что могло вызывать недоопределение до 6% (отн) карбоксильных групп. Следует отметить, что высокзольные препараты гумусовых кислот плохо растворяются в ДМСО-d₆, что ограничивает возможность применения разработанного метода.

С учетом указанных ограничений предложенная методика была использована для анализа 40 препаратов гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава

4.1.5 Структурно-групповой состав исследованных препаратов гумусовых кислот по данным ПМР

Результаты определения содержания протонов различных типов в 40 исследованных препаратах гумусовых кислот приведены в табл. 4.4. В этой же таблице приведено распределение скелетных протонов. Такой расчет был выполнен, чтобы получить возможность сопоставления наших данных с приводящимися в литературе для спектров в NaOD, где сигналы подвижных протонов не регистрируются. Описательные статистики данных по распределению водорода в препаратах гумусовых кислот, сгруппированных по сходному источнику происхождения и фракционному составу, приведены в Приложении 4.3.

Как следует из полученных результатов, содержание протонов карбоксильных групп в исследованных препаратах гумусовых кислот составляло от 4 до 14 % от суммарного содержания водорода. При этом ФК почв, ГФК поверхностных вод и ГК угля характеризовались более высоким содержанием карбоксилатов по сравнению с ГФК и ГК торфа и ГК почв. Содержание скелетных ароматических протонов было максимальным для ГК угля и чернозема. В расчете на общее содержание скелетных протонов (протонная ароматичность, H_{Ar}) она составляла 33-35%. Для ГФК торфа этот показатель лежал в диапазоне 13-22% и достигал минимальных величин – 9-10% для ГФК вод. Полученные результаты находятся в хорошем соответствии с приводимыми в литературе данными [Ruggiero et al., 1979; Wilson et al., 1983]. В целом можно отметить, что даже для гумусовых кислот с наибольшим содержанием ароматических структур (угли и черноземы) в составе скелетных протонов алифатические преобладают над ароматическими. Это свидетельствует о высокой замещенности углеродного скелета гумусовых кислот. Наибольшее содержание фенольных гидроксилатов (10-17%) было характерно для ГК и ГФК торфа, ненамного меньшие величины наблюдались для ГК почв, ГК угля и ГФК вод. Содержание скелетных НСО протонов было максимальным для препаратов ФК и ГФК верхового торфа. Для этих же препаратов соотношение НСО/AlkОН

составляло от 3 до 4, что указывает на доминирование полисахаридных цепей в их алифатической части. Гораздо более высокие значения НСО/AlkОН наблюдалось для ГФК, ГК и ФК низинных торфов и ГК почв, достигая максимума для ГК угля. Это свидетельствует о высоком вкладе алкоксильных (преимущественно метоксильных) групп в состав алифатической части данных препаратов гумусовых кислот. В ГК угля, все НСО протоны относятся к метоксильным группам.

Полученные данные позволяют сделать вывод о существенном различии в строении гумусовых кислот верховых и низинных торфов. В структуре гумусовых кислот верховых торфов до 60% скелетных протонов находятся в составе нетрансформированных олиго- или полисахаридных цепочек, тогда как для низинных торфов характерен высокий вклад ароматических протонов. Это указывает на большую степень трансформации углеводно-пептидного комплекса гумусовых кислот низинных торфов и, следовательно, на их более глубокую гумификацию. Особенно наглядно различие в строении углеводно-пептидного комплекса гумусовых кислот верховых и низинных торфов проявилось при изучении продуктов их гидролиза методом спектроскопии ЯМР, как будет показано ниже. Помимо различия между торфами, можно отметить весьма специфическую структуру ГК угля и черноземов, углеводный комплекс которых претерпел наибольшую деградацию – в углях он практически полностью отсутствует. В тоже время для ГФК вод характерна наибольшая степень замещения ароматических структур. Наряду с максимальной окисленностью, это указывает на наибольшую степень деградации ароматического каркаса в водных гумусовых кислотах.

Таким образом, в результате проведенных исследований разработана впервые ПМР-методика определения водорода в составе скелетных фрагментов и функциональных групп. Применение данной методики позволило существенно дополнить набор интегральных дескрипторов структурно-группового состава гумусовых кислот за счет данных по содержанию водорода в составе основных структурных фрагментов гумусовых кислот. Получен обширный массив данных (для 40 препаратов) по распределению водорода в структуре гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава.

Таблица 4.4.

Распределение водорода по скелетным фрагментам и функциональным группам гумусовых кислот и распределение водорода по структурным фрагментам углеродного скелета (N_{Ar} , N_{Carb} , N_{Alk}) ($s_r = 0.05-0.1$).

Препарат	Содержание Н, % от общего Н скелетных фрагментов и функциональных групп							Содержание Н, % от общего Н скелетных фрагментов		
	COOH	ArOH	ArH	AlkOH	HCO	AlkH	N_{Ar}	N_{Carb}	N_{Alk}	
	ГФК торфа									
PHF-T398	10	3	20	3	35	29	31	42	27	
PHF-T498	10	13	9	15	31	22	17	50	33	
PHF-T598	6	8	9	9	38	31	12	49	39	
PHF-T698	9	9	9	9	36	28	15	49	36	
PHF-T798	8	4	13	10	35	31	20	45	36	
PHF-T1098	7	8	13	9	35	28	21	46	33	
PHF-TT98	10	9	16	2	34	29	26	43	31	
PHF-T10L94	9	10	14	8	30	29	19	41	40	
PHF-T5H94	8	5	10	9	30	38	13	38	49	
PHF-T6H94	10	10	16	9	29	27	22	40	38	
PHF-T7H94	10	9	16	9	30	26	22	42	36	
PHF-TH94	8	8	13	9	32	30	17	43	40	
PHF-TTL94	9	9	13	9	29	31	18	40	42	
ГК торфа										
PHA-T398	11	17	16	3	24	29	30	34	36	
PHA-T498	7	14	14	2	31	31	23	41	36	
PHA-T598	7	11	14	5	31	31	22	41	37	

Препарат	Содержание Н, % от общего Н скелетных фрагментов и функциональных групп							Содержание Н, % от общего Н скелетных фрагментов		
	COOH	ArOH	ArH	AlkOH	HCO	AlkH	H _{Ar}	H _{Carb}	H _{Alk}	
	PHA-T698	6	6	15	4	38				31
PHA-T798	6	10	12	8	28	35	19	38	43	
PHA-T1094	6	11	17	3	35	29	27	43	30	
PHA-TT98	8	10	18	4	36	32	26	41	32	
PHA-THTO	7	8	12	9	34	30	19	45	37	

ФК торфа

PFA-T398	10	4	11	3	29	38	17	37	46
PFA-T498	10	9	8	8	37	27	13	51	36
PFA-T598	9	7	12	11	38	23	20	52	28
PFA-T698	7	6	13	16	41	16	24	58	18
PFA-T798	6	5	12	11	43	23	19	55	26
PFA-T1098	9	2	16	5	35	34	23	41	36
PFA-TT98	11	7	12	6	33	31	19	44	38

ГК почвы

SHA-Pw94	9	7	14	9	27	34	23	36	41
SHA-Pw96	4	9	10	21	24	31	19	37	45
SHA-Pw98	7	9	12	5	27	39	19	35	46
SHA-PwN	8	7	12	6	29	38	18	37	45
SHA-Pg98	8	5	14	4	32	37	20	38	42
SHA-Cmg	11	9	20	7	22	32	37	30	33

Препарат	Содержание Н, % от общего Н скелетных фрагментов и функциональных групп							Содержание Н, % от общего Н скелетных фрагментов		
	COOH	ArOH	ArH	AlkOH	HCO	AlkH	H _{Ar}	H _{Carb}	H _{Alk}	
	ФК почв									
SFA-Pw96	13	7	9	8	24	39	14	33	52	
SFA-Pw98	10	2	11	6	29	42	16	35	49	
SFA-Pg96	13	8	10	8	27	34	16	38	46	
SFA-Gp98	5	4	4	11	36	40	05	45	50	
SFA-Cm98	9	3	13	8	33	34	20	41	39	
ГФК почв										
SHF-Co94	10	7	13	11	33	26	22	46	32	
ГФК почвенного раствора										
SDFA-BS1	14	9	12	6	29	30	20	41	39	
ГФК природных вод										
AHF-RM	12	5	7	8	28	40	10	37	52	
AHF-RI	13	8	8	7	29	36	12	40	48	
ФК природных вод										
AFA-HO10	11	9	11	9	29	31	18	41	41	
AFA-FG1	11	4	7	9	28	30	12	43	45	
ГК углей										
CHA-AGK	14	7	23	1	13	43	41	16	42	
CHA-ALD	12	8	20	1	20	40	33	25	42	

Сопоставление полученных данных ПМР и спектроскопии ЯМР ^{13}C открывает возможности для расчета содержания ряда структурных фрагментов, непосредственно не определяемых при помощи каждого из упомянутых методов в отдельности. Однако прежде чем перейти к такому расчету, нами была проверена правильность определения кислотных групп по предложенной методике путем сопоставления полученных результатов с данными независимого титриметрического метода.

4.1.6 Определение кислотных групп гумусовых кислот титриметрическими методами

Обратное и заместительное титрование. В обзоре литературы указывалось, что общепринятой методикой определения карбоксильной кислотности гумусовых кислот является Са-ацетатная, а общей кислотности – баритовая. Основными факторами, влияющими на правильность результатов, получаемых с помощью данных методик, являются (1) точность определения точки эквивалентности при титровании избытка $\text{Ba}(\text{OH})_2$ или вытесненной уксусной кислоты; (2) оптимальность соотношения реагент/субстрат; (3) полнота протекания реакции образования гуматов бария и кальция.

Выбор условий анализа, обеспечивающих правильность данных по карбоксильной и общей кислотности гумусовых кислот, полученных с использованием Са-ацетатной и баритовой методики, подробно описан в наших публикациях [Данченко и др., 1998; Данченко и др., 1995], соответственно. Поэтому укажем лишь, что такими условиями являются: (1) определение точки эквивалентности по экспериментальной кривой титрования уксусной кислоты, вытесненной из ацетата кальция, (2) использование соотношений реагент/субстрат, подавляющих протекание обратной реакции: 35-40 ммоль/г ГФК – $\text{Ba}(\text{OH})_2$; 250-400 ммоль/г ГФК – $\text{Ca}(\text{OAc})_2$. Установлено, что при использовании оптимальных соотношений реагент/субстрат по реакции с гидроксидом бария могут быть определены все карбоксильные и не менее 90% фенольных групп гумусовых кислот. Образование растворимых солей с Са не приводит к завышению величин карбоксильной кислотности, если точку эквивалентности определять по экспериментальной кривой титрования.

В указанных условиях определения по Са-ацетатной методике было проанализировано 30 препаратов гумусовых кислот, а по баритовой методике – 12 препаратов. Полученные результаты приведены в табл. 4.5 и табл. 4.6 совместно с данными потенциметрического титрования (рК-спектроскопии) и ПМР-спектроскопии.

Прямое потенциметрическое **титрование.** Для препаратов ФК и ГФК торфа и природных вод были получены кривые прямого потенциметрического титрования в бессолевых растворах.

Поддерживающий электролит не использовали из-за низкой воспроизводимости рК-спектров ГФК в растворах с высокой ионной силой. Концентрация ГФК составляла 1 г/л, что обеспечивало хорошую воспроизводимость кривых титрования и рассчитанных по ним рК-спектров. Типичные кривые прямого потенциометрического титрования ГФК приведены на рис. 4.8.

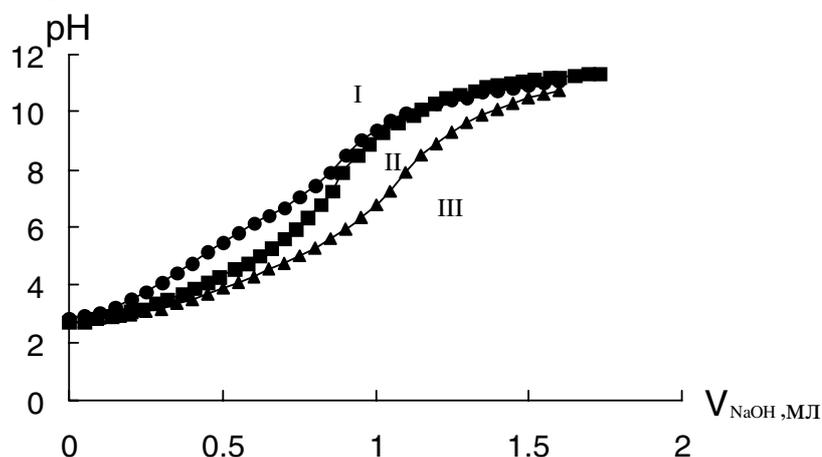


Рис. 4.8. Типичные кривые прямого потенциометрического титрования ГФК: I – торфяные, II – водные, III – почвенные.

Как видно из рис. 4.8, на кривой титрования торфяных ГФК наблюдается два слабо выраженных перегиба, соответствующих, вероятно, последовательной нейтрализации карбоксильных и фенольных групп. В то же время на кривых титрования почвенных и водных ГФК различим лишь один перегиб.

Для обработки кривых титрования использовали метод рК-спектроскопии, теоретические основы которого изложены в соответствующем разделе обзора литературы (1.2.1). Согласно указанному методу полученные титриметрические данные преобразовывали в функции распределения групп по рК (рис. 4.9) с помощью оригинальной компьютерной программы (авторы – А.В. Гармаш и А.В. Кудрявцев), основанной на решении интегрального уравнения кривой титрования с помощью линейного МНК с ограничениями на неотрицательность решений. Алгоритм расчета основан на численном решении относительно q_i (молярная доля групп с константой диссоциации K_i) системы уравнений вида (4.5), записанных для каждой точки кривой титрования.:

$$\alpha = \frac{[H^+] - [OH^-]}{c_0 V_0} (V_0 + V_T) + \frac{c_T V_T}{c_0 V_0} = \sum_{i=1}^N q_i \frac{K_i}{K_i + [H^+]}, \quad (4.5)$$

где α – степень диссоциации поликислоты,

c_0 и V_0 – концентрация и начальный объем титруемого раствора,

c_T и V_T – концентрация и добавленный объем титранта.

Как следует из приведенного уравнения, в качестве исходных данных использовали значения объема титранта и соответствующие значения pH во всех точках кривой титрования, а также начальный объем титруемого раствора V_0 и концентрацию титранта C_T . Набор значений pK от 1 до 12 с шагом 1 был задан априори. Ранее было показано, что использование для полиэлектролитов более высокого разрешения (шаг pK 0.5 и меньше) приводит к неустойчивости решения. В целом наблюдалась хорошая воспроизводимость pK-спектров, рассчитанных из данных параллельных титрований (рис. 4.9).

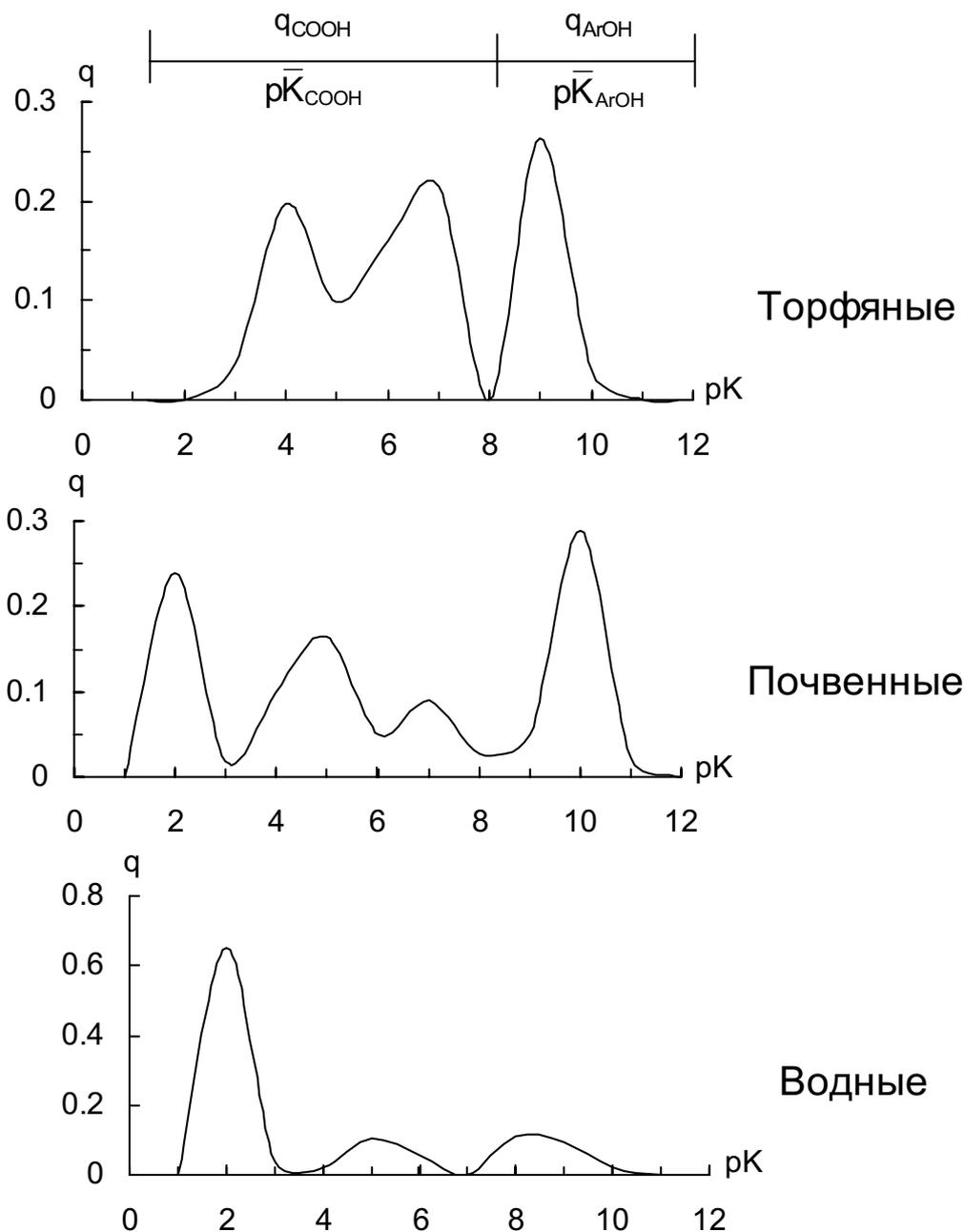


Рис. 4.9. Типичные pK-спектры препаратов ГФК различного происхождения (q – мольная доля групп с данным pK).

pK-спектры торфяных ГФК характеризовались наличием 3-4 максимумов, тогда как для всех водных образцов наблюдалось три максимума с преобладающим вкладом сильнокислотных групп (рис. 4.10). Положение первого пика для большинства образцов при pK = 2 объясняется, скорее всего, падением точности метода в определении величины pK в области значений, близких к граничным (1-2 и 11-12).

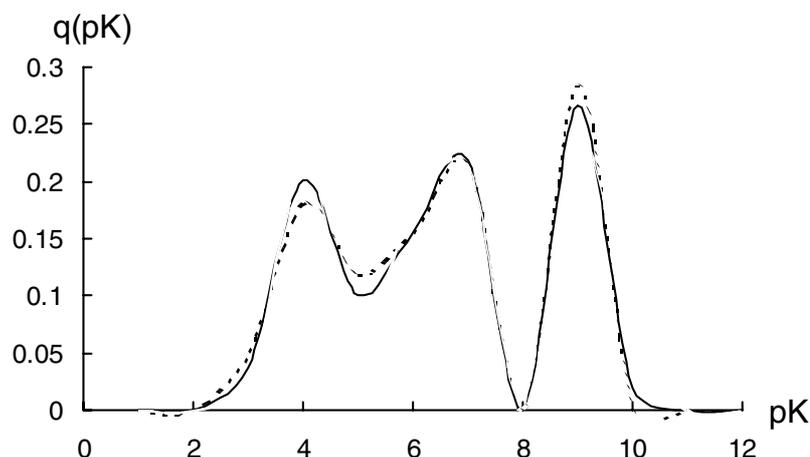


Рис.4.10. pK-спектры ГФК торфа (РНФ-Т7Н94), рассчитанные для трех повторных титрований.

В pK-спектрах практически всех исследованных препаратов гумусовых кислот наблюдалась четкая граница между диапазонами pK, характерными для карбоксильных и фенольных групп (минимум при pK = 8). На основании такого отнесения пиков из pK-спектров рассчитывали содержание карбоксильных и фенольных групп, суммируя доли всех кислотных групп, входящих в указанные интервалы. Полученные результаты приведены в табл. 4.5 и 4.6.

4.1.7 Сопоставление результатов определения кислотных групп методами ПМР-спектроскопии и титриметрии

Полученные титриметрические определения карбоксильной и общей кислотности гумусовых кислот сопоставляли с данными ПМР спектроскопии. Для этой цели на основании результатов по процентному содержанию водорода карбоксилов и фенольных гидроксидов и элементного анализа (содержание водорода в безводной пробе, ммоль/г) рассчитывали карбоксильную и общую кислотность (ммоль/г) гумусовых кислот по следующим формулам:

$$\text{COOH(ммоль/г)} = \text{COOH(ПМР, \%)} \times \text{H(эл. ан., ммоль/г)} \quad (4.6)$$

$$\text{COOH+ArOH(ммоль/г)} = [\text{COOH+ArOH(ПМР, \%)}] \times \text{H(эл. ан., ммоль/г)} \quad (4.7)$$

В таблицах 4.5 и 4.6 приведены результаты определения общего содержания кислотных групп и карбоксильных групп, соответственно, титриметрическими методами и с помощью ПМР-спектроскопии.

Таблица 4.5.

Общая кислотность препаратов гумусовых кислот по данным различных титриметрических методов и ПМР спектроскопии
(n = 3, P = 0.95)

Препарат	Общая кислотность (ммоль/г)		
	Ва	pK	ПМР
PHF-T5H94	10±1	5.1±0.3	5.9±0.9
PHF-T6H94	7.0±0.6	3.6±0.1	8.7±1.3
PHF-T7H94	8.2±0.6	5.0±0.3	8.4±1.2
PHF-T10L94	9±1	8.7±0.4	7.8±1.1
PHF-TНН94	7.9±0.4	6.0±0.1	6.6±1.0
PHF-TTL94	9.4±0.3	5.0±0.3	7.1±1.0
SHF-Co94	7.2±0.4	5.8±0.3	7.3±1.3
AHF-RMX2	10.9±0.6	9.95±0.4	7.0±1.1

Таблица 4.6.

Карбоксильная кислотность препаратов гумусовых кислот по данным различных титриметрических методов и ПМР спектроскопии (n = 3, P = 0.95)

Препарат	Содержание COOH, ммоль/г			Препарат	Содержание COOH, ммоль/г	
	Ca(AcO) ₂	pK-спектр	ПМР		Ca(AcO) ₂	ПМР
PHF-T5H94	3.1±0.3	3.0±0.2	3.6±0.5	PHF-T3L98	4±0.3	4.4±0.7
PHF-T6H94	3.1±0.1	2.7±0.2	4.4±0.7	PHF-T4H98	3.5±0.3	4.3±0.6
PHF-T7H94	2.9±0.1	3.0±0.3	4.4±0.7	PHF-T5H98	4.6±0.4	2.7±0.4
PHF-T10L94	3.1±0.2	7.0±0.5	3.5±0.5	PHF-T6H98	3.9±0.3	3.7±0.6
PHF-TНН94	4.0±0.2	4.0±0.2	3.2±0.5	PHA-T3L98	4.2±0.3	4.7±0.7
PHF-TTL94	4.0±0.4	4.1±0.2	3.4±0.5	PHA-T4H98	2.8±0.2	3.0±0.5
SHF-Co94	3.9±0.3	3.9±0.2	4.9±0.7	PHA-T5H98	2.8±0.2	3.1±0.5
AHF-RMX2	7.62±0.6	7.71±0.8	5.3±0.8	PHA-T6H98	3.2±0.3	2.6±0.4

Как видно из таблицы 4.6, общее содержание кислотных групп в исследованных образцах ГФК торфа, вод и почв лежит в пределах 6-11 ммоль/г, содержание карбоксильных групп составляет 3-7 ммоль/г, что

соответствует диапазонам величин, обычно приводимым в литературе (табл. 1.3). Сопоставление данных различных методов показывает, что общая кислотность, рассчитанная из рК-спектров, существенно ниже определяемой по баритовой методике. Между ними наблюдается значимое статистическое различие. Вероятно, это связано с присущим рК-спектроскопии ограничением – невозможностью определения кислотных групп с $pK \geq 11$. В тоже время между ПМР-определениями общей и карбоксильной кислотности и данными соответствующих определений по баритовой и кальциево-ацетатной методике статистических различий обнаружено не было. Проверка проводилась попарно, по t-критерию при $P = 0.95$.

Полученные данные позволяют сделать вывод о правильности определения кислотных групп гумусовых кислот с помощью предложенной ПМР-методики.

4.1.8 Расчет фрагментного состава и его применение для характеристики закономерностей строения гумусовых кислот

Сопоставление ^{13}C ЯМР и ПМР данных по распределению углерода и водорода в структуре гумусовых кислот позволяет проверить расчет содержания фрагментов, непосредственно не определяемых из соответствующих спектров. Набор фрагментов можно расширить за счет идентификации заместителя в углеродсодержащем фрагменте. В результате можно рассчитать содержание следующих фрагментов: карбонильные ($\text{C}_{\text{C=O}}$), карбоксильные (C_{COOH}) и сложноэфирные (C_{COOR}) группы; атомы углерода ароматических колец с соответствующими заместителями: незамещенные ($\text{C}_{\text{Ar-H}}$), C-замещенные ($\text{C}_{\text{Ar-C}}$), связанные с гидроксильной ($\text{C}_{\text{Ar-OH}}$) и алкоксильной ($\text{C}_{\text{Ar-OR}}$) группами; вторичные ($\text{C}_{\text{CH-OH}}$) и первичные ($\text{C}_{\text{CH}_2\text{-OH}}$) спиртовые фрагменты, метоксильные группы (C_{OCH_3}), ацетальные фрагменты (C_{OCO}) и несвязанные с гетероатомами алифатические фрагменты (C_{CH_n}).

Содержание $\text{C}_{\text{C=O}}$, C_{OCO} , и C_{CH_n} рассчитывали непосредственно из данных ^{13}C ЯМР спектроскопии. Содержание остальных фрагментов было рассчитано из сопоставления данных спектроскопии ^{13}C и ^1H ЯМР при использовании соотношения Н/С из результатов элементного анализа согласно уравнениям (4.10-4.13). В связи с тем, что одномерная ЯМР ^{13}C и ПМР спектроскопия не позволяет достоверно различить кислород- и азотсодержащие функциональные группы, поэтому все гетероатомы в структуре гумусовых кислот принимали за кислород, т.е. амиды рассматривали совместно со сложноэфирными группами, алифатические амины – со спиртами, и т.д.

Поскольку разработанный ПМР метод позволяет определить количество COOH групп, а спектроскопия ^{13}C ЯМР предоставляет данные о суммарном содержании $\text{COOH}+\text{COOR}$, то содержание сложноэфирных групп рассчитывали как:

$$C_{\text{COOH}} = N_{\text{COOH (ПМР)}} / H/C_{(\text{эл.ан.})} \quad (4.8)$$

$$C_{\text{COOR}} = (C_{\text{COOR+COOH}})_{(\text{C-13})} - N_{\text{COOH (ПМР)}} / H/C_{(\text{эл.ан.})} \quad (4.9)$$

Аналогичный расчет может быть выполнен для определения содержания ОН- и OR-замещенных ароматических атомов углерода:

$$C_{\text{ArOH}} = N_{\text{ArOH (ПМР)}} / H/C_{(\text{эл.ан.})} \quad (4.10)$$

$$C_{\text{ArOR}} = C_{\text{ArO (C-13)}} - N_{\text{ArOH (ПМР)}} / H/C_{(\text{эл.ан.})} \quad (4.11)$$

Также из сопоставления результатов спектроскопии ЯМР ^{13}C и ^1H можно рассчитать содержание незамещенных и C-замещенных ароматических атомов углерода:

$$C_{\text{ArH}} = N_{\text{ArH (ПМР)}} / H/C_{(\text{эл.ан.})} \quad (4.12)$$

$$C_{\text{ArC}} = C_{\text{Ar(C-13)}} - N_{\text{ArH (ПМР)}} / H/C_{(\text{эл.ан.})} \quad (4.13)$$

Для расчета содержания фрагментов, входящих в состав гетерозамещенных алифатических структур – $C_{\text{СНОН}}$, $C_{\text{СН2ОН}}$, $C_{\text{ОСН3}}$ – решали следующую систему уравнений:

$$\begin{aligned} C_{\text{СНОН}} + C_{\text{СН2ОН}} + C_{\text{ОСН3}} &= C_{\text{СНО(C-13)}} \\ 2/5 C_{\text{СНОН}} + C_{\text{СН2ОН}} &= \text{AlkOH}_{(\text{ПМР})} / H/C_{(\text{эл.ан.})} \end{aligned} \quad (4.14)$$

$$C_{\text{СНОН}} + 2C_{\text{СН2ОН}} + 3C_{\text{ОСН3}} = \text{СНО}_{(\text{ПМР})} / H/C_{(\text{эл.ан.})} - C_{\text{СОСО(C-13)}}$$

Результаты расчета по уравнениям (4.14) в целом удовлетворительно согласуются с результатами интегрирования диапазонов 50-58, 58-64 и 64-90 м.д. ^{13}C ЯМР спектров, где находятся сигналы соответствующих фрагментов.

Также были рассчитаны атомные соотношения Н/С в ароматических, алифатических и карбогидратных фрагментах, позволяющие определить среднюю степень замещения ароматических колец и разветвленности алифатической части молекул. Результаты расчета приведены в Приложении 4.4.

$$\begin{aligned} (H/C)_{\text{Ar}} &= \text{ArH}_{(\text{ПМР})} / (C_{\text{Ar(C-13)}} + C_{\text{ArO(C-13)}}) / H/C_{(\text{эл.ан.})} \\ (H/C)_{\text{Alk}} &= (\text{AlkH} + \alpha\text{-СН})_{(\text{ПМР})} / C_{\text{СН(C-13)}} / H/C_{(\text{эл.ан.})} \\ (H/C)_{\text{Alk-O}} &= \text{СНО}_{(\text{ПМР})} / C_{\text{СНО(C-13)}} / H/C_{(\text{эл.ан.})} \end{aligned} \quad (4.15)$$

Рассчитанные содержания структурных фрагментов для разных препаратов гумусовых кислот изменяются в достаточно широком диапазоне. Однако можно отметить ряд закономерностей, проявляющихся при анализе фрагментного состава препаратов, сгруппированных по сходному источнику происхождения и фракционному составу. Максимальное содержание карбоксильных групп характерно для препаратов ФК почв, ГФК природных вод и ГК угля. Эти же препараты характеризуются более низким содержанием C_{COOR} -фрагментов. При этом наблюдается значимая при $r = 0.99$ обратная корреляция между содержанием карбоксильных и сложноэфирных групп ($r = -0.68$). В случае фенольных гидроксидов и их эфиров не удается

установить такой закономерности, все препараты характеризуются довольно близкими содержаниями данных функциональных групп.

Все исследованные препараты содержат от 2 до 6% метоксильных групп. Наиболее вероятным источником таких групп являются остатки лигнинов. Однако при сопоставлении C_{OCH_3} и C_{ArOR} не удалось получить значимой корреляции между этими параметрами. По-видимому, это объясняется присутствием в структуре ГФК значительных количеств эфиров карбоксильных групп, как ариловых, так и метиловых.

Для определения количества полисахаридных структур было проанализировано распределение C_{CHO} – углерода в гумусовых кислотах. Для препаратов дерново-подзолистых почв и торфа содержание карбогидратных C_{CHOH} , ацетальных C_{OCO} и первичных спиртовых C_{CH_2OH} фрагментов соотносятся в среднем как 4:1:1 и в ряду препаратов изменяются симбатно. В связи с этим был сделан вывод о принадлежности всех C_{CHOH} и C_{CH_2OH} фрагментов в этих препаратах к полисахаридным циклам. Напротив, для препаратов ГФК природных вод до 50% спиртовых групп не относятся к полисахаридам.

В структуре ГК угля практически весь углерод C_{CHO} -фрагментов относится к метоксильным группам. Высокая обратная корреляция между содержанием полисахаридов и ароматических структур свидетельствует о том, что повышение содержания ароматических фрагментов в структуре ГФК в значительной степени обуславливается отщеплением периферических полисахаридных фрагментов.

Атомные соотношения $(H/C)_{Ar}$, характеризующие замещенность ароматического скелета ГФК, изменяются в довольно узких пределах от 0.25-0.28 для препаратов природных вод и ГК почв до 0.35 в случае ГК угля. От 30 до 44% атомов углерода ароматических колец являются С-замещенными, а 17-35% – О-замещенными. Таким образом, характер замещения “среднего” ароматического кольца для исследованных препаратов можно описать как: 2.6 С-замещенных, 1.7 О-замещенных и 1.7 незамещенных атомов углерода.

Самыми высокими значениями показателя окисленности ароматического ядра $C_{ArO}/(C_{ArH}+C_{ArC}+C_{ArO})$ характеризуются препараты ГФК природных вод и ГК почв, меньшая окисленность ароматического каркаса наблюдается для ГФК торфа и ГК почв, а наименьшие значения этого параметра достигаются для препаратов ГК бурого угля и черноземов. В этом же ряду снижается отношение содержания полисахаридных C_S и ароматических фрагментов. Между указанными показателями наблюдается значимая при $p = 0.99$ корреляция ($r^2 = 0.68$). Соотношение C_{COOH}/C_{COOR} , характеризующее глубину протекания гидролитических процессов резко различается для групп

препаратов, составляя 1.1-1.8 для ГК почв и ГФК торфа, 1.7-3.8 для ФК почв и ГФК природных вод и 3.5-4.5 для ГК угля.

Характер изменения приведенных параметров указывает на то, что в ГК черноземов происходит увеличение содержания ароматических фрагментов в результате интенсивной деградации полисахаридно-пептидного комплекса, которое сопровождается возрастанием окисленности ароматических колец и доли свободных функциональных групп (за счет гидролиза сложных эфиров). Параллельное протекание процессов отщепления полисахаридов и увеличения соотношения $C_{\text{COOH}}/C_{\text{COOR}}$ подтверждает высказанное в работе [Орлов, 1990] предположение, что полисахаридные фрагменты связаны с ароматической частью ГФК сложноэфирными связями. ГК угля, по-видимому, представляют собой предельный случай конденсированности ароматического скелета гумусовых кислот. Они характеризуются практически полным отсутствием углеводной периферии и самым высоким среди исследованных препаратов соотношением COOH/COOR .

ГФК природных вод и близкие им по структуре ФК почв представляют собой наиболее окисленные соединения. Для них наблюдается минимальное содержание незамещенного водорода ароматических структур, а доля свободных карбоксильных и фенольных групп значительно превышает аналогичные параметры для ГК почв. Окисление затрагивает и алифатическую часть молекул, результатом чего является присутствие значительного количества спиртовых гидроксильных, не относящихся к полисахаридным фрагментам. По-видимому, эти вещества представляют собой отщепившиеся при гидролизе окисленные ароматические фрагменты ГК с остатками глубоко трансформированных углеводных фрагментов.

4.2 Двумерная корреляционная спектроскопия ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C

Применение одномерной спектроскопии ЯМР для исследования структуры гумусовых кислот основано на выделении групп сигналов атомов со сходным химическим окружением. Это не позволяет охарактеризовать различия между атомами, входящими в такие группы, и дать однозначное отнесение их сигналов из-за сильного перекрытия. Двумерная спектроскопия ЯМР, основанная на регистрации попарных взаимодействий (спин-спиновых и диполь-дипольных) между магнитными ядрами, открывает возможности для проведения такого анализа. Основой двумерной ЯМР-спектроскопии является введение второй частотной переменной и получение набора спектров при изменении последней. Информация о спин-спиновом взаимодействии электронов химических связей отражает последовательность соединения атомов в молекуле. Диполь-дипольное взаимодействие вызывает

перенос поляризации между пространственно близкими атомами благодаря ядерному эффекту Оверхаузера, предоставляя информацию о пространственном строении молекул. Тем самым двумерная спектроскопия существенно расширяет представление о молекулярной структуре исследуемого органического соединения.

Двумерная спектроскопия ЯМР широко применяется для анализа биологических объектов, однако использованию этого метода для исследования гумусовых кислот посвящены лишь единичные публикации [Buddrus et al., 1998; Schmitt-Kopplin et al., 1998; Fan et al., 2000]. В нашей работе для исследования строения гумусовых кислот и получения детальной характеристики их структурно-группового состава использовали корреляционную спектроскопию химических сдвигов в гетероядерном (^1H , ^{13}C) и гомоядерном (^1H , ^1H) вариантах. Приводимые в работе результаты получены в процессе многолетней совместной работы с Др. Херткорном из Института Экологической Химии Национального Научно-Исследовательского Центра GSF, Германия и подробно изложены в соответствующих совместных публикациях [Hertkorn et al., 2000a, Hertkorn et al., 2000b].

4.2.1 Общая характеристика использованных в работе двумерных гомо- и гетероядерных ЯМР-экспериментов

Двумерные гомоядерные протонные ЯМР последовательности очень чувствительны, но характеризуются длительным временем переноса поляризации (TOCSY: $1/2J$; COSY: $1/J$) из-за малых величин геминальных и вицинальных H,H констант спин-спинового взаимодействия ($J < 10$ Гц). Это приводит к потере (исчезновению) сигналов в случае быстрой релаксации ядер. Поэтому для регистрации $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY спектров существенно, чтобы КССВ коррелирующих ядер была не меньше спектральной ширины линии их сигналов. Вследствие замедленного молекулярного движения молекул гумусовых кислот ширина спектральных линий протонов, как правило, велика, что ограничивает применение данного метода для исследования структуры гумусовых кислот.

Импульсная последовательность $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY основана на изотропном переносе синхронизированной по фазе намагниченности ядер в течение периода смешивания. При соответствующем подборе времени смешивания можно получать корреляционные сигналы ядер, удаленных на 3-5 химических связей. Типичные спектры TOCSY гумусовых кислот, как правило, имеют гораздо больше пиков в недиагональной области, чем соответствующие COSY спектры. Тем не менее, стандартные COSY-спектры, в которых проявляются только геминально или вицинально спин-связанные пары, позволяют достичь лучшего разрешения кросс-пиков в области очень

интенсивного перекрытия – в т.н. “карбогидратном регионе”. Кроме того, на COSY спектрах отчетливо видны вицинальные взаимодействия ароматических протонов.

Двумерные Н-С корреляционные импульсные последовательности ($^1J(\text{CH}) = 150$ Гц) позволяют достичь оптимальной амплитуды переноса намагниченности за более короткое время – 5-20 мс (HSQC: 10.9 мс), что более предпочтительно с точки зрения средних времен релаксации T_1 и T_2 гумусовых кислот. В корреляционных ^1H , ^{13}C ЯМР спектрах (например, HSQC, HMQC) наличие кросс-пиков является однозначным индикатором непосредственно связанных протон-углеродных пар. При этом разнесение сигналов по частотам ^1H и ^{13}C позволяет идентифицировать отдельные структурные группы в области их интенсивного перекрытия в одномерных спектрах. Примером такого диапазона может служить так называемая “карбогидратная” область в ПМР спектре гумусовых кислот, где находятся сигналы углеводов, боковых цепей лигнинов, пептидов, сложных и простых эфиров. Этой области в ^{13}C спектре соответствует гораздо более широкий диапазон частот, что позволяет “разнести” различные структурные группы по характеристическим наборам $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ частот, регистрируя ^1H , ^{13}C HSQC ЯМР спектры. Так, в указанном диапазоне отчетливо выделяются резонансы α -СН пептидов, для которых характерно значительное дезэкранирование протонов при экранированности ядер углерода. Между СН- α пептидов и резонансами СНО углеводов довольно часто появляются сигналы лигнинных боковых цепей (фенилпропаноидные фрагменты). Резонансы лигнинных метоксилов характеризуются средним сдвигом по протонам, но сдвинуты в область сильного поля по углероду. Отчетливо проявляются α -СН группы аминокислот, которые сильно экранированы как по ^1H , так и по ^{13}C . Гетероциклические азотсодержащие фрагменты дают весьма характерный кластер сигналов в области низких частот по ^1H и ^{13}C . Алкилированные и конденсированные терпеноидные структуры характеризуются дезэкранированием по ^{13}C , но сохраняют сильнополюсные протонные химсдвиги. Весьма специфические кластеры сигналов образуют таннины (С-С связь с кольцом при 4.8/37 и С5 в кольце – 5.9/96 м.д.), метиловые эфиры (3.8/55 м.д.), аномерные фрагменты углеводов (105-96/5-4), суберин (2.55/45), и т.д.

Регистрация двумерных спектров ЯМР проводилась в 5 мм ампулах на спектрометре фирмы “Bruker” с рабочей частотой 500 МГц для ядер ^1H в Институте Экологической Химии GSF, Мюнхен, ФРГ. Двумерные эксперименты включали в себя стандартные импульсные последовательности cosygsmf, mlevgstp19, noesygstp, invietgs и invigstp, входящие в состав пакета программного обеспечения фирмы “Bruker”. Обработку двумерных спектров

ЯМР проводили на рабочей станции “Silicon Graphics” с использованием программы XWINNMR.

Гомоядерные (H,H COSY – COrrelation SpectroscopY, H-H TOCSY – TOtal Correlation SpectroscopY) и гетероядерные (^1H , ^{13}C HSQC – Heteronuclear Single Quantum Correlation spectroscopy) корреляционные спектры гумусовых кислот приведены на рис. 4.10-4.12 на примере ФК и ГК верхового торфа (PFA-T5H98 и PNA-T5H98).

4.2.2 ^1H , ^1H COSY-спектры

^1H , ^1H COSY-спектры ФК и ГК верхового торфа приведены на рис 4.11. Для спектра ФК характерно наличие большего количества кросс-пиков, чем для ГК. За небольшим исключением все кросс-пики, которые наблюдаются в спектрах ГК, встречаются и в ФК. Основная доля спектральной интенсивности сосредоточена в области химсдвигов, указанных в табл. 4.7.

Таблица 4.7

Отнесения в COSY спектрах гумусовых кислот

Диапазон	F2 (м.д.)	F1 (м.д.)	Структурная группа	Отнесение
A _C	4.2-3.0	1.4-0.9	-C-CH-CH-O-	дезоксисахара, сложные и простые эфиры
B _C	3.0-1.7	3.0-1.7	-C _f -CH-C _f H-C-	протоны в α положении к функциональной группе
C _{C1}	5.0-4.3	4.3-3.0	-(C=O)NH-CH-CH-C _f	H _α -H _β пептидов (β положение к функциональной группе -O-CH-CH-C _f ,O или γ к гетероатому)
C _{C2}	5.0-4.3	3.0-1.7	-(C=O)NH-CH-CH-C	H _α -H _β пептидов (-O-CH-CH-C _f ,O)
D1	4.2-3.0	4.2-3.0	-O-CH-C(O)H-O-	циклические углеводы без аномеров
D2	5.7-3.0	5.7-3.0	-O-CH-C(O)H-O-	циклические углеводы с аномерами
E	8.0-6.5	8.0-6.5	-C _{ar} H-C _{ar} H-	орто-протоны в ароматическом кольце

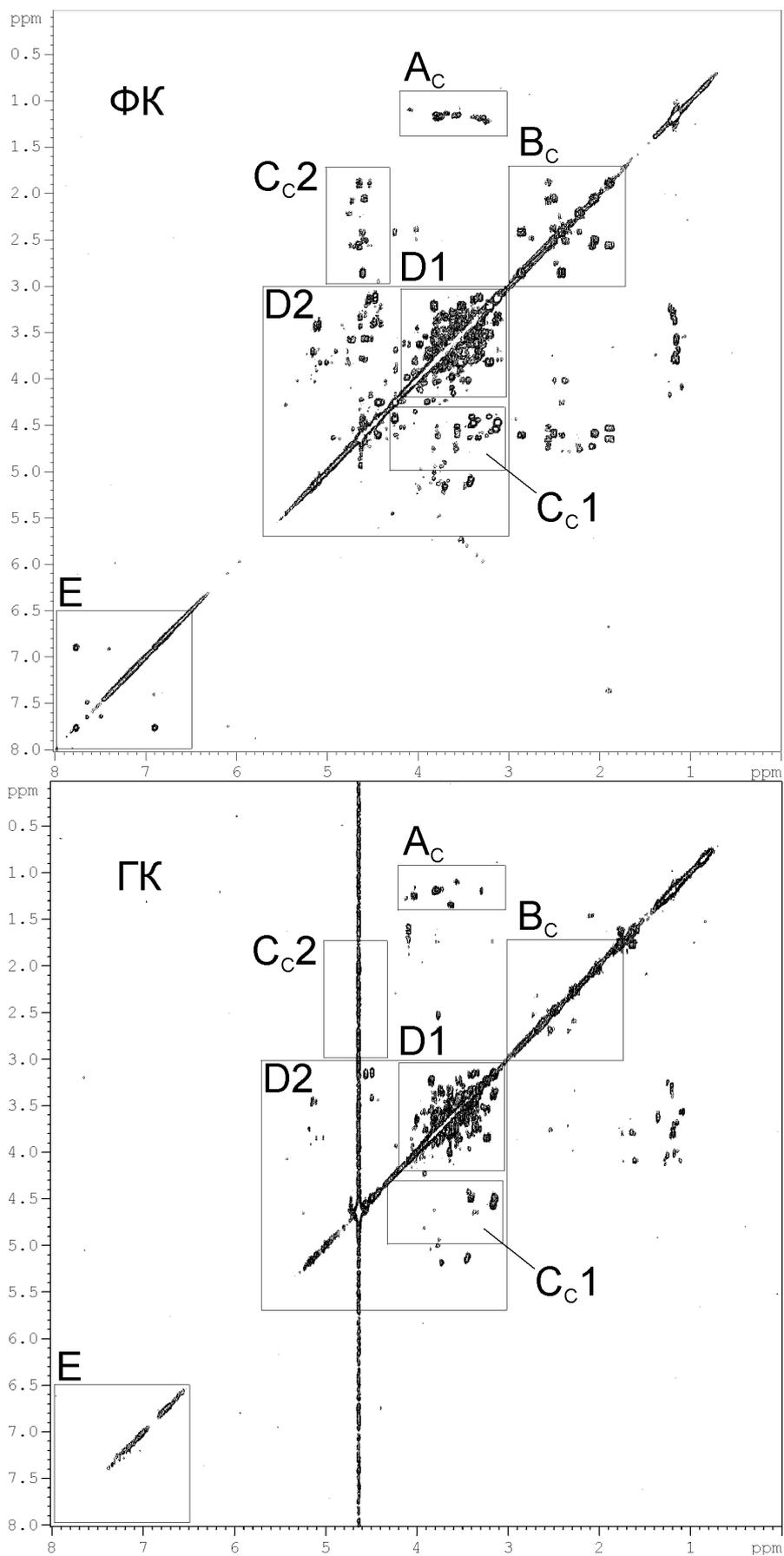


Рис. 4.11. Двумерные $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY спектры **ФК** и **ГК** верхового торфа (PNA-T5H98 и PFA-T5H98).

Для ФК характерно наличие интенсивных кросс-пиков в секторе C_C (рис. 4.11), которые почти не наблюдаются в спектрах ГК. Эти кросс-пики появляются в том же регионе, что и резонансы $N\alpha-N\beta$ пептидов, но принципиально от них отличаются по характеру образуемого рисунка: область C_{C2} смещена в более сильное поле по оси F_2 по сравнению с C_{C1} , тогда как для кросс-пиков пептидов характерна противоположная тенденция: кросс-пики в области C_{C1} смещены в более сильное поле на 0.4 м.д., а кросс пики в области C_{C2} – в более слабое поле на 0.25 м.д. Как следствие, указанные кросс-пики в спектре гумусовых кислот можно отнести к сильно окисленным боковым цепям сложных или простых эфиров. Корреляции в области C_{C1} обусловлены протонами в α -положении к карбонильной или другим электроотрицательным группам, в C_{C2} области – протонами в α -положении к гетероатому. Интенсивные кросс-пики в области D_{C1} и D_{C2} , относящиеся к циклическим сахарам, характерны как для ФК, так и ГК.

Несмотря на то, что для типичных гумусовых кислот характерна высокая степень замещения ароматического кольца (в среднем 4-5 заместителей на кольцо), в области E_C спектра COSY наблюдается меньше кросс-пиков от протонов заместителей в вицинальном положении к ароматическим протонам (1;1,2;1,3;1,4;1,2,3;1,2,4;1,2,5 и 1,2,3,4), чем в фенолах растительного происхождения [Simpson et al., 1997]. В целом для ФК наблюдаются лучшие релаксационные характеристики по сравнению с ГК, что, вероятно, связано с их меньшими размерами.

В области A_C группа кросс-пиков наблюдается только для ГК, а для ФК – нет. Их можно отнести к алкилированным сахарам, которые присутствуют в структуре ГК и не встречаются в ФК.

4.2.3 $^1H, ^1H$ TOCSY спектры

TOCSY спектры исследуемых ГК и ФК торфа приведены на рис. 4.12. Для спектров характерно большее количество кросс-пиков, чем для соответствующих COSY спектров. В пределах области A_T появляются кросс-пики, невидимые в COSY-спектрах, которые указывают на наличие порядка десяти корреляций между резонансами терминальных метилов ($\delta = 0.81$ м.д.) и алифатическими протонами. Дополнительные кросс-пики появляются также в области B_T (табл. 4.8). Наличие этих кросс-пиков обусловлено алифатическими цепями промежуточной длины (C3-C5), несущими функциональную группу.

Дополнительные (по сравнению с COSY) области химсдвигов,
проявляющиеся в TOCSY спектрах гумусовых кислот

Диапазон	F2 (м.д.)	F1 (м.д.)	Структурная группа	Отнесение
A _T	2.4-0.7	2.4-0.7	-C-CH-CH-C _{al} C-CH-CH-C _f	интактные алифатические цепи
B _{T1}	4.3-3.3	2.6-1.4	-N,O-CH-CH-C _{al}	алифатические заместители у гетероатома
B _{T2}	4.3-3.3	2.0-1.4	-N,O-CH-CH-C _f	алифатические заместители у гетероатома, несущие функциональную группу
C _{T1}	4.4-4.0	2.6-1.4	-(C=O)NH-CH-CH-C _{al}	Ha-Hb пептидов
C _{T2}	4.8-4.2	2.4-3.8	-(C=O)NH-CH-CH-C _f	Ha-Hb пептидов

В противоположность COSY спектрам, в TOCSY спектрах наблюдается образование “хребтов” из кросс-пиков с одинаковыми частотами по осям F1 и F2, что указывает на наличие протяженных спиновых систем в исследуемых соединениях. В среднем каждый хребет образуется слиянием 3-4 кросс-пиков, что позволяет отнести их к алифатическим цепям, замещенным функциональными группами, имеющими также в качестве заместителя гетероатом с терминальной алифатической (B_{T1}) или функционализованной алифатической (B_{T2}) группой.

В области C_T различимы серии кросс-пиков пептидного происхождения. Область C_{T2} вырождена по оси F2 невозбужденным резонансом NaOD (с узкой спектральной шириной), который ясно виден по оси F1 при $\delta = 4.4$ м.д. Положение пептидных кросс-пиков весьма отличается от находящихся в области C_{C1} и C_{C2} в COSY спектрах ФК.

По сравнению с COSY, в TOCSY спектрах ГК наблюдается гораздо больше C1-C2 корреляций (> 30 вместо < 10) аномерных положений углеводов. Для ФК наблюдается аналогичная картина. Интенсивность этих кросс-пиков возрастает при увеличении времени смешивания от 35 до 75 и далее до 100 мс. Это указывает на то, что многие из данных корреляций характеризуются малыми вицинальными КССВ.

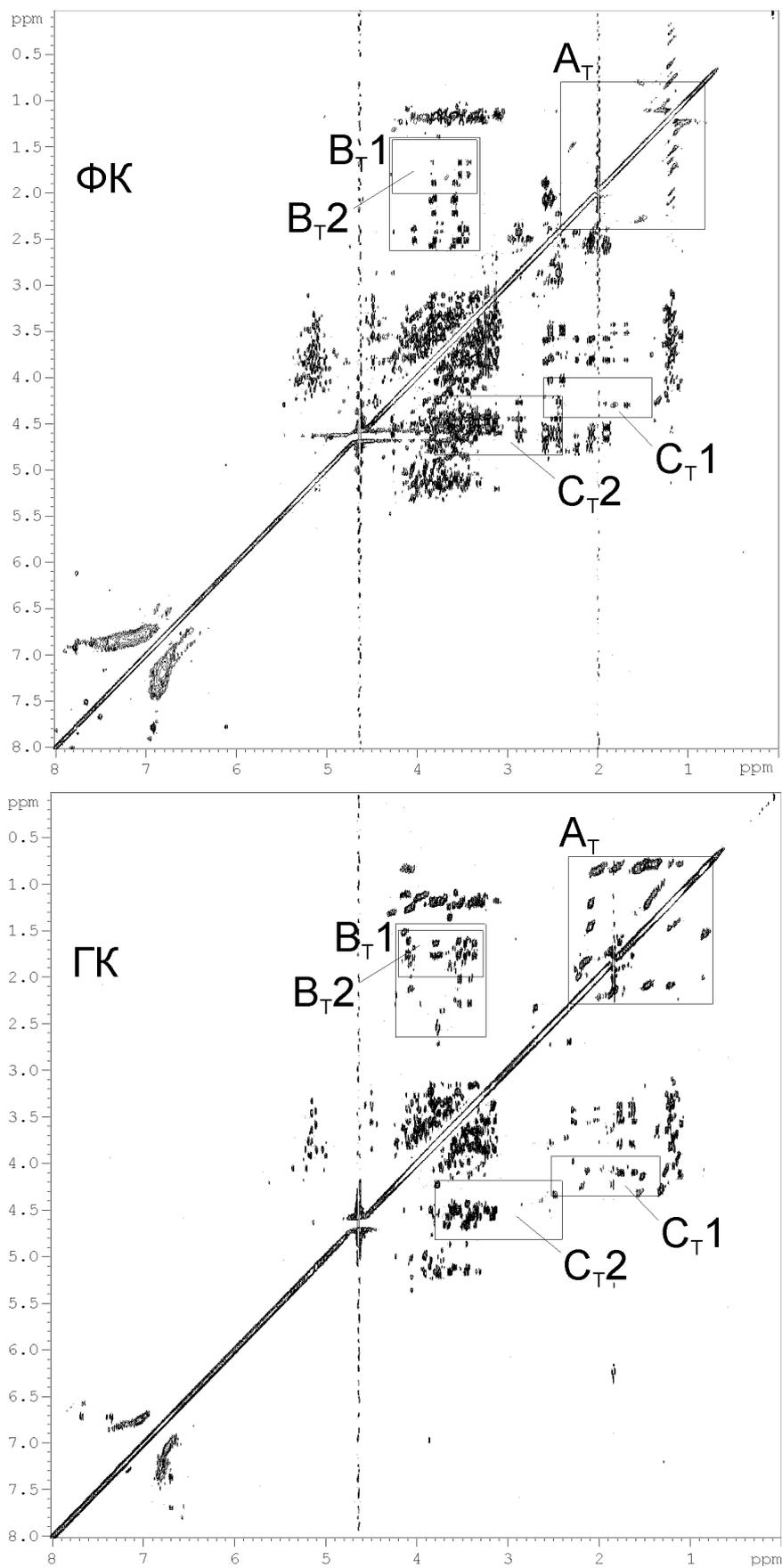


Рис. 4.12. Двумерные ^1H , ^1H TOCSY спектры ГК (а) и ФК (б) верхового торфа (РНА-Т5Н98 и РФА-Т5Н98).

В ароматической области как для ФК, так и для ГК наблюдаются кросс-пики, характерные для дигидрокси- или диметокси-замещенных ароматических колец, которые могут также иметь другие заместители (от алкильных радикалов до дезэкранирующих карбонильной или карбоксильной групп). Индивидуальные кросс-пики различаются для ГК и ФК, но их положение ясно свидетельствует о множественном кислородном замещении в сочетании с орто-дезэкранирующими заместителями, такими как карбонильные группы. В целом, на ароматическую область приходится весьма низкая спектральная интенсивность. Это указывает на то, что для гумусовых кислот характерно наличие высокозамещенных ароматических систем, из которых только небольшая доля представлена ароматическими фрагментами с протонами в орто-положении.

4.2.4 ^1H , ^{13}C HSQC спектры

HSQC спектры исследуемых ГК и ФК торфа приведены на рис. 4.12(а, б). Для спектров ГК и ФК характерно наличие существенного количества кросс-пигов, которые могут быть подразделены на следующие четыре основные области химических сдвигов (табл. 4.9).

Таблица 4.9

Основные отнесения в HSQC спектрах гумусовых кислот

Диапазон	F2 (м.д.)	F1 (м.д.)	Структурная группа	Отнесение
A _H	3.4-0.4	45-5	C-CH, C _r -CH	алифатические фрагменты
A _{H1}	1.1-0.4	26-5	C _r -CH	пептидные боковые цепи
B _H	5.0-2.6	84-40	X-CH	алифатические фрагменты, замещенные одним гетероатомом
B _{H1}	3.8-2.6	58-40	N-CH	аминосахара
C _H	5.6-4.2	106-90	O-CH-X	алифатические фрагменты, замещенные двумя гетероатомами
D _H	9.0-6.0	150-105	C _{ar} -H	ароматические или гетероциклические системы

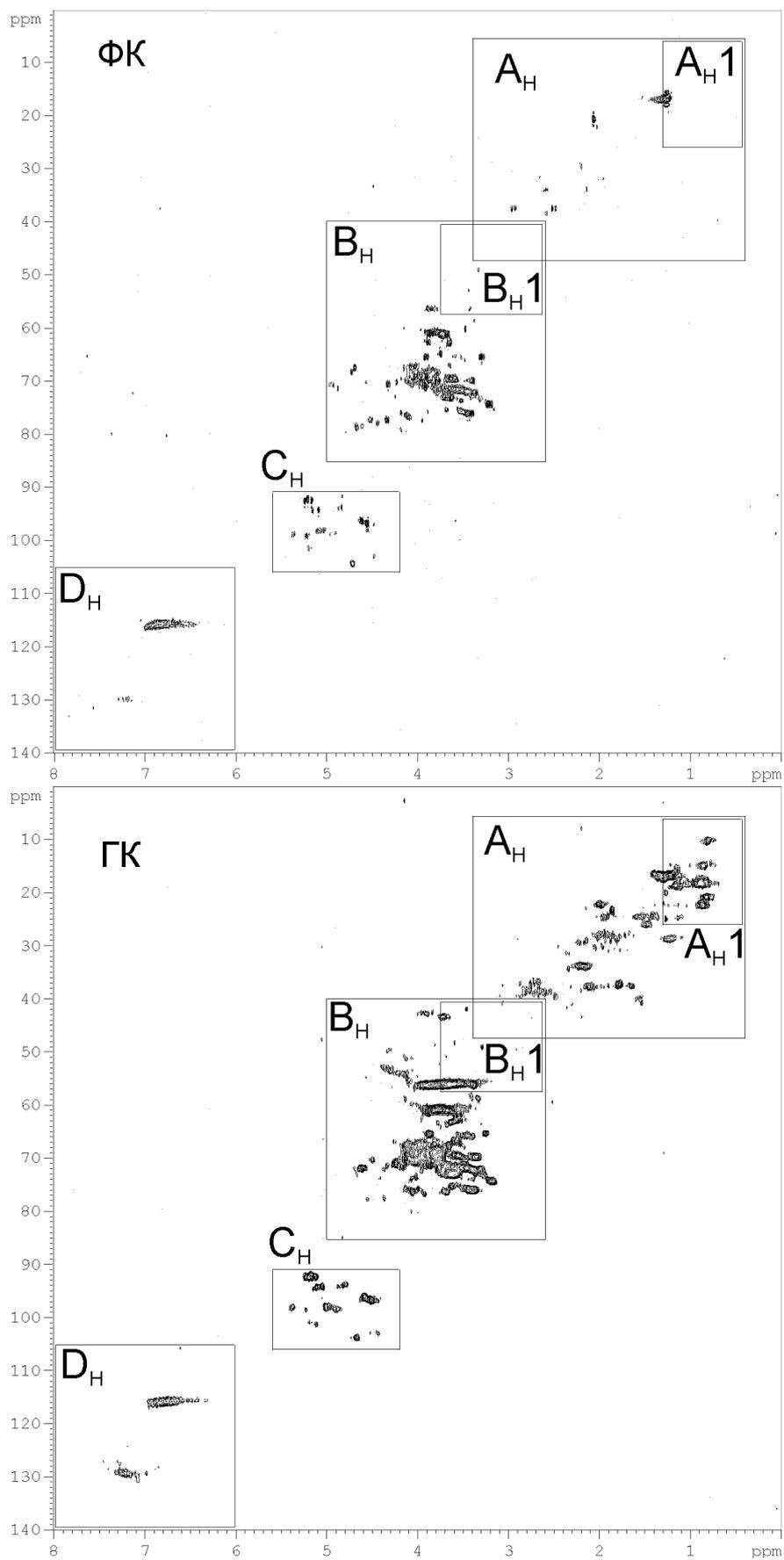


Рис. 4.13. Двумерные ^1H , ^{13}C HSQC спектры ФК и ГК верхового торфа (РНА-Т5Н98 и РФА-Т5Н98).

На первый взгляд, расположение кросс-пиков в секторах C_H и D_H весьма сходно для ФК и ГК. Однако оно существенно различается в области сильного поля по оси $F1$, для кросс-пиков из секторов A_H и B_H , где в спектре ФК отсутствует целый класс кросс-пиков. Весь набор сильнополюсных кросс-пиков в секторе A_H1 спектра ГК можно отнести к пептидным боковым цепям, отсутствующим в структуре ФК. Аналогично, кросс-пик $F2/F1$: 1.6/40 м.д., который наблюдается только в ГК, можно отнести к изопропильным метиленовым группам лейцина и валина и в других сходных положениях [Hertkorn et al., 2000]. Кросс-пики метиленовых групп длинноцепочечных алифатических фрагментов (2.3/29 м.д.) весьма заметны в ГК, но практически полностью отсутствуют в ФК. Алифатические метоксигруппы (3.8/56) гораздо более выражены в ГК, чем в ФК. В секторе B_H спектров ГК присутствует целый класс кросс-пиков в области сильного поля по ^{13}C , которые не наблюдаются в спектрах ФК. Среди них можно выделить интенсивные кросс-пики $C\alpha$ пептидов, но есть также и более слабые сигналы в области B_H1 . За исключением интенсивного кросс-пика $CN-\alpha$ глицина (3.8/42 м.д., Hertkorn et al, 2000), эти сигналы можно отнести к фрагментам аминокислот типа гексоз с одной аминогруппой.

В секторе B_H как в спектрах ГК, так и ФК находится группа относительно широких неразрешенных корреляционных пиков, обычно относимых к $CНОН$ фрагментам сахаров ($\delta(^{13}C)$: 85-67 м.д.). Этой группой представлена наиболее существенная доля всех резонансов, видимых в спектре ФК. Она сопровождается появлением интенсивных отчетливых корреляций в секторе C_H1 , соответствующем аномерному углероду (C_1) сахаров. В одномерном ПМР спектре эти сигналы частично перекрываются с $CНОН$, пептидами и остаточными протонами растворителя (HOD). Присутствие аномерного углерода указывает на то, что сахара в ГК и ФК имеют преимущественно циклическую конформацию. Положение и интенсивность кросс-пиков в аномерной области C_H , равно как и $CНОН$ фрагментов в секторе B_H , весьма сходно для исследованных ГК и ФК торфа. Отнесения, приведенные в табл. 4.10, сделаны для узких и разрешенных сигналов в аномерной области C_H спектра HSQC.

Положения кросс-пиков в аномерной области спектра HSQC гумусовых кислот слегка отличаются от величин химсдвигов, приводимых в литературе для свободных сахаров. По-видимому, это связано с тем, что в гумусовых кислотах сахара присоединены к каркасу макромолекулы, и входят в состав олигосахаридной цепи. Интенсивные и узкие сигналы $C1$ атомов рамнозы и фукозы хорошо согласуются с наличием в COSY спектрах ГК и ФК корреляций, относимых к $CН_3CНО-$ фрагментам.

Отнесения кросс-пиков в аномерной области C_H спектра HSQC
(если не отмечено особо, отнесения сделаны на основании 2D
HSQC спектров из базы данных Bruker SBASE)

PFA-T598		PHA-T598		Отнесение
$\delta(^{13}C)$	$\delta(^1H)$	$\delta(^{13}C)$	$\delta(^1H)$	
91.7	4.83			Рибопираноза
92.4	5.19	92.2	5.17	Глюкуроновая к-та, ксилоза
93.8	4.85	93.7	4.81	Олигомеры α -глюкозы
93.9	5.09	94.1	5.1	Фукоза, глюкоза, рибопираноза, галактоза
96.6	4.56	96.1	4.58	Глюкуроновая к-та, ксилоза, фукоза, манноза
		96.5	4.51	Рамноза, манноза
98.0	5.06	97.8	4.99	Олигомеры α -глюкозы
98.7	5.36	97.9	5.38	Рибопираноза
102.0	4.48	102.7	4.44	Целлюлозные фрагменты [Nehls, 1994]
104.3	4.71	103.5	4.67	Целлюлозные фрагменты [Nehls, 1994]

Для ароматической области характерно два основных кросс-пика: в области высокого поля (6.8/116 м.д.) – обусловлен наличием орто- или пара-кислородного замещения и при 7.15/130 м.д. – обусловлен наличием алкильных заместителей в орто-положении. Последний кросс-пик разделен на множество мелких резонансов, имеющих различные химсдвиги для ФК и ГК. В спектрах ФК наблюдаются протонные резонансы в области слабого поля ($\delta(^1H) > 7.5$ м.д.), что указывает на наличие по крайней мере одной дезэкранирующей группы (карбонил или карбоксил) в орто-положении кольца. В ГК присутствует класс высокополевых (по частоте ^{13}C) резонансов, которые не проявляются в спектре ФК.

4.2.5 Сравнительный анализ результатов двумерных ЯМР-экспериментов

Анализ данных проведенного комплекса ЯМР-экспериментов однозначно свидетельствует о колоссальных преимуществах двумерной спектроскопии для идентификации парциальных структур гумусовых кислот и выявления характеристических особенностей, присущих гумусовым кислотам различного фракционного состава и происхождения.

Так, для двух исследованных препаратов ГК и ФК торфа наблюдалась весьма сходная картина в карбогидратной области ПМР спектра. Использование как гомо-, так и гетероядерных импульсных последовательностей показало близость углеводных структур ФК и ГК и возможность детальной идентификации соответствующих аномерных фрагментов. В то же время, сопоставление спектров TOCSY и HSQC на предмет анализа азотсодержащих структурных групп показывает существенное различие между ГК и ФК, несмотря на близкие значения атомного соотношения C/N этих соединений (ФК: 28, ГК: 27). Так, кросс-пики аминокислот, присутствующие в TOCSY и HSQC спектрах ГК, отсутствуют в ФК. Это позволило отнести существенную долю метильных резонансов в высокопольной области одномерного ПМР спектра ГК к боковым цепям пептидов. Также впервые сделано отнесение кросс-пигов низкой интенсивности, наблюдающихся в области 3.3/50 только в HSQC спектрах ГК, к аминсахарам. Наличие терпеноидных углеводов, характеризующихся высоким содержанием изолированных метильных групп, установлено только в ГК при полном их отсутствии в ФК. В ГК, в отличие от ФК, присутствует и существенная доля метоксилов, не взаимодействующих с другими протонами.

Состав алифатической части ФК и ГК различается принципиальным образом. Различия в форме линий заметны уже при сопоставлении одномерных спектров. Расположение кросс-пигов в HSQC спектрах различается кардинально. Можно сделать вывод, что сигнал в ПМР спектре ФК при 1.17 м.д. не относится к метиленовым группам длинноцепочечных фрагментов (эти сигналы присутствуют только в спектрах ГК при 1.22/29.6 м.д.), так как он имеет корреляцию по углероду при $\delta = 22.4$ м.д. Химическая природа данной парциальной структуры неясна.

В ароматической области наблюдаются существенные вариации расположения кросс-пигов во всех двумерных спектрах ГК и ФК. Тем не менее, можно говорить о близости характера замещения основных ароматических структур, а именно: доминируют окисленные ароматические кольца многократно замещенные (через кислород) различными заместителями, наличие которых в орто или пара положении вызывает высокопольный сдвиг по ^1H и ^{13}C ; присутствие алкилированных колец

обуславливает появление интенсивного кросс-пика при 7.2/129 м.д., в то время как наличие протонных ароматических сигналов в слабopольной области спектра ($\delta(^1\text{H}) > 7.5$ м.д.) связано с дезэкранирующим влиянием карбонильных заместителей в кольце.

По всей видимости, кросс-пики, которые видны только в TOCSY спектрах, в большинстве своем также обусловлены взаимодействием протонов в вицинальном и геминальном положении. Их исчезновение в COSY спектрах вызвано самоуничтожением антифазной намагниченности для спектральных линий с полушириной $\Delta\nu_{1/2} > 10-15$ Гц. Существенным исключением является пик при 4.1/0.8 м.д., который, вероятнее всего, представляет собой корреляцию через четыре связи (4J) между положением, замещенным гетероатомом, и метильной группой. TOCSY спектр ФК отличается от COSY спектра существенным уменьшением пептидных $\text{H}\alpha\beta$ корреляций. По сравнению со спектрами COSY, в карбогидратной области TOCSY спектров наблюдается перераспределение интенсивности кросс-пиков в сторону более выраженных C1-C2 корреляций.

Таким образом, проведенный комплекс двумерных ЯМР экспериментов позволил провести отнесения в соответствующих спектрах для следующих парциальных структур: лигнины, танины, ароматические окси кислоты и их эфиры, хиноны, сахара, дезоксисахара, алкилированные сахара, сахарные кислоты, аминсахара, пептиды, азотсодержащие гетероциклы, липиды, суберин, жирные кислоты и их эфиры, терпеноиды.

Идентификация парциальных структур в составе гумусовых кислот различного генезиса и фракционного состава, выполненная на примере ФК и ГК верхового и низинного торфов, позволила продемонстрировать перспективность применения такого подхода при разработке классификации гумусовых кислот по химическому строению, так как метод позволяет установить характер различия строения препаратов различного фракционного состава и происхождения. Наличие или отсутствие в двумерных спектрах ЯМР сигналов найденных специфических парциальных структур гумусовых кислот (сахара, аминокислоты, аминсахара, терпены, и т.д.) может быть использовано для получения “отпечатков пальцев” гумусовых кислот различного фракционного состава и происхождения. Создание базы данных из таких “отпечатков пальцев” позволит в дальнейшем проводить идентификацию гумусовых кислот с помощью методов распознавания образов.

4.3 Определение структурно-группового состава негидролизующей и гидролизующей части гумусовых кислот

Для гумусовых кислот предметом особого интереса является взаиморасположение ароматических и углеводных фрагментов, которые определяют растворимость и гидрофильно-гидрофобный баланс молекул. При этом термины “ароматический каркас” и “углеводно-пептидная периферия” – дань широко применявшимся для исследования гумусовых кислот деструктивным методам – прочно вошли в лексикон, используемый для описания строения гумусовых кислот [Орлов, 1990; Stevenson, 1982]. Ввиду простой ассоциации: каркас – устойчивая несущая конструкция, периферия – “шаткая” надстройка, удаленная от центра масс, возникла некая механистичность в их трактовке, сводящая строение гумусовых кислот к наличию двух блоков, принципиально различных по структуре: ароматическое ядро (каркас) и полисахаридные цепочки (периферия).

Для выяснения, насколько такая концепция соотносится с реальностью, нами было предпринято исследование состава продуктов гидролиза гумусовых кислот 0.2 М HCl методом спектроскопии ЯМР и эксклюзионной хроматографии. Выбор относительно мягких условий гидролиза должен был обеспечить избирательность воздействия, – отщепление углеводной периферии без изменения каркасной ароматической части. В качестве основного объекта исследования были выбраны ГК, малая растворимость которых в кислой среде облегчала разделение негидролизующих и гидролизующих фрагментов: в осадке оставался негидролизующий остаток, а в раствор переходили отщепившиеся продукты гидролиза. Это позволило провести отдельное исследование структурно-группового состава так называемой “каркасной” и “периферической” частей молекул гумусовых кислот, результаты которого приводятся ниже.

В процессе гидролиза нерастворимых в воде ГК небольшая часть вещества переходила в раствор, который при этом окрашивался в желтый цвет. Выделенные в твердом виде, растворимые продукты гидролиза представляли собой аморфные порошки желтого цвета. Нерастворимые продукты гидролиза, легко отделяющиеся центрифугированием, были окрашены в черный цвет. При гидролизе растворимых в воде ГК прозрачный желтый раствор заметно темнел, после чего из него выпадало некоторое количество черного осадка. Полученный осадок обладал весьма ограниченной растворимостью в NaOH и DMSO-d₆. Растворимые продукты гидролиза ГК после выпаривания на ротаторном испарителе образовывали аморфную массу оранжевого цвета. Соотношение растворимых и нерастворимых продуктов гидролиза составляло для ГК около 1:10, а для ГК – около 7:1. Следует

отметить, что выпадение осадка при гидролизе наблюдалось для всех четырех исследованных препаратов ФК торфа. Аналогичный эффект ранее в литературе описан не был.

4.3.1 Одномерная спектроскопия ЯМР ^{13}C

Для определения структурно-группового состава продуктов гидролиза гумусовых кислот для ряда препаратов ГК и ФК торфа было проведено ^{13}C ЯМР исследование в описанных выше условиях, обеспечивающих количественность получаемых спектров, на спектрометре Bruker-400. Интегрирование спектров проводили согласно ранее сделанному отнесению, предусматривающему разбиение всего спектрального диапазона на семь интервалов (п. 4.1.1). Результаты интегрирования спектров исходных ГК и ФК и продуктов их гидролиза приведены в табл. 4.11. Для характеристики изменений, произошедших в структуре гумусовых кислот в результате гидролиза рассчитывали отношения содержания углерода всех указанных групп в продуктах гидролиза и в соответствующих исходных ГК и ФК. Полученные отношения, усредненные для всех исследованных препаратов ГК (а) и ФК (б), показаны на рис. 4.14.

Для всех препаратов ГК гидролиз в указанных условиях вызывает сходные изменения в структурно-групповом составе продуктов гидролиза. При этом в нерастворимых остатках (РННР) содержание углерода, входящего в состав углеводных фрагментов (C_{AlkO}), уменьшается на 30% и составляет в среднем 10-14%; незначительно (на 5-8%) увеличивается содержание ароматического углерода. Полученные данные в целом согласуются с приводимыми в литературе результатами по ^{13}C ЯМР-спектроскопическому исследованию нерастворимых гидролизатов гумусовых кислот [Schnitzer and Preston, 1983]. В то же время в растворимых продуктах гидролиза (РННД) содержание ароматического углерода (как в виде C_{ArO} , так и C_{Ar}) не превышает 30% от исходного и составляет 10-20% от общего С, на 50-70% выше содержание углерода углеводных фрагментов, достигая величин 35-40%, и более чем в два раза выше содержание карбоксильных групп. Незамещенные алифатические фрагменты равномерно распределяются между нерастворимыми и растворимыми продуктами гидролиза. Таким образом, в результате гидролиза наряду с отщеплением углеводных уходит в раствор часть ароматических и половина незамещенных алифатических фрагментов. При этом довольно существенная доля углеводных фрагментов (70 % от их исходного содержания) остается в составе гидролизованных нерастворимых остатков.

Распределение углерода по структурным фрагментам
в препаратах ГК и ФК низинных и верховых торфов
и продуктах их гидролиза 0.1 М HCl

Препарат	Содержание C, % от общего C						
	C=O	COO	C _{Ar} O	C _{Ar}	OCO	*C _{Alk} O	CH _n
РНА-Т6Н98	2.93	8.88	7.00	32.06	5.88	17.67	25.58
РННР-Т6Н98	4.51	13.03	8.14	40.30	4.72	8.32	20.97
РННД--Т6Н98	9.08	22.78	-0.44	10.27	-1.23	26.56	32.99
РНА-Т7Н98	3.99	10.28	8.90	28.25	8.00	22.28	18.29
РННР-Т7Н98	1.75	11.44	9.32	33.06	8.90	16.33	19.21
РННД-Т7Н98	3.67	12.59	5.95	13.98	10.08	40.32	13.41
РФА-Т10Л98	4.85	15.86	9.63	25.43	7.71	22.16	14.36
РФНР-Т10Л98	7.43	13.80	8.94	39.47	2.36	7.04	20.97
РФНД-Т10Л98	6.22	17.60	8.63	23.20	1.43	22.77	20.15
РНА-Т10Л98	3.81	11.47	8.94	30.34	5.41	21.72	18.31
РННР-Т10Л98	3.21	9.86	8.76	36.13	6.29	14.40	21.35
РННД-Т10Л98	1.47	31.46	2.02	8.48	3.65	34.47	18.46
РФА-ТТЛ98	3.60	17.16	8.30	24.39	6.57	20.30	19.67
РФНР-ТТЛ98	7.18	17.30	7.94	32.42	3.06	11.00	21.10
РФНД-ТТЛ98	5.65	17.94	6.17	24.05	2.94	20.94	22.30
РНА-ТТЛ98	3.42	12.54	7.50	28.96	7.63	15.35	24.59
РННР-ТТЛ98	3.88	13.04	10.36	35.02	1.57	13.75	22.37
РННД-ТТЛ98	5.56	22.95	1.44	10.93	4.76	31.64	22.72

$$*C_{Alk}O = \Sigma(CHO, CH_2O, CH_3O)$$

Другими словами, расщепления молекулы ГК на две части различной химической природы – чисто ароматическую и чисто углеводную, не происходит. Это позволяет предположить, что в выбранных условиях гидролизуется только гликозидная связь. При этом расщепляются олигосахаридные включения, которые уходят в раствор в виде моносахаридов и в составе низкомолекулярных углеводно-ароматических фрагментов, присоединенных к ароматическому каркасу исходной макромолекулы через полисахаридные мостики. В тоже время углеводные фрагменты, образующие сложноэфирную связь с ароматическим каркасом макромолекулы, остаются в составе нерастворимых гидролизованных остатков. Гидролизуемые алифатические фрагменты, которые дают сигнал углерода в районе 0-47 м.д., по-видимому, представляют собой дезоксисахара рамнозу и фукозу (пик 6-

СН₃ группы при 16 м.д.) и аминокислоты, которые были связаны с исходным каркасом через гликозидную связь.

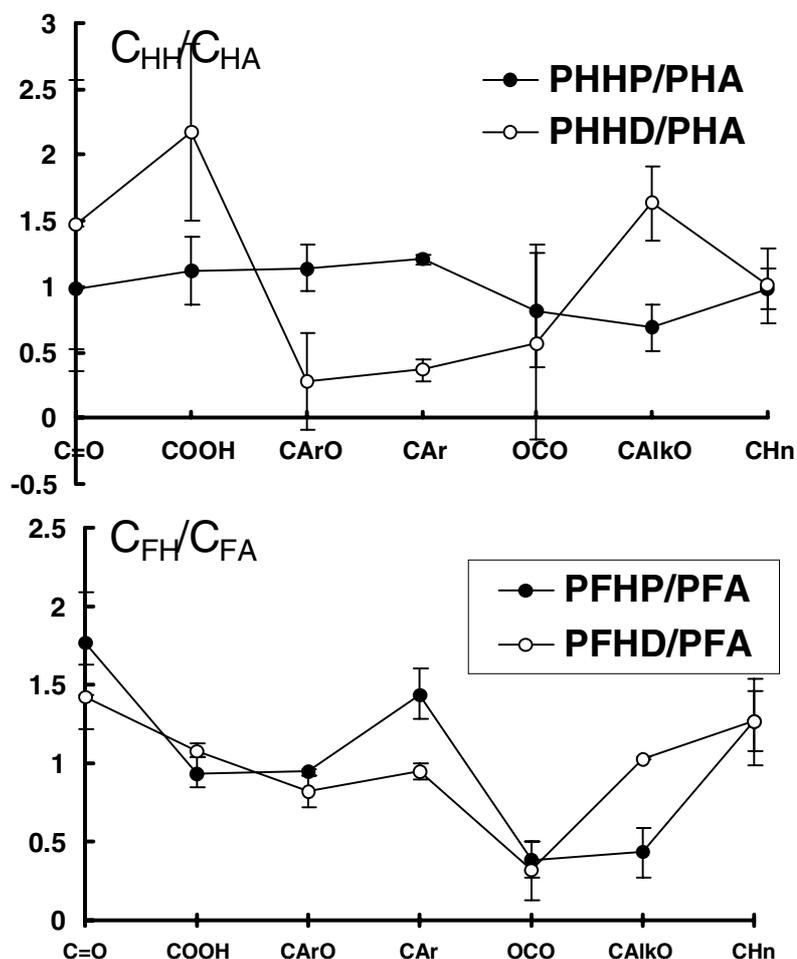


Рис. 4.14. Отношение содержания углерода в составе структурных фрагментов растворимых (PHHD/PFHD) и нерастворимых (PHHP/PFHP) продуктов гидролиза к таковому в составе исходных ГК (а) и ФК (б), соответственно. Приведены средние значения для четырех ГК и двух ФК. Планками показано \pm одно стандартное отклонение.

В отличие от ГК, единственное существенное изменение в структурно-групповом составе при переходе от ФК к растворимым продуктам их гидролиза – резкое уменьшение содержания аномерного углерода. В тоже время нерастворимый гидролизованный остаток ФК (FHHP) резко отличается от исходного препарата и весьма близок по составу к гидролизованному остатку соответствующих ГК. По-видимому, его выпадение обусловлено наличием примеси ГК в составе ФК

4.3.2 Двумерная спектроскопия ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C

Для получения дополнительной информации о характере взаиморасположения структурных фрагментов в составе макромолекул гумусовых кислот были получены двумерные гомоядерные ($^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY) и гетероядерные ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC) спектры ЯМР для растворимых продуктов гидролиза. Для нерастворимых продуктов гидролиза (РННР и РФНР) получить двумерные спектры не удалось, по-видимому, из-за отсутствия в их структуре медленно релаксирующих фрагментов полисахаридных и алифатических цепочек и олигопептидов. Типичные спектры растворимых продуктов гидролиза (РННД) и соответствующих исходных препаратов ГК (РНА) верхового и низинного торфа даны в Приложении 4.5.

