

На правах рукописи

Перминова Ирина Васильевна

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

02.00.02 – Аналитическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук

Москва-2000

Работа выполнена на кафедре органической химии Химического факультета
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Официальные оппоненты:

доктор химических наук,
член-корреспондент РАН
Тарасова Н.П.

доктор химических наук,
профессор
Шпигун О.А.

доктор химических наук,
профессор
Варшал Г.М.

Ведущая организация:

Российский Университет Дружбы Народов

Защита состоится *20 декабря 2000 г* года в *16 час. 10 мин* в аудитории *344* на заседании Диссертационного совета Д.053.05.60 кафедры аналитической химии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова по адресу:
119899, Москва, ГСП-3, Москва, Ленинские горы, МГУ, Химический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Химического факультета МГУ

Автореферат разослан *20 ноября 2000 г.*

Ученый секретарь

Диссертационного Совета

кандидат химических наук



И.И. Торочешникова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. 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.

Научная новизна. На примере гумусовых кислот разработана методология анализа органических объектов стохастического характера и свертки полученной информации, позволяющих определять классификационные признаки таких объектов и прогнозировать их свойства.

Разработан подход к численному описанию строения органических объектов стохастического характера с помощью интегральных дескрипторов состава (трактуемого в самом широком смысле – элементного, структурно-группового и молекулярно-массового), отвечающих критериям фундаментальности, воспроизводимости и специфичности.

Определены дескрипторы состава, обладающие максимальной дискриминирующей способностью по априорным классификационным признакам “источник происхождения” и “фракционный состав” для обширной выборки препаратов гумусовых кислот.

Разработан способ количественной характеристики детоксицирующих свойств гумусовых кислот с помощью констант детоксикации, основанный на применении концепции комплексообразования/связывания для описания процессов детоксикации тяжелых металлов и органических экотоксикантов гумусовыми кислотами.

Разработаны подходы к получению прогностических моделей “строение – свойство” для органических объектов стохастического характера адекватные предложенному способу численного описания их строения с помощью широкого набора дескрипторов состава.

Практическая значимость работы. Разработан комплекс методик анализа гумусовых кислот, включающий в себя: определение элементного состава в расчете на безводную беззольную пробу; ПМР-определение функционального состава; условия получения количественных ^{13}C ЯМР спектров; гель-хроматографическое определение молекулярных масс. Комплекс данных методик может быть внедрен в практику лабораторий химико-аналитического профиля.

Создано оригинальное программное обеспечение Geltreat для обработки хроматографических и спектроскопических данных, позволяющее рассчитывать широкий набор численных дескрипторов исходных распределений. Программа работает на ПК под Windows, что обеспечивает возможность ее широкого использования в исследовательской практике.

Создана обширная база данных по интегральным характеристикам состава гумусовых кислот, включающая данные по содержаниям элементов, углерода и водорода в составе структурных групп, средним молекулярным массам и полидисперсности, а также соответствующие описательные статистики для представительных выборок препаратов различного происхождения и фракционного состава.

Предложен способ определения Hg(II)-эквивалентной концентрации гумусовых кислот и адсорбционная методика определения констант устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II) с использованием конкурентного комплексообразования.

Получен широкий набор констант устойчивости комплексов с Hg(II), констант связывания и детоксикации ПАУ и атразина для представительных выборок препаратов различного происхождения и фракционного состава, которые могут быть использованы для расчета форм существования экотоксикантов в природных водоемах и прогноза их опасности.

Получены прогностические модели “строение – связывающие / детоксицирующие свойства гумусовых кислот” для Hg(II), ПАУ и атразина, которые могут быть использованы для целевого поиска препаратов с максимальной связывающей и детоксицирующей способностью по отношению к перечисленным экотоксикантам в целях применения в качестве детоксицирующих агентов.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы были представлены на VII, VIII, IX и X конференциях Международного общества по изучению гуминовых веществ (IHSS) в 1994 (Тринидад и Тобаго), 1996 (Вроцлав, Польша), 1998 (Аделаида, Австралия) и 2000 гг. (Тулуза, Франция), Симпозиуме IHSS “Humic substances in transport processes” (Анахайм, США, 1997), Международном конгрессе “Вода: экология и технология” (Москва, 1994), I Всемирном конгрессе и XVIII Конференции Международного общества по химии и токсикологии окружающей среды (SETAC) (Лиссабон, Португалия, 1993) и (Сан Франциско, США, 1997), IV и IX Конференциях Европейского Общества по токсикологии и химии окружающей среды (SETAC-Europe) (Брюссель, Бельгия, 1994 и Лейпциг, ФРГ, 1999), Международном симпозиуме “Тяжелые металлы в окружающей среде” (Пушино, 1996), VII Европейской конференции по спектроскопии биологических молекул (Мадрид, Испания, 1997), Международных симпозиумах “Refractory organic substances in the environment” (ROSE-I, Карлсруэ, 1997 и ROSE-II, Карлсруэ, ФРГ, 2000), XVI Всемирном конгрессе почвоведов (Монпелье, Франция, 1998), XVI Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Санкт-Петербург, 1998), X Международной конференции “Магнитный резонанс в химии и биологии” (Суздаль, 1998), XVII Международном симпозиуме по полядерным ароматическим углеводородам (ISPAC) (Бордо, Франция, 1999), XXXI Международном конгрессе ИЮПАК (Берлин, ФРГ, 1999), II European Symposium “NMR in soil science” (Фрайзинг, ФРГ, 2000), NATO ASI “Environmentally acceptable pollution and reclamation endpoints” (Вышеград, Венгрия, 2000).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 34 статьи.

Вклад автора в работы, выполненные в соавторстве и включенные в диссертацию, состоял в формировании направления, активном участии во всех этапах исследования, постановке конкретных задач и их экспериментальном решении, интерпретации и обсуждении экспериментальных данных.

Положения, выносимые на защиту:

1. Общая методология анализа гумусовых кислот и численного описания их строения в терминах интегральных дескрипторов состава.
2. Комплекс методик определения элементного, структурно-группового и молекулярно-массового состава гумусовых кислот.
3. Новые способы обработки данных (включая программное обеспечение) спектроскопических и хроматографических данных для расчета дескрипторов состава гумусовых кислот.
4. Результаты исследования строения гумусовых кислот методами элементного анализа, одномерной и двумерной спектроскопии ЯМР на ядрах ^{13}C и ^1H и эксклюзионной хроматографии.
5. Результаты исследования связывающих и детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к различным экотоксикантам с помощью физико-химических методов и биотестирования.
6. Результаты классификации гумусовых кислот по признакам “источник происхождения” и “фракционный состав”.
7. Методические подходы к прогнозу связывающих и детоксицирующих свойств гумусовых кислот на основании дескрипторов состава и полученные прогностические модели.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, 8 глав, заключения, основных выводов и списка литературы.

В *первой главе* дается критический анализ литературных данных по определению элементного, структурно-группового и молекулярно-массового состава гумусовых кислот и исследованию их связывающих и детоксицирующих свойств по отношению к различным классам экотоксикантов, на основе которого сформулирован ряд нерешенных проблем анализа, классификации и прогноза свойств гумусовых кислот.

Вторая глава посвящена принципам формирования исследованной выборки препаратов гумусовых кислот. Описываются основные методы их выделения из природных объектов. Приводится описание происхождения и фракционного состава использованных в работе препаратов.

Третья глава посвящена определению элементного состава гумусовых кислот в расчете на беззольную безводную пробу, приводятся соответствующие результаты и их метрологические оценки.

Четвертая глава посвящена исследованию структурно-группового состава гумусовых кислот с помощью методов одномерной и двумерной спектроскопии ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C , титриметрии, ВЭЖХ и деструктивных методов анализа.

Пятая глава посвящена определению молекулярно-массового состава гумусовых кислот методом эксклюзионной хроматографии и описанию способов расчета дескрипторов молекулярно-массового состава.

Шестая глава посвящена классификации гумусовых кислот по признакам “источник происхождения” и “фракционный состав” на основании полученного широко набора интегральных дескрипторов состава.

Седьмая глава посвящена исследованию связывающих и детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к различным классам экотоксикантов на примере Hg(II), ПАУ и атразина.

Восьмая глава посвящена получению прогностических моделей “строение – свойство” на основании дескрипторов состава гумусовых кислот.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЪЕКТА И ПРЕДМЕТА ИССЛЕДОВАНИЯ

Гумусовые кислоты относятся к органическим объектам стохастического характера наряду с такими классами соединений как нефти, лигнины, танины, хитозаны и др. По своей химической природе они представляют собой рандомизованные полимеры ароматических оксиполикарбонновых кислот, в структуру которых также входят азотсодержащие и углеводные фрагменты (рис. 1). В силу специфики строения, обусловленной наличием гидрофобного ароматического каркаса и богатой функциональными группами углеводно-пептидной периферии, гумусовые кислоты проявляют макролигандные свойства. Они образуют комплексы с ионами металлов и вступают в донорно-акцепторные и ван-дер-ваальсовы взаимодействия с различными классами органических соединений. Указанные свойства определяют протекторные функции (термин введен Д.С. Орловым) гумусовых кислот в биосфере: связывая экотоксиканты в комплексы, гумусовые кислоты снижают их биодоступность. Данное обстоятельство позволяет рассматривать гумусовые кислоты как перспективный класс соединений для получения детоксицирующих агентов природного происхождения, которые могут быть использованы в целях рекультивации водных и почвенных сред без опасности их вторичного загрязнения.

Однако их широкому практическому применению препятствует отсутствие прогностических моделей “строение – свойство”, которые бы обеспечили возможность целевого поиска гумусовых кислот с высокой детоксицирующей способностью. Это связано, в свою очередь, с отсутствием обоснованных подходов к численному описанию строения гумусовых кислот. Для этой цели используют результаты различных методов анализа и способы обработки данных, однако систематические исследования по данной проблеме практически отсутствуют.

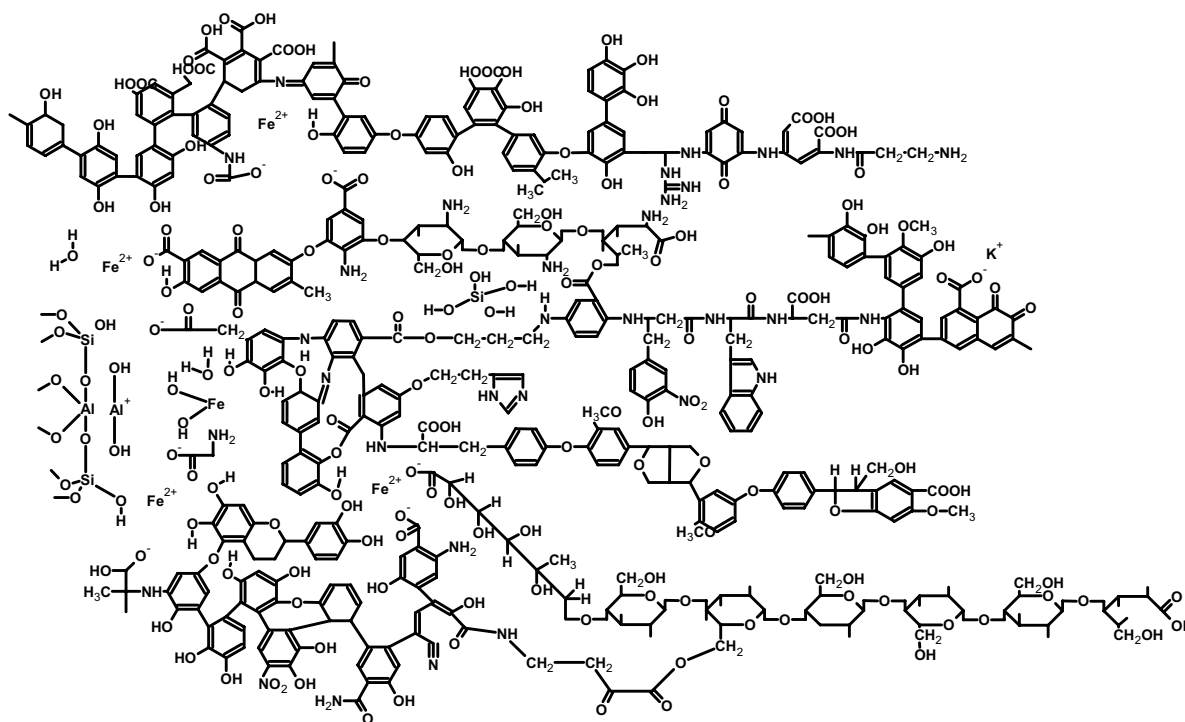


Рис. 1. Гипотетический структурный фрагмент гумусовых кислот (Kleinhempel, 1970).

В представленной работе в качестве подхода, отвечающего стохастической природе объекта, предложено **численное описание строения** гумусовых кислот с помощью **интегральных дескрипторов состава**, характеризующих три иерархических уровня структурной организации органических объектов: элементный, фрагментный и молекулярный. В качестве интегральных (характеризующих вещество в целом) дескрипторов состава рассматривали: для элементного уровня – процентное содержание основных элементов – С, Н, N, O, S и их атомные соотношения, для фрагментного уровня – процентное содержание С и Н (от общего содержания С и Н в веществе) в составе основных структурных групп, для молекулярного уровня – средние молекулярные массы и их отношения (полидисперсности).

Использование **интегральных дескрипторов состава** для описания всего разнообразия парциальных структур молекулярного ансамбля гумусовых кислот имело 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. Применимость рассчитанных дескрипторов для решения задач классификации и прогнозирования свойств показала справедливость использованного методологического подхода к получению и численному описанию информации о строении гумусовых кислот, что позволило выдвинуть тезис о возможности его распространения на все органические объекты стохастического характера.

2. ФОРМИРОВАНИЕ ВЫБОРКИ ПРЕПАРАТОВ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ

Принцип формирования рабочей выборки препаратов был ориентирован на выявление взаимосвязи между строением и свойствами гумусовых кислот. Поэтому при создании каждой выборки стремились к охвату максимального диапазона изменчивости 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 моделей каждую подвыборку составляли не менее, чем из шести препаратов (сходный источник происхождения и/или фракционный состав). Всего в работе было использовано около ста препаратов. При этом выделение гумусовых кислот из всех источников, за исключением угля, было проведено студентами, аспирантами и сотрудниками рабочей группы согласно стандартным методикам.

Для экстракции гумусовых кислот из торфа и почв использовали 0.1 М NaOH. Торфа предварительно дебитумировали, а черноземы – декальцировали. Гумусовые кислоты природных вод выделяли с использованием смол Амберлит XAD-2 и XAD-8, в ряде случаев – ДЭАЭ-целлюлозы. Фракционирование на ГК и ФК проводили путем подкисления щелочного экстракта до pH 1-2. Для получения ГК и ФК в Н-форме ГК обессоливали диализом, а ФК и ГФК – на катионообменниках. В твердом виде препараты выделяли лиофильным высушиванием или выпариванием.

В качестве основных источников происхождения гумусовых кислот использовали верховые и низинные торфа; почвы различной зональности (дерново-подзолистые, серые лесные и черноземы) и вида использования (участки под лесом, пахотные и огородные), природные воды (болотные и речные) и донные отложения пресноводных водоемов. Кроме того, в работе использовали коммерческие препараты ГК угля и фракционированные препараты природных вод, любезно предоставленные Др G. Abbt-Braun (Университет Карлсруэ, ФРГ).

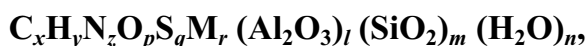
В шифры препаратов закладывали обозначение источника происхождения (вода/*Aqua*, донные отложения/*Bottom sediments*, уголь/*Coal*, торф/*Peat*, почва/*Soil*) и фракционного состава (ГФК/*HF*, ГК/*HA*, ФК/*FA*, растворенное органическое вещество и гумусовые кислоты почвенного раствора – РОВ/*DOM* и РГФК/*DHF*, соответственно).

Всего в работе было использовано *106 препаратов гумусовых кислот*, из них:

34 препарата торфа:	18 ГФК, 7 ГК, 7 ФК, 1 РОВ;
47 препаратов почв:	16 ГФК, 18 ГК, 9 ФК, 4 РГФК;
16 препаратов природных вод:	11 ГФК, 1 ГК, 2 ФК, 2 РОВ;
6 препаратов угля:	6 ГК;
3 препарата донных отложений:	3 ГФК.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА ПРЕПАРАТОВ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ

Под элементным составом гумусовых кислот понимают состав их органической части, в которую входят С, Н, N, О и S, при этом содержание N и S не превышает 1-5 % (масс). Однако в состав выделяемых препаратов входят и неорганические компоненты: зольные элементы (ионы металлов, оксиды кремния и алюминия) и гигроскопическая вода. Поэтому в общем виде брутто-формулу гумусовых кислот можно записать как:



где M – ионы металлов, x, y, z, p, q, l, m, n – стехиометрические коэффициенты.

Указанные факторы – большое различие в абсолютных содержаниях элементов органической части и наличие неорганических компонентов – создают основные методические трудности при проведении элементного анализа препаратов гумусовых кислот, которые будут обсуждены ниже.

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

Воспроизводимость определения элементов в препаратах гумусовых кислот оценивали по результатам внутри- и межлабораторных опытов, в которых принимали участие три лаборатории – Химфака МГУ, Института высокомолекулярных соединений РАН (ИВС) и Технического университета Карлсруэ, ФРГ (ТУК)*. В контрольную выборку при проведении межлабораторного опыта по определению СНN включали 13 препаратов с зольностью от 1 до 20 %. Определение СНN и О выполняли методом автоматического полумикроанализа, S – по методу Шенигера (МГУ). Общее содержание зольных форм элементов (зольность) определяли по методу сжигания (850°C, 40 мин) (МГУ). Гигроскопическую воду определяли по методу обратного набора веса (пробу высушивали в вакууме при 40°C, 24 ч) (ТУК).

Для результатов по определению С средние внутрилабораторные воспроизводимости ($s_r^{лаб}$, %) составляли: 1.9 (МГУ), 0.9 (ТУК) и 1.7 (ИВС); средняя межлабораторная воспроизводимость ($s_r^{межлаб}$, %) составляла 2.4. Для определения Н соответствующие $s_r^{лаб}$ (%) составляли: 3.8, 1.6 и 2.5, $s_r^{межлаб}$ – 7.1%; для N $s_r^{лаб}$ (%) составляли: 4.6, 4.6 и 5.5, $s_r^{межлаб}$ – 19.7%. Для остальных данных внутрилабораторные s_r составили: О – 2.0 %, S – 9.3 %, зольность (Ash) – 7.4 %, влажность (H₂O) – 3.8 %.

Сопоставимость данных по СНN характеризовали попарно по t-критерию: для С и N она была удовлетворительной для всех трех лабораторий, для Н сопоставимыми были данные ИВС и ТУК, тогда как между данными МГУ и двумя другими сериями наблюдались статистически значимые различия.

Как показывают приведенные результаты, самой высокой воспроизводимостью характеризовались данные по С и О. Низкая воспроизводимость данных по N и S

* Все анализы в ТУК были выполнены автором данной работы.

обусловлена отсутствием адекватных образцов сравнения для определения содержаний этих элементов на уровне 0.1-5 %. Довольно большой разброс и ограниченная сопоставимость данных по содержанию Н связаны с существенным влиянием атмосферной влажности на результаты его определения из-за присутствия в пробе гигроскопической воды на уровне 7-10 %. Поэтому при сопоставлении данных по содержанию Н их необходимо корректировать на влажность пробы. Принимая во внимание колебания атмосферной влажности, определение Н и Н₂О целесообразно проводить в один день.

Использование для прямого определения О 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 О в гумусовых кислотах и целесообразности использования образцов сравнения с содержанием О на уровне 20-30 %, что соответствует таковому в гумусовых кислотах.

Определение содержания гигроскопической воды в 33 препаратах гумусовых кислот показало, что весь диапазон изменчивости указанной величины составляет 6-12 %, а среднее по выборке составляет 8 %. При этом максимальная влажность (10-12 %), как правило, наблюдается для высокозольных препаратов. Столь высокое содержание гигроскопической воды требует обязательной корректировки данных на влажность пробы, однако ее определение весьма редко входит в используемые схемы элементного анализа гумусовых кислот. Для решения данной проблемы нами предложено использовать найденное для представительной выборки препаратов среднее значение 8 % при отсутствии экспериментальных данных по влажности.

Высокий разброс данных по зольности, по-видимому, связан с неоптимальностью использованного регламента сжигания пробы. Возможное недоопределение углерода в высокозольных препаратах из-за образования термостойких карбонатов щелочных металлов оценивали, корректируя результаты прямого определения С на зольность препаратов (с учетом влажности пробы) и определяя коэффициент корреляции между значениями С и зольности. Соответствующее значение r (для выборки из 70 препаратов) составило 0.39, что говорит о весьма слабой корреляции между скорректированными значениями С и зольностью. Это указывает на корректность общепринятой процедуры расчета содержания элементов на беззольную пробу путем использования величины общей зольности без учета форм зольных элементов.

Дополнительным подтверждением этому являются результаты по определению возможного компонентного состава золы гумусовых кислот, выполненного для 43 препаратов гумусовых кислот. Его проводили на основании АЭС-ИСП данных о

содержании зольных элементов в растворе гумусовых кислот известной концентрации, которые использовали для расчета общей зольности, делая предположение о форме зольного элемента на основании его химических свойств. При этом содержание карбонатов щелочных металлов рассчитывали с учетом реакции с кислотными оксидами и без. Сопоставление данных показало наличие тесной корреляции между рассчитанными и экспериментальными величинами ($r = 0.92$), при этом лучшее соответствие (близость тангенса угла наклона единице) наблюдалось для значений общей зольности, рассчитанных с учетом разложения карбонатов.

Полученные данные использовали для расчета содержания элементов в безводной беззольной пробе гумусовых кислот. Для этого массу исходного препарата рассматривали как состоящую из суммы органической (CHNOS – беззольная безводная проба) и неорганической части (вода и зольные элементы). Затем содержания элементов, входящих в органическую часть, корректировали на суммарное содержание золы и гигроскопической воды. При этом необходимо было учесть, что в условиях автоматического микроанализа Н и О гигроскопической воды определяются вместе с органической частью, поэтому данные по их содержанию сначала корректировали на влажность. При определении О по разности коррекция на влажность не нужна. Математически описанную процедуру можно записать как:

$$\text{для C, N, S: } X_{\text{corr}} = \frac{X_{\text{dir}}}{100 - \text{Ash} - \text{H}_2\text{O}} \times 100\% \quad (1a), \quad \text{для O и H: } X_{\text{corr}} = \frac{X_{\text{dir}} - X_{\text{H}_2\text{O}}}{100 - \text{Ash} - \text{H}_2\text{O}} \times 100\% \quad (1b)$$

где X_{dir} – данные прямых, а X_{corr} – скорректированных определений (% масс.).

Тогда О можно определить по разности как:

$$O_{\Delta} = 100 - C_{\text{corr}} - H_{\text{corr}} - N_{\text{corr}} - S_{\text{corr}} \quad (2)$$

Проверку правильности суммы всех определений, используемых при расчете элементного состава беззольной, безводной пробы гумусовых кислот, проводили для набора препаратов, содержание О в которых определяли прямым методом. В данном случае после выполнения всех коррекций сумма CHNOS, зольности и воды должна составлять 100 %. Полученные результаты показали, что вычитание О воды приводит в среднем к занижению результатов анализа, – среднее суммы определений составляет 95 %. Исключение этой процедуры дает завышенные результаты – 104 %. Это говорит о некорректности учета влияния гигроскопической воды на результаты прямого определения О путем вычитания О воды, найденной для условий атмосферной влажности. По-видимому, часть слабо связанной воды теряется при продувке анализатора горячим газом. Как следует из наших данных, она может составлять 50-60 % от исходного содержания воды в пробе. В целом, полученный результат может свидетельствовать о близости всех остальных определений истинным содержаниям CHNS, золы и гигроскопической воды в препаратах гумусовых кислот.

3.2. Анализ данных по элементному составу препаратов гумусовых кислот

Найденные содержания элементов (% масс), усредненные по подвыборкам препаратов гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава, и их

дисперсии приведены в табл. 1. Наблюдается закономерное изменение содержания элементов по препаратам с заданными признаками: возрастание содержания С и снижение О в ряду: воды < почвы < торф < уголь и при переходе от ФК к ГК.

Таблица 1

Оценка среднего (\bar{X}) и дисперсии (s^2) содержания элементов (% масс., на беззольную безводную пробу) для препаратов гумусовых кислот, сгруппированных по происхождению и фракционному составу

Препараты	С		Н		N		О	
	\bar{X}	s^2	\bar{X}	s^2	\bar{X}	s^2	\bar{X}	s^2
ГФК торфа (n=16)	55.2	4.9	4.2	0.1	2.1	0.4	36.8	6.8
ГК торфа (n=10)	56.7	5.3	4.3	0.1	2.3	0.3	35.7	7.6
ФК торфа (n=8)	51.6	7.3	3.8	0.4	1.1	0.4	42.5	6.9
ГФК почв (n=6)	51.1	3.6	4.0	0.9	3.2	0.7	38.3	35.7
ГК почв (n=14)	57.3	15.9	4.0	0.7	4.7	0.6	33.2	21.5
ФК почв (n=12)	52.8	7.0	4.0	0.1	3.6	1.1	38.6	8.7
ГК углей (n=6)	63.7	20.4	3.5	0.9	1.1	0.2	30.6	19.9
ГФК вод (n=9)	49.9	24.3	4.3	0.1	1.3	0.6	41.4	36.7
Все (n=81)	54.8	22.6	4.1	0.4	2.6	2.1	36.9	25.9

Полученные результаты указывают на перспективность использования данных по элементному составу для классификации гумусовых кислот. При этом в качестве дескрипторов элементного состава наиболее целесообразно использовать содержание CHNO и атомные соотношения Н/С, О/С, С/Н.

Таким образом, впервые методически обоснован необходимый комплекс определений и способ обработки экспериментальных данных для расчета содержания элементного состава гумусовых кислот в расчете на беззольную безводную пробу. К нерешенным проблемам следует отнести прямое определение кислорода в связи с мешающим влиянием гигроскопической воды. Получен обширный массив данных по элементному составу гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава – дескрипторов базисного уровня структурной организации гумусовых кислот.