Типы корреляций, проявляющиеся в COSY и HSQC спектрах растворимых продуктов гидролиза гумусовых кислот, существенно различны для ГК верхового и низинного торфа. Так, для РННД-Т10L98 и РННД-ТТL98 наблюдалась довольно сходная картина корреляций в $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY спектре. Одной из их наиболее характерных черт являлось отсутствие пиков в аномерной области углеводов (4.3-5.3/3.1-4.0). Принимая во внимание, что и исходные ГК не дают сигналов в этой области COSY и HSQC спектров, то можно сделать вывод об отсутствии в данных гумусовых соединениях нетрансформированных полисахаридных цепочек, – все они подверглись биоразложению в процессе гумификации. Отсутствие “углеводных” корреляций в COSY-спектре исходного препарата РНА-ТТL98 согласуется с видом HSQC-спектра, в котором в “карбогидратной” области химсдвигов наблюдаются только корреляции метиловых спиртов. Следовательно, большая часть спектральной интенсивности, наблюдаемой в 1D ^{13}C ЯМР спектрах РНА- и РННД-ТТL98 в диапазоне, относимом к HCO и HCN группам, на самом деле обусловлена присутствием большого количества метиловых эфиров.

В противоположность указанной картине, для препарата верхового торфа РНД-Т7H98 наблюдались интенсивные пики как в области HСХ, так и в аномерном диапазоне спектров COSY и HSQC. Это может быть связано с меньшей степенью трансформированности углеводно-пептидного комплекса, присущей верховым торфам.

Другой характерной чертой COSY спектров гидролизованных остатков ГК низинных торфов является присутствие серии пиков, коррелирующих с сигналами терминальных CH_3 -групп при 0.9 м.д. Указанные пики простираются вплоть до 2.0 м.д. и могут быть отнесены к протонам алифатических цепочек, несущих электроотрицательную группу (COOH) или фенильное кольцо. Интересно, что в спектре COSY верхового торфа (РННД-

T7H98) эта серия пиков практически полностью отсутствует. При этом почти вся спектральная интенсивность незамещенного алифатического диапазона (0-1.8 м.д.) обусловлена С6-метильными группами рамнозы и фукозы, коррелирующих с НСО областью углеводов. В HSQC спектре эти метильные группы сигнализируют при 18 м.д. по оси ^{13}C .

Ароматическая область также существенно различна для гидролизованных остатков ГК низинных (PHND-T10L98 и PHND-TTL98) и верховых (PHND-T6H98 и PHND-T7H98) торфов. Для низинных торфов в COSY-спектре наблюдаются серии из четырех и пяти кросс-пиков при 6.5/6.8-7.7 м.д., которые можно отнести за счет пара-дизамещенных бензольных колец. В тоже время эти сигналы практически полностью отсутствуют в PHND-T7H98, что указывает на более высокую степень замещения бензольных колец в ГК верховых торфов.

Таким образом, привлечение методов одномерной и двумерной спектроскопии ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C для анализа продуктов гидролиза ГК и ФК показало условность понятий “ароматический каркас” и “углеводная периферия”. Так, было установлено, что в структурно-групповой состав гидролизованных нерастворимых остатков ГК (“ароматический каркас”) входят углеводные фрагменты, в которых содержится до 15% С, тогда как до 15% углерода растворимых продуктов гидролиза (“углеводная периферия”) находится в составе ароматических фрагментов. При этом весьма значительные различия были найдены в структурно-групповом составе периферических фрагментов, отщепившихся от ГК низинных и верховых торфов. Оказалось, что в ГК низинных торфов существенная часть углерода, традиционно относимого к сахарам, на самом деле присутствует в составе метокси-групп, тогда как для верхового торфа термин “углеводная периферия” гораздо более адекватен: в составе отщепившихся фрагментов доминируют сахара, в том числе дезоксисахара – рамноза и фукоза.

4.3.3 Определение углеводного состава гидролизуемой части гумусовых кислот методом ВЭЖХ

Для идентификации моносахаридов, отщепляющихся в процессе кислотного гидролиза, и, следовательно, входящих в состав углеводной периферии гумусовых кислот, был предпринят анализ растворимых продуктов гидролиза препаратов различного происхождения и фракционного состава методом анионообменной ВЭЖХ с импульсной амперометрической детекцией (HPAE-AED). Данная работа была выполнена в тесном сотрудничестве с Др. Ю. Янель (кафедра водной химии, Технический университет Карлсруэ, ФРГ). Соответствующая совместная публикация готовится к печати.

Гидролизу подвергали набор препаратов гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава, который включал в себя: водные ФК и ГФК (АFA-IHSS, АНF-RMX2, АНF-RMC, АНF-RND3), торфяные ГФК и водный экстракт торфа (РНF-T194, РНF-T494, РНF-TНН94, РДОМ-TНН94), почвенные ФК и ГФК (SFA-Pg94, SFA-CtV94, SFA-Am, SHF-Co94) и ГФК озерных донных отложений (ВНF-SMu2). Кислотный гидролиз гумусовых кислот проводили в условиях, аналогичных описанным ранее. 2 мл 0.2 М HCl и 2 мл образца смешивали и нагревали при 110°C в течение 15 часов. Получившийся раствор фильтровали через нитратцеллюлозный фильтр (0.45 мкм) и вводили в хроматограф без дополнительной очистки. Концентрация растворов гумусовых кислот, использованных для гидролиза, составляла 300-500 мг С/л.

Определение сахаров проводили на хроматографической системе Dionex, включающей в себя градиентный насос GP-40 и электрохимический детектор ED40. Моносахариды детектировали путем измерения электрического тока при их окислении на поверхности золотого электрода. Принцип метода изложен в [Sawert, 1992; Solbrig-Lebuhn, 1992; Mopper, 1992]. Разделение проводили на колонке CarboPac PA1 (4x250 мм). В качестве элюента использовали 12 мМ NaOH. Скорость элюирования составляла 1.0 мл/мин. Набор детектируемых моносахаридов включал в себя гексозы, пентозы, дезоксисахара и аminosахара, а именно: галактозу, глюкозу, ксилозу, маннозу, арабинозу, рибозу, фруктозу, фукозу, рамнозу, глюкозамин и галактозамин. Следует отметить, что описанные выше условия разделения моносахаридов не обеспечивали разрешение пиков арабиноза/галактозамин, манноза/ксилоза и глюкоза/галактоза.

На основании данных по содержанию каждого из детектируемых моносахаридов в кислотном гидролизате гумусовых кислот рассчитывали их общее содержание ($C_{сах}$, мг С/л) и относили его к исходной концентрации препарата гумусовых кислот ($C_{орг}$, мг С/л). Полученные результаты приведены на рис. 4.15 и отражают процентное содержание углерода, отщепляющегося от макромолекул гумусовых кислот в виде моносахаридов в условиях кислотного гидролиза. Как видно из представленных данных, максимальное содержание гидролизуемых сахаров в пределах каждой подвыборки препаратов – водных ГФК, торфяных ГФК и почвенных ФК – наблюдалось для препаратов АНF-RMC, РДОМ-TН94 и SFA-Am, соответственно. Анализ процедур выделения данных образцов показал, что препараты АНF-RMC и SFA-Am были выделены с использованием в качестве сорбента ДЭАЭ-целлюлозы, а препарат РДОМ-TН94 представляет собой не экстракт гумусовых кислот, а водную вытяжку верхового торфа. Следовательно, все три величины не отражают содержание гидролизуемых

сахаров в гумусовых кислотах соответствующих источников, а обусловлены спецификой процедуры выделения, использование которой привело к появлению в растворе гумусовых кислот фракции негумусового происхождения: в одном случае – продуктов гидролиза ДЭАЭ-целлюлозы, в другом – фракции свободных олиго- и полисахаридов, не входящих в состав углеводно-пептидного комплекса гумусовых кислот. Содержание гидролизуемых сахаров в составе торфяных и почвенных ГФК (до 8-11% от исходного углерода гумусовых кислот) также может быть частично завышено из-за примесей олигосахаридов, извлекаемых из торфа и почвы в процессе щелочной экстракции. Следует отметить, что для препаратов ГФК вод и ФК почв, извлекаемых с помощью гидрофобной смолы Амберлит ХАД-2, и тем самым полностью свободным от примесей сопутствующих олигосахаридов, общее содержание гидролизуемых сахаров не превышало 3.5%. Однако для фракции ФК верховых торфов, которые, согласно данным ЯМР, характеризуются максимальным содержанием нетрансформированных сахаров, можно ожидать, что данная величина будет существенно больше.

В целом, полученные данные хорошо согласуются с приводимыми в литературе оценками содержания гидролизуемых сахаров в гумусовых кислотах различного происхождения: 1.5-11%, [Moers, 1989], а также с приведенными выше результатами ^{13}C ЯМР исследования (табл. 4.11). В соответствии с ЯМР-данными убыль “карбогидратного углерода” в нерастворимых гидролизованных остатках ГК торфа по сравнению с исходными препаратами составляет 6-10% (абс.). Учитывая, что в процессе гидролиза олигосахариды могут не только распадаться на моносахариды, но окисляться до сахарных кислот, трансформироваться с образованием фурфурола и формиата [Cheshire, 1970; Потапов и Татаринчик, 1976], то можно констатировать довольно хорошее соответствие результатов обоих методов.

Помимо оценки общего содержания гидролизуемых сахаров в препаратах гумусовых кислот с помощью независимого метода – ВЭЖХ, особый интерес представляла идентификация смеси моносахаридов, образующихся в результате гидролиза 0.1 М HCl. Эти данные позволили бы уточнить отнесения сигналов в двумерных ЯМР-спектрах гумусовых кислот, в частности, оценить вклад дезокси- и аминсахаров в состав углеводно-пептидной периферии гумусовых кислот. Для наглядной демонстрации вклада того или иного моносахарида в состав гидролизуемых углеводных фрагментов гумусовых кислот, содержание индивидуальных моносахаридов в продуктах кислотного гидролиза выражали в процентах от суммарного содержания всех моносахаридов, идентифицированных методом ВЭЖХ (рис. 4.15).

Как видно из приведенных результатов (рис. 4.16), вне зависимости от происхождения и фракционного состава гумусовых кислот, доминирующий вклад в состав гидролизуемых сахаров вносят гексозы: прежде всего, галактоза и глюкоза (40-60%), а также манноза и ксилоза (15-25%). Обращает на себя внимание довольно высокое и постоянное содержание рамнозы во всех исследованных препаратах на уровне 8-10%, тогда как содержание фукозы не превышало 5% и характеризовалось высокой изменчивостью. Весьма отчетливый тренд прослеживается для аминсахаров – их вклад минимален для препаратов ГФК торфа (не превышает 5%), тогда как в гидролизатах почвенных ГФК и ФК содержание аминсахаров существенно выше и составляет от 15 до 20%. При этом содержание галактозамина существенно выше (12-18%), чем глюкозамина (1-5%).

Полученные результаты хорошо согласуются с отнесениями, сделанными нами в двумерных ЯМР-спектрах гумусовых кислот верховых торфов и почв, которые указывают на существенный вклад дезоксисахаров в алифатическую часть ГК верховых торфов и аминсахаров – ГК и ФК почв.

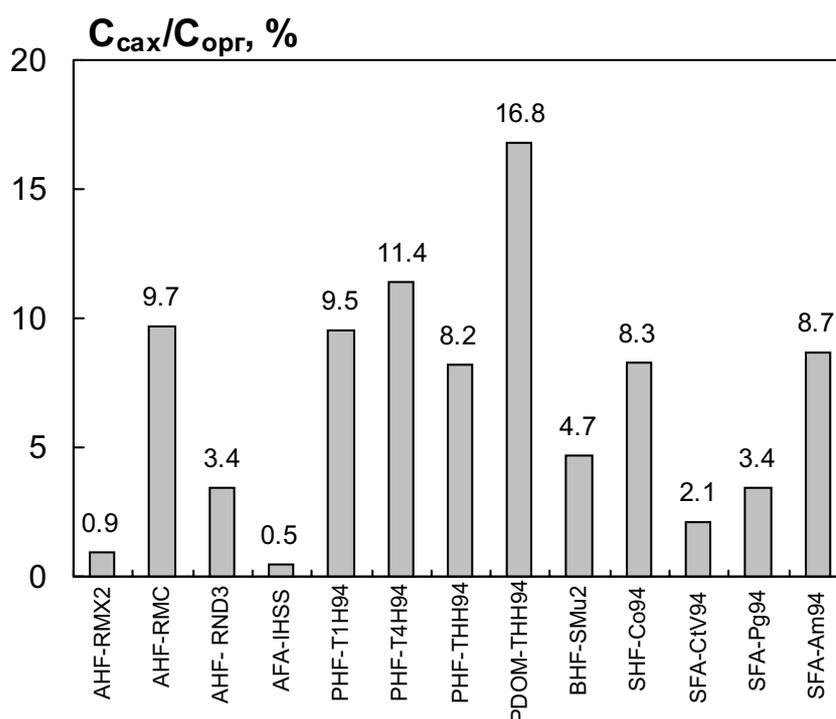


Рис. 4.15. Содержание моносахаридов в кислотном гидролизате (0.1 М HCl) в процентах от суммарного органического углерода исходного раствора гумусовых кислот.

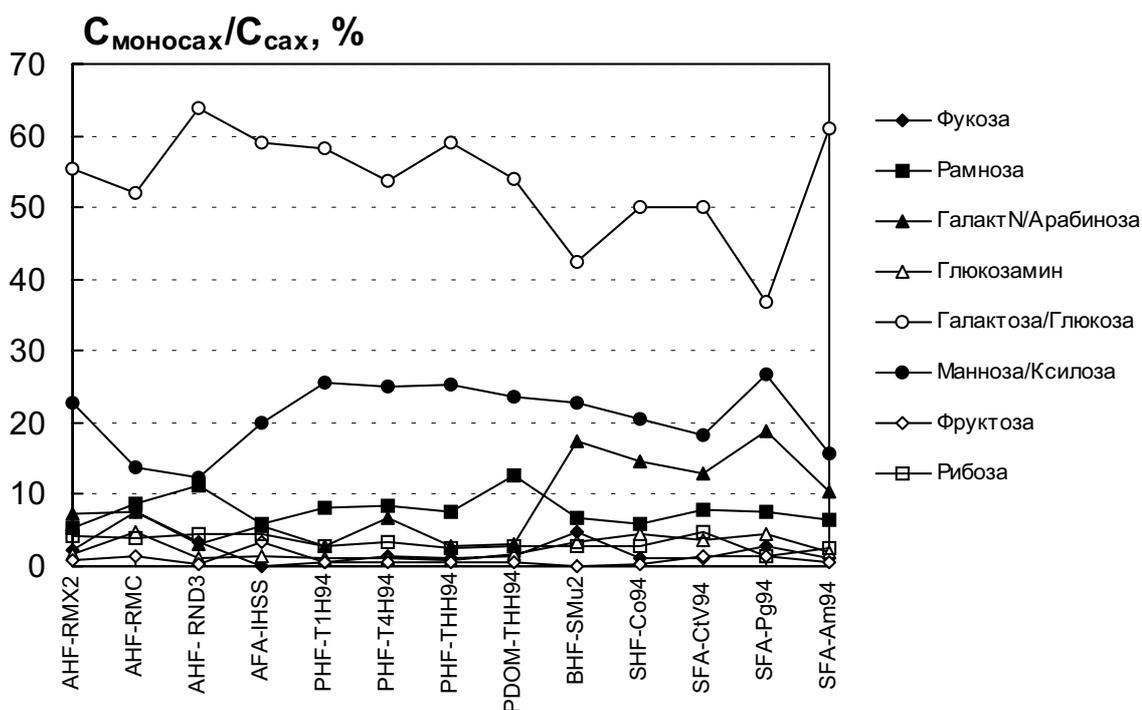


Рис. 4.16. Содержание индивидуальных моносахаридов в кислотном гидролизате гумусовых кислот в процентах от их суммарного содержания.

Таким образом, выполнен блок систематических исследований по определению структурно-группового состава гумусовых кислот методами одномерной и двумерной спектроскопии ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C . Решены методические проблемы, связанные с выбором условий для регистрации количественных спектров ^{13}C ЯМР. Разработана методика ПМР-определения водорода в составе скелетных фрагментов и функциональных групп гумусовых кислот. Реализация разработанных методик позволила характеризовать препараты гумусовых кислот набором интегральных дескрипторов структурно-группового состава, представляющих собой данные по содержанию углерода и водорода в составе структурных фрагментов в процентах от общего содержания Н и С в препарате. Получена база данных по структурно-групповому составу гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава, включающая ^{13}C ЯМР и ПМР данные по распределению углерода и водорода в составе 67 и 40 препаратов, соответственно. Проведена свертка полученного обширного массива данных с помощью расчета описательных статистик для выборок препаратов, группированных по сходному источнику происхождения и фракционному составу. Осуществлена детальная идентификация парциальных структур гумусовых кислот. Установлены парциальные структуры, характеристичные для гумусовых кислот различного фракционного состава и происхождения. Продемонстрирована перспективность применения двумерной спектроскопии

для решения задач идентификации препаратов гумусовых кислот. Исследованы особенности строения каркасной и периферической частей гумусовых кислот.

Вместе с тем, проведенное исследование позволило сформулировать целый ряд нерешенных аналитических проблем, связанных с определением структурно-группового состава гумусовых кислот, которые могли бы составить предмет будущих исследований. К их числу относится определение кислотных групп в образцах с высокой зольностью – случай, который весьма часто встречается на практике, но его адекватное аналитическое решение до сих пор отсутствует. Предложенная в нашей работе ПМР-методика определения функциональных групп является весьма существенным шагом вперед в плане идентификации определяемых кислотных групп, но она также неприменима для высокозольных образцов. Другой использованный метод – рК-спектроскопия – также весьма перспективен с точки зрения идентификации титруемых групп, однако он неприменим для анализа слабокислотных групп. Весьма широк круг нерешенных задач по идентификации структурных фрагментов гумусовых кислот и установлению их взаиморасположения в молекуле. В своей работе мы смогли только продемонстрировать масштабность задачи идентификации парциальных структур гумусовых кислот и показать, что наиболее перспективным методом для этой цели является двумерная спектроскопия ЯМР. Возможности данного мощного метода структурного анализа органических соединений постоянно возрастают в связи с совершенствованием ЯМР-спектрометров. С нашей точки зрения, именно здесь в самом скором будущем следует ожидать прорыва – расшифровки молекулярной структуры гумусовых кислот. Весьма целесообразной представляется также постановка широкомасштабных исследований по количественной спектроскопии ЯМР ^{13}C гумусовых кислот, направленных на прямое определение времен релаксации, а также установление зависимости получаемых данных от способа приготовления образца (концентрация, рН, ионная сила). Отдельной задачей является разработка новых алгоритмов извлечения количественной информации из сложных ЯМР-спектров гумусовых кислот, которые бы учитывали стохастический характер данных соединений.

Глава 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-МАССОВОГО СОСТАВА ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ

Для определения ММ состава гумусовых кислот был выбран метод эксклюзионной хроматографии, позволяющий получить информацию не только о средних ММ, но и о полной кривой ММР гумусовых кислот. Наряду с несомненными достоинствами метода, подробно обсужденными в обзоре литературы, его применение к анализу любых полиэлектролитов и гумусовых кислот, в частности, сопряжено с опасностью появления артефактов, – так называемых, неэксклюзионных эффектов. Поэтому особое внимание в нашей работе было обращено на определение адекватных условий анализа гумусовых кислот, включая выбор образца сравнения для расчета ММР. Кроме того, была поставлена задача повысить выход численной информации о характере ММР гумусовых кислот за счет детальной интерпретации эксклюзионных хроматограмм и кривой ММР.

5.1 Выбор оптимальных условий анализа

Определение молекулярно-массового состава препаратов гумусовых кислот проводили с использованием хроматографической системы, разработанной на кафедре водной химии в Техническом Университете Карлсруэ [Frimmel et al., 1992]. Система включала в себя автосамплер, инжектор (2 мл), заполненную гелем стальную колонку (20 мм × 25 см), два последовательно соединенных детектора – спектрофотометрический и проточный детектор растворенного органического углерода (Graentzel, Германия), снабженных интерфейсами для регистрации аналитического сигнала, и управляющий компьютер. Все анализы были выполнены на кафедре водной химии Университета Карлсруэ автором диссертации. Обработку результатов проводили на персональном компьютере с помощью оригинального программного обеспечения “Geltreat”, разработанного А..В. Кудрявцевым [Kudryavtsev et al., 2000].

Для устранения эффектов электростатического взаимодействия полианионов гумусовых кислот с материалом колонки – гидрофильным гелем *Toyopearl-HW*, – все определения выполнялись в 0.028 М фосфатном буфере при рН 6.8 согласно [Perminova et al., 1998]. Концентрация гумусовых кислот во фракционируемых пробах не превышала 3 мг органического углерода (С/л). Пробу гумусовых кислот предварительно уравнивали с подвижной фазой. Объем анализируемой пробы – 2 мл. Скорость элюирования – 1 мл/мин.

Для выбора геля с оптимальным диапазоном фракционирования ряд препаратов гумусовых кислот был проанализирован на колонках,

заполненных гелями с различным размером пор – *Toyopearl 40 HW(S)*, *50 HW(S)* и *55 HW(S)*. Кривые элюирования, полученные для препарата АНФ-*RMX2*, показаны на рис. 5.1. Все хроматограммы характеризовались мономодальным типом распределения, тогда как наиболее симметричные кривые наблюдалась для геля *Toyopearl-50 HW(S)*. Именно этот гель был выбран для анализа выборки препаратов гумусовых кислот различного происхождения. В ходе дальнейших экспериментов выяснилось, что выбранный гель действительно оптимален для водных препаратов гумусовых кислот и ФК различного происхождения ($K_d \approx 0.3$), тогда как фракционирование ГФК торфа и ГК почв осуществляется почти на верхнем пределе его диапазона фракционирования ($K_d \approx 0.2$). Поэтому необходимо признать, что для повышения достоверности определения молекулярно-массовых характеристик таких препаратов более предпочтительным является использование геля с большим размером пор – *55 HW(S)*.

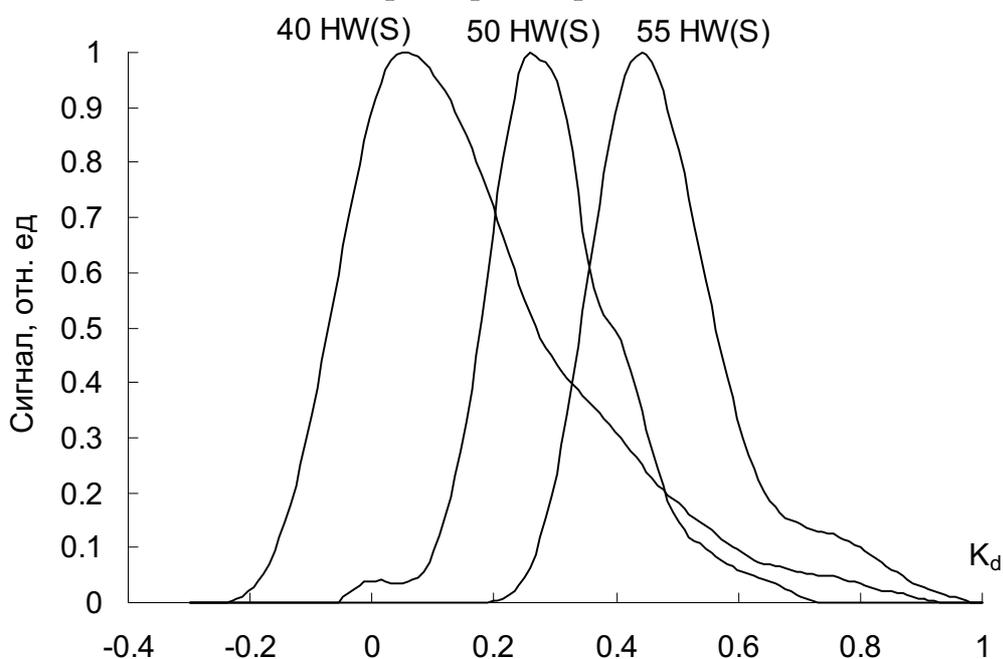


Рис. 5.1. Кривые элюирования препарата АНФ-*RMX2*, полученные на колонках, заполненных гелем *Toyopearl* с различным размером пор.

Для исключения зависимости характеристик кривых элюирования от геометрических параметров выбранной хроматографической системы, объемы удерживания конвертировали в коэффициенты доступности (K_d), используя для этой цели известное соотношение:

$$K_d = \frac{V_R - V_0}{V_t - V_0} \quad (5.1)$$

где V_R – объем удерживания аналита, V_0 – объем эксклюзии колонки, V_t – общий объем колонки.

Для использованной хроматографической системы V_0 и V_t составляли 26.0 и 67.1 мл, соответственно. Эти величины соответствуют объему выхода “голубого” декстрана (молекулярная масса 2.5 млн. Да) и метанола (36 Да).

Для проверки воспроизводимости кривых элюирования в координатах “ K_d ” – “отклик детектора”, полученных в различных хроматографических системах, было проведено фракционирование нескольких препаратов на колонке с другими геометрическими параметрами (15 мм × 40 см), но заполненной тем же гелем – *Toyopearl HW50S*. Как видно из сопоставления сконвертированных в шкалу K_d хроматограмм (рис. 5.2), для препаратов наблюдается хорошая воспроизводимость кривых элюирования, полученных в различных хроматографических системах. Кроме того, близость приведенных на том же рисунке кривых элюирования, полученных в течение года на одной и той же системе, позволяет сделать вывод о хорошей воспроизводимости результатов данного метода.

В связи с тем, что эксклюзионная хроматография представляет собой не абсолютный, а относительный метод определения молекулярных масс (ММ), то весьма важным и необходимым этапом анализа является калибровка хроматографической колонки. Сложности осуществления этой процедуры для определения молекулярно-массового распределения гумусовых кислот, связанные с отсутствием адекватных образцов сравнения, подробно обсуждаются в соответствующей публикации автора [Perminova et al., 1998]. Для демонстрации проблемы на рис. 5.4. приведены калибровочные кривые, полученные для одной и той же хроматографической системы с помощью четырех наборов полимерных гомологов с разным содержанием ионогенных групп на единицу массы. В качестве образцов сравнения использовали *полидекстраны (ПД)* с ММ 0.83, 4.4, 9.9, 21.4, 43.5 и 2000 КДа, *полиакрилаты натрия (ПА)* – 0.855, 1.25, 1.77, 4.0, 7.5 и 16 КДа, *полиметакрилаты натрия (ПМА)* – 1.67, 2.5, 6.9 и 9.8 КДа, *полистиролсульфонаты натрия (ПСС)* – 1.37, 3.8, 6.71, 8.0, 8.6, 13.4 и 16.9 КДа. Все образцы сравнения были приобретены у фирмы Polymer Standard Service (Mainz, Germany). Их полидисперсность не превышала 1.2. Для калибровки низкомолекулярной области ряд ПД расширяли за счет моно- и олигосахаридов (180, 342, 504 Да), глицерина (92 Да) и метанола (37 Да); ряд ПА – за счет насыщенного мономера, пропионовой кислоты (74 Да), ряд ПМА – за счет масляной кислоты (88 Да) и ряд ПСС – бензолсульфоновой кислоты (158 Да).

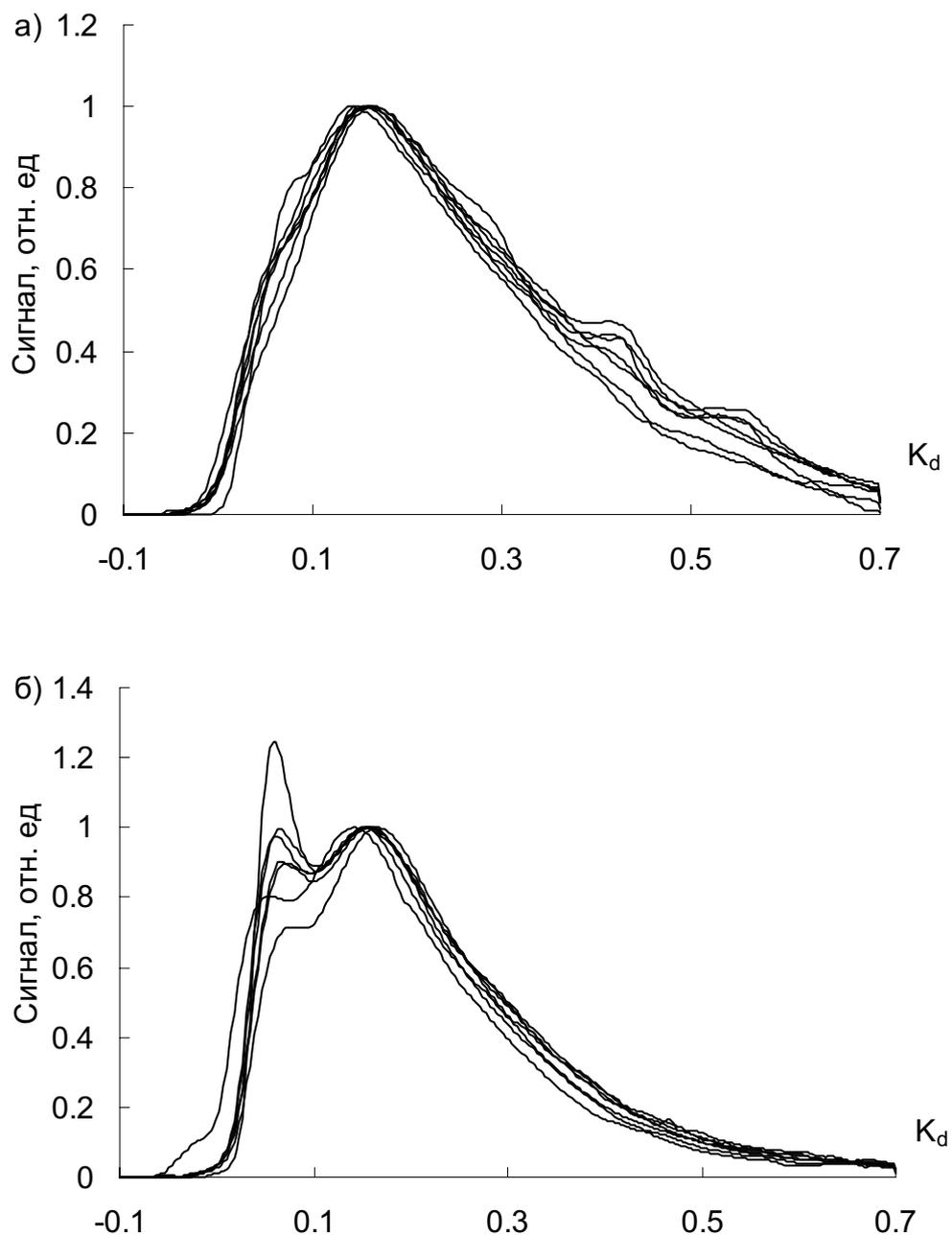


Рис. 5.2. Кривые элюирования, полученные в нескольких повторностях на колонках разного размера (гель – *Toyopearl HW50S*) в течение года для препарата *PHF-TNH94*. Детекция $C_{орг}$ (а) и УФ (б).

Как видно из приведенных кривых, угол наклона калибровочных зависимостей для заряженных полимеров (ПА, ПМА, ПСС) в гораздо большей мере определяется их удельным зарядом (Z), чем ММ. Количественно Z можно оценить с помощью следующего выражения:

$$Z = (\text{число ионогенных групп на моль мономера} / \text{ММ мономера})$$

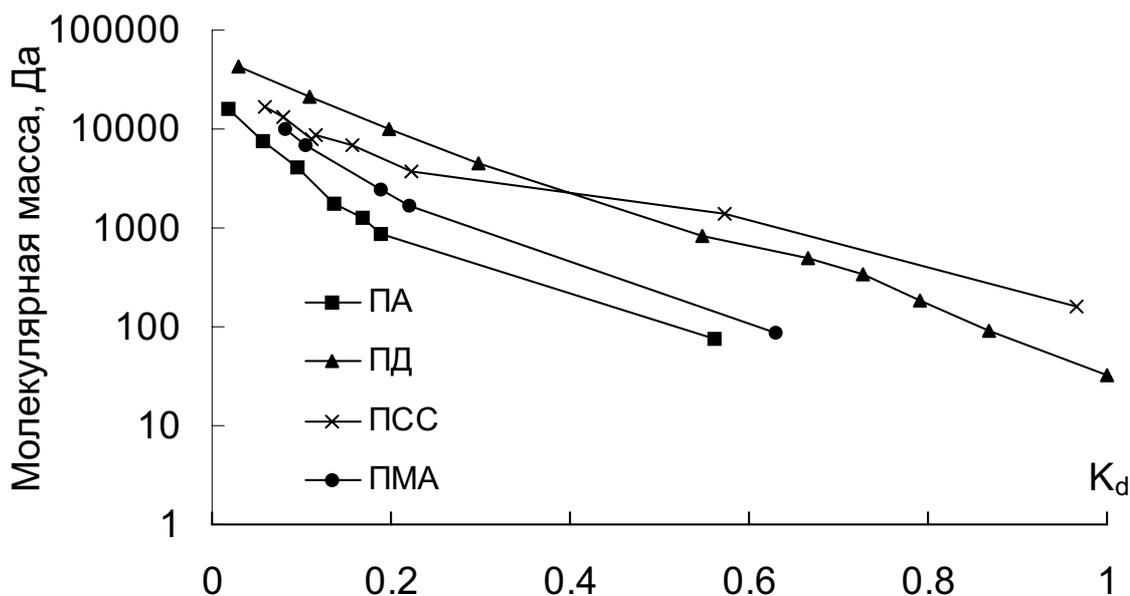


Рис. 5.3. Калибровочные кривые для колонки заполненной *Toyopearl HW50S*, полученные с использованием в качестве образцов сравнения полидекстранов (ПД), полиакрилатов (ПА), полиметакрилатов (ПМА) и полистиролсульфонатов (ПСС).

Тогда Z для ПА, ПМА и ПСС составляет 13.8, 11.6 и 5.4 ммоль/г, соответственно. Для гумусовых кислот эта величина варьирует от 3 до 5 ммоль/г (табл. 1.10). Как следует из рис. 5.3, чем больше Z , тем больше угол наклона соответствующего калибровочного графика. Это свидетельствует о том, что несмотря на использование буфера, указанные полианионы испытывают эффект сверхэксклюзии, вызванный электростатическим взаимодействием с матрицей геля, несущего частичный отрицательный заряд. Сопоставление калибровочных кривых заряженных полимеров и неионогенного ПД показывает, что величина ММ аналита, найденная с их помощью, может различаться на два порядка, будучи минимальной для ПД и максимальной – для ПА. Решением указанной проблемы могла бы быть количественная оценка вклада неэксклюзионного эффекта в экспериментально определяемые результаты анализа.

Если допустить, что хроматографическое поведение незаряженных молекул ПД обусловлено чисто эксклюзионными эффектами – различиями в гидродинамическом радиусе молекул разной молекулярной массы, то соответствующие калибровочные зависимости можно принять за идеальные для данной хроматографической системы. В этом случае количественной оценкой неэксклюзионного эффекта, обусловленного электростатическими или адсорбционными взаимодействиями аналита с гелем, может служить отклонение экспериментально определяемого K_d аналита от идеального,

который бы наблюдался в отсутствие неэкслюзионных факторов. Его можно записать с помощью следующего выражения:

$$\Delta K_d = K_d^0 - K_d^{\text{exp}} \quad (5.2)$$

где ΔK_d – неэкслюзионный эффект, K_d^0 – идеальный K_d , K_d^{exp} – экспериментально определяемый K_d

ΔK_d можно легко рассчитать для аналитов с известной молекулярной массой, находя K_d^0 по калибровочным зависимостям ПД. Так например, для исследованных полимеров ПД, ПСС, ПМА и ПА, имеющих ММ 4000 Да, соответствующие K_d^{exp} составляют 0.3, 0.2, 0.15 и 0.09. Тогда ΔK_d для этих же веществ составляет 0, 0.1, 0.15 и 0.21, возрастая по мере возрастания удельного заряда полимеров. Следовательно, величина ΔK_d является функцией структуры аналита, которая определяет его взаимодействия с матрицей геля. При этом если эффект сверхэкслюзии приводит к положительным значениям ΔK_d , то эффект специфической адсорбции будет приводить к его отрицательным значениям.

Принимая во внимание, что в отличие от использованных модельных полимеров, структурно-групповой состав гумусовых кислот включает в себя как ионогенные функциональные группы, гидрофильные углеводные фрагменты, так и гидрофобные ароматические и алкильные фрагменты, то их поведение в выбранной хроматографической системе трудно свести к какому-либо одному из исследованных образцов сравнения. Для выбора наиболее адекватной модели необходимо было установить количественную взаимосвязь между величиной неэкслюзионного эффекта и структурой анализируемого вещества. С этой целью в тех же экспериментальных условиях был проанализирован целый ряд низкомолекулярных аналогов структурных фрагментов гумусовых кислот, способных как к электростатическим, так и сорбционным взаимодействиям с гелем. Подробное описание проведенных экспериментов приведено в нашей работе [Perminova, 1999], а основные полученные результаты обсуждаются в следующем разделе.

5.2 Обоснование выбора образца сравнения для определения молекулярных масс гумусовых кислот

Для установления взаимосвязи между структурой аналита и неэкслюзионным эффектом, определяемым его взаимодействием с матрицей геля, была составлена выборка из обширного ряда органических соединений, моделирующих основные структурные фрагменты гумусовых кислот. В их число вошли карбоновые ароматические и алифатические кислоты, спирты, углеводы и аминокислоты (Приложение 5.1). Все указанные соединения были

проанализированы в тех же условиях, что и препараты гумусовых кислот (гель – *Toyopearl HW50S*, элюент – 0.028 М фосфатный буфер) с целью определения соответствующих K_d^{exp} . На основании известных ММ по калибровочной зависимости, построенной по ПД, определяли K_d^0 , необходимый для расчета искомой величины неэксклюзионного эффекта ΔK_d . Полученные значения приведены в Приложении 5.1.

Рассмотрение величины и знака рассчитанного неэксклюзионного эффекта показывает, что для всех ароматических оксикислот была характерна высокая специфическая сорбция на геле – соответствующие ΔK_d лежат в диапазоне от -0.3 до -0.5 . По-видимому, это связано с образованием водородных связей между гидроксилами оксикислот, лишь частично диссоциированными при рН 6.8, и отрицательно заряженными участками геля. Принимая во внимание, что в составе фенольных гидроксидов в гумусовых кислотах может находиться от 10 до 15% (отн) кислорода, то можно было ожидать весьма значительных сорбционных эффектов. В то же время определение баланса углерода гумусовых кислот на входе и выходе колонки показало почти полное отсутствие их сорбции на геле (не более 5 % (масс.) С). Это может быть связано с тем, что в структуру гумусовых кислот значительный вклад вносят углеводные фрагменты, которые экранируют гидрофобные ароматические участки гуминовых макромолекул (несущие фенольные гидроксилы в том числе) и в существенной степени предотвращают их взаимодействие с гелем. Для аминокислот, углеводов, спиртов было зафиксировано отсутствие неэксклюзионных эффектов (ΔK_d лишь немного отличен от нуля). Для всех карбоновых алифатических и ароматических кислот (за исключением упомянутых выше ароматических оксикислот) ΔK_d оказался положительным, что свидетельствует об эффекте сверхэксклюзии – наличии электростатического отталкивания между анионами органических кислот и отрицательно заряженными участками геля.

Проведенное исследование позволило продемонстрировать весьма существенное влияние обоих типов неэксклюзионных эффектов – специфической адсорбции и сверхэксклюзии – на гель-хроматографическое поведение органических кислот при их фракционировании в водных средах. При этом наблюдается отчетливая качественная взаимосвязь между структурой аналита и преобладающим типом неэксклюзионного эффекта. Однако предсказать его для гумусовых кислот, молекулярные фрагменты которых могут вступать как в адсорбционные, так и электростатические взаимодействия, можно только на основании количественной зависимости “структура – неэксклюзионный эффект”.

Для получения такой зависимости был сформирован блок данных по элементному и структурно-групповому составу модельных соединений, на основании которых затем рассчитывали атомные соотношения и другие комбинированные дескрипторы состава. Выбранный способ описания структуры индивидуальных соединений в терминах состава находился в логическом соответствии с принятым в работе общим подходом к описанию структуры гумусовых кислот. Корреляционные соотношения рассчитывали, применяя метод линейной множественной регрессии к блоку дескрипторов состава и прогнозируемым величинам ΔK_d . Наилучшее корреляционное соотношение, объясняющее 93 % вариации величины неэксклюзионного эффекта, приведено ниже:

$$\Delta K_d = 0.21 - 1.24O_{ArOH}/O - 0.18C/O + 0.35O_{COOH}/O - 0.47(N+S)/C + 0.07C/H \quad (5.3)$$

График соответствующий регрессионной зависимости показан на рис. 5.4.

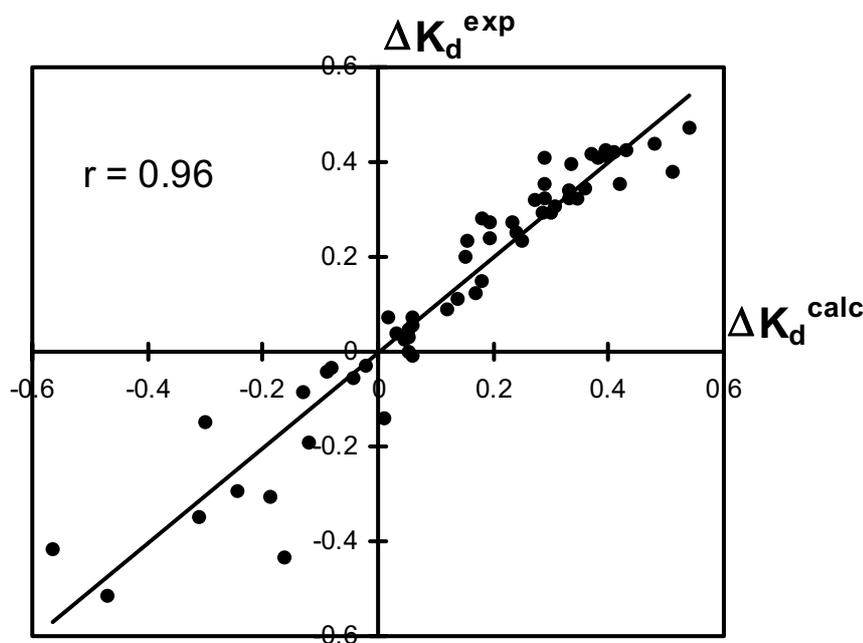


Рис. 5.4. Корреляционная взаимосвязь рассчитанных по уравнению (5.3) ΔK_d^{calc} и экспериментально найденных ΔK_d^{exp} для набора индивидуальных органических соединений (список в Приложении 5.1)

Полученное корреляционное соотношение имеет легко трактуемый физический смысл: ключевым фактором, определяющим хроматографическое поведение органического анализата в выбранной системе, является относительное содержание кислорода и его распределение между ионогенными функциональными группами – карбоксильными и фенольными гидроксильными. Практический выход полученного соотношения состоит в том, что зная указанные параметры, можно предсказать величину

неэксклюзивного эффекта для органического аналита, ввести соответствующую поправку в экспериментальный K_d и рассчитать ММ по неионогенным образцам сравнения (например, ПД или ПЭГ). Однако в силу того, что для вывода указанного соотношения были использованы только низкомолекулярные соединения, необходимо было проверить его применимость для высокомолекулярных соединений, обладающих полиэлектролитными эффектами.

С этой целью в соответствии с описанной процедурой была проведена корректировка данных для модельных полиэлектролитов с известной ММ – ПА, ПМА и ПСС. Величина ΔK_d , рассчитанного с помощью соотношения (5.3) составила 0.35, 0.25 и 0.09 для ПА, ПМА и ПСС, соответственно. Используя рассчитанную величину, определяли K_d^0 и находили ММ по калибровочной зависимости для ПД. Полученные результаты показаны на рис. 5.5.

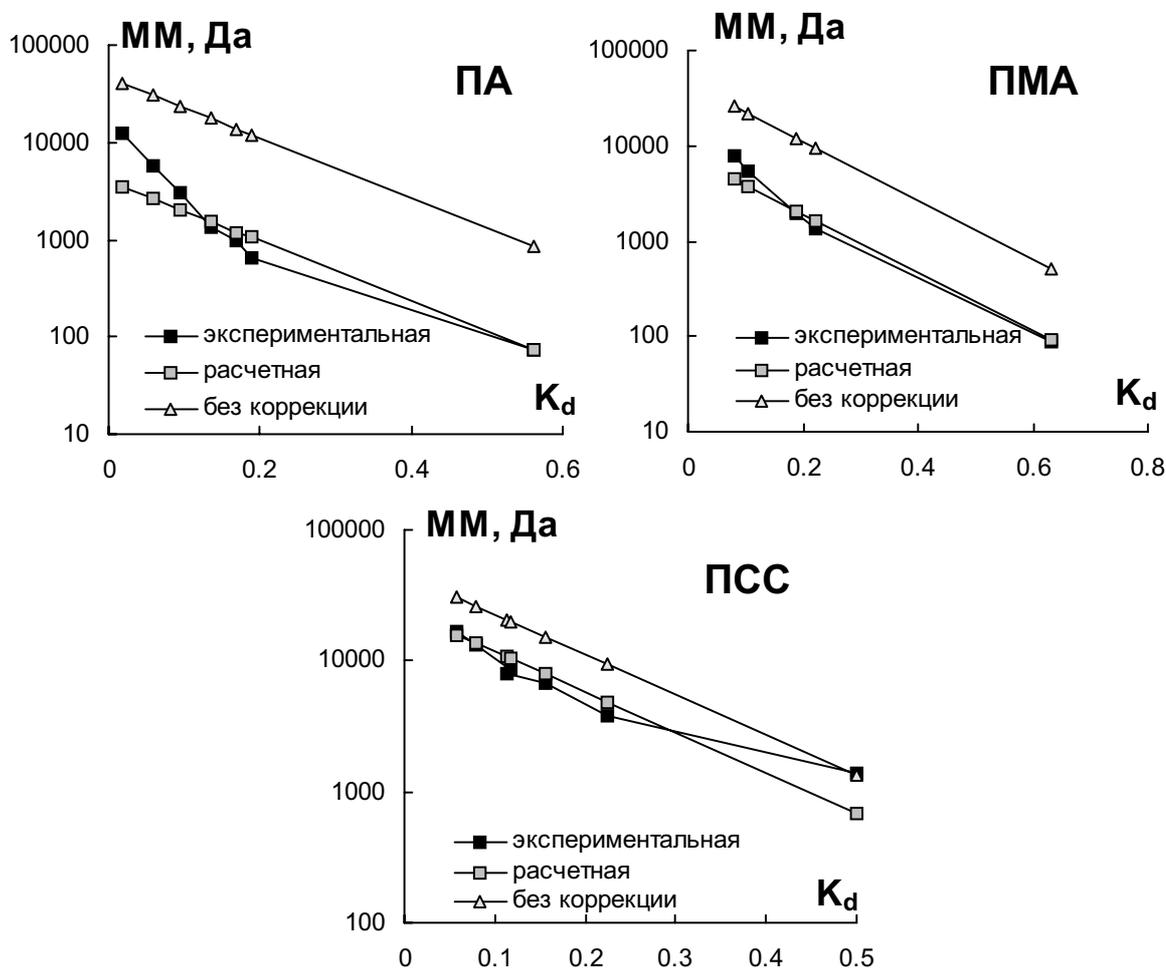


Рис. 5.5. Калибровочные зависимости для модельных полиэлектролитов, найденные экспериментально, и рассчитанные с помощью соотношения (5.3).

Как видно из представленных зависимостей, определение ММ полиэлектролитов по величине K_d^{exp} с использованием ПД в качестве образца

сравнения приводит к существенному завышению результатов (кривая “без коррекции”). Тогда как коррекция K_d^{exp} на рассчитываемую величину неэксклюзионного эффекта – ΔK_d , позволяет гораздо более адекватно определять ММ полиэлектролитов (кривая “расчетная” на рис. 5.6). Особенно хороших результатов удастся добиться для полиэлектролитов с низким удельным зарядом (ПСС), тогда как аппроксимация для ПА существенно хуже. По-видимому, это связано с усилением полиэлектролитных эффектов по мере возрастания удельного заряда макромолекул. Принимая во внимание, что удельный заряд гумусовых кислот не превосходит таковой для ПСС, то соотношение (5.3) можно применять для оценки их ΔK_d .

Для расчета неэксклюзионного эффекта гумусовых кислот использовали средние (по всей выборке из 98 препаратов) величины атомных соотношений O/C, H/C и (N+S)/C, приведенные в Приложении 3.2. Численные значения искомым параметров C/O, C/H и (N+S)/C составили 1.8, 1.1 и 0.03, соответственно. На основании собственных (Глава 4) и литературных данных [Schnitzer and Khan, 1972; Stevenson, 1982; Орлов, 1990] по распределению кислорода в составе функциональных групп средние значения O_{ArOH}/O и O_{COOH}/O принимали равными 0.1 и 0.5, соответственно. Величина рассчитанного для указанного набора данных ΔK_d оказалась близка к нулю (–0.0022). Это дает основания предполагать, что в выбранных условиях анализа электростатические и адсорбционные взаимодействия гумусовых кислот с гелем практически полностью скомпенсированы. Следовательно, полимерами, максимально близкими гумусовым кислотам по своему хроматографическому поведению в выбранных условиях анализа являются неионогенные ПД или ПЭГ. Принимая во внимание, что гумусовые кислоты в водном растворе имеют конформацию статистического клубка, а не вытянутой палочки [Swift, 1989], то использование ПД в качестве образца представляется более предпочтительным.

На основании полученных результатов расчет всех молекулярно-массовых характеристик гумусовых кислот проводили с использованием калибровочной зависимости по ПД.

5.3 Характеристика молекулярно-массового состава исследованных препаратов гумусовых кислот

Для обработки эксклюзионных хроматограмм гумусовых кислот использовали оригинальную программу “Geltreat”, которая позволяет проводить как первичную обработку кривых элюирования – коррекцию нулевой линии, сглаживание, так и рассчитывать калибровочную зависимость, ММР и его численные дескрипторы. Изложению принятого в работе подхода к расчету дескрипторов ММР гумусовых кислот посвящена

соответствующая публикация [Kudryavtsev et al., 2000]. Основное новшество состоит в том, что для получения детальной информации о специфике ММ состава гумусовых кислот наряду с традиционными характеристиками ММР – средними ММ (M_n , M_w , M_z) и полидисперсностью (M_w/M_n , M_z/M_w), рассчитывали также параметры, характеризующие форму хроматограммы (в шкале K_d) с помощью метода статистических моментов [Belenki and Vilenchik, 1983]. В отличие от указанных характеристик ММР, основным достоинством которых является фундаментальность, параметры кривой элюирования гораздо более специфичны для каждого конкретного препарата, т.е. обладают большей дискриминирующей способностью. Кроме того, они более точны, так как исключается процедура пересчета распределения через калибровочную зависимость. Их недостатком является зависимость от типа хроматографической системы, на которой был выполнен анализ, то есть весьма ограниченная “переносимость” на другие условия. Хотя продемонстрированная выше хорошая воспроизводимость хроматограмм, полученных для препаратов гумусовых кислот на разных хроматографических колонках, заполненных одним и тем же гелем (рис. 5.2), показывает возможность использовать эти параметры, по крайней мере, в пределах одного геля. Для характеристики кривой элюирования рассчитывали средние K_d [$(K_d)_n$, $(K_d)_w$ и $(K_d)_z$], начальные и центральные моменты (m_2 , m_3 , m_4 , cm_2 , cm_3 , cm_4), коэффициент асимметрии (A) и эксцесс (E). Помимо формы кривой, характеризовали также распределение площади под кривой, рассчитывая квантили (Q) и парциальные интегралы (I). Список обозначений и математические формулы для расчета дескрипторов молекулярно-массового состава приведены в табл. 5.1.

Для получения дескрипторов, которые бы сочетали в себе как фундаментальность, так и высокую дискриминирующую способность, в нашей работе впервые был осуществлен расчет распределения эффективных коэффициентов поглощения гумусовых кислот по молекулярным массам, основанный на совместной обработке выходных данных детекторов УФ-поглощения и органического углерода (C). Развитие такого подхода стало возможным благодаря несомненному техническому достоинству использованной хроматографической системы, снабженной не только УФ-спектрофотометрическим, но и проточным детектором органического углерода. Это позволило, во-первых, рассчитывать ММР гумусовых кислот на

Список обозначений и математические формулы для расчета дескрипторов молекулярно-массового состава гумусовых кислот

Дескриптор	Формула и (или) примечание
Средние молекулярные массы: среднечисловая – M_n , средневесовая – M_w , z-средняя – M_z	$\bar{M} = \frac{\int_{K_{d0}}^{K_{dk}} M^r(K_d)F(K_d)dK_d}{\int_{K_{d0}}^{K_{dk}} M^{r-1}(K_d)F(K_d)dK_d}$ <p>где $F(K_d)$ хроматограмма в координатах K_d (от K_{d0} до K_{dk}), $M(K_d)$ – калибровочная зависимость, \bar{M} при $r = 0$ соответствует M_n, при $r = 1$ – M_w и при $r = 2$ – M_z.</p>
Начальные моменты: m_2, m_3, m_4	$m_n = \frac{\int_{K_{d0}}^{K_{dk}} F(Kd)Kd^n dKd}{\int_{K_{d0}}^{K_{dk}} F(Kd)dKd}$
Центральные моменты: mc_2, mc_3, mc_4	$mc_n = \frac{\int_{K_{d0}}^{K_{dk}} F(Kd)(Kd - m_1)^n dKd}{\int_{K_{d0}}^{K_{dk}} F(Kd)dKd}$
Коэффициент асимметрии: A	$A = mc_3 / mc_2^{3/2}$
Эксцесс: E	$E = (mc_4 / mc_2^2) - 3$
Средние K_d : $(K_d)_n, (K_d)_w$ и $(K_d)_z$	$\bar{K}_d = \frac{\int_{K_{d0}}^{K_{dk}} K_d^r F(K_d)dK_d}{\int_{K_{d0}}^{K_{dk}} K_d^{r-1} F(K_d)dK_d}$ <p>где \bar{K}_d соответствует “среднечисловому” $((K_d)_n)$, “средневесовому” $((K_d)_w)$ и “Z-среднему” $((K_d)_z)$ значению K_d при $r = 0, 1$ и 2, соответственно.</p>
Квантили: Q_{25}, Q_{50}, Q_{75}	Значения координаты (ММ или K_d), соответствующее 25, 50 и 75% всего интеграла.
Парциальные интегралы: $I_{x_1-x_2}$	Значение интеграла в интервале от x_1 до x_2 (кДа). Использовано для распределения ϵ^* по ММ.

основании данных прямого определения их содержания, – из кривых элюирования по С. Тем самым был снят традиционный вопрос о степени соответствия УФ-профиля истинному распределению гумусовых кислот в хроматографической колонке, который обусловлен зависимостью оптических свойств гумусовых кислот от их ММ [Орлов, 1991]. Во-вторых, наличие двойной системы регистрации позволило не только напрямую оценить диапазон возможных колебаний величины ϵ^* гумусовых кислот в пределах разных фракций одного препарата, но и получить распределение данной величины по молекулярным массам.

Важность постановки такой проблемы становится очевидной при рассмотрении типичных кривых элюирования, полученных с помощью одновременной регистрации УФ-поглощения и С для препаратов гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава (рис. 5.6). Как видно из приведенных данных, для узкодисперсных фракционированных препаратов (ГК и ФК) различия в хроматографических профилях минимальны, но они существенно возрастают по мере увеличения полидисперсности препарата. Для нефракционированных препаратов (ГФК), как правило, наблюдается появление второго максимума на УФ-хроматограммах, который проявляется в виде плеча на С-профилях. Это связано с тем, что высокомолекулярные фракции гумусовых кислот более сильно поглощают в УФ-области спектра, чем низкомолекулярные. Следовательно, в данном случае использование УФ-хроматограмм для расчета ММР может привести к существенному завышению содержания высокомолекулярных фракций. Поэтому в нашей работе для расчета ММР использовали только С-профили.

На основании результатов, изложенных в предыдущем параграфе, расчет ММР проводили с использованием ПД в качестве образца сравнения. Соответствующее уравнение калибровочной зависимости, наилучшим образом описывающее экспериментальную кривую ($r^2 = 0.998$), приведено ниже:

$$\lg M = 6.73 - 0.0773 \times K_d \quad (5.4)$$

Типичные хроматограммы и кривые ММР препаратов гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава приведены на рис. 5.6. Хроматограммы и кривые ММР всех исследованных в работе препаратов приведены в Приложении 5.2 и 5.3, соответственно.

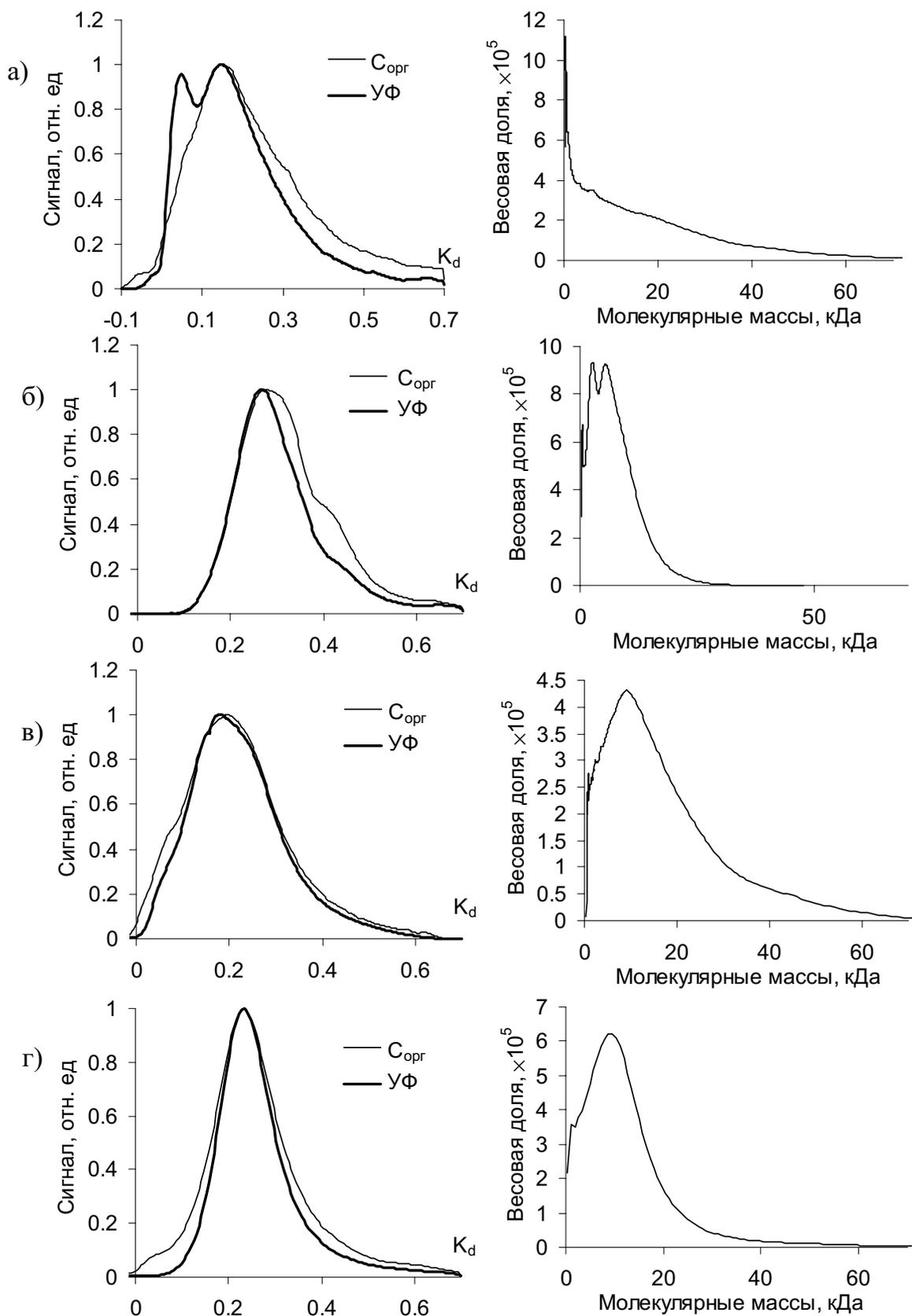


Рис. 5.6. Типичные кривые элюирования и соответствующие им кривые ММР для препаратов гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава: ГФК торфа (а), ГФК вод (б), ГК почв (в) и ФК почв (г).

Их сопоставление позволяет сделать вывод, что форма и положение максимума хроматограмм и кривых ММР существенно зависит как от фракционного состава (ГК и ФК почв), так и источника происхождения (ГФК торфа и вод). При этом хроматограммы фракционированных препаратов (ГК и ФК) гораздо более симметричны, а ММР существенно уже, чем нефракционированных (ГФК). Максимумы ММР водных препаратов и ФК почв лежат в диапазоне существенно более низких ММ, чем ГК почв или ГФК торфа.

Полученные результаты по средним ММ, полидисперсностям, пиковой ММ и их стандартные отклонения для всех исследованных препаратов приведены в табл. 5.2. Оценки среднего и дисперсии M_n , M_w , M_p и M_w/M_n для препаратов, сгруппированных по источнику происхождения и фракционному составу, приведены в табл. 5.3. Воспроизводимость единичного определения M_w и M_w/M_n довольно высокая (s_r составляет 7 %).

Таблица 5.2

Некоторые характеристики ММР исследованных препаратов
гумусовых кислот ($n = 3$, $P = 0.95$)

Препарат	M_n	M_w	M_z	M_p	M_w/M_n	M_z/M_w
	КДа					
ГФК торфа						
RHF-T10L94	4.7±0.4	19±3	39±1	26±2	4.0±0.8	2.17±0.3
RHF-T1H94	5.0±0.8	17.3±0.7	31±2	20±1	3.6±0.5	1.79±0.08
RHF-T4H94	5.6±0.7	22.2±0.5	38.1±0.8	32±8	4.0±0.4	1.72±0.05
RHF-T5H94	4.9±0.8	19±1	35±2	30±17	3.9±0.4	1.83±0.07
RHF-T6H94	4.6±0.4	17.1±0.8	31±2	21±1	3.8±0.3	1.81±0.06
RHF-T7H94	5.0±0.4	18±5	32±10	20±5	3.5±0.9	1.8±0.1
RHF-TH94	4.6±0.4	16.8±0.6	30±1	21±1	3.7±0.2	1.8±0.04
RHF-TTL94	5.6±0.6	19±2	32±4	23±1	3.4±0.2	1.66±0.05
РОВ торфа						
PDOM-TH	2.7±0.3	10.9±0.7	27±1	7.6±0.8	4.1±0.2	2.4±0.1
PDOM-TT	2.5±0.3	10.0±0.7	25.4±0.8	7.1±0.8	4.1±0.2	2.54±0.09
ГФК почв						
SHF-Co94	5.5±0.7	19±1	35±1	36±11	3.6±0.3	1.79±0.08
ГК почв						
SHA-Cm94	6±2	17±3	30±4	15±2	3.1±0.8	1.7±0.1
SHA-CtV94	5.9±0.7	15±2	25±4	15±1	2.6±0.5	1.62±0.08
SHA-Gp94	7±1	22±4	35±6	21±9	3.0±0.2	1.58±0.07

Препарат	M _n	M _w	M _z	M _p	M _w /M _n	M _z /M _w
	КДа					
SHA-Gw94	6±1	21±3	34±6	22±7	4±1	1.61±0.02
SHA-Pg94	8±2	22±5	34±6	23±5	2.9±0.1	1.55±0.06
SHA-Pp94	8±2	21±5	33±5	226±6	2.7±0.2	1.6±0.1
SHA-Pw94	9±2	19±3	28±3	16±3	2.1±0.5	1.5±0.1
ФК почв						
SFA-Am*	8.1±0.8	20.1±0.7	31.8±0.8	16.8±0.8	2.5±0.2	1.58±0.04
SFA-CtV94	5.7±0.7	12.6±0.5	21±1	11.8±0.8	2.3±0.2	1.66±0.06
SFA-Cm94	4±1	114±1	21±3	10.0±0.8	2.5±0.3	1.92±0.02
SFA-Gw94	5.4±0.9	14±1	25±1	14±2	2.7±0.3	1.75±0.05
SFA-Pg94	5.4±0.3	12.6±0.7	22±1	12.5±0.7	2.3±0.1	1.73±0.02
SFA-Pp94	4±1	10±1	17±2	10±1	2.4±0.4	1.7±0.1
SFA-Pw94	4.7±0.6	10.2±0.8	18±2	9.7±0.8	2.2±0.2	1.76±0.02
ГК угля						
CHA-AGK	2.6±0.9	3±2	2.3±0.3	4±10	2.9±0.1	3.4±0.3
ГФК природных вод						
AHF-RND3	4.0±0.3	11.0±0.8	29±2	7.8±0.6	2.7±0.1	2.63±0.07
AHF-MMu8	3.2±0.4	8.6±0.7	21±1	6.2±0.9	2.7±0.1	2.5±0.2
AHF-RMC	4.7±0.4	15.1±0.6	36±1	8.1±0.5	3.3±0.2	2.39±0.05
AHF-RMX2	3.3±0.3	7.3±0.6	14±3	7.5±0.5	2.2±0.1	1.9±0.3
AHF-RMX8	3.1±0.3	7.0±0.5	12±2	7.9±0.8	2.35±0.2	1.7±0.2
ФК и РОВ природных вод						
AFA-GFg1	2.7±0.7	6±2	9±4	6±4	2.1±0.3	1.59±0.07
ADOM-SMu4	3.5±0.7	10±2	21±4	8.1±0.5	2.9±0.1	2.05±0.09
ADOM-SMu8	2.9±0.1	8±1	17±3	7±1	2.7±0.2	2.15±0.04
ГФК донных отложений						
BHF-RND13	5.5±0.6	17±2	33±2	12±7	3.17±0.04	1.9±0.1
BHF-SMu2	5.4±0.8	19±1	35±2	43±5	3.7±0.5	1.81±0.07

*Препарат с небольшой примесью гидролизованной ДЭАЭ-целлюлозы

Оценки среднего и дисперсии характеристик ММР и массового коэффициента поглощения ε^* препаратов гумусовых кислот, сгруппированных по происхождению и фракционному составу

	\bar{x}	Med	X_{\min}	X_{\max}	Q_{25}	Q_{75}	s^2	A	E	W
ГФК торфа (n = 8)										
M_n	5.0	4.9	4.6	5.6	4.6	5.3	0.2	0.76	-0.73	0.849
M_w	18.5	18.2	16.8	22.2	17.2	19.1	3.1	1.45	2.42	0.852
M_z	33.5	32.0	30.0	39.2	30.9	36.6	12.4	0.87	-0.95	0.857
M_p	24.1	22.0	19.2	32.0	20.6	28.0	22.5	0.86	-0.83	0.875
M_w/M_n	3.7	3.7	3.4	4.0	3.6	4.0	0.1	-0.09	-1.46	0.942
M_z/M_w	1.8	1.8	1.7	2.1	1.8	1.8	0.01	1.46	3.61	0.843
ε^*	0.064	0.063	0.056	0.077	0.058	0.067	0.00005	0.97	1.14	0.937
ГК почв (n = 8)										
M_n	6.2	6.7	5.9	9.0	5.9	7.7	1.4	-1.92	4.57	0.787
M_w	17.3	19.9	15.4	22.2	16.4	21.7	6.9	-2.26	5.50	0.701
M_z	27.3	31.2	25	35.0	26.5	34.3	14.3	-2.35	5.88	0.684
M_p	16.9	18.8	15	22.6	15.2	22.1	12.0	-1.89	4.01	0.760
M_w/M_n	15.0	3.0	2.1	3.6	2.7	3.3	0.22	2.83	8.00	0.429
M_z/M_w	13.9	1.6	1.5	1.7	1.6	1.7	0.004	2.83	8.00	0.419
ε^*	0.089	0.086	0.077	0.117	0.079	0.099	0.0002	1.47	1.75	0.840
ФК почв (n = 7)										
M_n	5.4	5.4	4.1	8.1	4.4	5.7	1.7	1.65	3.34	0.839
M_w	12.9	12.6	9.8	20.1	10.2	14.3	12.7	1.63	2.94	0.833
M_z	22.1	20.9	16.9	31.8	17.9	25.1	25.1	1.29	1.81	0.894
M_p	12.1	11.8	9.7	16.8	10.0	13.7	6.3	1.14	0.99	0.890
M_w/M_n	2.4	2.4	2.2	2.7	2.3	2.5	0.03	0.31	0.12	0.984
M_z/M_w	1.7	1.7	1.6	1.9	1.7	1.8	0.01	0.50	1.69	0.934
ε^*	0.055	0.052	0.047	0.074	0.048	0.056	0.00008	2.00	4.46	0.776
ГФК природных вод (n = 5)										
M_n	3.7	3.3	3.1	4.6	3.1	3.7	0.4	1.08	-0.31	0.850
M_w	9.8	8.6	7.0	15.1	7.0	9.8	11.2	1.24	0.86	0.870
M_z	22.4	21.4	11.7	36.1	11.7	25.1	103.7	0.40	-1.61	0.943
M_p	7.5	7.8	6.2	8.1	6.2	7.9	0.6	-1.77	3.18	0.804
M_w/M_n	2.6	2.7	2.2	3.3	2.2	2.7	0.2	0.56	-0.43	0.914
M_z/M_w	2.2	2.4	1.7	2.6	1.7	2.4	0.2	-0.61	-2.03	0.901
ε^*	0.039	0.039	0.030	0.044	0.038	0.042	0.00003	-1.18	1.80	0.913

Объединенная выборка (n = 27)										
M_n	5.4	5.0	3.1	9.0	4.6	6.0	2.2	0.750	0.231	–
M_w	15.8	17.1	7.0	22.2	11.0	19.2	22.6	–0.381	–1.040	–
M_z	27.9	30.0	11.7	39.2	21.4	34.0	56.0	–0.594	–0.567	–
M_p	16.7	16.4	6.1	32.0	10.0	22.1	50.8	0.330	–0.689	–
M_w/M_n	3.0	2.7	2.1	4.0	2.4	3.6	0.4	0.322	–1.274	–
M_z/M_w	1.8	1.7	1.5	2.6	1.6	1.8	0.1	1.807	2.856	–
ε^*	0.063	0.060	0.030	0.117	0.048	0.077	0.0004	0.73	0.62	–

\bar{x} , X_{\min} , X_{\max} и Med – средние, мин. и макс. значения и медиана, соответственно. Q_{25} и Q_{75} – нижние и верхние квартили, A – коэффициент асимметрии, E – эксцесс.

Как видно из полученных данных, вопреки весьма распространенному мнению о том, что ММ гумусовых кислот варьируют от сотен до сотен тысяч Дальтон [De Nobili and Gjessing, 1989], весь диапазон изменения M_w исследованных препаратов гумусовых кислот различного фракционного состава и происхождения составил от 7000 до 22200 Да, а M_w/M_n – от 2.1 до 4.0. При этом по величине M_w препараты расположились в следующий ряд: водные ГФК < почвенные ФК < почвенные ГК < ГФК торфа. По полидисперсности ряд был несколько иной: почвенные ФК < почвенные ГК \cong водные ГФК < ГФК торфа. Легко заметить, что процедура фракционирования препаратов на ФК и ГК существенно снижает их полидисперсность, в то время как исходные экстракты характеризуются высокой полидисперсностью (5 и выше). Этот показатель существенно ниже для гумусовых кислот вод, макромолекулы которых практически не содержат включений полисахаридных фрагментов. Как следствие, их распределение по ММ гораздо уже, чем торфа – полидисперсность препаратов составляет, в среднем, 3.2.

Установив ММР препаратов гумусовых кислот, рассчитывали распределение ε^* по ММ. Задача осложнялась тем, что в использованной хроматографической системе отклик УФ-детектора регистрировался не в единицах оптической плотности, а в Вольтах. Поэтому в качестве первого этапа необходимо было определить “постоянную ячейки”. Для этой цели использовали хроматограммы низкомолекулярных индивидуальных соединений, зарегистрированные при той же длине волны, что и для гумусовых кислот – 254 нм и в кювете с такой же длиной оптического пути – 1 см. Рассчитывали площадь под УФ-хроматограммой, относили ее к площади под С-хроматограммой, пересчитанной в массовую концентрацию

анализируемого вещества с помощью соответствующей калибровки по гидрофталату калия (мг С/л), а затем соотносили полученную величину ($I_{УФ}/I_{Сорг}$) с экспериментально измеренным ϵ^*_{exp} . Последний определяли как отношение оптической плотности раствора индивидуального соединения в 0.028 М фосфатном буфере, измеренной на спектрофотометре при $\lambda = 254$ нм и $l = 1$ см, к его массовой концентрации (мг С/л). Список использованных индивидуальных соединений, соответствующие ϵ^*_{exp} при 254 нм и график для расчета “постоянной ячейки” приведены в Приложении 5.4. Рассчитанная “постоянная ячейки” составила 0.0821 ± 0.0014 ед. изм. отклика УФ-детектора. Это позволило прокалибровать шкалу отклика УФ-детектора в единицах ϵ^* .

Для проверки правильности предложенной процедуры и ее применимости для расчета распределения ϵ^* гумусовых кислот по ММ было проведено сопоставление средних ϵ^* , определенных для каждого препарата гумусовых кислот, двумя способами: (1) путем расчета из соответствующей УФ-хроматограммы, перестроенной в ϵ^* – координатах (ϵ^*_{calc}), и (2) экспериментальным путем, измеряя оптическую плотность раствора препарата в 0.028 М фосфатном буфере при $\lambda = 254$ нм и $l = 1$ см, и относя ее к известной массовой концентрации препарата (мг С/л) (ϵ^*_{exp}). Значения ϵ^*_{exp} приведены в табл. 5.4. Их сопоставление с рассчитанными из хроматограмм (ϵ^*_{calc}) приведено на рис. 5.7.

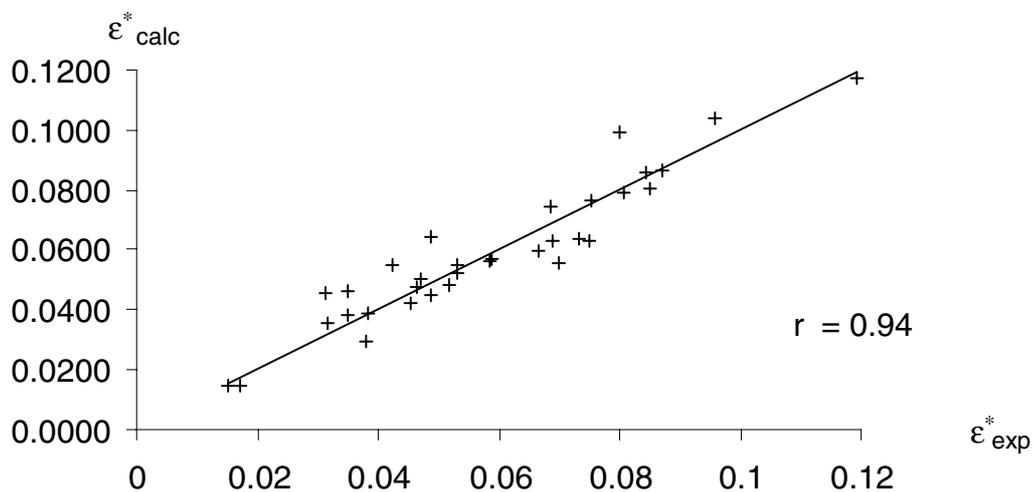


Рис. 5.7. Зависимость экспериментально найденных значений ϵ^*_{exp} препаратов гумусовых кислот, указанных в табл. 5.4, и рассчитанных для них с помощью “постоянной ячейки” из соотношения УФ- и $C_{орг}$ -хроматограмм ϵ^*_{calc}

Массовые коэффициенты поглощения ε^* препаратов гумусовых кислот ($\lambda = 254$ нм, $l = 1$ см, $C_{ГФК}$ в мг С/л, $n = 3$, $P = 0.95$)

Препарат	ε^* , л/(мг С×см)	Препарат	ε^* , л/(мг С×см)
ГФК торфа		ФК почв	
PHF-T10L94	0.065±0.008	SFA-Am	0.056±0.002
PHF-T1H94	0.056±0.005	SFA-CtV94	0.074±0.002
PHF-T4H94	0.060±0.005	SFA-Cm94	0.052±0.004
PHF-T5H94	0.063±0.003	SFA-Gw94	0.048±0.002
PHF-T6H94	0.064±0.006	SFA-Pg94	0.055±0.001
PHF-T7H94	0.077±0.009	SFA-Pp94	0.050±0.001
PHF-TН94	0.057±0.002	SFA-Pw94	0.047±0.001
PHF-TTL94	0.068±0.005	ГФК почвенного раствора	
РОВ торфа		SDFa-BS1FA	0.053
PDOM-TH	0.015±0.001	ГК углей	
PDOM-TT	0.015±0.001	CHA-AGK	0.099±0.009
ГФК почв		ГФК природных вод	
SHF-Co94	0.056±0.006	AHF-RND3	0.042±0.002
ГК почв		AHF-MMu8	0.038±0.001
SHA-Cm94	0.099±0.002	AHF-RMC	0.030±0.001
SHA-CtV94	0.117±0.006	AHF-RMX2	0.039±0.001
SHA-Gp94	0.081±0.007	AHF-RMX8	0.044±0.001
SHA-Gw94	0.086±0.004	ФК природных вод	
SHA-Pg94	0.079±0.001	AFA-SHo10	0.056
SHA-Pp94	0.077±0.001	AFA-GFg1	0.034
SHA-Pw94	0.086±0.002	ГК природных вод	
SHA-PwN	0.104	ANA-SHo10	0.066
ГФК донных отложений		РОВ природных вод	
BHF-RND13	0.055±0.004	ADOM-SMu4	0.046±0.002
BHF-SMu2	0.075±0.012	ADOM-SMu8	0.045±0.003

Как следует из приведенных данных, между $\varepsilon^*_{\text{exp}}$ и $\varepsilon^*_{\text{calc}}$ наблюдается хорошее соответствие:

$$\varepsilon^*_{\text{exp}} = 1.0006 \times \varepsilon^*_{\text{calc}} \quad (r = 0.95) \quad (5.5)$$

Это говорит о том, что указанная процедура может быть применена для конвертации шкалы отклика УФ-детектора в ε^* -шкалу.

Расчет распределения ϵ^* по ММ проводили в две стадии – ординату УФ-хроматограммы делили на ординату С-хроматограммы и умножали полученную величину на “постоянную ячейки”. Абсциссу (объемы удерживания, V_R) конвертировали с помощью калибровочной зависимости в ММ, что позволяло получить искомое распределение ϵ^* по ММ. Типичные кривые указанного распределения для препаратов гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава приведены на рис. 5.8, а для препаратов (см. табл. 2.2) в Приложении 5.5.

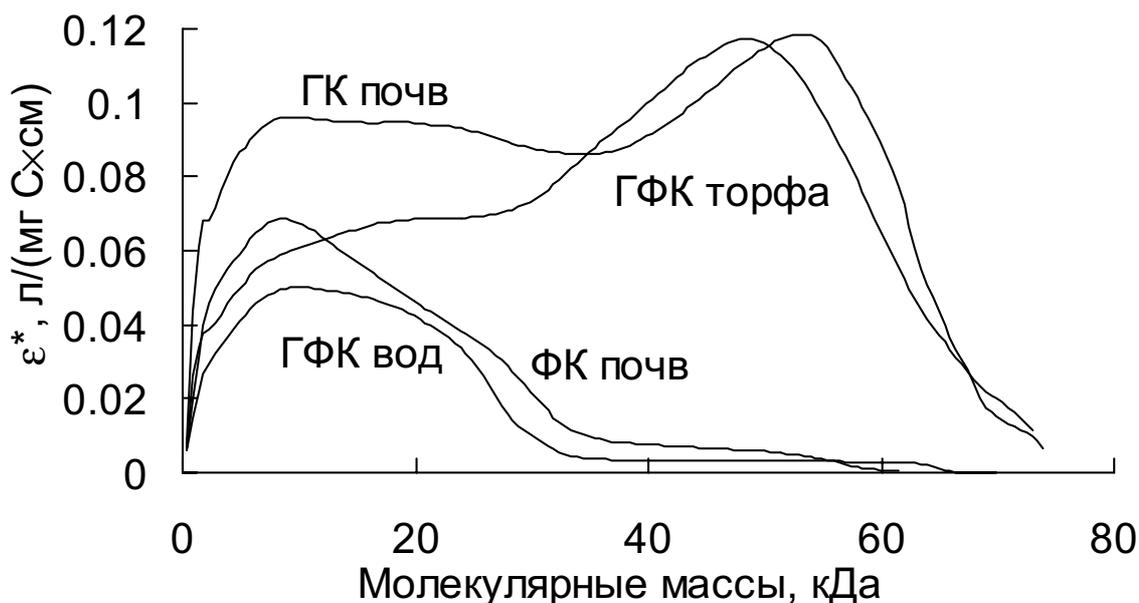


Рис. 5.8. Типичные кривые распределения ϵ^* по ММ для гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава.

На основании полученных данных можно, прежде всего, сделать вывод о размахе варьирования величины ϵ^* в пределах фракций одного препарата. Для всех исследованных препаратов его величина не превышала порядка, составляя, в среднем 2-4 раза. Полученный результат согласуется с предыдущими данными автора [Першина и др, 1989] по “прямому” определению ϵ^* для низко- и высокомолекулярной фракций препарата гумусовых кислот реки Москва (путем гравиметрического определения массы фракций), которые показали их различие на порядок. Наибольшие значения ϵ^* наблюдались для ГК почв, а в их ряду – для черноземов. Минимальные значения ϵ^* были характерны для водной вытяжки торфа. При одинаковой ММ (10 КДа) ГФК вод и ФК почв характеризуются весьма близким значением ϵ^* , тогда как для ГК и ФК аналогичного происхождения величина ϵ^* различается, в среднем, в 1.5 раза (ГК поглощают сильнее, чем ФК).

Наблюдаемые величины ϵ^* хорошо согласуются с содержанием ароматических фрагментов в препаратах, достигая максимума для максимально ароматических черноземов и минимума – для препарата с наименьшим содержанием ароматических фрагментов – водной вытяжки торфа. В целом для всех препаратов в диапазоне от 1 КДа до соответствующего M_w наблюдается монотонное возрастание ϵ^* . По мере дальнейшего возрастания ММ для низкомолекулярных ФК почв и ГФК вод наблюдается снижение ϵ^* , а для высокомолекулярных ГК почв и ГФК торфа наблюдается дальнейшее увеличение ϵ^* вплоть до ММ 40-50 КДа. Наличие ниспадающего участка в районе максимальных ММ для всех препаратов, с нашей точки зрения, связано с возрастанием вклада полисахаридных фрагментов в структуру макромолекул, обладающих наибольшими ММ. Полученные распределения ϵ^* по ММ использовали в дальнейшем для расчета дескрипторов молекулярно-массового состава. С нашей точки зрения, такие дескрипторы должны были обладать большей дискриминирующей способностью, чем традиционно используемые средние ММ и полидисперсность. Это подтвердилось при их дальнейшем использовании для классификации препаратов гумусовых кислот по источнику происхождения и фракционному составу.