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 структурообразующих элементов – углерода и водорода – в структуре гумусовых кислот, содержание которых поддавалось бы количественному определению. Оптимальным методом для решения указанной задачи является одномерная спектроскопия ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C . Ее ограниченные возможности в плане надежного отнесения сигналов в сложных спектрах и идентификации парциальных структур, в которые входят структурные фрагменты, компенсировали с помощью метода двумерной спектроскопии ЯМР.

4.1. Одномерная спектроскопия ЯМР ^{13}C гумусовых кислот

Типичный ^{13}C ЯМР спектр гумусовых кислот (на примере ГК верхового торфа) приведен на рис. 2а. Для сопоставления приведен также и ПМР спектр (рис. 2б).

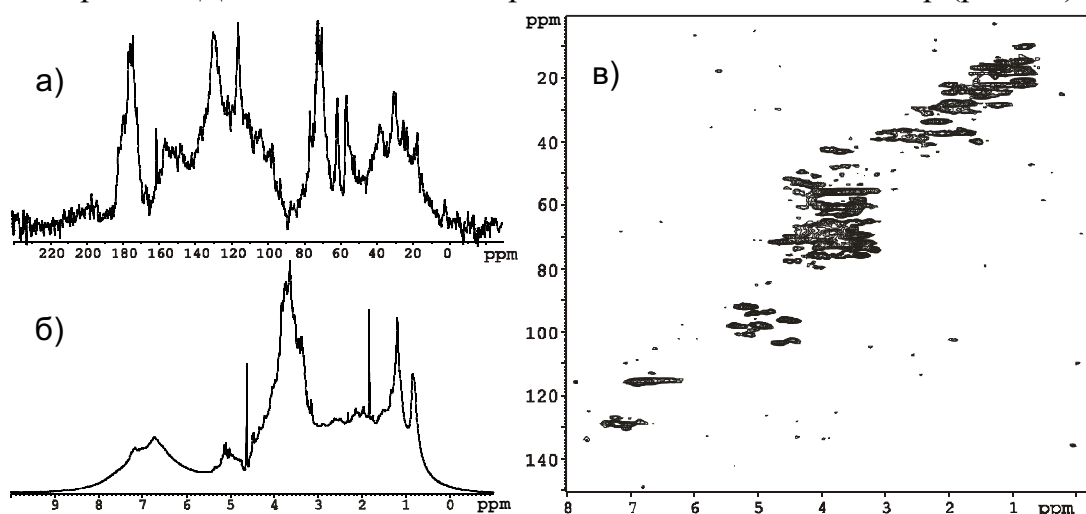


Рис. 2. Спектры ^{13}C ЯМР (а), ПМР (б) и двумерный спектр ^1H , ^{13}C – HSQC (в) для ГК верхового торфа (0.1 М NaOD). ЯМР-спектрометр Bruker-500.

Оба спектра характеризуются широкими полосами поглощения, обусловленными перекрыванием большого количества сигналов. Ввиду сильного перекрывания, отнесение сигналов возможно только “поинтервально” – согласно положению резонансов атомов со сходным химическим окружением, как это показано в табл. 2.

Таблица 2

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

Фрагмент	Интервал, м.д.		Описание
	ПМР	^{13}C ЯМР	
CH-H,C	0.5-1.95	5-50	C, H-замещенные алифатические фрагменты
α -CH	1.95-3.1		алифатические фрагменты в α -положении к электроотр. группе или ароматическому кольцу
CH ₃ -O	3.1-4.7	50-58	метоксильные фрагменты
CH ₂ -O,N		58-64	O-, N- замещенные алифатические фрагменты
CH-O,N		64-90	(“карбогидратные”)
O-CH-O,N	4.7-6.0	90-108	алифатические фрагменты, дважды замещенные гетероатомами (“аномерные”)
Ar-H,C	6.0-10.0	108-145	H-, C-замещенные ароматические фрагменты
Ar-O,N	–	145-165	O, N-замещенные ароматические фрагменты
COO-H,C	–	165-187	карбоксильные группы и их производные
C=O	–	187-220	кетонные и хинонные группы

Величины интегралов по указанным интервалам, сумма которых равна полному интегралу спектра, могут быть использованы как интегральные дескрипторы структурно-группового состава, если они пропорциональны содержанию атомов в соответствующих фрагментах. Из-за различия времен релаксации ядер C разного типа

пропорциональность величины интеграла количеству атомов С в ^{13}C ЯМР спектре достигается только при его регистрации в количественных условиях. Для этого необходимо (1) использование времени задержки между импульсами (T_d), достаточного для полной релаксации третичных и четвертичных ядер углерода, и (2) устранение ядерного эффекта Оверхаузера.

В тоже время 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. Поэтому для выбора оптимального T_d был проведен эксперимент на 12 препаратах гумусовых кислот различного происхождения. Для каждого из них регистрировали 5 спектров со временем задержки от 1 до 8 с, для всех спектральных областей (табл. 2) рассчитывали отношение парциального интеграла к таковому в спектре с $T_d = 1$ с и строили зависимость полученных отношений от T_d . Было установлено, что указанные зависимости выходили на плато при $T_d = 4$ с. Это означает, что в данных условиях достигается полная релаксация всех ядер С. В связи с изложенным все спектры ^{13}C ЯМР регистрировали при $T_d = 4$ с. Для устранения ядерного эффекта Оверхаузера на период T_d выключали развязку от протонов.

Интегрирование полученных в указанных условиях спектров проводили поинтервально (табл. 2). Найденные величины парциальных интегралов, эквивалентные доле атомов С с данным химическим окружением от суммы всех атомов С в препарате, представляли собой интегральные дескрипторы структурно-группового состава. Для оценки воспроизводимости полученных величин проводили повторное растворение пробы, регистрацию спектра и его интегрирование с использованием 5 фазирований. Интегралы спектральной интенсивности для семи из указанных в табл. 2 диапазонов характеризовались хорошей воспроизводимостью ($s_r = 6\%$), тогда как для карбонильных и ацетальных фрагментов она была существенно хуже ($s_r = 23\%$).

В выбранных количественных условиях были зарегистрированы и обработаны ^{13}C ЯМР спектры 67 препаратов гумусовых кислот. Полученные результаты усредняли по подвыборкам сходного происхождения и фракционного состава, оценки средних и дисперсий приведены в табл. 3. Наиболее принципиальные различия структурно-группового состава препаратов проявляются в соотношении ароматических и углеводных фрагментов. При этом весьма отчетливо выделяются классы наиболее ароматических ГК угля, ГК чернозема и обогащенных углеводными фрагментами ФК торфа, также довольно хорошо группируются ГФК торфа и ФК почв.

Таким образом, в результате выполненного исследования установлены условия регистрации количественных ^{13}C ЯМР спектров гумусовых кислот. Получен обширный массив данных (67 препаратов) по структурно-групповому составу гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава.

Таблица 3

Оценки средних (\bar{X}) и дисперсий (s^2) содержания углерода (% от общего C) в составе основных структурных фрагментов гумусовых кислот в препаратах, сгруппированных по источнику происхождения и фракционному составу (по данным спектроскопии ЯМР ^{13}C)

Препараты	C=O		COO		C _{Ar} O		C _{Ar}		CHO		CH ₂ O		CH ₃ O		CH _n		ΣC _{Ar}	
	\bar{X}	s^2	\bar{X}	s^2	\bar{X}	s^2	\bar{X}	s^2	\bar{X}	s^2	\bar{X}	s^2	\bar{X}	s^2	\bar{X}	s^2	\bar{X}	s^2
ГФК торфа (n=15)	3.0	3.1	14.8	3.8	12.2	12.2	30.0	18.0	12.8	20.0	2.8	1.1	3.1	0.7	17.5	3.5	42.2	37.1
ГК торфа (n=8)	3.0	1.5	13.6	9.3	11.1	28.2	32.4	15.8	10.9	14.2	2.5	0.6	4.1	1.4	19.8	19.3	43.5	65.5
ФК торфа (n=6)	2.6	1.2	13.1	11.3	7.8	4.1	24.9	8.1	21.1	45.0	3.3	1.6	2.5	1.1	18.6	26.1	32.7	16.8
ГФК почв (n=5)	2.0	1.3	14.5	13.5	9.4	16.3	33.6	32.3	9.9	8.3	2.7	0.5	3.8	5.8	20.0	53.5	43.1	21.7
ГК почв (n=16)	2.2	0.7	16.3	2.4	10.6	4.0	33.6	56.2	9.0	4.8	2.2	0.5	4.7	0.9	18.7	17.2	44.2	63.7
ФК почв (n=4)	3.1	0.7	20.1	4.4	9.4	7.6	24.1	15.0	11.5	5.8	2.5	0.2	4.1	0.2	22.5	12.6	33.4	39.1
ГК углей (n=5)	2.0	1.4	16.3	1.3	15.8	17.1	45.9	31.6	1.8	8.4	0.6	0.2	2.7	4.6	13.3	51.7	61.8	47.2
Все (n=58)	2.6	1.6	15.4	7.7	11.1	14.1	32.0	55.6	11.1	33.3	2.4	1.1	3.7	2.0	18.4	21.9	43.1	90.4

Таблица 4

Оценки средних (\bar{X}) и дисперсий (s^2) содержания водорода (% от общего H) в составе основных структурных фрагментов гумусовых кислот в препаратах, сгруппированных по источнику происхождения и фракционному составу (по данным спектроскопии ПМР)

Препараты	COOH		ArOH		ArH		AlkOH		CHO		AlkH		ΣH _{Ar} *		ΣH _{Carb} **	
	\bar{X}	s^2	\bar{X}	s^2	\bar{X}	s^2	\bar{X}	s^2	\bar{X}	s^2	\bar{X}	s^2	\bar{X}	s^2	\bar{X}	s^2
ГФК торфа (n=13)	8.8	1.7	8.1	7.2	13.2	11.1	8.5	9.9	32.6	9.1	29.2	13.1	0.2	0.002	0.4	0.001
ГК торфа (n=8)	7.3	2.8	10.9	11.6	14.8	4.8	4.3	9.1	32.1	21.0	31.0	3.7	0.2	0.001	0.4	0.001
ФК торфа (n=7)	8.9	3.1	5.7	5.2	12.0	5.7	8.6	19.6	36.6	22.6	27.4	56.3	0.2	0.001	0.5	0.006
ГК почв (n=6)	7.8	5.4	7.7	2.7	13.7	11.9	8.7	39.5	26.8	12.6	35.2	11.0	0.2	0.002	0.4	0.001
ФК почв (n=5)	10.0	11.0	4.8	6.7	9.4	11.3	8.2	3.2	29.8	22.7	37.8	13.2	0.1	0.002	0.4	0.002
Все (n=39)	8.5	4.2	7.7	10.3	12.9	10.6	7.6	16.5	32.0	23.2	31.3	28.8	0.2	0.002	0.4	0.004

*ΣH_{Ar} = ArH/(ArH+HCO+AlkH);

**ΣH_{Carb} = HCO/(ArH+HCO+AlkH)

4.2. Одномерная спектроскопия ПМР 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 расширить и дополнить набор ^{13}C ЯМР дескрипторов структурно-группового состава. Для спектроскопии ПМР не существует проблемы регистрации количественных спектров. Основным 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. Поэтому на момент постановки данных исследований использование спектроскопии ПМР для анализа гумусовых кислот ограничивалось, в основном, определением распределения водорода углеродного скелета.

Разработку ПМР методики определения Н в составе скелетных фрагментов (С-Н протоны) и функциональных групп (ОН-протоны) основывали на трех базисных 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 апротонного растворителя ДМСО- d_6 и получить спектр гумусовых кислот, где сигналы COOH, ArOH и AlkOH протонов разделены;

(2) создать условия ускоренного обмена путем добавления CF_3COOH и получить спектр, в котором сигналы ОН-протонов сдвинуты в область слабого поля, а в областях перекрывания ArOH+ArO и AlkOH+AlkO теперь находятся только скелетные протоны;

(3) путем сопоставления полученных спектров оценить соотношение $(\text{ArOH}+\text{ArO})/\text{ArO}$ и $(\text{AlkOH}+\text{AlkO})/\text{AlkO}$ протонов в растворе гумусовых кислот;

(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/ D_2O), и определить соотношение интеграла области протонов гумусовых кислот, закрываемой сигналом ДМСО- d_6 , к интегралу этой области, обусловленной только протонами гумусовых кислот.

Реализация указанной схемы потребовала применения вакуумной техники для приготовления растворов гумусовых кислот в безводном ДМСО-d₆ в отсутствие контакта с атмосферной влагой. Гигроскопическую воду из препаратов удаляли откачиванием в глубоком вакууме в течение 6 ч. Полученные спектры гумусовых кислот в ДМСО-d₆ и ДМСО-d₆ с добавкой CF₃COOD приведены на рис. 3. В первом спектре отчетливо виден сигнал COOH в области 10-12 м.д., что говорит о достижении в растворе условий медленного обмена. Характер изменения спектра при добавлении CF₃COOD указывает на сдвиг подвижных протонов в область слабого поля в результате ускорения обмена. Однако до проведения количественных расчетов необходимо было удостовериться в полноте сдвига и отсутствии в Н/D обмена скелетных протонов. Для этой цели были проведены эксперименты по сдвигу с модельными соединениями и на дейтерированном образце гумусовых кислот, которые подтвердили полноту сдвига подвижных протонов при добавлении CF₃COOD и отсутствии Н/D обмена для СН-протонов.

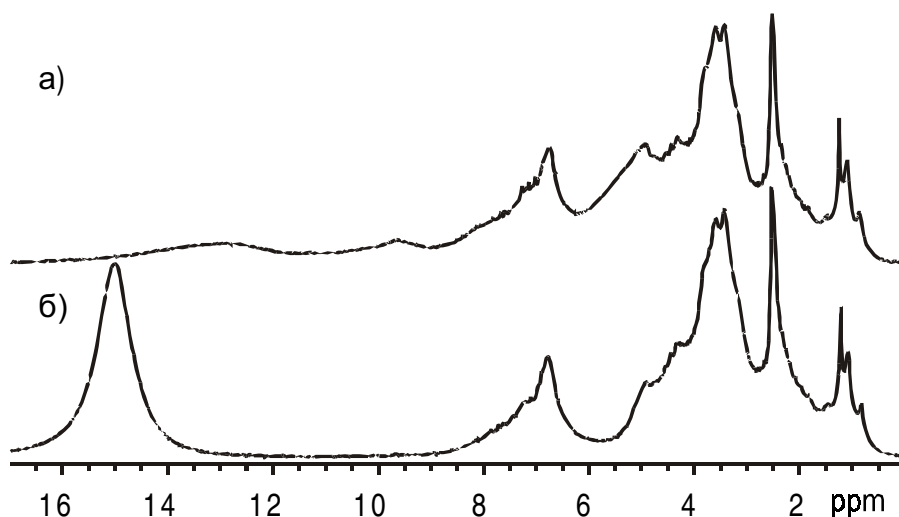


Рис. 3. Спектры ПМР препарата ФК торфа: а) ДМСО-d₆, б) ДМСО-d₆ с добавкой CF₃COOD.

Совместная обработка полученных спектров позволяет определить соотношения ArOH/ArH и AlkOH/CHO, а спектров в ДМСО-d₆ и NaOD/D₂O (рис. 3б) – α-CH/H_{ДМСО}. С помощью полученных соотношений учитывали вклад растворителя в интеграл гумусовых кислот и рассчитывали полное распределение водорода, входящего в состав препарата гумусовых кислот, между функциональными группами и скелетными фрагментами: COOH, ArOH, ArH, AlkOH, CHO, α-CH, CH. Это позволяет решить поставленную задачу и использовать указанные данные в качестве интегральных дескрипторов структурно-группового состава гумусовых кислот.

Описанная выше методика была использована для характеристики распределения водорода в структуре 40 препаратов гумусовых кислот. Полученные результаты усреднены по выборкам препаратов различного происхождения и фракционного состава и приведены в табл. 3. Заметны закономерные изменения в структуре гумусовых кислот в зависимости от их фракционного состава и происхождения. Так, в ГК угля и чернозема

подавляющая доля водорода принадлежат ароматическим фрагментам скелета, тогда как в ГФК вод их содержание минимально, что наряду с высокой окисленностью указывает на глубокую степень деградации ароматического каркаса. Максимальное содержание углеводных протонов характерно для ФК верховых торфов. Специфичность полученных дескрипторов указывает на перспективность их использования для классификации и прогноза свойств гумусовых кислот.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов впервые разработана ПМР-методика определения протонов в составе скелетных фрагментов и функциональных групп, применение которой позволило существенно расширить набор интегральных дескрипторов структурно-группового состава гумусовых кислот. Получен обширный массив данных (для 40 препаратов) по распределению водорода в структуре гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава. Правильность определения кислотных групп по предложенной методике была проверена путем сопоставления полученных результатов с данными независимого титриметрического метода.

4.3. Определение кислотных групп гумусовых кислот методами титриметрии

Кривые титрования гумусовых кислот не имеют выраженной точки перегиба. Поэтому традиционно для определения кислотных групп гумусовых кислот используют методы заместительного и обратного титрования. Для этой цели проводят реакции с ацетатом кальция и гидроксидом бария, в результате которых образуются нерастворимые гуматы кальция и бария. По количеству выделившейся уксусной кислоты определяют содержание карбоксильных групп (Са-ацетатная методика), а обратным титрованием избытка $\text{Ba}(\text{OH})_2$ определяют сумму карбоксильных и фенольных групп (баритовая методика).

Выбор условий анализа, обеспечивающих правильность данных по карбоксильной и общей кислотности гумусовых кислот, показал, что они достигаются при: (1) определении точки эквивалентности по экспериментальной кривой титрования уксусной кислоты, вытесненной из $\text{Ca}(\text{OAc})_2$, (2) использовании соотношений реагент/субстрат: 35-40 ммоль/г ГФК для $\text{Ba}(\text{OH})_2$; 250-400 ммоль/г ГФК – $\text{Ca}(\text{OAc})_2$. По баритовой методике было проанализировано 8, по Са-ацетатной – 16 препаратов гумусовых кислот. Полученные результаты приведены в табл. 5 и 6, соответственно.

В последние годы все большее применение находят и методы прямого потенциометрического титрования, что связано с развитием компьютерной техники и методов математического моделирования. Для интерпретации кривой титрования гумусовых кислот использовали модель непрерывного рК спектра с решением интегрального уравнения кривой титрования методом аппроксимации. Разработку компьютерного обеспечения осуществили доц. А. В. Гармаш (каф. аналит. химии) и А. В. Кудрявцев. Алгоритм расчета основан на численном решении относительно q_i

(мольная доля групп с константой диссоциации K_i) системы уравнений вида (3), записанных для каждой точки кривой титрования:

$$\alpha = \frac{[\text{H}^+] - [\text{OH}^-]}{c_0 V_0} (V_0 + V_T) + \frac{c_T V_T}{c_0 V_0} = \sum_{i=1}^N q_i \frac{K_i}{K_i + [\text{H}^+]} \quad (3)$$

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.

Набор значений рК от 1 до 12 с шагом 1 был задан априори, так как более высокое разрешение приводит к неустойчивости решения. Метод был протестирован на смесях низкомолекулярных электролитов и полиэлектролитах известного состава. В целом наблюдалась хорошая воспроизводимость рК-спектров для параллельных титрований гумусовых кислот (рис. 4).

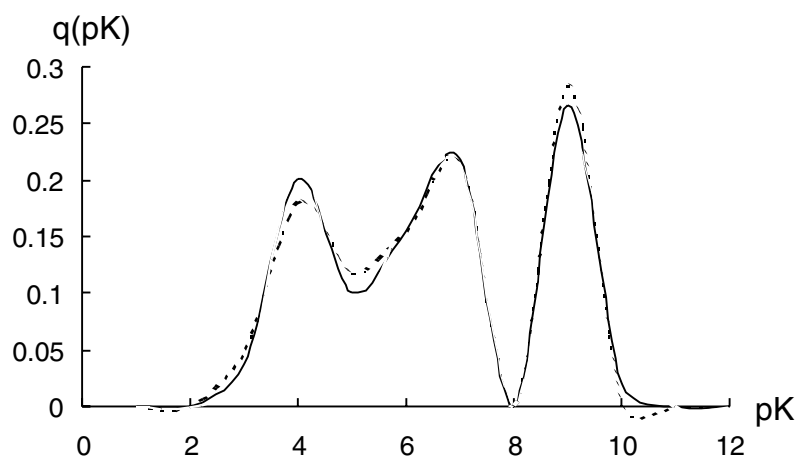


Рис. 4. рК-спектры гумусовых кислот (на примере ГФК торфа), рассчитанные из трех параллельных титрований (q – мольная доля групп с данным значением рК).

В рК-спектрах практически всех исследованных препаратов гумусовых кислот наблюдался минимум при $pK = 8$, что позволяло отнести пики с $pK < 8$ к карбоксильным, а с $pK > 8$ – к фенольным группам. Содержание карбоксильных и фенольных групп рассчитывали, суммируя доли всех кислотных групп, входящих в указанные интервалы. Полученные результаты приведены в табл. 5 и 6.

Для сопоставления с результатами титриметрических определений, из данных ПМР рассчитывали карбоксильную и, по аналогии, общую кислотность гумусовых кислот (ммоль/г) как $\text{COOH}(\text{ПМР}, \%) \times \text{H}(\text{эл. ан.}, \text{ммоль/г})$. Результаты приведены в табл. 5 и 6.

Таблица 5

Общая кислотность препаратов гумусовых кислот по данным титриметрических методов и ПМР спектроскопии

Препарат	Общая кислотность, ммоль/г			Препарат	Общая кислотность, ммоль/г		
	Ва*	pK*	ПМР**		Ва*	pK*	ПМР**
PHF-T5H94	10±1	5.1±0.3	5.9±0.9	PHF-TNH94	7.9±0.4	6.0±0.1	6.6±1.0
PHF-T6H94	7.0±0.6	3.6±0.1	8.7±1.3	PHF-TTL94	9.4±0.3	5.0±0.3	7.1±1.0
PHF-T7H94	8.2±0.6	5.0±0.3	8.4±1.2	SHF-Co94	7.2±0.4	5.8±0.3	7.3±1.3
PHF-T10L94	9±1	8.7±0.4	7.8±1.1	AHF-RMX2	10.9±0.6	9.95±0.4	7.0±1.1

* $n = 3$, ** пять фазирований, $P = 0.95$.

Карбоксильная кислотность препаратов гумусовых кислот по данным титриметрических методов и ПМР спектроскопии

Препарат	ммоль COOH/г			Препарат	ммоль COOH/г	
	Ca(AcO) ₂	pK-спектр*	ПМР**		Ca(AcO) ₂	ПМР
RHF-T5H94	3.1±0.3	3.0±0.2	3.6±0.5	RHF-T3L98	4±0.3	4.4±0.7
RHF-T6H94	3.1±0.1	2.7±0.2	4.4±0.7	RHF-T4H98	3.5±0.3	4.3±0.6
RHF-T7H94	2.9±0.1	3.0±0.3	4.4±0.7	RHF-T5H98	4.6±0.4	2.7±0.4
RHF-T10L94	3.1±0.2	7.0±0.5	3.5±0.5	RHF-T6H98	3.9±0.3	3.7±0.6
RHF-TNH94	4.0±0.2	4.0±0.2	3.2±0.5	RHA-T3L98	4.2±0.3	4.7±0.7
RHF-TTL94	4.0±0.4	4.1±0.2	3.4±0.5	RHA-T4H98	2.8±0.2	3.0±0.5
SHF-Co94	3.9±0.3	3.9±0.2	4.9±0.7	RHA-T5H98	2.8±0.2	3.1±0.5
AHF-RMX2	7.6±0.6	7.7±0.8	5.3±0.8	RHA-T6H98	3.2±0.3	2.6±0.4

*n = 3, ** пять фазирований, P = 0.95.

Общее содержание кислотных групп в исследованных образцах ГФК торфа, вод и почв лежит в пределах 6-11 ммоль/г, карбоксильная кислотность составляет 3-5 ммоль/г, что соответствует диапазонам приводимых в литературе величин. Сравнение полученных результатов показало, что для общей кислотности данные, получаемые из pK-спектров, при P = 0.95 значимо отличаются от остальных. Вероятно, это связано с присущим pK-спектроскопии ограничением – невозможностью определения кислотных групп с pK ≥ 11. В тоже время для карбоксильной кислотности все методы дают сопоставимые результаты. Сравнение результатов ПМР с данными независимых методов позволяет сделать вывод о правильности предложенной ПМР-методики.

4.4. Двумерная корреляционная спектроскопия ЯМР

В представленной работе выполнено первое систематическое исследование структуры гумусовых кислот с помощью комплекса методов корреляционной двумерной спектроскопии ЯМР в гетероядерном (¹H, ¹³C) и гомоядерном (¹H, ¹H) вариантах. Существенный вклад в его постановку внес Др. Херткорн (Институт Экологической Химии, GSF, ФРГ). Подробно результаты этого крупного блока исследований приведены в диссертации, в автореферате хотелось бы отметить принципиально новую информацию, которая углубляет понимание структурной организации гумусовых кислот и дает возможность перейти от атомов и фрагментов к уровню парциальных структур, реально присутствующих в гумусовых кислотах.

Использование комплекса гомо- и гетероядерных импульсных последовательностей позволило установить ряд структурных признаков, специфичных для источника происхождения или фракционного состава гумусовых кислот. Так, установлена близость углеводных структур, входящих в состав ГК и ФК сходного происхождения, и существенное их различие для гумусовых кислот из разных источников. В частности, установлена гораздо большая степень трансформации углеводного комплекса низинного

торфа по сравнению с верховым (отсутствие и присутствие аномерных корреляций в HSQC спектре, соответственно (рис. 2в)). Впервые сделано отнесение сигналов дезоксисахаров и аминсахаров в HSQC спектре ГК торфа, которые отсутствуют в ФК. Показаны принципиальные различия в составе незамещенной алифатической части ФК и ГК. В спектрах ГК найдены кросс-пики полиметиленовых цепочек и терпеноидных изолированных метильных групп, отсутствующие в ФК. В спектрах ФК почв, в отличие от ФК торфа, найдены кросс-пики как аминсахаров, так и аминокислот. Полученная информация позволяет глубже понять специфику строения гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава.

Таким образом, проведенное исследование позволило определить набор интегральных дескрипторов структурно-группового состава, включающий 9 ^{13}C ЯМР и 6 ПМР дескрипторов. При этом информация о полном распределении водорода в структуре гумусовых кислот получена впервые благодаря применению разработанной ПМР-методики. К числу нерешенных проблем относится прямое определение времен релаксации ядер углерода. Отдельной задачей является разработка новых алгоритмов извлечения количественной информации из сложных ЯМР-спектров гумусовых кислот.