Таким образом, проведенный комплекс исследований позволил определить оптимальные условия определения ММ гумусовых кислот методом эксклюзионной хроматографии и обосновать выбор адекватного образца сравнения. Кроме того, предложен подход и создано соответствующее программное обеспечение для получения численной информации, детально характеризующей экспериментальные данные эксклюзионной хроматографии гумусовых кислот. Получен расширенный набор численных дескрипторов ММ состава гумусовых кислот, включающий в себя характеристики трех распределений, получаемых с помощью эксклюзионно-хроматографического фракционирования гумусовых кислот: кривых элюирования в шкале K_d , ММР и распределения ϵ^* по ММ. Весь набор полученных дескрипторов был в дальнейшем использован для классификации гумусовых кислот по происхождению и фракционному составу.

Глава 6. КЛАССИФИКАЦИЯ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ ПО ПРОИСХОЖДЕНИЮ И ФРАКЦИОННОМУ СОСТАВУ

Основные проблемы классификации гумусовых кислот обусловлены стохастическим характером данного органического объекта, а именно, переменным составом, нерегулярностью структуры и полидисперсностью. Указанные факторы создают большие трудности для поиска классификационных признаков гумусовых кислот. Здесь необходимо оговориться, что в связи с еще не устоявшейся русскоязычной терминологией классификационного анализа, зачастую под классификационным признаком понимают как количественную характеристику (в нашем случае – дескриптор состава или свойств), с использованием которой осуществляют в дальнейшем отнесение препарата к тому или иному классу, так и ту категорию, по которой проводят априорное разделение на классы (в нашем случае – “источник происхождения”, “фракционный состав”). Поэтому при использовании понятия “классификационный признак” в последнем смысле добавляли определение “априорный” или указывали конкретные категории, по которым проводили классификацию (“источник происхождения”, “фракционный состав” или более детализированный признак – “источник происхождения и фракционный состав”). Согласно принятому в нашей работе подходу к численному описанию строения гумусовых кислот в качестве количественных характеристик для классификации использовали наборы интегральных дескрипторов состава, соответствующие трем иерархическим уровням структурной организации органических объектов – элементному, фрагментному и молекулярному. Применение комплекса описанных методов для анализа гумусовых кислот позволило определить следующие интегральные дескрипторы состава: содержание элементов (% масс) и их атомные соотношения, содержание С и Н в составе структурных групп в процентах от общего С и Н, соответственно, и их отношения, средние ММ (их отношения. Данный набор интегральных дескрипторов состава дополняли за счет интегрального дескриптора свойств – массового коэффициента поглощения ϵ^* .

6.1 Характеристика полученного массива данных

Спецификой полученного массива данных являлось то, что полный набор интегральных дескрипторов был получен лишь для малого количества препаратов (10), что не позволяло поставить задачу классификации по химическому строению. В тоже время размеры выборок с известным набором интегральных дескрипторов одного уровня – элементного, фрагментного или молекулярного, полученные с использованием одного метода, – были гораздо

больше и составляли 30 (эксклюзионная хроматография – ЭХ), 40 (ПМР), 60 (^{13}C ЯМР) и 80 (элементный анализ – ЭЛАН) препаратов. В набор ЭХ входили: M_w , M_n , M_z , M_w/M_n , M_z/M_w , M_p ; в ПМР-набор – содержание Н в составе COOH , ArOH , ArH , AlkOH , $\alpha\text{-CH}$, CH_n , а также содержание Н в составе ароматических (H_{Ar}) и углеводных (H_{Carb}) фрагментов в процентах от общего содержания скелетных протонов; в ^{13}C ЯМР-набор – содержание С в составе $\text{C}=\text{O}$, COO , C_{Ar} , C_{ArO} , CHO , CH_2O , CH_3O , CH_n , а также суммарное содержание углерода в составе ароматических ($\Sigma\text{C}_{\text{Ar}}$) и углеводных фрагментов ($\Sigma\text{C}_{\text{Carb}}$).

Первичная классификация препаратов указанных выборок с использованием интегральных дескрипторов одного уровня (элементного и структурно-группового) (рис. 6.1), отчетливо показала тенденцию к образованию кластеров в соответствии с источником происхождения и фракционным составом гумусовых кислот. Так, рассмотрение диаграммы Ван Кревелена (рис. 6.1а) показывает, что все исследованные препараты гумусовых кислот расположились в коридоре значений Н/С от 0.4 до 1.2, а О/С – от 0.3 до 1.0. По величине Н/С препараты различного происхождения, но сходного фракционного состава образуют следующий ряд: уголь \leq чернозем < торф < дерново-подзолистые и серые лесные почвы < воды. Для О/С этот же ряд выглядит почти аналогично: уголь \leq чернозем < дерново-подзолистые и серые лесные почвы < торф < воды. Это говорит о максимальной ненасыщенности препаратов угля и наибольшей окисленности гумусовых кислот вод. Изменение Н/С и О/С по фракционному составу происходит сходным образом для торфа и почв: при довольно близкой величине Н/С для ГК характерны значительно меньшие значения О/С по сравнению с ФК. Это указывает на обогащенность молекулярной структуры ФК кислородсодержащими группами. Нефракционированные препараты ГФК (как видно на примере обширной выборки препаратов торфа) занимают промежуточное положение между ГК и ФК.

Рассмотрение двумерной диаграммы распределения исследованных препаратов гумусовых кислот по содержанию С в составе ароматических $\Sigma(\text{Ar}, \text{ArO})$ и углеводных $\Sigma(\text{OCO}, \text{CHO}, \text{CH}_2\text{O})$ фрагментов показывает, что они расположились в коридоре значений $\Sigma\text{C}_{\text{Ar}}$ от 0.25 до 0.72 и $\Sigma\text{C}_{\text{Carb}}$ – от 0.02 до 0.37. Наиболее уникальный структурно-групповой состав характерен для ГК угля – максимальное содержание ароматического углерода (до 70 %) при практически полном отсутствии углеводных фрагментов. Это позволяет предположить наличие поликонденсированных структур в составе данных соединений и их высокую гидрофобность. Высокое содержание

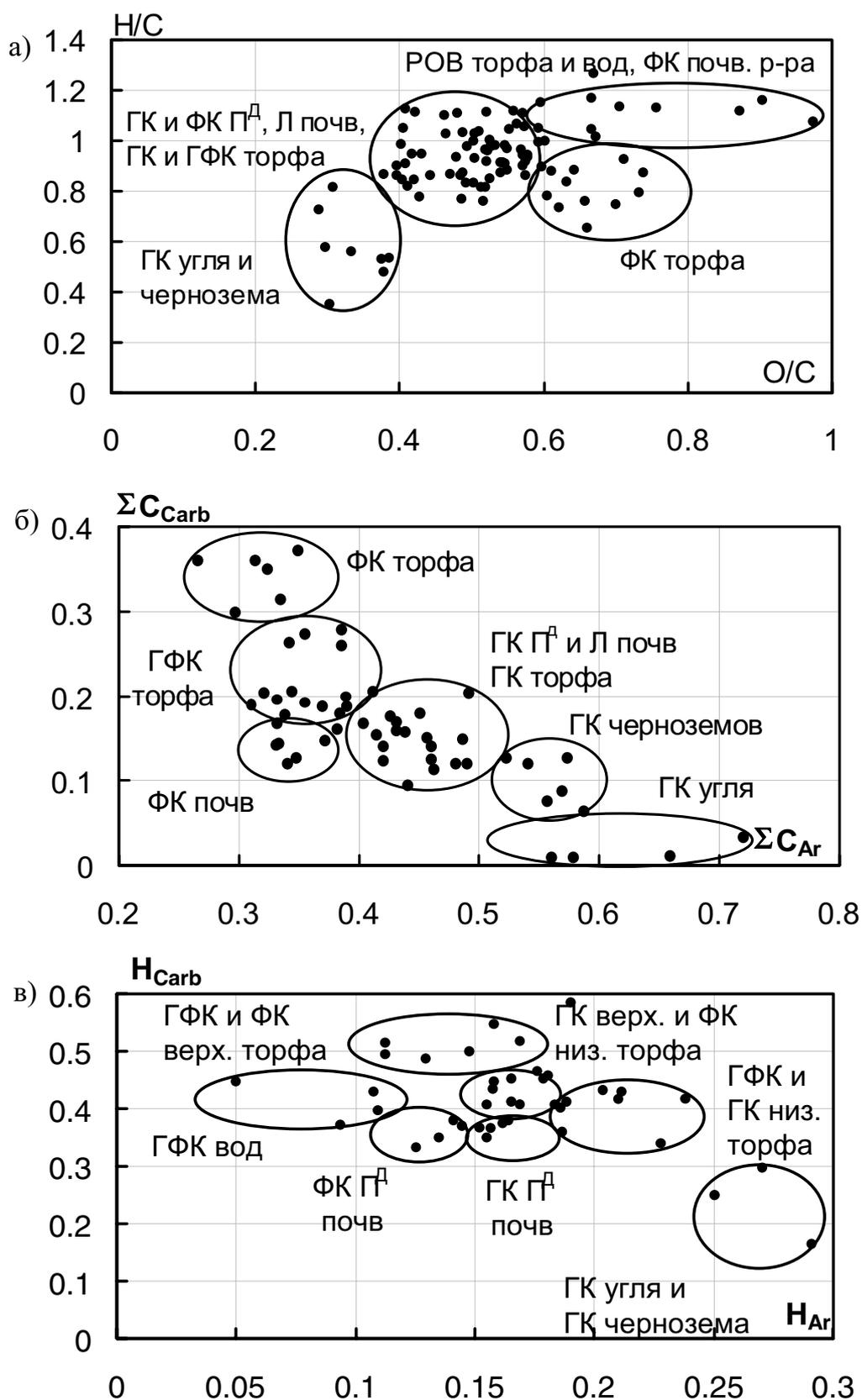


Рис. 6.1. Распределение препаратов по атомным соотношениям (а) и суммарному содержанию С (б) и Н (в) в составе ароматических и углеводных фрагментов углеродного скелета гумусовых кислот.

ароматического углерода (иногда сопоставимое с ГК угля) характерно для ГК черноземов. Однако, в отличие от угля, в них присутствуют углеводные фрагменты, в состав которых входит от 8 до 13% углерода. ГК дерново-подзолистых (П^д) и серых лесных (Л) почв существенно отличаются от черноземов. Содержание ароматического углерода в них не превышает 45%, тогда как содержание углерода углеводных фрагментов достигает 15-20%. Почвенным ГК весьма близки по распределению углерода ГК и ГФК торфа. ФК почв весьма отличны от ГК и характеризуются самым высоким содержанием углерода карбоксильных (сложноэфирных) групп – до 22%, содержание ароматического углерода не превышает 40%, а в состав углеводных фрагментов входит 20-25% углерода. ФК торфа содержат еще больше углеводных фрагментов, чем ФК почв: для верховых торфов величина $C_{АККО}$ достигает максимума – 40%. В тоже время для низинных торфов этот показатель составляет 24-25%, будучи на уровне почвенных ФК. Тем самым ФК верхового торфа образуют второй экстремум – по содержанию углеводного углерода, и должны характеризоваться высокой гидрофильностью. Следовательно, можно сделать вывод о том, что ГК угля и ФК торфа представляют собой два граничных класса гумусовых кислот с максимальным содержанием ароматических и углеводных фрагментов, соответственно. Все остальные классы гумусовых кислот занимают по этим показателям промежуточное положение. Для ГФК вод наблюдается самое высокое содержание алкильного углерода (до 25%), довольно высокие значения этой величины (до 22%) характерны и для двух других низкомолекулярных, гидрофильных классов гумусовых кислот – для ФК почв и торфа.

Расположение препаратов на диаграмме в координатах содержание Н в составе “ароматических (H_{Ar})” и “углеводных (H_{Carb})” фрагментов углеродного скелета (рис. 6.1в) позволило определить коридор значений этих параметров для исследованных препаратов гумусовых кислот как 0.05-0.3 для H_{Ar} и 0.15-0.60 для H_{Carb} . Характер распределения водорода в углеродном скелете гумусовых кислот верховых и низинных торфов свидетельствует о существенном различии в их строении. В скелете гумусовых кислот верховых торфов до 60 % водорода находится в составе неразложившихся олиго- или полисахаридных цепочек, тогда как для низинных торфов характерен высокий вклад водорода ароматических фрагментов. Это указывает на большую степень трансформации углеводно-пептидного комплекса гумусовых кислот низинных торфов и, следовательно, на их более глубокую гумификацию. Помимо различия между торфами, можно отметить весьма специфическую структуру ГК угля и черноземов, углеводный комплекс которых претерпел наибольшую деградацию – в углях он практически полностью отсутствует. В

тоже время для ГФК вод характерна наибольшая степень замещения ароматических структур. Наряду с максимальной окисленностью, это указывает на наибольшую степень деградации ароматического каркаса в водных гумусовых кислотах.

Описанные особенности строения гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава позволили сформулировать задачу классификационного анализа как установление принадлежности препарата к классам “источник происхождения” (вода, почва, торф, уголь), “фракционный состав” (ГК, ФК, ГФК) или “источник происхождения и фракционный состав”. Наборы интегральных дескрипторов состава для проведения соответствующей классификации создавали с учетом критерия специфичности, требующего использования комплекса дескрипторов разного уровня для численного описания строения гумусовых кислот. При этом из-за обсужденных выше ограничений, данную проблему решали, дополняя наборы дескрипторов фрагментного или молекулярного уровней дескрипторами элементного состава, которые были определены для препаратов всех выборок. Кроме того, набор дескрипторов молекулярно-массового состава дополняли значениями ϵ^* , найденными для той же выборки препаратов. Наборы интегральных дескрипторов разных уровней называли смешанными и обозначали их как ЭЛАН+ЭХ, ЭЛАН+ПМР, ЭЛАН+ ^{13}C ЯМР, ϵ^* +ЭХ и ЭЛАН+ЭХ+ ϵ^* .

До проведения классификации с использованием указанных дескрипторов, необходимо было ответить на вопрос о принципиальной воспроизводимости свойств препаратов гумусовых кислот при их повторном выделении из сходного источника по стандартной методике. Данная проблема имеет особое значение, так как гумусовые кислоты, присутствующие в природном объекте, представляют собой открытую динамическую систему, обменивающуюся веществом и энергией с окружающей средой. Помимо естественной изменчивости условий гумусообразования, важнейшим фактором, влияющим на свойства наблюдаемых гумусовых кислот, является процедура их выделения из природного объекта. Поэтому если в стандартных условиях выделения из сходных источников получают препараты гумусовых кислот с воспроизводимыми свойствами, то можно говорить о типологизируемости систем гумусовых кислот [Степин, 198&&], присутствующих в различных природных объектах. Это, в свою очередь, означает принципиальную возможность получения воспроизводимых результатов для данных объектов исследования.

Для ответа на поставленный вопрос было проведено сопоставление атомных соотношений, полученных для препаратов, выделенных из сходных источников по стандартным методикам в разные годы (рис. 6.2). Как видно,

для большинства препаратов наблюдается довольно хорошая воспроизводимость данных. Максимальный разброс характерен для Н, на результаты определения которого большое влияние оказывает атмосферная влажность, тогда как для С и для N результаты разных лет хорошо согласуются между собой. На рис. 6.3 приведено распределение атомов углерода с различным химическим окружением (данные ^{13}C ЯМР) для препаратов, выделенных из сходных источников в разные годы. Данные характеризуются хорошей воспроизводимостью, что свидетельствует о воспроизводимости дескрипторов структурно-группового состава.

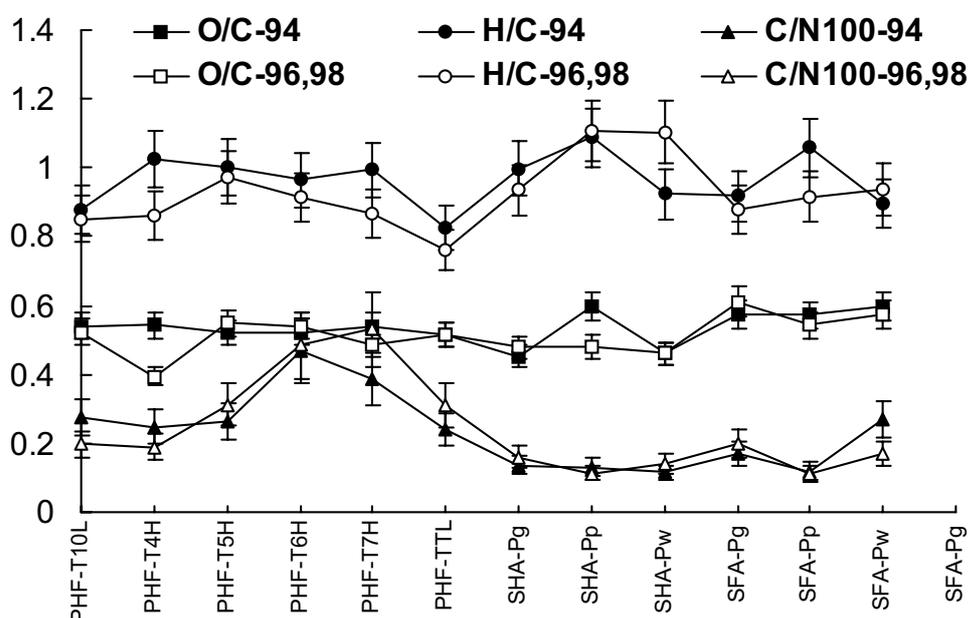


Рис. 6.2. Атомные соотношения препаратов гумусовых кислот, выделенных из сходных источников в разные годы ($n = 3$, $P = 0.95$).

Полученные результаты могут служить убедительным положительным ответом как на вопрос о типологизируемости систем гумусовых кислот в природных объектах, так и о воспроизводимости интегральных дескрипторов состава препаратов гумусовых кислот при их повторном выделении из сходного объекта по стандартной методике. Это позволило перейти к решению поставленной задачи классификации с точки зрения источника происхождения и фракционного состава гумусовых кислот с использованием интегральных дескрипторов состава.

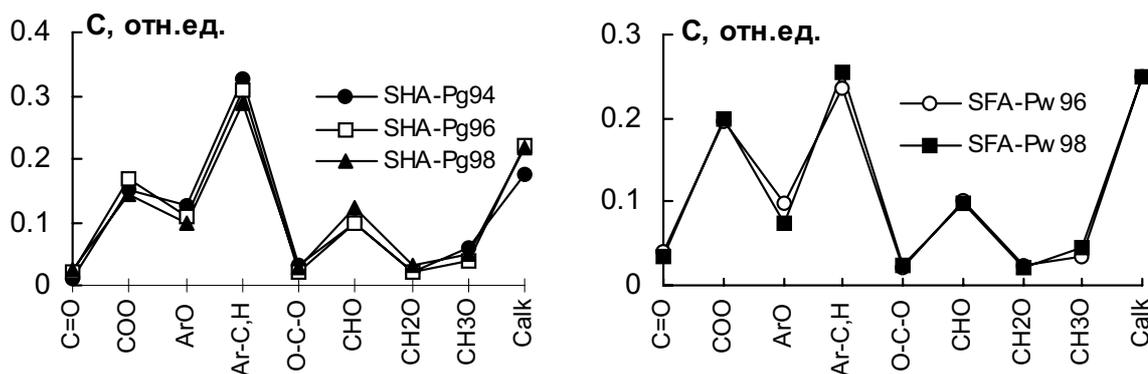


Рис. 6.3. Распределение углерода в структуре гумусовых кислот, выделенных из сходных источников в разные годы (по данным ^{13}C ЯМР).

6.2 Классификация с использованием интегральных дескрипторов состава

Ввиду отсутствия сведений о характере связи между принадлежностью препарата к определенному классу и значениями его интегральных дескрипторов состава и свойств были использованы различные методы многомерной классификации, а именно, *линейный дискриминантный анализ (ЛДА), K ближайших соседей (КБС) и нейронных сетей*. Достоинство ЛДА – возможность вероятностных оценок полученной классификации, недостаток – неприменимость в случае сильного отличия разграничительных поверхностей между классами от линейности. Метод КБС, напротив, хорошо работает при наличии границ между классами сложной формы, он не требует априорных предположений о распределении элементов внутри класса. Недостаток – отсутствие вероятностных оценок классификационного правила. Расчеты по методу КБС проводили с использованием оригинальной программы Regr (автор А. В. Кудрявцев), алгоритм которой предусматривает кросс-валидацию и перебор дескрипторов. Метод нейронных сетей обладает наиболее мощным универсальным алгоритмом и позволяет оценить значимость вклада каждого признака. Недостаток – сложность реализации и ограниченная применимость для работы с малыми массивами данных – легкость “переобучения”.

Для оценки дискриминирующей способности дескрипторов одного уровня проводили классификацию с точки зрения источника происхождения и фракционного состава с использованием наборов ЭЛАН, ЭХ, ПМР и ^{13}C ЯМР методами ЛДА и КБС. Полученные результаты приведены в табл. 6.1 и 6.2, соответственно.

Таблица 6.1

Классификация препаратов гумусовых кислот методом ЛДА с использованием дескрипторов одного уровня

Набор данных	Источник					Фракционный состав			
	Правильно классифицировано, %								
	Торф	Почва	Уголь	Вода	Общее	ГФК	ГК	ФК	Общее
ЭЛАН	94	84	67	56	83	77	77	55	72
ЭХ	100	100	–	80	96	85	57	85	77
¹³ С ЯМР	79	96	60	–	84	60	82	70	72
ПМР	96	91	–	–	94	85	79	100	87

Таблица 6.2

Классификация препаратов гумусовых кислот методом КБС с использованием дескрипторов одного уровня

Набор данных	Источник					Фракционный состав			
	Правильно классифицировано, %								
	Торф	Почва	Уголь	Вода	Общее	ГФК	ГК	ФК	Общее
ЭЛАН	97	84	50	22	80	74	73	55	69
ЭХ	100	93	–	80	93	85	100	86	89
¹³ С ЯМР	82	88	40	–	81	75	82	40	72
ПМР	93	82	–	–	90	69	79	58	69

Как видно из полученных результатов, проведение ЛДА с применением указанных наборов дескрипторов состава одного уровня дает довольно высокий уровень правильных классификаций, хотя ни в одном случае 100 % правильной классификации достичь не удавалось. Наибольшее количество правильных отнесений обеспечивалось с использованием дескрипторов ММ состава (ЭХ-набор).

Классификации с использованием *смешанных наборов дескрипторов* показали их гораздо более высокую дискриминирующую способность как для метода ЛДА (табл. 6.3), так и КБС (табл. 6.4). Применение наборов ЭЛАН+ЭХ и ЭЛАН+ЭХ+ε* позволило достичь 100 % правильных классификаций по всем трем априорным признакам – по источнику происхождения, по фракционному составу и по детализированному признаку – источник происхождения и фракционный состав – для обоих методов. Это говорит о

высокой дискриминирующей способности указанных наборов дескрипторов. На рис. 6.4 показан пример такой классификации. Следует отметить, что и остальные смешанные наборы – ЭЛАН+¹³С ЯМР, ЭЛАН+ПМР и ЭХ+ε* обеспечивали довольно высокий процент правильных классификаций по всем трем категориям.

Таблица 6.3

Характеристики классификации препаратов гумусовых кислот методом ЛДА (Q – общее количество правильных классификаций, %)

Наборы данных	Источник		Фракционный состав		Источник и фракционный состав	
	Q	Дескрипторы	Q	Дескрипторы	Q	Дескрипторы
ЭЛАН+ ¹³ С ЯМР	94	N, C, ΣC _{Carb} , C/N, CH ₃ O, C _{Ar} O, CH _n	88	O, CHO, COO C/N, N, C, H/C, CH ₂ O, ΣC _{Ar}	94	N, ΣC _{Carb} , C/N, C, O, H/C, CH ₂ O, C _{Ar} , CH ₃ O
ЭЛАН+ ПМР	97	N, AlkH, AlkOH, COOH, ArOH, H/C, C/N	97	O/C, ArOH, COOH, ΣH _{Carb} , AlkOH, N, C/N	94	N, C/N, COOH, ArOH, ΣH _{Carb} , C, O/C, ArH, ΣH _{Ar} , AlkH
ЭХ+ε*	96	M _w /M _n , M _z /M _w , M _w , M _n , M _p , ε*	96	ε*, M _w /M _n , M _w , M _p , M _n	100	M _p , ε*, M _n , M _z /M _w , M _w /M _n , M _w
ЭЛАН+ ЭХ	100	N, M _p , M _w /M _n , M _z /M _w , O, C, M _w , M _n , C/N, H	100	N, M _z , C/N, M _n , O, O/C, C, M _p , H, H/C, M _w /M _n , M _w	100	N, M _p , O, O/C, C, M _n , M _w /M _n , M _w , M _z /M _w , H, H/C
ЭЛАН+ ЭХ+ε*	100	ε*, M _p , N, M _w , M _z , O, O/C, M _z /M _w , C, H, H/C	100	N, ε*, M _w /M _n , M _z , C/N, O, O/C, C, M _p , H, H/C	100	M _p , N, M _w , M _z , O, O/C, M _z /M _w , C, H, H/C

В табл. 6.3. и 6.4 приведены также дескрипторы, использование которых обеспечивает наилучшие классификации методами ЛДА и КБС, соответственно. Значимость дескрипторов и частота их встречаемости в наилучших дискриминирующих функциях метода ЛДА позволили сделать вывод о максимальной дискриминирующей способности N, M_p, ε*, M_w/M_n, CHO. Анализ частоты встречаемости дескрипторов в наилучших классификациях методом КБС показал весьма сходный ряд параметров: N, C, M_p, M_w/M_n, CHO и ΣC_{carb}. Следует отметить, что использование набора исходных дескрипторов, расширенного за счет их отношений и обратных

величин, для проведения классификаций методом КБС показало высокую дискриминирующую способность $1/\epsilon^*$ и $1/M_p$.

Таблица 6.4

Характеристики классификации препаратов гумусовых кислот
методом КБС (Q – общее количество правильных
классификаций, %)

Наборы данных	Источник		Фракционный состав		Источник и фракционный состав	
	Q	Дескрипторы	Q	Дескрипторы	Q	Дескрипторы
ЭЛАН+ + ¹³ C ЯМР	98	N/C, C, N, ΣC_{Carb}	83	C/H, C, CHO, CH ₃ O	71	H/C, N/C, CHO, ΣC_{Carb}
ЭЛАН+ +ПМР	94	N/C, 1/AlkH	73	1/C, N, AlkOH/CH _n O	72	O/C, N/C, CH _n /AlkOH
ЭЛАН+ЭХ	100	1/M _p , H, N, M _w /M _n	100	M _p , N, M _z /M _w	100	1/M _p , N, M _w /M _n
ЭХ+ ϵ^*	100	1/ ϵ^* , 1/M _p , 1/M _n	100	1/ ϵ^* , 1/M _p , 1/M _n	100	1/ ϵ^* , M _p , 1/M _n
ЭЛАН+ +ЭХ+ ϵ^*	100	1/ ϵ^* , M _n , M _p	100	1/ ϵ^* , M _n , M _p	100	1/ ϵ^* , M _n , M _p

Метод нейронных сетей применяли только для наилучшего из смешанных наборов дескрипторов – ЭЛАН+ЭХ+ ϵ^* . Тестирование сетей различных топологий показало, что для данного набора дескрипторов достаточно 4 нейронов и 13 синапсов для полной классификации 27 препаратов по детализированному признаку – источник и фракционный состав. Это свидетельствует о высокой достоверности классификационного правила, получаемого с использованием указанного набора дескрипторов. Анализ значимости дескрипторов еще раз подтвердил максимальную дискриминирующую способность содержания N, M_w/M_n и M_p.

Представляло интерес сопоставить полученные результаты с набором пяти диагностических признаков гумусовых кислот, выработанных Д.С. Орловым, который подробно описывался в обзоре литературы [Орлов, 1974]. Данные признаки были выбраны автором с точки зрения их наибольшей характеристичности для гумусовых кислот как класса химических соединений с целью создания основ классификации гумусовых кислот по химическому строению. В нашей работе решали другую задачу классификации гумусовых кислот, однако установленный в результате набор дескрипторов, обладающих самой высокой дискриминирующей способностью по происхождению и фракционному составу гумусовых кислот, может также рассматриваться как набор наиболее характеристичных

признаков данных соединений. Поэтому ниже приводится сопоставление указанных наборов признаков гумусовых кислот.

Два из пяти диагностических признаков, предложенных Д. С. Орловым, описывают общее содержание и распределение N между гидролизуемой и негидролизуемой частью гумусовых кислот. Это хорошо согласуется с максимальной дискриминирующей способностью содержания N, выявленной тремя различными методами классификации, использованными в нашей работе. Содержание N, как правило, гораздо выше в почвенных гумусовых кислотах и ниже в торфяных и водных. При этом в ФК его меньше, чем в ГК. Первые два признака по Д.С. Орлову включают и содержание C, что также согласуется с полученными нами результатами. Третий признак характеризует величину массового коэффициента оптического поглощения при 465 нм, – нами показана высокая дискриминирующая способность аналогичного показателя – ϵ^* при 254 нм. Величина ϵ^* гораздо выше для почвенных препаратов, чем для водных, и возрастает при переходе от ФК к ГК. Четвертый и пятый признаки описывают выход бензолполикарбоновых кислот и наличие характеристических полос поглощения в ИК-спектре гумусовых кислот. Оба указанных признака призваны охарактеризовать специфику строения углеродного скелета гумусовых кислот. Проведенное нами исследование показало, что содержание C в составе углеводных фрагментов является более мощным дискриминирующим признаком, чем содержание C в составе ароматических фрагментов (выход бензолполикарбоновых кислот). Величина данного параметра тесным образом связана с глубиной разложения углеводного комплекса гумусовых кислот. Его минимальные значения наблюдаются для угля и чернозема, характеризующихся самой высокой степенью гумификации. Максимальные значения характерны для ФК верховых торфов, содержащих в своем составе (как было показано с помощью двумерной спектроскопии ЯМР, Глава 4) цепочки нетрансформированных олигосахаридов. Кроме того, данный параметр определяет гидрофильно-гидрофобный баланс молекул гумусовых кислот, их растворимость в воде. Принципиально новым результатом нашей работы является установление максимальной дискриминирующей способности дескрипторов ММ состава по источнику и происхождению гумусовых кислот. Это дает основания рассматривать средние ММ и полидисперсность как важнейшие диагностические признаки, количественной характеристике которых должно быть уделено особое внимание при создании классификации гумусовых кислот по химическому строению.

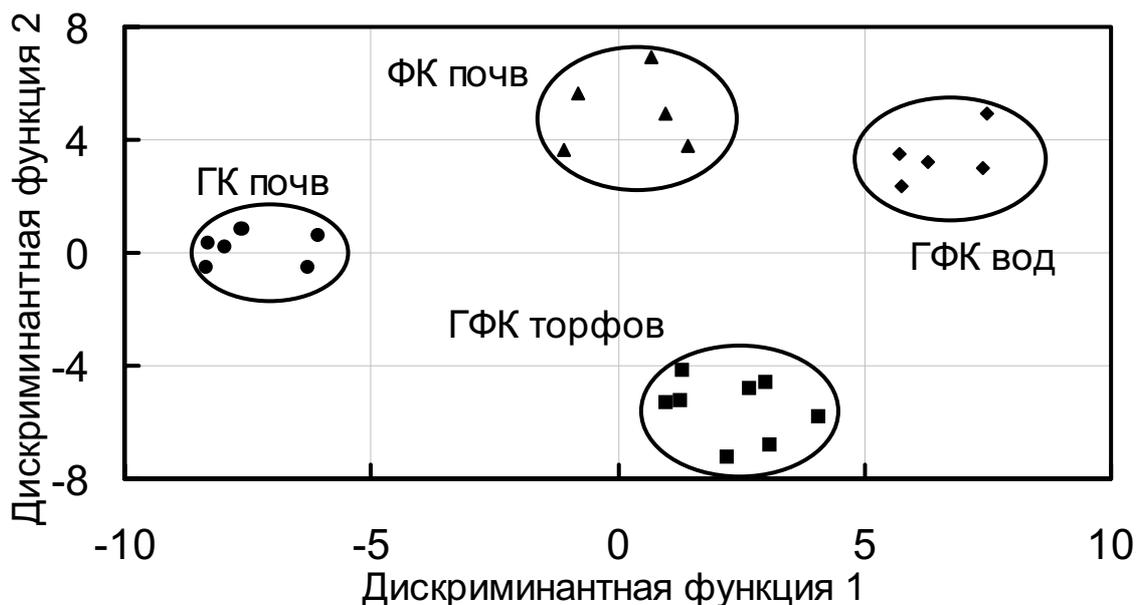


Рис. 6.4. Классификация гумусовых кислот по источнику происхождения и фракционному составу методом ЛДА с использованием набора дескрипторов “ЭЛАН+ЭХ”.

Таким образом, проведенный классификационный анализ показал, что смешанные наборы дескрипторов обладают гораздо более высокой дискриминирующей способностью, чем индивидуальные. Это подтверждает справедливость выбранного в нашей работе подхода к повышению специфичности численного описания структуры с помощью дескрипторов состава за счет использования комплекса дескрипторов, отвечающих разным уровням структурной организации.

В связи с тем, что интегральные дескрипторы ММ состава показали максимальную дискриминирующую способность по источнику происхождения и фракционному составу гумусовых кислот, то была поставлена задача классификации гумусовых кислот по указанным категориям с использованием набора интегральных дескрипторов ММ состава, расширенного за счет численных характеристик трех ЭХ-распределений: кривой элюирования в шкале K_d , ММР и распределения ϵ^* по ММ.

6.3 Классификация с использованием расширенного набора дескрипторов молекулярно-массового состава

Расширенные наборы дескрипторов ММ состава включали в себя около 20 параметров, описывающих особенности, характерные как для кривых ММР, так и эксклюзионных хроматограмм в шкале K_d и распределения ϵ^* по ММ (табл. 5.4). Для их расчета использовали программу Geltreat. В связи с весьма ограниченными размерами выборки препаратов – 27, прибегали к

искусственному приему ее увеличения, рассматривая каждую повторность как новый препарат того же класса. Допустимость использования такого приема обосновывали с помощью дисперсионного анализа, который показал, что дисперсия внутри повторностей одного препарата несущественно отличалась от общей дисперсии внутри повторностей класса (в среднем для всех классов в 1.5 раза).

Полученная описанным способом выборка содержала 116 препаратов: ГФК вод (31), ГФК торфа (35), ФК почв (32) и ГК почв (18), что позволило провести классификацию с контрольной выборкой, разделив исходную выборку случайным образом на обучающую и контрольную. Для классификации использовали методы, не накладывающие ограничений на формы классов в пространстве признаков – метод КБС и нейронных сетей.

6.3.1 Классификация по методу K-ближайших соседей

Каждый из исходных наборов ЭХ распределений – “K_d”, “ММР” и “ε* по ММ” состоял из около двадцати дескрипторов, в которые входили средние ММ, полидисперсность, коэффициенты асимметрии и эксцесса, верхний и нижний квартили, интегралы по заданному диапазону и др. (полный список дескрипторов приведен в табл. 5.1). Для поиска максимально “полезных” дескрипторов в столь обширном массиве данных была предусмотрена процедура их отбора при реализации алгоритма КБС. Отбор проводили путем перебора всех возможных сочетаний дескрипторов с оценкой качества получаемых классификаций. Помимо исходных, в расчет вводили комбинированные дескрипторы: произведения или отношения исходных дескрипторов (не выше второй степени) и их обратные величины. Расчет классификационного правила проводили с участием двух комбинированных или трех-четырех исходных дескрипторов. На число и максимальный “порядок” дескрипторов накладывали ограничения как вычислительные мощности, так и сложность интерпретации классификационных правил с участием комбинированных дескрипторов. Для улучшения качества классификаций все дескрипторы нормировали на стандартное отклонение по всей обучающей выборке хроматограмм (образцов) и масштабировали с помощью дисперсионных весов w_1 , w_2 и w_3 , рассчитываемых по уравнениям, приведенным в Приложении 6.1. Масштабирование придает больший вес дескриптору, обладающему более высокой дискриминирующей способностью

Качество классификаций оценивали методом кросс-валидации. Для этого из обучающей выборки последовательно исключали образец и проводили его отнесение к тому или иному классу по оставшимся образцам. Если полученный класс совпадал с оригинальным, то классификация признавалась успешной. По окончании данной процедуры рассчитывали коэффициент качества классификации – $Q_{\text{обуч}}$, представляющий собой

отношение успешных классификаций к общему числу образцов. Затем отбирали 11 лучших классификаций, качество которых проверяли с использованием контрольной выборки. Для этой цели рассчитывали параметр качества $Q_{\text{контр}}$ – отношение правильно отнесенных хроматограмм с использованием данного классификационного правила к общему числу хроматограмм в контрольной выборке. Для оценки влияния масштабирования усредняли $Q_{\text{обуч}}$ и $Q_{\text{контр}}$ для 11 лучших классификаций, а для оценки классифицирующей способности различных наборов дескрипторов проводили усреднение рассчитываемых оценок качества – $Q_{\text{обуч}}$ и $Q_{\text{контр}}$ – по каждому из наборов.

Характеристики лучших классификационных правил, рассчитанных с использованием трех рассматриваемых наборов ММ дескрипторов, приведены в табл. 6.5. В ней даны оценки качества классификаций Q (усредненные по 11 лучшим) с участием трех-четырех исходных или двух комбинированных дескрипторов, которые были подвергнуты различным процедурам нормирования и масштабирования.

Таблица 6.5

Характеристики качества классификаций гумусовых кислот по происхождению и фракционному составу с использованием трех ЭХ-наборов дескрипторов ММ состава

Масштабирование	Набор дескрипторов					
	K_d		ММР		ϵ^* по ММ	
	$Q_{\text{контр}}$	$Q_{\text{обуч}}$	$Q_{\text{контр}}$	$Q_{\text{обуч}}$	$Q_{\text{контр}}$	$Q_{\text{обуч}}$
2 комбинированных дескриптора						
без масштабирования	0.837	0.925	0.803	0.923	0.760	0.987
w_1	0.835	0.918	0.832	0.917	0.804	0.983
w_2	0.851	0.920	0.817	0.915	–	–
w_3	0.846	0.926	0.818	0.914	0.846	0.983
<i>В среднем</i>	<i>0.842</i>	<i>0.922</i>	<i>0.817</i>	<i>0.917</i>	<i>0.804</i>	<i>0.984</i>
3-4 исходных дескриптора						
без масшт., 3 дескр.	0.840	0.903	0.777	0.906	0.864	0.987
без масшт., 4 дескр	0.804	0.920	0.788	0.918	0.842	1.000
<i>В среднем по всем</i>	<i>0.836</i>	<i>0.919</i>	<i>0.806</i>	<i>0.916</i>	<i>0.823</i>	<i>0.988</i>

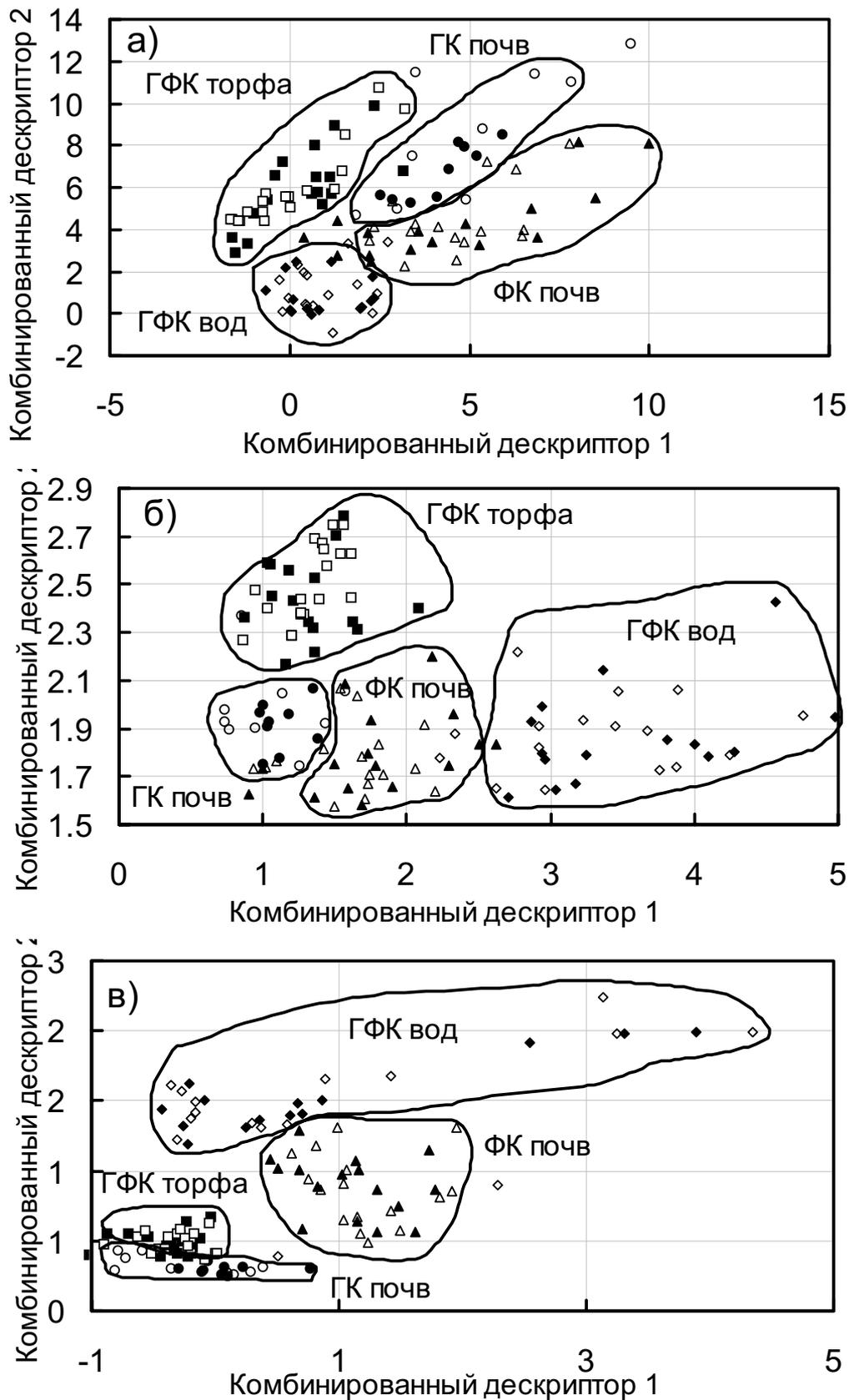


Рис. 6.5. Наилучшие классификации гумусовых кислот по происхождению и фракционному составу, полученные методом КБС с использованием наборов дескрипторов K_d (а), MMP (б) и ϵ^* по ММ (в).

Как видно, дискриминирующая способность наборов дескрипторов увеличивается в ряду $ММР < K_d < \varepsilon^*$ по ММ. Наибольшее количество правильных отнесений достигнуто для классификационных правил, построенных с использованием набора дескрипторов распределения ε^* по ММ при участии трех исходных дескрипторов ($Q_{\text{контр}} = 0.864$). На рис. 6.5 приведены лучшие классификации, полученные с использованием каждого из трех наборов дескрипторов.

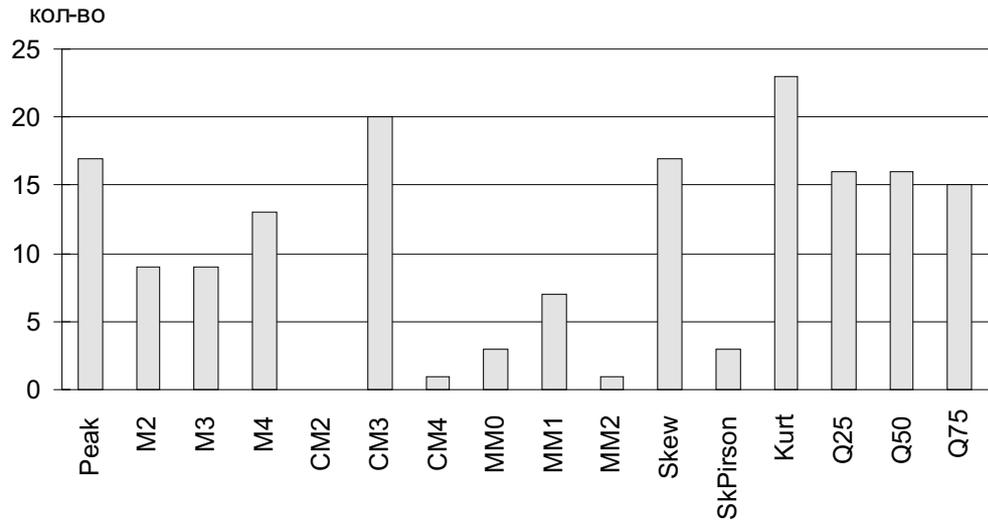
Для оценки дискриминирующей способности индивидуальных дескрипторов, входящих в состав рассматриваемых наборов, был проведен анализ частоты их встречаемости в лучших классификациях, полученных с использованием каждого набора. Результаты приведены на рис. 6.6.

Как видно из приведенных диаграмм, из набора дескрипторов кривых элюирования в шкале K_d чаще всего встречаются $(K_d)_p$, m_4 , cm_3 , А, Е, Q_{25} , Q_{50} и Q_{75} ; из дескрипторов ММР – M_z/M_w , M_p , Q_{25} , Q_{50} и Q_{75} ; из дескрипторов распределения ε^* по ММ – I_{100} , А, Q_{25} , I_{0-10} , I_{10-20} , I_{60-70} . Тем самым каждый из упомянутых дескрипторов характеризуется высокой дискриминирующей способностью по признакам “источник происхождения” и “фракционный состав” гумусовых кислот.

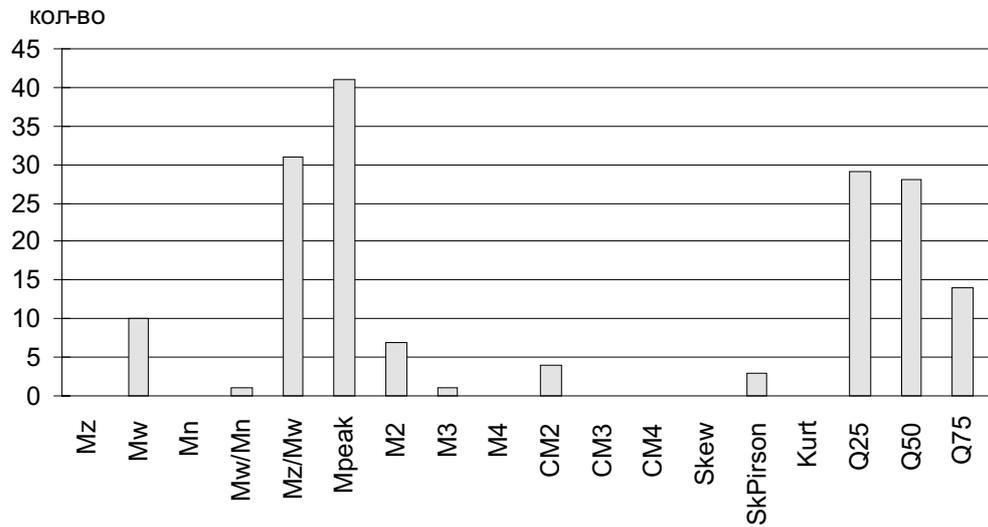
Представлялось целесообразным объединить выявленные “максимально полезные” дескрипторы в новый, расширенный набор дескрипторов ММ состава, с потенциально гораздо более высокой дискриминирующей способностью, чем каждый из отдельных наборов, и провести классификацию с его использованием.

Для этого проводили нормирование, а затем масштабирование указанных дескрипторов, умножая их на дисперсионные веса w_1-w_3 (Приложение 6.1). Классификационные правила, рассчитанные с использованием расширенного набора дескрипторов ММ состава, характеризовались гораздо более высоким качеством: средние $Q_{\text{обуч}}$ по 11 лучшим классификациям при участии двух комбинированных дескрипторов составляли 1.0, для 3-4-х исходных дескрипторов – 0.993. Соответствующие $Q_{\text{контр}}$ составляли 0.92 и 0.92. На рис. 6.7 для примера показано классификационное поле, построенное для двух комбинированных дескрипторов, обеспечивающих наилучшее отнесение препаратов.

а)



б)



в)

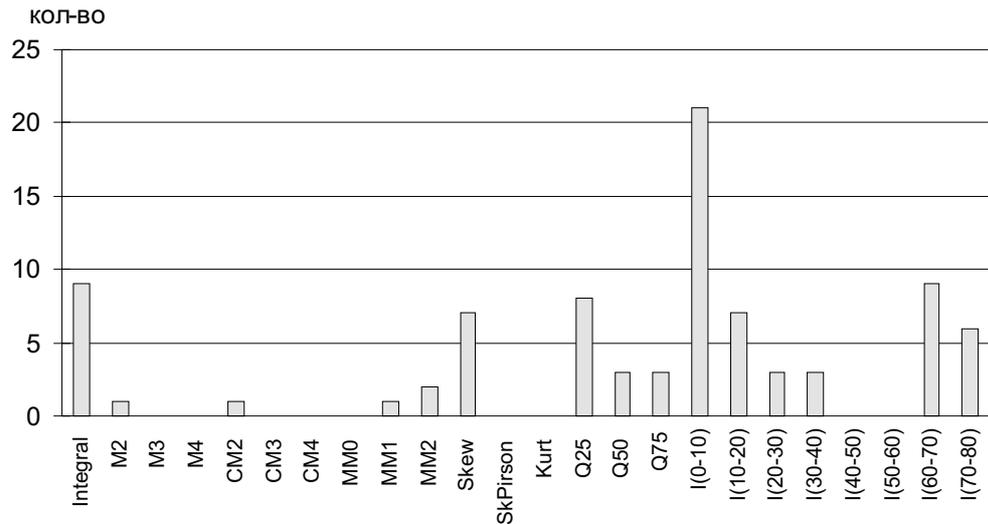


Рис. 6.6. Частота встречаемости дескрипторов кривых элюирования в шкале K_d (а), MMP (б) и распределения ϵ^* по MM (в). Skew – А, Kurt – Е, Peak – K_d пика.

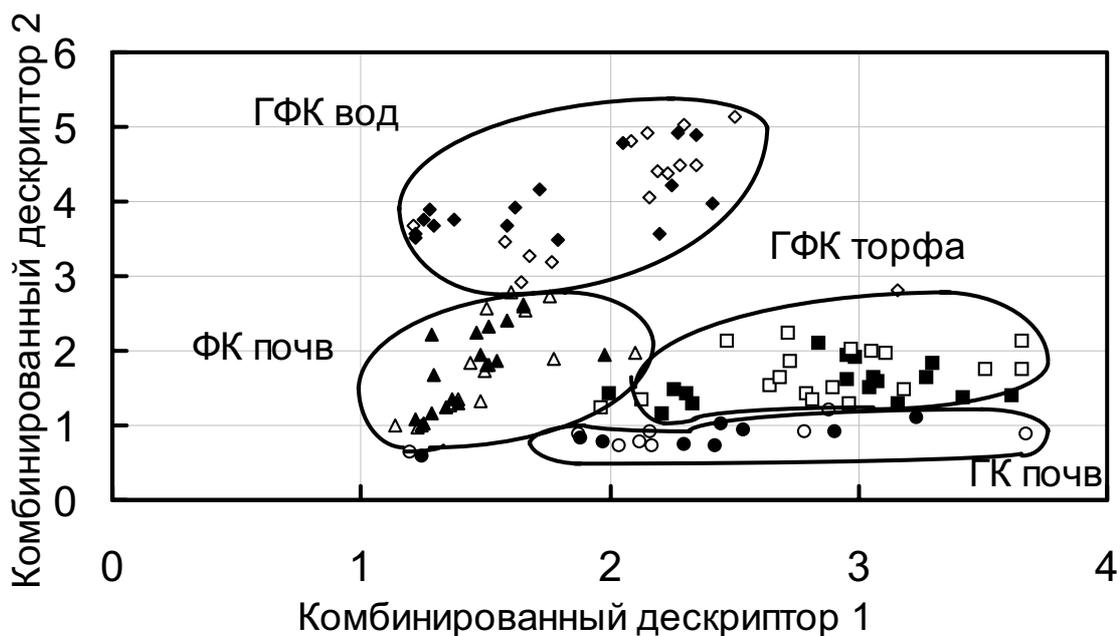


Рис. 6.7. Наилучшая классификация гумусовых кислот по происхождению и фракционному составу, полученная методом КБС с использованием расширенного набора ММ дескрипторов.

Таким образом, использование расширенного набора дескрипторов ММ состава (включающего дескрипторы распределений K_d , ММР и ϵ^* по ММ), обладающих высокой дискриминирующей способностью по детализированному признаку “источник происхождения и фракционный состав”, позволило решить задачу классификации гумусовых кислот с применением дескрипторов одного уровня. На этом основании данный набор дескрипторов использовали и при построении соответствующего классификационного правила с применением нейронных сетей.

6.3.2 Классификация с использованием нейросетей

В связи с тем, что нейронные сети сравнительно недавно вошли в практику компьютерного моделирования, мы сочли уместным кратко изложить основные принципы этого самого мощного метода классификации и прогнозирования и ввести термины, употребляемые для описания результатов моделирования с использованием нейросетей.

Под искусственной нейронной сетью понимается некоторое вычислительное устройство обработки информации, состоящее из большого числа параллельно работающих простых процессорных элементов – нейронов, связанных между собой линиями передачи информации – синапсами. У нейронной сети выделена группа синапсов, по которым она получает входную информацию, и группа синапсов, с которых снимается

информация на выходе сети. Нейронная сеть обучается решению задачи с помощью обучающей выборки [Горбань, 1990; Горбань и Россиев, 1996]. На рис. 6.8 представлена схема нейрона.

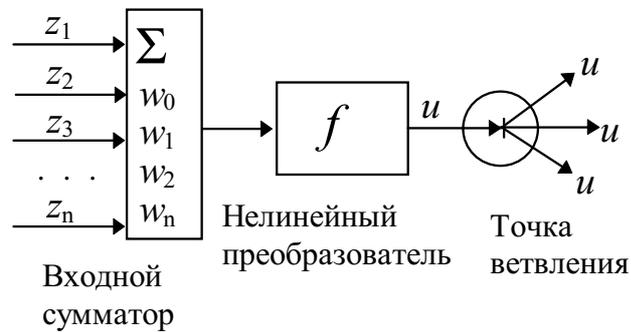


Рис. 6.8. Схема нейрона.

На вход нейрона подаются значения z_1, z_2, \dots, z_n (значения дескрипторов или выходные сигналы с других нейронов), которые преобразуются по формуле:

$$u = f(w_0 + z_1 w_1 + z_2 w_2 + z_3 w_3 + \dots + z_n w_n) \quad (6.1.)$$

где f – нелинейная (обычно S-образная) пороговая функция.

Выходное значение u передается на входы других нейронов или является выходным значением нейросети. Параметры w представляют собой веса синапсов сети. Они образуют набор адаптивных параметров, настраивая которые, нейронная сеть обучается решению задачи. В ходе обучения проводится минимизация отклонения (чаще всего минимизируется сумма квадратов отклонений) рассчитанных значений свойств от известных.

Для построения классификационных правил или прогностических моделей нейроны объединяются в нейросети. Наиболее распространены слоистые сети (рис. 6.9), где нейроны расположены в несколько слоев. Нейроны первого слоя получают входные сигналы, преобразуют их и через точки ветвления передают нейронам второго слоя. Далее срабатывает второй слой, и т.д. до k -го слоя, который выдает выходные сигналы. Если не оговорено особо, то каждый выходной сигнал i -го слоя подается на вход всех нейронов $i+1$ -го. Число нейронов в каждом слое может быть любым и никак заранее не связано с количеством нейронов в других слоях. Стандартный способ подачи входных сигналов: каждый нейрон первого слоя получает все входные сигналы.

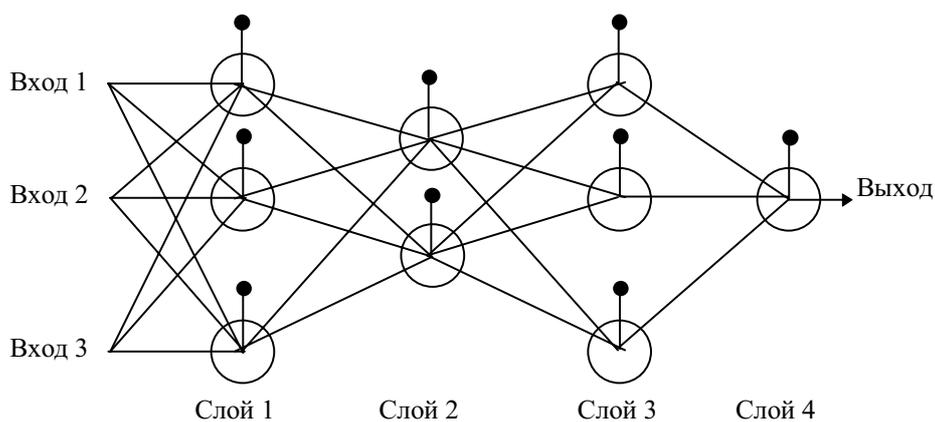


Рис. 6.9. Слоистая нейронная сеть.

К преимуществам метода относятся: (1) хорошо работает при наличии сложных разграничительных поверхностей между классами, (2) при правильном построении и обучении нейросети устраняется влияние посторонних дескрипторов, т.е. выбирается оптимальный набор дескрипторов; (3) позволяет оценивать значимость дескрипторов.

К недостаткам метода относятся: (1) сложность реализации, (2) большое количество настраиваемых параметров и неочевидный выбор оптимальной топологии, (3) весьма продолжительный процесс обучения, (4) склонность к “переобучению”, т.е. нейросеть может научиться “узнавать” образец из обучающего набора, а не выявлять зависимость между свойствами и дескрипторами, (5) получаемая сложная нелинейная классифицирующая функция или прогностическая модель затрудняет интерпретацию результатов.

Для построения классификационного правила, которое бы позволяло относить исследуемые эксклюзионные хроматограммы, или “препараты”, к классам по источнику происхождения и фракционному составу гумусовых кислот использовали слоистую нейронную сеть. Для выбора оптимальной топологии нейросети тестировали пять различных вариантов с числом нейронов от 2 до 10 и слоев – от 1 до 2. На вход подавали значения всех дескрипторов. Число выходных сигналов соответствовало количеству задаваемых классов. В ходе обучения был задан люфт (т.е. допустимый предел отклонения) ± 0.1 для требуемых значений на выходах сети при этом в большинстве случаев количество синапсов и входов сокращалось с сохранением 100% правильной классификации обучающей выборки. Характеристики протестированных топологий и качества полученных классификаций приведены в табл. 6.6.

Характеристики классификаций гумусовых кислот по источнику происхождения и фракционному составу методом нейронных сетей с использованием расширенного набора дескрипторов ММ состава

Кол-во слоев	Кол-во нейронов	Кол-во входов	Кол-во синапсов	$Q_{\text{обуч}}$	$Q_{\text{контр}}$
1	10	3	62	1	0.95
1	5	5	40	1	0.95
1	3	9	37	1	0.95
1	2	20	54	0.98	0.72
2	8	3	35	1	0.95

Как видно, качество классификации контрольной выборки было лучше, чем в среднем для метода КБС: величина $Q_{\text{контр}}$ составляла 95% для 4 из 5 протестированных топологий. Исходя из принципа, что простая модель более предпочтительна при равном качестве классификаций, оптимальной можно считать топологии с одним слоем и 3 нейронами и с двумя слоями и 8 нейронами. Однако в последнем случае число используемых входов снизилось до 3, а количество синапсов – до 35. Стоит заметить, что топология с одним слоем нейронов (не считая сумматора на выходе) реализует линейную дискриминантную модель, а с двумя слоями – нелинейную

Для четырех топологий нейросетей была рассчитана относительная значимость дескрипторов, представляющая собой нормированную сумму модулей весовых коэффициентов синапсов, относящихся к соответствующему входу. Результаты приведены на рис. 6.10.

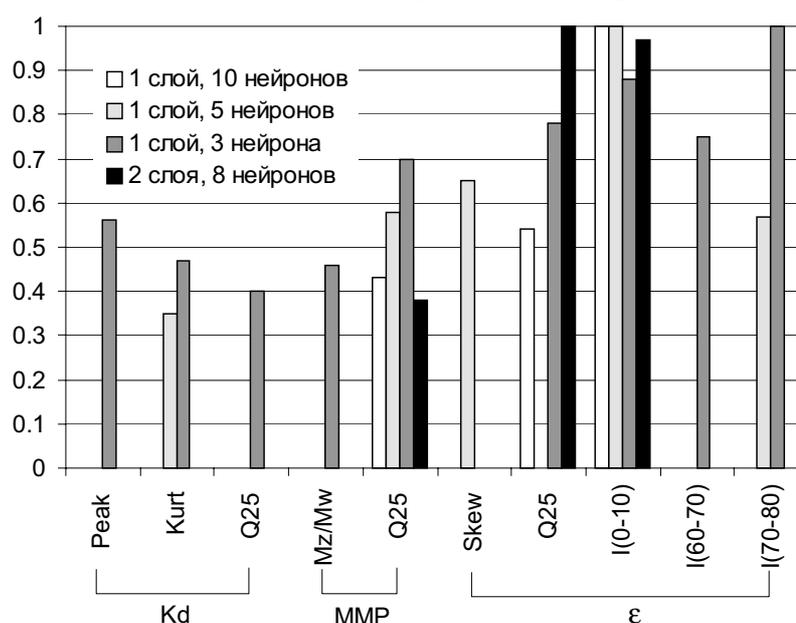


Рис. 6.10. Относительная значимость дескрипторов, использованных в нейросетях различных топологий.

Глава 7. ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗЫВАЮЩИХ И ДЕТОКСИЦИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ

Количественной оценке макролигандных свойств гумусовых кислот посвящены многочисленные публикации (их обзор приводится в разделах 1.5.1, 1.5.2, 1.6.1, 1.6.2), разработаны соответствующие методические подходы. Однако систематические исследования по установлению количественных зависимостей между строением и связывающими свойствами гумусовых кислот по отношению к различным классам экотоксикантов, а также тесным образом с ними связанными детоксицирующими свойствами до сих пор отсутствовали. Предыдущие главы диссертации были посвящены численному описанию строения гумусовых кислот, задача настоящего этапа исследования состояла в получении количественных характеристик их связывающих и детоксицирующих свойств по отношению к различным экотоксикантам. Исследования проводили для трех классов экотоксикантов – тяжелых металлов (на примере Hg(II)), полиядерных ароматических углеводородов (ПАУ) (на примере пирена, флуорантена и антрацена) и гербицидов (на примере атразина). Их выбор был обусловлен приоритетностью положения в списке загрязняющих веществ и различием механизмов взаимодействия с гумусовыми кислотами. В качестве параметров, характеризующих связывающие свойства гумусовых кислот использовали константы связывания (для органических экотоксикантов) и константы устойчивости комплексов (для тяжелых металлов). Для их определения использовали существующие методические подходы, которые адаптировали к задачам, поставленным в работе. Для количественной оценки детоксицирующих свойств применяли интерпретационный аппарат концепции связывания/комплексообразования, который позволил описать процесс детоксикации экотоксикантов гумусовыми кислотами с помощью соответствующих констант детоксикации – аналогов констант связывания и устойчивости комплексов. Все три упомянутых типа констант использовали в качестве прогнозируемых признаков при установлении количественных зависимостей между строением гумусовых кислот и их связывающими и детоксицирующими свойствами по отношению к выбранным экотоксикантам.

Для определения констант связывания и устойчивости комплексов с различными экотоксикантами использовали соответствующие физико-химические методы, константы детоксикации определяли методом биотестирования.

7.1 Исследование комплексообразующих свойств гумусовых кислот по отношению к Hg(II)

Из-за стохастического характера гумусовых кислот основной проблемой количественного описания реакций с их участием является неизвестная стехиометрия. В случае тяжелых металлов, с нашей точки зрения, наиболее простым и удобным подходом к ее решению служит использование металл-эквивалентной концентрации гумусовых кислот (раздел 1.5.5), что позволяет свести стехиометрию соответствующего взаимодействия к соотношению 1:1. Металл-эквивалентную концентрацию можно определить как количество металл-связывающих центров на единицу массы гумусовых кислот, При этом под металлсвязывающим центром понимается комбинация молекулярных фрагментов гумусовых кислот, связывающих один атом металла.

Согласно данному подходу гумусовые кислоты рассматриваются как набор металлсвязывающих центров, поэтому их взаимодействие с Hg(II) можно записать следующей реакцией



где PCЦ – ртуть-связывающий центр.

Тогда соответствующая константа равновесия будет выглядеть как:

$$K(\text{PCЦ}) = \frac{[\text{Hg} \cdot \text{PCЦ}]}{[\text{Hg}^{2+}] \cdot [\text{PCЦ}]} \quad (7.2)$$

где $K(\text{PCЦ})$ – кажущаяся константа устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II), л/моль PCЦ; $[\text{HgPCЦ}]$ – равновесная концентрация Hg(II), связанного с гумусовыми кислотами в комплексы, моль/л; $[\text{PCЦ}]$ – концентрация PCЦ, моль PCЦ/л.

В таком представлении размерность константы соответствует размерности констант устойчивости комплексов Hg(II) по первой ступени (л/моль) с низкомолекулярными лигандами. Это дает возможность сопоставлять получаемые величины с константами для низкомолекулярных лигандов.

Обоснование допустимости использования кажущейся константы (7.2) для термодинамической характеристики взаимодействия металл-ГФК (аббревиатуру ГФК использовали для обозначения гумусовых кислот при записи реакций, соотношений, концентраций и т.д.) в литературе отсутствует. Поэтому необходимо было показать взаимосвязь между кажущейся константой, выраженной через PCЦ (7.2), и микроконстантой, характеризующей присоединение Hg(II) к каждому PCЦ:

$$k_{i,j,h} = \frac{[I_{i,j}]}{[\text{Hg}^{2+}] \cdot [I_{i-1,h}]} \quad (7.3)$$

где $k_{i,j,h}$, – микроконстанта, характеризующая образование j -й комбинации $Hg_i\Gamma\Phi K$ из h -й комбинации $Hg_{i-1}\Gamma\Phi K$; $l_{i,j}$ – j -ая комбинация свободных и занятых центров в комплексе $Hg_i\Gamma\Phi K$.

Под РСЦ будем понимать комбинацию молекулярных фрагментов гумусовых кислот, участвующих в связывании одного атома ртути. Он может включать в себя от одной до четырех функциональных групп. Тогда “среднюю” молекулу гумусовых кислот, имеющую m центров связывания со ступенчатыми константами $K_1 \dots K_m$, можно представить как набор m невзаимосвязанных РСЦ. При вышеприведенном определении РСЦ их количество в молекуле гумусовых кислот соответствует максимальному количеству $Hg(II)$, которое может быть связано данной молекулой. Кроме того, число РСЦ можно также рассчитывать на массу гумусовых кислот, тогда это будет максимальное количество ртути, которое может быть связано с данной массой гумусовых кислот.

Для установления взаимосвязи между кажущейся константой и микроконстантой рассмотрим два крайних варианта распределения РСЦ в гумусовых кислотах по силе связывания:

1. Все РСЦ одинаковы (однородное распределение).
1. Существует несколько типов РСЦ разной силы. При этом они различаются настолько, что заполнение центров связывания i -го типа начинается не раньше, чем заполняются все более сильные центры.

Вариант 1 (РСЦ в гумусовых кислотах равноценны). В этом случае все $K(РСЦ^i)$ идентичны и равны $K(РСЦ)$. Чтобы связать любую из этих констант с микроконстантой (7.3), необходимо выразить $[Hg \cdot РСЦ]$ и $[РСЦ]$ через концентрации гумусовых кислот ($\Gamma\Phi K$) и их комплексов с $Hg(II)$:

$$[Hg \cdot РСЦ] = \sum_{i=1}^m i \cdot [Hg_i \Gamma\Phi K] \quad (7.4)$$

где $i = 1 \dots m$ – число РСЦ в молекуле гумусовых кислот.

$$[РСЦ] = \sum_{i=1}^m (m - i + 1) \cdot [Hg_{i-1} \Gamma\Phi K] \quad (7.5)$$

Подставляя (7.4) и (7.5) в (7.2) получаем:

$$K(РСЦ) = \frac{1}{[Hg^{2+}]} \cdot \frac{\sum_{i=1}^m i \cdot [Hg_i \Gamma\Phi K]}{\sum_{i=1}^m (m - i + 1) \cdot [Hg_{i-1} \Gamma\Phi K]} \quad (7.6)$$

Выразим $[Hg_i \Gamma\Phi K]$ через микроконстанту (7.2). Для этого воспользуемся выражением для общей константы устойчивости комплексов гумусовых кислот с $Hg(II)$:

$$\beta_i = \frac{[Hg_i \Gamma\Phi K]}{[Hg^{2+}]^i \cdot [\Gamma\Phi K]} \quad (7.7)$$

Данная константа является произведением ступенчатых констант от K_1 до K_i . Исходя из этого факта, можно записать, что:

$$\beta_i = C_i^m \cdot k^i \quad (7.8)$$

где m – общее число РСЦ в молекуле, а

$$C_i^m = \frac{m!}{(m-i)! \cdot i!} \quad (7.9)$$

Из уравнений (7.7) и (7.8) следует, что:

$$[\text{Hg}_i\text{ГФК}] = C_i^m \cdot k^i \cdot [\text{Hg}^{2+}]^i \cdot [\text{ГФК}] \quad (7.10)$$

Подставляя (7.10) в (7.6) получаем:

$$K(\text{РСЦ}) = \frac{1}{[\text{Hg}^{2+}]} \cdot \frac{\sum_{i=1}^m i \cdot C_i^m \cdot k^i \cdot [\text{Hg}^{2+}]^i \cdot [\text{ГФК}]}{\sum_{i=1}^m (m-i+1) \cdot C_{i-1}^m \cdot k^{i-1} \cdot [\text{Hg}^{2+}]^{i-1} \cdot [\text{ГФК}]} \quad (7.11)$$

Чтобы упростить уравнение (7.11) нужно сократить $[\text{ГФК}]$ в числителе и знаменателе, вынести k и $[\text{Hg}^{2+}]$ из-под знака суммы в числителе и провести следующее преобразование:

$$(m-i+1) \cdot C_{i-1}^m = i \cdot C_i^m. \quad (7.12)$$

Тогда уравнение (7.11) приобретает очень простой вид:

$$K(\text{РСЦ}) = k \quad (7.13)$$

Таким образом, при условии равноценности всех РСЦ кажущаяся константа устойчивости комплексов гумусовых кислот с $\text{Hg}(\text{II})$, рассчитанная на РСЦ, оказывается идентичной микроконстанте, характеризующей связывание единичного центра с $\text{Hg}(\text{II})$. Более того, величина данной константы не зависит от молярной массы гумусовых кислот, а значит, отпадает необходимость в использовании “средней” молекулярной массы гумусовых кислот, о проблемах определения которой говорилось в Главе 5.

Вариант 2 (РСЦ в ГФК неравноценны). В этом случае распределение $\text{Hg}(\text{II})$, связанного с гумусовыми кислотами, определяется следующим процессом:



При этом микроконстанты (7.3) различаются для разных типов РСЦ. Поэтому в общем случае кажущаяся константа (7.2) не может быть выражена через микроконстанту (7.3). Тем не менее, существуют ситуации, когда это возможно.

Один из таких случаев – малая степень заполнения РСЦ, при которой частично заполнены лишь наиболее сильные центры связывания ($i=1$). Экспериментально этот случай проявляется в том, что кажущаяся константа практически не зависит от степени заполнения РСЦ. Тогда взаимодействия в системе ГФК- $\text{Hg}(\text{II})$ сводятся к реакции



Данной реакции соответствует константа:

$$K(\text{РСЦ}^1) = \frac{[\text{Hg} \cdot \text{РСЦ}^1]}{[\text{Hg}^{2+}] \cdot [\text{РСЦ}^1]} \quad (7.16)$$

В соответствии с выкладками для варианта одинаковых РСЦ (см. выше),

$$K(\text{РСЦ}^1) = k_1, \quad (7.17)$$

то есть величина $K(\text{РСЦ}^1)$ является термодинамической характеристикой наиболее сильных центров связывания. К сожалению, на практике определение $[\text{HgРСЦ}^1]$ и $[\text{РСЦ}^1]$ затруднено, поэтому экспериментально доступной величиной может оказаться только кажущаяся константа (7.2). Свяжем ее с $K(\text{РСЦ}^1)$.

Из определения $K(\text{РСЦ})$ (7.2), уравнения материального баланса и определения степени заполнения РСЦ:

$$\theta = i/m \quad (7.18)$$

где i – количество занятых РСЦ, m – общее количество РСЦ в молекуле гумусовых кислот, следует, что:

$$K(\text{РСЦ}) = \frac{1}{[\text{Hg}^{2+}]} \cdot \frac{\theta}{1 - \theta} \quad (7.19)$$

Аналогичное уравнение можно записать для $K(\text{РСЦ}^1)$. Выражая из обоих уравнений $[\text{Hg}^{2+}]$, и приравнявая их, получаем:

$$\frac{K(\text{РСЦ}^1)}{K(\text{РСЦ})} = \frac{\theta_1}{\theta} \cdot \frac{1 - \theta}{1 - \theta_1} \quad (7.20)$$

где θ_1 – степень заполнения РСЦ¹.

Как правило, экспериментальное определение θ_1 затруднено. Однако из (7.20) следует, что при постоянной $K(\text{РСЦ}^1)$ в диапазоне $0 < \theta_1 < 0.9$ $K(\text{РСЦ})$ уменьшается всего на порядок, после чего, при $\theta_1 > 0.9$ начинает резко падать. Это означает, что в случае, если при малых θ кажущаяся константа устойчивости гуматов ртути уменьшается меньше, чем на порядок, то

$$\theta_1 < 0.9. \quad (7.21)$$

С другой стороны, при малых ($\theta < 0.1$) степенях заполнения РСЦ:

$$1 - \theta \approx 1. \quad (7.22)$$

Кроме того, если заполняется только РСЦ¹, то θ_1 связана с θ соотношением

$$\theta_1 = \theta/\delta_1, \quad (7.23)$$

где δ_1 – доля РСЦ¹ в общем количестве РСЦ:

$$\delta_1 = C(\text{РСЦ}^1)/C(\text{РСЦ}), \quad (7.24)$$

В случае, если в данном диапазоне θ заполняется только РСЦ¹, можно записать, что

$$\delta_1 > \theta, \quad (7.25)$$

Подставляя (7.21), (7.23) и (7.25) в (7.20) и учитывая (7.22), получаем

$$K(\text{РСЦ}^1) < (10/\theta) \cdot K(\text{РСЦ}) \quad (7.26)$$

При этом в качестве нижней границы значения $K(\text{РСЦ}^1)$ остается величина $K(\text{РСЦ})$.

Таким образом, кажущаяся константа (7.2) позволяет оценить границы значения константы связывания наиболее сильного РСЦ и тем самым охарактеризовать его. При этом необходимо соблюдение следующих условий.

1. $\theta < 0.1$

2. В исследуемом диапазоне степеней заполнения РСЦ кажущаяся константа (7.2) должна изменяться не более, чем на порядок.

Тогда границы для константы связывания самого сильного РСЦ определяются следующим неравенством:

$$K(\text{РСЦ}) < K(\text{РСЦ}^1) < (10/\theta) \cdot K(\text{РСЦ}) \quad (7.27)$$

Вышеизложенное обуславливает планирование эксперимента по определению кажущихся констант. Во-первых, необходимо контролировать характер зависимости кажущейся константы от степени заполнения РСЦ. Во-вторых, чтобы исключить участие более слабых металлсвязывающих центров, желательно использовать такой интервал θ , чтобы изменение кажущейся константы в этом интервале было как можно меньше. К сожалению, уменьшение интервала θ приводит, в соответствии с (7.27), к увеличению диапазона значений $K(\text{РСЦ}^1)$, что ухудшает качество характеристики связывания наиболее сильных центров с Hg(II). Изложенные положения можно распространить и на другие металлы.

В связи с тем, что протолитические свойства РСЦ^{2-} нами не исследовались, то в дальнейшем определяли рН-условную константу $K(\text{РСЦ})$, используя заряд РСЦ только при корректировке значений констант на ионную силу раствора по уравнению Дэвиса.

7.1.1 Определение содержания ртуть-связывающих центров в гумусовых кислотах

Для исследования комплексообразующих свойств гумусовых кислот по отношению к Hg(II) использовали выборку из 24 препаратов различного происхождения и фракционного состава, которая включала в себя: 2 РОВ вод, 5 ГФК вод, 3 ГФК донных отложений, 2 ГК угля, 6 ГФК торфа, 3 ГК почв и 3 ГФК почв. Для определения содержания РСЦ в гумусовых кислотах была использована способность ртути (II) образовывать нерастворимые гуматы [Онуфриенок и Солодовникова, 1961]. Предполагалось, что содержание ртути в насыщенных гуматах соответствует содержанию РСЦ. Поэтому для

установления содержания РСЦ в растворах гумусовых кислот нужно было сначала установить условия образования насыщенных гуматов ртути.

Условия образования насыщенных гуматов Hg(II). Изучение условий образования нерастворимых гуматов описано в соответствующих публикациях [Жилин и др., 1996; Жилин и др., 2000]. На первом этапе проводили качественный эксперимент, цель которого была установить соотношения Hg(II):металл, при которых заметно выпадение осадка нерастворимых гуматов. Для этого к концентрированным растворам ГФК торфа (0.5 и 1.2 г/л, соответственно) добавляли насыщенный раствор $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ до полного выпадения окрашенного вещества в осадок. При этом наблюдалось понижение pH до 2.4-2.5. В обоих случаях осадки имели темно-коричневый цвет и рыхлую структуру. Анализ осадков показал, что в них содержится 33%(масс) и 27% (масс) Hg. Это говорит о том, что осадки являлись гуматами ртути, а не ГК, выпавшими при закислении среды за счет гидролиза Hg^{2+} .

Высокое содержание ртути в полученных гуматах позволило предположить, что в указанных условиях образуются гуматы, в которых все РСЦ заполнены. Чтобы подтвердить это предположение, было проведено количественное изучение образования нерастворимых гуматов ртути.

Для этой цели готовили растворы с различными соотношениями Hg(II):ГФК при pH 2.3 и изучали распределение Hg(II) и ГФК между раствором и образующимся осадком. Эксперименты проводили на двух препаратах ГФК торфа. Концентрацию ртути определяли методом ААСХП (Приложение 7.1), концентрацию ГФК – спектрофотометрически.

Было установлено, что при соотношении Hg:ГФК меньше 0.3-0.6 ммоль/г (в зависимости от концентрации ГФК) Hg(II) и гумусовые кислоты оставались в растворе, тогда как при превышении указанного соотношения в системе образовывался осадок, при этом часть гумусовых кислот оставалась в растворе. При двукратном превышении этого соотношения все окрашенное вещество полностью выпадало в осадок (ход соответствующей зависимости показан на рис 7.1). Следует заметить, что несмотря на широкий диапазон исследованных концентраций гумусовых кислот (0.01-0.2 г/л) характерные соотношения Hg:ГФК начала выпадения осадка и полного выпадения окрашенного вещества изменялись не более, чем в два раза.

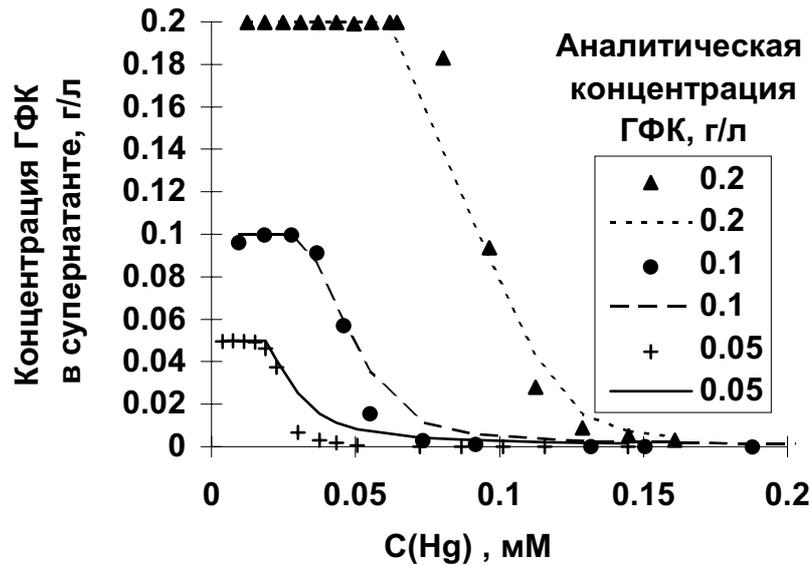


Рис. 7.1. Зависимость концентрации ГФК в супернатанте от аналитической концентрации Hg(II) при различных исходных аналитических концентрациях ГФК.

Участок, на котором окрашенное вещество выпадало полностью (т.е. участок максимальных соотношений Hg:ГФК, превышавших 0.6-1.2 ммоль/г) был исследован более подробно. Для каждой точки этого участка было рассчитано количество ртути, связанной с гумусовыми кислотами. Его определяли, исходя из разности между введенной концентрацией Hg(II) и концентрацией, обнаруженной над осадком гумата. Соответствующие изотермы сорбции строили в линеаризованных координатах изотермы Лэнгмюра:

$$\frac{C_L(\text{Hg})}{Q} = \frac{1}{K_{\text{сорб}} \cdot Q_{\text{max}}} + \frac{1}{Q_{\text{max}}} \cdot C_L(\text{Hg}) \quad (7.28)$$

где $C_L(\text{Hg})$ – концентрация всех форм Hg(II) над осадком, Q – количество ртути, приходящееся на единицу массы ГФК, $K_{\text{сорб}}$ – константа сорбции, Q_{max} – максимальная сорбция, соответствующая содержанию РСЦ.

Для обоих исследованных препаратов ГФК торфа изотермы оказались линейны ($r = 0.9$), хотя тангенс угла наклона различался для разных аналитических концентраций препаратов. Однако непосредственной зависимости между тангенсом угла наклона и аналитической концентрацией препарата обнаружено не было. Возможно, это связано с различием свойств поверхностей образующихся гуматов ртути.

На основании полученных изотерм были рассчитаны параметры адсорбции Hg(II) на двух гуматах ртути: $K_{\text{сорб}} = (3.6 \pm 1.3) \times 10^4$ и $(3.1 \pm 2.0) \times 10^4$ л/М, $Q_{\text{max}} = (2.1 \pm 0.6)$ и (1.4 ± 0.3) ммоль/г ГФК (приведены доверительные интервалы при $n = 5$, $P = 0.95$). Полученные значения Q_{max}

хорошо согласуются с содержанием ртути в гуматах (2.2 и 1.8 ммоль/г), полученных в ходе качественных экспериментов. Из этого следует, что использовавшиеся в предварительных экспериментах условия получения гуматов ртути (концентрация ГФК 0.5 г/л и более, соотношение Hg:ГФК не менее 0.01 моль/г) позволяют получать насыщенные гуматы Hg(II).

Получение и характеристика насыщенных гуматов ртути (II). Для определения содержания РСЦ в исследуемой выборке, состоящей из 24 препаратов гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава, в описанных выше условиях для каждого препарата получали насыщенный гумат Hg(II). С этой целью насыщенный раствор $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ добавляли к концентрированным (1-2 г/л) растворам гумусовых кислот. При этом все окрашенное вещество выпадало в осадок.

Полученные гуматы представляли собой темно-коричневые аморфные порошки, нерастворимые в воде, органических растворителях (бензоле, хлороформе, ТГФ, ацетоне, ДМФА, ацетонитриле), ограниченно растворимые в 0.1 М KCl и 0.1 М NaOH. Препараты разлагались, не плавясь, при нагревании выше 200°C. Рентгено-фазовый анализ показал их рентгеноаморфность.

Таблица 7.1.

Содержание РСЦ в препаратах гумусовых кислот
(n = 3, P = 0.95)

Препарат	РСЦ, ммоль/г ОВ	Препарат	РСЦ, ммоль/г ОВ
РОВ природных вод		ГФК торфа	
ADOM-SMu4	3.7±0.7	RHF-T494	2.2±0.4
ADOM-SMu8	2.6±0.4	RHF-T594	2.1±0.4
ГФК природных вод		RHF-T694	2.5±0.2
AHF-MMu7	4.2±0.8	RHF-TH94	2.1±0.2
AHF-RND11	2.7±0.3	RHF-TMu4	2.4±0.5
AHF-RND14	5.9±0.6	RHF-TT94	2.8±0.5
AHF-SSH1	2.7±0.4	ГК почв	
AHF-SMu8	3.5±0.6	SHA-Gw94	1.0±0.5
ГФК донных отложений		SHA-Pw94	1.0±0.1
BHF-RLuh	3.2±0.4	SHA-PwN	2.0±0.1
BHF-RND13	2.9±0.4	ГФК почв	
BHF-SMu2	2.4±0.4	SHF-Co94	2.7±0.3
ГК углей		SHF-TMu12	1.8±0.2
CHA-AGK	4.3±0.9	SHF-PMu9	1.9±0.2
CHA-ALD	2.6±0.1		

Для определения содержания Hg(II) в гуматах, их разлагали в автоклаве в присутствии персульфата калия. Содержание гумусовых кислот в гуматах принимали равным их массе в исходном растворе. На основании этого рассчитывали количество ртути, приходящееся на единицу массы гумусовых кислот. Это количество соответствует содержанию РСЦ в ГФК. Результаты (в расчете на беззольную пробу) представлены в табл. 7.1.

Как видно из табл. 7.1, весь диапазон изменения содержания РСЦ в исследованных препаратах ГФК составлял от 1 до 6 ммоль/г ГФК. При этом максимальные содержания РСЦ наблюдались для ГФК вод, минимальные – для ГК почв. Количество РСЦ, приходящееся на “среднюю молекулу” ГФК, составляло от 10 до 70, что подтверждает тезис о том, что гумусовые кислоты способны образовывать полиядерные комплексы с тяжелыми металлами.

7.1.2 Определение кажущихся констант устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II)

Согласно выкладкам, приведенным в разделе 7.1.1, оптимальной характеристикой взаимодействия гумусовых кислот с Hg(II) является кажущаяся константа (7.2) при малых степенях заполнения РСЦ. Данная константа позволяет охарактеризовать наиболее сильные РСЦ, которые определяют комплексообразующие свойства гумусовых кислот в природных средах. В силу указанных обстоятельств, именно ее будем в дальнейшем подразумевать под термином “константа устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II)”.

Константы устойчивости комплексов с Hg(II) были определены для 24 препаратов. Концентрацию гумусовых кислот выражали через молярную концентрацию РСЦ и соответствующие константы обозначали $K(\text{РСЦ})$. Чтобы приблизить условия определения констант к природным водам, определение проводили при pH 7 в 0.0025 М гидрокарбонатном буфере. Определение ртути в присутствии гумусовых кислот приводили по методике, подробно изложенной в соответствующей публикации [Жилин и др., 2000] и приведенной в приложении. Методические аспекты определения констант и полученные результаты описаны ниже.

Ионообменный метод. На первом этапе исследований для определения констант устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II) был выбран ионообменный метод, который широко применяется в этих целях [Линник и Набиванец, 1986]. Метод основан на том, что гумусовые кислоты, связывая ионы металла в комплекс, препятствуют его связыванию с катионитом. При этом в случае, если емкость катионита значительно превышает количество металла, поглощение металла катионитом линейно зависит от концентрации свободной формы металла, то есть сорбция металла описывается изотермой Генри:

$$v_{\text{sorb}}(\text{Hg}) = K_{\text{H}} \cdot [\text{Hg}^{2+}] \quad (7.29)$$

где $v_{\text{sorb}}(\text{Hg})$ – количество сорбированного Hg(II), K_{H} – константа Генри.

При pH 7 практически весь Hg^{2+} гидролизован. Чтобы предотвратить гидролиз, в растворы, содержащие гумусовые кислоты и Hg(II), вводили хлорид калия в концентрации 0.01 М. Как показывает расчет, в этих условиях в отсутствие гумусовых кислот практически весь Hg(II) присутствует в растворе в виде HgCl_2 . Тогда в отсутствие гумусовых кислот изотерма сорбции Hg(II) на катионите будет выглядеть следующим образом:

$$v_{\text{sorb}}(\text{Hg}) = \lambda_0 \cdot [\text{Hg}(\text{II})] \quad (7.30)$$

где λ_0 – коэффициент распределения Hg(II) в отсутствие гумусовых кислот, а $[\text{Hg}(\text{II})]$ – суммарная концентрация всех растворенных форм Hg(II), определяемая экспериментально.

λ_0 можно связать с константой Генри, исходя из определения константы устойчивости HgCl_2 , и учитывая, что хлорид-ионы находятся в большом избытке по сравнению с Hg(II):

$$\lambda_0 = \frac{K_{\text{H}}}{\beta_2(\text{HgCl}_2) \cdot C^2(\text{Cl}^-)} \quad (7.31)$$

При введении гумусовых кислот в систему, содержащую Hg(II) и Cl^- , протекает реакция конкурентного комплексообразования:



Тогда коэффициент распределения Hg(II) между раствором и катионитом выражается через константу Генри следующим образом:

$$\lambda = \frac{K_{\text{H}}}{\beta_2(\text{HgCl}_2) \cdot C^2(\text{Cl}^-) + K(\text{РСЦ}) \cdot C(\text{РСЦ})} \quad (7.33)$$

Из уравнений (7.31) и (7.33) следует, что:

$$\frac{\lambda_0}{\lambda} - 1 = \frac{K(\text{РСЦ}) \cdot C(\text{РСЦ})}{\beta_2(\text{HgCl}_2) \cdot C^2(\text{Cl}^-)} \quad (7.34)$$

Из последнего уравнения следует, что при постоянной концентрации Cl^- по мере увеличения концентрации РСЦ величина $(\lambda_0/\lambda - 1)$ линейно растет, причем из тангенса угла наклона соответствующей зависимости можно вычислить $K(\text{РСЦ})$. Это означает, что для определения $K(\text{РСЦ})$ необходимо построить зависимость $(\lambda_0/\lambda - 1)$ от $C(\text{РСЦ})$.

Для определения λ_0 изучали распределение Hg(II) между катионитом и раствором. λ_0 находили как тангенс угла наклона полученной линейной изотермы адсорбции. Его значение составило 0.009.

Для изучения влияния гумусовых кислот на коэффициент распределения Hg(II) между катионитом и раствором в систему вводили различные концентрации гумусовых кислот и определяли Hg(II) в растворе. В экспериментах использовали препараты PHF-T4H94, ADOM-SMu4 и PHF-

SMu4. Полученные результаты представляли в виде зависимости $(\lambda_0/\lambda-1)$ от концентрации гумусовых кислот в логарифмических координатах, причем концентрацию гумусовых кислот выражали как молярную концентрацию РСЦ (рис. 7.2).

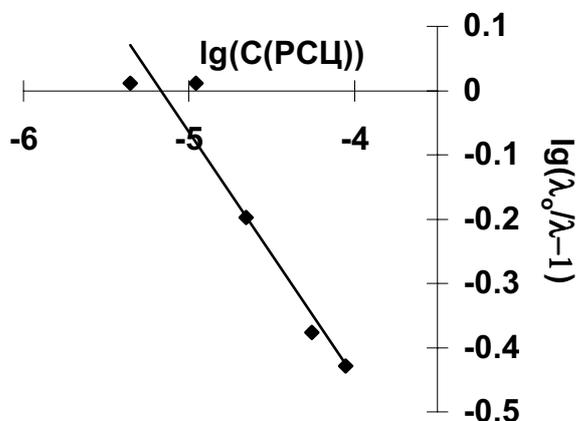


Рис. 7.2 Зависимость поглощения Hg(II) катионитом КУ-23 от концентрации ГФК РНФ-SMu4.

Для всех трех препаратов введение гумусовых кислот приводило к *увеличению* связывания Hg(II) с катионитом. Следовательно, гумусовые кислоты способствует связыванию Hg(II) с катионитом, то есть помимо сорбции ионов Hg^{2+} на катионите, на нем происходит и сорбция гуматов ртути. Это делает ионообменный метод неприменимым для определения констант устойчивости гуматов ртути.

Адсорбционный метод. Неприменимость ионообменного метода для определения констант устойчивости гуматов ртути побудила нас к модификации этого метода. А именно, возникла идея заменить катионит на какой-либо другой сорбент, способный сорбировать Hg(II) из раствора. При этом искомый сорбент должен был удовлетворять следующим условиям. Во-первых, обеспечивать линейность изотермы сорбции Hg(II) при концентрации 250 нМ и выше. Во-вторых, не должен сорбировать гуматы. Кроме того, в условиях эксперимента сорбент должен понижать концентрацию Hg(II) в 2-4 раза: при более сильной сорбции возникнут большие погрешности при определении λ_0 , а при более слабой – при определении $(\lambda_0/\lambda - 1)$.

В качестве возможных сорбентов были выбраны полиэтилен [Heiden and Aikens, 1983], кварц [Цуканова и Тихомолова, 1996] и стекло. Для оценки их сорбционной способности по отношению к Hg(II) была изучена адсорбция Hg(II) на стенках сосудов из соответствующего материала в присутствии 0.0025 М гидрокарбонатного буфера (pH 7). Эксперименты проводились в бесхлоридной среде, так как хлориды препятствовали сорбции Hg(II). Для оценки доли адсорбированного Hg(II) строили зависимость концентрация Hg(II) в равновесии с сорбентом от исходной концентрации Hg(II) (рис. 7.3).

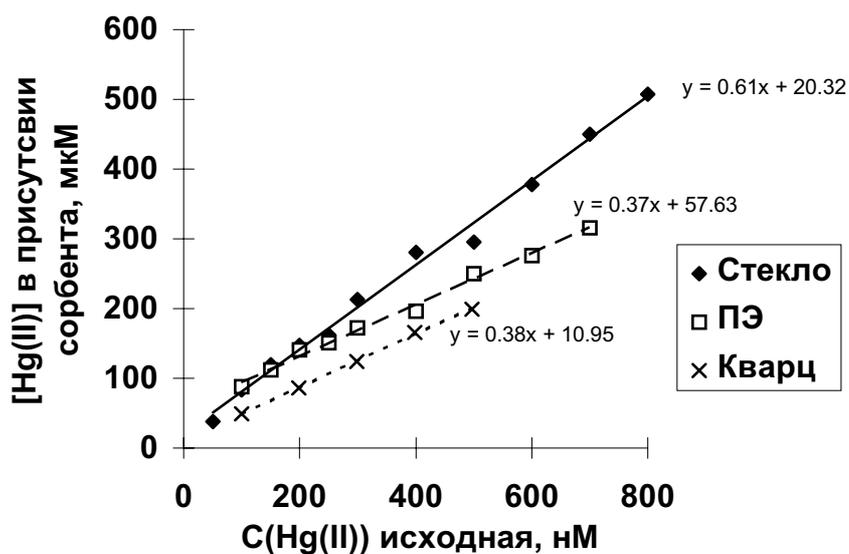


Рис. 7.3. Зависимость концентрации Hg(II) в растворе над различными сорбентами от исходной (аналитической) концентрации Hg(II) (pH7, 0.0025 М гидрокарбонатный буфер).

Из рис. 7.3 видно, что все три сорбента обеспечивают линейность изотерм адсорбции в требуемом диапазоне концентраций. При этом стекло обладает минимальной сорбционной способностью, а кварц – максимальной.

Изучение адсорбции Hg(II) на кварце в присутствии 20 и 80 мг/л ГФК показало, что по мере увеличения концентрации гумусовых кислот наблюдалось отклонение изотерм адсорбции от линейности. По-видимому, это связано с тем, что гумусовые кислоты также занимают адсорбционные центры на кварце и тем самым препятствуют сорбции Hg(II).

Аналогичные эксперименты были проведены с полиэтиленовыми поверхностями. Изотермы адсорбции Hg(II) на полиэтиленовых поверхностях при различных концентрациях гумусовых кислот приведены на рис. 7.4.

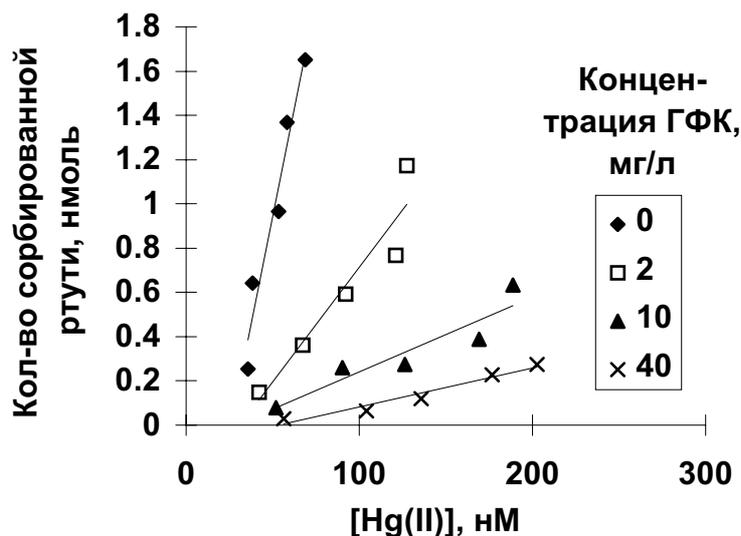


Рис. 7.4. Типичные изотермы адсорбции Hg(II) на полиэтиленовых поверхностях при различных концентрациях гумусовых кислот (рН 7, 0.0025 М гидрокарбонатный буфер).

Из рис. 7.4 видно, что гумусовые кислоты снижают адсорбцию Hg(II) на полиэтиленовых поверхностях, причем во всем исследованном диапазоне концентраций гумусовых кислот изотермы остаются линейными. Кроме того, при повышении концентрации гумусовых кислот до 200 мг/л, Hg(II) практически не адсорбируется на полиэтиленовых поверхностях, что говорит об отсутствии адсорбции гуматов ртути на полиэтилене. На основании данного факта дальнейшие эксперименты по определению констант устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II) проводили с использованием полиэтилена в качестве адсорбента.

Как и ранее, константы устойчивости рассчитывали в соответствии с подходом, рассматривающим гумусовых кислот как набор РСЦ. Принимая во внимание, что определение констант устойчивости гуматов ртути (II) осложнялось гидролизом иона Hg^{2+} и комплексообразованием ртути(II) с компонентами буферной среды, вводили следующие допущения.

1. На полиэтилене сорбируется соединение HgA , представляющее собой либо гидроксид, либо гидрокарбонатный комплекс Hg(II). При этом А может быть как одним, так и несколькими лигандами.

2. Концентрация свободного А постоянна.

3. В растворах, содержащих гумусовые кислоты, протекает реакция конкурентного комплексообразования (заряды не учитываются):



Тогда из изотерм адсорбции (рис. 7.4) можно определить следующее соотношение:

$$\frac{[\text{Hg} \cdot \text{РСЦ}]}{[\text{HgA}]} = \left(\frac{\lambda_0}{\lambda} - 1 \right) \quad (7.36)$$

где λ_0 и λ – коэффициент распределения Hg(II) в отсутствие и присутствии гумусовых кислот, соответственно.

Для расчета $K(\text{РСЦ})$ на основании (7.36) запишем выражение для константы лигандного обмена:

$$K(\text{РСЦ} / \text{A}) = \frac{[\text{Hg} \cdot \text{РСЦ}] \cdot [\text{A}]}{[\text{HgA}] \cdot [\text{РСЦ}]} \quad (7.37)$$

При условии постоянства $[\text{A}]$, ее можно включить в константу. В этом случае равновесие (7.35) будет описываться следующей условной константой конкурентного комплексообразования:

$$K_{[\text{A}]}(\text{РСЦ} / \text{A}) = \frac{[\text{Hg} \cdot \text{РСЦ}]}{[\text{HgA}] \cdot [\text{РСЦ}]} \quad (7.38)$$

Поскольку во всех экспериментах использовался большой избыток РСЦ (как минимум, 10:1), то можно записать, что

$$[\text{РСЦ}] = C(\text{РСЦ}) \quad (7.39)$$

Подставляя (7.39) и (7.38) в (7.37) и преобразуя полученное уравнение, получаем

$$K_{[\text{A}]}(\text{РСЦ} / \text{A}) = \frac{1}{C(\text{РСЦ})} \cdot \left(\frac{\lambda_0}{\lambda} - 1 \right) \quad (7.40)$$

Выразим $K(\text{РСЦ})$ из $K_{[\text{A}]}(\text{РСЦ}/\text{A})$. Для этого домножим числитель и знаменатель в правой части уравнения (7.40) на $[\text{Hg}^{2+}]$, перенесем $K(\text{РСЦ})$ влево, а $K_{[\text{A}]}(\text{РСЦ}/\text{A})$ – вправо:

$$K(\text{РСЦ}) = \frac{[\text{HgA}]}{[\text{Hg}^{2+}]} \cdot K_{[\text{A}]}(\text{РСЦ} / \text{A}) \quad (7.41)$$

Дробь в правой части этого уравнения представляет собой константу равновесия реакции:



при условии, что $[\text{A}]$ включено в константу:

$$K_{[\text{A}]}(\text{HgA}) = \frac{[\text{HgA}]}{[\text{Hg}^{2+}]} \quad (7.43)$$

Следовательно, для расчета $K(\text{РСЦ})$ необходимо было определить $K_{[\text{A}]}(\text{HgA})$. Эту константу находили аналогичным способом, используя в качестве конкурентного лиганда бромид. Константы устойчивости бромидных комплексов Hg(II) находили в соответствующей базе данных [SCDB]. Их приводили к нулевой ионной силе по уравнению Дэвиса (уравнение 1.22, раздел 1.5.1) и усредняли. Согласно полученным данным $\lg\beta(\text{HgBr}_2) = 17.6$, хотя, разброс значений констант, приведенных в разных работах, весьма значителен (стандартное отклонение – 0.4).

Величину $K_{[A]}(Br/A)$ вычисляли для каждой изотермы. Логарифмы полученных констант усредняли. Полученное таким образом значение $K_{[A]}(Br/A)$ составило $(4.1 \pm 1) \times 10^8$. Рассчитанная на основании этого значения условная константа устойчивости HgA составляет 4.9×10^8 , что весьма близко значениям условных (рН 7) констант устойчивости $Hg(OH)_2$, рассчитанных из литературных данных [SCDB] (от 6.7×10^7 до 4.6×10^8). Это позволило идентифицировать HgA как гидроксид ртути(II).

На основании изотерм, полученных при трех различных концентрациях гумусовых кислот, находили $K(РСЦ)$. Полученные константы логарифмировали и усредняли. Особо следует отметить, что закономерного изменения $K(РСЦ)$ при увеличении концентрации гумусовых кислот не наблюдали. Из этого можно сделать вывод, что константа устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II) в исследованном диапазоне соотношений Hg:ГФК постоянна с точностью до погрешностей эксперимента.

К достоинствам вышеописанного метода можно отнести возможность определения констант устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II) с учетом гидролиза ионов Hg^{2+} . К недостаткам – довольно высокую чувствительность определяемых величин к экспериментальным погрешностям, неизбежным в опытах с адсорбцией из очень разбавленных растворов (особенно неустойчива к экспериментальным погрешностям величина λ_0). Также результаты зависят от правильности использованного значения константы устойчивости $HgBr_2$. Кроме того, этот метод не позволяет учесть протонирования РСЦ в гумусовых кислотах и их неравноценность.

Таким образом, найденная константа ($K(РСЦ)$) применима при соблюдении следующих условий: $pH \approx 7$, $I \approx 0.0025$ М, соотношение Hg(II):ГФК < 100 мкМ Hg(II) на 1 г ГФК). Состав многих природных вод отвечает данным условиям, поэтому полученные значения констант можно использовать для расчета распределения Hg(II) по формам в природных водах.

Определенные вышеописанным методом константы устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II) приведены в табл. 7.2.

Весь диапазон изменчивости $\lg K(РСЦ)$ для использованных препаратов составил от 13.5 до 14.7, то есть один порядок. Наиболее высокие значения констант были характерны для ГК почв, наименьшие значения – для ГФК вод. Вопросы взаимосвязи строения гумусовых кислот и полученных констант устойчивости в этой главе не рассматривали, так как им будет уделено особое внимание в Главе 8, посвященной прогностическому моделированию свойств гумусовых кислот.

Константы устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II)

(n = 3, P = 0.95)

Препарат	lgK(РСЦ)	Препарат	lgK(РСЦ)
РОВ природных вод		ГФК торфа	
ADOM-SMu4	13.7±0.3	PHF-T494	14.1±0.2
ADOM-SMu8	14.1±0.2	PHF-T594	14.3±0.1
ГФК природных вод		PHF-T694	14.0±0.2
AHF-MMu7	14.6±0.4	PHF-TH94	14.2±0.3
AHF-RND11	13.7±0.1	PHF-TMu4	14.2±0.3
AHF-RND14	13.5±0.1	PHF-TT94	14.2±0.3
AHF-SSH1	13.9±0.2	ГК почв	
AHF-SMu8	13.8±0.1	SHA-Gw94	14.7±0.2
ГФК донных отложений		SHA-Pw94	14.5±0.2
BHF-RLuh	14.4±0.2	SHA-PwN	14.6±0.2
BHF-RND13	14.0±0.3	ГФК почв	
BHF-SMu2	14.5±0.2	SHF-Co94	14.2±0.2
ГК углей		SHF-TMu12	14.9±0.4
CHA-AGK	14.4±0.2	SHF-PMu9	14.2±0.2
CHA-ALD	14.0±0.2		

Полученные значения констант были соотнесены с литературными данными (табл. 1.14). Для того, чтобы значения констант были сопоставимы, литературные данные пересчитывали на концентрацию РСЦ. Для констант, выраженных через молярную концентрацию гумусовых кислот, пересчет проводили по формуле:

$$\lg K(\text{РСЦ}) = \lg K(\text{ГФК}) - (\lg M(\text{ГФК}) + \lg \omega(\text{РСЦ})), \quad (7.44)$$

где $K(\text{ГФК})$ – константа, выраженная через молярную концентрацию ГФК, $M(\text{ГФК})$ – молярная масса гумусовых кислот, использованных в указанной работе, $\omega(\text{РСЦ})$ – количество РСЦ на единицу массы гумусовых кислот.

Поскольку значение последнего параметра авторами цитируемых работ не определялось, использовали средние значения для соответствующих типов гумусовых кислот, найденные в настоящей работе. Пересчитанные значения констант приведены в (табл. 7.3). При этом из рассмотрения были исключены работы [Strohal and Huljev, 1970; Yin et al, 1997] по причинам, описанным в обзоре литературы (разд. 1.5.1).

Литературные данные по константам устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II) в пересчете на Hg(II)-эквивалентную концентрацию гумусовых кислот

Препарат	pH	I	lgK(ГФК)	M(ГФК) г/моль	ω (РСЦ) ммоль/г	lgK(РСЦ)	Источник
Морские ГФК	8	?	18.1		3.7*	16.0-16.9	Mantoura et al., 1978
Речные ГФК			19.3-19.7	4600-	3.7*	17.1-18.5	
Озерные ГФК			18.4-20.1	32000	3.7*	16.3-18.9	
ФК торфа			18.3		2.3**	16.2-17.1	
ФК Москвы-реки	6.5	0.1	11	4100	3.7*	10.2***	Варшал и Буачидзе, 1983
ГК "Aldrich"	7	?	–	–	–	13.7-15.0	Heiden&Aikens, 1983

* – для водных гумусовых кислот в расчете на беззольный препарат;

** – для торфяных гумусовых кислот;

*** – дополнительно пересчитано на $I = 0$ по уравнению Дэвиса (1.22).

Как видно из данных, приведенных в табл. 7.3, полученные нами результаты хорошо согласуются с [Heiden and Aikens, 1983]. Так, для препарата ГК Aldrich, по нашим данным, $\lg K(\text{РСЦ}) = 14.0 \pm 0.2$ ($P = 0.95$), а из данных [Heiden and Aikens, 1983] – 13.7-15.0 в зависимости от соотношения Hg(II):ГФК. Нужно заметить, что указанные авторы также определяли константы устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II) из данных по адсорбции Hg(II) на полиэтилене в присутствии гумусовых кислот, что близко методу, использованному в настоящей работе.

Значения констант, найденные в [Mantoura et al., 1978], оказались на 2-4 порядка выше, чем в настоящей работе, а приводимые в [Варшал и Буачидзе, 1983] – на 3 порядка ниже. Расхождение с [Варшал и Буачидзе, 1983] может быть обусловлено принципиально иным методом выделения гумусовых кислот – сорбцией на активированном угле, что могло сказаться на их свойствах. В отношении работы [Mantoura et al., 1978] причины расхождения с нашими данными можно объяснить использованием более высоких pH, при котором работали авторы.

На основании проведенных систематических исследований получены количественные характеристики комплексообразующих свойств гумусовых кислот по отношению к Hg(II) (содержание ртути-связывающих центров и константы устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II)) для

представительной выборки препаратов различного происхождения и фракционного состава. В качестве константы устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II) предложено использовать кажущуюся константу в расчете на ртуть-эквивалентную концентрацию гумусовых кислот. Разработаны методики определения Hg(II)-эквивалентной концентрации гумусовых кислот и кажущихся констант устойчивости комплексов с Hg(II). Показано, что гумусовые кислоты различного происхождения и фракционного состава связывают Hg(II) в прочные комплексы, при этом диапазон изменения найденных кажущихся констант устойчивости по всей исследованной выборке препаратов составлял один порядок.

7.2 Исследование связывающих свойств гумусовых кислот по отношению ПАУ и атразину

Полиядерные ароматические углеводороды (ПАУ) образуют класс химических соединений, оказывающих выраженные токсические, мутагенные и канцерогенные эффекты на живые организмы [Neff, 1979; Lee et al., 1981]. Наряду с полихлорированными углеводородами, они относятся к одному из наиболее опасных классов загрязняющих веществ – высокогидрофобным органическим соединениям [Maruya et al., 1997]. Влияние гумусовых кислот на формы существования ПАУ в водных средах и их биологическую активность было подробно обсуждено в соответствующем разделе обзора литературы (1.6), что позволило наглядно продемонстрировать необходимость учета этого фактора при построении адекватных моделей биогеохимических циклов ПАУ и прогнозировании их опасности для биотической компоненты природных сред.

Еще одним важным классом органических экотоксикантов являются гербициды. При этом особо опасно загрязнение персистентными гербицидами, одним из наиболее распространенных представителей которых является атразин [Захаренко, 1990]. Время его жизни в почве составляет от нескольких недель до четырех лет и более. Атразин принадлежит к классу сим-триазиновых гербицидов – сильных специфических ингибиторов фотосинтеза. Согласно многочисленным исследованиям, основным фактором, определяющим закрепление атразина в почвенном профиле и уровень проявляемой им токсичности является связывание с гумусовыми кислотами [Лебедева и др., 1990; Овчинникова, 1987]. Этот вопрос подробно освещен в обзоре литературы (раздел 1.6.3).

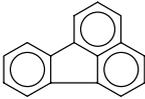
Указанные причины обусловили выбор ПАУ и атразина в качестве модельных органических токсикантов для оценки связывающих и детоксицирующих свойств гумусовых кислот.

7.2.1 Определение констант связывания гумусовых кислот с ПАУ

Изучение взаимодействия гумусовых кислот с ПАУ проводили на примере трех представителей этого класса соединений – пирена (Py), флуорантена (Flt) и антрацена (An). Выбор модельных ПАУ основывали на различии их физико-химических свойств, в первую очередь, гидрофобности, растворимости и потенциала ионизации, что важно для установления механизма соответствующего взаимодействия. Основные физико-химические характеристики используемых ПАУ приведены в табл. 7.4.

Таблица 7.4

Физико-химические характеристики модельных ПАУ по данным [Clar, 1964; Кирсо и др., 1988]

ПАУ	Стр-ра	$T_{mp}^{\circ C}$	$T_{bp}^{\circ C}$	Раствори- мость в воде, мкг/л (25°C)	Давлени е паров, (20°C)	lgK_{ow}	I, (эВ)
Пирен		149	360	135	6.85×10^{-7}	5.18	7.55
Флуорантен		110	–	265	0.60×10^{-6}	5.22	7.8
Антрацен		216	340	30	1.96×10^{-4}	4.44	7.44

Выборка препаратов, использованная для исследования взаимодействия с ПАУ, включала 26 образцов: 7 ГФК и 1 РОВ торфа; 7 ГК, 5 ФК и 1 ГФК почв; 4 ГФК вод и 1 ГК угля. Константы связывания ПАУ гумусовыми кислотами определяли методом тушения флуоресценции. Как указывалось в литобзоре (раздел 1.6.2), данный метод позволяет определять константы связывания ПАУ гумусовыми кислотами путем измерения концентрации свободной и связанной форм ПАУ без их предварительного разделения. Кроме того, использование этого метода не требует определения точной концентрации ПАУ в растворе [Shlautman and Morgan, 1993]. Расчет констант связывания ПАУ гумусовыми кислотами (K_{OC}) проводили с помощью уравнения Штерна-Фольмера (1.27). Подробное обсуждение полученных результатов приведено в [Perminova et al., 1999].

Для определения K_{OC} измеряли интенсивности флуоресценции растворов ПАУ в отсутствие (F_0) и в присутствии (F) различных концентраций гумусовых кислот. С этой целью готовили концентрационные серии гумусовых кислот при постоянной концентрации ПАУ, которая составляла: 5×10^{-7} , 6.4×10^{-7} и 1.7×10^{-7} М для Py, Flt и An, соответственно. Концентрации

гумусовых кислот устанавливали в диапазоне $0.5-7 \times 10^{-6}$ кг С/л. На рис. 7.5 приведены типичные спектры флуоресценции Ру в присутствии различных концентраций гумусовых кислот. Типичные концентрационные зависимости тушения флуоресценции ПАУ гумусовыми кислотами, использованные для расчета K_{OC} , приведены на рис. 7.6.

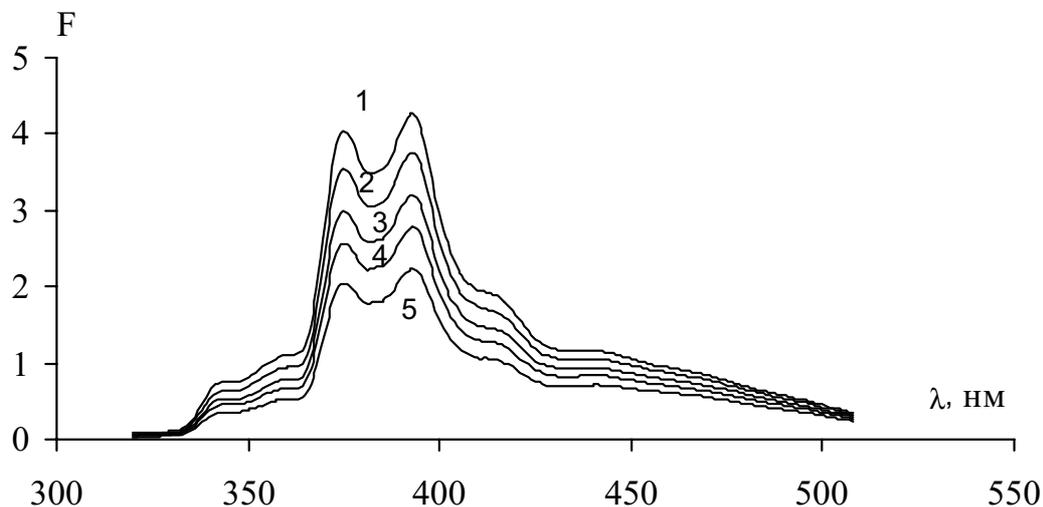


Рис. 7.5. Спектры флуоресценции Ру в присутствии различных концентраций гумусовых кислот при $\lambda_{ex}=224$ нм. (1, 2, 3, 4 и 5 соответствуют 0, 1, 3, 5 и 7 мг С/л ГФК).

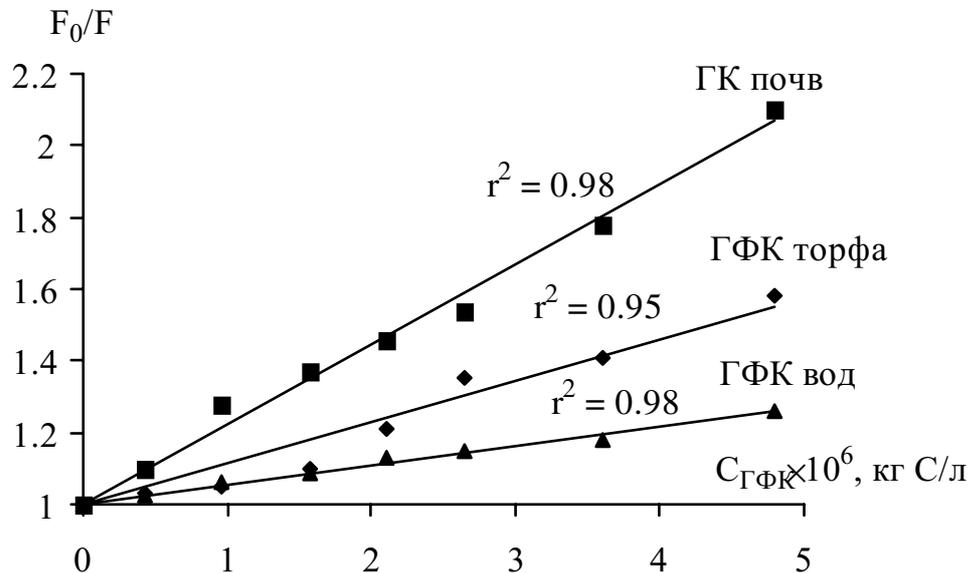


Рис. 7.6. Зависимости Штерна-Фольмера для Ру и гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава

Как видно из рис. 7.6, в исследуемом диапазоне концентраций гумусовых кислот полученные зависимости линейны. Рассчитанные по уравнению Штерна-Фольмера значения констант и их доверительные интервалы приведены в табл. 7.5.

Таблица 7.5

Константы связывания ($K_{OC} \times 10^{-5}$, л/кг С) модельных ПАУ
гумусовыми кислотами ($n = 7$, $P = 0.95$)

Препарат	Py	Flt	An	Препарат	Py	Flt	An
ГК и ФК почв				ГФК торфа			
SHA-Pw94	1.0±0.1	0.8±0.1	<0.1	RHF-T1H94	1.2±0.2	0.9±0.2	0.12±0.05
SHA-PwN	1.3±0.1	0.8±0.1	0.5±0.1	RHF-T4H94	1.4±0.1	0.9±0.1	0.22±0.05
SHA-Pp94	1.2±0.2	0.8±0.1	0.5±0.1	RHF-T5H94	0.8±0.2	0.6±0.2	0.16±0.03
SHA-Pg94	0.7±0.1	0.5±0.1	<0.1	RHF-T6H94	0.7±0.1	0.7±0.1	0.25±0.07
SHA-Gw94	1.4±0.5	0.9±0.2	0.5±0.2	RHF-T7H94	1.7±0.1	1.1±0.2	0.6±0.2
SHA-Gp94	1.8±0.2	1.2±0.1	0.7±0.1	RHF-TH94	1.4±0.2	0.9±0.2	0.5±0.1
SHA-Cm94	2.2±0.2	1.3±0.2	1.0±0.1	RHF-TTL94	1.0±0.2	0.8±0.1	<0.1
SHA-CtV94	2.4±0.3	1.6±0.3	1.0±0.4	ГФК природных вод			
SFA-Pw94	0.13±0.08	<0.1	<0.1	AHF-RMC	<0.1	<0.1	<0.1
SFA-Pp94	<0.1	<0.1	<0.1	AHF-RMX	0.7±0.1	0.5±0.1	<0.1
SFA-Pg94	<0.1	<0.1	<0.1	AHF-RND3	0.4±0.1	0.2±0.1	<0.1
SFA-Gw94	0.5±0.1	0.3±0.1	<0.1	AHF-SSh1	1.2±0.2	0.9±0.2	<0.1
SFA-CtV94	1.1±0.2	0.7±0.1	<0.1	РОВ торфа и ГК угля			
ГФК почв				PDOM-TH	<0.1	<0.1	<0.1
SHF-Co94	1.0±0.1	0.6±0.1	0.5±0.1	CHA-ALD	2.3±0.3	1.8±0.2	1.0±0.2

Как видно из табл. 7.5, рассчитанные с помощью метода тушения флуоресценции K_{OC} лежат в диапазоне $(0.1-2.5) \times 10^5$, $(0.2-1.7) \times 10^5$ и $(0.1-1.0) \times 10^5$ л/кг С для Py, Flt и An, соответственно. Полученные значения хорошо согласуются с K_{OC} , приводимыми в литературе. Так, согласно [Gauthier et al., 1986; Danielsen et al., 1995; Shlautman and Morgan, 1993; Herbert et al., 1993; Gauthier et al., 1987], диапазон K_{OC} Py составляет $(0.2-5.5) \times 10^5$ л/кг С и $(0.2-0.6) \times 10^5$ л/кг С для An. Диапазон полученных нами значений K_{OC} Flt для ГК почв $(0.7-1.6) \times 10^5$ л/кг С соответствует величине 0.9×10^5 л/кг С, приводимой авторами [Chen et al., 1994].

Для оценки минимально определяемых величин K_{OC} использовали 3 σ критерий [Doerffel, 1990]. Для этой цели по результатам трех параллельных измерений рассчитывали стандартное отклонение минимального из всех определенных значений константы. Умножая полученную величину на три, получали минимально определяемое значение K_{OC} . Наименьшим значением

характеризовалось связывание An препаратом PNF-T1H94. Величины соответствующей K_{OC} и стандартного отклонения составили 0.12×10^5 и 0.034×10^5 л/кг С. Поэтому минимально определяемое значение K_{OC} составило 0.1×10^5 л/кг С.

Как видно из представленных данных, значения K_{OC} Py и Flt превышают таковые для An. По-видимому, такая разница обусловлена более высокой гидрофобностью Py и Flt ($\lg K_{ow} \sim 5.2$) по сравнению с An ($\lg K_{ow} \sim 4.4$). Схожие закономерности получены в [Gauthier et al., 1986; Kopinke et al., 1995; Chin and Weber, 1994]. В целом, по величине K_{OC} препараты ГФК различного происхождения можно расположить в следующий ряд:

ГК угля \cong ГК чернозема > ГК Л и П^Д почв > ГФК торфов >
> ГФК природных вод > ФК чернозема > ФК Л и П^Д почв

Наибольшее сродство к ПАУ было зафиксировано для СНА-ALD (2.3×10^5 ; 1.7×10^5 и 1×10^5 л/кг С для Py, Flt и An, соответственно), а также ГК черноземов. ГК П^Д и Л почв также характеризовались высокими K_{OC} , но в среднем их значения были ниже на 20% по сравнению с ГК черноземов. Для торфяных ГФК значения K_{OC} были ниже в среднем на 30-40% по сравнению с ГК почв. Относительно низкими константами связывания характеризовалось взаимодействие водных ГФК с модельными ПАУ. Так, в случае An не было зафиксировано тушения флуоресценции ни с одним из водных препаратов. Это означает, что соответствующие константы были ниже минимально определяемой величины (0.1×10^5 л/кг С). Для Py и Flt связывание наблюдалось только для препаратов ANF-RND3, ANF-RMX2 и ANF-SSh1. Водная вытяжка торфа не вызывала тушения флуоресценции ни одного из ПАУ. Аналогичный эффект наблюдался и в случае ФК почв. Исключение составили ФК, выделенные из чернозема типичного (SFA-CtV94), а также препарат SFA-Gw94. Значения данных констант были в среднем в 2-3 раза ниже по сравнению с соответствующими ГК почв. Полученные результаты согласуются с данными авторов [Gauthier et al., 1986; Paolis and Kukkonen, 1997; Gauthier et al., 1987].

Таким образом, как видно из представленных данных, сродство гумусовых кислот к ПАУ определяется как свойствами ПАУ, так и источником происхождения и фракционным составом гумусовых кислот. Наблюдаемые различия в величинах K_{OC} для препаратов гумусовых кислот различного происхождения, по-видимому, связаны с особенностями их строения.

В силу специфики свойств ПАУ, а именно, их высокой гидрофобности, и характера полученных закономерностей – максимальные константы связывания наблюдались для более гидрофобных ПАУ (Py и Flt), наиболее вероятным представлялся механизм гидрофобного взаимодействия гумусовых

кислот с ПАУ. Дополнительным указанием на это являлось обнаруженное максимальное сродство к ПАУ препаратов ГК угля и чернозема, которые характеризуются самым высоким вкладом ароматических – гидрофобных – фрагментов в их структуру. Гипотезы о гидрофобном механизме связывания ПАУ гумусовыми кислотами неоднократно высказывались в литературе [Gauthier et al., 1983, Paolis and Kukkonen, 1997; Black and McCarthy, 1988] на основании корреляционных взаимосвязей между показателями ароматичности гумусовых кислот – H/C , C_{Ar} и ϵ^* – и величиной константы связывания. Обсуждению подобных зависимостей, полученных по результатам нашей работы, будет посвящен специальный раздел следующей главы (8.2). Однако экспериментальные подтверждения превалирующей роли ароматического каркаса в связывании ПАУ отсутствовали. Поэтому следующий раздел работ был посвящен изучению связывающей способности негидролизуемой (каркасной) части гумусовых кислот на примере Ру.

7.2.2 Определение констант связывания пирена гидролизрованными препаратами гумусовых кислот

Для изучения связывающей способности каркасной и периферической частей гумусовых кислот по отношению к Ру исходные препараты подвергали кислотному гидролизу (0.2 М HCl, $t = 110^\circ\text{C}$, 15 часов) согласно процедуре, описанной в п. 4.3.1 В данных условиях происходит расщепление макромолекул гумусовых кислот на ароматический каркас и углеводную периферию. При этом каркасные фрагменты образуют нерастворимые продукты гидролиза, а периферические переходят в раствор. Гидролиз проводили для 4 ГК торфа (РНА-Т3L98, РНА-Т4Н98, РНА-Т5Н98, РНА-Т6Н98), ФК торфа (РФА-Т4Н98) и ГК почв (SНА-СtV98).

Константы связывания Ру негидролизуемой (ННР) и гидролизуемой частью ((ННД) гумусовых кислот определяли методом тушения флуоресценции аналогично процедуре, использованной для исходных препаратов. Полученные K_{OC} и их доверительные интервалы приведены в табл. 7.6.

Как видно из табл. 7.6, для всех нерастворимых продуктов гидролиза гуминовых кислот наблюдалось возрастание K_{OC} по сравнению с исходными. По-видимому, увеличение K_{OC} обусловлено тем, что, во-первых, в результате отщепления периферической части облегчается доступ Ру к ароматическому каркасу молекул ГК, а во-вторых, возрастает гидрофобность образовавшегося продукта гидролиза. Наибольшее увеличение K_{OC} (30%) наблюдалось для ГК чернозема. В случае торфяных ГК значения констант изменялись не столь существенно. Константы связывания Ру гидролизуемой частью ГК для всех исследованных препаратов были ниже минимально определяемой величины

0.1×10^{-5} л/кг С. Это позволяет сделать вывод о том, что периферическая часть молекул ГК практически не участвует в связывании Ру.

Таблица 7.6

Константы связывания Ру исходными препаратами ГК и продуктами их гидролиза (n = 7, P = 0.95)

Препарат	$K_{OC} \times 10^{-5}$ л/кг С	Препарат	$K_{OC} \times 10^{-5}$ л/кг С	Препарат	$K_{OC} \times 10^{-5}$ л/кг С
исходные ГК		негидролизуемая часть		гидролизуемая часть	
РНА-Т3Л98	1.2±0.3	РННР-Т3Л98	1.3±0.2	РННД-Т3Л98	<0.1*
РНА-Т4Н98	1.2±0.3	РННР-Т4Н98	1.7±0.3	РННД-Т4Н98	<0.1
РНА-Т5Н98	1.2±0.2	РННР-Т5Н98	1.4±0.2	РННД-Т5Н98	<0.1
РНА-Т6Н98	1.4±0.2	РННР-Т6Н98	1.8±0.4	РННД-Т6Н98	<0.1
SНА-СТ98	2.8±0.3	SHНР-СТ98	3.4±0.4	SHНД-СТ98	<0.1

* минимально определяемое значение K_{OC} .

Полученные данные можно рассматривать как экспериментальное подтверждение ведущей роли ароматического каркаса в связывании ПАУ гумусовыми кислотами. Чем больше вклад ароматических фрагментов в структуру гумусовых кислот, чем меньше она экранирована углеводно-обогатненными периферическими фрагментами, тем выше их связывающая способность по отношению к ПАУ.

7.2.3 Зависимость констант связывания ПАУ гумусовыми кислотами от pH и ионной силы среды

В связи с тем, что константы связывания, определяемые по уравнению (1.27), являются условными, то была изучена их зависимость от pH и ионной силы среды. Результаты исследования опубликованы в [Яценко и др., 1999]. Выявление характера такой зависимости особенно важно для расчета распределения ПАУ по формам существования в природных водах с учетом их связывания гумусовыми кислотами.

Для исследования влияния pH среды на константы Ру, Flt и An были выбраны препараты гумусовых кислот, существенно различающиеся по величине K_{OC} : ГК угля; ГК почв; ГФК торфа и ГФК природных вод. Требуемый pH в растворах гумусовых кислот в присутствии ПАУ создавали с помощью 0.1 М NaOH и концентрированной HCl. Диапазон изменений pH составил 2.1-8.4.

Полученные зависимости K_{OC} от pH среды приведены на рис. 7.7. Как видно из представленных данных, величина K_{OC} увеличивалась с уменьшением pH. При этом снижение pH от 8.5 до 3.8 сопровождалось лишь

незначительным увеличением K_{OC} (на 10-20%). В то же время дальнейшее уменьшение pH от 3.8 до 2 вызывало двукратное возрастание K_{OC} . В наибольшей степени данный эффект был выражен для Ру и Flt, в меньшей – для An. Максимальное изменение K_{OC} наблюдалось в присутствии препаратов ГК угля и чернозема для Ру и Flt. Так, в случае Ру, значения соответствующих констант уменьшались от 3.0×10^5 до 0.6×10^5 и от 3.0×10^5 до 1.0×10^5 л/кг С при увеличении pH от 2.1 до 8.4. Для Flt соответствующие изменения составили $2.5 \times 10^5 - 0.4 \times 10^5$ и $2.7 \times 10^5 - 0.8 \times 10^5$ л/кг С. В меньшей степени этот эффект был выражен для ГК дерново-подзолистых и серых лесных почв: K_{OC} пирена уменьшалась в диапазоне $2.4 \times 10^5 - 1.1 \times 10^5$ л/кг С при изменении pH от 2.1 до 8.4. В случае Flt – от 1.8×10^5 до 0.7×10^5 л/кг С. Константы связывания ПАУ препаратами ГФК природных вод, для которых были характерны минимальные значения, практически не зависели от pH среды. В случае An наиболее существенное уменьшение K_{OC} наблюдалось при изменении pH от 6.4 до 8.4. Исключение составили ГК угля, для которых K_{OC} уменьшались во всем диапазоне увеличения pH.

Увеличение степени связывания ПАУ гумусовыми кислотами при снижении pH, по-видимому, связано с возрастанием гидрофобности гумусовых кислот в результате протонирования ионогенных групп их макромолекул.

Для установления аналитического выражения, которое описывало бы зависимость K_{OC} от pH среды, полученные зависимости были аппроксимированы следующей двухпараметрической функцией:

$$K_{OC}^{pH} = K_{OC}^0 ((1 - b) \times (pH^0/pH)^c + b) \quad (7.45),$$

где K_{OC}^0 – константа связывания ПАУ гумусовыми кислотами при pH 2;

K_{OC}^{pH} – константа связывания при заданном pH.

b, c – эмпирические коэффициенты:

для Ру: $b = -0.30$; $c = 0.50$;

для Flt: $b = 0.20$; $c = 1.30$;

для An: $b = -450$; $c = 0.001$.

Значения коэффициентов b, c рассчитывали путем минимизации суммы квадратов отклонений расчетной и экспериментальной кривых pH-зависимостей K_{OC} . Примеры аппроксимации экспериментальных зависимостей с помощью функции (7.45) приведены на рис. 7.8 для Ру. Аналогичные зависимости были получены для Flt и An.

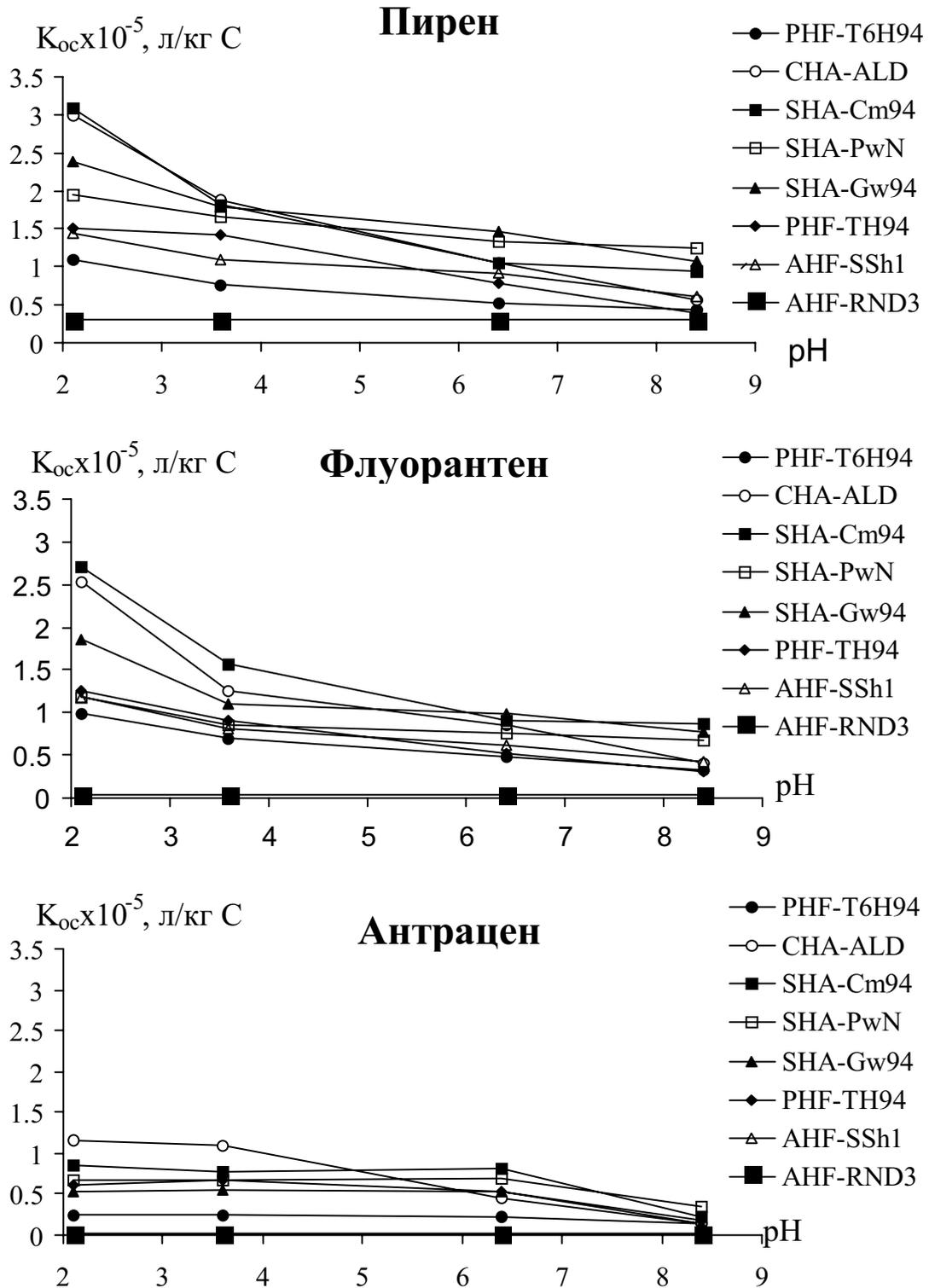


Рис. 7.7. Зависимость K_{oc} модельных ПАУ от рН среды.

Как видно из рис. 7.8, используемое уравнение (7.45) позволяет аппроксимировать экспериментальные кривые с достаточно высоким уровнем статистической достоверности. Соответствующие r^2 составили, в среднем, 0.92 в случае Ру и 0.95 и 0.80 для Flt и An.

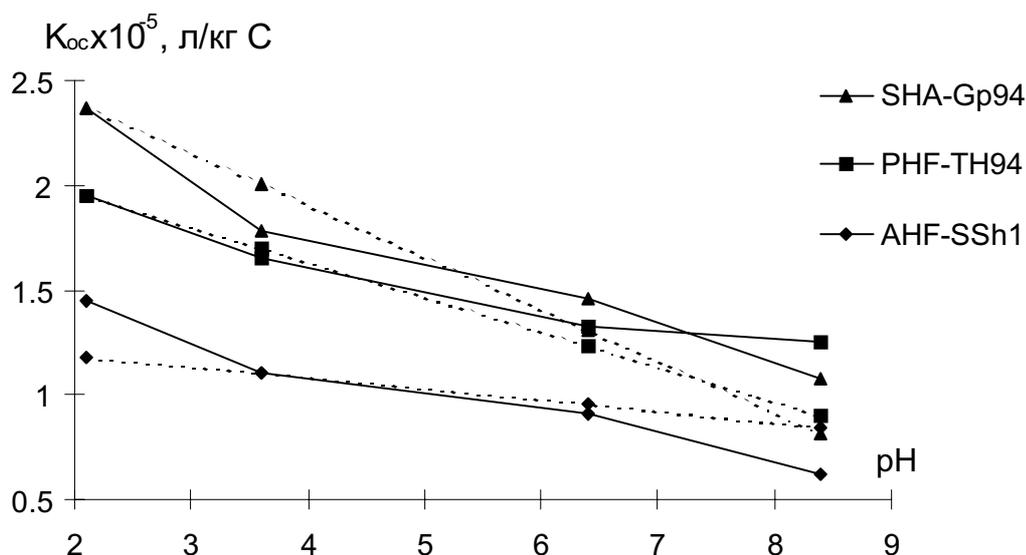


Рис. 7.8. Зависимость K_{OC} пирена от pH для гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава (сплошными линиями обозначены экспериментальные данные; пунктирными – рассчитанные).

Исследование влияния ионной силы на связывающую способность гумусовых кислот по отношению к Ру, Flt и An проводились на той же выборке препаратов, существенно различающихся по величине K_{OC} . В случае An вместо водных ГФК были использованы торфяные, т.к. какого-либо связывания An с водными ГФК зарегистрировано не было. Требуемую ионную силу (I) в растворах ГФК-ПАУ создавали с помощью NaCl. Диапазон изменения I составил 1×10^{-4} – 2.5×10^{-1} М. Полученные зависимости K_{OC} от логарифма ионной силы среды приведены на рис. 7.9.

Как видно из рис. 7.9, для всех исследованных препаратов ГФК наблюдалось уменьшение K_{OC} по мере возрастания ионной силы. При этом наиболее существенное изменение K_{OC} (20–30%) было характерно для препаратов с высоким сродством к ПАУ – ГК угля и чернозема в интервале концентраций электролита 1×10^{-3} – 1×10^{-2} М. Дальнейшее увеличение концентрации NaCl до 0.25 М практически не влияло на степень связывания ГФК ни с Ру, ни с Flt. В то же время для An наблюдалось снижение K_{OC} во всем диапазоне изменения ионной силы.

Уменьшение степени связывания ПАУ с возрастанием ионной силы, по-видимому, обусловлено конформационными изменениями макромолекул гумусовых кислот в растворе электролита. Так, увеличение ионной силы вызывает экранирование заряда полианиона и, следовательно, способствует принятию им более компактной конформации. Как следствие, уменьшается эффективная площадь контакта гидрофобной поверхности макромолекул гумусовых кислот с ПАУ, что приводит к уменьшению их констант связывания.

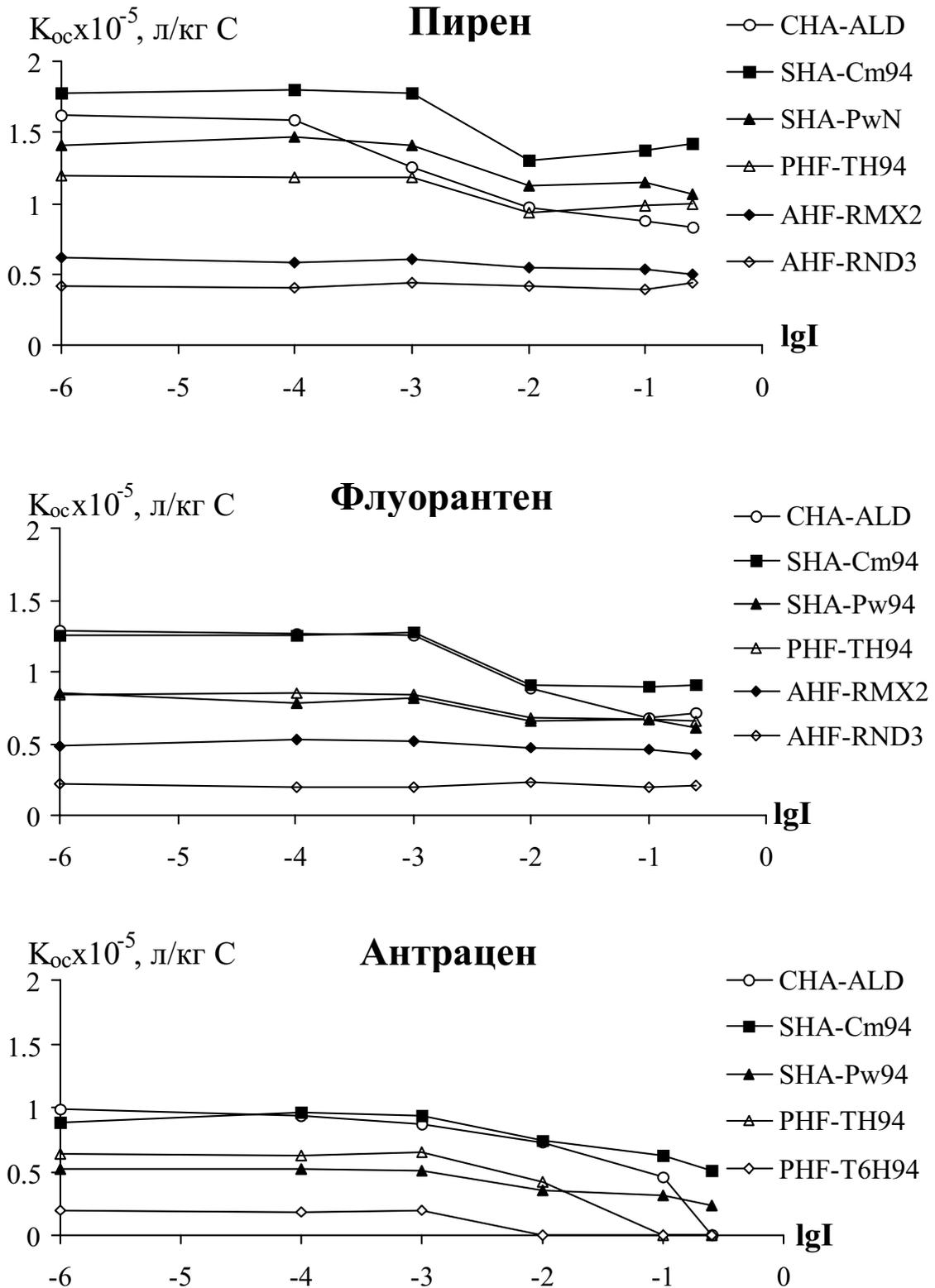


Рис. 7.9. Зависимость K_{OC} модельных ПАУ от ионной силы среды.

Для установления аналитического выражения, которое описывало бы зависимость K_{OC} от I , полученные зависимости были аппроксимированы следующей двухпараметрической функцией:

$$K_{OC}^I = (1 - b) \times K_{OC}^{I=0} \times \text{EXP}(-c \times I + b) \quad (7.46)$$

где $K_{OC}^{I=0}$ – константа связывания ПАУ гумусовыми кислотами при ионной силе раствора равной нулю;

K_{OC}^I – константа связывания при ионной силе I ;

b, c – эмпирические коэффициенты:

для Ру: $b = 0.75$; $c = 184$;

для Flt: $b = 0.70$; $c = 102$;

для An: $b = 0.32$; $c = 38$;

Коэффициенты b, c из уравнения (7.46) определяли путем минимизации суммы квадратов отклонений экспериментальных и теоретических зависимостей. Примеры аппроксимационных кривых приведены на рис. 7.10 для Ру. Аналогичные зависимости были получены для Flt и An.

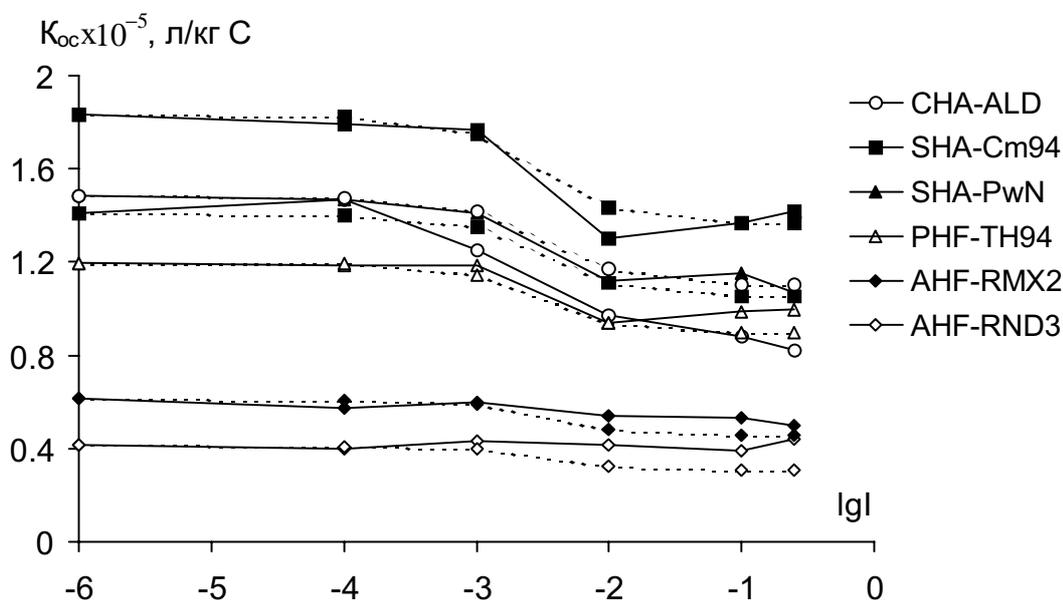


Рис. 7.10. Зависимость K_{OC} пирена от ионной силы для гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава (сплошные линии – экспериментальные данные; пунктирные – рассчитанные).

Как видно из представленных зависимостей, предложенное уравнение (7.46) позволяет аппроксимировать экспериментальные кривые с достаточно высоким уровнем статистической достоверности. Соответствующие r^2 составили, в среднем, 0.83 в случае Ру и 0.88 и 0.92 для Flt и An.

В связи с тем, что галогенид-ионы в высоких концентрациях также могут вызывать тушение флуоресценции ПАУ [Паркер, 1972; Engebretson and Wandruszka, 1994], которое в этом случае не будет связано с образованием нефлуоресцирующих комплексов ПАУ-ГФК, то нами была исследована зависимость интенсивности флуоресценции модельных ПАУ от концентрации

фонового электролита (NaCl). Результаты измерений показали, что интенсивность флуоресценции ПАУ не изменялась во всем диапазоне изменения ионной силы от 1×10^{-4} до 2.5×10^{-1} М. Данный факт может свидетельствовать об отсутствии эффекта тушения флуоресценции ПАУ хлорид-ионами в условиях эксперимента.

Проведенные исследования показывают, что сродство гумусовых кислот к ПАУ зависит не только от их строения, но и от параметров водной среды, в которой происходит это взаимодействие. Описанный характер зависимости K_{OC} от рН и ионной силы хорошо согласуется с предположением о преобладающем вкладе гидрофобных взаимодействий в связывание ПАУ гумусовыми кислотами. Полученные двухпараметрические зависимости K_{OC} от рН и ионной силы могут быть использованы для корректировки значений констант связывания ПАУ гумусовыми кислотами при изменении параметров водной среды.

7.2.4 Определение констант связывания гумусовых кислот с атразином

Атразин является представителем класса симм-триазинов (рис. 7.11.) – персистентных гербицидов системного действия. Для него характерны малая растворимость в воде (30 мг/л при 25°C), способность протонироваться при низких значениях рН ($pK_a \approx 1.7$) и слабовыраженные гидрофобные свойства ($\lg K_{OW} = 2.7$) [Devitt and Weisner, 1998].

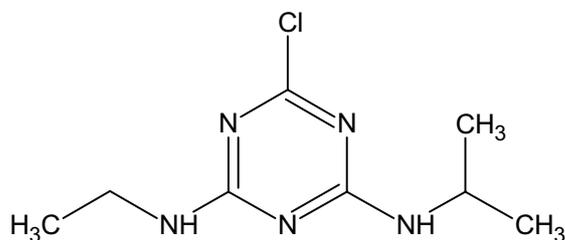


Рис. 7.11. Структурная формула атразина.

Для определения констант связывания атразина гумусовыми кислотами использовали тот же подход, что и для ПАУ, рассчитывая ее как константу сорбции по уравнению (1.26). Данная часть работы подробно изложена в соответствующей публикации [Kulikova et al., 2000]. Для экспериментального нахождения данной константы необходимо определять долю свободнорастворенного атразина (α) в присутствии гумусовых кислот. Тогда из уравнения (1.26) имеем:

$$\frac{1}{\alpha} + 1 = K_{OC} \times C_{ГФК} \quad (7.47)$$

Атразин, в отличие от ПАУ, не флуоресцирует, что делает неприменимым использование метода тушения флуоресценции. Поэтому

прибегали к другому способу, основанному на разделении свободнорастворенного и связанного гумусовыми кислотами атразина методом ультрафильтрации. Для разделения использовали мембраны с пределом пропускания 1000 Да. Определение свободнорастворенного атразина в фильтрате осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с УФ-детектированием при 220 нм.

Связывающие свойства гумусовых кислот по отношению к атразину проводили с использованием выборки, состоящей преимущественно из препаратов почв, так как проблема загрязнения гербицидами наиболее актуальна для почвенных сред. Для расширения диапазона изучаемых свойств в выборку были включены и другие препараты. Всего в нее вошло 16 препаратов: 8 ГК, 3 ФК и 1 ГФК почв; 1 ГФК, 1 ГК и 1 РОВ торфа, 1 ГК угля.

Эксперименты по связыванию атразина гумусовыми кислотами проводили при следующих условиях: концентрация атразина C_A 10^{-5} М; концентрация гумусовых кислот $C_{ГФК} = (1.5-6.5) \times 10^{-4}$ кг С/л; pH 5.5; время взаимодействия – 24 ч. Константу связывания атразина гумусовыми кислотами находили как тангенс угла наклона зависимости $(1/\alpha+1)$ от концентрации гумусовых кислот. Типичные графики указанной зависимости для препаратов гумусовых кислот различных классов приведены на рис. 7.12.

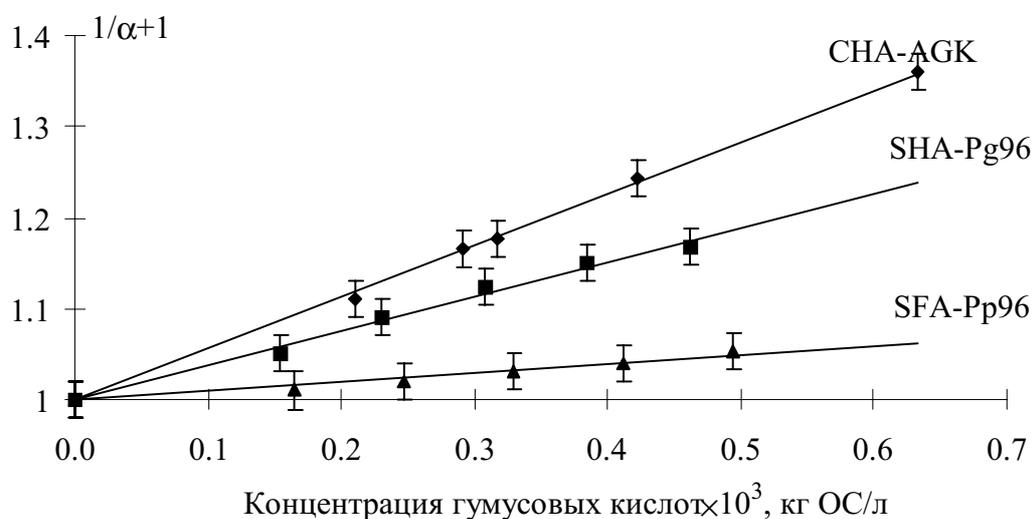


Рис. 7.12. Типичные графики зависимости $1/\alpha+1$ от концентрации гумусовых кислот. α – доля свободнорастворенного атразина ($n = 5$, $P = 0.95$).

Как видно из рис. 7.12, исследованные препараты гумусовых кислот обладали различной связывающей способностью по отношению к атразину. Об этом же свидетельствуют и полученные значения K_{OC} (табл. 7.7).

Константы связывания (K_{OC}) атразина гумусовыми кислотами
($n = 5$; $P = 0.95$)

Препарат	K_{OC} , л/кг ОС	Препарат	K_{OC} , л/кг ОС
ГФК торфа		ГК почв	
PHF-T494	370±20	SHA-Pw94	380±20
ГК торфа		SHA-Pw96	281±20
PHA-THTO	300±20	SHA-Pp96	180±10
РОВ торфа		SHA-Pg94	400±30
PDOM-TH	87±5	SHA-Pg96	380±30
ГФК почв		SHA-Gw94	580±40
SHF-Co94	44±30	SHA-Cm94	50±30
ФК почв		SHA-CtV94	40±20
SFA-Pw96	190±10	ГК углей	
SFA-Pp96	110±7	CHA-AGK	580±30
SFA-Pg96	280±20		

Рассчитанные константы связывания атразина гумусовыми кислотами находятся в пределах 90-580 л/кг С, что хорошо согласуется с существующими литературными данными [Grover and Hance, 1970; Brown and Flagg, 1981; Gamble and Khan, 1988; Wang et al., 1990]. Значения констант свидетельствуют о слабом сродстве гумусовых кислот к атразину: соответствующие константы связывания ПАУ (табл. 7.5) на три порядка выше, чем атразина.

Как видно из табл. 7.7, наибольшей связывающей способностью по отношению к атразину обладал препарат ГК угля, а наименьшей – ОВ водного экстракта торфа. Среди ряда почвенных препаратов наименьшие значения K_{OC} были получены для ФК, наибольшие – для ГК черноземов и промежуточные – для ГК П^Д. Полученные значения K_{OC} для трех пар ГК и ФК, выделенных из одной почвы, показывают, что ГК в целом обладают большим сродством к атразину, чем ФК. В тоже время большее сходство в связывающей способности наблюдали для ГК и ФК из одной почвы, чем для ГК или ФК из разных почв. Так ГК и ФК из огородной дерново-подзолистой почвы (SHA-Pg96 и SFA-Pg96) показали более высокую связывающую способность по сравнению с ГК и ФК, выделенными из дерново-подзолистой почвы под лесом (SHA-Pw96 и SFA-Pw96). ГК и ФК дерново-подзолистой полевой почвы (SHA-Pp96 и SFA-Pp96) обладали наименьшим сродством к атразину в ряду изученных дерново-подзолистых почв.

Полученные данные свидетельствуют о возрастании сродства гумусовых кислот к атразину по мере увеличения их ароматичности (максимальные значения K_{OC} найдены для ГК угля и чернозема), что подтверждается и результатами корреляционного анализа с дескрипторами структурно-группового состава, которые будут подробно обсуждены в Главе 8. Указанная тенденция хорошо согласуется с закономерностями, установленными для ПАУ. Следовательно, наиболее вероятным механизмом взаимодействия гумусовых кислот с атразином, как и в случае ПАУ, является гидрофобное связывание. Об этом свидетельствует и существенное большие значения констант связывания, найденные для высокогидрофобных ПАУ по сравнению с атразином.

Таким образом, выполнены систематические исследования по количественной оценке связывающих свойств гумусовых кислот по отношению к ПАУ и атразину. Определены константы связывания ПАУ и атразина для представительных выборок препаратов различного происхождения и фракционного состава, которые могут быть использованы в качестве прогнозируемых признаков при разработке моделей “строение – свойство”, а также для расчета форм существования ПАУ и атразина в природных средах. На основании характера зависимости констант связывания от гидрофобности органических экотоксикантов и ароматичности исследованных препаратов гумусовых кислот сделан вывод о гидрофобном механизме связывания гумусовых кислот с ПАУ и атразином.

7.3 Концепция константы детоксикации как количественной характеристики детоксицирующих свойств гумусовых кислот

Важнейшим экологическим последствием процессов связывания экотоксикантов гумусовыми кислотами является снижение концентрации свободнорастворенной, наиболее биологически активной формы экотоксиканта. Эффекты детоксикации, вызываемые присутствием гумусовых кислот, многократно описаны в литературе и подробно обсуждены в обзоре литературы (разделы 1.5.3 и 1.6.3). Однако количественная оценка детоксицирующих свойств гумусовых кислот оставалась нерешенной проблемой на момент постановки настоящих исследований. Получение таких оценок необходимо для разработки системы скрининга препаратов гумусовых кислот и для прогностического моделирования их детоксицирующих свойств.

Для количественной оценки детоксицирующих свойств гумусовых кислот был использован подход, являющийся оригинальной разработкой нашей рабочей группы. Его рассмотрение заслуживает особого внимания, так

как он во многом predetermined логику постановки соответствующих токсикологических экспериментов. Поэтому мы сочли необходимым предварить изложение результатов исследования детоксицирующих свойств гумусовых кислот подробным рассмотрением введенных для этой цели количественных параметров: коэффициента детоксикации D и константы детоксикации K_{OC}^D , определяемых из данных токсикологических экспериментов.

Основной трудностью при оценке детоксицирующих свойств гумусовых кислот является то, что помимо химического взаимодействия с ЭТ, приводящего к уменьшению концентрации его свободной формы, гумусовые кислоты оказывают собственное воздействие на биологический объект, используемый в качестве тест-организма. Так, наблюдаемое снижение токсичности ЭТ в присутствии гумусовых кислот может быть обусловлено как его связыванием в нетоксичные комплексы, так и стимулирующим действием гумусовых кислот. Поэтому для расчета детоксицирующей способности препаратов гумусовых кислот был введен особый показатель – коэффициент детоксикации D . Его подробное описание приведено в наших соответствующих публикациях [Perminova et al., 1996; Steinberg et al., 1999]. Достоинством данного показателя является то, что он отражает изменение уровня токсичности ЭТ в присутствии гумусовых кислот ($T_{ЭТ+ГФК}$) по сравнению с токсичностью ЭТ в их отсутствие ($T_{ЭТ}$), учитывая при этом возможное изменение тест-отклика под влиянием собственного воздействия гумусовых кислот. Принимая, что:

$$T_{ЭТ} = \frac{R_0 - R_{ЭТ}}{R_0} \quad (7.48)$$

и

$$T_{ЭТ+ГФК} = \frac{R_{ГФК} - R_{ЭТ+ГФК}}{R_{ГФК}} \quad (7.49),$$

где R_0 – тест-отклик в контроле (без ЭТ и ГФК);

$R_{ЭТ}$ – тест-отклик в присутствии ЭТ;

$R_{ГФК}$ – тест-отклик в присутствии ГФК;

$R_{ЭТ+ГФК}$ – тест-отклик в присутствии ЭТ и ГФК, получаем:

$$D = \frac{T_{ЭТ} - T_{ЭТ+ГФК}}{T_{ЭТ}} = 1 - \frac{T_{ЭТ+ГФК}}{T_{ЭТ}} \quad (7.50)$$

При условии, что чувствительность тест-организмов к собственному действию гумусовых кислот не изменяется в присутствии ЭТ, использование коэффициента D позволяет охарактеризовать детоксицирующий эффект гумусовых кислот, обусловленный только связыванием ЭТ в нетоксичные

комплексы, на фоне их стимулирующего воздействия на тест-объект. Поэтому зная зависимость коэффициента D от концентрации гумусовых кислот (т.н. кривую детоксикации), можно рассчитать константу детоксикации K_{OC}^D . Преимущество данного параметра при оценке детоксикации по сравнению с коэффициентом D состоит в том, что если последний позволяет получить точечную оценку детоксикации, то K_{OC}^D является характеристикой детоксицирующей способности гумусовых кислот во всем диапазоне концентраций. При этом его физический смысл аналогичен K_{OC} .

Для вывода уравнения данной константы запишем уравнение связывания ЭТ гумусовыми кислотами:



Тогда долю ЭТ, находящегося в свободном состоянии (α), можно выразить через соответствующую константу связывания:

$$\alpha = \frac{[\text{ЭТ}]}{[\text{ЭТ}] + [\text{ЭТ-ГФК}]} = \frac{1}{1 + C_{\text{ГФК}} \times K_{OC}} \quad (7.52)$$

Сделаем допущение, что токсичность раствора прямо пропорциональна концентрации ЭТ. Тогда токсичность в присутствии ЭТ запишется как:

$$T_{\text{ЭТ}} = k \times C_{\text{ЭТ}} \quad (7.53)$$

где k – коэффициент пропорциональности.

Токсичность ЭТ в присутствии гумусовых кислот аналогично можно записать как:

$$T_{\text{ЭТ+ГФК}} = k \times [\text{ЭТ}] \quad (7.54)$$

Подставляя (7.53) и (7.54) в уравнение (7.50), получаем:

$$D = 1 - \frac{[\text{ЭТ}]}{C_{\text{ЭТ}}} = 1 - \alpha \quad (7.55)$$

Выражая долю несвязанного ЭТ (α) через концентрацию гумусовых кислот на основании зависимости K_{OC} от α (1.26), получаем:

$$D = \frac{K_{OC}^D \times C_{\text{ГФК}}}{1 + K_{OC}^D \times C_{\text{ГФК}}} \quad (7.56)$$

Фигурирующую в данном уравнении константу, определяемую видом зависимости эффекта детоксикации от концентрации гумусовых кислот, мы назвали константой детоксикации – K_{OC}^D . Она будет эквивалентна константе химического связывания ЭТ-ГФК только в том случае, если величина эффекта детоксикации D зависит от единственного фактора – концентрации свободной формы ЭТ. На практике K_{OC}^D можно рассчитать путем аппроксимации экспериментальных зависимостей D от концентрации гумусовых кислот уравнением (7.56). Поэтому результаты всех токсикологических экспериментов представляли в виде соответствующих кривых детоксикации.

Использование данного интерпретационного аппарата предъявляло вполне конкретные требования к постановке экспериментов по детоксикации. Так, для расчета каждой точки на кривой детоксикации необходимо было измерить тест-отклик в четырех тест-системах: (1) контроль, (2) ЭТ при рабочей концентрации в отсутствие гумусовых кислот, (3) гумусовые кислоты при тестируемой концентрации в отсутствие ЭТ, (4) ЭТ (рабочая концентрация) в присутствии тестируемой концентрации гумусовых кислот.

В связи с изложенным, все дальнейшие эксперименты по детоксикации проводились в соответствии с описанными требованиями.

7.4 Исследование детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к Hg(II)

7.4.1 Выбор условий биотестирования для изучения детоксикации Hg(II) гумусовыми кислотами

В отличие от большинства других тяжелых металлов, ртуть практически не встречается в природных средах в форме свободного иона Hg^{2+} . Основные формы существования ртути (II) в отсутствие гумусовых кислот – $\text{Hg}(\text{OH})_2$ и HgCl_2 . При этом соотношение $\text{Hg}(\text{OH})_2:\text{HgCl}_2$ зависит от pH и концентрации хлорид-ионов (рис. 7.13).

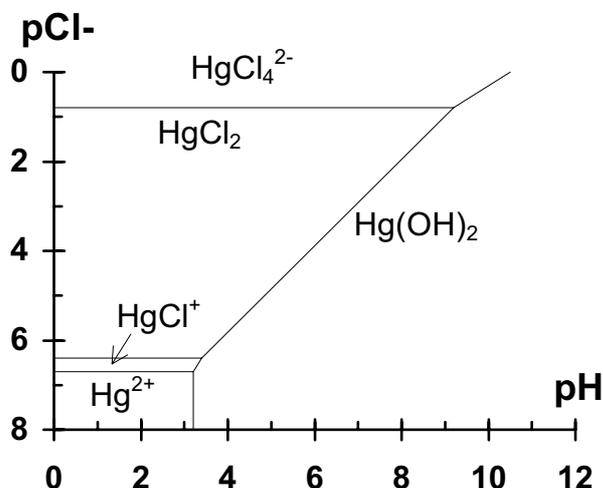


Рис. 7.13. Формы существования Hg(II) в зависимости от pH и концентрации хлорид-ионов.

Таким образом, токсическое действие могут оказывать свободный ион Hg^{2+} (что маловероятно, поскольку его доля в природных средах крайне незначительна), $\text{Hg}(\text{OH})_2$ или HgCl_2 , причем их токсическое действие может различаться [Mason et al., 1996]. Поэтому в первую очередь необходимо было установить, какая из вышеуказанных форм оказывает наибольшее токсическое действие, с тем, чтобы исследовать детоксицирующие свойства гумусовых кислот по отношению к этой форме.