5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-МАССОВОГО СОСТАВА ИССЛЕДОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ

Молекулярная масса (ММ) – важнейшая характеристика, относящаяся к молекулярному уровню структурной организации. Ввиду полидисперсности гумусовых кислот, оптимальным методом определения их ММ состава является эксклюзионная хроматография, позволяющая получать информацию о полной кривой молекулярно-массового распределения (ММР). Этот метод используется для анализа гумусовых кислот с 1963 г. Однако вплоть до постановки настоящих исследований не были решены такие базисные методические вопросы как устранение неэксклюзионных эффектов и выбор адекватных образцов сравнения. Как результат, приводимые в литературе оценки ММ гумусовых кислот варьируют от сотен до миллионов Дальтон. 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 неэксклюзионных эффектов и сложности интерпретации экспериментальных данных.

5.1. Выбор оптимальных условий анализа и образца сравнения

Граничные условия для выбора оптимальной гель-хроматографической системы задаются следующими специфическими свойствами гумусовых кислот: гидрофильность – необходимость использовать гидрофильные гели и водные среды ввиду ограниченной растворимости в органических растворителях; наличие ионогенных кислотных групп – склонность к рН-зависимым электростатическим взаимодействиям с матрицей геля; высокая полидисперсность – необходим гель с широким диапазоном фракционирования; нерегулярность строения – гетерогенность свойств макромолекул с различной ММ –

необходимость двойного детектирования массы вещества и свойства; переменный состав – необходимость выбора адекватных образцов сравнения.

Гель-хроматографический анализ гумусовых кислот проводили на хроматографической системе, созданной в Университете Карлсруэ (ФРГ) на кафедре проф. Ф. Фриммеля. Часть специфических свойств объекта была учтена разработчиками: система оснащена двумя последовательно соединенными детекторами: спектрофотометрическим (УФ) и проточным детектором органического углерода ($C_{орг}$) (Graentzel, Германия). Был определен тип гидрофильного геля, обладающего высокой механической прочностью – *Toyopearl-HW-40S*, и выбрана подвижная фаза – 0.028 М фосфатный буфер (рН 6.8), обеспечивающая устранение электростатических взаимодействий с гелем.

Однако целый ряд методических вопросов требовал дальнейшей оптимизации. Так, автором настоящей работы было установлено, что диапазоны фракционирования гелей *Toyopearl-HW-50S* и *-55S* более оптимальны для анализа гумусовых кислот. Кроме того, с помощью анализа индивидуальных органических кислот была убедительно продемонстрирована артефактная природа солевого пика, появляющегося при анализе пробы гумусовых кислот, неуравновешенной с подвижной фазой. Предложен усовершенствованный способ обработке данных по гель-хроматографическому фракционированию гумусовых кислот.

В его основу легли результаты целого комплекса исследований по теоретическому обоснованию выбора адекватного образца сравнения для определения ММ гумусовых кислот. Для этой цели было изучено эксклюзионное поведение обширного ряда модельных соединений с известной структурой и ММ, в том числе – пять наборов полимеров-гомологов (неионогенные вещества и полиэлектролиты). Они включали в себя полидекстраны (ПД), полиэтиленгликоли (ПЭГ), полиакрилаты (ПА), полиметакрилаты (ПМА) и полистиросульффонаты (ПСС) натрия. Калибровочные кривые по указанным наборам полимеров приведены на рис. 5. Их сопоставление наглядно показывает действие электростатических факторов, которое возрастает по мере увеличения удельного содержания кислотных групп в анализе. Введение допущения о близости эксклюзионного поведения неионогенных аналитов (ПЭГ и ПД) к идеальному, позволило предложить в качестве оценки неэксклюзионного эффекта величину ΔK_d . Его численное значение рассчитывается как отклонение K_d аналита, вступающего в специфические взаимодействия с гелем, от такового для аналита с идентичной ММ в отсутствие неэксклюзионных эффектов. Соответствующее выражение имеет вид:

$$\Delta K_d = K_d^0 - K_d^{exp} \quad (4)$$

где ΔK_d – неэксклюзионный эффект, K_d^{exp} – экспериментально определяемый K_d , K_d^0 – идеальный K_d , определяемый по калибровочной зависимости ПД или ПЭГ.

Величина ΔK_d является функцией структуры аналита, которая определяет его взаимодействия с матрицей геля. Эффект сверхэксклюзии приводит к положительным значениям ΔK_d , а эффект специфической адсорбции – к отрицательным.

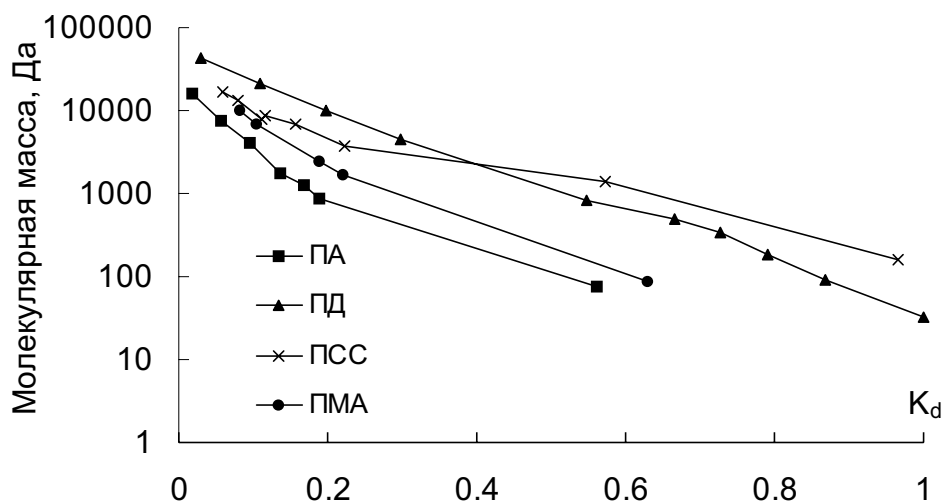


Рис. 5. Калибровочные зависимости для геля *Toyoperl HW 50S*, полученные по наборам различных полимеров-гомологов (полные названия см. в тексте).

Для установления количественной взаимосвязи между структурой аналита и величиной ΔK_d для 80 низкомолекулярных модельных соединений (алифатические и ароматические карбоновые кислоты, аминокислоты, спирты и т.д.) рассчитывали ΔK_d и описывали их структуру в виде элементного и структурно-группового состава. Полученные значения ΔK_d использовали для установления корреляционных соотношений “структура – свойство”. Наилучшее соотношение ($r = 0.96$) приведено ниже:

$$\Delta K_d = 0.21 - 1.24 \times O_{ArOH}/O - 0.18 \times C/O + 0.35 \times O_{COOH}/O - 0.47 \times (N+S)/C + 0.07 \times C/H \quad (5)$$

Полученное соотношение оказалось хорошо применимым для полиэлектролитов с низкой удельной кислотностью (ПСС), которая характерна и для гумусовых кислот. Для расчета ΔK_d гумусовых кислот использовали средние (по выборке из 81) препарата величины атомных соотношений O/C, H/C и (N+S)/C (1.8, 1.1 и 0.03, соответственно), O_{ArOH}/O и O_{COOH}/O принимали равными 0.1 и 0.5. Величина рассчитанного ΔK_d оказалась близка к нулю (-0.0022). Это дает основания полагать, что в выбранных условиях неэксклюзионные эффекты практически скомпенсированы, поэтому адекватными образцами сравнения являются неионогенные ПД или ПЭГ. Принимая во внимание тип конформации гумусовых кислот в водном растворе, использование ПД более предпочтительно. В дальнейшем расчет всех ММ характеристик гумусовых кислот проводили с использованием калибровочной зависимости по ПД.

5.2. Определение молекулярно-массового состава гумусовых кислот

Типичная кривая элюирования гумусовых кислот (на примере ФК почв) показана на рис. 6а. Все хроматограммы характеризовались мономодальным распределением. В качестве образцов сравнения использовали ПД с ММ от 0.83 до 43.5 КДа и моно- и олигосахариды.

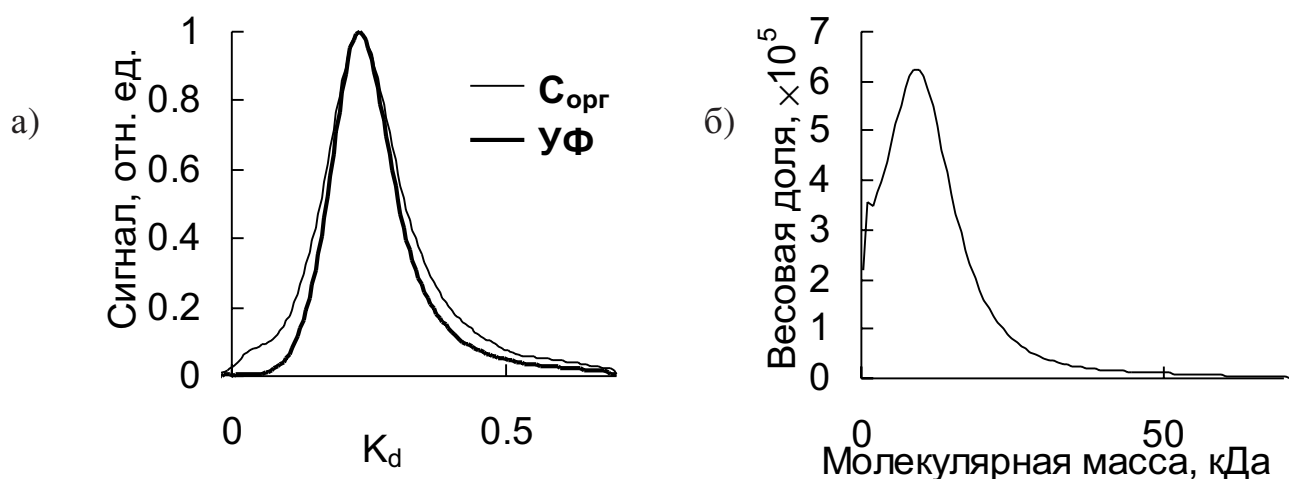


Рис. 6. Кривая элюирования (а) и соответствующее ММР (б) гумусовых кислот (ФК почв). Условия: гель *Toyopearl HW-50S*, колонка: 2×25 см, элюент – 0.028 М фосфатный буфер, рН 6.8, скорость элюирования – 1 мл/мин, образец сравнения – ПД.

Для обработки гель-хроматографических данных использовали оригинальную программу “Geltreat”, разработанную А. В. Кудрявцевым. Она позволяет проводить первичную обработку кривых элюирования, рассчитывать калибровочную зависимость, ММР и расширенный набор численных дескрипторов распределений: средние ММ (M_n , M_w , M_z), полидисперсности (M_w/M_n , M_z/M_w), статистические моменты и квантили. Путем совместной обработки данных УФ- и $C_{орг}$ -детекторов впервые было рассчитано распределение массовых коэффициентов поглощения гумусовых кислот ε^* (мг С/(л×см)) по ММ. Среднее ε^* использовали в качестве интегрального дескриптора свойств гумусовых кислот для классификации и прогноза.

Кривая ММР гумусовых кислот на примере ФК почв приведена на рис. 6б. Анализ выборки из 27 препаратов показал, что форма и положение максимумов хроматограмм и кривых ММР существенно зависит как от фракционного состава (ГК и ФК почв), так и источника происхождения (ГФК торфа и вод). Результаты статистической обработки полученных интегральных дескрипторов ММ состава: M_w , M_n , M_p , M_w/M_n , а также ε^* для исследованных препаратов гумусовых кислот приведены в табл. 7. Весь диапазон изменения M_w исследованных препаратов составил от 6 до 22.6 КДа, а M_w/M_n – от 1.9 до 6.8. При этом по величине M_w препараты располагались в следующий ряд: ГФК вод < ФК почв < ГК почв < ГФК торфа, а по полидисперсности: ФК < ГК < ГФК. Данные по M_w и M_w/M_n характеризуются хорошей воспроизводимостью ($s_r = 7\%$).

На основании известных ММР было рассчитано распределение ε^* по ММ гумусовых кислот. Диапазон изменения ε^* в пределах фракций одного препарата не превышал порядка. В целом для всех препаратов в диапазоне от 1 КДа до соответствующего M_w наблюдалось монотонное возрастание ε^* . Параметры полученного распределения ε^* по ММ включали в расширенный набор дескрипторов ММ состава, куда входили также параметры кривых элюирования в шкале K_d и ММР. Этот набор был в дальнейшем использован для классификационного анализа.