Определение диапазонов токсичности $\text{Hg}(\text{OH})_2$ и HgCl_2 . Для исследования детоксицирующего действия гумусовых кислот по отношению к $\text{Hg}(\text{II})$ применялся метод альгологического тестирования. Тест-объектом служила одноклеточная водоросль *Chlorella pyrenoidosa*, выбор которой был обусловлен отработанностью соответствующей методики биотестирования [Полынов, 1992]. В качестве тест-функции использовали относительный выход переменной флуоресценции $R = F_v/F_m$, характеризующий долю поглощенной световой энергии, направляемую на фотосинтез. Время экспозиции составило 4 часа.

Тест-среды для изучения токсичности HgCl_2 и $\text{Hg}(\text{OH})_2$ готовили на основе среды Тамия (5 мМ KNO_3 и 1 мМ MgSO_4), варьируя pH и содержание KCl . Распределение $\text{Hg}(\text{II})$ по формам существования в тест-средах рассчитывали на основании литературных данных по соответствующим константам устойчивости [SCDB], усредненным и приведенным к ионной силе среды для биотестирования по уравнению Дэвиса (1.22) (табл. 7.8). В ходе токсикологического эксперимента pH несколько изменялся в результате жизнедеятельности водорослей. Поэтому распределение $\text{Hg}(\text{II})$ рассчитывали с учетом pH раствора в конце биотестирования.

Таблица 7.8

Среды для тестирования токсичности ртути (II)

№	Конц. KCl	pH в начале/конце тестирования	$\text{HgCl}_2:\text{Hg}(\text{OH})_2$ в конце тестирования	$[\text{Hg}^{2+}]/C(\text{Hg}^{2+})$
1	0	7.3 / 6.9-7.5	0 / 0	$1.6 \times 10^{-8} - 1.6 \times 10^{-9}$
2	0.01 М	6.4 / 5.9-6.8	7200-114	2.5×10^{-10}

Как видно из таблицы, в среде №1 основная форма ртути $\text{Hg}(\text{OH})_2$, в среде №2 – HgCl_2 . Доля свободного иона в обеих средах незначительна. Результаты альгологического тестирования обеих сред приведены на рис. 7.14.

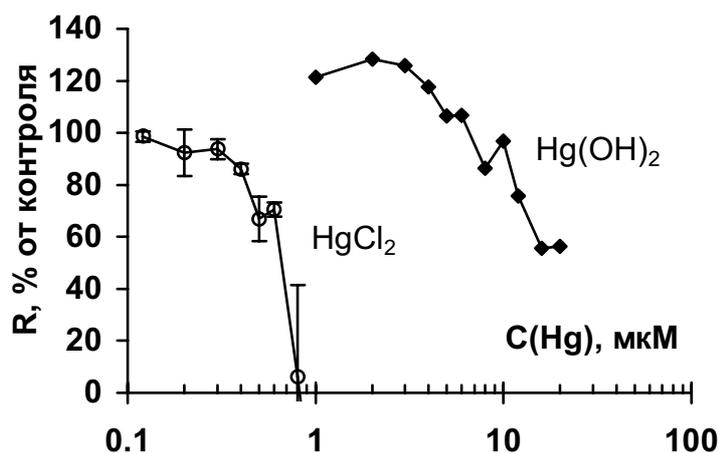


Рис. 7.14. Токсическое действие HgCl_2 и Hg(OH)_2 на водоросль *Chlorella pyrenoidosa*; для HgCl_2 приведены средние значения по двум измерениям.

Как видно из рис. 7.14, токсичность Hg(II) в обеих средах заметно различается. Соответствующие диапазоны токсичности приведены в табл. 7.9.

Таблица 7.9

Диапазоны токсичности Hg(OH)_2 и HgCl_2

Форма	Hg(OH)_2	HgCl_2
ЭК ₀ , мкМ Hg(II)	4	0.3
ЭК ₅₀ , мкМ Hg(II)	16	0.6
ЭК ₁₀₀ , мкМ Hg(II)	не достигнута	0.8

Как видно из табл. 7.9, для исследуемого тест-объекта HgCl_2 более, чем на порядок токсичнее, чем Hg(OH)_2 . Это говорит о том, что уровень токсичности среды преимущественно будет обусловлен содержанием HgCl_2 .

Указанное различие в токсическом действии HgCl_2 и Hg(OH)_2 может быть обусловлено либо сорбцией Hg(OH)_2 на стенках культиватора, сопровождающейся снижением его концентрации в тест-системе, либо различием токсического действия HgCl_2 и Hg(OH)_2 .

Для проверки данных предположений было изучено распределение Hg(II) между биомассой водоросли, средой для биотестирования и стенками культиватора. Для этого во всех трех указанных компонентах тест-системы определяли содержание Hg(II) по окончании токсикологического эксперимента. Полученные данные по распределению Hg(II) в тест-системах приведены на рис. 7.15 и рис. 7.16.

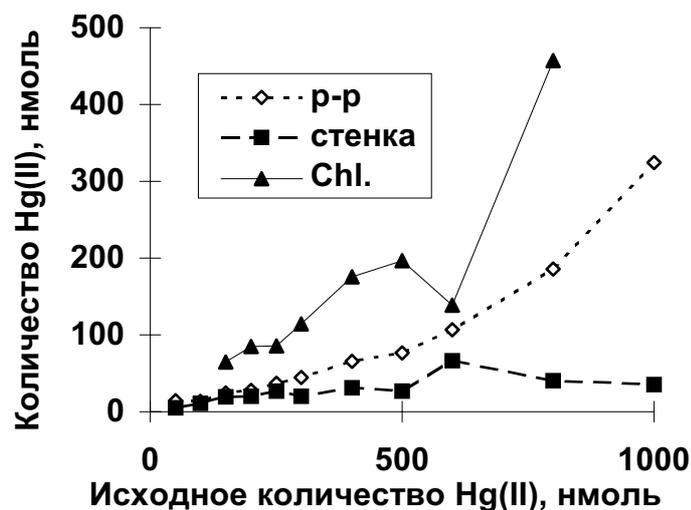


Рис. 7.15. Распределение ртути между компонентами тест-системы в среде с $\text{Hg}(\text{OH})_2$.

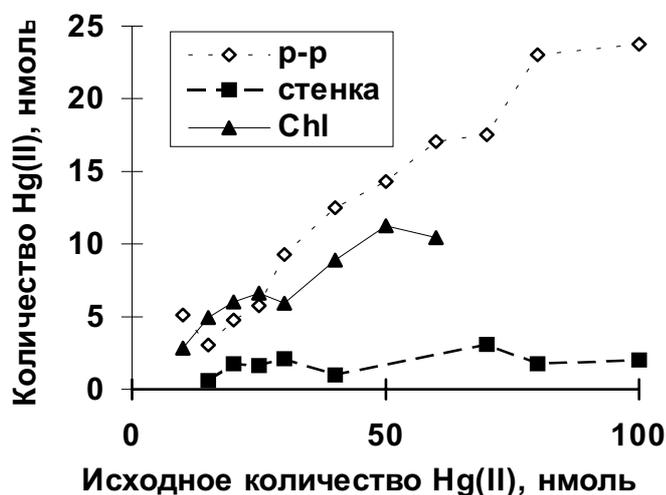


Рис. 7.16. Распределение ртути между компонентами тест-системы в среде с HgCl_2 .

Из приведенных данных видно, что в обеих тест-средах на стенках сорбируется не более 10% от введенного $\text{Hg}(\text{II})$, поэтому различие в токсичности $\text{Hg}(\text{OH})_2$ и HgCl_2 не может быть обусловлено различной сорбцией на стенках культиватора. Кроме того, накопление $\text{Hg}(\text{II})$ в биомассе водоросли существенно зависело от наличия хлорид-ионов в среде. Так, в отсутствие хлоридов две трети всей обнаруженной $\text{Hg}(\text{II})$ находилось в биомассе хлореллы, в то время как в присутствии хлоридов эта величина составляла менее половины. Следует заметить, что для HgCl_2 при ЭК_0 (0.3 мкМ) хлорелла накапливала 0.1% ртути от сухой массы. В то же время для $\text{Hg}(\text{OH})_2$, при ЭК_0 (3 мкМ) водоросль накапливает 2% ртути от сухой массы. Это говорит о том, что различие в токсическом действии HgCl_2 и

$\text{Hg}(\text{OH})_2$ обусловлено различным уровнем токсичности этих соединений для исследуемого тест-объекта.

При сопоставлении количества введенной и найденной $\text{Hg}(\text{II})$, было обнаружено, что как в среде с $\text{Hg}(\text{OH})_2$, так и с HgCl_2 в ходе токсикологического эксперимента происходят потери ртути. В первом случае они составляют $35 \pm 10\%$, во втором $40 \pm 10\%$, то есть недоопределенное количество $\text{Hg}(\text{II})$ в обеих средах совпадает с точностью до ошибки эксперимента. Специальных исследований о причинах этих потерь не проводили, однако можно предполагать, что в условиях эксперимента часть $\text{Hg}(\text{II})$ восстанавливается водорослью до элементарной и выдувается при барботировании воздуха через тест-систему.

Таким образом показано, что токсичность HgCl_2 для водоросли *Chlorella pyrenoidosa* на порядок выше, чем $\text{Hg}(\text{OH})_2$. Этот факт важен для предсказания токсичности $\text{Hg}(\text{II})$ в водных средах, поскольку показывает, что токсичность одних и тех же концентраций $\text{Hg}(\text{II})$ может различаться в зависимости от состава природных вод.

Для получения достоверной зависимости токсического эффекта HgCl_2 от концентрации HgCl_2 необходимо было учесть колебания чувствительности водоросли в разных экспериментах. С этой целью измеренный токсический эффект нормировали таким образом, чтобы при определенной концентрации токсиканта (в дальнейшем будем называть ее рабочей) значение относительной токсичности составляло 1, а в отсутствие токсиканта 0. Для этого относительную токсичность выражали следующим образом:

$$T = \frac{R_0 - R_t}{R_0 - R_b}, \quad (7.57)$$

где R_t – тест-отклик в присутствии токсиканта, R_b – тест-отклик в присутствии рабочей концентрации токсиканта, R_0 – тест-отклик в контроле.

Для HgCl_2 в качестве рабочей была выбрана концентрация 0.8 мкМ (ЭК_{100}). Полученная зависимость T от концентрации HgCl_2 показана на рис. 7.17.

Полученную зависимость аппроксимировали с помощью линейной функции ($r = 0.94$). При построении аппроксимирующей функции для всего диапазона концентраций HgCl_2 от 0 до рабочей учитывали, что токсикант ниже некой пороговой концентрации не проявлял токсического действия, т.е. $T = 0$. В результате аппроксимирующая функция для описания токсического действия HgCl_2 в диапазоне концентраций от 0 до 0.8 мкМ имеет следующий вид:

$$T = \max(0, 2 \times C(\text{HgCl}_2) - 0.6) \quad (7.58)$$

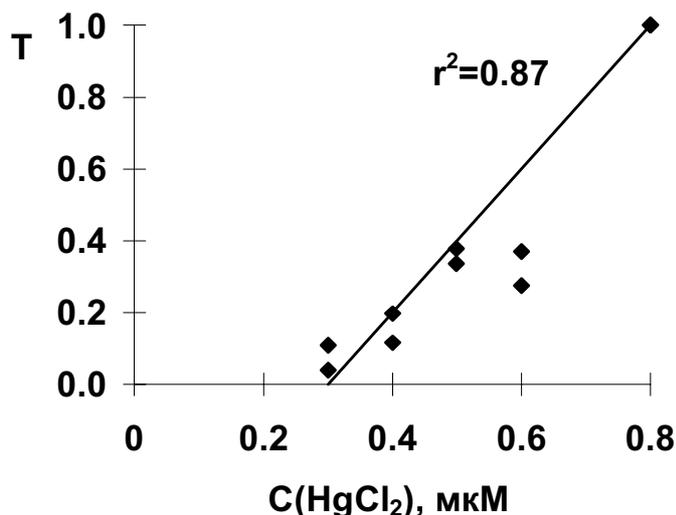


Рис. 7.17. Зависимость относительной токсичности HgCl_2 от концентрации.

7.4.2 Определение констант детоксикации Hg(II) гумусовыми кислотами

Оценку детоксицирующих свойств гумусовых кислот проводили по отношению к наиболее токсичному HgCl_2 . Эксперименты по детоксикации проводили в среде, содержащей 0.01 М KCl и рабочую концентрацию HgCl_2 0.8 мкМ (ЭК_{100} (рис. 7.17)). Диапазон концентраций гумусовых кислот составлял 5-25 мг/л, что характерно для поверхностных вод [Лапин и Красюков, 1991]. В ходе экспериментов измеряли интенсивность фотосинтеза водоросли в условиях постоянной (0.8 мкМ) концентрации HgCl_2 и различных концентраций гумусовых кислот. Чтобы количественно охарактеризовать эффект детоксикации, рассчитывали коэффициент D в соответствии с (7.50). Для этого схема проведения токсикологических экспериментов включала в себя наряду с контрольным вариантом (без HgCl_2 и гумусовых кислот) варианты с внесением HgCl_2 и HgCl_2 +гумусовые кислоты. Вариант внесения гумусовых кислот без HgCl_2 опускали в связи с указанным выше отсутствием собственного действия гумусовых кислот на хлореллу в выбранных условиях эксперимента.

В экспериментах по детоксикации использовали ту же выборку препаратов, что и при изучении комплексообразующих свойств, которая состояла из 24 препаратов различного происхождения и фракционного состава: 2 РОВ вод, 5 ГФК вод, 3 ГФК донных отложений, 2 ГК угля, 6 ГФК торфа, 3 ГК почв и 3 ГФК почв.

Проведенные эксперименты показали, что подавляющее большинство препаратов гумусовых кислот обладало детоксицирующим действием по

равновесную концентрацию Cl^- и РСЦ приравнивали к общей (поскольку хлорид-ионы находятся в большом избытке). Равновесную концентрацию HgРСЦ определяли из уравнения материального баланса (в предположении, что вся ртуть распределяется между комплексами с гумусовыми кислотами и хлоридом):

$$[\text{HgРСЦ}] = C(\text{Hg}) - [\text{HgCl}_2] \quad (7.62)$$

Подставляя (7.62) и (7.61) в (7.60), получаем формулу для расчета константы лигандного обмена из экспериментальных данных:

$$K(\text{РСЦ} / \text{Cl}^-) = \frac{(C(\text{Hg}) - [\text{HgCl}_2]) \cdot C^2(\text{Cl})}{[\text{HgCl}_2] \cdot C(\text{РСЦ})} \quad (7.63)$$

Согласно приведенной схеме для каждой экспериментальной точки рассчитывали константы устойчивости комплексов гумусовых кислот с $\text{Hg}(\text{II})$ из данных по детоксикации $K^D(\text{РСЦ})$, их логарифмировали, усредняли и корректировали по уравнению Дэвиса на ионную силу среды для биотестирования (0.019 моль, корректирующий фактор – 0.49). Полученные значения $K^D(\text{РСЦ})$ приведены в (табл. 7.10). Сопоставление $K^D(\text{РСЦ})$ с $K(\text{РСЦ})$, найденными адсорбционным методом (табл. 7.2), показывает, что они совпадают по порядку величины, при этом значимая корреляция между ними отсутствует.

Полученные данные можно рассматривать как свидетельство того, что связывание $\text{Hg}(\text{II})$ в нетоксичные гуматы является основным механизмом детоксикации $\text{Hg}(\text{II})$ гумусовыми кислотами. Важным следствием данного заключения является то, что в этом случае значения $K(\text{РСЦ})$ можно использовать для оценки токсичности $\text{Hg}(\text{II})$ в разных водоемах. Подробно эта тема обсуждается в соответствующей публикации [Жилин и Перминова, 2000].

Для получения дополнительной количественной оценки процесса детоксикации $\text{Hg}(\text{II})$ гумусовыми кислотами было изучено их влияние на накопление $\text{Hg}(\text{II})$ в биомассе водорослей в присутствии хлоридов. При этом ожидалось, что накопление $\text{Hg}(\text{II})$ в биомассе водорослей будет, как и в случае токсического эффекта, определяться равновесной концентрацией HgCl_2 .

Для этой цели изучали влияние гумусовых кислот на распределение $\text{Hg}(\text{II})$ в системе хлоридсодержащий раствор – биомасса водорослей. При измерении содержания $\text{Hg}(\text{II})$ в тест-растворе и биомассе водоросли по окончании токсикологического эксперимента было обнаружено, что во всех случаях гумусовые кислоты препятствовали накоплению ртути.

Логарифмы констант детоксикации и бионакопления Hg(II)
гумусовыми кислотами различных классов (n = 3, P = 0.95)

Препарат	lgK ^D (РСЦ)	lgK ^B (РСЦ)	Препарат	lgK ^D (РСЦ)	lgK ^B (РСЦ)
РОВ природных вод			ГФК торфа		
ADOM-SMu4	13.8±0.1	14.1±0.2	PHF-T494	14.3±0.1	14.3±0.5
ADOM-SMu8	14.2±0.1	14.0±0.3	PHF-T594	14±1	14.5±0.1
ГФК природных вод			PHF-T694	13.5±0.2	14.3±0.2
AHF-MMu7	–	14.2±0.1	PHF-TН94	13.8±0.5	14.3±0.1
AHF-RND11	–	13.5±0.6	PHF-TMu4	14.0±0.1	14.4±0.1
AHF-RND14	13.7±0.2	13.9±0.3	PHF-TT94	13±3	13±2
AHF-SSH1	–	14.04±0.05	ГК почв		
AHF-SMu8	13.80±0.04	13.6±0.7	SHA-Gw94	14.4±0.2	14.64±0.08
ГФК донных отложений			SHA-Pw94	14.3±0.3	14.9±0.3
BHF-RLuh	13±6	14.3±0.5	SHA-PwN	–	14.1±0.5
BHF-RND13	13.9±0.5	14.4±0.4	ГФК почв		
BHF-SMu2	14.4±0.3	14.6±0.4	SHF-Co94	13.8±0.1	14.3±0.2
ГК углей			SHF-TMu12	14.0±0.1	15.3±0.1
CHA-AGK	13.9±0.1	14.0±0.4	SHF-PMu9	14±2	14.8±0.4
CHA-ALD	13.4±0.2	14.1±0.4			

Данный факт позволил рассчитать константы устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II) из данных по ее бионакоплению. Считая, что накопление Hg(II) в биомассе водорослей, как и в случае токсического эффекта, определяется равновесной концентрацией HgCl₂ (т.е. гуматы не поглощаются хлореллой), причем соответствующая зависимость линейна (т.е. Hg(II) занимает незначительную долю центров связывания на водоросли) можно записать, что:

$$BCF/BCF_0 = 1 - \alpha, \quad (7.64)$$

где BCF – фактор биоконцентрирования Hg(II) в присутствии гумусовых кислот;

BCF₀ – то же в отсутствие гумусовых кислот;

α – доля Hg(II), связанного в комплекс HgРСЦ.

Тогда константы устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II) можно найти из “кривых бионакопления” – зависимости отношения BCF/BCF₀ (аналог отношению токсичностей – эффекту детоксикации D) от концентрации гумусовых кислот, аппроксимируя их функцией (7.56).

С помощью указанной процедуры находится величина $K(PCl/Cl)/[Cl^-]^2$. Учитывая, что хлорид-ионы находятся в большом избытке по отношению к ртути, равновесную концентрацию хлоридов можно приравнять к общей, откуда найти константу лигандного обмена и пересчитать ее на константу устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II) аналогично тому, как это делалось для токсикологических констант.

Полученные значения констант обозначали $lgK^B(PCl)$ (табл. 7.10). Они также хорошо согласуются с константами, найденными адсорбционным методом, причем между $lgK(PCl)$ и $lgK^B(PCl)$ наблюдается значимая корреляция ($r = 0.67$ при $n = 22$). Это еще раз подтверждает гипотезу о том, что основным механизмом детоксикации ртути(II) гумусовыми кислотами является ее связывание в нетоксичные комплексы, которые не поглощаются водорослью. Отсутствие тесной корреляции между константами детоксикации и $lgK(PCl)$ может быть связано с проявлением собственного воздействия гумусовых кислот на тест-объект, которое, однако, несопоставимо по величине с детоксицирующим эффектом, вызываемым снижением концентрации свободной формы токсиканта.

7.5 Исследование детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к ПАУ

Для исследования детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к ПАУ был использован метод биотестирования. В качестве тест-объекта была выбрана водная блоха *Daphnia magna*, тест-откликом служила активность питания дафний. Предварительные эксперименты с другим тест-объектом – одноклеточной водорослью *Chl. pyrenoidosa* – показали его непригодность для подобных исследований ввиду низкой чувствительности к токсическому действию ПАУ. Применение методики биотестирования с использованием в качестве тест-объекта *D. magna* [Полынов, 1992] позволило регистрировать токсический эффект ПАУ уже на первые сутки экспозиции.

При проведении тестирования дафнии (5-7 особей) помещали в раствор ПАУ, приготовленной на предварительно отстаиванной и пропущенной через фильтр “Родничок” водопроводной воде. После суточной экспозиции в стаканчик добавляли хлореллу и измеряли изменение флуоресценции хлорофилла водоросли в процессе ее выедания дафниями. На основании полученных данных рассчитывали скорость питания дафний согласно [Полынов, 1992].

В соответствии с предложенной концепцией получения количественных характеристик детоксицирующих свойств гумусовых кислот (глава 7.3), все схемы проведения токсикологических экспериментов включали в себя наряду с контрольным вариантом (без ПАУ и гумусовых кислот) варианты с

внесением ПАУ и препаратов гумусовых кислот, а также варианты с внесением гумусовых кислот.

Основные результаты данной части работ подробно изложены в соответствующих публикациях [Перминова и др., 1994; Перминова и др., 1995; Perminova et al., 1996; Steinberg et al., 2000; Perminova et al., 2000a; Perminova et al., 2000b].

7.5.1 Выбор условий биотестирования для изучения детоксикации ПАУ гумусовыми кислотами

Для определения диапазонов токсичности Py, Flt и An готовили серии растворов каждого ПАУ с концентрациями в диапазоне: $(1-5) \times 10^{-7}$, $(0.5-7) \times 10^{-7}$ и $(0.2-1.7) \times 10^{-7}$ М, соответственно. Токсичность в присутствии ПАУ ($T_{\text{ПАУ}}$) оценивали в соответствии с уравнением (7.48). Концентрационные зависимости токсичности в присутствии Py, Flt и An приведены на рис. 7.19.

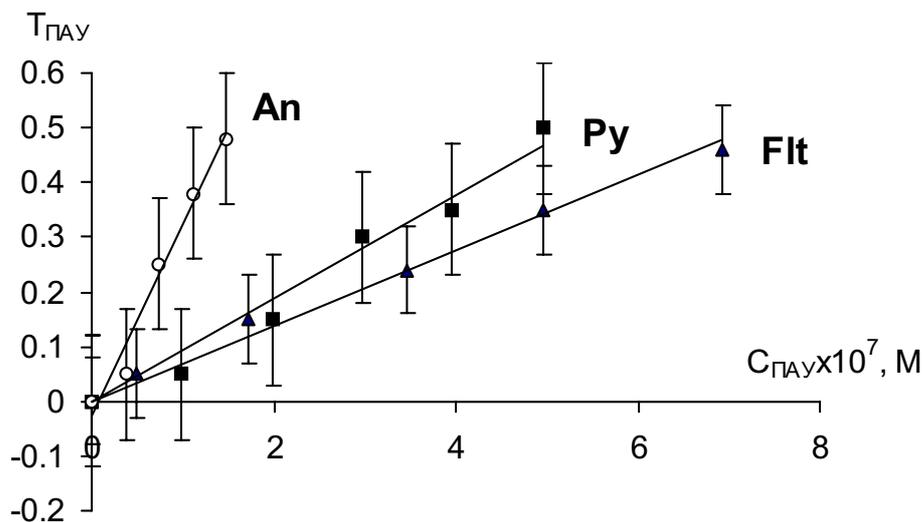


Рис. 7.19. Концентрационные зависимости токсичности Py, Flt и An (тест-объект *D. magna*).

Как видно из рис. 7.19, экспериментальные концентрационные зависимости для всех исследованных ПАУ в выбранном диапазоне концентраций могут быть удовлетворительно аппроксимированы линейной зависимостью, при этом значения r во всех случаях превышали 0.97. Это свидетельствует о том, что получаемые данные токсикологических экспериментов могут быть использованы для расчета констант детоксикации в соответствии с уравнением (7.56).

Максимальная токсичность модельных ПАУ по отношению к *D. magna* наблюдалась при самых высоких концентрациях ПАУ, а именно, 0.5, 0.7 и 0.17 μM для Py, Flt и An, соответственно. Данные концентрации вызывали уменьшение активности питания дафний на $54 \pm 8\%$, $52 \pm 7\%$ и $50 \pm 9\%$ ($P = 0.95$,

$n = 3$), для Py, Flt и An. В дальнейшем именно они были выбраны для проведения экспериментов по определению констант детоксикации ПАУ гумусовыми кислотами.

7.5.2 Определение констант детоксикации ПАУ гумусовыми кислотами

Эксперименты по детоксикации проводили в отстоянной водопроводной воде, пропущенной через угольный фильтр ($pH = 7.1$). Рабочие концентрации ПАУ составляли 0.5, 0.7 и 0.17 μM для Py, Flt и An, соответственно. Концентрацию гумусовых кислот устанавливали в диапазоне 1-25 мг С/л.

Для проведения экспериментов по детоксикации ПАУ использовали ту же выборку препаратов, что и в экспериментах по связыванию. Она включала в себя 26 препаратов гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава (8 ГК почв, 5 ФК почв, 1 ГК почв, 7 ГК торфа, 4 ГК вод, 2 ГК угля).

На основании четырех серий измерений – тест-отклик (1) в контроле, (2) в присутствии рабочей концентрации ПАУ, (3) в присутствии исследуемой концентрации гумусовых кислот и (4) в присутствии ПАУ и гумусовых кислот рассчитывали коэффициент D для каждой тестируемой концентрации. Типичные кривые детоксикации для трех модельных ПАУ на примере препарата почв приведены на рис. 7.20.

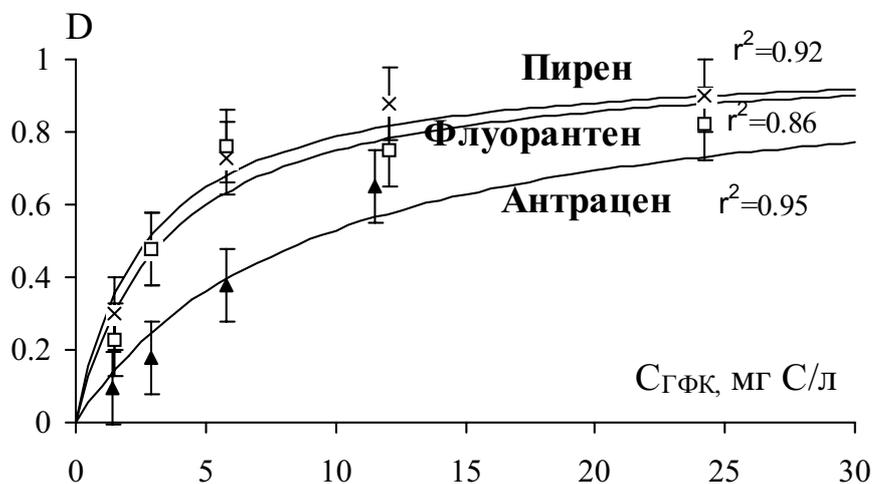


Рис. 7.20. Кривые детоксикации модельных ПАУ гумусовыми кислотами на примере ГК почв (SHA-Pw94). Точками обозначены экспериментальные данные, сплошными линиями – расчетные кривые.

Как видно из рис. 7.20, для всех трех ПАУ присутствие гумусовых кислот вызывает эффект детоксикации, который возрастает по мере увеличения концентрации гумусовых кислот. Для расчета констант детоксикации экспериментальные кривые аппроксимировали уравнением (7.56), примеры соответствующих расчетных кривых приведены на рис. 7.20. Следует отметить, что использование уравнения (7.56) позволяет аппроксимировать экспериментальные кривые с довольно высоким уровнем статистической значимости. Рассчитанные значения K_{OC}^D для Py, Flt и An и соответствующие стандартные отклонения приведены в табл. 7.11.

Таблица 7.11

Константы детоксикации ПАУ гумусовыми кислотами различного происхождения и фракционного состава ($n = 5$, $P = 0.95$)

Препарат	$K_{OC}^D \times 10^{-5}$, л/кг С			Препарат	$K_{OC}^D \times 10^{-5}$, л/кг С		
	Py	Flt	An		Py	Flt	An
ГК и ФК почв				ГФК торфа			
SHA-Pw94	4±1.4	5±1.3	6±2.4	PHF-T1H94	4±1.1	3±1.2	–
SHA-PwN	4±1.2	7±3.4	6±1.9	PHF-T4H94	3.7±0.6	5±1	1±0.5
SHA-Pp94	3.0±0.8	4±1.5	4±1.3	PHF-T5H94	2±0.8	4.4±2.5	1.2±0.2
SHA-Pg94	2.1±0.5	2.1±0.2	2±0.6	PHF-T6H94	3.6±0.6	3±0.8	2±0.6
SHA-Gw94	4±1.3	4±2.2	4±1.1	PHF-T7H94	4±2.6	6.0±0.3	–
SHA-Gp94	4.0±0.8	5±0.8	4±1.2	PHF-TH94	4±1.7	4±0.8	1.8±0.5
SHA-Cm94	6±3.1	8±4.8	6±2.4	PHF-TTL94	4±2.7	4±1	0.3±0.1
SHA-CtV94	5±1.6	6±3.5	6±2.5	ГФК природных вод			
SFA-Pw94	<0.3	<0.3	<0.3	AHF-RMC	3±1.1	2±0.5	<0.3
SFA-Pp94	<0.3	<0.3	<0.3	AHF-RMX	1.1±0.3	0.4±0.1	<0.3
SFA-Pg94	<0.3	<0.3	<0.3	AHF-RND3	1.9±0.5	2.5±0.5	<0.3
SFA-Gw94	<0.3	<0.3	<0.3	AHF-SSh1	1.9±0.7	2±0.6	<0.3
SFA-CtV94	3.0±0.8	2.2±0.6	<0.3	ГК угля			
ГФК почв				CHA-ALD	6±3.4	6±2.8	5±1.3
SHF-Co94	3.6±0.6	3.4±0.4	2±0.5	CHA-AGK	6±0.6	5±0.8	–

Как видно из приведенных данных, максимальное детоксицирующее действие гумусовых кислот наблюдается для Py и Flt. В случае An детоксицирующий эффект гумусовых кислот минимален. Различие величин K_{OC}^D модельных ПАУ, по видимому, обусловлено их различной гидрофобностью: $\lg K_{OW} = 4.45$ для An и $\lg K_{OW} \cong 5.0$ для Py и Flt. Полученные закономерности по детоксицирующей способности гумусовых кислот по отношению к различным ПАУ согласуются с данными других авторов по биоаккумуляции различных ПАУ дафниями в присутствии гумусовых кислот [Landrum et al., 1987; Kukkonen and Oikari, 1991; McCarthy and Jimenez, 1985; Haitzer et al., 1999].

Сопоставление препаратов различных классов показало, что ГК черноземов и ГК угля обладают наибольшей детоксицирующей способностью по отношению к Ру, Flt и An. Близкими к ним значениями K_{OC}^D характеризовались ГК дерново-подзолистых и серых лесных почв. Для торфяных ГФК значения K_{OC}^D ниже, в среднем, на 30-40% по сравнению с ГК почв. Относительно низкие константы наблюдаются в случае взаимодействия водных ГФК с Ру и Flt. Для An значения констант оказались ниже минимально определяемой величины K_{OC}^D (0.3×10^5 л/кг С), рассчитанной с использованием 3s критерия [Doerffel, 1990]. Константы связывания Ру, Flt и An в случае ФК почв также были ниже минимально определяемой величины. Исключение составили ФК чернозема для Ру и Flt ($(3.0 \pm 0.8) \times 10^5$ и $(2.2 \pm 0.6) \times 10^5$ л/кг С, соответственно). Полученные результаты позволяют расположить препараты гумусовых кислот по величине их детоксицирующей способности по отношению к ПАУ в следующий ряд:

ГК угля, ГК чернозема >> ГК П^Д и Л почв > ГФК торфа > ГФК вод \cong
ФК чернозема >> ФК П^Д и Л почв

Следует отметить, что аналогичный ряд был получен для связывающей способности гумусовых кислот по отношению к ПАУ.

Для сопоставления двух введенных количественных параметров детоксицирующей способности гумусовых кислот – K_{OC}^D и D – был проведен корреляционный анализ соответствующих блоков данных для исследованной выборки препаратов гумусовых кислот. Коэффициенты корреляции между D, определенным при концентрации гумусовых кислот 6 мг С/л, и K_{OC}^D составили 0.90, 0.81 и 0.84 для Ру, Flt и An, соответственно, что свидетельствует об их тесной взаимосвязи и позволяет использовать как тот, так и другой параметр для оценки детоксицирующей способности гумусовых кислот.

7.5.3 Сравнение связывающих и детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к ПАУ

Для выяснения механизма детоксикации ПАУ гумусовыми кислотами полученные величины K_{OC}^D были сопоставлены с K_{OC} , найденными из экспериментов по тушению флуоресценции. Между параметрами была установлена довольно тесная корреляция: $r = 0.77, 0.86$ и 0.85 для Ру, Flt и An, соответственно. Однако по абсолютной величине K_{OC}^D превосходили соответствующие K_{OC} в несколько раз: (2.6 ± 0.3) , (4.6 ± 0.6) и (6 ± 1.4) для Ру, Flt и An, соответственно ($P = 0.95$, $n = 26$), а сравнение полученных значений с использованием t-критерия показало значимое различие K_{OC} и K_{OC}^D ($P = 0.95$).

Установленные различия в абсолютных значениях констант K_{OC} и K_{OC}^D могут быть обусловлены (1) разными условиями проведения экспериментов по связыванию и детоксикации, что могло повлиять на величину констант, так

как обе константы являются условными; (2) невыполнением предположения о том, что токсичностью обладает только свободная форма ПАУ, либо о том, что чувствительность *D. magna* к токсическому действию свободной формы ПАУ не изменяется в присутствии гумусовых кислот.

Согласно гипотезе (2) детоксикация ПАУ обусловлена непосредственным воздействием гумусовых кислот на тест-объект, но тогда детоксицирующий эффект должен зависеть не от способности гумусовых кислот связывать ПАУ, а от их физиологической активности. Однако наличие тесной корреляционной взаимосвязи между K_{OC} и K_{OC}^D свидетельствует о том, снижение токсичности ПАУ вызвано уменьшением концентрации свободной формы ПАУ. Иными словами, детоксикация ПАУ обусловлена главным образом образованием нетоксичных аддуктов ПАУ-ГФК.

Для проверки гипотезы (1) принимали во внимание, что в случае определения K_{OC} с помощью метода тушения флуоресценции для приготовления растворов ПАУ и гумусовых кислот использовали бидистиллированную воду; тогда как токсикологические эксперименты проводили в отстоянной водопроводной воде, предварительно пропущенной через фильтр “Родничок”. Поэтому было проведено сравнение констант связывания Ап ГФК торфа, которые определяли с использованием растворов, приготовленных на бидистиллированной, дистиллированной и водопроводной воде, пропущенной через фильтр “Родничок”. Полученные результаты приведены на рис. 7.21.

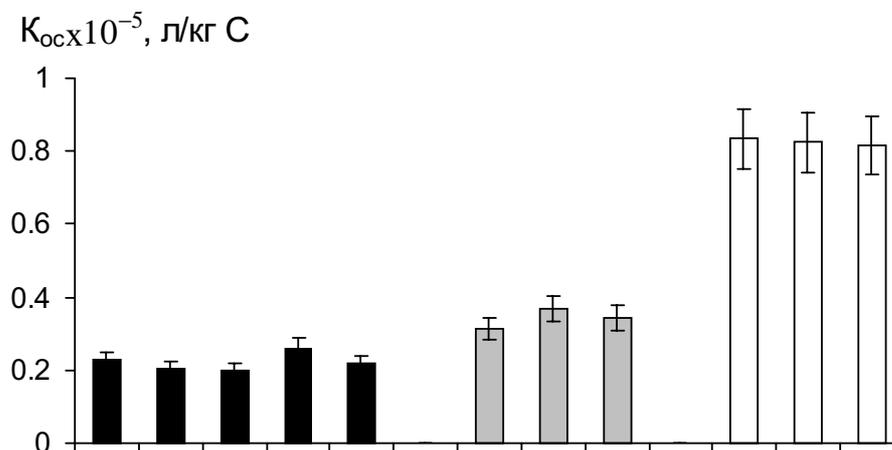


Рис. 7.21. Константы связывания Ап ГФК торфа (PHF-T6H94), определенные в различных условиях.

■ – бидистиллированная вода, ▨ – дистиллированная вода, □ – водопроводная вода, пропущенная через “Родничок”.

Как видно из рис. 7.21, значения $K_{OC} A_n$ существенно зависят от качества использованной воды. Наибольшее связывание A_n наблюдается в водопроводной воде, пропущенной через фильтр (0.8×10^5 л/кг С), наименьшее – в бидистиллированной воде (0.25×10^5 л/кг С). При этом значение $K_{OC} A_n$, найденное при использовании водопроводной воды, близко по значению к K_{OC}^D (1.3×10^5 л/кг С), полученной в условиях проведения токсикологических экспериментов.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что основным процессом, определяющим детоксикацию ПАУ гумусовыми кислотами, является связывание ПАУ в нетоксичные аддукты.

7.6 Исследование детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к атразину

Для исследования детоксицирующей способности гумусовых кислот по отношению к атразину в качестве тест-объекта была выбрана одноклеточная водоросль *Chlorella vulgaris*. В связи с тем, что атразин является специфическим ингибитором фотосинтеза, в качестве тест-отклика использовали параметры кривой индукции флуоресценции, характеризующие интенсивность фотосинтеза хлорофилла в культуре водоросли. В соответствии с предложенной концепцией получения количественных характеристик детоксицирующих свойств гумусовых кислот (глава 7.3), все схемы проведения токсикологических экспериментов включали в себя наряду с контрольным вариантом (без атразина и гумусовых кислот) варианты с внесением атразина и препаратов гумусовых кислот, а также варианты с внесением гумусовых кислот.

Результаты данной части работ подробно изложены в соответствующих публикациях [Перминова и др., 1994; Perminova et al., 1996; Куликова и др., 1997; Kulikova et al., 2000; Perminova et al., 2000].

7.6.1 Выбор условий биотестирования для изучения детоксикации атразина гумусовыми кислотами

Детоксицирующие свойства гумусовых кислот оценивали на основании изменения интенсивности фотосинтеза хлорофилла в культуре водоросли в присутствии постоянной концентрации атразина и переменной – гумусовых кислот. Тест-откликами служили два параметра кривой индукции флуоресценции: F_i/F_m и F_v/F_m . Показатель F_i/F_m характеризует содержание переносчиков электронов (в долях единицы), не способных принимать электрон вследствие каких-либо нарушений. Значение показателя F_v/F_m характеризует общее количество акцепторов электронов в электрон-транспортной цепи (ЭТЦ), которые могут принимать электрон, и является

характеристикой эффективности реакции фотосинтеза [Krause and Weis, 1991].

При внесении атразина – специфического ингибитора фотосинтеза – величина F_i/F_m мгновенно возрастает, так как происходит блокирование части переносчиков электрона. В тоже время изменение показателя F_v/F_m которое может быть вызвано и влиянием токсиканта общего действия, наступает только через некоторый интервал времени. Поэтому при измерении F_i/F_m применяли нулевую экспозицию, а F_v/F_m измеряли после 3 часовой экспозиции.

Учет мешающего действия гумусовых кислот. Так как гумусовые кислоты обладают собственной флуоресценцией, то необходимо было учесть ее влияние на величины показателей F_i/F_m и F_v/F_m . Для этой цели проводили серию экспериментов, в которых кривые индукции флуоресценции хлорофилла водоросли регистрировали непосредственно после добавления гумусовых кислот (нулевая экспозиция). При этом параллельно регистрировали также фоновую флуоресценцию гумусовых кислот. Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что показатель F_v/F_m хлорофилла в клетках водоросли при внесении гумусовых кислот в концентрациях 1-50 мг С/л существенно снижается, если его расчет производить непосредственно из регистрируемых кривых индукции флуоресценции, что равноценно кажущейся “токсичности” раствора гумусовых кислот.

Однако причиной наблюдаемой “токсичности” гумусовых кислот является влияние их собственной флуоресценции на регистрируемый показатель F_v/F_m . Действительно, если гумусовые кислоты обладают собственной флуоресценцией F , то отношение F_v/F_m будет рассчитываться как:

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_v}{F_m + F} \quad (7.65)$$

При наличии собственной флуоресценции гумусовых кислот (F_m+F) всегда больше F_m и значения рассчитываемого таким способом показателя F_v/F_m получаются заниженными. Поэтому для корректного расчета F_v/F_m из кривых индукции флуоресценции хлорофилла предварительно вычитали кривую фоновой флуоресценции гумусовых кислот. Для этого было создано оригинальное программное обеспечение (автор – Д.В. Ковалевский).

Во избежание эффекта внутреннего фильтра, проявляющегося при высоких концентрациях гумусовых кислот [Паркер, 1972], их рабочие концентрации не превышали 50.0 и 5.0 мг С/л для экспериментов с нулевой и 3-часовой экспозицией, соответственно.

Выбор рабочей концентрации атразина. Токсичность атразина по отношению к водоросли изучали при времени экспозиции 0 и 3 часа. В первом случае в качестве тест-функции использовали F_i/F_m , во втором – F_v/F_m . Как уже указывалось, значения показателя F_i/F_m увеличиваются при возрастании концентрации атразина. Поэтому мы сочли нецелесообразным приводить диапазон токсичности в координатах “концентрация атразина – F_i/F_m , проценты от контроля” и использовали абсолютные значения показателя F_i/F_m (рис. 7.22). Значение показателя F_i/F_m , соответствующее 50% угнетению фотосинтеза, рассчитывали как половину разности между его максимальным и минимальным значениями. ЭК₅₀ атразина составила 1.1×10^{-6} М. При этом при минимальной концентрации гумусовых кислот соотношение атразин : гумусовые кислоты (С) в расчете на массу составляло 1 : 4

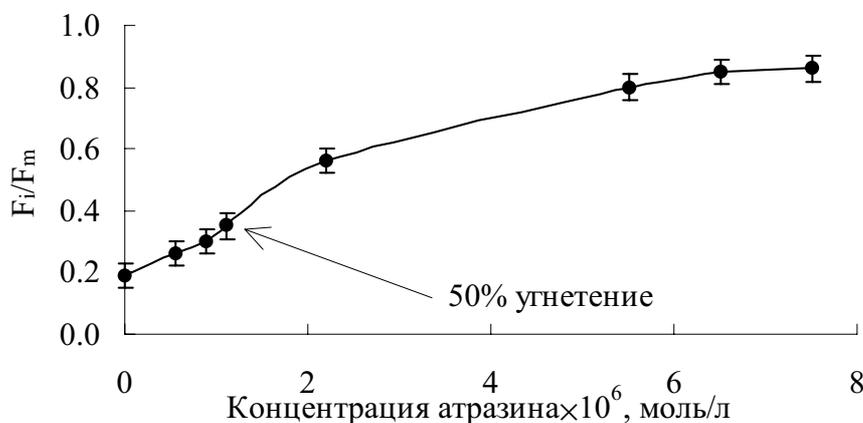


Рис. 7.22. Диапазон токсичности атразина для водоросли *Chlorella vulgaris*. Нулевая экспозиция.

В экспериментах с 3-часовой экспозицией в качестве тест-отклика использовали показатель F_v/F_m . Диапазон токсичности атразина при 3-часовой экспозиции водоросли приведен на рис. 7.23.

В предварительных экспериментах было установлено, что при использовании концентрации атразина, вызывающей 50% снижение показателя F_v/F_m (1.5×10^{-6} М), внесение гумусовых кислот вплоть до концентрации 50 мг С/л детоксицирующего действия не оказывало. При этом максимальное соотношение (масс. С) атразин : гумусовые кислоты составляло 1 : 1.8, т.е. превышало таковое для экспериментов с нулевым временем экспозиции. Увеличить концентрацию гумусовых кислот было нельзя из-за мешающего влияния на регистрацию флуоресценции хлорофилла, поэтому для установления соотношения атразин : гумусовые кислоты, равного 1 : 4, уменьшили концентрацию атразина. В качестве рабочей нами была выбрана концентрация атразина 6.7×10^{-7} М, приводящая к 25% угнетению фотосинтеза *Chlorella vulgaris*.

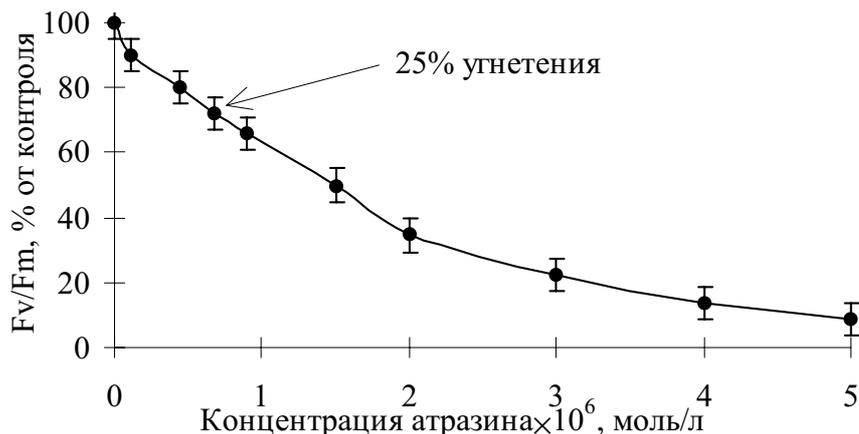


Рис. 7.23. Диапазон токсичности атразина для водоросли *Chlorella vulgaris*. Время экспозиции 3 часа.

7.6.2 Определение констант детоксикации атразина гумусовыми кислотами

Для исследования детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к атразину проводили серию экспериментов с 3-х часовым временем экспозиции с внесением возрастающих количеств гумусовых кислот (0,6–5,0 мг С/л) при постоянной концентрации атразина ($1,5 \times 10^{-6}$ М), выбранной на основании установленного диапазона токсичности.

Для проведения экспериментов по детоксикации атразина использовали выборку тех же препаратов гумусовых кислот, что и для связывания (8 ГК, 3 ФК и 1 ГФК почв; 1 ГФК, 1 ГК и 1 РОВ торфа, 1 ГК угля), вводя в нее еще три препарата – ГФК почвенного раствора. Их выделению уделялось особое внимание в работе (Глава 2). Предполагалось, что эти препараты, представляющие собой самую низкомолекулярную фракцию почвенных гумусовых кислот, могут обладать высокой физиологической активностью.

Проведенные эксперименты показали, что гумусовые кислоты снижали токсичность атразина во всем исследованном диапазоне концентраций. На основании полученных данных (зависимости показателя F_v/F_m от концентрации гумусовых кислот) согласно (7.56) для каждой использованной концентрации гумусовых кислот были рассчитаны значения коэффициента D . Типичные кривые детоксикации приведены на рис. 7.24.

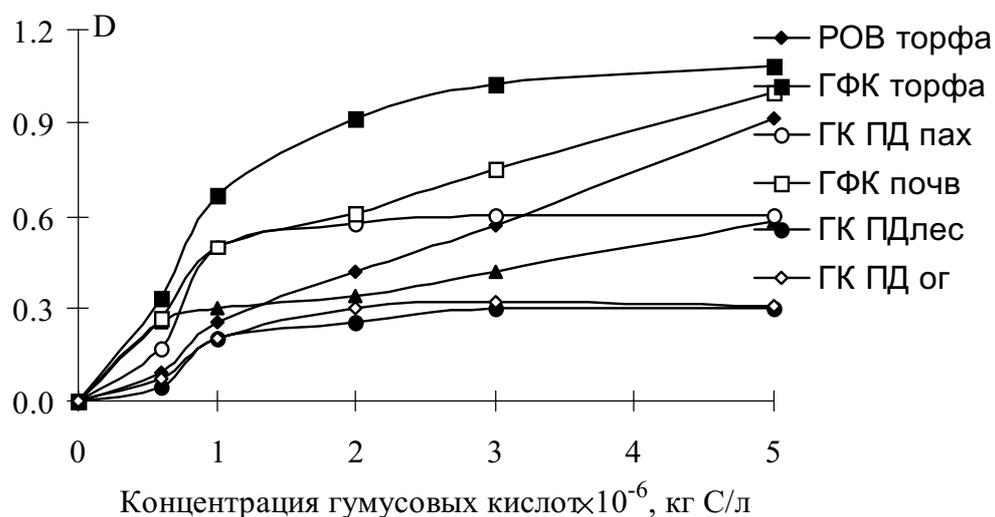


Рис. 7.24. Кривые детоксикации атразина различными гумусовыми кислотами.

На основании полученных зависимостей коэффициента D от концентрации гумусовых кислот были рассчитаны константы детоксикации K_{OC}^D атразина гумусовыми кислотами (табл. 7.12).

Таблица 7.12

Константы детоксикации атразина гумусовыми кислотами различного происхождения и фракционного состава ($n = 9$, $P = 0.95$)

Препарат	K_{OC}^D , л/кг С	Препарат	K_{OC}^D , л/кг С
ГФК торфа		ГК почв	
PHF-T494	$(8.9 \pm 1.4) \times 10^5$	SHA-Pw94	$(1.2 \pm 0.3) \times 10^5$
PHF-TH94	$(5.7 \pm 0.9) \times 10^5$	SHA-Pw96	$(5.6 \pm 0.7) \times 10^5$
PHF-TT94	$(1.3 \pm 0.2) \times 10^6$	SHA-Pp94	$(1.4 \pm 0.4) \times 10^5$
РОВ торфа		SHA-Pp96	$(5.5 \pm 0.7) \times 10^5$
PDOM-TH	$(5.8 \pm 0.8) \times 10^5$	SHA-Pg94	$(1.0 \pm 0.2) \times 10^4$
PDOM-TT	$(4.5 \pm 0.7) \times 10^5$	SHA-Gw94	$(2.0 \pm 0.3) \times 10^5$
ФК почв		SHA-Gw96	$(1.4 \pm 0.2) \times 10^5$
SFA-Pw96	$(5.0 \pm 0.7) \times 10^4$	SHA-Cm94	$(2.9 \pm 0.4) \times 10^5$
SFA-Pp96	$(5.0 \pm 0.8) \times 10^4$	SHA-CtV94	$(3.7 \pm 0.6) \times 10^5$
SFA-Pg94	$(1.4 \pm 0.2) \times 10^5$	ГФК почвенного раствора	
SFA-Pg96	$(6.0 \pm 0.8) \times 10^4$	SDHF-Pw96	$(2.1 \pm 0.3) \times 10^6$
SFA-Gw94	$(5.3 \pm 0.8) \times 10^5$	SDHF-Pp96	$(1.8 \pm 0.2) \times 10^6$
ГФК почв		SDHF-Pg96	$(1.9 \pm 0.2) \times 10^6$
SHF-Co94	$(7.1 \pm 1.1) \times 10^5$	ГФК природных вод	
ГК углей		АНF-RMX2	$(2.9 \pm 0.5) \times 10^5$
CHA-AGK	$(7.4 \pm 1.1) \times 10^5$		

Как видно из табл. 7.12, ГФК водных вытяжек почв обладали наибольшей детоксицирующей способностью по отношению к атразину. Близкими к ним значениями K_{OC}^D характеризовались ГК угля, чернозема и некоторых П^D почв. ОВ водного экстракта торфов и препараты ФК почв практически не снижали токсичность атразина.

7.6.3 Сравнение связывающих и детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к атразину

Сравнение полученных K_{OC}^D атразина с K_{OC} , определенными с использованием физико-химических методов (табл. 7.12 и 7.7, соответственно), показало, что K_{OC}^D в среднем на два-три порядка превышали K_{OC} , при этом коэффициент корреляции между ними составлял 0.12. При этом анализ блоков данных по свойствам гумусовых кислот и константами связывания и детоксикации атразина выявил наличие тесной взаимосвязи K_{OC}^D с содержанием низкомолекулярной фракции (<5 КДа – предел проницаемости клеточных мембран [Del Agnola et al., 1986]; коэффициент корреляции составил 0.93. В то время для K_{OC} наиболее тесная корреляция наблюдалась с содержанием ароматических фрагментов (C_{Ar}) в гумусовых кислотах.

Следовательно, сравнение величин K_{OC} и K_{OC}^D указывает на то, что связывание атразина гумусовыми кислотами не может служить основным фактором, определяющим величину детоксикации. По-видимому, в условиях внесения атразина преобладающим фактором является стимулирующее действие гумусовых кислот, проявляющееся только при неблагоприятных условиях среды, которое обсуждалось выше (раздел 1.6.3). Данная гипотеза подтверждается и результатами экспериментов по влиянию гумусовых кислот на состояние фотосинтетического аппарата водорослей в условиях воздействия других негативных факторов среды – пониженной температуры.

Так, в ходе проведения токсикологических экспериментов было установлено, что при оптимальной температуре культивирования водоросли (35°C) гумусовые кислоты не обладали физиологической активностью по отношению к хлорелле. В то же время выраженное стимулирующее действие гумусовых кислот отмечалось при проведении экспериментов с 3-часовой экспозицией в неблагоприятных условиях культивирования хлореллы. Так, заметное увеличение показателя F_v/F_m наблюдалось при внесении гумусовых кислот у хлореллы, выращиваемой при пониженной температуре (25°C вместо 35°C). Результаты для двух препаратов приведены на рис. 7.25. Аналогичные данные были получены и для ряда других исследованных препаратов (SHA-Pw96, SHA-Pp96, SHA-Pg96, SHA-CtV94, SHA-Gw94).

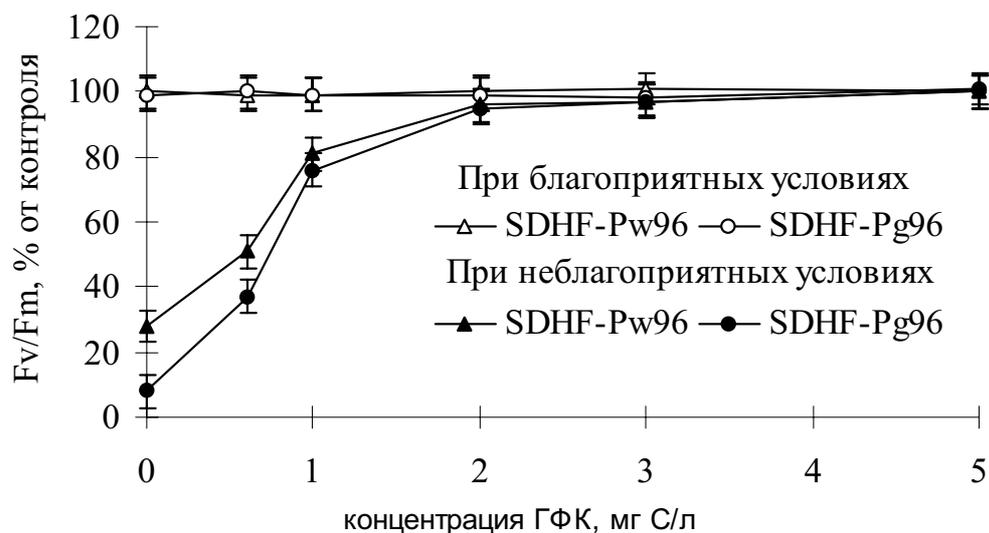


Рис. 7.25. Воздействие гумусовых кислот на фотосинтетическую активность *Chlorella vulgaris* при пониженной (25°C) и нормальной (35°C) температурах культивирования. Время экспозиции – 3 часа.

Подобные эффекты могут служить подтверждением известного тезиса о способности гумусовых кислот повышать общую неспецифическую сопротивляемость организмов, сформулированного Христовой с сотрудниками на основе многочисленных опытов с растениями [Христева и др., 1968]. Возможным механизмом, объясняющим стимулирующее воздействие гумусовых кислот при неблагоприятных условиях среды, является увеличение проницаемости клеточных мембран как реакция на действие стрессора – в наших экспериментах, при внесении атразина или снижении температуры. Наличие тесной корреляции между K_{oc}^D и содержанием в гумусовых кислотах низкомолекулярной фракции (<5 КДа) свидетельствует в пользу данного предположения.

Для установления конкретного механизма детоксикации атразина гумусовыми кислотами (например, определение специфических сайтов действия гумусовых кислот) необходимо проведение дополнительных экспериментов, включающих детальное исследование физиологической активности гумусовых кислот, а также возможность их поступления в тест-организмы.

Таким образом, в результате выполненного комплекса экспериментов систематически исследованы связывающие и детоксицирующие свойства гумусовых кислот по отношению к Hg(II), ПАУ и атразину для представительных выборок гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава. На основании применения концепции

комплексообразования/связывания для описания процессов детоксикации тяжелых металлов и органических экотоксикантов гумусовыми кислотами предложен способ количественной оценки детоксицирующих свойств гумусовых кислот с помощью констант детоксикации. Единый методологический подход для оценки связывающих и детоксицирующих свойств гумусовых кислот использован впервые. На основании сравнения констант связывания и детоксикации сделан вывод о комплексообразовании (связывании) как основном механизме детоксикации Hg(II) и ПАУ гумусовыми кислотами и о принципиально иной природе их детоксицирующего действия по отношению к атразину. Сформирован обширный массив признаков свойств – констант связывания, устойчивости комплексов и детоксикации, что позволило перейти к завершающему этапу работы – получению прогностических моделей “строение-свойство”.

Глава 8. ПРОГНОЗ СВОЙСТВ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЕСКРИПТОРОВ СОСТАВА

В результате выполнения предыдущего блока исследований были созданы все необходимые предпосылки для решения важной теоретической и практической задачи – разработки прогностических моделей “состав – свойство”. Создание таких моделей может служить теоретическим базисом для разработки системы скрининга гумусовых кислот, основанного на определении их состава. Это позволит осуществлять целевой поиск препаратов, обладающих максимальными связывающими и/или детоксицирующими свойствами по отношению к различным экотоксикантам, не проводя экспериментов по связыванию или детоксикации. Появление таких моделей способствовало бы расширению сферы применения природного гуминового сырья (уголь, торф, сапропель) в целях рекультивации загрязненных сред, а также явилось бы необходимой предпосылкой для разработки лекарственных препаратов на основе гуминовых веществ.

Спецификой полученного в работе массива данных является высокая размерность матрицы дескрипторов состава (число столбцов > 20) и сравнимое с ней число препаратов в выборке (число строк 16-26 в зависимости от количества найденных констант связывания). Создание прогностических моделей с использованием таких массивов данных требует применения методов, позволяющих снизить размерность матрицы независимых переменных, в нашем случае – дескрипторов состава.

Для этой цели использовали метод множественной регрессии (МР), вводя ограничение на количество членов в уравнении регрессии и предусматривая выбор оптимальных дескрипторов путем их автоматического перебора (автор алгоритма и программы – А. В. Кудрявцев), и методы многокомпонентного анализа – регрессии на главных компонентах (РГК) и дробного метода наименьших квадратов (ДМНК). Оба метода позволяют снизить размерность матрицы исходных данных, разлагая ее на компоненты, не снижая при этом количество исходных дескрипторов. В методе РГК разложение исходной матрицы проводят только с учетом ее внутренней структуры [Дубров и др., 2000]. В методе ДМНК осуществляется совместное разложение как матрицы дескрипторов, так и прогнозируемых свойств [Geladi and Kowalski, 1986, Gunst and Maston, 1980]. Это повышает надежность получаемой прогностической модели [Lindberg et al, 1983].

В дальнейшей работе использовали все три метода. На выходе все они дают прогностическую модель, которая представляет собой линейную (МР,

РГК и ДМНК) или нелинейную (МР) функциональную зависимость прогнозируемого свойства от дескрипторов.

8.1 Корреляционная взаимосвязь дескрипторов состава и прогнозируемых свойств

Расчет прогностических моделей предваряли оценкой наличия корреляционных взаимосвязей между дескрипторами состава, набор которых для всех выборок был стандартным и включал все три уровня дескрипторов (за исключением выборки для ПАУ, где набор дескрипторов был дополнен за счет ϵ^*), и прогнозируемыми свойствами – константами связывания и детоксикации Hg(II), ПАУ (Py, Flt, An): и атразина гумусовыми кислотами.

Проведение корреляционного анализа показало, что тесные корреляционные взаимосвязи между константами устойчивости комплексов Hg(II) с гумусовыми кислотами и интегральными дескрипторами состава всех уровней отсутствуют.

Для констант связывания и детоксикации ПАУ наблюдалось наличие тесной корреляционной взаимосвязи с прямыми и косвенными показателями содержания ароматических фрагментов в составе гумусовых кислот (C_{Ar} , ΣC_{Ar} , Н/С, ϵ^*). Пример такой корреляционной зависимости для констант связывания ПАУ приведен на рис. 8.1.

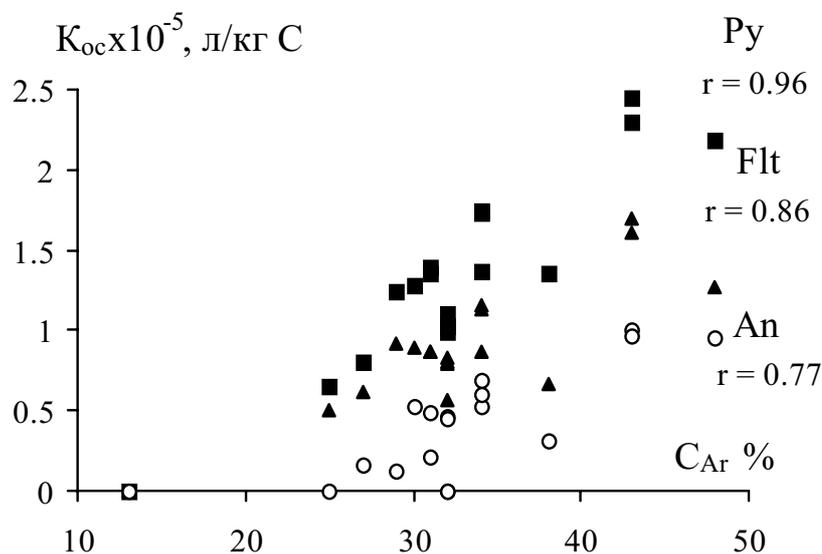


Рис. 8.1. Корреляционное поле для пары переменных “ ΣC_{Ar} – K_{OC} ” для выборки из 19 препаратов, использованной в экспериментах по связыванию ПАУ.

Особо следует отметить, что указанная зависимость наблюдалась для всех трех ПАУ, и для обоих типов констант – связывания и детоксикации. Наиболее тесной она была для наиболее гидрофобных Py и Flt. Полученные результаты хорошо согласуются с данными работ [Gauthier et al, 1987; Chin et

al, 1997], где авторами показано наличие тесной корреляции между содержанием ароматического углерода в гумусовых кислотах и их сродством к ПАУ.

Корреляционная взаимосвязь двух косвенных показателей ароматичности гумусовых кислот – H/C и ϵ^* – с константами связывания P_u , F_{lt} и A_n была существенно слабее, чем для ^{13}C ЯМР-дескриптора. Значения коэффициентов корреляции для P_u , F_{lt} и A_n составили 0.85, 0.84, 0.76 и 0.66, 0.74, 0.55 для H/C и ϵ^* , соответственно. Все зависимости являются значимыми при $P = 0.95$.

Корреляционное поле для K_{OC} всех исследованных ПАУ и M_w гумусовых кислот приведено на рис. 8.2. Как видно из представленных данных, явной тенденции увеличения степени сродства гумусовых кислот к ПАУ по мере возрастания M_w не наблюдалось ни для одного из трех ПАУ. Гумусовые кислоты с M_w ниже 10000 Да характеризовались весьма слабым сродством к ПАУ.

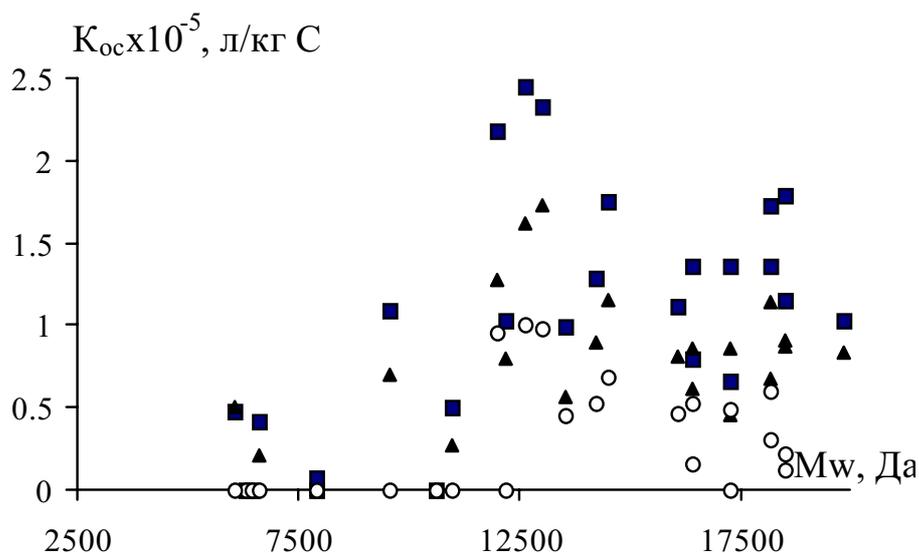


Рис. 8.2. Корреляционное поле для пары переменных “ M_w - K_{OC} ” для полной выборки из 26 препаратов, использованной в экспериментах по связыванию ПАУ (■ P_u , ▲ F_{lt} , ○ A_n).

Для оценки устойчивости полученных корреляционных взаимосвязей между константами связывания ПАУ и различными дескрипторами ароматичности ($\sum C_{Ar}/\sum C_{Alk}$, $\sum C_{Ar}$, C_{Ar} , H/C , ϵ^*) гумусовых кислот и их M_w , была осуществлена процедура кросс-валидации. Эта часть работ подробно изложена в соответствующей публикации [Perminova et al, 1999]. Ее суть заключалась в следующем: исходную выборку препаратов (полная – 26 и охарактеризованная методом спектроскопии ЯМР ^{13}C – 19 препаратов) разбивали на непересекающиеся подмножества, сгруппированные по

сходству источника происхождения и/или фракционного состава. Указанные подмножества включали: 8 препаратов ГФ торфа (ГК+ФК), 8 ГК и 5 ФК почв. Одна из выборок была сформирована из 5 препаратов, не вошедших ни в одно из подмножеств (ГФК почв, 2 ГК угля, 2 ГФК вод) и обозначена как ГФК*. Полученные зависимости между K_{oc} Py и указанными дескрипторами гумусовых кислот приведены на рис. 8.3. Аналогичные результаты были получены для Flt и An.

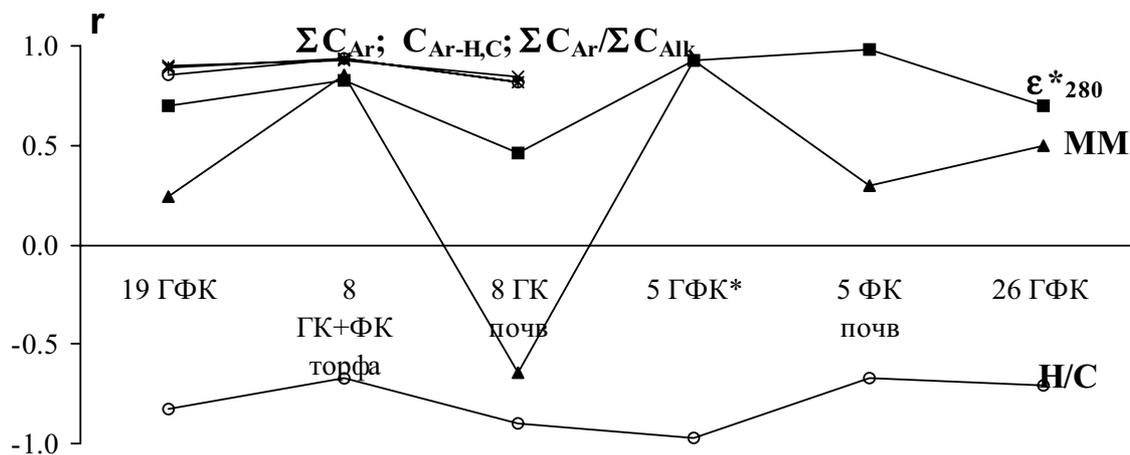


Рис. 8.3. Зависимость коэффициента корреляции, характеризующего взаимосвязь между K_{oc} пирена и исследуемыми дескрипторами, от состава выборки препаратов гумусовых кислот.

Как видно из представленных данных, наибольшей устойчивостью характеризовалась корреляционная взаимосвязь между K_{oc} и ^{13}C ЯМР дескрипторами (C_{Ar} , ΣC_{Ar} , $\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$) гумусовых кислот. Довольно высокая устойчивость наблюдалась и для соотношения H/C и ϵ^* . Наиболее чувствительным дескриптором к изменению состава выборки препаратов гумусовых кислот оказалась M_p . Как видно из рисунка, корреляция между K_{oc} и M_p является значимой только для выборок из 8 препаратов торфяных ГФК, 5 ГФК* и 8 ГК почв. Причем в двух первых случаях корреляция прямая, а для ГК почв – обратная. Следовательно, M_p можно использовать для прогноза сродства к ПАУ только для гумусовых кислот аналогичных по происхождению и/или фракционному составу.

Полученные зависимости имеют очевидный физический смысл, свидетельствуя о ведущей роли гидрофобных взаимодействий в процессах связывания и детоксикации ПАУ гумусовыми кислотами: чем больше содержание ароматических фрагментов, тем выше гидрофобность макромолекул гумусовых кислот и выше их сродство к гидрофобным молекулам ПАУ.

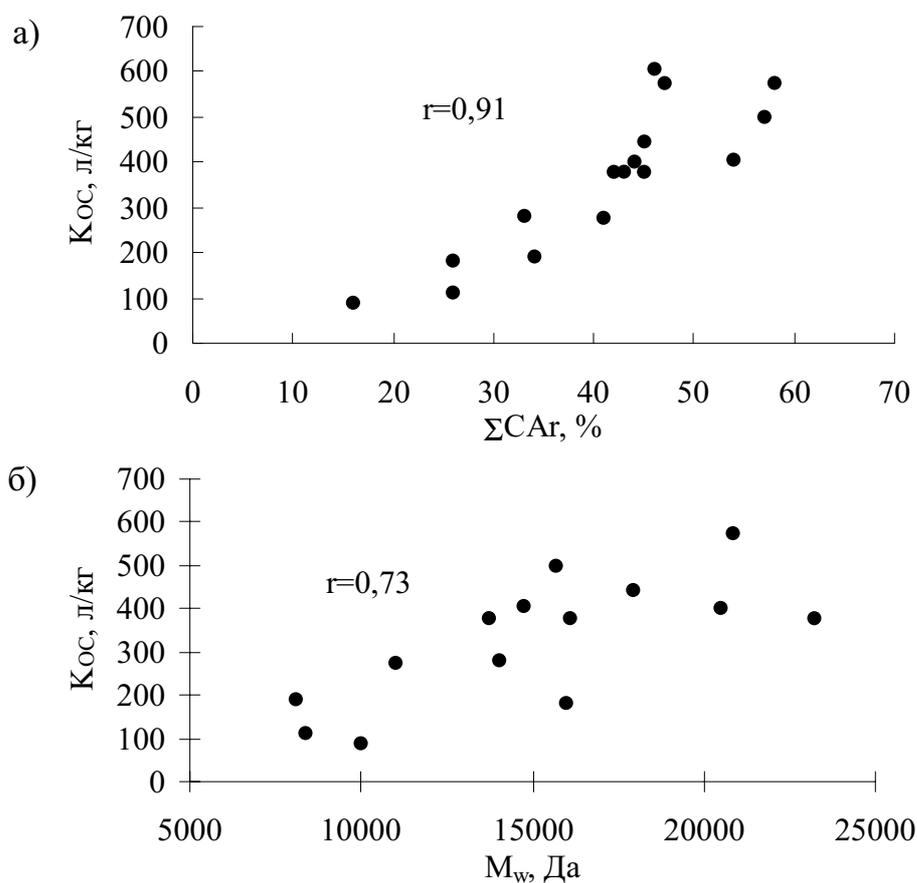


Рис. 8.4. Корреляционное поле для пары переменных “ $\Sigma C_{Ar} - K_{OC}$ ” (а) и “ $M_w - K_{OC}$ ”.(б) для выборки из 16 препаратов, использованной в экспериментах по связыванию атразина.

Наличие наиболее тесной корреляции между K_{OC} и содержанием углерода в составе ароматических фрагментов было установлено и для атразина (рис. 8.4), что может трактоваться как проявление действия сходного с ПАУ механизма связывания – гидрофобного. Для K_{OC} атразина также наблюдалась и значимая (при $P = 0.95$) корреляционная взаимосвязь с M_w гумусовых кислот. Однако в отличие от ПАУ, для K_{OC}^D атразина корреляция с содержанием ароматических фрагментов отсутствовала. Эти константы не имели значимой корреляции ни с одним из интегральных дескрипторов состава. Однако тесно коррелировали с содержанием низкомолекулярных фракций (<5000 Да – предела проницаемости клеточных мембран [Del Agnola et al., 1986] в образце гумусовых кислот ($r = 0.93$). Полученные данные могут свидетельствовать о различии механизмов связывания и детоксикации атразина гумусовыми кислотами.

Как было показано в Главе 7, в случае атразина детоксикация обусловлена стимулирующим действием гумусовых кислот на тест-объект, приводящим к усилению его резистентности к химическим стрессорам. Данный эффект неоднократно описывался в литературе для высших растений [Христева, 1973] Однако механизм его до сих пор не ясен. Существенный

прогресс в этой области может быть достигнут с помощью установления корреляционных соотношений “строение – детоксицирующая способность” и “строение – физиологическая активность” гумусовых кислот.

Для описания конкретных типов взаимосвязей между дескрипторами состава и связывающими/детоксицирующими свойствами гумусовых кислот использовали методы регрессионного анализа.

8.2 Прогностические модели, полученные методом множественной регрессии

Одно из основных требований, которое предъявляет метод МР к калибровочной выборке, используемой для расчета прогностической модели, – это существенное превышение количества прогнозируемых признаков (известных констант связывания/детоксикации) над числом независимых переменных (дескрипторов состава) [Geladi and Kowalski, 1986]. Принимая во внимание размерность матрицы интегральных дескрипторов состава, в виде которой записывается информация о строении каждого препарата гумусовых кислот ($n > 20$), оптимальный объем выборки должен был бы составлять 50-60 препаратов. Однако в связи с трудоемкостью формирования обширных выборок препаратов это требование весьма сложно реализовать на практике. Каждый из полученных нами массивов прогнозируемых свойств содержал 15-25 значений, что не позволяло удовлетворить сформулированное выше условие.

Для решения указанной дилеммы использовали вариант метода МР с ограничением на количество членов в регрессии (не больше четырех), но при этом предусматривали поиск оптимальных наборов дескрипторов путем перебора. Для этого нами был реализован алгоритм МР (автор – А.В. Кудрявцев), позволяющий проводить автоматический перебор всех возможных сочетаний дескрипторов (в том числе комбинированных – произведения и отношения исходных дескрипторов) с ограничением на число членов в полиномах (до 4-х исходных и 2 комбинированных дескриптора). Для расчетов моделей задавали полиномиальный вид уравнения регрессии:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n \quad (8.1)$$

где y – признак свойства, x_i – i -й дескриптор, в качестве которого могут выступать как исходные величины, так и их комбинации (x_1x_2 , x_1/x_2 , $x_1x_2^2$ и т.д.). Значения коэффициентов b_i рассчитывали по методу МНК.

На выходе модели отбирали 10 лучших полиномов. Качество моделей оценивали с помощью параметров R^2 и Q^2 , характеризующих, соответственно, описательную и прогностическую способность. R^2 представляет собой долю объясненной дисперсии и рассчитывался традиционно:

$$R^2 = 1 - s_r^2/s_t^2 \quad (8.2)$$

где s_r^2 – остаточная (необъясненная в рамках данной модели) дисперсия, а s_t^2 – общая дисперсия описываемого свойства.

Чем ближе r^2 к 1, тем лучше модель описывает имеющиеся данные, но может при этом плохо предсказывать данные, которые не использовались при ее построении. Если разделить имеющуюся выборку препаратов (признаки их свойств и дескрипторы) на обучающую и контрольную выборки, то для характеристики предсказывающей способности можно рассчитать R^2 для контрольной выборки, что будет более адекватной оценкой предсказывающей способности модели.

Однако далеко не всегда имеется возможность выделить контрольную выборку, особенно при работе с выборками малых объемов. В то же время, чем больше препаратов использовано при построении модели, тем лучше ее качество. Поэтому альтернативным методом оценки прогностической способности моделей является расчет Q^2 в результате кросс-валидации (перекрестного оценивания) [Krzanowski, 1987; Geladi and Kowalski, 1986a]. Для этой цели рассчитывают модель, используя весь набор препаратов. Затем исключают один или несколько препаратов, пересчитывают модель, предсказывают значения свойств для исключенных препаратов и считают дисперсию между предсказанным и известным свойством. Данную процедуру повторяют, исключая из исходного набора следующий препарат. Полученную таким образом среднюю непредсказанную дисперсию, используют для расчета Q^2 :

$$Q^2 = 1 - s_p^2/s_t^2 \quad (8.3)$$

где s_p^2 – средняя непредсказанная дисперсия; s_t^2 – общая дисперсия описываемого свойства. Чем ближе Q^2 к 1, тем лучше модель предсказывает имеющиеся данные. Таким образом, Q^2 может служить оценкой прогностической способности моделей, использоваться для их оптимизации и сравнения.

Для расчета моделей использовали весь набор дескрипторов. Результаты расчета лучших полиномов по методу МР приведены в табл. 8.1. Полиномы с 3-4 членами (исходные дескрипторы), как правило, предсказывают лучше, чем с двумя комбинированными дескрипторами (произведения и отношения исходных дескрипторов). Увеличение числа дескрипторов в наборе приводит к улучшению качества модели, при этом максимальные Q^2 наблюдаются для смешанного набора дескрипторов всех трех уровней.

Наилучшие прогностические модели МР с тремя исходными параметрами

Токсикант	Полином	Q ²	R ²
Hg(II)	$\lg K_{PCЦ} = 13.5 - 6010/Q_{50} + 5.40 \times C_{Ar}O + 0.106 \times CHO$	0.79	0.89
	$\lg K_{PCЦ}^D = 10.7 + 146/C_{Ar} - 26.3 \times C + 0.000140 \times Q_{25}$	0.59	0.75
	$\lg K_{PCЦ}^B = 14.1 - 0.552/E - 20.6 \times C + 2.77 \times 10^{-5} \times M_z$	0.65	0.80
Py	$K_{OC} = 170000 - 10240/CHO - 48100 \times H + 836000 \times C_{Ar}$	0.85	0.89
	$K_{OC}^D = 0.172 + 1900/Q_{25} - 2100/M_n + 0.345/(H/C)$	0.83	0.85
Атразин	$K_{OC} = -34600 + 579000/(H/C) - 242 \times Q_{25} + 71.3 \times Q_{75}$	0.57	0.76
	$K_{OC}^D = 513 - 1620 \times C_{Ar}O + 0.0196 \times M_z - 134 \times M_w/M_n$	0.90	0.94

* E – эксцесс, Q – квантили ММР.

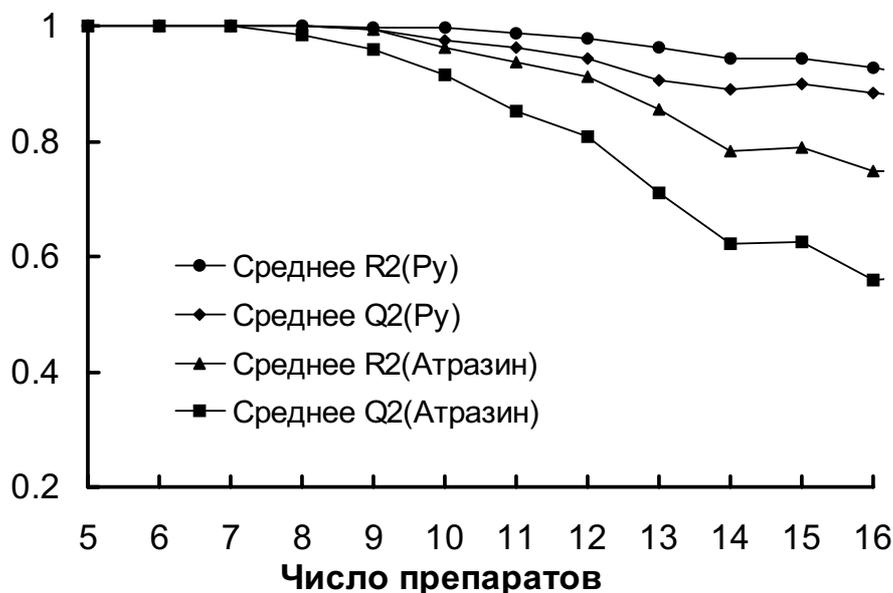


Рис. 8.5. Зависимость средних R² и Q² (усреднение по пяти моделям со случайным образом удаленными препаратами) от размера выборки, использованной для моделирования K_{OC}^D атразина и K_{OC} пирена.

Из прогнозируемых свойств наиболее удовлетворительные результаты получены для K_{OC} и K_{OC}^D всех трех ПАУ и для K_{OC}^D атразина. Использование метода МР позволило выявить форму зависимости между K_{OC}^D атразина и ММ характеристиками гумусовых кислот. Удалось также описать зависимости K_{PCЦ} от дескрипторов состава.

Анализ характера изменения величин R² и Q² в зависимости от размера исходной выборки препаратов позволил обнаружить их завышение для прогностических моделей, построенных для малых выборок, что может

указывать на случайность подбора дескрипторов в таких полиномах. Данное предположение было проверено с помощью численного эксперимента путем последовательного исключения препаратов из выборки, которое проводилось случайным образом. Результаты в виде зависимости R^2 и Q^2 от числа препаратов (на примере K_{OC}^D атразина и $K_{OC} Py$) представлены на рис. 8.5.

Из характера полученных зависимостей видно, что при $n < 15$ значения R^2 и Q^2 начинают резко возрастать. Это позволяет сделать вывод о том, что для построения адекватных прогностической модели на основании данных аналогичного качества с использованием алгоритма МР размер выборки должен быть не менее 20 препаратов.

8.3 Прогностические модели, полученные методами многокомпонентного анализа

С целью снижения размерности исходной матрицы дескрипторов состава без опасности потери информативных признаков использовали методы многокомпонентного анализа – РГК и ДМНК. Применение указанных методов к массивам разнородных данных (например, как в нашем случае – при использовании дескрипторов состава, определяемых разными методами) включает обязательную процедуру их центрирования и масштабирования [Стьюпер и др., 1982], что позволяет заменить исходную матрицу данных на матрицу их дисперсий.

Согласно методу РГК, полученную матрицу разлагают на сумму компонент по принципу максимального объяснения дисперсии исходных данных [Дубров и др., 2000; Geladi and Kowalski, 1986]. Выбор компонент обусловлен спецификой внутренней структуры матрицы дескрипторов. К преимуществам данного метода относится простота реализации, высокая скорость расчета, использование информации о специфике матрицы дескрипторов, возможность получения дополнительных сведений об изучаемой зависимости строение – свойство за счет анализа состава главных компонент и степени их влияния на прогнозируемое свойство. К недостаткам метода относится то, что не используется информация о структуре матрицы свойств. Как следствие, выделяемые главные компоненты могут описывать факторы, непосредственно не связанные с прогнозируемым свойством.

Указанного недостатка лишен метод ДМНК. В отличие от РГК, он предусматривает выбор главных компонент путем минимизации необъясненной дисперсии не только матрицы независимых, но и зависимых переменных [Geladi and Kowalski, 1986; Clementi et al., 1986; Sjöström et al., 1983]. Это повышает надежность получаемой прогностической модели, снижает ее чувствительность к появлению в калибровочной выборке образца сравнения с несколько отличными свойствами [Lindberg et al, 1983]. Кроме

того данный метод хорошо работает в случае сильной взаимокорреляции дескрипторов [Новиков и Шпигун, 1993]. Метод также относительно прост в реализации, характеризуется высокой скоростью расчета, состав выделяемых главных компонент и характер их влияния на прогнозируемое свойство может дать дополнительную информацию об исследуемой зависимости строение – свойство. К недостаткам метода, как впрочем и РГК, относится отсутствие возможности выбора оптимального набора параметров и необходимость достаточно линейного характера зависимости между свойствами и дескрипторами для получения удовлетворительного качества прогноза [Geladi and Kowalski, 1986]. С учетом указанной специфики, в дальнейшей работе для получения прогностических моделей использовали оба метода.

Для расчета использовали полный набор дескрипторов, включающий в себя комбинации исходных дескрипторов по первой и второй степени. Оптимальное число компонент определяли методом кросс-валидации.

Таблица 8.2.

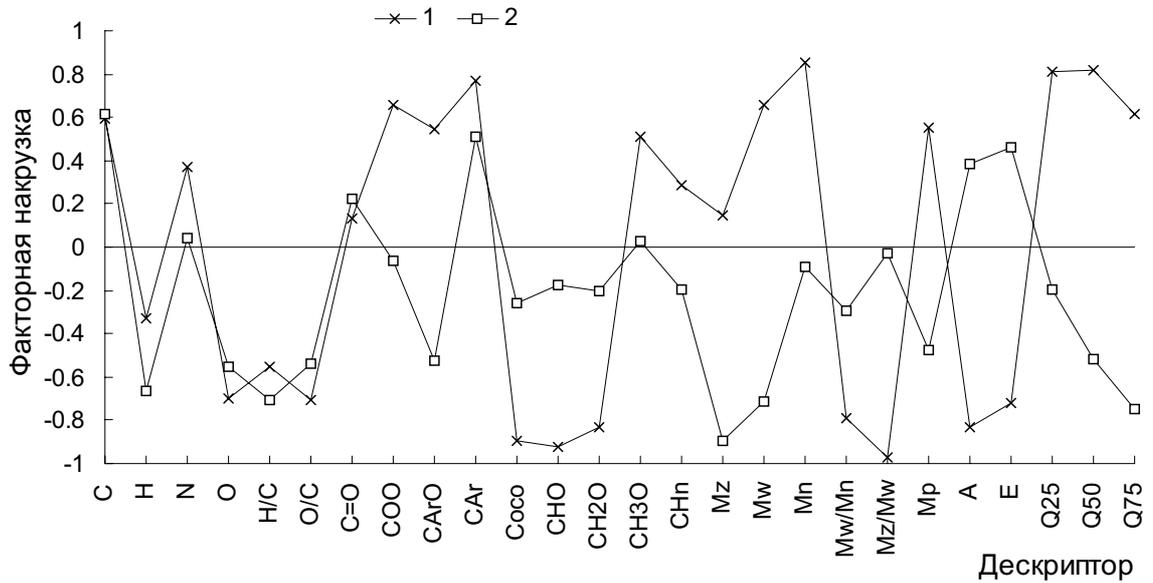
Характеристики прогностических моделей (R^2 и Q^2), рассчитанных методами РГК и ДМНК

Константы связывания						
	Hg		Pu	Flt	An	Атразин
	lgK _{PCЦ}		K _{OC}			
ДМНК						
R^2	0.69		0.9	0.9	0.41	0.78
Q^2	0.27		0.52	0.55	0.09	0.47
РГК						
R^2	0.62		0.9	0.91	0.4	0.87
Q^2	0.47		0.67	0.78	0.24	0.73
Константы детоксикации						
	Hg		Pu	Flt	An	Атразин
	lgK _{PCЦ} ^D	lgK _{PCЦ} ^B	K _{OC} ^D			
ДМНК						
R^2	0.37	0.36	0.78	0.48	0.79	0.72
Q^2	-0.49	-0.79	0.57	-0.02	0.63	0.31
РГК						
R^2	0.12	0.15	0.77	0.60	0.79	0.73
Q^2	0.10	0.02	0.63	0.28	0.73	0.45

Как видно, прогностическая способность полученных моделей невысока – значительно хуже, чем моделей МР. Для объяснения этого факта проводили анализ главных компонент, которые выделяются с помощью указанных методов из исходного пространства дескрипторов. Число компонент, используемых для прогноза по методу РГК, составляло от 2 до 9. Для метода ДМНК оно, как правило, не превышало 2.

Первые пять компонент, на которые метод РСЦ разлагает матрицу исходных дескрипторов для выборки из 19 препаратов, использованных для изучения их взаимодействия с ПАУ, приведены на рис. 8.6а (первые две компоненты) и рис. 8.6б (третья, четвертая и пятая компоненты).

а)



б)

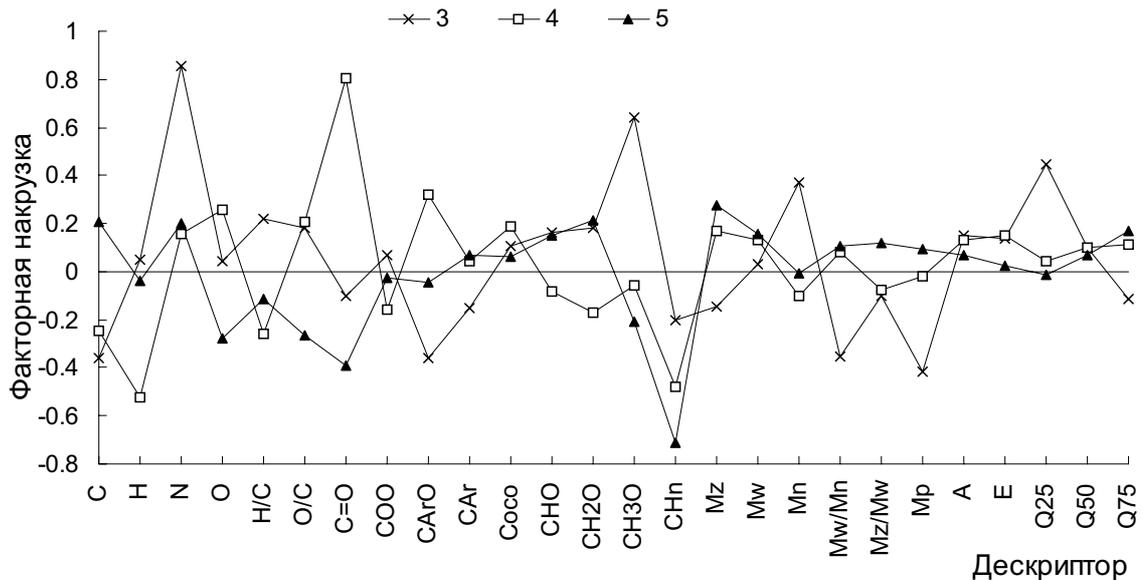


Рис. 8.6. Первая и вторая (а) и третья, четвертая, пятая (б) РГК-компоненты для выборки из 19 препаратов, использованных в экспериментах по связыванию ПАУ.

Как видно из рис. 8.6а, первая компонента преимущественно описывает совместный вклад ароматических и углеводных фрагментов в состав макромолекул гумусовых кислот, а также их полидисперсность (наиболее высокие факторные нагрузки наблюдаются для C_{Ar} , CHO , CH_2O , M_w/M_n , M_z/M_w). Вторая компонента определяется, в основном, ММ характеристиками и частично – параметрами состава ароматической части гумусовых кислот ($C_{Ar}O$ и C_{Ar}). Максимальный вклад в третью компоненту вносит содержание N и O/C, четвертая компонента определяется содержанием карбониллов, пятая – алифатического незамещенного углерода.

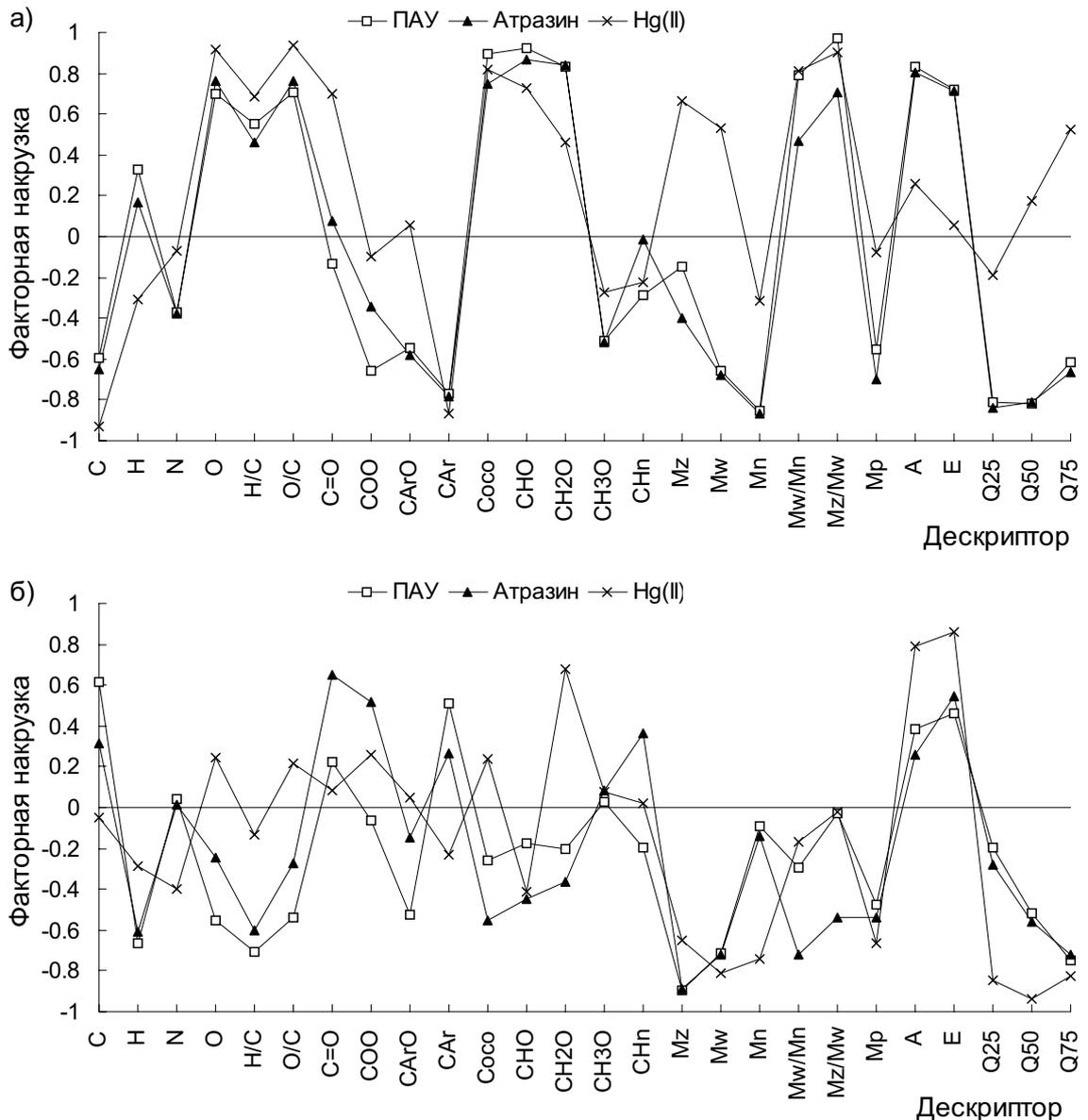


Рис. 8.7. Первые (а) и вторые (а) РГК-компоненты, полученные для различных выборок препаратов, использованных в экспериментах по связыванию и детоксикации Hg(II) (n = 16), ПАУ (n = 19) и атразина (n = 16) гумусовыми кислотами.

Рассмотрение первых двух РГК-компонент для выборок препаратов, использованных для изучения взаимодействия с Hg(II) и атразином (пересечение всех выборок только по 4 препаратам), показало их существенное сходство с описанными выше для выборки по ПАУ (рис. 8.7). Это позволяет сделать важный вывод об адекватности использованного в нашей работе принципа формирования выборок для установления зависимостей “строение – свойство”, который предусматривал задание максимального разнообразия строения и свойств гумусовых кислот по выборке путем включения в нее препаратов различного происхождения и фракционного состава.

В связи со спецификой выбора главных компонент по методу ДМНК, они должны нести в себе информацию не только о внутренней структуре матрицы дескрипторов, но и о ее взаимосвязи с матрицей прогнозируемых свойств. Поэтому проводили сопоставление первых компонент, полученных для одной и той же выборки препаратов, но в одном случае для констант связывания, а в другом – детоксикации. В случае ПАУ выделяемые компоненты оказались практически идентичны (рис. 8.8), что согласуется с наличием тесной корреляции между K_{OC} и K_{OC}^D для ПАУ.

В тоже время в случае атразина, для которого корреляция между K_{OC} и K_{OC}^D отсутствует, наблюдалось принципиальное различие между первыми ДМНК компонентами (рис. 8.8б). Так, если для K_{OC} она была весьма сходна с таковой для ПАУ и, соответственно, характеризовалась максимальным вкладом дескрипторов структурно-группового состава, то для K_{OC}^D явно превалировали дескрипторы ММ состава. В случае Hg(II), для всех трех наборов данных (K_{PC} , K_{PC}^D , K_{PC}^B) наблюдалось хорошее совпадение первых ДМНК компонент. При этом они существенно различались от таковых для ПАУ и атразина по факторным нагрузкам дескрипторов структурно-группового состава, но практически совпадали по вкладу ММ-дескрипторов.

Проведенный анализ ДМНК-компонент показывает его полезность для выявления характера взаимосвязи между прогнозируемыми свойствами и дескрипторами, обеспечивая дополнительный источник информации о физической сущности исследуемых процессов. Так, максимальный вклад дескрипторов – показателей гидрофильно-гидрофобного баланса (углеводы/ароматика), в первые компоненты для данных по связыванию ПАУ и атразина может трактоваться как подтверждение гипотезы о гидрофобном взаимодействии как основном механизме связывания органических экотоксикантов гумусовыми кислотами. В тоже время большой вклад ММ-дескрипторов в описание дисперсии K_{OC}^D для атразина указывает на превалирующую роль факторов, ответственных за проникновение гумусовых кислот в клетки, в процесс детоксикации атразина. Это хорошо согласуется с

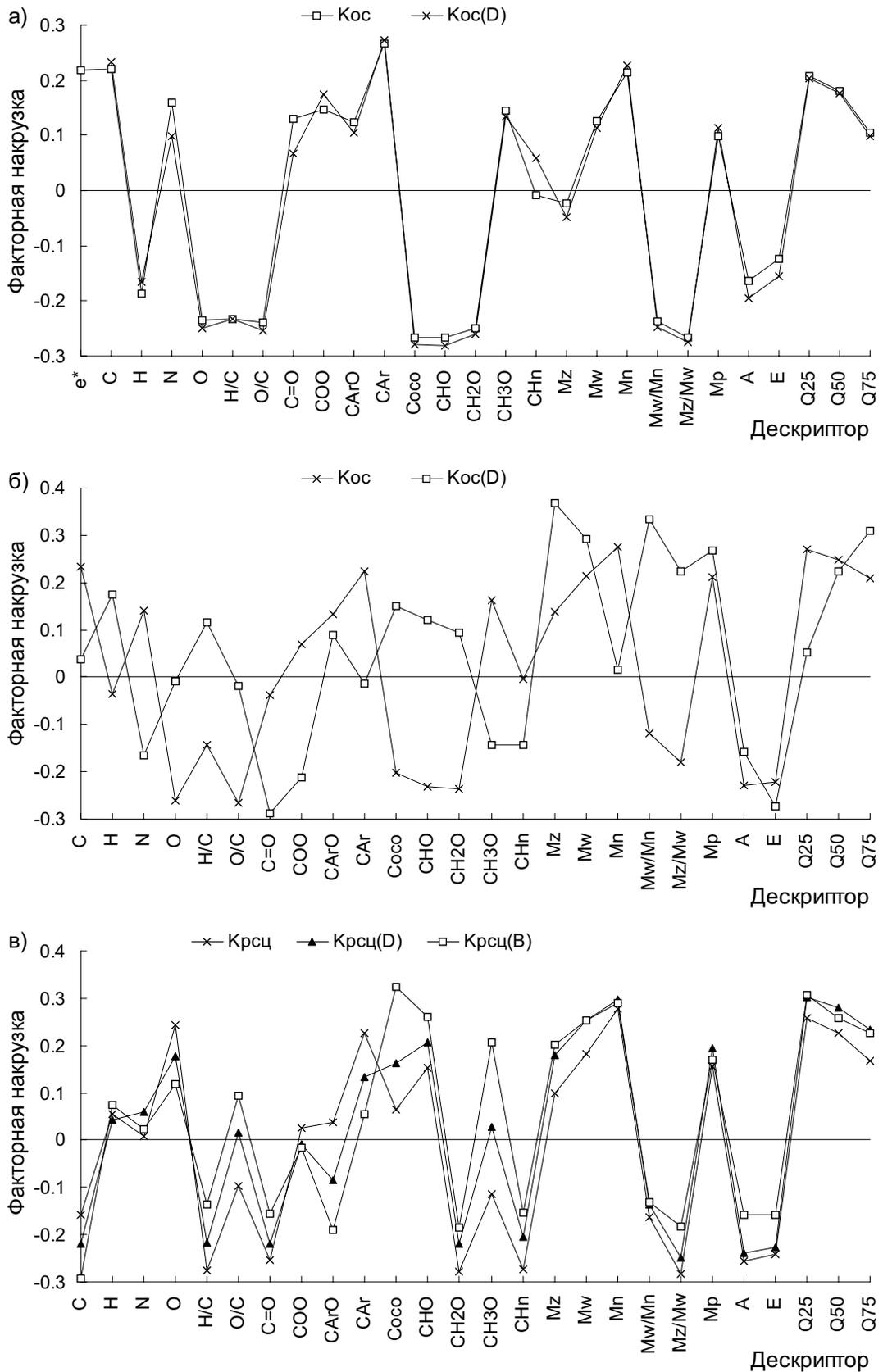


Рис. 8.8. Первые ДМНК компоненты для выборок препаратов, использованных для экспериментов по связыванию и детоксикации ПАУ (а), атразина (б) и Hg(II) гумусовыми кислотами.

установленным нами механизмом детоксикации атразина гумусовыми кислотами (Глава 7), который не является процессом истинной детоксикации, а заключается в повышении сопротивляемости организма к негативным факторам среды под воздействием гумусовых кислот. По-видимому, физиологическая активность гумусовых кислот в существенной степени определяется характером их ММР.

В результате анализа РГК- и ДМНК-компонент было установлено, что многие дескрипторы из использованного набора входят во все компоненты с очень малыми факторными нагрузками. Это может свидетельствовать об избыточности исходного набора независимых переменных, что приводит к информационному шуму при их использовании. Для наглядной демонстрации данного утверждения на рис. 8.9 графически представлены нормированные коэффициенты b , которые вошли в лучшие из полученных РГК-моделей для всех прогнозируемых свойств – K_{OC} и K_{OC}^D ПАУ (рис. 8.9а,б), K_{OC} и K_{OC}^D атразина (рис. 8.9в) и $K_{PCЦ}$, $K_{PCЦ}^D$ и $K_{PCЦ}^B$ комплексов Hg(II) с гумусовыми кислотами (рис. 8.9г).

Как следует из приведенных значений нормированных коэффициентов, прогностические модели РГК, полученные с использованием заданного набора дескрипторов состава, характеризуются очень высоким уровнем шума, который выражается в придании низких значений коэффициентов всем дескрипторам. Особенно наглядно этот эффект заметен для моделей, описывающих взаимосвязь дескрипторов состава и $K_{PCЦ}$. Для данных констант не было обнаружено значимой корреляционной зависимости ни с одним из интегральных дескрипторов состава. По-видимому, не существует и такой их линейной оптимальной комбинации, которая бы удовлетворительно описывала данное свойство. В итоге, как следует из рис. 8.9г, значения всех нормированных коэффициентов в РГК-модели для $K_{PCЦ}$ не превышают 0.08 и несущественно отличаются друг от друга.

В то же время для K_{OC} ПАУ, которые обнаружили тесную корреляционную взаимосвязь с дескрипторами состава (содержание ароматических фрагментов), характерен совсем иной вид распределения коэффициентов по их значимости в прогностической модели – отчетливо выявляется высокий вклад в прогнозируемое свойство таких дескрипторов, как C_{Ar} , H , $C=O$, CH_n , M_w/M_n (K_{OC} Py и Flt). При этом для An, обладающего минимальным сродством к гумусовым кислотам из трех исследованных ПАУ, указанный характер распределения коэффициентов, как и в случае Hg(II), вырождается в их равномерное распределение по всем дескрипторам, что свидетельствует о низкой прогностической способности такой модели.

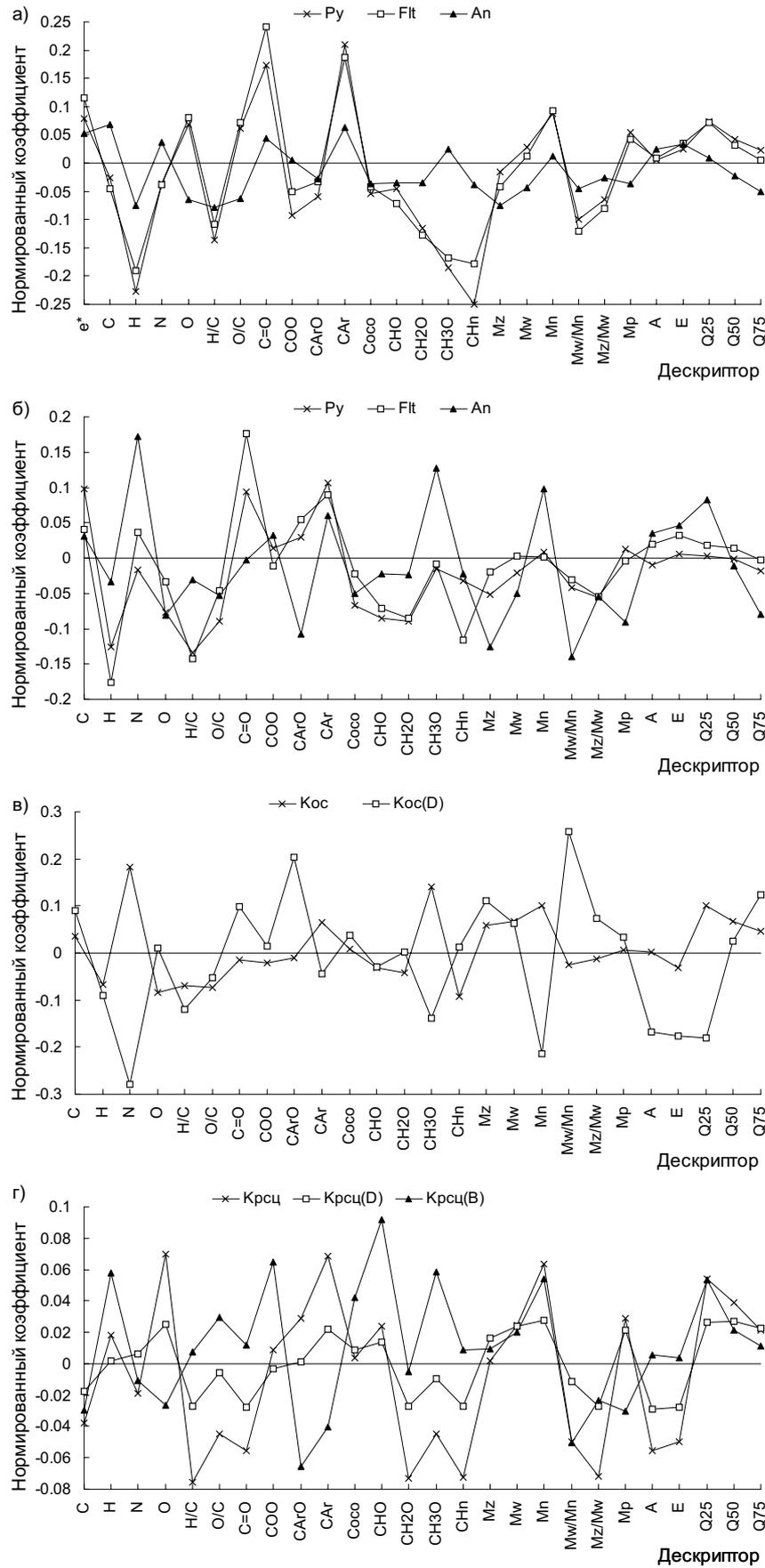


Рис. 8.9. Нормированные коэффициенты, полученные при расчете РГК моделей для K_{oc} ПАУ (а), K_{oc}^D ПАУ (б), атразина (в), Hg(II) (г).

Для преодоления указанной проблемы информационного шума была введена процедура пошагового исключения дескрипторов. Удалялись те из них, исключение которых приводило к большему Q^2 рассчитываемой модели. Лучшими считались модели с наибольшим Q^2 . Их характеристики и входящие в них дескрипторы приведены в табл. 8.3.

Таблица 8.3.

Характеристики описательной и прогностической способности моделей (R^2 и Q^2), рассчитанных с пошаговым исключением дескрипторов методами ДМНК и РГК

Токси- кант	св-во	ДМНК				РГК			
		Q^2	R^2	Число дескр	Число комп.	Q^2	R^2	Число дескр.	Число комп.
Hg (II)	$\lg K_{PCD}$	0.98	1.00	14	11	0.80	0.89	5	4
	$\lg K_{PCD}^D$	0.38	0.52	8	1	0.39	0.44	4	2
	$\lg K_{PCD}^B$	0.24	0.60	7	2	0.30	0.41	7	4
Py	K_{OC}	0.86	0.94	9	4	0.86	0.93	8	6
	K_{OC}^D	0.78	0.85	4	2	0.80	0.82	12	3
Flt	K_{OC}	0.85	0.92	8	3	0.86	0.92	7	6
	K_{OC}^D	0.50	0.61	2	1	0.53	0.61	11	3
An	K_{OC}	0.58	0.66	2	2	0.58	0.65	8	3
	K_{OC}^D	0.84	0.89	12	2	0.82	0.85	14	4
Атразин	K_{OC}	0.57	0.73	9	2	0.60	0.71	15	5
	K_{OC}^D	0.83	0.90	4	1	0.86	0.92	5	4

Полученные данные показывают эффективность процедуры снижения информационного шума за счет исключения из исходной матрицы дескрипторов, имеющих наименьшее влияние на прогнозируемое свойство. Так, качество рассчитываемых РГК- и ДМНК-моделей существенно улучшилось, хотя в среднем оно оставалось хуже, чем для МР-моделей (табл. 8.1)

С целью выявления значимости дескрипторов для прогнозируемых связывающих и детоксицирующих свойств гумусовых кислот, был проведен анализ частоты встречаемости дескрипторов в лучших моделях (по каждому свойству), полученных методами РГК и ДМНК (характеристики приведены в табл. 8.3). Полученные результаты приведены на рис. 8.10.

Анализ частоты встречаемости дескрипторов в наилучших моделях позволил выявить наибольшую значимость структурно-групповых дескрипторов, описывающих распределение углерода в углеводной части гумусовых кислот, полидисперсности, содержания Н и N. Следует отметить,

что полученный ряд дескрипторов, имеющих высокую значимость для прогнозирования связывающих и детоксицирующих свойств гумусовых кислот, оказался весьма близок найденному ранее набору дескрипторов, обладающих высокой дискриминирующей способностью с точки зрения происхождения и фракционного состава гумусовых кислот.

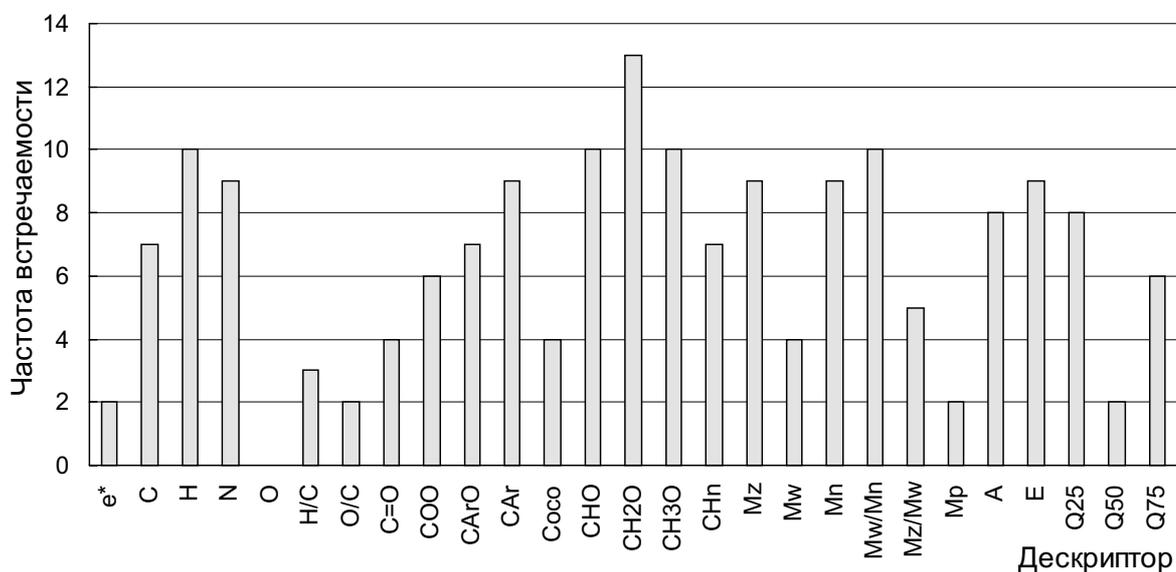


Рис. 8.10. Частота встречаемости дескрипторов в наилучших РГК- и ДМНК-моделях, прогнозирующих связывающие и детоксицирующие свойства гумусовых кислот по отношению к ПАУ, атразину и Hg(II) (характеристики всех 22 моделей приведены в табл. 8.3).

Таким образом, проведенный комплекс систематических исследований позволил разработать методические подходы к построению прогностических моделей “строение – свойство” с использованием набора интегральных дескрипторов состава для численного описания строения гумусовых кислот. Так, установлен минимальный размер выборки препаратов для определения признаков свойств, показаны преимущества реализованного в работе алгоритма метода МР по сравнению с методами многокомпонентного анализа, предложен способ повышения прогностической способности моделей, рассчитываемых методами РГК и ДМНК, путем оптимизации исходного набора дескрипторов.

На основании указанных методических подходов разработаны МР-, РГК- и ДМНК-модели, которые могут быть использованы для прогноза связывающих и детоксицирующих свойств гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава по отношению к ПАУ, атразину и Hg(II). Оценка прогностической способности полученных моделей

свидетельствует о возможности построения моделей удовлетворительного качества с использованием интегральных дескрипторов состава. Тем самым подтверждена состоятельность предложенного в работе подхода к численному описанию строения гумусовых кислот в терминах состава. Успешное решение задач классификации и прогноза свойств гумусовых кислот с использованием комплекса интегральных дескрипторов состава, отвечающих разным уровням структурной организации органических объектов, позволяет предположить справедливость данного подхода к численному описанию строения и других объектов стохастического характера.

Опыт применения рассчитанных моделей на практике позволит более полно выявить достоинства и недостатки заложенных в них алгоритмов и определить оптимальные сферы их использования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполненный комплекс исследований по анализу, классификации и прогнозу свойств гумусовых кислот позволил продемонстрировать масштабность и нетривиальность проблем, возникающих при применении количественных подходов к описанию строения и свойств объектов стохастического характера.

В своей работе в поисках способа численного описания строения гумусовых кислот мы остановились на комплексе *интегральных (характеризующих вещество в целом)* дескрипторов состава, отвечающих трем иерархическим уровням структурной организации органических соединений: элементному, фрагментному и молекулярному. При этом использование *интегральных дескрипторов состава* преследовало цель обеспечить *фундаментальность* (общность) характеризуемого признака и *воспроизводимость* соответствующего параметра, а их *комплекса* – повысить уровень *специфичности* описания строения в терминах состава. Предполагалось, что определяя такие дескрипторы с помощью соответствующих методов анализа, удастся решать задачи классификации и прогноза свойств гумусовых кислот.

Реализации данного подхода на практике предшествовало формирование представительной выборки препаратов с широким разнообразием строения и свойств. Для данной выборки необходимо было провести комплекс определений элементного, структурно-группового и молекулярно-массового состава в условиях, обеспечивающих достоверность информации о распределении интегрального признака как части от целого (содержание элементов от общей массы препарата, содержание углерода или водорода в основных фрагментах от общего). Предстояло также количественно охарактеризовать свойства, наиболее актуальные с позиций практической значимости получаемых прогностических моделей, что обусловило выбор связывающих и детоксицирующих свойств.

Получение необходимой аналитической информации потребовало привлечения широкого спектра физико-химических методов. Комплексный анализ гумусовых кислот в рамках единого методологического подхода

(требование интегральности к получаемым дескрипторам) и с использованием представительной выборки препаратов позволил осуществить верификацию данных о составе гумусовых кислот, получаемых разными методами. В результате был выявлен целый ряд нерешенных методических проблем, обусловленных стохастическим характером объекта, что потребовало существенной модификации существующих или создания новых методик анализа. Получению количественных характеристик связывающих и детоксицирующих свойств гумусовых кислот также предшествовал этап выбора и оптимизации соответствующих методик. Применение концепции связывания/комплексообразования для описания процесса детоксикации экотоксикантов гумусовыми кислотами позволило использовать единый интерпретационный аппарат – расчет констант связывания и детоксикации – для оценки связывающих и детоксицирующих свойств гумусовых кислот.

Применение созданного массива интегральных дескрипторов оказалось весьма эффективным для решения задач классификации гумусовых кислот по происхождению и фракционному составу. При этом максимальной дискриминирующей способностью обладали комплексы дескрипторов разных уровней структурной организации (элементного и молекулярного, элементного и фрагментного), тогда как среди дескрипторов одного уровня самой высокой дискриминирующей способностью обладали дескрипторы молекулярно-массового состава. Полученные результаты позволили продемонстрировать эффективность предложенного подхода к численному описанию строения гумусовых кислот для решения задач классификации по происхождению и фракционному составу.

Однако вскрылись его существенные ограничения при использовании для прогностического моделирования свойств. Это может быть обусловлено отсутствием тесной взаимосвязи между дескрипторами состава и прогнозируемыми свойствами, а также существенным влиянием экспериментальных погрешностей на определяемые значения дескрипторов и прогнозируемых свойств. Данные факторы приводят к снижению прогностической способности рассчитываемых моделей. Поэтому необходимо дальнейшее развитие подходов для работы с такими массивами

данных. Кроме того, улучшению качества получаемых моделей может способствовать использование более информативных дескрипторов, рассчитываемых из данных двумерной спектроскопии ЯМР. Существенному прогрессу в этой области может способствовать развитие методов фракционирования гумусовых кислот, что позволит снизить неоднородность исходного объекта и повысить уровень информативности получаемых структурных дескрипторов.

Опираясь на результаты проведенных исследований, к наиболее приоритетным направлениям в области анализа гумусовых кислот мы относим дополнение и расширение базы данных по интегральным дескрипторам состава как за счет введения новых препаратов, так и применения новых методов анализа. Эта задача наиболее важна с точки зрения выработки классификационных признаков гумусовых кислот по химическому строению. и для повышения прогностической способности моделей строение-свойство. Их появление – залог широкому практическому использованию гуминовых материалов как детоксикантов природного происхождения и созданию лекарственных препаратов на их основе.

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ

1. Разработана общая методология анализа гумусовых кислот и численного описания их строения в терминах состава (трактуемого в самом широком смысле – элементного, структурно-группового, молекулярно-массового) с помощью дескрипторов, удовлетворяющих критериям фундаментальности, воспроизводимости и специфичности. Выдвинут тезис о возможности распространить предложенный методологический подход на все органические объекты стохастического характера.
2. Разработано методическое обеспечение для определения элементного, структурно-группового и молекулярно-массового состава гумусовых кислот, включающее комплекс соответствующих методик, а также способов и средств (программное обеспечение) свертки полученной информации для расчета дескрипторов состава. К числу авторских разработок принадлежат способ определения элементного состава в расчете на беззольную безводную пробу, выбор количественных условий регистрации ^{13}C ЯМР спектров, ПМР-методика совместного определения водорода скелетных фрагментов и функциональных групп, теоретическое обоснование выбора полидекстранов в качестве образца сравнения для определения молекулярных масс, программное обеспечение для обработки гель-хроматографических и спектроскопических данных, позволяющее рассчитывать дескрипторы состава.
3. На основании систематических исследований, выполненных в рамках единого методологического подхода, заложена фактологическая основа для разработки классификации гумусовых кислот по закономерностям их химического строения в виде обширного массива дескрипторов элементного, структурно-группового и молекулярно-массового состава, сформированного для представительной выборки гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава.
4. Решена задача классификации гумусовых кислот по источнику происхождения и фракционному составу путем использования интегральных дескрипторов состава, описывающих элементный, фрагментный и молекулярный уровни структурной организации органических объектов и выявлены дескрипторы состава, обладающие максимальной дискриминирующей способностью по указанным признакам.

5. На основании применения концепции комплексообразования/связывания для описания процессов детоксикации тяжелых металлов и органических экотоксикантов гумусовыми кислотами предложен способ количественной оценки детоксицирующих свойств гумусовых кислот с помощью констант детоксикации.
6. На основании систематических исследований по определению констант устойчивости комплексов (связывания) гумусовых кислот с Hg(II), ПАУ и атразином с использованием аналитических методов и биотестирования сделан вывод о комплексообразовании (связывании) как основном механизме детоксикации Hg(II) и ПАУ гумусовыми кислотами и о принципиально иной природе их детоксицирующего действия по отношению к атразину.
7. Разработаны методические подходы к прогностическому моделированию связывающих и детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к различным экотоксикантам на основании дескрипторов состава, в рамках которых обоснованы требования к минимальному размеру выборки препаратов, определен наиболее эффективный метод регрессионного анализа, разработано соответствующее программное обеспечение.

ВЫРАЖЕНИЕ ПРИЗНАТЕЛЬНОСТИ

Автор выражает самую глубокую и искреннюю признательность своим ученикам, соратникам и единомышленникам, чей труд и вдохновение легли в основу этой работы: Н.А. Куликовой и А.В. Кудрявцеву, взявшим на себя титанический труд по подготовке диссертации к печати; Д.В. Ковалевскому и Д.М. Жилину, принявшим активное участие в обсуждении и рецензировании глав диссертации, а также Н.Ю. Гречищевой, Н.Н. Данченко и М.А. Анисимовой. Самая глубокая признательность В.С. Петросяну – за постоянный интерес к работе и дарованную свободу творчества; А.В. Гармашу и А.Б. Пермину – за неоценимый вклад в формирование теоретического фундамента данной тематики; Г.Ф. Лебедевой – за радость совместного творчества и взаимопонимание; Д.Н. Маторину, П.В. Венедиктову, В.В. Фадееву, Е.М. Филипповой и А.А. Позизовскому – за многолетнее плодотворное сотрудничество; Ф. Фриммелю, Г. Аббт-Браун и С. Хессе – за сотрудничество и помощь в работе; Ю.А. Устынюку – за негибкую поддержку “супрамолекулярной химии”; Г.Н. Коваль – за дружбу и неоценимую помощь в создании базы данных по литературе; Норберту Херткорну и Филиппу Шмитт-Копплину – за дружбу, сотрудничество и преданность общей научной идее; В.М. Бограду, нашему доброму гению, – за живое и деятельное участие в практическом осуществлении наших мечтаний; Е.К. Ивановой, Т.В. Поленовой и С.М. Черняку, моим первым научным руководителям, за науку о гумусовых кислотах; Е.Д. Гопиус, С.В. Пономареву, П.И. Демьянову, Л.Г. Сагиновой, И.Д. Ильиной – моим коллегам, за искренний интерес к нашей работе; Матвею Юдову, Володе Холодову, Ане Царьковй, Грише Филонову и Тане Беловой, моим студентам и аспирантам, – за неустанный труд; моим друзьям, родным и близким – за веру, помощь и долготерпение, а также всем, кто своим советом, интересом и дружеским участием способствовал воплощению данной работы.

Глубочайшая и искренняя благодарность академику Ю.А. Золотову, позволившему вовлечь себя в дискуссию о гумусовых кислотах.

Автор выражает также признательность организациям, оказавшим финансовую поддержку при выполнении данной работы:

Российскому Фонду Фундаментальных Исследований (гранты №96-04-49838 и №98-03-33186а); Фонду Сороса (гранты NBN000 и NBN300); DAAD (грант 1996 г. на участие в 30 Международном Семинаре при Университете Карлсруэ, ФРГ), INTAS (грант INTAS-1997 №1129); BMBF (грант RUS-143/97),

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аммосова Я.М. и Балаганская Е.Д.//Почвоведение, 1991, 7, С.29-39.
2. Анисимова М.А, Перминова И.В. и Лебедева Г.Ф.//Почвоведение, 1988, 9, С.1079-1084.
3. Бельский Б.Г. и Виленчик Л.З. Хроматография полимеров. М., 1978.
4. Бобырь Л.Ф.//Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, 1980, 7, С.54-63.
5. Бугаевский А.А. и Холин Ю.В.//Вестник Харьковского Университета, Харьков, ХГУ, 1989, 340, С.85.
6. Булгакова М.П. и Приходько Л.А.//Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, 1983, 9 С.15-18.
7. Варшал Г.М., Бугаевский А.А., Холин Ю.В. и др.//Химия и технология воды, 1990, 12(11), С.979-986.
8. Варшал Г.М. и Буачидзе Н.С.//Ж. Аналит. Химии, 1983, 38(12), С.2155-2167.
9. Варшал Г.М., Велюханова Т.К., Кошечева И.Я.//Геохимическая роль гумусовых кислот в миграции элементов. В сб. "Гуминовые вещества в биосфере", М., Наука, 1993, С.97-116.
10. Варшал Г.М., Велюханова Т.К., Сироткина И.С. и др.//Гидрохим. материалы, 1973, 59, С.143-151.
11. Варшал Г.М., Инцкирвели Л.Н., Сироткина И.С., Колосов И.В.//Геохимия, 1975, 10, С.1581-1584.
12. Варшал Г.М., Махарадзе Г.А., Велюханова Т.К., Супаташвили Г.Д.//В кн.: Химический анализ морских осадков. М.: Наука, 1980, С.168-175.
13. Варшал Г.М., Кошечева И.Я., Сироткина И.С. и др.//Геохимия, 1979, 4, С.598-607.
14. Вишнякова О.В., Егорова Р.А. и Чимитдоржиева Г.Д.//Тез. докл. II съезда почвоведов. С-Петербург, книга 1, 1996, С.150-151.
15. Гончарова Т.О., Кужекова Н.И., Титькова Е.Н., Капоин В.Т.//Гидрохимические Материалы, 48, С.103-111.
16. Горбань А.Н. Обучение нейронных сетей. М.: Изд. СССР-США СП "ParaGraph", 1990. 160 С.
17. Горбань А.Н. и Россиев Д.А.//Нейронные сети на персональном компьютере. Новосибирск, Наука, 1996. 276 С.
18. Григорьева Е.А. и Кухаренко Т.А.//Методы анализа и контроля производства в химической промышленности. 1968, т. 13, С.10.
19. Данченко Н.Н.//Функциональный состав гумусовых кислот, определение и взаимосвязь с реакционной способностью. Дисс. канд. хим. наук., Москва, 1997, 138 С.

20. Дмитриев Е.А.//Математическая статистика в почвоведении. М.: МГУ, 1995, 320 С.
21. Драгунов С.С.//Труды почв. инст. им. Докучаева, 1951, т. 38, С.86-98.
22. Едигарова И.А., Красюков В.Н., Лапин И.А., Никаноров А.М.//Водн. Рес., 1989, 4, С.122-129.
23. Жилин Д.М. и Перминова И.В.//Природа, 2000, 11, С.43-50.
24. Жилин Д.М., Перминова И.В., Петросян В.С.//Ж. Экологич. Химии, 1996, 5(2), С.131-137.
25. Жилин Д.М., Перминова И.В., Петросян В.С.//Вестник МГУ, сер. 2. Химия, 2000, 41(3), С.214-215.
26. Захаренко В.А.//Гербициды, М., 1990, 238 С.
27. Зырин Н.Г. и Обуховская Т.Д.//Агрохимия, 1980, 7, С.126-138.
28. Зырин Н.Г., Овчинникова М.Ф., Орлов Д.С.//Агрохимия, 1964, 4, С.168.
29. Карпухин А.И и Фокин А.Д.//В кн.: Особенности почвенных процессов дерново-подзолистых почв. М., 1977, С.102-114.
30. Кауричев И.С., Карпухин А.И., Степанова Л.П.//В кн.: Особенности почвенных процессов дерново-подзолистых почв. М., 1977, С.5-21.
31. Кирсо У.Э., Стом Д.И., Белых Л.И., Ирха Н.И.//Превращение канцерогенных веществ в гидросфере. 1988, Валгус, Таллин, С.214.
32. Когут Б.М.//Трансформация гумусового состояния черноземов при их сельскохозяйственном использовании. Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. доктора с-х наук. М., 1996.
33. Комиссаров И.Д. и Логинов Л.Ф.//Труды Тюменского СХИ, 1970, XIV, С.131.
34. Коршун М. О. и Гельман Н.Э.//Новые методы элементного анализа. М.-Л., Госхимиздат, 1949, С.19-25
35. Кулик А.Ф. и Гороя А.И.//Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, 1980, 7, С.151-158.
36. Куликова Н.А., Перминова И.В., Лебедева Г.Ф., Маторин Д.Н.//Вестник МГУ, сер.16, Биология, 1997, 2, С.36-41.
37. Кумок В.Н.//Закономерности в устойчивости координационных соединений в растворах. Томск, Изд. Томского Ун-та, 1977, 270 С.
38. Кухаренко Т.А.//О молекулярной структуре гуминовых кислот. В сб., Гуминовые вещества в биосфере. М., Наука, 1993, С.28-35.
39. Кухаренко Т.А.//ЖАХ, 1948, 3(3), С.181-185
40. Кухаренко Т.А. и Бороздина Л.А.//Коллоидн. журн., 1949, 11(4), с. 244-250.
41. Кухаренко Т.А. и Бороздина Л.А.//Коллоидн. журн., 1949, 11(4), С.244-250.
42. Кухаренко Т.А.//ЖАХ, 1948, 3(3), С.181-185.

43. Кухаренко Т.А.//Хим. Тверд. Топл., 1937, 8(9), С.803-813.
44. Кухаренко Т.А.//Хим. Тверд. Топл., 1937, 8, 12, С.1064-1072.
45. Кушнарев Д.Ф.// Количественная спектроскопия ядерного магнитного резонанса природного органического сырья и продуктов его переработки. Дисс. докт. хим. наук. Иркутск, 1997, 267 С.
46. Лапин И.А. и Красюков В.Н.//Водн. рес., 1991, 3, С.195-199.
47. Лебедева Г.Ф. и др.//Экологические аспекты применения гербицидов.//М.: МГУ, 1990, 208 С.
48. Линник П.Н. и Набиванец Б.И.//Формы миграции металлов в пресных поверхностных водах. Л., Гидрометеиздат, 1986, 268 С.
49. Логинов Л.Ф. и Комиссаров И.Д.//В кн.: Гуминовые препараты. Тюменский с-х ин-т. Научные труды. XIV, 1971, 266 С.
50. Лурье Ю.Ю.//Справочник по аналитической химии. М., "Химия", 1989.
51. Махарадзе Г.А., Варшал Г.М., Супаташвили Г.Д.//Сообщ. АН Груз. ССР, 1982, 106(3), С.517-520.
52. Методы количественного органического элементного микроанализа. Под ред. Гельман Н.Э., М., Химия, 1987, 252 С.
53. Михайленко В.И. и Михальчук В.В.//Ж. Прикл. Спектр., 1987, 46(4), С.535-543.
54. Назарова А.В.//Науч. труды Ленингр. с-х ин-та, 1978, 354, С.35-42.
55. Овчинникова М.Ф.//Химия гербицидов в почве. М.: МГУ, 1987, 109С.
56. Онуфриенок И.П. и Солодовникова Р.С.//Труды Томск. Ун-та, 1961, 170, С.163-169.
57. Орлов Д. С.//В сб.: Гуминовые вещества в биосфере. М., Наука, 1993, С.16-27.
58. Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. Изд-во МГУ, М., 1990, 325С.
59. Орлов Д.С. и Гришина Л.А.//Практикум по химии гумуса. М., МГУ, 1981, С.119-126.
60. Орлов Д.С., Садовникова Л.К., Саврова А.Л.//Докл. РАН, сер. "Геохимия", 1995, 345(4), С.1-3.
61. Орлов Д.С.//Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. Изд-во МГУ, М., 1990, 325 С.
62. Орлов Д.С.//Химия почв. М., Изд-во МГУ, 1992, 259С.
63. Паркер С.//Фотолюминесценция растворов. М.: "Мир", 1972. 510С.
64. Перминова И.В., Данченко Н.Н., Яценко Н.Ю., Лебедева Г.Ф., Ковалевский Д.В, Куликова Н.А., Филиппова О.И., Венедиктов П.С., Полюнов В.А.//Материалы международного конгресса "Вода: экология и технология", Москва, 6-9 сент. 1994, 4, С.1136-1143.

65. Перминова И.В., Ященко Н.Ю., Полынов В.А., Петросян В.С., Венедиктов П.С.//Экологическая химия, 1995, 4(3), С.234-238.
66. Першина И.В., Вермул В.М., Поленова Т.В., Иванова Е.К.//Вестник МГУ, сер. 2, Химия, 1989, 30, С.176-182.
67. Полынов В.А.//Разработка и применение флуоресцентных методов биотестирования токсичности природных и сточных вод. Дисс. канд. биол. наук, М., 1992.
68. Потапов В.М., Татаринчик С.Н.//Органическая химия. М., Изд-во "Химия", 1976, 381 С.
69. Приходько Л.А., Горювая А.И., Глоба М.П., Кулик А.Ф.//Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, 1968, 7, С.243-245.
70. Рабинович В.А. и Хавин З.Я.// Краткий химический справочник. Л., "Химия", 1977, 150 С.
71. Рузавин Г.И.//Методология научного исследования. М.: ЮНИТИ-ДАНА, 1999, 317 С.
72. Сиггиа С. и Ханна Дж.Г.//Количественный органический анализ по функциональным группам. М.: Химия, 1983, С.132-135.
73. Сироткина И.С., Варшал Г.М., Лурье Ю.Ю., Степанова Н.П.//Ж. аналит. химии, 1974, 29(8), С.1626-1632.
74. Сироткина И.С., Загудаева Н.С., Варшал Г.М.//Гидрохим. мат., 1973, 57, С.153-163.
75. Скуг Д. и Уэст Д.//Основы аналитической химии. М., Мир, 1979, т.1, С. 425-432.
76. Смирнов М.Б. и Крапивин А.М.//В кн.: Методы исследования состава органических соединений нефти и битумоидов. 1985, С.138-181.
77. Соколов М.С. и Галиулин Р.В.//Микробиологическое самоочищение почвы от пестицидов. М., 1987, 102 С.
78. Справочник помощника санитарного врача и помощника эпидемиолога. М.: Медицина, 1990, 337 С.
79. Степанова И.К. и Комов В.Т.//Экология, 1996, 3, С.198-202.
80. Стадников Г.Л., Сысков К.И., Ушакова А.А.//Хим. Тверд. Топл., 1934, 7(6), С.581-589.
81. Сысков К.И. и Кухаренко Т.А.//Заводск. лаб., 1947, 13(1), С.25-28.
82. Сысков К.И.//Хим. Тверд. Топл., 1936, 7(6), С.566-574.
83. Ткаченко Л.К., Филиппова Т.В., Горювая А.И., Давыдовский А.А., Сулиман Г.Ф. и Христева Л.А.//Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, и животноводство, 1977, 6, С.31-45.
84. Тенфорд Ч.//Физическая химия полимеров. М.: Химия, 1965, С.25.

85. Фокин А.Д., Бобыр Л.Ф., Епишина Л.Е., Кравцова Л. и Христева Л.А.//Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, 1975, 5, С. 115-117.
86. Фокин А.Д. и Карпухин А.И.//Изв. ТСХА, 1972, 1(132), С.19-21.
87. Фритц Дж. и Шенк Г.//Количественный анализ. М.: Мир, 1978, 227 С.
88. Христева Л.А., Горовая А.И. др.//Способ детоксикации ядохимикатов. Авторское свидетельство №460037, 1974.
89. Христева Л.А., Старостин А.Н., Улитина В.П.//Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, 1968, 3, С.136-142.
90. Христева Л.А.//Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, 1962, 2, С.123-129.
91. Христева Л.А.//Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, 1968, 3, С.13-27.
92. Христева Л.А.//Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, 1973, 4, С.5-23.
93. Христева Л.А.//Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, 1977, 6, С.25-27.
94. Христева Л.А.//Труды почвенного ин-та им. В.В.Докучаева, Академия Наук СССР, 1951, 38, С.108-184.
95. Цуканова В.М. и Тихомолова К.П.//Колл. Ж., 1996, 58(5), С.705-712.
96. Яценко Н.Ю, Перминова И.В., Петросян В.С., Филиппова Е.М., Фадеев В.В.//Вестник МГУ, сер. 2. Химия, 1999, 40, С.188-193.
97. Abbt-Braun G., Schmiedel U., Frimmel F.H.//Vom Wasser. В, 1990, 75, P.59-73.
98. Ahard F.//Grell's Chem. Ann., 1786, 2, P.391.
99. Aiken G.R. and Gillam A.H.//In: Humic Substances II, 1989, Hayes M.H.B., MacCarthy P., Malcolm R.L., and Swift R.S. (Eds.) John Wiley&Sons Ltd., P.516-543
100. Allard B. and Arsenie I.//Water, Air and Soil Pollut., 1991, 56, P.457-464.
101. Ashley J.T.F.//Chemosphere, 1996, 33(11), P.2175-2187.
102. Bakhus D.A. and Gschwend P.M.//Environ. Sci. Technol., 1990, 24, P.1214-1223.
103. Barton D.H.R. and Schnitzer M.//Nature, 1963, 198(4876), P.217-218.
104. Bender M.E., Matson W.R., Jordan S.A.//Environ. Sci. Technol., 1970, 4(6), P. 520.
105. Benedetti M.F., Riemsdijk W.H., Koopal Luuk K., Kinniburgh D.G., Goody D.C., Milne C.J.//Geochim. Cosmochim. Acta, 1996, 60(14), P.2503-2513.
106. Berg C.M.G. and Kramer J.R.//Anal. Chim. Acta, 1979, 106, P.113-120.
107. Beyer L.//Z. Pflanzenernahr. Bodenk., 1996, 159, P.527-539.
108. Black M.C. and McCarthy J.F.//Environ. Toxicol. Chem., 1988, 7, P.593-600.

109. Bollag, J.-M. and K. Mayers//*Sci. Total Environ.*, 1992, 117/118, P.357-366.
110. Bonn B.A. and Fish W.//*Environ. Sci. Technol.*, 1991, 25, P.232.
111. Bowles E.C., Antweiler R.C., MacCarthy P.//In: Humic substances in the Suwannee river, Georgia, Interactions, properties, and proposed structures. Averett R.C., Leenheer J.A., McKnight D.M., and Thorn K.A. (Eds.) U.S. Geological survey water-supply paper
112. Bresnahan W.T., Grant C.L., Weber J.H.//*Anal. Chem.*, 1978, 50(12), P.1675-1679.
113. Brooks J.D. and Sternhell S.//*Austr. J. Appl. Sci.*, 1957, 8, P.206-221.
114. Brown D.C. and Flagg E.W. //*J. Environ. Qual.*, 1981, 10, P.382-386.
115. Buchwalter D.B., Linder G., Curtis L.R.//*Environ. Toxicol. Chem.*, 1996, 15(4), P.568-573.
116. Buddrus J., Burba P., Herzog H., Lambert J.//*Anal. Chem.*, 1998, P.628-631.
117. Buffle J., Deloedoy M.D., Haerdi L.// *Anal. Chim. Acta*, 1978, 101, P.339.
118. Carlberg G.E. and Martinsen K.//*Sci. Total Environ.*, 1982, 25, P.245-254.
119. Carter C.W. and Suffet I.H.//*Environ. Sci. Technol.*, 1982, 16, P.735-740.
120. Celis R., Cornejo J., Hermosin M.C., and Koskinen W.C.//*Soil Sci. Soc. Am. J.*, 1997, 61, P.436-443.
121. Chaney K. and Swift R.S.//*J. Soil Sci.*, 1984, 35, P.223-230.
122. Chen S., Inskip, W.P., Williams S.A., Callis P.R.//*Environ. Sci. Technol.*, 1994, 28, P.1582-1588.
123. Cheshire M.V.//*Nature and origin of carbohydrates in soils*. Academic press, London, 1970, 323P.
124. Chin Yu.-P. and Gschwend P.M.//*Environ. Sci. Technol.*, 1992, 26, P.1621-1626.
125. Chin Yu.-P. and Weber W.I.//*Environ. Sci. Technol.*, 1994, 28, P. 1853.
126. Chin Yu.-P., Aiken G., and O'Loughlin E.//*Environ. Sci. Technol.*, 1994, 28, P.1853-1858.
127. Chiou C.T., Kile D.E., Brinton T.I., Malcolm R.L.//*Environ. Sci. Technol.*, 1987, 21, P.1231-1234.
128. Chiou C.T., Malcolm R.L., Brinton T.I., Kile D.E.//*Environ. Sci. Technol.*, 1986, 20, P.502-508.
129. Choudhry G.G. and Webster, G.R.B.//*Toxicol. Environ. Chem.*, 1989, 23, P. 227-242.
130. Clar E.//*Polycyclic Hydrocarbons*. Academic Press, London and New York, 1964, P. 442.
131. Clark F.E. and Tan K.H.//*Soil Biol. Biochem.*, 1969, 1, P. 75.
132. Conte P., Piccolo A., Van Lagen B., Buurman P. and De Jager P.A.//*Geoderma*, 1997, 80, P.327-338.
133. Cook R.L. and Langford C.H.//*Environ. Sci. Technol.*, 1998, 32, P.719-725.

134. Danielsen K.M., Chin Y.P., Buterbaugh J.S., Gustafso, T.L., Traina S.J.//*Environ. Sci. Technol.*, 1995, 29, P.2162-2165.
135. Davis J.A.//*Geochim. Cosmochim. Acta.* 1982, 46, P.2381-2393.
136. De Nobili M. and Contin M.//In: *Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health.* Senesi N., Miano T.M. (Eds.) 1994. Elsevier, P.263.
137. De Nobili M., Gjessing E., and Sequi P.//In: *Humic substances II.* Hayes M.B.H., MacCarthy P., Malcolm R.L., and Swift R.S. (Eds). John Wiley&Sons Ltd. 1989, P.562-591.
138. Dell'Agnola G., Ferrari G., and Maggioni A.//*Ric. Sci., Part 2*, 1964, B4, P.347-352.
139. Devitt E.C. and Weisner M.R.//*Environ. Sci. Technol.*, 1998, 32, P.232-237.
140. Doerffel K.//*Statistik in der analytischen Chemie.* Deutscher Verlag fuer Grundstoffindustrie GmbH, Leipzig, 1990, 258P.
141. Dubin P. and Straus U.//*J. Phys. Chem.*, 1970, 74, P.2842-2851.
142. Earl W.L., Wershaw R.L., Thorn K.A.//*J. Magn. Res.*, 1987, 74, P.264-274.
143. Eberle S.H. and Feuerstein W.//*Naturwissenschaften*, 1979, 66, P.572-573.
144. Engebretson R.R. and Wandruszka R.V.//*Environ. Sci. Technol.*, 1994, 28, P.1934-1941.
145. Ephraim J.H., Boren H., Arsenie I., Pettersson C., Allard B.//*Sci. Total Environ.*, 1989, 81/82, P.615-624.
146. Ephraim J.H., Boren H., Arsenie I., Pettersson C., Allard B.//*Sci. Total Environ.*, 1991
147. Ephraim J.H. and Marinsky J.A.//*Anal. Chim. Acta*, 1990, 232, P.171-180.
148. Ernst R.R.//*Adv. Magn. Res.*, 1966, 2, P.1-35.
149. Fan W.M., Higashi R.M., Lane A.N.//*Environ. Sci. Technol.*, 2000, 34, P.1636-1646.
150. Felbeck G.T.//*Soil Sci.*, 1971, 111(1), P. 42.
151. Fisher, N.S. and D. Frood.//*Mar. Biol.*, 1980, 59, P.85-93.
152. Freeman R., Pachler K.G.R., La Mar G.N.//*J. Chem Phys.*, 1971, 55(9), P.4586-4593.
153. Frimmel F.H., T. Gremm, and S.A. Huber.//*Sci. Total Environ*, 1992, 117/118, P.197-206.
154. Frimmel F. H., Hopp W., Quentin K.-E. Z.//*Wasser Abwasser-Forsch.*, 1985, 18, P.259-262.
155. Frund R, Haider K. and Ludemann, H.-D.//*Z. Pflanzenernahr. Bodenk.*, 1994, 157, P.29-35.
156. Frund R., Guggenberger G., Haider K., et al. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenk.*//1994, 157, P.175-186.
157. Frund R. and Ludemann H.-D.//*Sci. Total Environ.*, 1989, 81/82, P.157-168.

158. Fukushima M., Tanaka S., Hasebe K., Taga M., Nakamura H.//*Analyt. Chim. Acta*, 1995, 302, P. 365-373.
159. Gachrer R., Davis J.S., and Mares A.//*Environ. Sci. Technol.*, 1978, 12(13), P.14-16.
160. Gamble D.S.//*Can. J. Chem.*, 1972, 50, P. 2680-2686.
161. Gamble D.S. and Schnitzer M.//*Trace metals and metal organic interaction in natural waters. Ch. 9.* 1973, P.265-302.
162. Gamble D.S. and Khan S.U.//*Can. J. Chem.*, 1988, 66, P.2605-2617.
163. Gamble D.S., Schnitzer M., Hoffman I.//*Can. J. Chem.*, 1970, 48, P.3197-3204.
164. Gamble D.S. and Underdown A.W.//*Anal.Chem.*, 1980, 52, P.1901-1908.
165. Gauthier T.D., Seitz W.R., Grant C.L.//*Environ. Sci. Technol.*, 1987, 21, P.243-248.
166. Gauthier T.D., Shane E.C., Guerin W.F.//*Environ. Sci. Technol.*, 1986, 20, P.1162-1166.
167. Genevini P.L., Saxxhi G.A. and Borio D.//*In: Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health*
168. Ghassemi M. and Christman R.F.//*Limnol. Oceanogr.*, 1968, 13, P.583-587.
169. Giesy, J.P., A. Newell, and G.J. Laversee.//*Sci. Total. Environ.*, 1983, 28, P.23-36.
170. Gillam A.H. and Riley J.P.//*Anal. Chim. Acta*, 1982, 141, P.287-299.
171. Gjessing E.T.//*Schweiz. Z. Hydrol.*, 1973, 35(2), P.286-294.
172. Gjessing E.T.//*Arch. Hydrobiol.*, 1981, 91(2), P.144-149.
173. Grainer L.K., Lafrance P., Campbell G.C.//*Chemosphere*, 1999, 38, P.335-350.
174. Grasset L. and Ambles A.//*Org. Geochem.*, 1998, 29(4), P.881-891.
175. Grover R. and Hance R.J. J.//*Soil Sci.*,1970, 109, P.136-138.
176. Guna S., Jaffe P.R., Peters C.A.//*Environ. Sci. Technol.*, 1998, 32, P.2317-2324.
177. Guy R.D. and Chackrabarti C.L.//*Can. J. Chem.*, 1976, 54, P.2600-2611.
178. Haitzer M., Hoess S., Transpurger W., Steinberg C.//*Environ. Toxicol. Chem.*, 1999, (in Press).
179. Harvey G.R., Boran D. A., Tokar J.M.//*Mar. Chem.*, 1983, 12, P.119-132
180. Hasset J.P. and Milicic E.//*Environ. Sci. Technol.*, 1985, 19, P.638-643.
181. Hatcher P.G.//*Org. Geochem.*, 1987, 11, P.31-39.
182. Hayashi T. and Nagai T.//*Soil Sci. Plant Nutr.*, 1962, 8(4), P.22.
183. Heiden R.W. and Aikens D.A.//*Anal. Chem.*, 1983, 55, P.2327-2332.
184. Herbert B.E., Bortsch M., Novak, J.M.//*Environ. Sci. Technol.*, 1993, 27, P.398-403.
185. Herbes S.E. //*Wat. Res.*, 1977, 11, P.493-496.

186. Herzog H., Burba P., Buddrus J. Fresenius//*J. Anal.Chem.*, 1996, 354(3), P.375-377.
187. Hesketh N., Jones M.N., and Tipping E.//*Anal. Chim. Acta*,1996, 327(3), P.191-201.
188. Hoult D.I., Chen C.N., Eden H., Eden M.//*J. Magn. Res.*, 1983, 51(1), P.110-117.
189. Huber W.//*Microchim. Acta*, 1959, 5, P.751-755.
190. Huffman E.W.D., Stuber Jr. and H. A.//In: Humic substances in soil, sediment and water Aiken G.R., McKnight D.M., Wershaw R.L., MacCarthy P. (Eds.), John Wiley & Sons. N.Y., 1985, P.433-445.
191. Humic substances in the Suwannee river, Georgia: Interactions, properties, and proposed structures. Averett R.C., Leenheer J.A., McKnight D.M., and Thorn K.A. (Eds.) U.S.1994. Geological survey water-supply paper, 2373P.
192. Ishiwatari R.//*Chem. Geol.*, 1973., 12, P.113-126.
193. Ishiwatari R., Hamana H., Machihara T.//*Water Res.*, 1980, 14, P.1257-1262.
194. Johnsen S., Gribbestad I.S.//*Sci. Total Environ.*, 1991, 107, P.99-108.
195. Johnsen S.//*Sci. Total Environ.*, 1987, 67, P.269-278.
196. Kanitskaya L.V., Ivanova N.V., Gorokhova V.G., Babkin V.A.//*Chem. Sustainable Develop.*, 1996, 4, P.275-280.
197. Karickhoff S.W., Brown D.S., Scott T.A.//*Water Res.*, 1979, 3, P.241-248.
198. Katchalsky A. and Gillis G.//*Rec. Trav. Chim.*, 1950, 69, P.192-208.
199. Katchalsky A., Shavit N., Eisenberg H.//*J. Polymer Sci.*, 1954, 13, P. 69-78.
200. Khan S.U.//*Soil Sci.*, 1970, 109(4), P.227-228.
201. Khan S.U.//*Soil Sci.*, 1971, 112, P.401-408.
202. Khan S.U.//*J. Environ. Sci. Health. Sec. B.*, 1980, 15, P.1071-1020.
203. Kinchesh P, Powlson D.S., Randall E.W.//*European J. Soil Sci.*, 1995, 46, P.125-138.
204. Kleinhempel D.//*Albrecht-Thaer-Archiv.*, 1970, 14(1), P.3-14.
205. Knight S.A.//*Chem. Ind.*, 1967, 45, P.1920-1923.
206. Knulst J.C., Boershke R.C., Loemo S.//*Environ. Sci. Tech.*, 1998, 32(1), P.8-12.
207. Kopinke F.-D. and Lebelt A.G.I.//*Symposium on Refractory Organic Substances in the Environment*, Rose, Karlsruhe, 1997, P.53-55.
208. Kopinke, F.D.; Porschmann, J.; Stottmeister, U.//*Environ. Sci. Technol.*, 1995, 29, P.941-950.
209. Krosshavn M., Bjorgum J.O., Krane J. and Steinnes E. J.//*Soil Sci.*, 1990, 41, P.371-377.
210. Kudryavtsev A.V., Perminova I.V., Petrosyan V.S.//*Anal. Chim. Acta*, 2000, 407(1-2), P.193-202.
211. Kukkonen J. and Oikari A.//*Sci. Tot. Environ.*, 1987, 62, P.399-402.

212. Kukkonen J. and Oikari A.//*Wat. Res.*, 1991, 25, P.455-463.
213. Kukkonen J. and Pellinen J.//*Sci. Total Environ.*, 1994, 152, P.19-29.
214. Kulikova N.A., Perminova I.V., Lebedeva G.F.//*Proceedings of the 10th IHSS*, 24-28 July, Toulouse, France, P.112-115.
215. Kumada K.//*Chemistry in soil organic matter*. Tokyo, 1988.
216. Kumke M.U., Lohmannsroben H.-G., Roch T.//*Analyst*, 1994, 119, P.991-1001.
217. Kuwatsuka S., Tsutsuki K., Kumada K.//*Soil Sci. Plant Nutr.*, 1978, 24, P.337-347.
218. Landrum P.F, Reinhold M.D, Nihart S.R, Eadie B.J.//*Environ. Toxicol. Chem.*, 1985, 4, P.459-467.
219. Landrum P.F, Sheila R.N, Eadie B.J, Herche L.R.//*Environ. Toxicol. Chem.*, 1987, 6, P.11-20.
220. Landrum P.F., Dupuis W.S. and Kukkonen J.//*Environ. Toxic. Chem.*, 1994, 13, P.1769-1780.
221. Landrum P.F., Nihart S.R., Eadie B.J., Gardner W.S.//*Environ. Sci. Technol.*, 1984, 18, P.187-192.
222. Landrum P.F., M.D. Reinhold, S.R. Nihart, and B.J. Eadie.//*Environ. Toxicol. Chem.* 4, 459-467, 1983
223. Lee M.L., Novotny M.V., Bartle K.D.//*Analytical Chemistry of Polycyclic Aromatic Compounds*. 1981, Academic Press, INC. LTD, London, 462P.
224. Leuenberger B. and Schindler P.//*Analyt.Chem.*, 1986, 58, P.1471-1474.
225. Levesee G.J., Landrum J.P., Fannin T.//*Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1983, 40, P.63-69.
226. Levy G.C. and Komorovsky R.A.//*J. Am. Chem. Soc.*, 1974, 96(3), P.678-681.
227. Lobartini J.C. and Tan K.H.//*Soil Sci.Soc.Amer.J.*, 1988, 52, P.125-130.
228. Lowe L.E.//*Sci. Total Environ.*, 1992, 113, P.133-145.
229. Luoma, S.N.//*A Review. Sci. Total Environ.*, 1983, 28, P.1-22.
230. MacCarthy P. and Mark Jr., H. B.//*In: The biological implication of metals in the environment. Proc. 15th Annual Life Sciences Symp., Hanford, Washington, Sept. Oct. 1975, (publ. 1976), P.197-212.*
231. MacCartney P. and Mark H.B.//*Soil Soc. Am. J.*, 1976, 40, P.275.
232. Malcolm R.L. and MacCarthy P.//*Environ Sci. Technol.*, 1986, 20, P.904-911.
233. Malcolm R.L.//*In: Humic substances in soil and crop science. P. MacCarthy, C.E. Clapp, R.L. Malcolm and P.R. Bloom (Eds.), 1990, P.1*
234. Mannio J., Verta, M., Kortelainen P., Rekolainen S.//*Publ. Wat. Res. Inst. Nat. Board Waters, Finland*. 1986, 65, P.32-43.
235. Mantoura R.F.C. and Riley J. P.//*Anal. Chim. Acta*, 1975, 78, P.97-106.

236. Mantoura R.F.S., Dickson A., Riley J.P.//*Est. Coast. Mar. Sci.*, 1978, 6, P.387-408.
237. Marinsky J.A. and Ephraim J.//*Environ. Sci. Technol.*, 1986, 20, P.349-354.
238. Marinsky J.A., Wolf A., Bunzl K.//*Talanta*, 1980, 27, P.461-468.
239. Martin F., Dubach P., Menta N. C.//*Z. Pflanzeherner Dung Boden*, 1963, 103, P.27-32.
240. Martin J.P. and Waksman S.A.//*Soil Sci.*, 1941, 52, P.381-394.
241. Maruya K.A., Risebrough R.W., Horne A.J.//*Environ. Toxic. Chem.*, 1997, 16, P.1087-1097.
242. Masini J.C.//*Anal. Chim. Acta*, 1993, 283, P.803-810.
243. Mason R.P., Reinfelder J.R., Morel F.M.M.//*Environ. Sci. Technol.*, 1996, 30, P.1835-1845.
244. Matthiessen A.//*Fresenius J. Anal. Chem.*, 1996, 354, P.747-749.
245. McCarthy J.F.//*Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 1983, 12, P.559-568.
246. McCarthy J.F. and Jimenez B.D.//*Environ. Sci. Technol.*, 1985, 19, P.1072-1076.
247. McCarthy J.F., Jimenez B.D., Barbee T.//*Aquat. Toxicol.*, 1985, 7, P.15-24.
248. McCarthy J.F., Roberson L.E., Burriss L.W.//*Chemosphere*, 1989, 19, P.1911-1920.
249. McCarthy J.F. and S.M. Bartell.//*ASTM STP 1988*, J. Cairns, Jr. and J.R. Pratt, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1988, P.3-16.
250. McCarthy J.F. and B.D. Jimenez.//*Environ. Toxicol. Chem.*, 1985, 4, P.511-521.
251. Means J.C. and Wijayaratne R.D.//*Sci.*, 215, P.968-970.
252. Moers M.E.C.//*Occurrence and Fate of Carbohydrates in Recent and Ancient Sediments from Different Environments of Deposition*. Dissertation, Techn. Univ. Delft, 1989.
253. Mopper K., Schultz C.A., Chevolut L., Germain C., Revuelta R., Dwason R.//*Environ. Sci. Technol.*, 1992, 26, P.133-138.
254. Morehead N.R., Eadie B.J., Lake B., Landrum P.//*Chemosphere*, 1986, 15, P.403-412.
255. Morra M.J., Corapcioglu M.O., Wadruszka R.M.A., Marshall D.B.//*Soil Sci. Am. J.*, 1990, 54., P.1283-1288.
256. Nam K., Chung N., Alexander M.//*Environ. Sci. Technol.*, 1998, 32, P.3785-3788.
257. Neff J.M.//*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon in the Aquatic Environment*. 1979, Applied Sci. Pub. LTD, London, 266P.
258. Nehls I., Wagenknecht W., Philipp B., Stscherbina D.//*Prog.Polym.Sci.*, 1994, 19, P.29-78.

259. Newman R.H., Tate K.R., Barron P.F. and Wilson M.A.//*J. Soil Sci.*, 1980, 31, P.623-631.
260. Nilsson A. and Hakanson L.//*Hydrobiol.*, 1992, 235/236, P.675-683.
261. *NMR of Humic Substances and Coal - Techniques, Problems and Solutions.* Wershaw R.L., Mikita M.A. (Eds.) Lewis Publishers, Chelsea, 236P.
262. Noggle J.H. and Schirmer R.E.//*The nuclear Overhauser effect.* NY, Academ. Press, 1971, 259P.
263. Norwood D.L.//In: *Humic substances and their role in the environment*, Frimmel F.H. and Christman R.F. (Eds), John Wiley & Sons Limited, 1988, P.133-148.
264. Ogner G.//*Soil Sci.*, 1970, 110(2), P.86.
265. Oh Y. K et al.//*Nippon suiscinukkaishi*, 1986, 52(9), P.1653; цит. по Ch.Ab., 105, 220407.
266. Oikari A., Kukkonen J., Virtonen V.//*Sci. Total Environ*, 1992, 117/118, PP.367-377.
267. Oris J.T., Hall A.T., Tylka J.D.//*Environ. Toxicol. Chem.*, 1990, 9, P.575-583.
268. Pandeya S.B.//*Geoderma*, 1993, 58, P.219-231.
269. Pang S. and Zhao K.//*Huanjing Huaxue*, 1983, 2(1), P. 49; цит. по Ch. Ab. 99,58482u.
270. Paolis F. and Kukkonen J.//*Chemosphere*, 1997, 34, P.1693-1704.
271. Parsons J.W.//In: *Humic substances II. In search of structure.* Hayes M.H.B., Malkolm R.L. and Swift R.S. (Eds), 1989.
272. Pattersson C., Arsenie I., Ephraim J.P., Boren H., Allard B.//*Sci. Total Environ.*, 1989, 81/82, P.287-296.
273. Pauli F.W.//*Soil fertility*, London, 1967.
274. Paxeus N.//*Studies on aquatic humic substances*, Ph.D. thesis, University of Goeteborg, Sweden, 1985, P.51-57.
275. Paxeus N. and Wedborg M.//*Analyt. Chim. Acta*, 1985, 169, P.87-98.
276. Pearson G.A.//*J. Magn. Res.*, 1977, 27(2), P.265-272.
277. Perdue E.M.//*Geochim. Cosmochim. Acta*, 1984, 48, P.1435-1442.
278. Perdue E.M.//In: *Humic substances in soil, sediment and water.* Aiken G.R., McKnight D.M., Wershaw R.L., MacCarthy P. (Eds.) N.Y., 1985, P.493-525.
279. Perdue E.M., Reuter J.H., Ghosal M.//*Geochim. Cosmochim. Acta*, 1980, 44, P.1841-1851.
280. Perdue E.M., Reuter J.H., Ghosal M.//*Geochim. Cosmochim. Acta*, 1980, 44, P.1841-1851.
281. Perdue E.M., Reuter J.H., Parrish R. S.//*Geochim. Cosmochim. Acta*, 1984, 48, P.1257-1263.
282. Perdue E.M.//*Geochim. Cosmochim. Acta*, 1978, 42, P.1351-1358.
283. Perminova I.V.//*Soil Sci.*, 1999, 164(11), P.834-840.

284. Perminova I.V., Grechishcheva N.Yu., Kovalevskii D.V., Kudryavtsev A.V., Petrosyan V.S., and Matorin D.N.//*Environ. Sci. Technol.*, 2000a. (в печати).
285. Perminova I.V., Grechishcheva N.Yu., Petrosyan V.S.//*Environ. Sci. Technol.*, 1999, 33, P.3781-3787.
286. Perminova I.V., Frimmel F., Kovalevskii D.V., Abbt-Braun G., Kudryavtsev A.V., Hesse S.//*Water Res.*, 1998, 32, 872-881.
287. Perminova I.V., Kudryavtsev A.V., Frimmel F., Abbt-Braun G., Hesse S., Petrosyan V.S.//*Proceedings of the Symposium on the refractory humic substances in the environment (ROSE-II)*, 1-3 August, Karlsruhe, Germany, 2000, P.28-32.
288. Perminova I.V., Lebedeva G.F., D.V. Kovalevsky D.V., Kulikova N.A., Philippova O.I., Danchenko N.N, and Lomonosov M.V.//*Proceedings of the 7th Meeting of IHSS, teil 2, F7*, 1996.
289. Perminova I.V., Yashchenko N.Yu., Petrosyan V.S., Anisimova M.A., Kulikova N.A., Lebedeva G.F., Matorin D.N., Venediktov P.S.//*In: Humic Substances and Transport Processes. Proceedings of IHSS Symposium on Humic Substances and Transport Processes. Oct 26-27, 1997, Anaheim, California. Eds: M.H.B. Hayes, C.E. Clapp, N. Senesi, P.R. Bloom and P.M. Jardine. Publication by SSSA, IHSS, and ASA. 2000b. Chapter 14.*
290. Piccolo A.//*In: The Role of Humic Substances in the Ecosystems and in Environmental Processes. J. Drozd, S.S. Gonet, N. Senesi, and J. Weber (Eds.), IHSS-Polish Society of Humic Substances, Wroclaw, Poland, 1997, P.19-35.*
291. Piccolo A. and Mirabella A.//*Sci. Total Environ.*,1987, 62, P.39-46.
292. Piccolo A. and Camici L.//*Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 1990, 41, P.65-69.
293. Piccolo A., S. Nardi, and G. Concheri.//*European J. Soil Sci.*, 1996, 47, P.319-328.
294. Pinheiro J.P., Mota A.M., Simoes Goncalves M.L.//*Anal. Chim. Acta*, 1994, 284, P.525-537.
295. Piotrowicz S.R., Harvey G.R., Boran D.A. et al.//*Marine Chem.*, 1984, 14, P.333.
296. Pommery J., Imbenotte M., Erb F.//*Environ. Pollut. (Ser. B)*, 1985, 9, P.127-136.
297. Pommery J., M. Imbenotte, and F. Erb.//*Environ. Poll. (Ser. B.)*, 1985, 9, P.127-136.
298. Posner A.M.//*Nature*, 1963, 198, P.1161-1163.
299. Preston C.M. and Blackwell B.A.//*Soil Sci.*, 1985, 139(1), P.88-96.
300. Preston C.M. and Schnitzer M.//*J.Soil Sci.*, 1987, 38, P.667-678.
301. Ramamoorthy S. and Blumhagen K.//*Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1984, 41, P.750-756.