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

Препараты	M_n		M_w		M_p		M_w/M_n		ε^*	
	КДа								л/(мг С×см)	
	\bar{X}	s^2	\bar{X}	s^2	\bar{X}	s^2	\bar{X}	s^2	\bar{X}	s^2
ГФК торфа (n=8)	5.0	1.7×10^2	18.5	3.1×10^5	24.1	2.3×10^3	3.7	0.1	0.064	0.5×10^{-4}
ГК почв (n=8)	6.2	7.3×10^2	17.3	5.4×10^7	16.9	5.6×10^4	2.9	0.2	0.089	2.0×10^{-4}
ФК почв (n=7)	5.4	1.7×10^2	12.9	1.3×10^4	12.1	6.3×10^3	2.4	0.03	0.055	0.8×10^{-4}
ГФК вод (n=5)	3.7	4.2×10^2	9.8	1.1×10^4	7.5	5.8×10^2	2.6	0.2	0.039	0.3×10^{-4}
Все (n=27)	5.4	2.2×10^2	15.8	2.3×10^4	16.7	5.1×10^4	3.0	0.4	0.063	0.4×10^{-4}

Таким образом, в результате выполненного комплекса исследований разработано методическое обеспечение для гель-хроматографического анализа гумусовых кислот: определен перечень требований к хроматографической системе для компенсации неэксклюзионных эффектов, обоснован выбор образца сравнения, предложен способ и средство (программа) интерпретации получаемых данных. Впервые исследовано распределение массовых коэффициентов поглощения гумусовых кислот по ММ.

6. КЛАССИФИКАЦИЯ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ ПО ПРОИСХОЖДЕНИЮ И ФРАКЦИОННОМУ СОСТАВУ

6.1. Характеристика массива данных

Комплексный анализ гумусовых кислот с применением описанных методов позволил охарактеризовать три иерархических уровня их структурной организации – элементного, фрагментного и молекулярного – в терминах состава. Полученный набор интегральных дескрипторов включал содержания элементов (% масс) и их атомные соотношения, содержание С и Н в составе структурных групп в процентах от общего С и Н, соответственно, средние ММ и их отношения. Кроме того, в него входили значения ε^* – интегрального дескриптора свойств.

Первичная классификация препаратов с использованием дескрипторов элементного и структурно-группового уровня (рис. 7) отчетливо показала тенденцию к образованию кластеров в соответствии с источником происхождения и фракционным составом гумусовых кислот. Это позволило сформулировать задачу классификационного анализа как установление принадлежности препарата к классам по источнику происхождения (вода, почва, торф, уголь), фракционному составу (ГК, ФК, ГФК) и по более детализированному признаку – источник и состав. Задачу классификации по химическому строению не ставили из-за весьма ограниченного пересечения выборок препаратов, проанализированных каждым методом. Они включали 30 (эксклюзионная хроматография – ЭХ), 40 (ПМР), 60 (^{13}C ЯМР) и 80 (элементный анализ – ЭЛАН) препаратов. Данными ЭЛАН были охарактеризованы все препараты всех выборок. Поэтому классификацию проводили как по наборам дескрипторов одного уровня

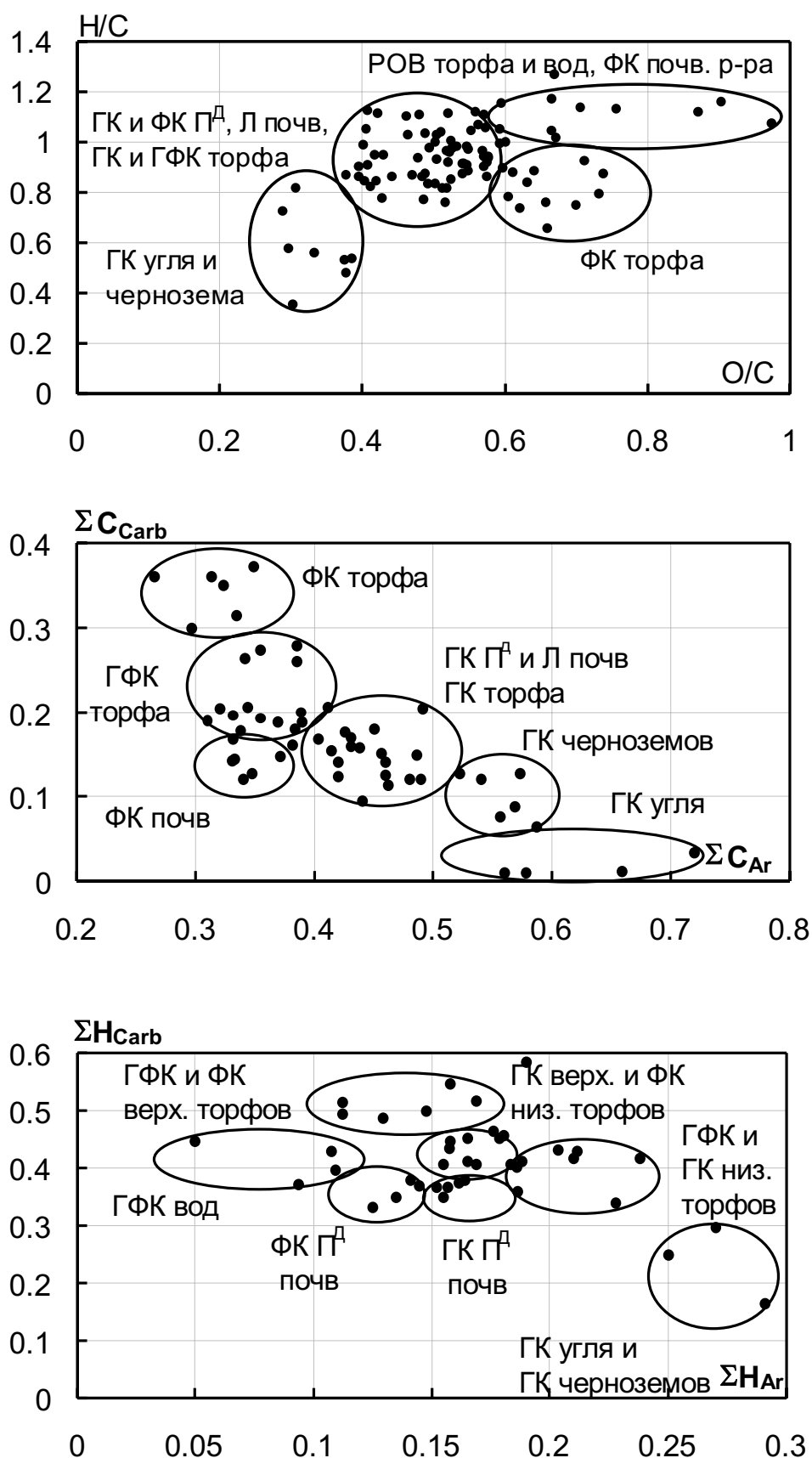


Рис. 7. Распределение препаратов по соотношению основных элементов – С, Н, О (а) и суммарному содержанию С и Н в составе основных фрагментов (ароматических и углеводных) углеродного скелета гумусовых кислот – диаграммы (б) и (в), соответственно.

(полученные одним методом), так и по смешанным наборам дескрипторов разных уровней (больше, чем один метод): ЭЛАН+ЭХ, ЭЛАН+ПМР, ЭЛАН+ ^{13}C ЯМР, ε^* +ЭХ и ЭЛАН+ЭХ+ ε^* .

В связи с проведением классификационного анализа целесообразно было ответить на фундаментальный вопрос о возможности получения препаратов гумусовых кислот с воспроизводимыми свойствами при их повторном выделении из сходного источника. Для этого оценивали воспроизводимость атомных соотношений препаратов, выделенных из сходных источников по стандартным методикам в разные годы (рис. 8).

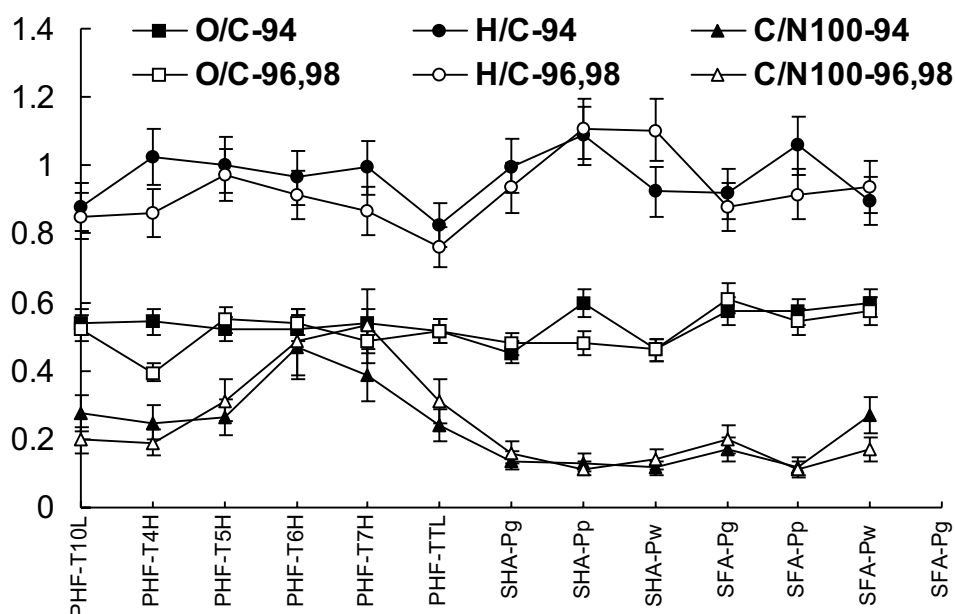


Рис. 8. Атомные соотношения препаратов гумусовых кислот, выделенных из сходных источников в разные годы ($n = 3$, $P = 0.95$).

Как видно, для большинства препаратов наблюдается довольно хорошая сходимость данных. Максимальный разброс характерен для H, на результаты определения которого большое влияние оказывает атмосферная влажность, тогда как для C и для N результаты разных лет хорошо согласуются между собой. Подобные результаты были получены и для данных ^{13}C ЯМР по распределению углерода. Поэтому следующий этап работы был посвящен непосредственно классификации гумусовых кислот с точки зрения источника их происхождения и фракционного состава.

6.2. Классификация с использованием наборов интегральных дескрипторов состава

Ввиду отсутствия априорных сведений о характере связи между принадлежностью препарата к определенному классу и значениями его интегральных дескрипторов состава, для классификации использовали методы линейного дискриминантного анализа (ЛДА), K-ближайших соседей (КБС) и нейронных сетей. Достоинство ЛДА – возможность вероятностных оценок полученной классификации, недостаток – неприменимость при наличии границ сложных форм между классами. В последнем случае хорошо работает метод КБС, однако он не предусматривает вероятностных

оценок классификации. Метод нейронных сетей применим для самых сложных форм границ между классами, но имеет ограничение по работе с малыми массивами данных.

Классификация препаратов по наборам дескрипторов одного уровня (ЭЛАН, ЭХ, ПМР и ^{13}C ЯМР) с использованием методов ЛДА и КБС ни в одном случае не дала 100 % правильных отнесений. Расчеты по смешанным наборам дескрипторов показали гораздо более высокую дискриминирующую способность (табл. 8). Так, использование наборов ЭЛАН+ЭХ и ЭЛАН+ЭХ+ ε^* позволило достичь 100 % правильных классификаций как по источнику происхождения, так и по фракционному составу с применением ЛДА и КБС. Для более детальной классификация по признаку "источник и фракционный состав" также было получено 100 % правильных отнесений (рис. 9), что говорит о высокой дискриминирующей способности используемого набора дескрипторов. Следует отметить, что и остальные смешанные наборы дескрипторов обеспечивали высокий процент правильных классификаций по всем трем признакам.

Таблица 8

Результаты классификации препаратов гумусовых кислот по трем категориям методами ЛДА и КБС

Наборы данных	Источник		Фракционный состав		Источник и состав	
	общее количество правильно классифицированных препаратов, %					
	ЛДА	КБС	ЛДА	КБС	ЛДА	КБС
ЭЛАН+ ^{13}C ЯМР	94	98	88	83	94	71
ЭЛАН+ПМР	97	94	97	73	94	72
ЭЛАН+ЭХ	100	100	100	100	100	100
ЭХ+ ε	96	100	96	100	100	100
ЭЛАН+ЭХ+ ε	100	100	100	100	100	100

Анализ значимости дескрипторов, входящих в лучшие дискриминирующие функции ЛДА, и частота их встречаемости позволили сделать вывод о максимальной дискриминирующей способности N , M_p , ε^* , M_w/M_n , C_{HCO} . Анализ частоты встречаемости дескрипторов в наилучших классификациях методом КБС позволяет выделить весьма сходный ряд параметров: N , C , M_p , M_w/M_n , C_{HCO} .

Таким образом, оба метода показали высокую дискриминирующую способность смешанных наборов дескрипторов разного уровня. Самым мощным из наборов дескрипторов одного уровня является набор дескрипторов ММ состава.

Применение нейронных сетей для наилучшего из смешанных наборов дескрипторов – ЭЛАН+ЭХ+ ε^* – показало, что в этом случае достаточно 4 нейронов и 13 синапсов для полной классификации 27 препаратов по объединенному 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 .

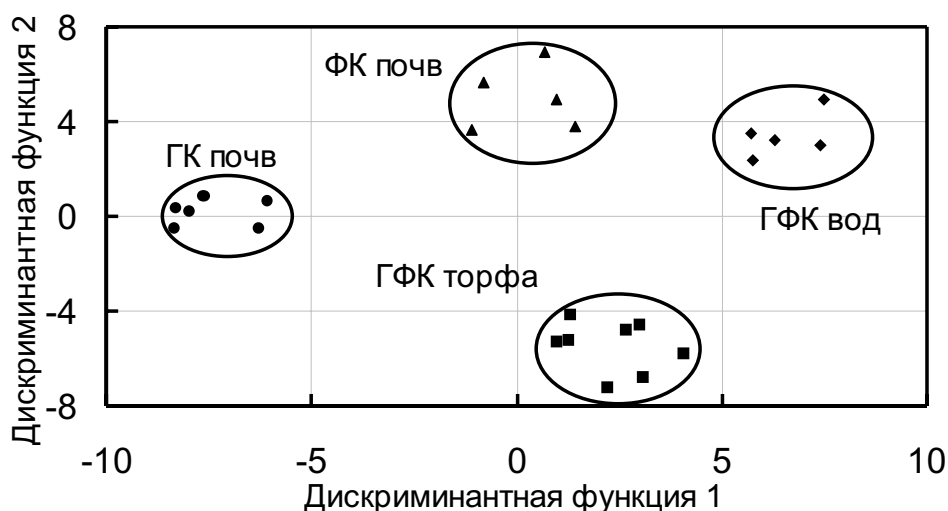


Рис. 9. Классификация препаратов гумусовых кислот по источникам и фракционному составу методом ЛДА на основе набора дескрипторов “ЭЛАН+ЭХ”.

Таким образом, классификационный анализ показал, что смешанные наборы дескрипторов разных уровней обладают гораздо более высокой дискриминирующей способностью по выбранным классам. Это подтверждает справедливость выбранного в нашей работе подхода к повышению информативности численного описания структуры с помощью дескрипторов состава за счет использования комплекса дескрипторов, отвечающих разным уровням структурной организации органических соединений.

6.3. Классификация с использованием расширенного набора дескрипторов молекулярно-массового состава

Для выяснения принципиальной возможности проведения классификации на основании дескрипторов одного уровня набор интегральных дескрипторов ММ состава, показавший самую высокую дискриминирующую способность, был существенно расширен за счет характеристик трех видов распределений – кривой элюирования в шкале K_d , ММР и ε^* по ММ, которые включали в себя начальные и центральные моменты, скошенности, эксцессы, квантили и интегралы. 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 тем, что дисперсия внутри повторностей одного препарата несущественно отличалась от общей дисперсии повторностей внутри класса.

Полученная описанным способом выборка содержала 116 препаратов: ГФК вод (31) и торфа (35), ФК почв (32) и ГК почв (18), что позволило провести классификацию с контрольной выборкой, разделив исходную случайным образом на обучающую и контрольную. Для классификации использовали метод КБС, реализованный алгоритм которого предусматривал кросс-валидацию полученных классификаций (автор – А.В. Кудрявцев). Качество классификации оценивали величинами Q: процент правильных классификаций для обучающей ($Q_{обуч}$) и контрольной выборки ($Q_{контр}$). Все дескрипторы

нормировали на стандартное отклонение по всей обучающей выборке образцов и масштабировали с помощью дисперсионных весов.

В качестве дескрипторов использовали не только исходные параметры, но и их комбинации: произведения, отношения, обратные величины. Количество параметров для исходных дескрипторов ограничивали 4, а для комбинированных – двумя. Для создания расширенного набора, включающего в себя дескрипторы всех трех распределений, проводили отбор дескрипторов, характеризующихся максимальной частотой встречаемости в лучших классификациях по каждому отдельному набору.

Классификацию по методу КБС проводили с точки зрения детализированного признака – “источник и фракционный состав”. Классифицирующая способность наборов дескрипторов каждого из ЭХ-распределений увеличивалась в ряду $ММР < K_d < \varepsilon^*$, достигая максимума для ε^* : $Q_{обуч} = 0.99$ и $Q_{контр} = 0.82$. Использование расширенного набора дескрипторов позволило существенно улучшить качество классификаций по контрольной выборке: $Q_{обуч} = 0.99$ и $Q_{контр} = 0.92$ для варианта “4 исходных параметра” и $Q_{обуч} = 1.0$ и $Q_{контр} = 0.92$ для варианта “2 комбинированных дескриптора”. Наилучшая классификация приведена на рис. 10.

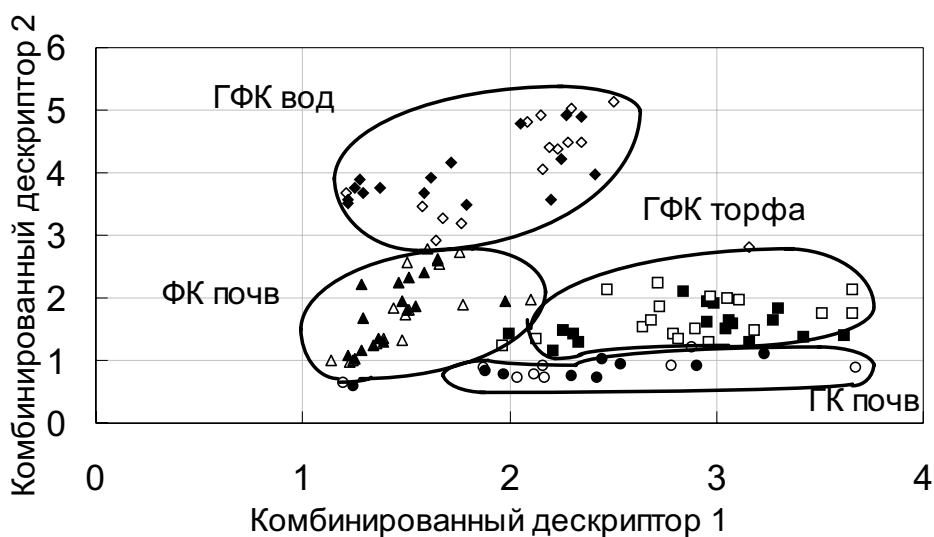


Рис. 10. Наилучшая классификация гумусовых кислот методом КБС по происхождению и фракционному составу для расширенного набора ММ дескрипторов.

Полученные результаты показали возможность решения задач классификации гумусовых кислот с помощью дескрипторов молекулярного уровня – ММ состава.

Проведенный комплекс исследований позволил решить задачу классификации гумусовых кислот по источнику происхождения и фракционному составу. Тем самым показана применимость использованного подхода к численному описанию строения гумусовых кислот с помощью интегральных дескрипторов состава для решения задач классификации гумусовых кислот. Наиболее эффективным оказалось использование смешанных наборов интегральных дескрипторов разных уровней, а из дескрипторов одного уровня – ММ состава.

7. ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗЫВАЮЩИХ И ДЕТОКСИЦИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ

Задача следующего этапа исследований состояла в получении количественных характеристик связывающих и детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к различным классам экотоксикантов (на примере Hg(II), ПАУ и атразина), которые могли быть использованы как признаки прогнозируемых свойств. Для ее решения применяли хорошо разработанный методический подход – описание процессов связывания/комплексообразования гумусовых кислот с экотоксикантами с помощью соответствующих констант связывания и устойчивости комплексов. Распространяя указанный подход для описания процесса детоксикации, оказалось возможным охарактеризовать детоксицирующие свойства гумусовых кислот с помощью констант детоксикации. Для определения констант связывания и устойчивости комплексов с различными экотоксикантами использовали соответствующие физико-химические методы, константы детоксикации определяли методом биотестирования.

7.1. Определение констант устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II)

Для преодоления основной проблемы определения констант устойчивости комплексов гумусовых кислот с тяжелыми металлами – неизвестной стехиометрии взаимодействия – разработаны разные методические подходы. Одним из наиболее адекватных стохастической природе объекта является использование концепции металл-эквивалентной концентрации, что позволяет свести стехиометрию к соотношению 1:1. Для применения данной концепции к описанию взаимодействия гумусовых кислот с Hg(II) вводили понятие ртуть-связывающего центра (РСЦ). Под РСЦ понимали комбинацию фрагментов молекулы гумусовых кислот, участвующих в связывании одного атома ртути. Тогда реакция описывается константой равновесия:

$$K_{\text{РСЦ}} = \frac{[\text{Hg} \cdot \text{РСЦ}]}{[\text{Hg}^{2+}] \cdot [\text{РСЦ}^{2-}]} \quad (6)$$

где $K_{\text{РСЦ}}$ – кажущаяся константа устойчивости гуматов ртути, $[\text{РСЦ}]$ – Hg-эквивалентная концентрация гумусовых кислот, ммоль Hg/л.

Такое представление константы позволяет перейти к размерности констант устойчивости комплексов Hg(II) по первой ступени (л/моль Hg). Это дает возможность сопоставлять получаемые величины с константами для низкомолекулярных лигандов.

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.

Содержание РСЦ в препаратах гумусовых кислот определяли в предположении, что оно эквивалентно содержанию Hg(II) в насыщенном гумате ртути (все РСЦ заполнены). Исследование условий образования гуматов Hg(II) методом адсорбционных изотерм показало, что насыщение гуматов Hg(II) достигается при соотношении

$\text{Hg:ГФК} > 0.01$ моль/г при pH 2.9-3.4. Анализируя гуматы на содержание Hg(II) (методом ААСХП) определяли содержание РСЦ в расчете на г органического вещества (ОВ) (табл. 9). Большинство препаратов гумусовых кислот характеризовалось близким содержанием РСЦ – в среднем 2.5 ммоль/г ОВ.

$K_{\text{РСЦ}}$ определяли адсорбционным методом с использованием конкурентного комплексообразования. Для этого проводили адсорбционные эксперименты на полиэтиленовых поверхностях в среде 0.0025 М гидрокарбонатного буфера (pH 7) при $C_{\text{Hg(II)}} = 50, 100, 150, 200$ и 250 нМ, вводя различные концентрации гумусовых кислот (0-40 мг ОВ/л). Из полученных изотерм адсорбции рассчитывали условную (при постоянной концентрации лиганда) константу лигандного обмена $K_{[\text{A}]}(\text{РСЦ}/\text{A})$, где А – конкурирующий лиганд. Величину $K_{[\text{A}]}(\text{HgA})$ оценивали аналогично $K_{[\text{A}]}(\text{РСЦ}/\text{A})$ из адсорбционных экспериментов с бромидом, константа которого с Hg(II) известна. Значение $K_{[\text{A}]}(\text{HgA})$ составило 4.9×10^8 , что позволило идентифицировать адсорбированную форму как Hg(OH)₂. Подставляя его в выражение для константы лигандного обмена, рассчитывали $K_{\text{РСЦ}}$:

$$K_{[\text{A}]}(\text{РСЦ} / \text{A}) = \frac{K_{\text{РСЦ}}}{K_{[\text{A}]}(\text{HgA})} \quad (7)$$

Полученные значения логарифмировали и усредняли (табл. 9).

Таблица 9

Содержание РСЦ и условные константы устойчивости гуматов Hg(II) (n = 3, P = 0.95)

Препарат	РСЦ, ммоль/г ОВ	lgK _{РСЦ}	Препарат	РСЦ, ммоль/г ОВ	lgK _{РСЦ}
РОВ природных вод			ГФК торфа		
ADOM-SMu4	3.7±0.7	13.7±0.3	PHF-T494	2.2±0.4	14.1±0.2
ADOM-SMu8	2.6±0.4	14.1±0.2	PHF-T594	2.1±0.4	14.3±0.1
ГФК природных вод			PHF-T694	2.5±0.2	14.0±0.2
AHF-MMu7	4.2±0.8	14.6±0.4	PHF-TN94	2.1±0.2	14.2±0.3
AHF-RND11	2.7±0.3	13.7±0.1	PHF-TMu4	2.4±0.5	14.2±0.3
AHF-RND14	5.9±0.6	13.5±0.1	PHF-TT94	2.8±0.5	14.2±0.3
AHF-SSH1	2.7±0.4	13.9±0.2	ГК почв		
AHF-SMu8	3.5±0.6	13.8±0.1	SHA-Gw94	1.0±0.5	14.7±0.2
ГФК донных отложений			SHA-Pw94	1.0±0.1	14.5±0.2
BHF-RLuh	3.2±0.4	14.4±0.2	SHA-PwN	2.0±0.1	14.6±0.2
BHF-RND13	2.9±0.4	14.0±0.3	ГФК почв		
BHF-SMu2	2.4±0.4	14.5±0.2	SHF-Co94	2.7±0.3	14.2±0.2
ГК углей			SHF-TMu12	1.8±0.2	14.9±0.4
CHA-AGK	4.3±0.9	14.4±0.2	SHF-PMu9	1.9±0.2	14.2±0.2
CHA-ALD	2.6±0.1	14.0±0.2			

По величине lgK_{РСЦ} большинство групп препаратов близки друг к другу. Сопоставление полученных данных с опубликованными в литературе в пересчете на

[РСЦ] для $I = 0$ показало, что они лежат в диапазоне величин, найденных другими авторами: от 10.2 до 17, который, однако, исключительно широк из-за различия в экспериментальных подходах к решению указанной задачи.

7.2. Определение констант связывания органических экотоксикантов гумусовыми кислотами

Изучение связывающих свойств гумусовых кислот различного происхождения по отношению к ПАУ проводили на примере пирена (Py), флуорантена (Flt) и антрацена (An). Выбор углеводородов был обусловлен различием их физико-химических свойств. Из-за неизвестной стехиометрии взаимодействия гумусовых кислот с ПАУ для описания этого процесса обычно используют константу сорбции, что позволяет оперировать массовой концентрацией гумусовых кислот ($C_{ГФК}$). Соответствующее выражение для константы приведено ниже:

$$K_{oc} = \frac{1-\alpha}{\alpha} \times \frac{1}{C_{ГФК}} \quad (8)$$

где K_{oc} – константа связывания ПАУ в расчете на массовую концентрацию гумусовых кислот (кг С/л); α – доля несвязанного ПАУ.