302. Rashid M.A.//*Chemical Geology*, 1974, 13, P.115-123.
303. Rashid M.A.//*Geochemistry of marine humic compounds*. Springer-Verlag, Oxford, 1985, 243P.
304. Ricart M., Villaescusa I., Torre F.//*React. Funct. Polym.*, 1996, 28, P.159-165.
305. Ricca G. and Severini F.//*Geoderma*, 1993, 58, P.233-244.
306. Rice J.A. and MacCarthy P.//*Org. Geochem.*, 1991, 17(5), P.635-648.
307. Right J.R., Schnitzer M.//*Trans. 7th Intern. Congr. Soil Sci.*, 1960, 2, P.120-123.
308. Rise G. and Sulbu B.//*Sci. Total Environ.*, 1989, 81/82, P.137-142
309. Roemelt P.M. and Seitz W.R.//*Environ. Sci. Technol.*, 1982, 16, P.613-616.
310. Ruggiero P., Interesse F.S., Sciacovelli O.//*Geochim. Cosmochim. Acta*, 1979, 43, P.1771-1775.
311. Ruggiero P., Sciacovelli O., Testini C., Interesse F.S.//*Geochim. Cosmochim. Acta*, 1978, 42, P.411-416.
312. Ryan D.K. and Weber J.H.//*Environ. Sci. Tech.*, 1982, 16, P.866-872.
313. Saar R. A. and Weber J. H.//*Can. J. Chem.*, 1979, 57(11), P.1263-1268.
314. Sapek A.//*Roczniki Gleboznawcze*. 1970, 21(2), P.429.
315. Sapek A.//*Rocz. Glebozn.*, 1973, 24, P.519-527.
316. Savant A. and Pandey G.S.//*J. Inst. Chemists (India)*, 1995, 67(1), P.16-17.
317. Sawert A.//*GIT Fachz, Lab.*, 1992, 9, P.875-881.
318. Schmitt P., Kettrup A., Freitag D., Garrison A.W.//*Fresenius J. Anal. Chem.*, 1996, 354, P.915-920.
319. Schmitt-Kopplin, P., Hertkorn, N, Schulten, H.-R., Kettrup, A.//*Environ. Sci. Technol.*, 1998, 32, P.2531-2541.
320. Schnitzer M. and Gupta U.C.//*Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1965, 29, P.274-277.
321. Schnitzer M. and Preston C.M.//*Plant and soil*, 1983, (75), P.201-211.
322. Schnitzer M. and Preston C.M.//*Soil Sci.Soc.Amer.J.*, 1986, 50, P.326-331.
323. Schnitzer M. and Desjardins J.G.//*Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1962, 26, P.362-3368.
324. Schnitzer M. and Desjardins J.G.//*Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1970, 34, P.77-79.
325. Schnitzer M. and Gupta U.C.//*Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1964, 28, P.374-377.
326. Schnitzer M. and Hansen E.H.//*Soil Sci.*, 1970, 109(6), P.333-340.
327. Schnitzer M. and Khan S.U.//*In: Humic substances in the environment*. Marcel Decker, N.Y., 1972, P.12-17.
328. Schnitzer M. and Preston C.M.//*Soil Sci. Soc. Amer. J.*, 1986, 50, P.326-331.
329. Schnitzer M. and Preston C.M.//*Plant and soil*, 1983, 75, P.201-211.
330. Schnitzer M.//*Soil Sci.*, 1974, 117(2), P.94-101.

331. Schubert J.//J. Phys. Chem., 1952, 56, P.113-118.
332. Schubert J. and Richter J. W.//J. Amer. Chem. Soc., 1948, 70, P.4259-4268.
333. Schubert J., Russel E. R., Myers L. S.//J. Biol. Chem., 1950, 185, P.387-398.
334. Schulten H.-R. and Schnitzer M.//Naturwissenschaften, 1993, 80, P.29-30.
335. Schulten H.-R.//J. Anal. Appl. Pyrolysis, 1993, 25, P.97-122.
336. Schulten H.-R.//In: Humic Substances in the Global Environment and Implications on the Human Helth. Senesi N., Miano T.M. (Eds), Elsevier Science, 1994, P.43-56.
337. SDCB (Stability constant data base), IUPAC, 1996.
338. Senesi N.//Analit. Chim. Acta, 1990, 232, P.51-75.
339. Servos M.R., D.C.G. Muir, and G.R.B. Webster.//Aquat. Toxicol.,1989, 14, P.169–184.
340. Shin H. S. and Moon H.//Soil Sci., 1996, 161(4), P.250-256.
341. Shlautman M.A. and Morgan J.J.//Environ. Sci. Technol., 1993, 27, P.2523-2532.
342. Shoolery J.N.//Progress in NMR spectroscopy. 1977.
343. Simms H.S.//J. Amer. Chem. Soc., 1926, 48, P.1231-1261.
344. Simonin S.A., Gloss S.P., Driscoll C.T., Shofield C.L., Kretser W.A., Karcher R.W., Symila J.//Mercury pollution. Integration and synthesys. Watras J.C., Huckabee J.W. (Eds.). Lewis Publishers, 1994, P.457-472.
345. Simpson A.J., Boersma R.E., Kingery W.L., Hicks R.P. and Hayes M.H.B.//In: Application of NMR Spectroscopy for Studies of the Molecular Compositions of Humic Substances. M.H.B. Hayes, W.S. Wilson (Eds.) Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1997, P.46-62.
346. Sips R.//J. Chem. Phys., 1948, 16, P.490-498.
347. Skjemstad J.O., Frost R.L., Barron P.F.//Austr. J. Soil Res., 1983, 21, P.539.
348. Skogerboe R.K. and Wilson S.A.//Anal. Chem., 1981, 53, P.228-232.
349. Söchtig H.//In: Humic substances. Their structure and function in biosphere. Povoledo D., Golterman L. (Eds.) PUDOC, Wageningen, 1972, P.321-335.
350. Solbrig-Lebuhn H.//Zuckerind, 1992, 117, P.979-983.
351. Sotak C.H., Dumoulin C.L., Levy G.C.//Anal. Chem., 1983, 55, P.782-787.
352. Steelink C., Wershaw R.L, Thorn K.A., Wilson M.A.//In: Humic Substances II, In Search of Structure. Hayes M.H.B., MacCarthy P., Malcolm R.L., Swift R.S. (Eds.) 1989, P.281-310.
353. Steelink C.//In: Humic substances in soil, sediment and water. Aiken G.R., McKnight D.M., Wershaw R.L., MacCarthy P. (Eds.), John Wiley & Sons. N.Y., 1985, P.457-475.
354. Steelink, C., Wershaw, R.L., Thorn, K.A. and Wilson, M.A.//In: Humic Substances II. In Search of Structure. Hayes, M.H.B., MacCarthy, P., Malcolm, R.L. and Swift, R.S. Chichester (Eds.)

355. Steinberg C.E.W., Haitzer M., Brueggemann R., Perminova I.V., Yashchenko N.Yu., Petrosyan V.S.//*Int. Rev. Hydrobiol.*, 2000, 85, P.253-266.
356. Stevenson F. J. and Butler I. H. A.//*In: Organic Geochemistry*, New York, 1969, P.534.
357. Stevenson F.J.//*In: Humic substances in soil, sediment and water*. Aiken G.R., McKnight D.M., Wershaw R.L., MacCarthy P. (Eds.), John Wiley & Sons. N.Y., 1985, P.13-52.
358. Stevenson F.J. and Goh K. M.//*Soil Sci.*, 1972, 113(5), 334-345.
359. Stevenson F.J.//*Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reactions*. John Wiley&Sons, New York, 1982, 443P.
360. Stevenson F.J.//*In: Humic substances in soil, sediment and water*. Aiken G.R., McKnight D.M., Wershaw R.L., MacCarthy P. (Eds.), N.Y., John Wiley & Sons, 1985, P.13-52.
361. Stevenson I. L. and Schnitzer M.//*Soil Sci.* 1982, 133(3), P.179-185.
362. Stewart A.J.//*In: Synthetic fossil fuel technologies*. Cowser K.E. (Ed). Boston, Butterworth publ., 1984, P.505-521.
363. Strohal P. and Huljev D.//*Nuclear Technics in Environmental Pollution*. Proc. Symp., Salzburg, Oct. 26-30, 1970; Vienna, IAEA, 1970, P.439-446.
364. Stuermer D. H. and Payne J. R.//*Geochem. Cosmochim. Acta*, 1976, 40, P.1109-1114.
365. Stuermer D.H., Peters K.E., Kaplan I.R.//*Geochim. Cosmochim. Acta*, 1978, 42, P.989-997.
366. Suffet I.H. and MacCarthy P.//*Aquatic Humic Substances, Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. American Chemical Society, Advances in Chemistry Series, 1989.
367. Swan R.L. and Eschenroeder A.//*Fate of chemicals in the environment*. Washington, Amer. Chem. Soc., 1983, Ser. 225, P. 228.
368. Swift R.S.//*In: Humic substances II*. Hayes M.H.B., MacCarthy P., and Swift R.S. (Eds.) John Wiley&Sons Ltd., 1989. P.468-495.
369. Takamutsu T. and Yoshida T.//*Soil Sci.*, 1978, 125(6), P.377-386
370. Tan K.H., Leonard R.A., Bertrand A.R., Wilkinson S.R.//*Soil. Sci. Amer. Proc.*, 1971, 35, P.265-269.
371. Tao Sh.//*Sci. Total Environ.*, 1992, P.139-144.
372. Tate R.L.//*Adv. Microbial. Ecol.*, 1980, 4, P.169-201.
373. Thakur A.K., Munson P.J., Hunston D.L., Rodbard D.//*Anal. Biochem.*, 1980, 103, P.240-254.
374. Thurman E.M.//*Organic geochemistry of natural waters*. Martinus Nijhof/Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1985, 451P.
375. Traina S.J., Spontak D.A., Logan T.J.//*J. Environ. Quality*, 1988, 19, P.221-227.

376. Triay I.R. and Rundberg R.S.//*J. Phys. Chem.*,1987, 91, P.5269-5275.
377. Truitt R.E. and Weber J.H.//*Anal.Chem.*, 1981, 53, P.337-342.
378. Turner D.R., Varney M.S., Whitfield M., Mantoura R.F.C., Riley J.P.//*Geochim. Cosmochim. Acta*, 1986, 50(2), P. 289-297.
379. Van Den Hoop M.A.G.T., Van Leeuwen H.P., Cleven R. F. M. J.//*Anal. Chim. Acta*, 1990, 232, P.141-148.
380. Varney M., Mantoura R.F.C., Whitfield M., Turner D.R, and Riley J.P.//In: Trace metals in sea water. Proceedings of the NATO conference, Sicily,1981, P.751-772.
381. Visser S.A.//*Environ. Sci. Technol.*,1983, 17(7), P.412-417.
382. Voice T.C. and Weber W.J.//*Water Res.*, 1983, 17, P.1433-1441.
383. Vymazal J.//*Hydrobiol.*, 1984, 119, P.171-179.
384. Vymazal J.//*Hydrobiologie*, 1984, 119, P.171-179.
385. Wang C.X., Yediler A., Kettrup A.//*Chemosphere*, 1995, 30, P.501-510.
386. Wang Z.-D., Gamble D.S. and Langford C.H.//*Anal.Chim.Acta*, 1990, 232, P.181-188.
387. Wang Z.-D., Gamble D.S., and Landford C.H.//*Anal. Chim. Acta*, 1991, 244, P.135-143
388. Weber J.//In: Humic substances and their role in the environment. Frimmel F. H., Christman R. F. (Eds.) John Wiley & Sons. N. Y., 1988, P.165-178.
389. Weinstein J.E. and Oris J.T.//*Environ. Toxicol. Chem.*, 1999, 18, P.2087-2094.
390. Wershaw R.L., Mikita M.A. and Steelink C.//*Environ.Sci.Technol.*, 1981, 15(12), P.1461-1463.
391. Wershaw R.L.//In: Humic substances in soil, sediment and water. Aiken G.R., McKnight D.M., Wershaw R.L., MacCarthy P. (Eds.), John Wiley & Sons, N.Y., 1985, Chapter 22.
392. Wilcke W. and Zech W.//*Z. Pflanzenernahr. Bodenk.*, 1997, 160, P.573-579.
393. Wilson M. A., Gillam A. H., Collin P. J.//*Chem. Geol.*, 1983, 60(3-4), P.181-201.
394. Wilson M. A., Philip R. P., Gillam A. H., Tate R. R.//*Geochim. Cosmochim. Acta*, 1983, 47, P.497-502.
395. Wilson M.A. and Goh K.M.//*J. Soil Sci.*, 1983, 34, P.305-313.
396. Wilson M.A., Collin P.J., Tate K.R.//*J. of Soil Sci.*, 1983, 34, P.297-304.
397. Wilson M.A., Heng S., Goh K.M., Pugmire R.J. and Grant D.M.//*J. Soil Sci.*, 1983, 34, P.83-97.
398. Wilson M.A., Pugmire R.J. and Grant D.M.//*Org.Geochem.*, 1983, 5(3), P.121-129.
399. Wilson M.A., Vassallo A.M., Perdue E.M. and Reuter J.H.//*Anal. Chem.*, 1987, 59, P.551-558.

400. Wilson M.A.//In: Humic Substances in Soil and Crop Sciences, Selected Readings. P. MacCarthy (Eds.). Madison, USA, 1990, P.221-260.
401. Wilson M.A.//In: Humic substances. Oxford, Pergamon Press, 1987, P.182-216.
402. Winner R.W.//Aquat. Toxicol., 1984, 5, P.267-274.
403. Winner R.W.//Water Res., 1985,19(4), P.449-455.
404. Wit J.C.M.//Proton and metal ion binding to humic substances. Doctoral thesis, Wageningen Agricultural University, The Netherlands, 1996.
405. Wright J.R. and Schnitzer M.//Nature, 1959, 184(4697), P.1462-1463.
406. Yin Yu., Allen H.A., Huang C.P., Sanders P.F.//Anal. Chim. Acta, 1997, 341, P.73-82.
407. Yonebayashi K. and Hattori T.//Soil Sci. Plant Nutr., 1989, 35, P.383-392.
408. Ziechman W.//Huminstoffen. Probleme, Methoden, Ergebniss. Weicheim, Chemie, 1980, 480P.
409. Zhilin D.M., Perminova I.V., Petrosyan V.S.//8th Meeting of IHSS, 9-14 Sept. 1996, Wroclaw, Poland. Abstracts, P.259.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 3.1

Первичные данные по элементному составу препаратов
гумусовых кислот (СНН и О – данные элементного анализатора;
S и зольность – ручное сжигание; H₂O – по обратному набору веса)

Препарат	Содержание, масс. %						
	С	Н	Н	О	S	Ash	H ₂ O
ГФК торфа							
RHF-T10L94	48.9	4.5	2.1	27.5*	1.4	0.8	
RHF-T10L98	37.6	3.6	2.2			22.5	
RHF-T1H94	48.5	5.1	1.9	36.2	2.8	4.7	
RHF-T3L98	53.8	4.8	1.8			4.7	
RHF-T4H94	48.2	5.0	2.3	36.8*	1.1	1.5	7.2
RHF-T4H98	53.3	4.7	3.3		2.4	1.1	
RHF-T5H94	48.2	4.9	2.1	33.1*	1.0	3.0	7.9
RHF-T5H98	48.4	4.8	1.8	36.3*		1.5	
RHF-T6H94	48.1	4.8	1.2	35.9	1.9	3.3	7.4
RHF-T6H98	49.3	4.6	1.2			1.4	
RHF-T7H94	47.6	4.8	1.4	34.2	2.8	2.0	9.2
RHF-T7H98	47.3	4.3	1.0			8.9	
RHF-TH94	50.1	4.5	1.6	35.7*	1.4	1.4	9.2
RHF-TMu4H	49.7	5.0	1.9	34.8	2.9	0.0	8.8
RHF-TTL94	48.9	4.3	2.4		1.6	2.1	8.3
RHF-TTL98	48.8	4.0	1.8			3.8	
ГК торфа							
RHA-T10L98	49.9	5.0	2.0			0.0	
RHA-T3L98	52.0	4.6	2.3			2.4	
RHA-T4H98	47.8	4.5	2.0			4.5	
RHA-T5H98	48.4	4.6	2.1			4.4	
RHA-T6H98	49.4	4.6	1.5			0.5	
RHA-T7H98	52.1	4.7	1.3			0.0	
RHA-TH8	52.4	5.2	1.7			4.7	
RHA-THTO	46.4	4.6	2.5	29.9*		12.3	10.1
RHA-TSkL00	47.5	4.2	2.5			11.3	
RHA-TTL98	50.1	4.4	2.1			2.0	

Препарат	Содержание, масс. %						
	C	H	N	O	S	Ash	H ₂ O
ФК торфа							
PFA-T10L98	47.1	4.0	1.2			1.8	
PFA-T3L98	46.7	3.9	0.5			0.0	
PFA-T4H98	49.3	4.4	0.5			0.0	
PFA-T5H98	44.7	4.7	1.9			0.8	
PFA-T6H98	45.2	4.8	0.5			11.1	
PFA-T7H98	46.1	4.7	0.7			3.6	
PFA-TSkL00	38.1	3.7	1.6			11.2	
PFA-TTL98	46.9	3.8	1.1			1.4	
РОВ торфа							
PDOM-TH	42.2	5.3	1.7		2.4	1.1	11.0
PDOM-TT	43.8	5.5	1.0			2.6	
ГФК почв							
SHF-Co94	41.0	4.6	3.3	32.5/32.0*	6.4	16.0	7.2
SHF-CtK98	44.4	3.3	2.5			2.8	
SHF-CtV98	34.4	3.0	1.7			21.0	
SHF-Gw98	39.4	4.0	3.1			15.7	
SHF-PMu9	32.5	3.9	1.6		2.6	27.6	
SHF-TMu12	45.5	4.8	2.8		4.3	5.9	
ГК почв							
SHA-Cm94	51.9	3.7	4.4	29.9*	2.7	7.0	11.0
SHA-Cm98	55.1	3.4	4.0			1.2	
SHA-CtK98	41.9	2.8	2.0			27.0	
SHA-CtV94	49.9	3.4	3.7	28.9*		7.4	11.1
SHA-Gp94	40.1	4.4	3.8		1.6	9.0	11.6
SHA-Gw94	45.4	4.5	4.6	32.4*	2.0	10.1	9.8
SHA-Pg94	39.0	4.1	3.3	30.5*	0.8	22.2	9.4
SHA-Pg96	44.7	4.4	3.3			11.3	
SHA-Pp94	41.5	4.7	3.7			9.1	11.2
SHA-Pp96	38.0	4.4	3.9			21.6	
SHA-Pw94	43.3	4.2	4.4	32.1*	2.5	11.7	11.3
SHA-Pw96	45.3	5.1	3.8			10.0	
SHA-Pw98	48.9	5.2	3.8			7.8	
SHA-PwN	52.2	4.9	3.7	32.6*	2.1	1.7	7.1
SHA-K1	28.0	3.0	2.3			32.3	

Препарат	Содержание, масс. %						
	C	H	N	O	S	Ash	H ₂ O
ФК почв							
SFA-Cm94	43.5	4.4	3.1	36.8		11.2	10.9
SFA-Cm98	47.5	4.2	2.5			12.3	
SFA-Ct94	44.7	4.0	3.3	39.8		8.9	8.4
SFA-Gp94	38.2	4.2	3.0	38.8		16.5	
SFA-Gw94	43.9	4.7	3.4	40.3		7.7	9.8
SFA-Pg94	41.4	4.2	2.8	41.0		11.0	9.0
SFA-Pg96	43.8	4.1	2.6			5.7	
SFA-Pp94	41.2	4.5	3.9	40.1		11.1	
SFA-Pp96	45.5	4.4	4.7			4.5	
SFA-Pw94	38.2	3.8	1.7	39.2		17.7	8.4
SFA-Pw96	43.9	4.3	3.0			7.1	
SFA-Pw98	45.8	4.1	1.4			2.2	
ГФК почвенного раствора							
SDHF-Pg96	30.6	3.6	0.3			30.8	
SDHF-Pp96	22.0	3.0	0.1			46.7	
SDHF-Pw96	13.5	2.2	0.1			60.4	
ГК углей							
CHA-AGK	49.0	4.1	0.5	38.2*	1.8	16.6	10.3
CHA-ALD	43.1	3.8	0.7			27.0	
CHA-RO	49.3	4.1	1.1			9.5	
CHA-K2	50.0	2.4	0.4			19.3	
CHA-K3	41.2	2.5	1.2			26.7	
CHA-K4	29.9	2.8	0.5			39.8	
ГФК природных вод							
AHF- RI	48.5	5.1	1.0		1.8	3.6	
AHF- RMX2/8	41.0	4.2	1.3		1.0	14.4	
AHF- RMX8	45.0	4.5	1.2		2.7	11.0	6.3
AHF- RND3	32.4	3.7	1.4	28.6	3.0	29.8	6.3
AHF-MMu7	18.8	2.6	0.3		1.3	48.0	
AHF-MMu8	37.5	4.0	0.5		3.2	18.0	
AHF-RMC	42.1	4.9	2.4		5.3	4.8	
AHF-RMX2	32.3	3.3	0.7		1.2	31.8	
AHF-RND14	14.2	2.2	0.1			57.6	

Препарат	Содержание, масс. %						
	С	Н	Ν	О	Ѕ	Ash	H ₂ O
РОВ природных вод							
ADOM-SMu4	35.2	3.8	0.5		0.9	19.6	11.1
ADOM-SMu8	30.5	3.8	2.2	27.8	1.2	31.0	9.6
ADOM-SSh1	26.9	2.9	0.1		1.3	42.1	
ГФК донных отложений							
BHF-RLuh	25.9	3.3	1.9			35.0	
BHF-RND13	45.3	5.1	1.9		5.2	4.0	
BHF-SMu2	45.7	4.6	2.0		3.1	6.0	
ГК донных отложений							
BHA-SSk00	48.6	5.4	3.3			7.5	
ФК донных отложений							
BHA-SSk00	39.9	3.5	2.4			7.3	

* – по данным ИВС.

Данные по элементному составу препаратов гумусовых кислот,
исправленные на зольность и влажность, и атомные отношения
(содержание О рассчитано по разности, содержание H₂O 8%)

Препарат	Содержание, % масс.							
	С	Н	N	О	S	H/C	O/C	C/N
ГФК торфа								
PHF-T10L94	53.6	3.9	2.3	38.7	1.6	0.88	0.54	28
PHF-T10L98	54.2	3.8	3.2	37.8	1.0	0.85	0.52	20
PHF-T1H94	55.5	4.8	2.2	34.3	3.2	1.03	0.46	30
PHF-T3L98	61.5	4.5	2.0	31.0	1.0	0.87	0.38	35
PHF-T4H94	52.8	4.6	2.5	38.9	1.2	1.02	0.54	25
PHF-T4H98	58.6	4.2	3.6	30.9	2.7	0.86	0.40	20
PHF-T5H94	54.1	4.5	2.4	37.8	1.1	1.00	0.52	27
PHF-T5H98	53.5	4.3	2.0	39.2	1.0	0.97	0.55	31
PHF-T6H94	53.9	4.4	1.3	38.2	2.1	0.96	0.52	47
PHF-T6H98	54.3	4.1	1.3	39.2	1.0	0.91	0.54	49
PHF-T7H94	53.6	4.3	1.6	37.4	3.1	0.99	0.54	39
PHF-T7H98	56.9	4.1	1.3	36.8	1.0	0.87	0.48	53
PHF-TH94	56.0	3.9	1.8	36.8	1.5	0.87	0.51	36
PHF-TMu4H	54.5	4.4	2.0	35.9	3.1	1.00	0.50	31
PHF-TTL94	54.6	3.7	2.7	37.3	1.7	0.83	0.52	24
PHF-TTL98	55.3	3.5	2.1	38.1	1.0	0.76	0.52	31
ГК торфа								
PHA-T10L98	54.3	4.4	2.2	38.1	1.0	0.98	0.53	29
PHA-T3L98	58.0	4.2	2.6	34.2	1.0	0.87	0.44	26
PHA-T4H98	54.6	4.2	2.3	37.9	1.0	0.92	0.52	28
PHA-T5H98	55.2	4.3	2.4	37.1	1.0	0.93	0.50	27
PHA-T6H98	54.0	4.1	1.7	39.3	1.0	0.91	0.55	38
PHA-T7H98	56.7	4.1	1.4	36.8	1.0	0.87	0.49	46
PHA-TH8	60.0	4.9	2.0	32.1	1.0	0.99	0.40	36
PHA-THTO	59.8	4.5	3.2	31.6	1.0	0.96	0.43	22
PHA-TSkL00	58.9	4.2	3.1	32.9	1.0	0.85	0.42	22
PHA-TTL98	55.6	3.9	2.3	37.2	1.0	0.83	0.50	28

Препарат	Содержание, % масс.							
	C	H	N	O	S	H/C	O/C	C/N
ФК торфа								
PFA-T10L98	52.2	3.4	1.3	42.1	1.0	0.78	0.60	48
PFA-T3L98	50.8	3.2	0.5	44.5	1.0	0.76	0.66	120
PFA-T4H98	53.6	3.9	0.5	41.0	1.0	0.86	0.57	127
PFA-T5H98	49.0	4.2	2.0	43.8	1.0	1.02	0.67	28
PFA-T6H98	55.9	4.8	0.6	37.6	1.0	1.03	0.50	101
PFA-T7H98	52.1	4.3	0.8	41.7	1.0	1.00	0.60	75
PFA-TSkL00	47.1	3.4	2.0	46.4	1.0	0.88	0.74	27
PFA-TTL98	51.7	3.2	1.2	42.9	1.0	0.74	0.62	49
РОВ торфа								
PDOM-TH	48.0	4.7	1.9	42.6	2.8	0.67	1.18	29
PDOM-TT	49.0	5.2	1.1	43.8	1.0	0.67	1.27	52
ГФК почв								
SHF-Co94	53.4	5.0	4.3	29.0	8.3	1.10	0.39	15
SHF-CtK98	49.7	2.7	2.8	43.7	1.0	0.65	0.66	20
SHF-CtV98	48.4	3.0	2.4	45.1	1.0	0.75	0.70	23
SHF-Gw98	51.6	4.1	4.1	39.2	1.0	0.95	0.57	15
SHF-PMu9	50.4	4.7	2.5	38.4	4.0	1.11	0.57	24
SHF-TMu12	52.8	4.5	3.3	34.3	5.0	1.03	0.49	19
ГК почв								
SHA-Cm94	63.3	3.0	5.4	25.1	3.2	0.66	0.34	14
SHA-Cm98	60.7	2.7	4.4	31.2	1.0	0.54	0.39	16
SHA-CtK98	64.4	3.0	3.0	28.6	1.0	0.56	0.33	25
SHA-CtV94	61.2	2.7	4.5	30.6	1.0	0.62	0.42	16
SHA-Gp94	50.5	4.0	4.8	38.7	2.0	1.06	0.63	12
SHA-Gw94	56.7	4.3	5.8	30.7	2.5	0.96	0.43	12
SHA-Pg94	56.9	4.5	4.9	32.6	1.1	1.00	0.45	14
SHA-Pg96	55.3	4.3	4.1	35.3	1.0	0.93	0.48	16
SHA-Pp94	52.1	4.3	4.7	37.9	1.0	1.09	0.60	13
SHA-Pp96	54.0	5.0	5.5	34.5	1.0	1.11	0.48	11
SHA-Pw94	56.3	3.9	5.7	30.9	3.3	0.92	0.46	12
SHA-Pw96	55.2	5.1	4.6	34.1	1.0	1.10	0.46	14
SHA-Pw98	58.1	5.1	4.5	31.3	1.0	1.05	0.40	15
SHA-PwN	57.2	4.5	4.0	31.9	2.3	0.93	0.41	17
SHA-K1	47.0	3.6	3.9	44.5	1.0	0.71	0.92	14

Препарат	Содержание, % масс.							
	C	H	N	O	S	H/C	O/C	C/N
ФК почв								
SFA-Cm94	55.9	4.0	4.0	35.1	1.0	0.87	0.47	16
SFA-Cm98	59.6	4.2	3.2	32.1	1.0	0.85	0.40	22
SFA-Ct94	54.0	3.7	4.0	37.3	1.0	0.81	0.52	16
SFA-Gp94	50.6	4.4	3.9	40.0	1.0	1.05	0.59	15
SFA-Gw94	53.2	4.3	4.1	37.3	1.0	0.98	0.53	15
SFA-Pg94	51.8	4.0	3.4	39.7	1.0	0.92	0.58	18
SFA-Pg96	50.8	3.7	3.0	41.4	1.0	0.88	0.61	19
SFA-Pp94	50.9	4.5	4.8	38.8	1.0	1.06	0.57	12
SFA-Pp96	52.0	4.0	5.4	37.7	1.0	0.91	0.54	11
SFA-Pw94	51.7	3.9	2.2	41.2	1.0	0.90	0.60	27
SFA-Pw96	51.7	4.0	3.5	39.7	1.0	0.94	0.58	17
SFA-Pw98	51.0	3.6	1.5	42.9	1.0	0.84	0.63	40
ГФК почвенного раствора								
SDHF-Pg96	49.9	4.4	0.4	44.3	1.0	0.67	1.06	146
SDHF-Pp96	48.5	4.6	0.2	45.6	1.0	0.71	1.14	283
SDHF-Pw96	42.9	4.1	0.3	51.7	1.0	0.90	1.15	167
ГК углей								
CHA-AGK	67.0	4.1	0.7	25.8	2.5	0.79	0.32	112
CHA-ALD	66.4	4.5	1.0	27.1	1.0	0.81	0.31	77
CHA-RO	59.8	3.9	1.3	34.1	1.0	0.78	0.43	55
CHA-K2	68.8	2.0	0.5	27.7	1.0	0.35	0.30	167
CHA-K3	63.0	2.5	1.8	31.7	1.0	0.48	0.38	41
CHA-K4	57.2	3.7	1.0	37.1	1.0	0.77	0.49	69
ГФК природных вод								
AHF- RI	54.9	4.7	1.1	37.2	2.0	1.04	0.51	57
AHF-RMX2/8	52.8	4.3	1.6	40.1	1.3	0.97	0.57	38
AHF- RMX8	54.3	4.5	1.5	36.4	3.3	0.95	0.48	43
AHF- RND3	50.7	4.7	2.2	37.7	4.7	1.05	0.52	26
AHF-MMu7	42.7	4.0	0.7	49.7	3.0	1.12	0.87	74
AHF-MMu8	50.7	4.2	0.7	40.1	4.3	1.00	0.59	83
AHF-RMC	48.3	4.6	2.7	38.3	6.0	1.15	0.59	21
AHF-RMX2	53.6	4.0	1.1	39.3	2.0	0.88	0.55	55
AHF-RND14	41.4	3.7	0.3	53.7	1.0	1.07	0.97	166

Препарат	Содержание, % масс.							
	С	Н	N	О	S	H/C	O/C	C/N
РОВ природных вод								
ADOM-SMu4	50.8	3.7	0.7	43.4	1.3	0.64	0.87	85
ADOM-SMu8	51.3	4.6	3.6	38.5	2.0	0.56	1.08	17
ADOM-SSh1	53.8	4.0	0.2	40.9	1.0	0.57	0.89	314
ГФК, ГК и ФК донных отложений								
BHF-RLuh	45.5	4.3	3.4	45.8	1.0	0.75	1.13	16
BHF-RND13	51.5	4.8	2.1	35.7	5.9	0.52	1.12	28
BHF-SMu2	53.1	4.3	2.3	36.7	3.7	0.52	0.97	27
BHA-SSk00	57.5	5.3	3.8	32.3	1.0	0.42	1.1	17
BFA-SSk00	47.1	3.1	2.9	45.9	1.0	0.73	0.79	19

Интегральные интенсивности диапазонов ^{13}C ЯМР спектров
препаратов при различных временах релаксационной задержки

Препарат	Спектральная область, м.д.						
	220-185	185-167	167-145	145-108	108-90	90-50	50-5
I_1							
SHF-Pw94	0.7	13.1	12.6	32.2	2.5	17.3	21.6
SHF-PwN	1.8	9.3	10.4	32.1	2.4	19.3	24.7
PHF-T1094	1.4	8.3	8	26.6	4.7	28.7	22.2
PHF-T594	1.5	9.4	12.8	23.1	2.6	22.3	28.4
PHF-T694	1.2	8.8	10.3	31	2.3	26.5	20
PHF-T794	1.9	10.7	12.2	31.2	3.9	21.9	18.2
PHF-TT94	1.1	9.4	10.7	29.1	5.1	22	22.5
PHF-TH94	1.6	10.6	11.4	29	3	25.4	18.9
SFA-Pw94	2.6	11.6	8.9	22	1.2	25	28.6
SFA-Pg94	2.9	11.3	9.5	24.9	1.9	25.7	23.7
AHF-RI	1.2	11.6	9.3	25.3	2.2	26.9	23.5
CHA-ALD	2.1	9.2	10	40.9	0	9.1	28.6
I_2							
PHF-T694	1.5	11.1	12.9	38.2	1	20	15.4
PHF-TH94	1.3	14.4	12.8	29.6	2.9	19.8	19.1
SFA-Pw94	2.2	16.2	10.6	22.9	3.1	19.6	25.4
SFA-Pg94	2.8	16	11.6	29.9	1.4	17.3	21
AHF-RI	2.5	14.5	11.3	23.9	2.5	22.2	23.1
CHA-ALD	1.1	11.9	12.7	43.2	0	7.5	23.5
I_3							
SHF-Pw94	0.9	16.8	13	33	2.7	15.4	18.2
SHF-PwN	2.1	14.3	14	33.7	1.9	13.5	20.5
PHF-T1094	1.5	14.2	14.3	32	3.2	16.7	18.1
PHF-T594	1.7	14.5	13.7	23.8	2.8	18.8	24.7
PHF-T694	1.5	13.3	13.9	36	3	16.5	15.8
PHF-T794	1.8	14.6	14.6	33.3	3.8	16.3	15.6
PHF-TT94	1.2	14.3	13.9	31	4.2	16.2	19.2
PHF-TH94	1.8	14.4	15.5	29.5	2.9	19	16.9

Препарат	Спектральная область, м.д.						
	220-185	185-167	167-145	145-108	108-90	90-50	50-5
I_4							
SHF-Pw94	0.9	17.1	12.5	32.4	2.1	16.5	18.6
SHF-PwN	1	14.2	14	33.9	3.3	13.3	20.3
PHF-T594	1.3	12.1	16	24.6	1.2	22.1	22.7
PHF-T694	2.3	13.4	14.2	37.5	0.9	17.5	14.2
PHF-T794	4.7	15.1	15.8	33.1	2.4	14.2	14.8
PHF-T1094	2.1	16.1	15.4	33.1	1.3	15.7	16.4
PHF-TT94	1.5	13.7	15.4	30.1	5	16.1	18.1
PHF-TH94	0.7	15.3	14.5	28.9	2.7	17.7	20.2
SFA-Pw94	2.7	19.6	12	23	2	17	23.7
SFA-Pg94	3	18	12	29	2	17	19
AHF-RI	2	18	12	26	3	19	20
CHA-ALD	1	15	13	43	0	7	21
I_8							
PHF-T694	3.1	13.9	13.5	37.5	0.6	17.2	14.2
PHF-TH94	1.2	15	14.3	28.7	2.1	17.5	21.2
SFA-Pw94	2	20	12.3	23.4	2.7	17.5	22.1
SFA-Pg94	2.2	18.3	13.1	28.4	2	16.9	19.1
AHF-RI	1.2	17.5	13.4	25.8	3.6	18.6	19.9
CHA-ALD	0.9	15.1	13	43.4	0	7.1	20.5

Описательные статистики ^{13}C ЯМР-данных по распределению C в структуре гумусовых кислот (содержание C в составе фрагментов дано в % от общего C)

Фрагмент	\bar{x}	Med	X_{\min}	X_{\max}	Q_{25}	Q_{75}	s^2	A	E	W
ГФК торфа (n = 15)										
C=O	3.0	2.4	0.5	7.3	2.0	4.7	3.1	1.09	1.07	0.895
COO	14.8	15.3	10.8	17.3	13.4	16.6	3.8	-0.73	-0.26	0.924
C _{Ar} O	12.2	12.7	6.9	17.3	8.6	15.3	12.2	-0.04	-1.36	0.941
C _{Ar}	30.0	29.4	24.8	38.3	25.9	33.2	18.0	0.47	-0.88	0.933
OCO	3.8	3.5	0.5	6.9	2.9	5.6	3.8	0.10	-0.67	0.962
CHO	12.8	11.0	7.5	22.7	9.0	16.2	20.0	0.87	-0.05	0.913
CH ₂ O	2.8	2.6	1.3	5.5	2.1	3.3	1.1	1.19	1.63	0.916
CH ₃ O	3.1	3.1	1.7	4.5	2.4	3.7	0.7	0.12	-0.84	0.971
CH _n	17.5	17.4	13.8	20.9	16.1	19.1	3.5	0.03	-0.15	0.973
$\Sigma\text{C}_{\text{Ar}}$	42.2	45.5	33.4	49.5	35.4	46.9	37.1	-0.46	-1.78	0.816
$\Sigma\text{C}_{\text{Carb}}$	19.4	19.3	11.4	31.5	14.5	26.1	37.5	0.57	-0.74	0.935
ГК торфа (n = 8)										
C=O	3.0	2.6	1.6	4.5	1.7	4.1	1.5	0.15	-2.21	0.875
COO	13.6	14.1	8.6	17.5	11.0	16.1	9.3	-0.51	-0.37	0.976
C _{Ar} O	11.1	9.2	6.7	20.6	7.2	16.5	28.2	1.29	0.28	0.801
C _{Ar}	32.4	32.2	25.0	37.9	31.7	35.4	15.8	-0.82	2.13	0.905
OCO	2.5	2.3	1.1	4.3	1.7	3.7	1.3	0.63	-0.78	0.932
CHO	10.9	12.3	3.7	14.2	8.2	14.1	14.2	-1.42	1.61	0.839
CH ₂ O	2.5	2.7	1.0	3.4	2.2	3.3	0.6	-1.20	2.00	0.895
CH ₃ O	4.1	4.0	2.6	6.5	3.4	4.4	1.4	1.27	3.02	0.887
CH _n	19.8	20.5	13.3	25.7	14.8	22.7	19.3	-0.46	-0.72	0.938
$\Sigma\text{C}_{\text{Ar}}$	43.5	42.0	33.1	58.6	38.8	48.6	65.5	1.01	1.62	0.925
$\Sigma\text{C}_{\text{Carb}}$	16.0	17.6	6.4	20.7	12.4	20.1	26.8	-1.17	0.81	0.880
ФК торфа (n = 6)										
C=O	2.6	2.6	1.1	3.9	1.6	3.5	1.2	-0.12	-1.75	0.954
COO	13.1	12.0	9.8	18.9	10.9	15.2	11.3	1.20	0.81	0.890
C _{Ar} O	7.8	7.6	4.9	10.9	6.9	8.8	4.1	0.26	0.63	0.980
C _{Ar}	24.9	24.4	21.6	30.2	24.0	25.1	8.1	1.41	3.32	0.846
OCO	6.3	6.0	3.7	9.6	5.4	6.9	3.8	0.79	1.81	0.947
CHO	21.1	24.4	12.3	26.6	12.7	26.1	45.0	-0.89	-1.87	0.751
CH ₂ O	3.3	3.0	2.2	5.6	2.3	3.5	1.6	1.67	3.08	0.832

Фрагмент	\bar{x}	Med	X_{\min}	X_{\max}	Q_{25}	Q_{75}	s^2	A	E	W
CH ₃ O	2.5	2.3	1.2	4.1	1.8	3.2	1.1	0.53	-0.39	0.973
CH _n	18.6	19.9	11.9	24.9	13.2	21.6	26.1	-0.31	-1.58	0.924
ΣC_{Ar}	32.7	32.2	26.5	38.9	31.3	34.9	16.8	0.07	1.12	0.963
ΣC_{Carb}	30.6	35.6	18.8	37.2	20.5	36.1	73.1	-0.96	-1.77	0.727

ГФК почв (n = 5)

C=O	2.0	1.7	0.8	3.8	1.5	2.2	1.3	1.16	1.88	0.925
COO	14.5	15.4	9.0	18.4	12.9	16.8	13.5	-0.82	0.07	0.955
C _{Ar} O	9.4	8.2	4.4	14.0	7.4	13.1	16.3	0.06	-2.01	0.921
C _{Ar}	33.6	32.6	26.2	41.7	31.9	35.8	32.3	0.26	0.78	0.979
OCO	4.1	3.0	3.0	7.4	3.0	4.0	3.6	1.98	3.90	0.690
CHO	9.9	11.0	4.8	12.0	10.5	11.0	8.3	-2.03	4.35	0.725
CH ₂ O	2.7	2.7	1.7	3.7	2.6	3.0	0.5	-0.25	1.25	0.972
CH ₃ O	3.8	3.6	0.7	7.4	3.2	4.0	5.8	0.54	1.89	0.938
CH _n	20.0	18.7	12.1	28.9	14.2	26.1	53.5	0.26	-2.47	0.920
ΣC_{Ar}	43.1	44.0	36.9	49.1	40.3	45.0	21.7	-0.11	-0.43	0.985
ΣC_{Carb}	16.7	18.0	9.5	20.5	16.7	18.7	18.0	-1.66	3.16	0.844

ГК почв (n = 16)

C=O	2.2	2.1	1.0	4.0	1.7	2.8	0.7	0.41	0.02	0.952
COO	16.3	15.6	14.3	19.0	15.0	17.4	2.4	0.57	-0.95	0.899
C _{Ar} O	10.6	11.0	7.0	13.0	9.4	12.4	4.0	-0.50	-0.69	0.924
C _{Ar}	33.6	32.5	21.0	48.1	29.3	37.9	56.2	0.54	-0.19	0.949
OCO	2.7	2.5	2.0	4.1	2.0	3.0	0.6	0.75	-0.82	0.790
CHO	9.0	9.7	4.0	12.2	8.0	10.3	4.8	-0.65	0.40	0.947
CH ₂ O	2.2	2.1	0.8	3.5	2.0	2.7	0.5	-0.21	0.16	0.956
CH ₃ O	4.7	4.8	3.0	6.6	4.0	5.4	0.9	0.13	-0.17	0.979
CH _n	18.7	18.3	12.6	26.0	15.5	21.9	17.2	0.21	-0.96	0.963
ΣC_{Ar}	44.2	44.7	31.0	56.8	37.7	50.2	63.7	-0.01	-0.92	0.961
ΣC_{Carb}	13.9	14.0	7.6	19.0	12.0	15.9	9.9	-0.29	-0.13	0.966

ФК почв (n = 4)

C=O	3.1	3.3	2.0	4.0	2.6	3.7	0.7	-0.83	1.32	0.962
COO	20.1	19.7	18.0	23.0	18.8	21.4	4.4	1.14	2.15	0.915
C _{Ar} O	9.4	8.7	7.0	13.1	7.3	11.5	7.6	1.04	-0.03	0.910
C _{Ar}	24.1	24.5	19.0	28.2	21.3	26.9	15.0	-0.62	0.52	0.981
OCO	2.3	2.2	2.0	3.0	2.0	2.7	0.2	1.52	1.98	0.814
CHO	11.5	10.5	9.9	15.0	10.0	13.0	5.8	1.76	3.06	0.779
CH ₂ O	2.5	2.5	2.0	3.0	2.2	2.8	0.2	0.36	1.28	0.976

Фрагмент	\bar{x}	Med	X_{\min}	X_{\max}	Q_{25}	Q_{75}	s^2	A	E	W
CH ₃ O	4.1	4.1	3.5	4.5	3.8	4.4	0.2	-0.65	0.71	0.979
CH _n	22.5	23.6	17.6	25.1	19.8	25.1	12.6	-1.15	0.21	0.852
ΣC_{Ar}	33.4	33.2	26.0	41.3	29.6	37.3	39.1	0.22	1.52	0.948
ΣC_{Carb}	16.3	15.0	14.2	21.0	14.4	18.2	10.2	1.85	3.46	0.761
ГК углей (n = 5)										
C=O	2.0	2.7	0.5	3.1	1.0	2.9	1.4	-0.64	-2.68	0.831
COO	16.3	16.6	15.0	17.7	15.2	16.9	1.3	-0.06	-2.13	0.916
C _{Ar} O	15.8	17.9	10.0	19.3	13.0	19.0	17.1	-0.83	-1.63	0.851
C _{Ar}	45.9	47.8	38.0	52.8	43.0	48.0	31.6	-0.42	-0.15	0.965
OCO	1.4	0.0	0.0	4.8	0.0	2.1	4.5	1.43	1.21	0.762
CHO	1.8	1.1	0.0	6.9	0.0	1.1	8.4	2.04	4.29	0.703
CH ₂ O	0.6	1.0	0.1	1.0	0.1	1.0	0.2	-0.61	-3.33	0.684
CH ₃ O	2.7	2.7	0.2	6.0	1.6	3.0	4.6	0.80	1.36	0.953
CH _n	13.3	10.8	5.2	21.0	8.9	20.8	51.7	0.25	-2.68	0.865
ΣC_{Ar}	61.8	57.8	56.0	71.9	57.3	65.9	47.2	0.98	-0.95	0.847
ΣC_{Carb}	3.8	1.2	1.0	12.7	1.0	3.3	25.5	2.05	4.22	0.681
Объединенная выборка (n = 58)										
C=O	2.6	2.4	0.5	7.3	1.7	3.2	1.6	1.046	2.087	–
COO	15.4	15.4	8.6	23.0	14.2	17.0	7.7	-0.258	0.538	–
C _{Ar} O	11.1	10.3	4.4	20.6	8.1	13.1	14.1	0.636	-0.162	–
C _{Ar}	32.0	31.8	19.0	52.8	25.9	35.3	55.6	0.826	0.357	–
OCO	3.3	3.0	0.0	9.6	2.0	4.1	3.8	0.884	1.065	–
CHO	11.1	10.5	0.0	26.6	8.0	12.5	33.3	0.780	1.339	–
CH ₂ O	2.4	2.5	0.1	5.6	2.0	3.0	1.1	0.452	1.704	–
CH ₃ O	3.7	3.8	0.2	7.4	2.7	4.5	2.0	0.075	0.384	–
CH _n	18.4	18.3	5.2	28.9	15.9	21.6	21.9	-0.206	0.168	–
ΣC_{Ar}	43.1	42.8	26.0	71.9	34.9	48.0	90.4	0.657	0.495	–
ΣC_{Carb}	16.8	15.6	1.0	37.2	12.5	20.1	63.8	0.612	1.070	–

–, X_{\min} , X_{\max} и Med – средние, мин. и макс. значения и медиана;

Q_{25} и Q_{75} – нижние и верхние квартили;

A и E – коэффициенты асимметрии и эксцесса; W – значение критерия Уилка-Шапиро.

* Жирным шрифтом выделены $W < (W_{0.05})_{\text{крит}}$.

Описательные статистики ПМР-данных по распределению Н
в структуре гумусовых кислот (содержание Н в составе фрагментов
дано в % от общего Н)

Фрагмент	\bar{x}	Med	X_{\min}	X_{\max}	Q_{25}	Q_{75}	s^2	A	E	W
ГФК торфа (n = 13)										
COOH	8.8	9.0	6.0	10.0	8.0	10.0	1.7	-0.84	-0.02	0.831
ArOH	8.1	9.0	3.0	13.0	8.0	9.0	7.2	-0.46	0.40	0.909
ArH	13.2	13.0	9.0	20.0	10.0	16.0	11.1	0.38	-0.17	0.914
AlkOH	8.5	9.0	2.0	15.0	9.0	9.0	9.9	-0.47	2.31	0.757
CHO	32.6	32.0	29.0	38.0	30.0	35.0	9.1	0.31	-1.32	0.906
AlkH	29.2	29.0	22.0	38.0	28.0	31.0	13.1	0.62	3.18	0.898
H _{Ar}	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.002	0.03	-0.79	0.977
H _{Carb}	0.4	0.4	0.4	0.5	0.4	0.5	0.001	0.43	-0.95	0.934
ГК торфа (n = 8)										
COOH	7.3	7.0	6.0	11.0	6.0	7.5	2.8	1.94	4.18	0.753
ArOH	10.9	10.5	6.0	17.0	9.0	12.5	11.6	0.58	0.59	0.954
ArH	14.8	14.5	12.0	18.0	13.0	16.5	4.8	0.10	-1.09	0.943
AlkOH	4.3	3.5	0.0	9.0	2.5	6.5	9.1	0.48	-0.47	0.946
CHO	32.1	32.5	24.0	38.0	29.5	35.5	21.0	-0.63	-0.11	0.960
AlkH	31.0	31.0	29.0	35.0	29.5	31.5	3.7	1.28	2.31	0.869
H _{Ar}	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.001	0.29	-0.98	0.931
H _{Carb}	0.4	0.4	0.3	0.5	0.4	0.4	0.001	-0.91	0.82	0.904
ФК торфа (n = 7)										
COOH	8.9	9.0	6.0	11.0	7.0	10.0	3.1	-0.71	-0.53	0.919
ArOH	5.7	6.0	2.0	9.0	4.0	7.0	5.2	-0.33	0.06	0.981
ArH	12.0	12.0	8.0	16.0	11.0	13.0	5.7	0.00	2.07	0.923
AlkOH	8.6	8.0	3.0	16.0	5.0	11.0	19.6	0.54	-0.20	0.958
CHO	36.6	37.0	29.0	43.0	33.0	41.0	22.6	-0.28	-0.34	0.986
AlkH	27.4	27.0	16.0	38.0	23.0	34.0	56.3	-0.09	-0.64	0.977
H _{Ar}	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.001	-0.80	0.46	0.918
H _{Carb}	0.5	0.5	0.4	0.6	0.4	0.6	0.006	-0.31	-1.43	0.945
ГК почв (n = 6)										
COOH	7.8	8.0	4.0	11.0	7.0	9.0	5.4	-0.57	1.50	0.955
ArOH	7.7	8.0	5.0	9.0	7.0	9.0	2.7	-0.86	-0.30	0.821
ArH	13.7	13.0	10.0	20.0	12.0	14.0	11.9	1.44	2.72	0.866
AlkOH	8.7	6.5	4.0	21.0	5.0	9.0	39.5	2.06	4.47	0.747

Фрагмент	\bar{x}	Med	X_{\min}	X_{\max}	Q_{25}	Q_{75}	s^2	A	E	W
CHO	26.8	27.0	22.0	32.0	24.0	29.0	12.6	0.08	-0.29	0.977
AlkH	35.2	35.5	31.0	39.0	32.0	38.0	11.0	-0.17	-2.20	0.917
H_{Ar}	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.002	1.99	4.09	0.753
H_{Carb}	0.4	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0.001	-1.81	3.55	0.809

ФК почв (n = 5)

COOH	10.0	10.0	5.0	13.0	9.0	13.0	11.0	-0.82	0.14	0.897
ArOH	4.8	4.0	2.0	8.0	3.0	7.0	6.7	0.36	-2.41	0.915
ArH	9.4	10.0	4.0	13.0	9.0	11.0	11.3	-1.17	2.03	0.925
AlkOH	8.2	8.0	6.0	11.0	8.0	8.0	3.2	0.82	2.36	0.863
CHO	29.8	29.0	24.0	36.0	27.0	33.0	22.7	0.21	-1.27	0.978
AlkH	37.8	39.0	34.0	42.0	34.0	40.0	13.2	-0.20	-2.59	0.867
H_{Ar}	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.002	-1.43	3.01	0.853
H_{Carb}	0.4	0.4	0.3	0.5	0.4	0.4	0.002	0.41	-0.96	0.974

Объединенная выборка (n = 39)

COOH	8.5	9.0	4.0	13.0	7.0	10.0	4.2	0.10	-0.09	-
ArOH	7.7	8.0	2.0	17.0	5.0	9.0	10.3	0.41	0.80	-
ArH	12.9	13.0	4.0	20.0	11.0	15.0	10.6	-0.03	0.71	-
AlkOH	7.6	8.0	0.0	21.0	5.0	9.0	16.5	0.91	2.23	-
CHO	32.0	32.0	22.0	43.0	29.0	35.0	23.2	0.03	-0.28	-
AlkH	31.3	31.0	16.0	42.0	29.0	34.0	28.8	-0.33	0.70	-
H_{Ar}	0.2	0.2	0.1	0.3	0.2	0.2	0.002	-0.21	1.52	-
H_{Carb}	0.4	0.4	0.3	0.6	0.4	0.5	0.004	0.59	0.37	-

\bar{x} , X_{\min} , X_{\max} и Med – средние, мин. и макс. значения и медиана;

Q_{25} и Q_{75} – нижние и верхние квартили;

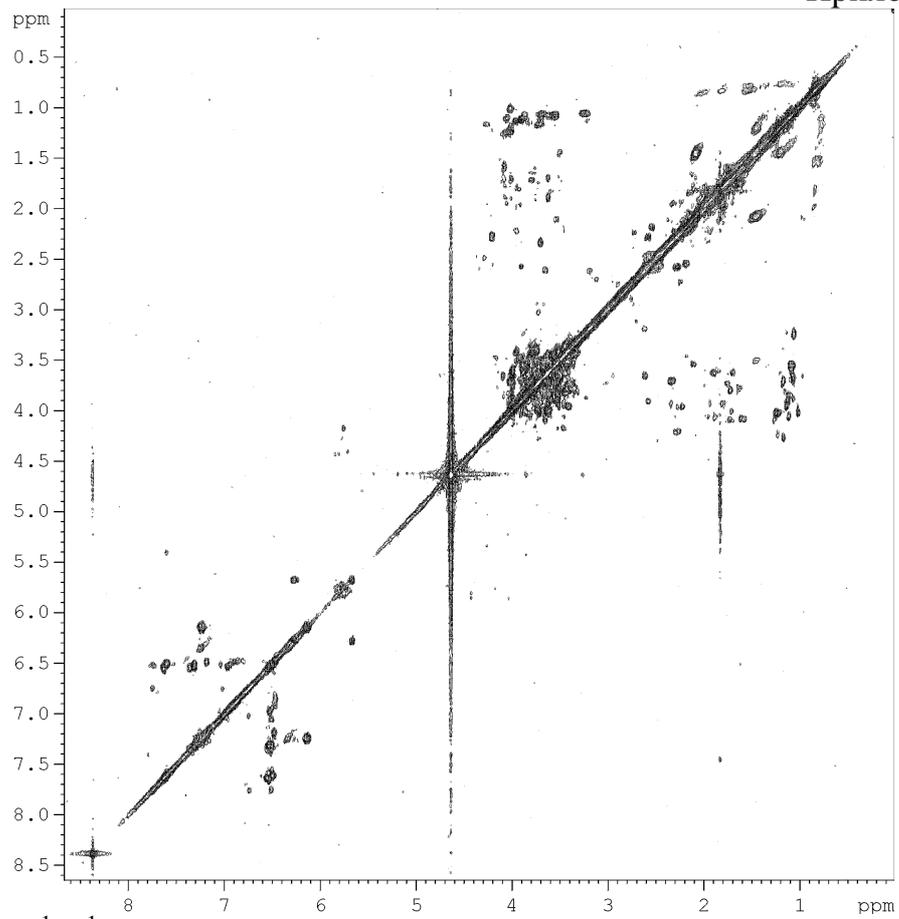
A и E- коэффициенты асимметрии и эксцесса; W - значение критерия Уилка-Шапиро.

* Жирным шрифтом выделены $W < (W_{0.05})_{\text{крит}}$.

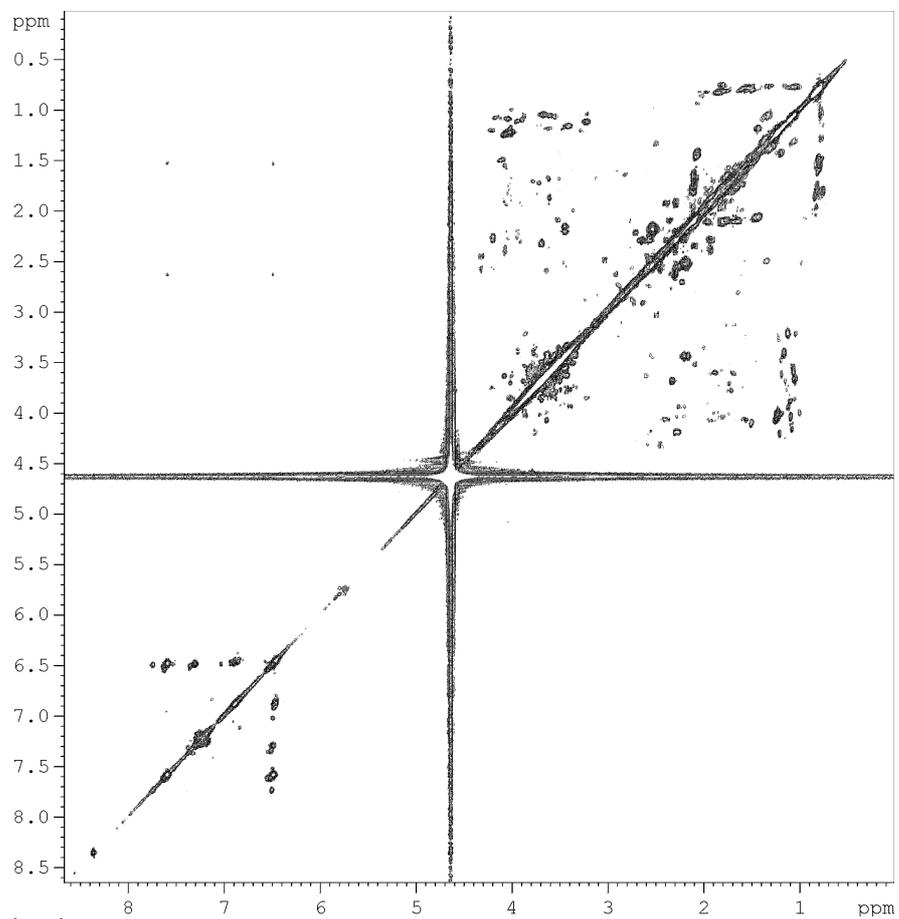
Фрагментный состав препаратов гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава

Шифр	CO	COOH	COOR	C _{Ar} -OH	C _{Ar} -OR	C _{Ar} -H	C _{Ar} -C	CH ₃ O	CH-OH	CH ₂ OH	C _{Alk}	H/C _{Alk}	H/C _{Ar}	H/C _{Alk-O}
ГК дерново-подзолистых почв														
SHA-Pw94	1.0	9.0	8.0	7.0	5.0	13.4	18.6	3.0	14.3	2.7	18.0	1.88	0.30	1.37
SHA-PwN	2.0	8.2	6.8	7.1	5.9	12.3	17.7	4.5	12.9	2.6	20.0	1.94	0.29	1.48
ГК чернозема														
SHA-Cmg	2.0	9.6	5.4	7.4	3.1	17.5	28.0	3.0	7.5	1.5	15.0	1.87	0.27	1.60
ФК дерново-подзолистых почв														
SFA-Pw94	3.0	13.0	7.0	7.5	4.5	8.5	13.5	3.0	13.5	2.5	24.0	1.62	0.25	1.26
SFA-Pg94	3.0	14.2	3.8	8.4	3.6	10.0	19.0	3.5	13.0	2.5	19.0	1.88	0.26	1.49
ГФК торфа														
PHF-T594	1.0	8.4	7.6	5.3	4.7	10.5	17.5	3.0	16.0	3.0	23.0	1.74	0.29	1.44
PHF-T694	2.0	8.9	5.1	9.4	4.6	14.6	23.4	3.0	12.5	2.5	14.0	1.82	0.26	1.52
PHF-T794	2.0	9.6	7.4	8.7	6.3	15.4	18.6	4.0	11.0	2.0	15.0	1.67	0.30	1.70
PHF-T1094	2.0	8.9	7.1	10.4	4.6	13.4	19.6	4.0	11.5	2.5	16.0	1.79	0.28	1.65
PHF-TH94	2.0	7.9	7.1	7.9	6.1	12.9	18.1	4.0	14.0	3.0	17.0	1.74	0.28	1.51
PHF-TT94	3.0	8.6	6.4	8.6	4.4	12.4	19.6	3.5	13.5	3.0	17.0	1.75	0.26	1.41
PHa-THTO	3.0	7.3	5.7	8.4	4.6	12.6	18.4	5.0	15.8	3.2	16.0	1.96	0.30	1.48
ГФК природных вод														
AHF-RMX8	2.0	13.5	5.5	5.6	5.4	7.9	17.1	5.0	10.0	4.0	24.0	1.87	0.25	1.65
AHF-RI	3.0	14.2	3.8	9.1	2.9	8.5	17.5	5.5	8.5	4.0	23.0	1.78	0.26	1.83
AFA-GFg1	1.0	12.6	3.4	4.6	4.4	7.4	17.6	3.0	15.5	4.5	26.0	1.82	0.25	1.39
AFA-SHo10	1.0	11.0	7.0	9.0	4.0	11.0	19.0	3.0	13.5	4.0	17.5	1.78	0.26	1.42

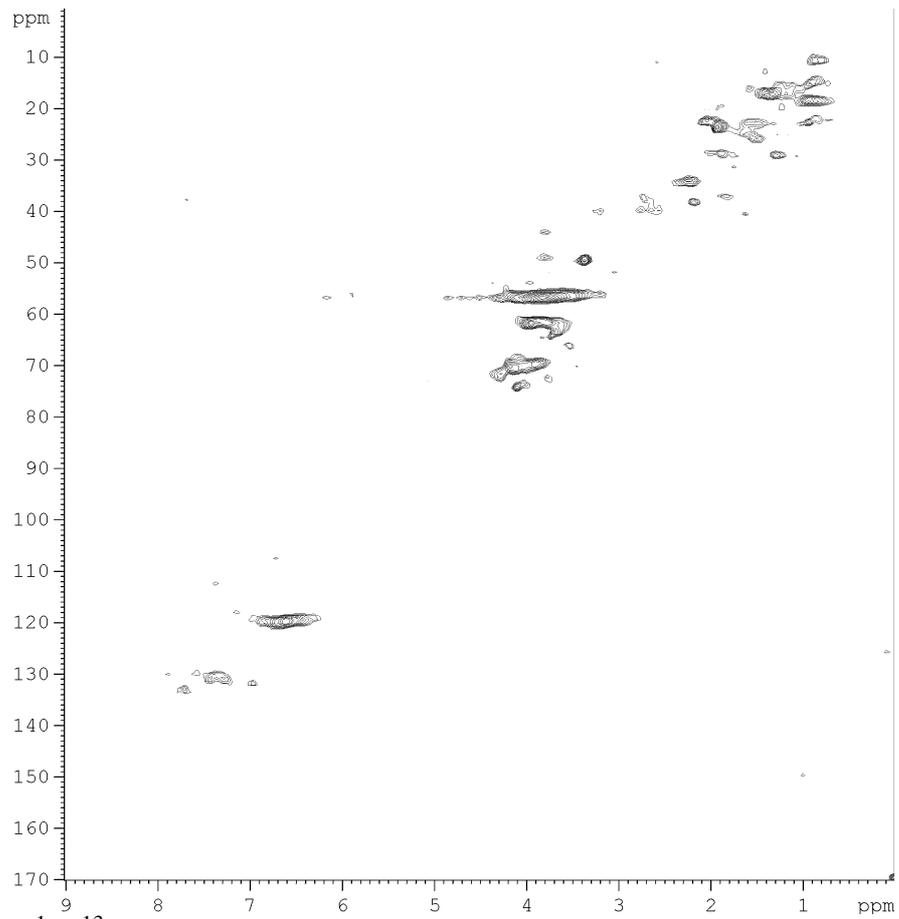
Шифр	CO	COOH	COOR	C _{Ar-OH}	C _{Ar-OR}	C _{Ar-H}	C _{Ar-C}	CH ₃ O	CH-OH	CH ₂ OH	C _{Alk}	H/C _{Alk}	H/C _{Ar}	H/C _{Alk-O}
ГК угля														
CHA-AGK	1.0	13.1	2.9	6.1	3.9	21.5	26.5	4.0	0.0	0.0	21.0	1.94	0.35	3.04
CHA-ALD	1.0	12.0	3.5	8.5	4.0	19.5	23.5	6.0	0.0	1.0	21.0	1.88	0.35	2.79
Другое														
SHF-Co94	1.0	10.8	7.2	7.2	5.8	12.9	19.1	4.0	15.0	3.0	14.0	1.92	0.30	1.53
SDFA-BS1	3.0	14.7	2.3	8.6	2.4	12.2	25.8	5.5	8.5	2.0	15.0	2.03	0.25	1.84
PHF-TMu4	2.0	10.8	6.2	8.6	3.4	9.7	16.3	2.0	22.0	6.0	13.0	1.91	0.28	1.29



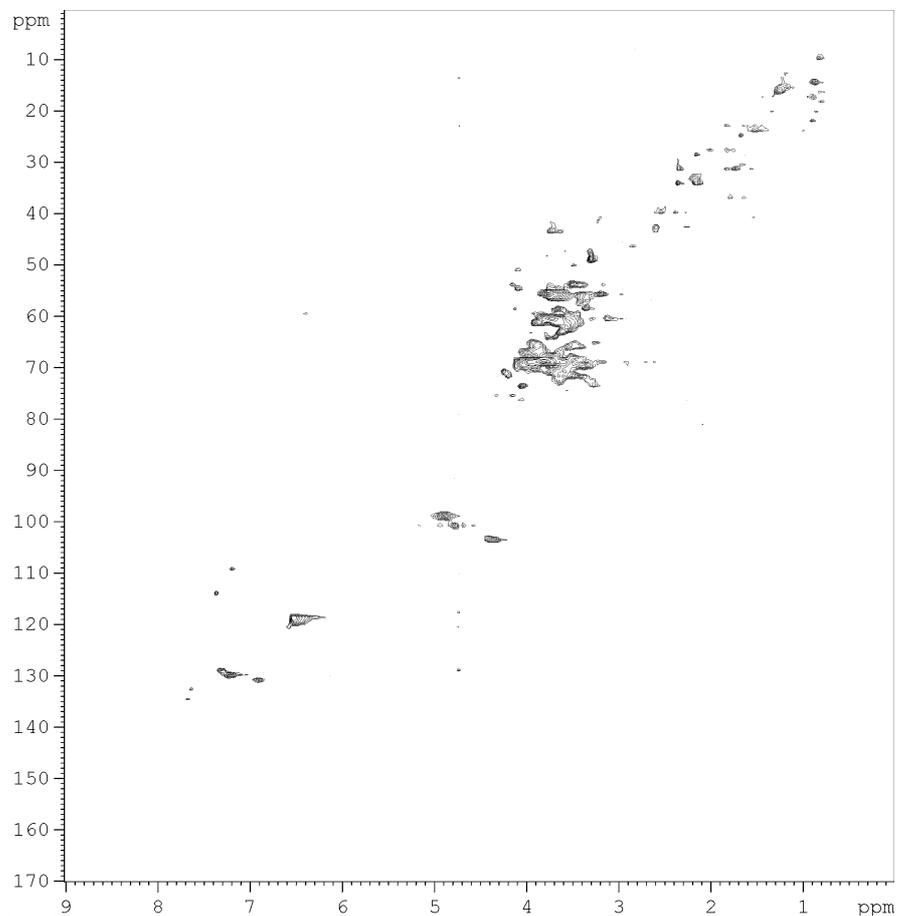
^1H , ^1H COSY спектр ГК низинного торфа РНА-Т10L98.



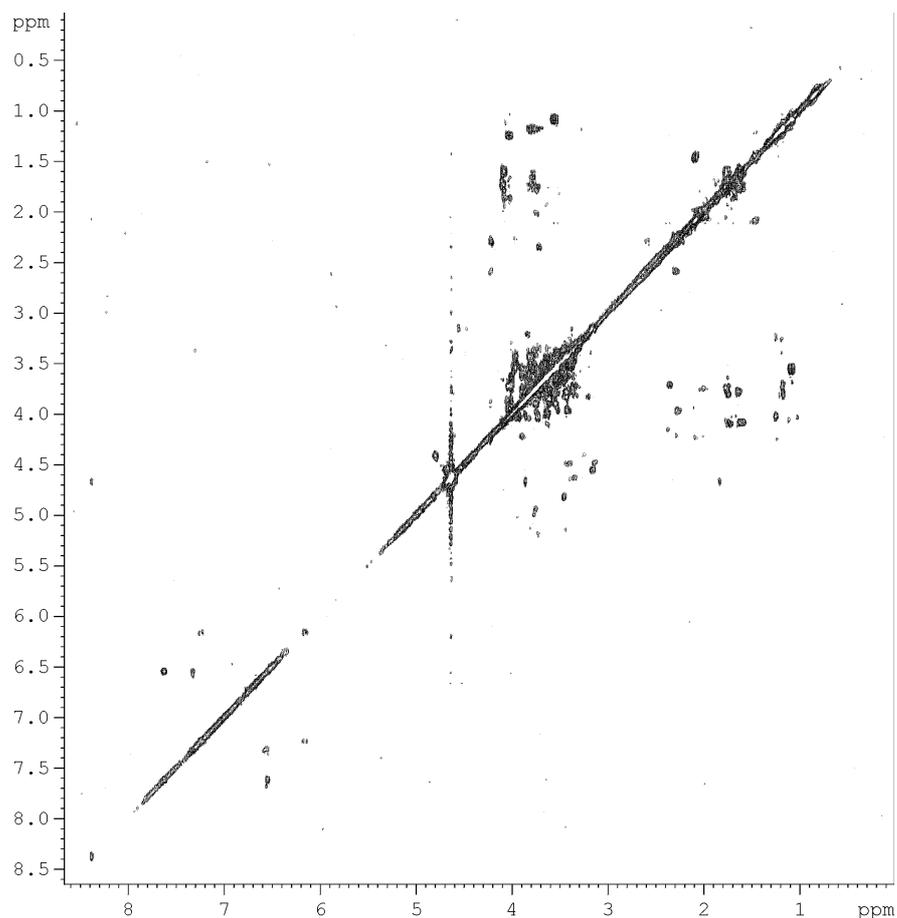
^1H , ^1H COSY спектр гидролизующей части (PHND-T10L98).



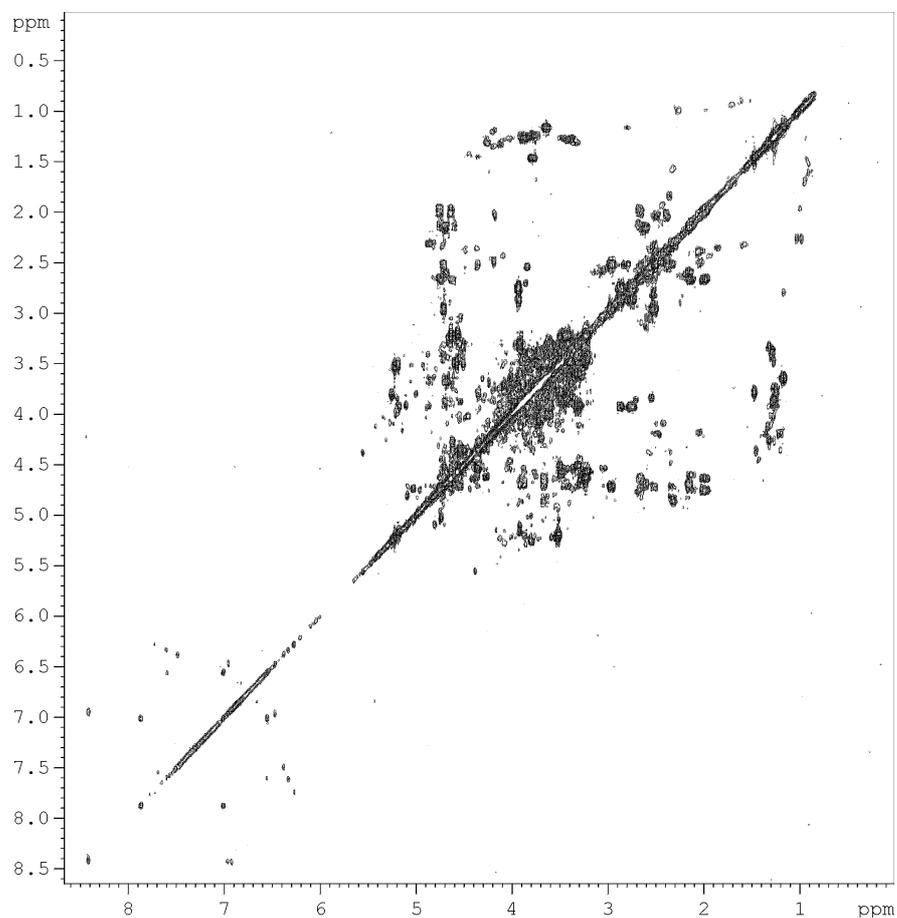
^1H , ^{13}C HSQC спектр ГК низинного торфа РНА-Т10L98.



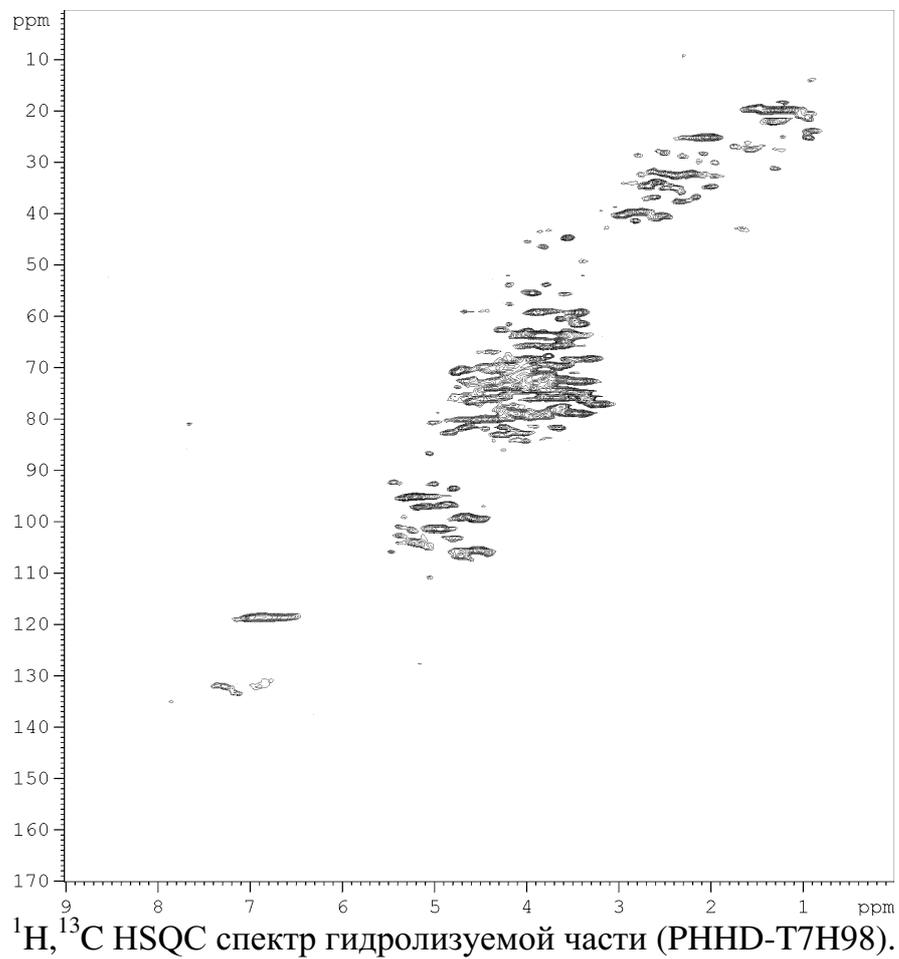
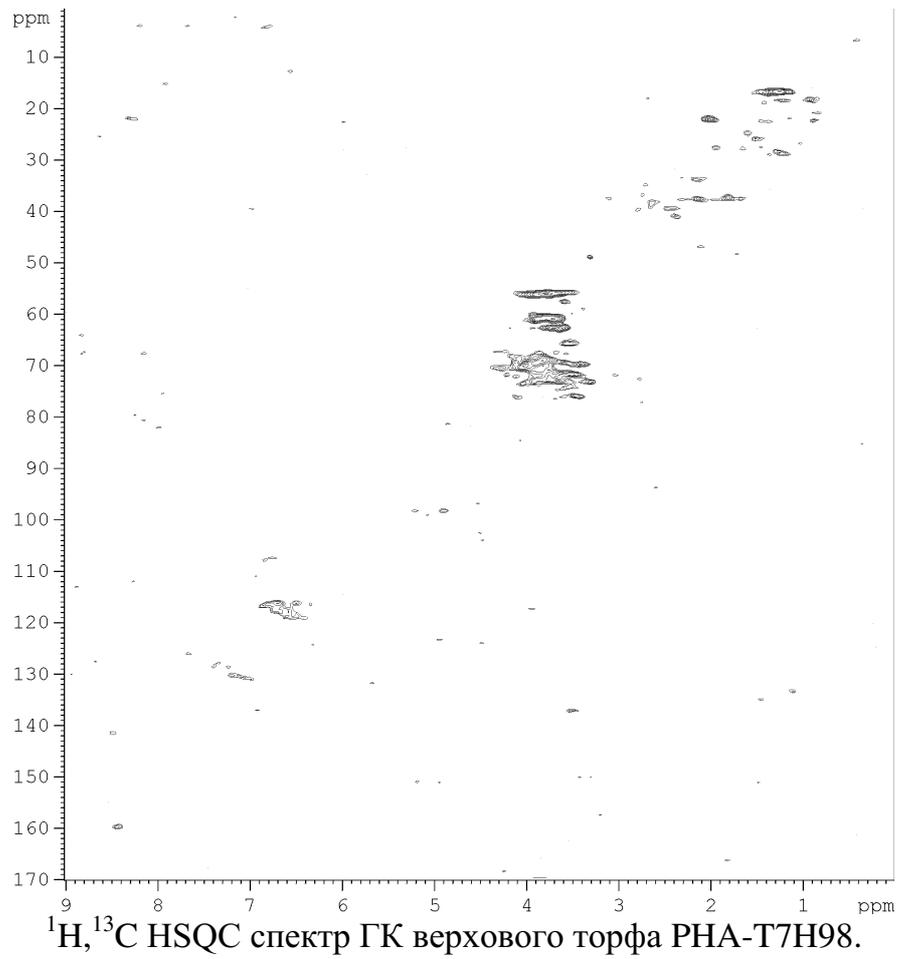
^1H , ^{13}C HSQC спектр гидролизуемой части (PHND-T10L98).



^1H , ^1H COSY спектр ГК верхового торфа РНА-Т7Н98.



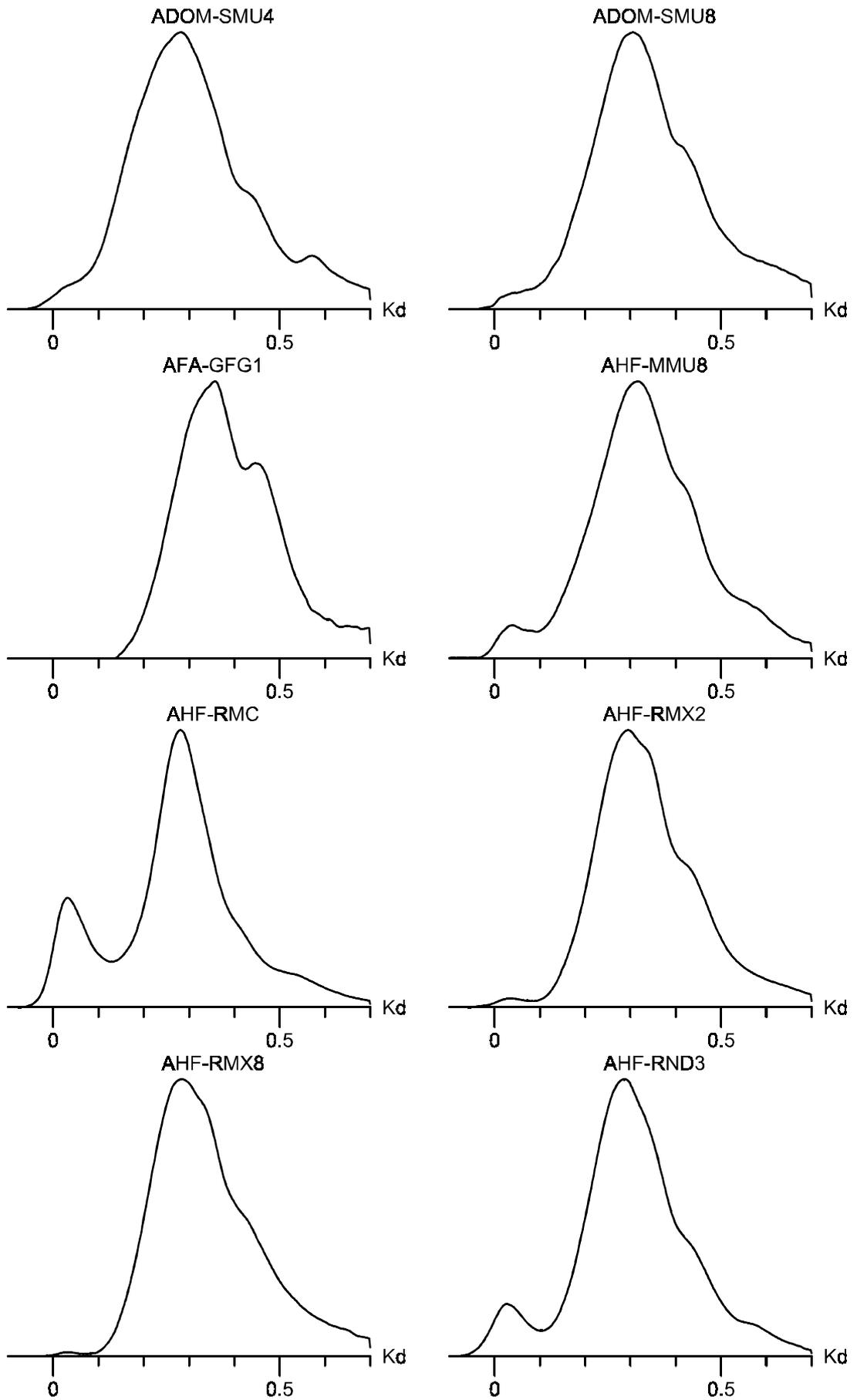
^1H , ^1H COSY спектр гидролизуемой части (PHND-Т7Н98).

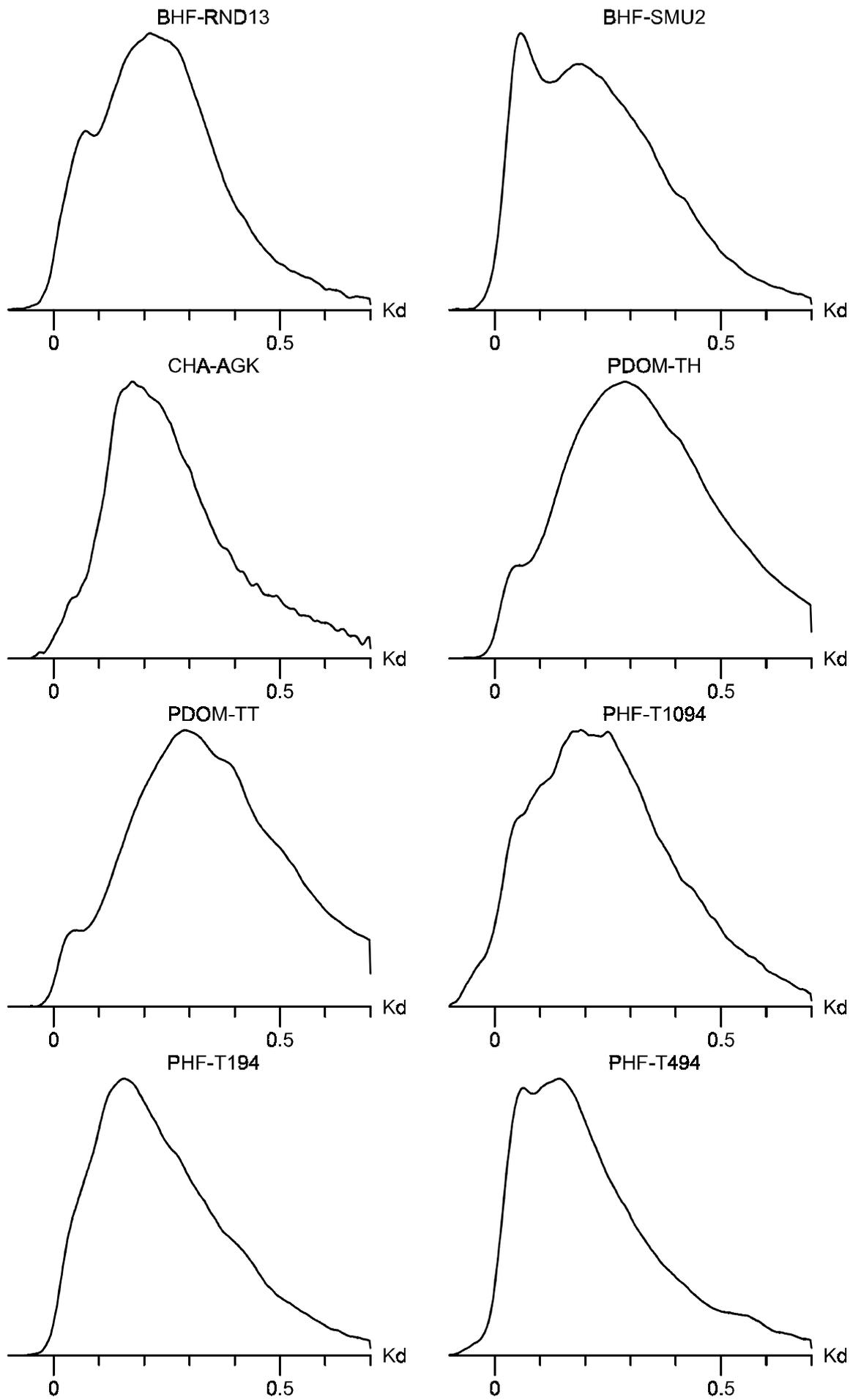


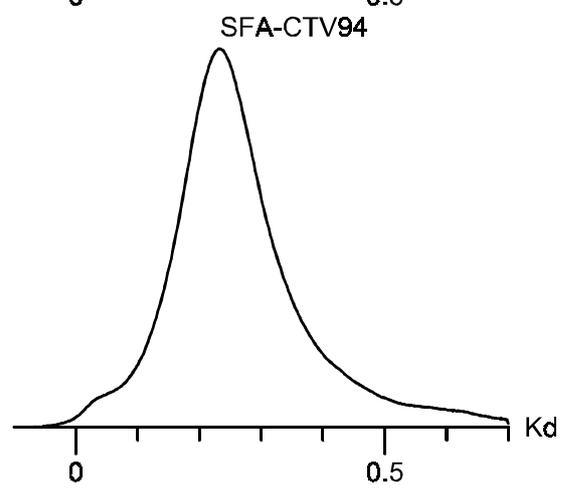
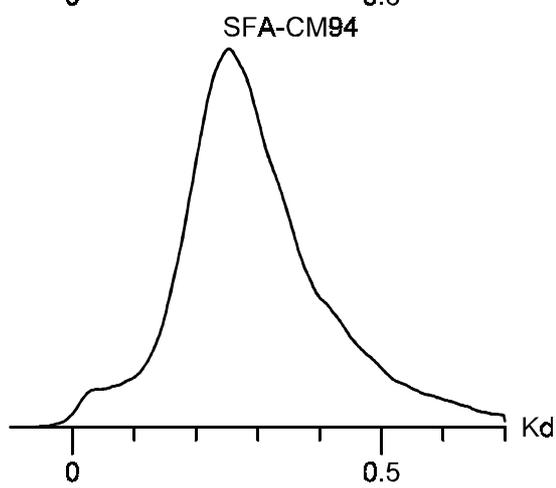
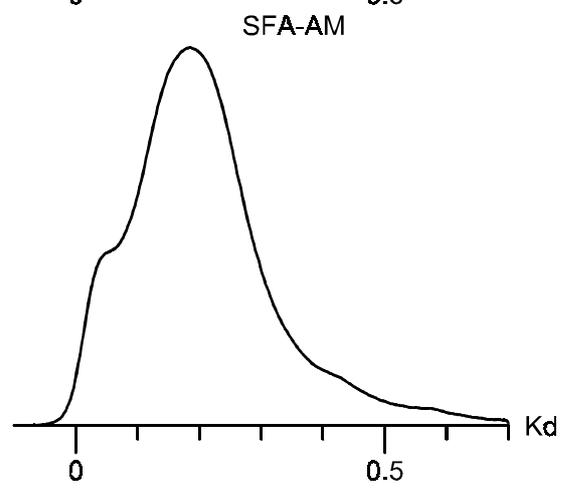
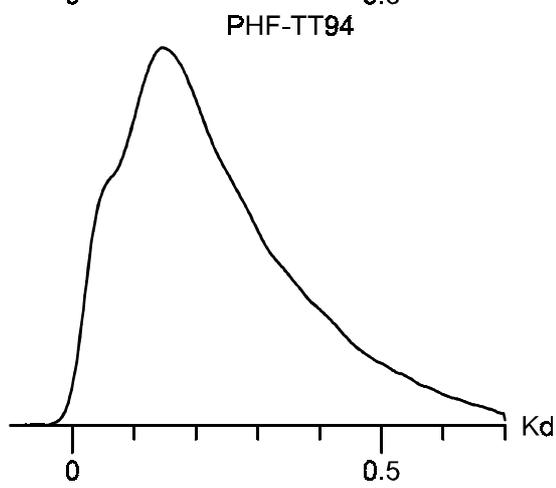
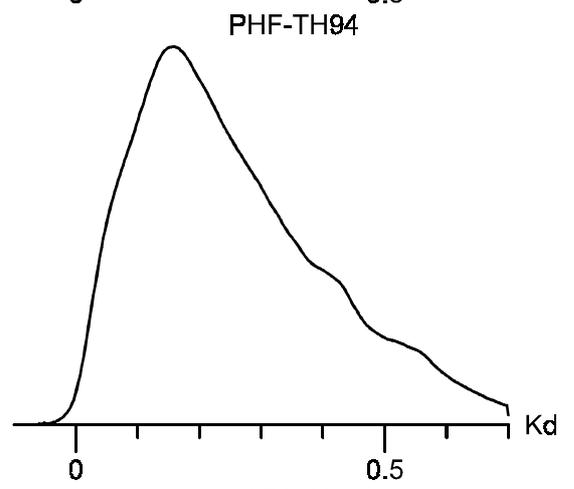
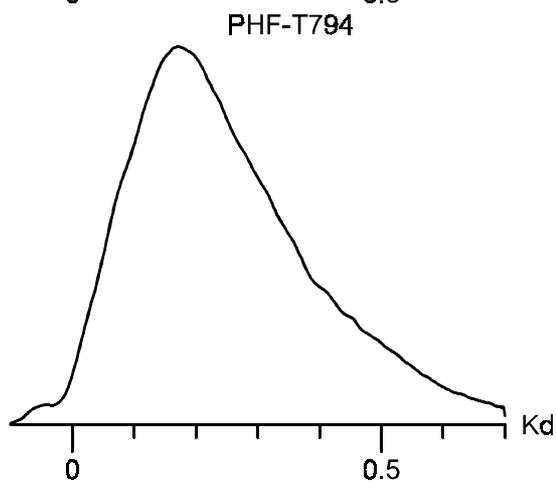
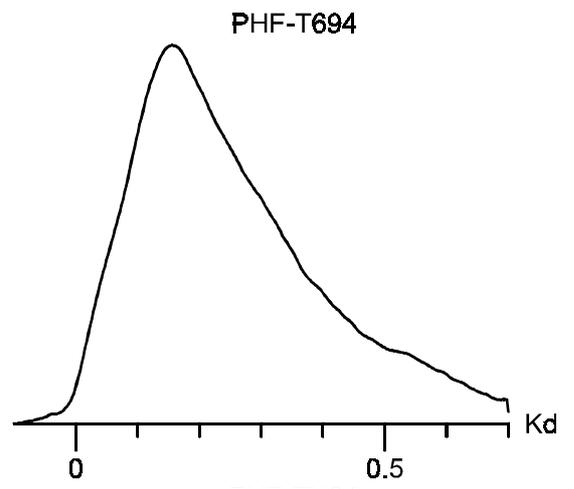
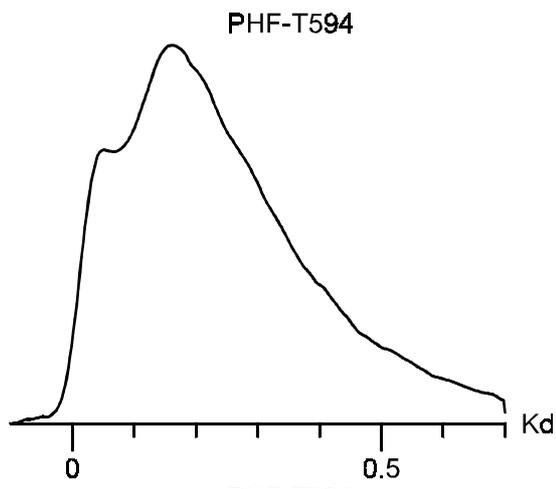
Величина неэксклюзионного эффекта (ΔK_d) для индивидуальных органических соединений в выбранной хроматографической системе

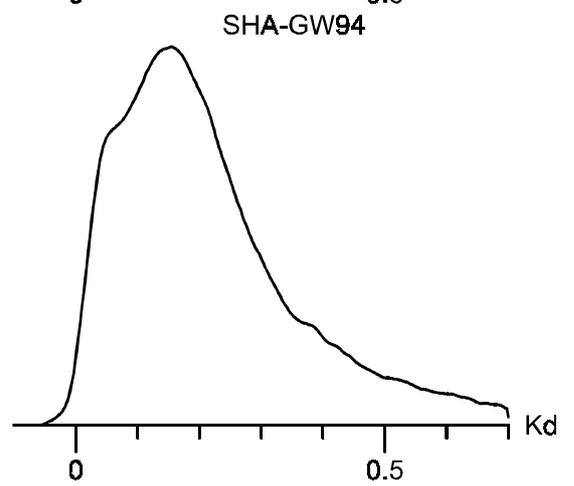
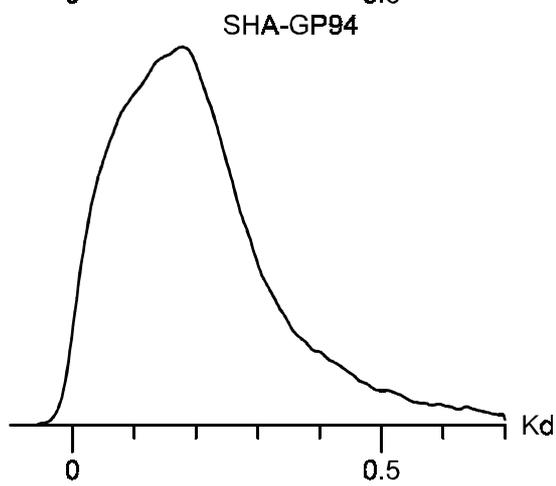
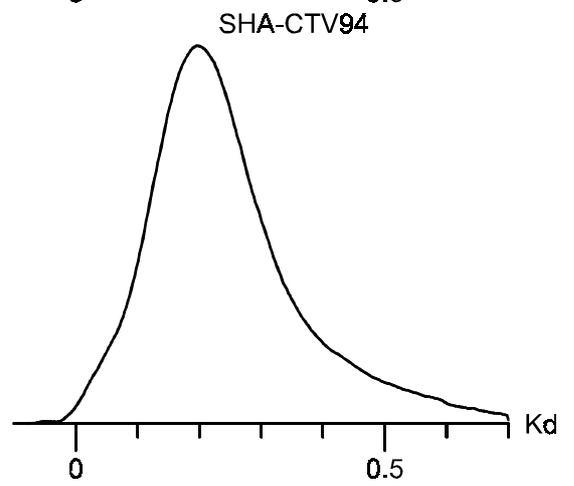
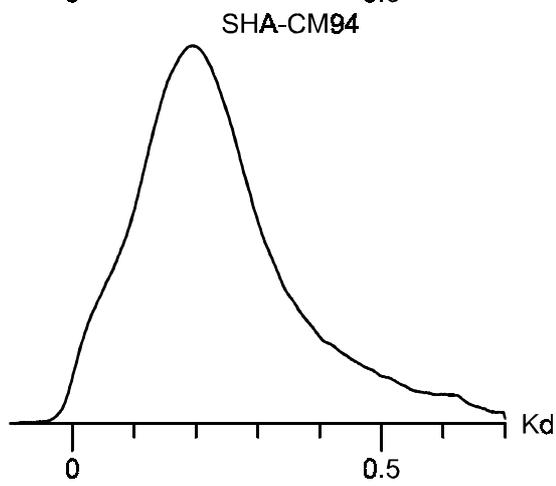
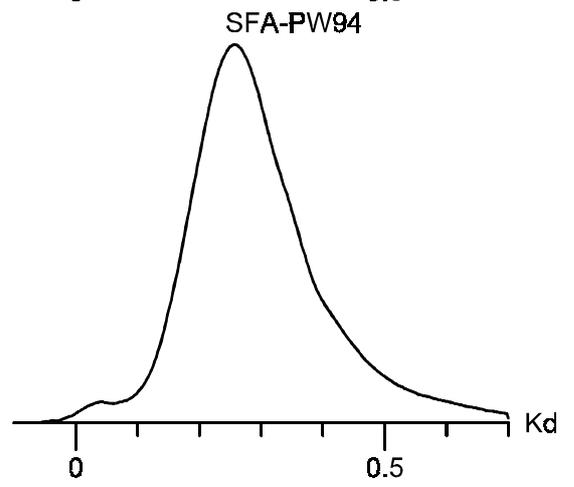
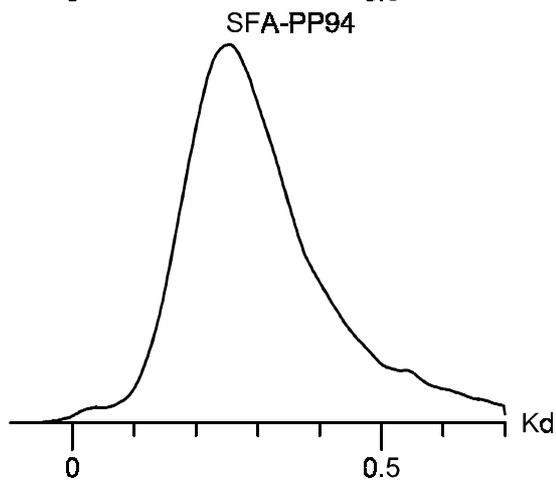
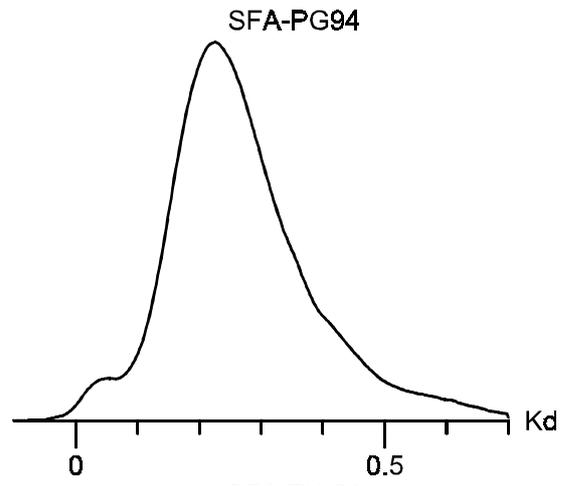
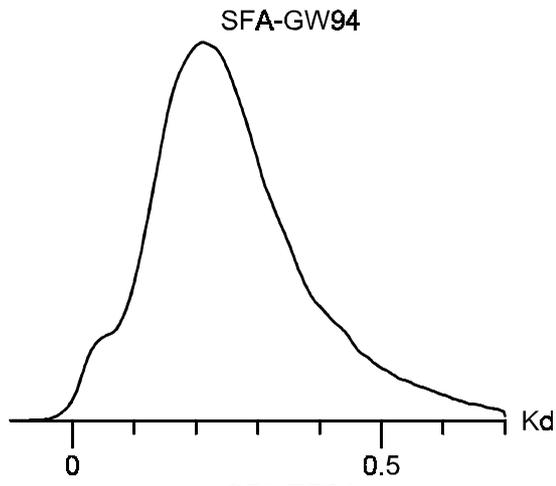
No	Брутто-формула	Соединение	ΔK_d	No	Брутто-формула	Соединение	ΔK_d
1	$C_7H_6O_4$	3,4-Дигидрокибензойная кислота	-2.21	33	$C_7H_{12}O_6$	Хинная кислота	0.23
2	$C_7H_6O_4$	3,5-Дигидрокибензойная кислота	-2.21	34	$C_4H_6O_2$	Кротоновая кислота	0.23
3	$C_9H_{10}O_5$	Сиреневая кислота	-0.41	35	$C_4H_6O_2$	Метакриловая кислота	0.23
4	$C_7H_6O_5$	3,4,5-Тригидроксибензойная кислота	-2.55	36	$C_6H_{10}O_7$	Глюкуроновая кислота	0.24
5	$C_7H_6O_3$	3-Гидрокибензойная кислота	-0.74	37	$C_4H_8O_2$	Масляная кислота	0.25
6	$C_7H_6O_3$	4-Гидрокибензойная кислота	-0.74	38	$C_9H_8O_4$	Карбоксифенил-уксусная к-та	0.27
7	$C_9H_{10}O_2$	Гидрокоричная кислота	-0.31	39	$C_{10}H_8O_4$	2-Карбоксикоричная кислота	0.27
8	$C_9H_{11}O_2N$	Фенилаланин	-0.29	40	$C_{10}H_{10}O_4$	Бензилмалоновая кислота	0.28
9	$C_4H_8O_2$	1,4-Диоксан	-0.19	41	$C_{10}H_{10}O_4$	1,2-Фенилендиуксусная к-та	0.28
10	C_3H_6O	Ацетон	-0.15	42	$C_3H_6O_3$	Молочная кислота	0.29
11	$C_7H_6O_2$	Бензойная кислота	-0.14	43	$C_5H_9O_4N$	Глутаминовая кислота	0.30
12	C_2H_6O	Этанол	-0.08	44	$C_4H_7O_4N$	Аспаргиновая кислота	0.31
13	$C_5H_{11}O_2NS$	Метионин	-0.05	45	$C_4H_4O_4$	Малеиновая кислота	0.32

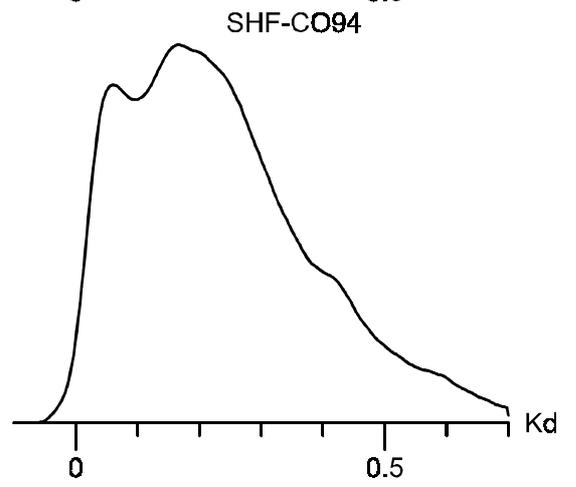
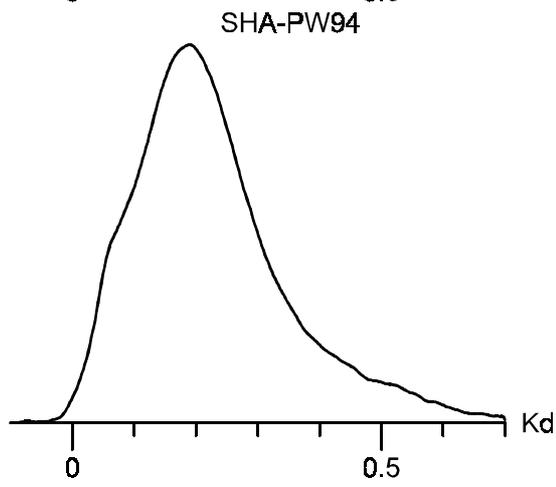
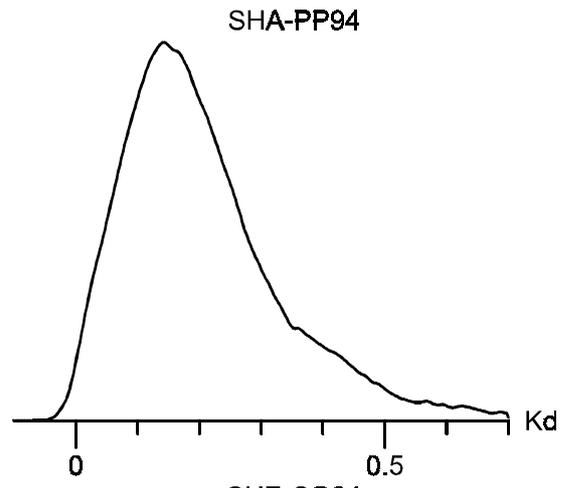
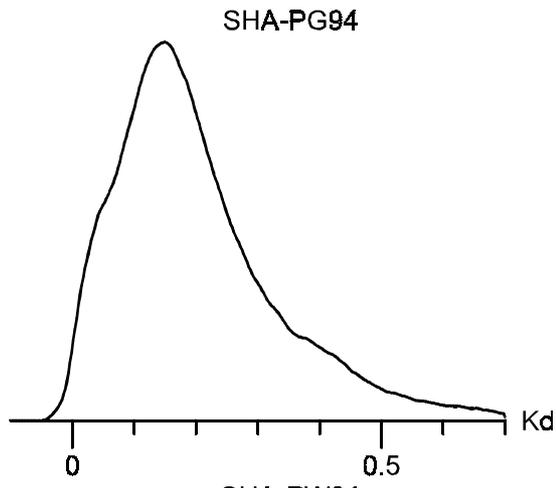
14	$C_8H_8O_2$	Фенилуксусная кислота	-0.04	46	$C_8H_6O_4$	Фталевая кислота	0.32
15	$C_{18}H_{16}O_5$	4-[4-(2-Карбоксибензоил)-	-0.04	47	$C_8H_6O_4$	Терефталевая кислота	0.32
16	$C_{18}H_{16}O_5$	Фенилбутановая кислота	-0.04	48	$C_3H_4O_2$	Акриловая кислота	0.32
17	$C_6H_{13}O_2N$	Лейцин	-0.03	49	$C_2H_2O_3$	Глиоксальная кислота	0.33
18	$C_6H_{12}O_6$	Глюкоза	-0.01	50	$C_3H_6O_2$	Пропионовая кислота	0.34
19	$C_3H_8O_3$	Глицерин	0.00	51	$C_2H_4O_3$	Гликолевая кислота	0.33
20	CH_4O	Метанол	0.02	52	$C_2H_4O_2$	Уксусная кислота	0.35
21	$C_9H_8O_4$	Ацетилсалициловая кислота	0.03	53	$C_6H_{10}O_8$	Глукарная кислота	0.35
22	$C_8H_8O_3$	2-Метоксибензойная кислота	0.04	54	CH_2O_2	Муравьиная кислота	0.38
23	$C_5H_{11}ONS$	Валин	0.05	55	$C_6H_{10}O_4$	Адипиновая кислота	0.40
24	$C_6H_{12}O_2$	Гексановая кислота	0.05	56	$C_7H_{12}O_4$	Пимелиновая кислота	0.41
25	$C_6H_{12}O_4N_2S_2$	Цистин	0.07	57	$C_5H_8O_4$	Глутаровая кислота	0.41
26	$C_5H_9O_2N$	Пролин	0.07	58	$C_5H_6O_4$	Глутаконовая кислота	0.41
27	$C_4H_9NO_3$	Треонин	0.09	59	$C_4H_6O_6$	Винная кислота	0.42
28	$C_3H_7O_3N$	Серин	0.11	60	$C_6H_8O_7$	Лимонная кислота	0.42
29	$C_3H_7O_2N$	Аланин	0.12	61	$C_4H_6O_5$	Малеиновая кислота	0.42
30	$C_2H_5O_2N$	Глицин	0.15	62	$C_4H_6O_4$	Янтарная кислота	0.43
31	$C_5H_{10}O_2$	Изовалериановая кислота	0.20	63	$C_3H_4O_4$	Малоновая кислота	0.44
32	$C_5H_{10}O_2$	Валериановая кислота	0.20	64	$C_2H_2O_4$	Щавелевая кислота	0.47

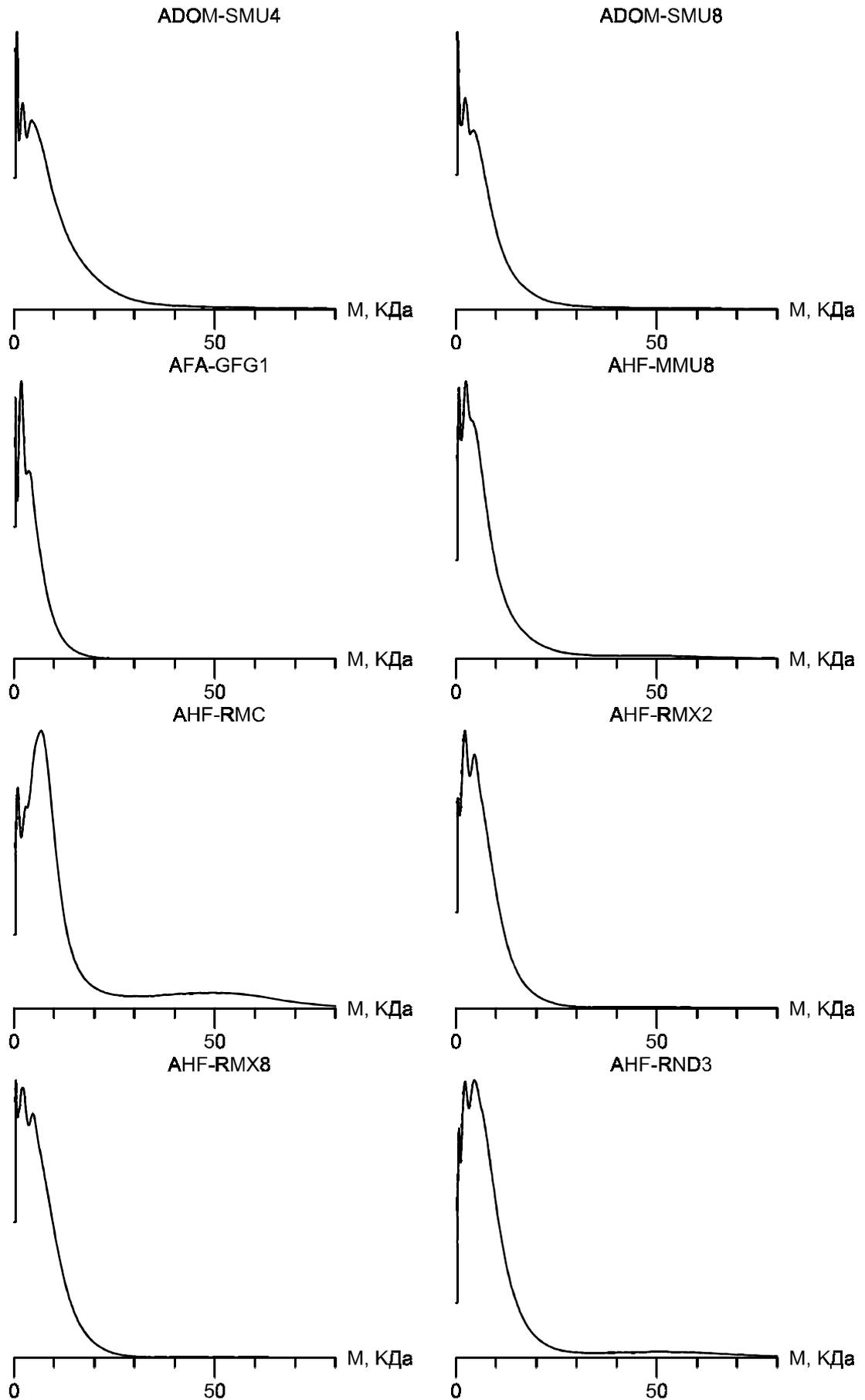




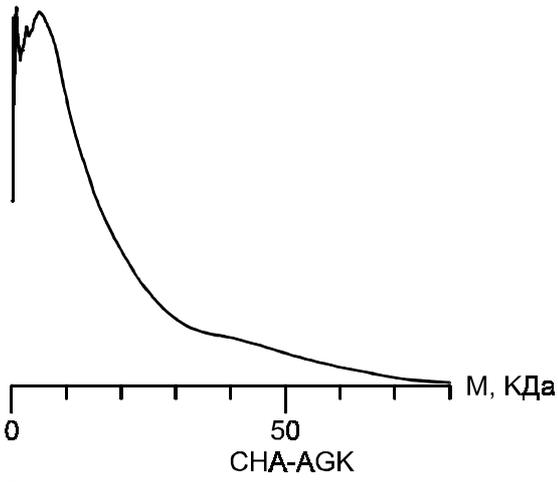




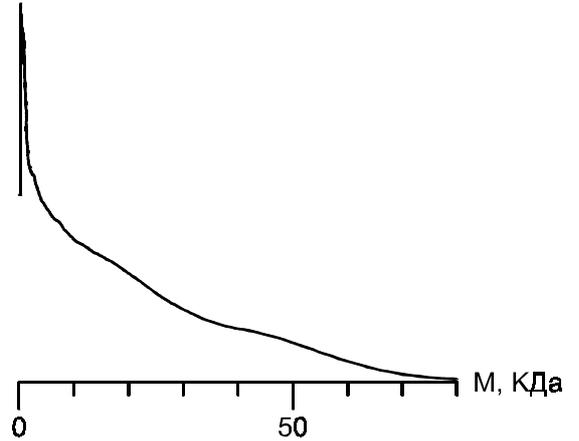
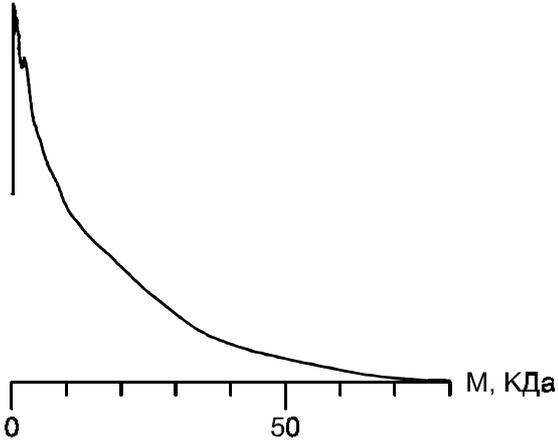
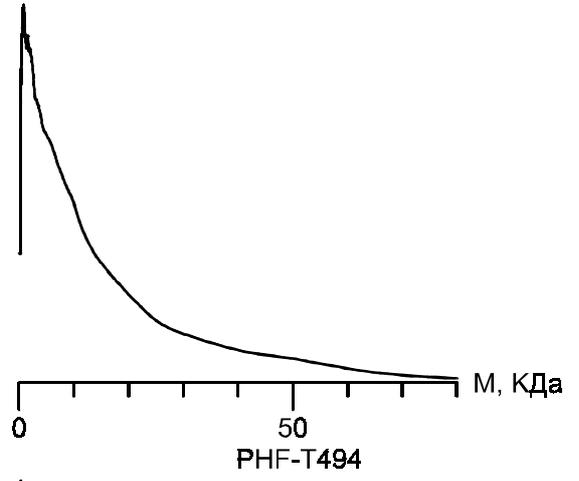
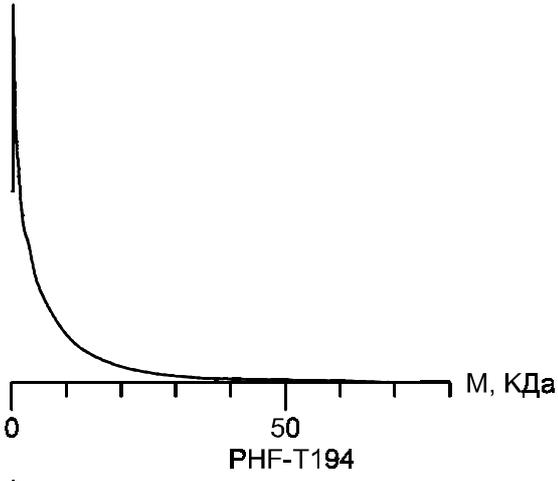
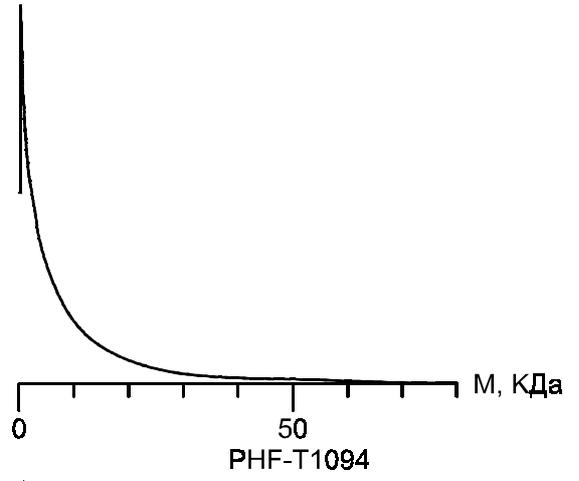
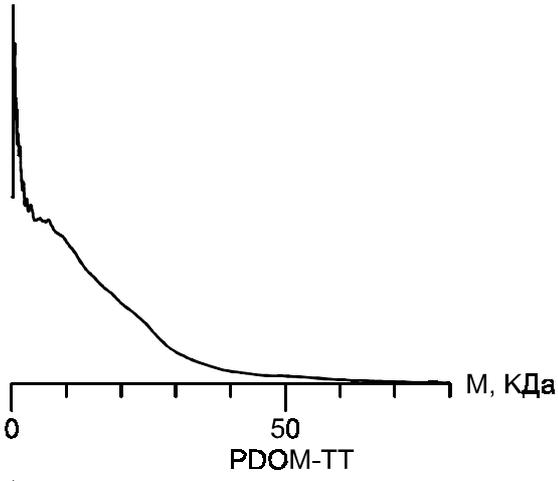
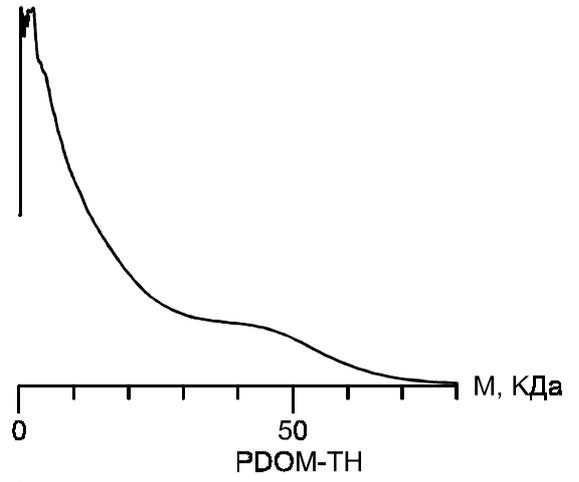




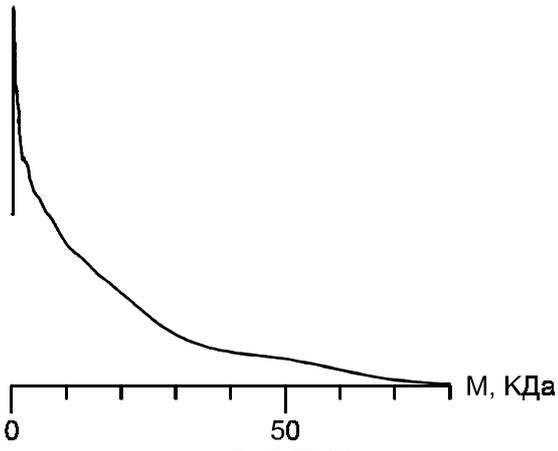
BHF-RND13



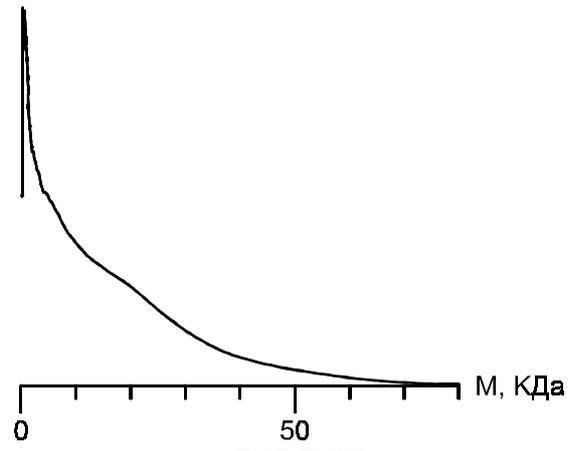
BHF-SMU2



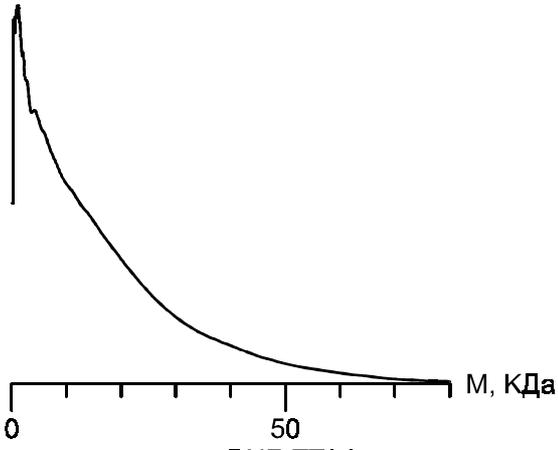
PHF-T594



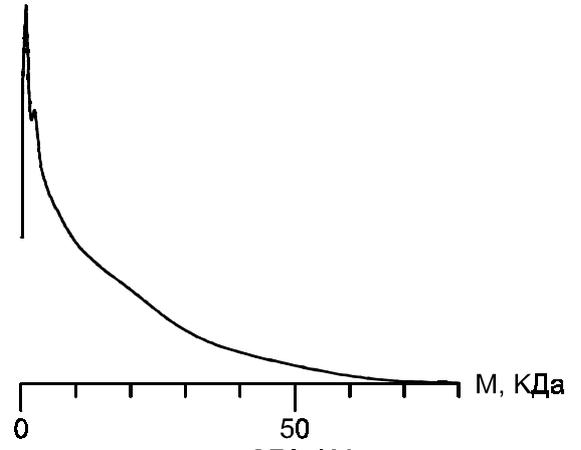
PHF-T694



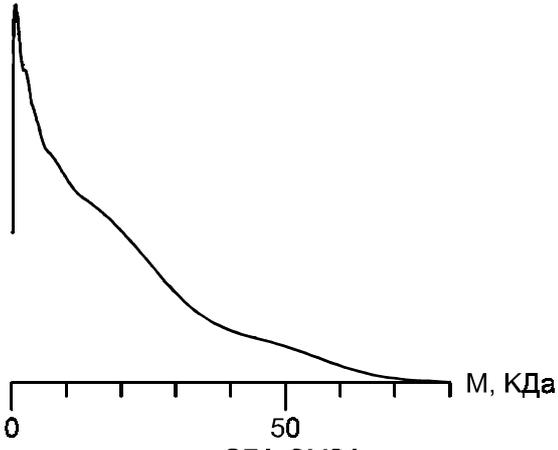
PHF-T794



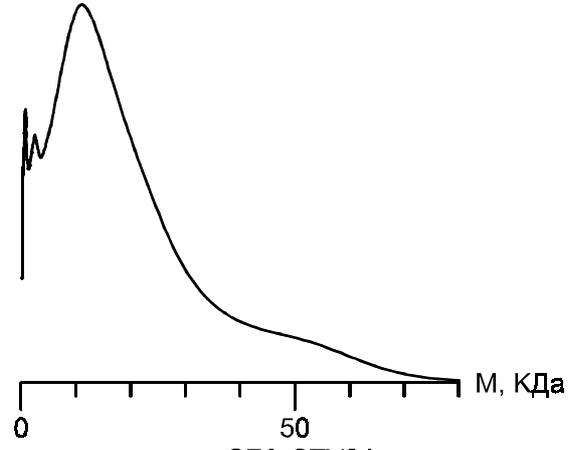
PHF-TH94



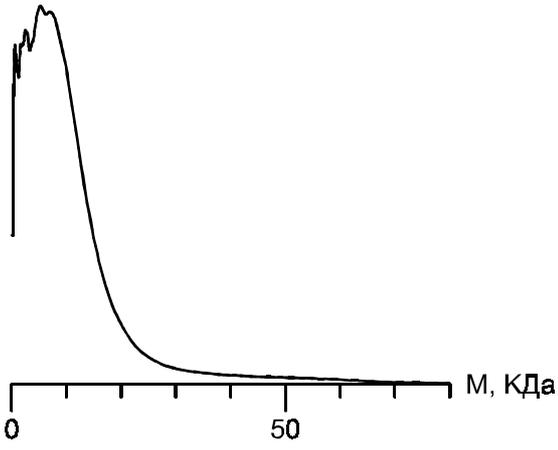
PHF-TT94



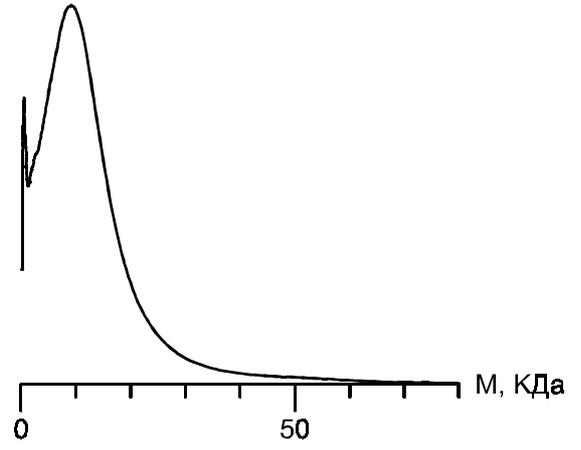
SFA-AM

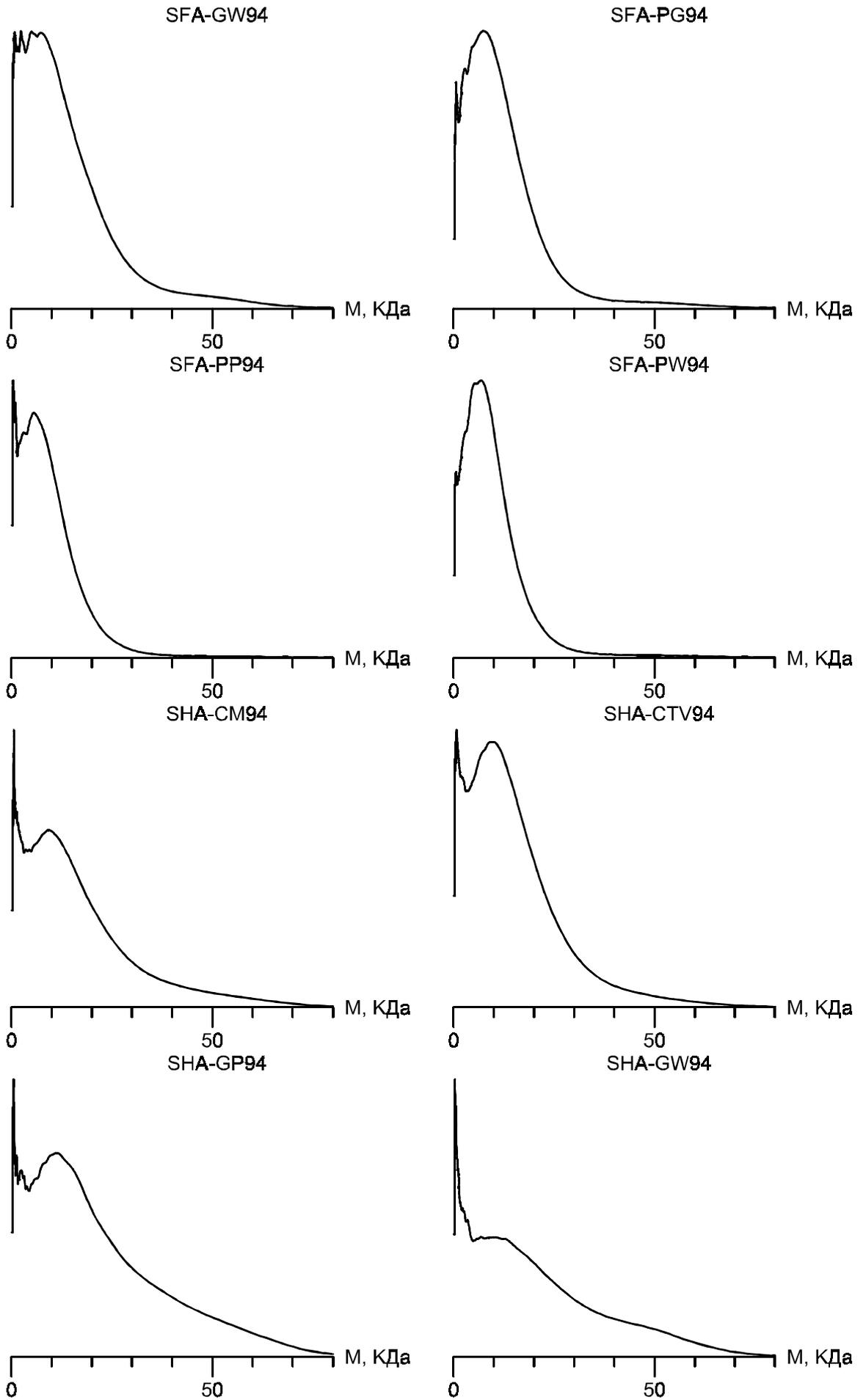


SFA-CM94

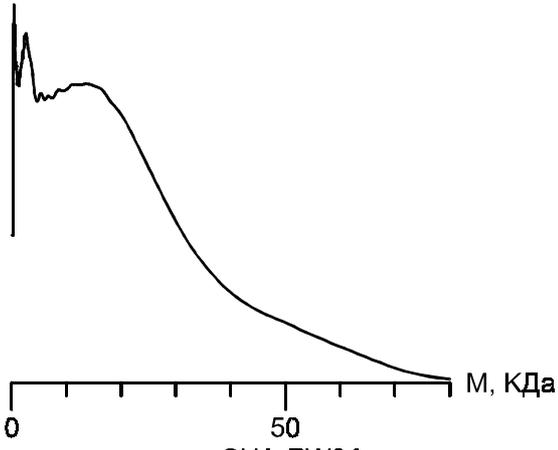


SFA-CTV94

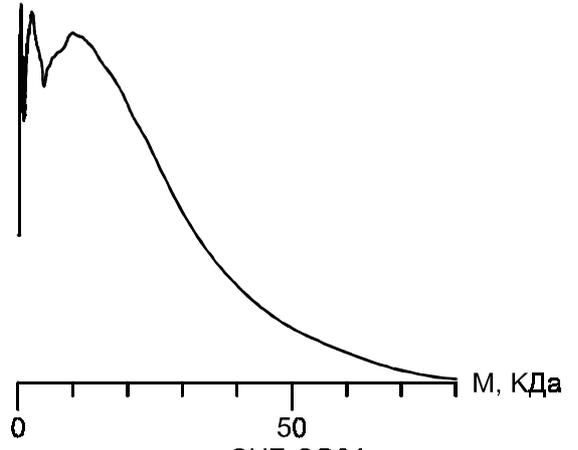




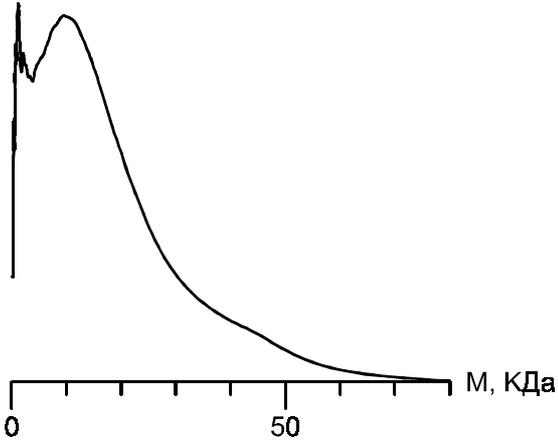
SHA-PG94



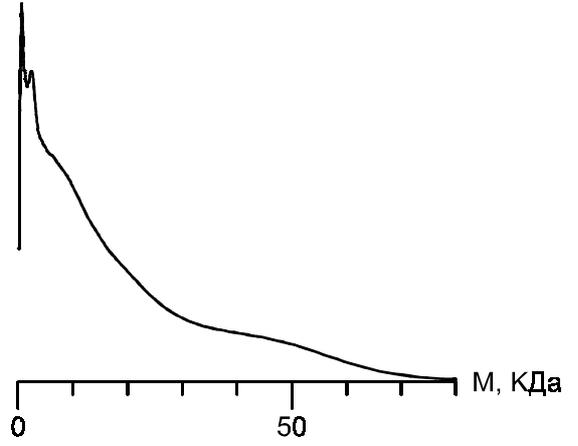
SHA-PP94



SHA-PW94

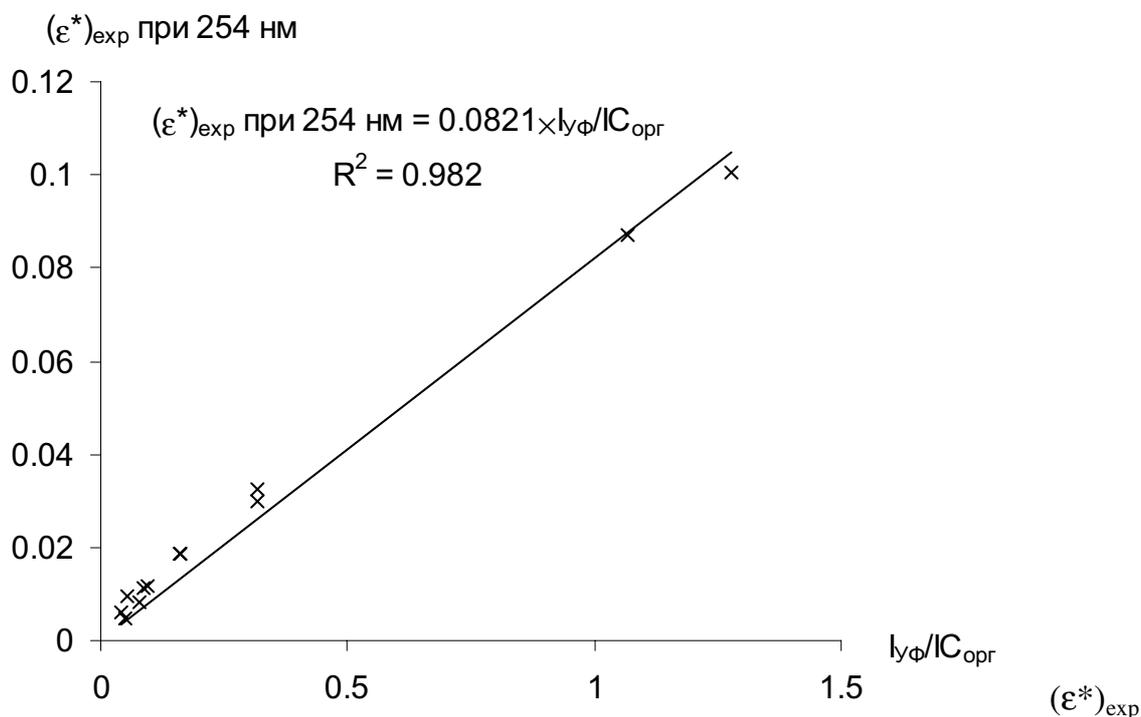


SHF-CO94

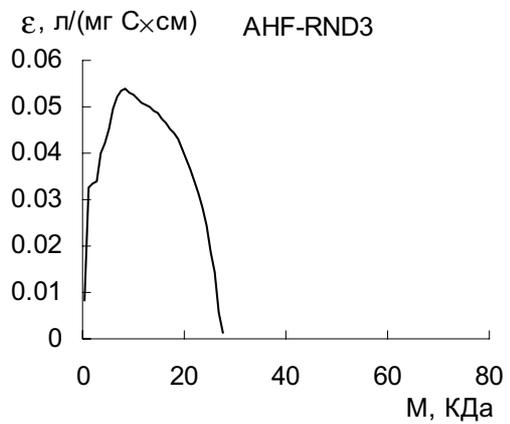
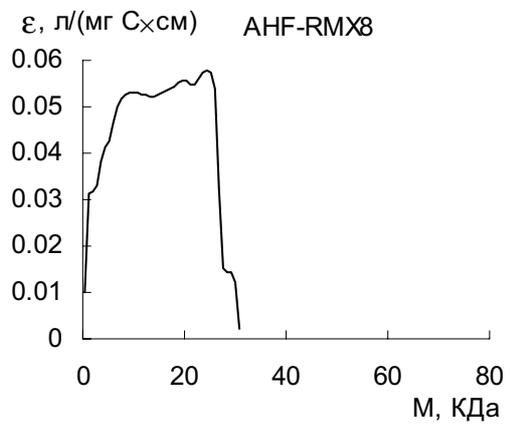
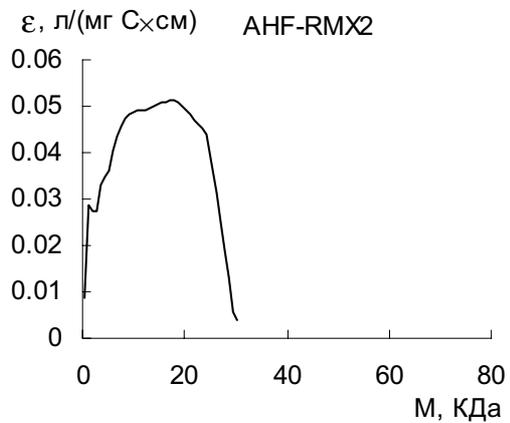
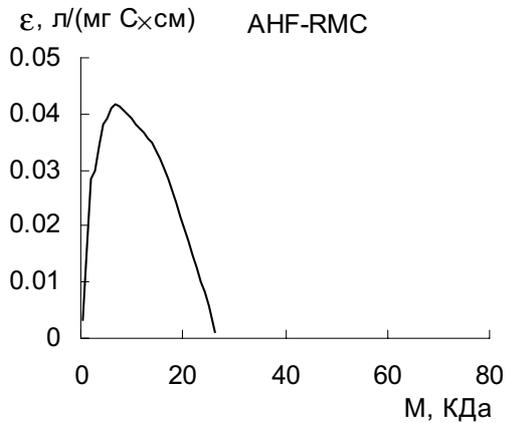
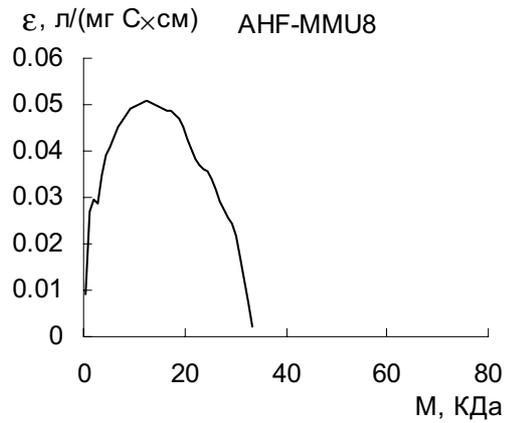
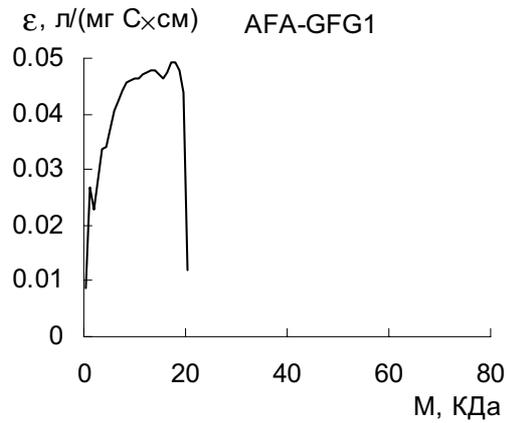
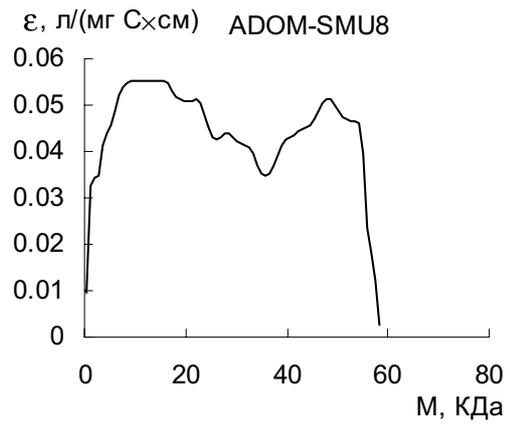
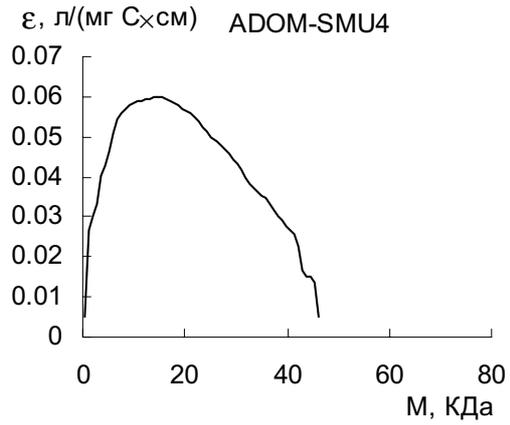


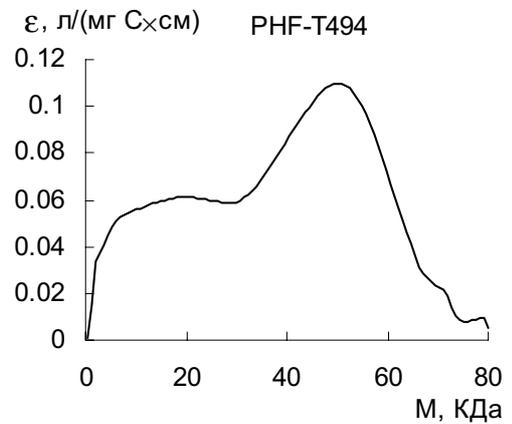
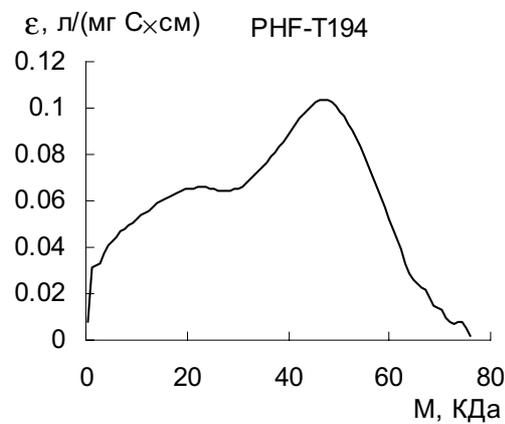
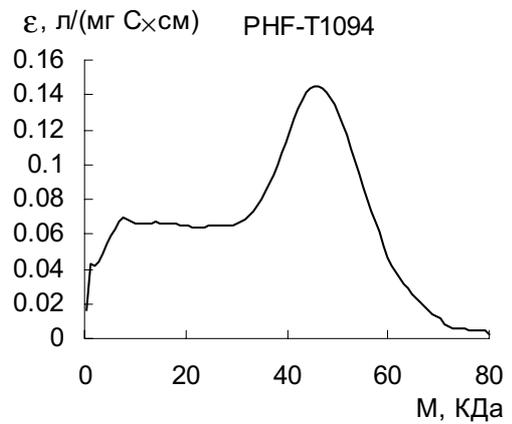
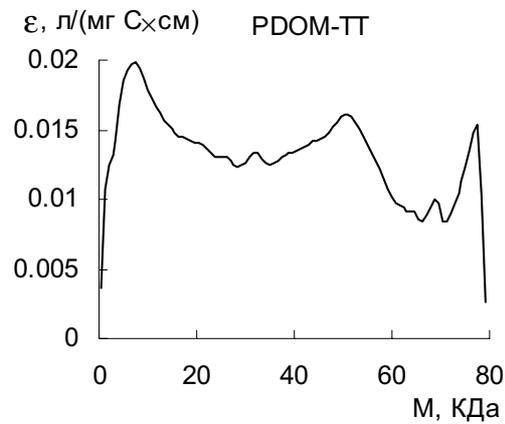
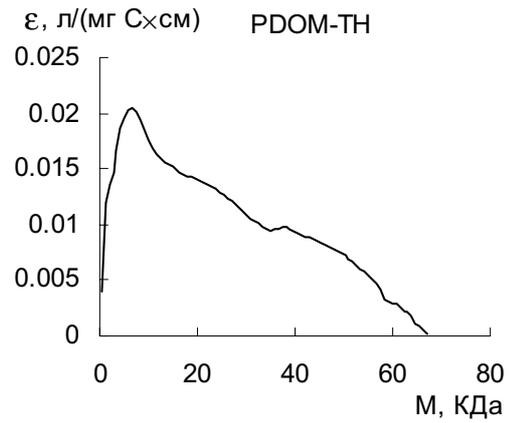
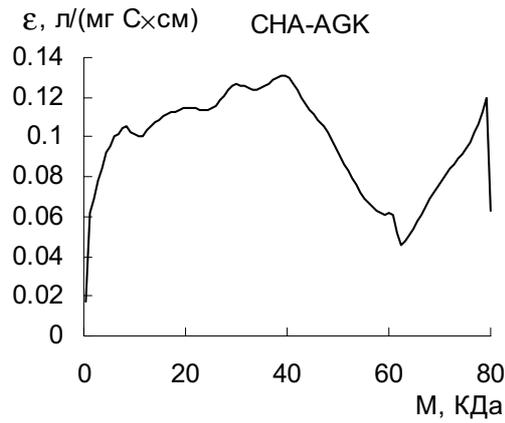
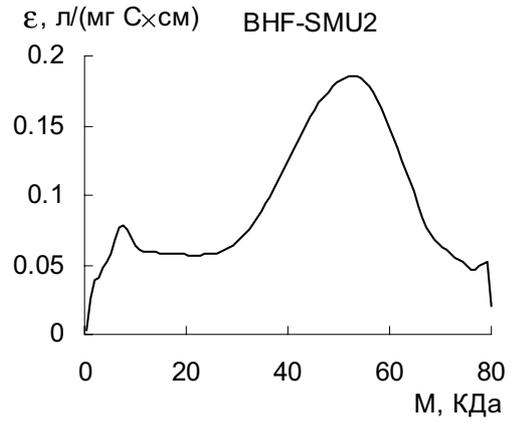
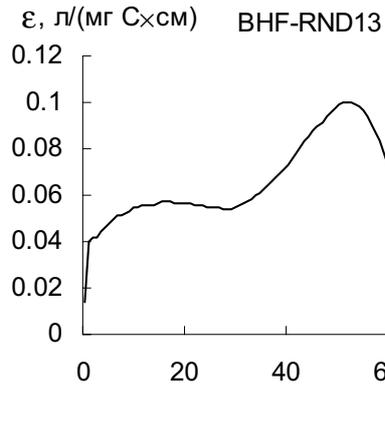
Список индивидуальных соединений использованных для расчета
 “постоянной ячейки” и соответствующие $(\epsilon^*)_{\text{exp}}$ при 254 нм

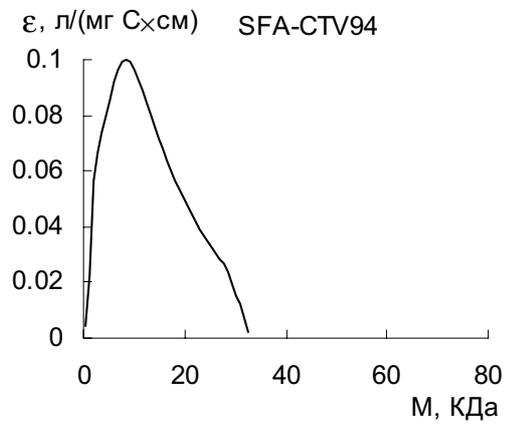
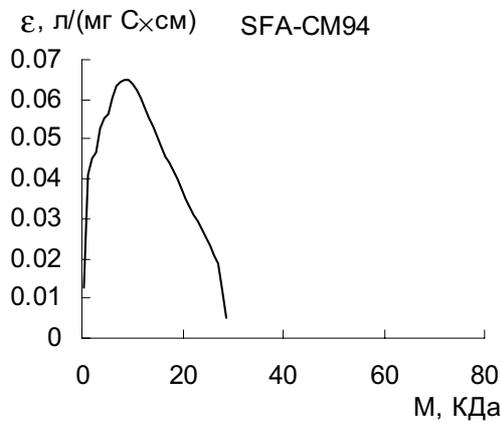
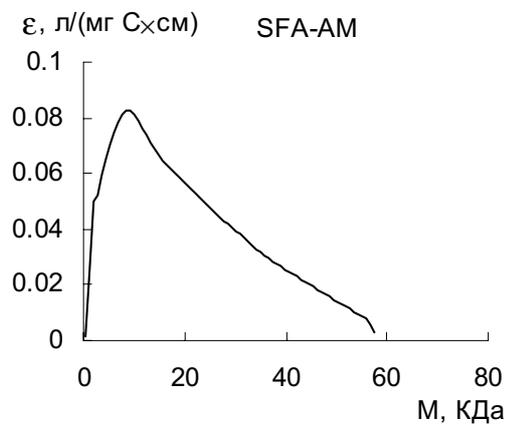
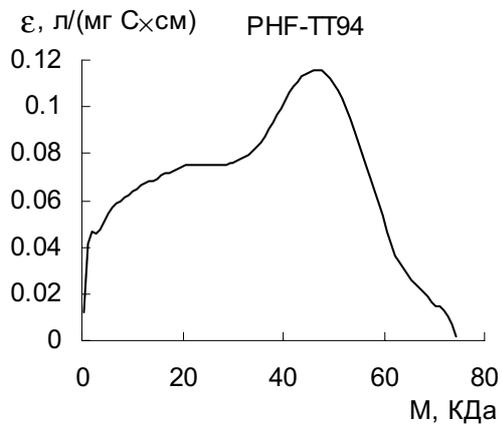
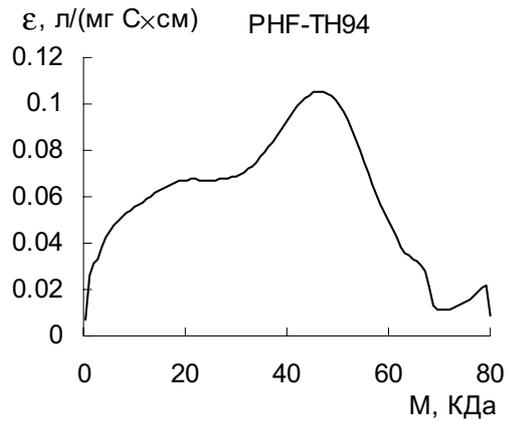
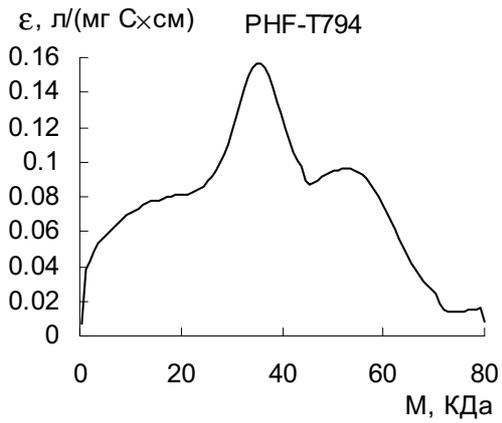
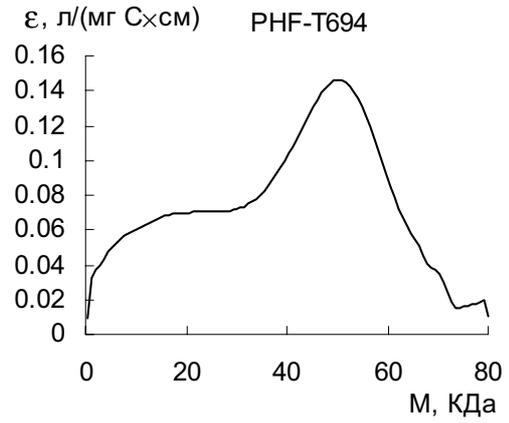
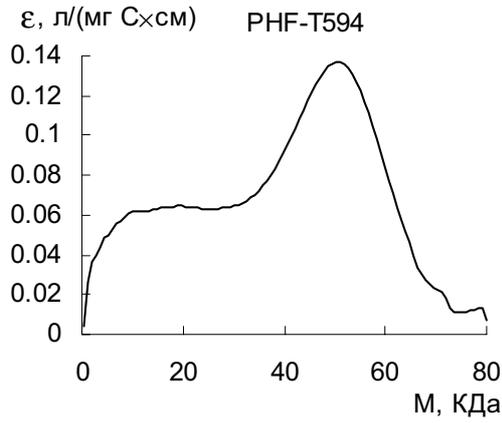
Соединение	Интеграл хр. по УФ / интеграл хр. по $C_{\text{орг}}$	$(\epsilon^*)_{\text{exp}}$ при 254 нм
Бензолсульфоновая	0.0514	0.0048
3-фенилпропионовая	0.0427	0.0061
5-гидроксифенилуксусная	0.0763	0.0083
4-гидроксифенилуксусная	0.0526	0.0097
3-гидроксibenзойная	0.0855	0.0111
2-метоксибензойная	0.0967	0.0117
Фталевая (хр. 1)	0.162	0.0186
Фталевая (хр. 2)	0.162	0.0186
2,3-гидроксibenзойная	0.316	0.0297
3,5-гидроксibenзойная	0.318	0.0326
Ванилиновая	1.068	0.0872
Галловая	1.278	0.1005

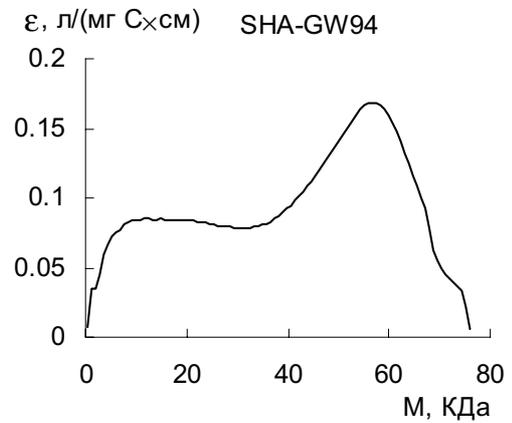
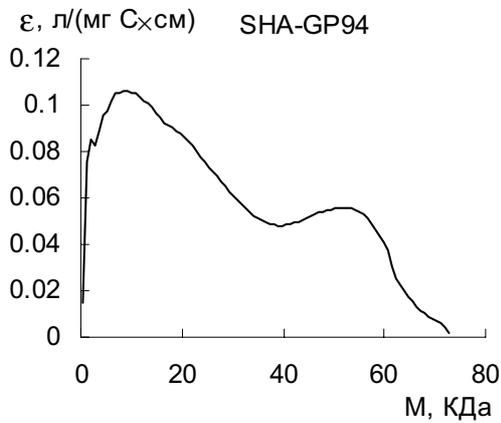
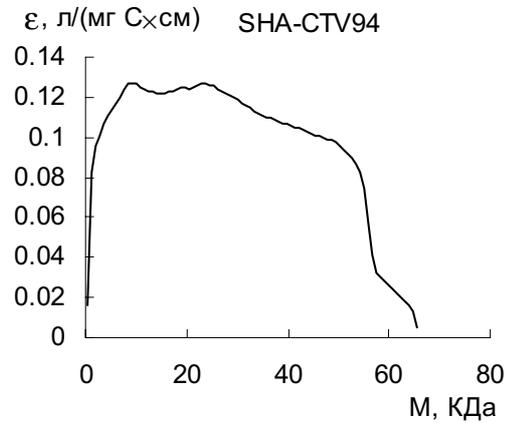
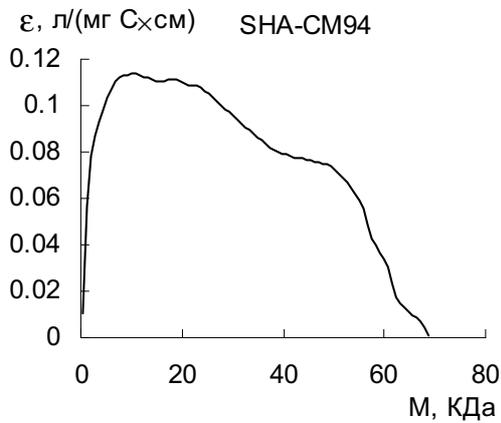
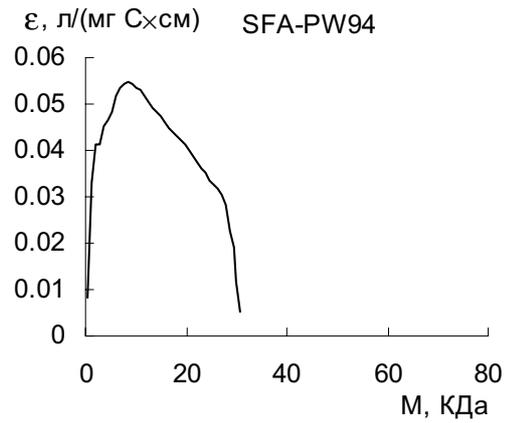
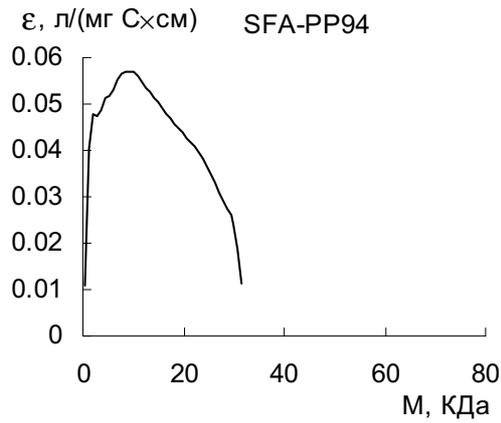
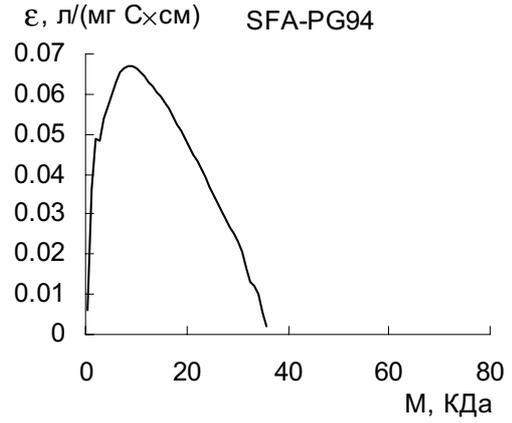
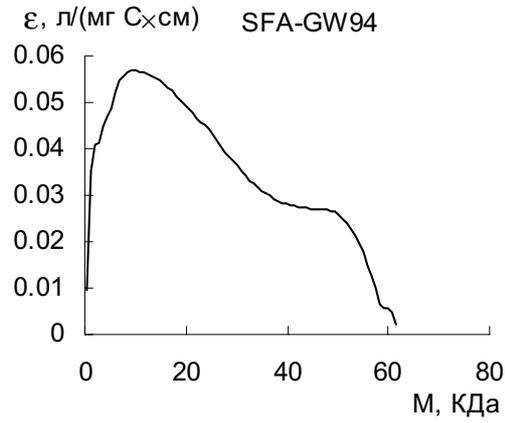


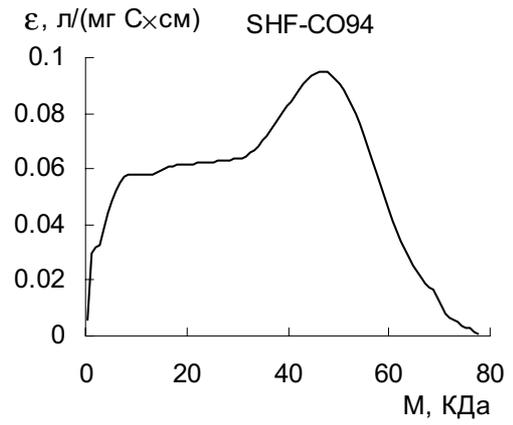
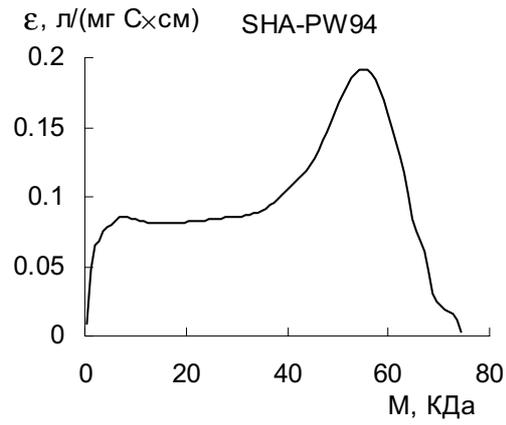
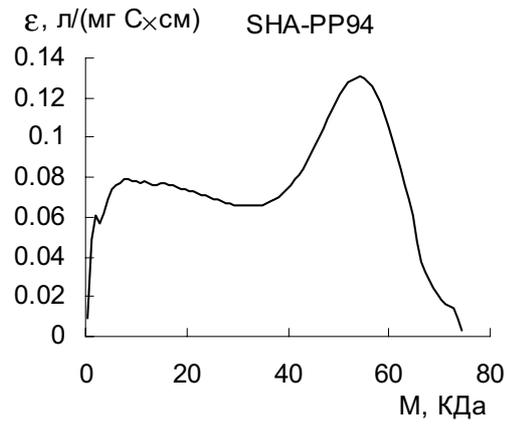
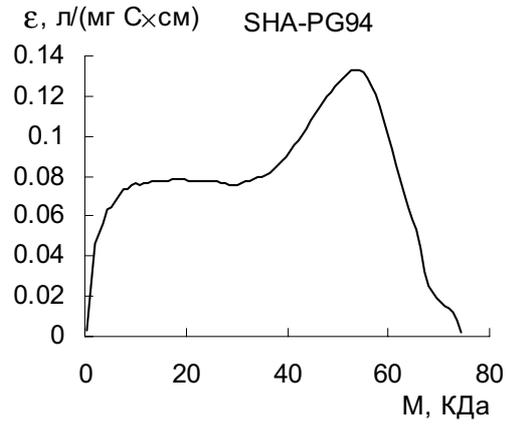
при 254 нм и соответствующее отношение площади под
 УФ-хроматограммой к площади под $C_{\text{орг}}$ -хроматограммой
 $(I_{\text{УФ}}/I_{\text{C}_{\text{орг}}})$ для индивидуальных соединений,
 использованных при расчете “постоянной ячейки”.











Формулы для расчета дисперсионных весов

1) Отношение дисперсии между классами (SD между) к дисперсии внутри классов (SD внутри) (w_1):

$$\text{SD между} = \frac{\sum_{j=1}^m n_j (\bar{x}_j - \bar{x})^2}{m-1}$$

$$\text{SD внутри} = \frac{\sum_{j=1}^m \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ji} - \bar{x}_j)^2}{n-m}$$

$$w_1 = \text{SD между} / \text{SD внутри}$$

где

m – число всех классов;

n_j – число хроматограмм класса j ;

$n = \sum n_j$ – число всех хроматограмм;

\bar{x} – общее среднее дескриптора (усредненное по хроматограммам)

\bar{x}_j – среднее дескриптора для хроматограмм класса j ;

x_{ji} – значение дескриптора для хроматограммы i класса j .

2. Дисперсионный вес (w_2):

$$w_{jk} = \frac{\sum_{i=1}^{n_j} x_{ji}^2 / n_j - 2 \sum_{i=1}^{n_j} x_{ji} \sum_{i=1}^{n_k} x_{ki} / n_j n_k + \sum_{i=1}^{n_k} x_{ki}^2 / n_k}{\sum_{i=1}^{n_j} (x_{ji}^2 - \bar{x}_j) / n_j + \sum_{i=1}^{n_k} (x_{ki}^2 - \bar{x}_k) / n_k}$$

$$w_2 = \left(\prod w_{jk} \right)^{2/(m(m-1))}.$$

3. Дисперсионный вес Фишера (w_3):

$$w_{jk} = \frac{|\bar{x}_j - \bar{x}_k|}{\sum_{i=1}^{n_j} (x_{ji}^2 - \bar{x}_j) / n_j + \sum_{i=1}^{n_k} (x_{ki}^2 - \bar{x}_k) / n_k}$$

$$w_3 = \frac{\sum w_{jk}}{m(m-1)}.$$

Методика определения ртути (II) в присутствии гумусовых кислот

Ртуть в растворе в присутствии гумусовых кислот определяли методом атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара (ААСХП). В качестве восстановителя использовали NaBH_4 в кислой среде. Для определения ртути при рН7 проводили предварительную пробоподготовку, заключающуюся в окислении гумусовых кислот персульфатом калия.

Реактивы и оборудование. Определение Hg(II) проводили с использованием прибора SpectrAA-30 с приставкой VGA-76 фирмы "Varian". Для измерения поглощения паров ртути использовали кварцевую кювету с длиной оптического пути 15.5 см.

Для определения Hg(II) в растворах в качестве восстановителя использовали 0.3% раствор NaBH_4 в 0.1 М NaOH . Для приготовления указанного восстановительного раствора навеску твердого NaOH растворяли в дистиллированной воде и добавляли NaBH_4 . Раствор готовили не более, чем за сутки до употребления. Для создания кислой среды непосредственно при восстановлении Hg(II) использовали 5 М HCl .

Калибровочные растворы Hg(II) готовили разбавлением стандартного в 3%-ном растворе HNO_3 . Концентрация калибровочных растворов Hg(II) составляла 10, 20, 30, 40, 50 мкг/л. В качестве стандартного использовали раствор $\text{Hg(NO}_3)_2$ 1 г/л (по Hg) (ГСО 3497-86, приготовлен в СКБ ФХИ им. А.В. Богатского, г. Одесса).

Пробоподготовка. К 10 мл пробы, предварительно нагретой на кипящей водяной бане в высокой (для предотвращения испарения) пробирке добавляли 100 мг $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ и продолжали нагревание в течение трех минут. Через 3 минуты пробирку извлекали из бани и добавляли 2 капли HNO_3 конц. (для разложения остатков персульфата). Когда раствор остывал до комнатной температуры, в нем определяли содержание Hg(II) методом ААСХП.

Определение методом ААСХП. Анализируемый раствор, 0.3% раствор NaBH_4 и 5 М раствор HCl прокачивают через смеситель, после чего пары ртути из реакционной смеси выдувают аргоном и определяют поглощение при 253.7 нм. Скорость прокачки растворов через смеситель составляет: для пробы – 6 мл/мин, для реагентов – 2 мл/мин.

Относительная ошибка определения указанным методом не превышает 3%.