Для определения K_{oc} использовали метод тушения флуоресценции в предположении, что квантовый выход флуоресценции аддуктов ПАУ-ГФК равен нулю. Это позволяет определять α без предварительного разделения связанных и несвязанных форм ПАУ как соотношение интенсивности флуоресценции ПАУ в присутствии и отсутствие гумусовых кислот. Определение K_{oc} проводили при следующих условиях: $C_{ПАУ} = 5 \times 10^{-7}$, 6.4×10^{-7} и 1.7×10^{-7} М для Py, Flt и An, соответственно, $C_{ГФК}$ – от 0.5 до 7×10^{-6} кг С/л, рН 5.5 (дистиллированная вода), время взаимодействия – 15 минут. Выборка препаратов включала 26 образцов: 7 ГФК и 1 РОВ торфа; 7 ГК, 5 ФК и 1 ГФК почв; 4 ГФК вод и 1 ГК угля. Рассчитанные значения констант приведены в табл. 10.

Полученные значения K_{oc} лежат в диапазоне $(0.13-2.5) \times 10^5$, $(0.2-1.7) \times 10^5$ и $(0.12-1.0) \times 10^5$ л/кг С для Py, Flt и An, соответственно, что хорошо согласуется с данными, приводимыми в литературе. Наиболее высокие значения K_{oc} наблюдаются для более гидрофобных Py и Flt ($\lg K_{ow} \sim 5.2$). Для менее гидрофобного An не было обнаружено тушения флуоресценции в присутствии ГФК вод и ФК почв: соответствующие константы оказались ниже минимально определяемой величины K_{oc} (0.1×10^5 л/кг С), найденной по 3S-критерию. По величине K_{oc} все препараты можно расположить в следующий ряд:

ГК угля \cong ГК чернозема > ГК Л и П^Д почв, ГФК торфов \gg ГФК вод > ФК почв

Таким образом, проведенное исследование показало, что сродство гумусовых кислот выше к наиболее гидрофобным ПАУ. При этом максимальное сродство наблюдается для гумусовых кислот, обогащенных ароматическими фрагментами – ГК угля и чернозема. Получена обширная база данных по константам связывания ПАУ,

которая может быть использована для установления корреляционных соотношений строение – свойства, а также для расчета форм существования ПАУ в водных средах.

Таблица 10

Константы связывания модельных ПАУ гумусовыми кислотами различного происхождения и фракционного состава ($n = 7, P = 0.95$)

Препарат	$K_{oc} \times 10^{-5}$, л/кг С			Препарат	$K_{oc} \times 10^{-5}$, л/кг С		
	Py	Flt	An		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

Изучение взаимодействия гумусовых кислот с гербицидами проводили на примере *атразина* – персистентного гербицида класса симм-триазинов. Выборка гумусовых кислот состояла в основном из препаратов почв, так как проблема загрязнения гербицидами наиболее актуальна для почв. Для расширения диапазона свойств были включены и другие препараты. Всего в выборку вошло 16 препаратов: 8 ГК, 3 ФК и 1 ГФК почв; 1 ГФК, 1 ГК и 1 РОВ торфа, 1 ГК угля.

Определение константы связывания атразина гумусовыми кислотами основывали на той же теоретической концепции, что и для ПАУ, рассчитывая ее как константу сорбции. Отличался только метод определения доли несвязанного атразина в присутствии гумусовых кислот. Для этой цели сначала проводили разделение связанной и несвязанной форм с помощью ультрафильтрации (использовали мембранный фильтр с пределом пропускания 1000 Да), а затем определяли концентрацию несвязанной формы в фильтрате методом ОФ-ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием ($\lambda = 220$ нм). Эксперименты проводили при следующих условиях: $C_A = 1 \times 10^{-5}$ М; $C_{ГФК} = (1.5-6.5) \times 10^{-4}$ кг С/л; рН 5.5; время взаимодействия – 24 часа. Полученные значения K_{oc}

даны в табл. 11. Они оказались почти на три порядка ниже, чем для ПАУ. При этом сродство препаратов к атразину изменялось весьма сходным образом, как и для ПАУ. Так, наибольшие K_{OC} наблюдались для ГК угля, наименьшие – для ОВ водного экстракта торфа. Среди препаратов почв наименьшие K_{OC} были получены для ФК, наибольшие – для ГК черноземов.

Таблица 11

Константы связывания (K_{OC}) и детоксикации (K_{OC}^D) атразина гумусовыми кислотами
($n = 9, P = 0.95$)

Препарат	K_{OC} , л/кг С	K_{OC}^D , л/кг С	Препарат	K_{OC} , л/кг С	K_{OC}^D , л/кг С
ГФК торфа			ГК почв		
PHF-T494	380±20	(8.9±1.4)×10 ⁵	SHA-Pw94	380±20	(1.2±0.3)×10 ⁵
PHF-TN94	300±20	(5.7±0.9)×10 ⁵	SHA-Pw96	280±20	(5.6±0.7)×10 ⁵
PHF-TT94	–	(1.3±0.2)×10 ⁶	SHA-Pp94	–	(1.4±0.4)×10 ⁵
РОВ торфа			SHA-Pp96	180±10	(5.5±0.7)×10 ⁵
PDOM-TN	87±5	(5.8±0.8)×10 ⁵	SHA-Pg94	400±30	(1.0±0.2)×10 ⁴
PDOM-TT	–	(4.5±0.7)×10 ⁵	SHA-Gw94	580±40	(2.0±0.3)×10 ⁵
ФК и ГФК почв			SHA-Gw96	380±30	(1.4±0.2)×10 ⁵
SFA-Pw96	190±10	(5.0±0.7)×10 ⁴	SHA-Cm94	450±30	(2.9±0.4)×10 ⁵
SFA-Pp96	110±7	(5.0±0.8)×10 ⁴	SHA-CtV94	400±20	(3.7±0.6)×10 ⁵
SFA-Pg94	–	(1.4±0.2)×10 ⁵	ГФК почвенного раствора		
SFA-Pg96	280±20	(6.0±0.8)×10 ⁴	SDHF-Pw96	–	(2.1±0.3)×10 ⁶
SFA-Gw94	–	(5.3±0.8)×10 ⁵	SDHF-Pp96	–	(1.8±0.2)×10 ⁶
SHF-Co94	440±30	(7.1±1.1)×10 ⁵	SDHF-Pg96	–	(1.9±0.2)×10 ⁶
ГК углей			ГФК природных вод		
CHA-AGK	580±30	(7.4±1.1)×10 ⁵	AHF-RMX2	–	(2.9±0.5)×10 ⁵

Характер найденных закономерностей указывает на то, что наиболее вероятным механизмом взаимодействия гумусовых кислот как с ПАУ, так и атразином является гидрофобное связывание. Об этом свидетельствует возрастание констант по мере возрастания $\lg K_{ow}$ органического соединения. Кроме того, и в ряду препаратов максимальное сродство к ПАУ и атразину наблюдается для ГК угля и черноземов, в структуру которых вносят наибольший вклад ароматические фрагменты, что способствует большей гидрофобности данных препаратов.

Таким образом, в результате проведенного комплекса исследований удалось получить представительный блок данных по константам устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II) и константам связывания ПАУ и атразина. Убедительно показано, что связывающие свойства гумусовых кислот весьма существенно варьируют в ряду исследованных препаратов.

7.3. Определение констант детоксикации экотоксикантов гумусовыми кислотами

Для количественного описания процесса детоксикации его рассматривали с позиций универсальной концепции комплексообразования/связывания, вводя допущение, что токсичность (Т) обусловлена только свободной формой экотоксиканта, а связанная с гумусовыми кислотами – нетоксична и небиодоступна. Тогда относительное уменьшение токсичности (эффект детоксикации – D) экотоксиканта (ЭТ) при введении гумусовых кислот будет эквивалентна доле экотоксиканта (α), связавшегося с гумусовыми кислотами. В этом случае зависимость D от концентрации гумусовых кислот может быть описана с помощью константы детоксикации (K_{OC}^D):

$$D = \frac{T_{ЭТ} - T_{ЭТ+ГФК}}{T_{ЭТ}} \Rightarrow D = 1 - \alpha = \frac{C_{ГФК} \times K_{OC}}{1 + C_{ГФК} \times K_{OC}} \quad (9)$$

Условиями выполнимости данного выражения является (1) линейность зависимости отклика биотеста от концентрации свободной формы экотоксиканта в растворе; (2) зависимость величины D только от единственного фактора – концентрации свободной формы экотоксиканта. Так как гумусовые кислоты могут оказывать собственное воздействие на тест-объект, то его необходимо было учесть при расчетах D. Для этого вводили допущение об аддитивности действия экотоксиканта и гумусовых кислот на тест-объект, токсичность экотоксиканта в отсутствие и присутствии гумусовых кислот рассчитывали как, соответственно:

$$T_{ЭТ} = \frac{R_0 - R_{ЭТ}}{R_0} \quad \text{и} \quad T_{ЭТ+ГФК} = \frac{R_{ГФК} - R_{ГФК+ЭТ}}{R_{ГФК}} \quad (10)$$

где R_0 – тест-отклик в контроле без ЭТ и гумусовых кислот; $R_{ЭТ}$ – тест-отклик в присутствии ЭТ; $R_{ГФК}$ – тест-отклик в присутствии гумусовых кислот без ЭТ; $R_{ГФК+ЭТ}$ – тест-отклик в присутствии ЭТ и гумусовых кислот.

Использование приведенных выражений для расчета эффекта детоксикации позволяет исключить влияние стимулирующего действия гумусовых кислот на тест-объект. Как следствие, в этом случае экспериментальная зависимость D от $C_{ГФК}$ может быть использована для расчета константы детоксикации по выражению (9).

Hg(II). Поскольку токсичность Hg(II) зависит от ее формы существования, в качестве токсиканта была выбрана наиболее токсичная форма – $HgCl_2$. Тест-объектом служила водоросль *Chlorella pyrenoidosa*, в качестве тест-функции использовали показатель фотосинтетической активности водоросли. В качестве рабочей выбирали концентрацию $HgCl_2$ 0.8 мкМ, которая вызывала 100%-ное угнетение фотосинтеза водоросли. Концентрации гумусовых кислот составляли 5-25 мг/л, что характерно для поверхностных вод.

Предполагали, что токсичность хлорида ртути снижается за счет его превращения в нетоксичный гумат. Тогда детоксикация определяется константой лигандного обмена $K_{PCl/Cl}$. Для ее нахождения принимали во внимание, что как хлорид-ионы, так и РСЦ находятся в растворе в большом избытке по сравнению с Hg(II). $[HgCl_2]$ определяли непосредственно из диапазона токсичности $HgCl_2$ (который оказался нелинейным), а

[HgPCЦ] – из уравнения материального баланса (считая, что Hg(II) распределена между HgCl₂ и гуматом). Домножая ее на константу устойчивости HgCl₂, получали выражение для константы устойчивости гумата или константы детоксикации Hg(II) гумусовыми кислотами:

$$K_{PCЦ}^D = K_{PCЦ/Cl} \times K_{HgCl_2} \quad (11)$$

Полученные значения корректировали по уравнению Дэвиса на ионную силу среды для биотестирования (0.019 М, корректирующий фактор – 0.49).

Из данных по биоаккумуляции Hg(II) в биомассе водорослей в присутствии хлоридов рассчитывали константу бионакопления $K_{PCЦ}^B$. Для этой цели определяли распределение Hg(II) в системе раствор – биомасса водорослей в присутствии гумусовых кислот. $K_{PCЦ}^B$ рассчитывали, полагая, что накопление Hg(II) в биомассе водорослей, как и в случае токсического эффекта, определяется только [HgCl₂]. Как показали эксперименты, данная зависимость линейна, то есть для расчета $K_{PCЦ}^B$ можно использовать уравнение (9), из которого находится величина $K_{PCЦ/Cl}/[Cl^-]^2$. Из нее находят константу лигандного обмена (принимая $[Cl^-] = C_{Cl^-}$ и пересчитывают ее в $K_{PCЦ}^B$ по уравнению (11) как для $K_{PCЦ}^D$.

Полученные значения констант (табл. 12) хорошо согласовались с величиной $K_{PCЦ}$, причем между ними наблюдалась значимая корреляция ($r = 0.67$ при $n = 22$). Это является подтверждением того, что основным механизмом детоксикации Hg(II) является связывание в гуматы, которые не поглощаются водорослью.

Таблица 12

Константы детоксикации ($K_{PCЦ}^D$) и бионакопления ($K_{PCЦ}^B$) Hg(II) гумусовыми кислотами различного происхождения и фракционного состава ($n = 3$, $P = 0.95$)

Препарат	$lgK_{PCЦ}^D$	$lgK_{PCЦ}^B$	Препарат	$lgK_{PCЦ}^D$	$lgK_{PCЦ}^B$
РОВ природных вод			ГФК торфа		
ADOM-SMu4	13.8±0.1	14.1±0.2	RHF-T494	14.3±0.1	14.3±0.5
ADOM-SMu8	14.2±0.1	14.0±0.3	RHF-T594	14±1	14.5±0.1
ГФК природных вод			RHF-T694	13.5±0.2	14.3±0.2
AHF-MMu7	–	14.2±0.1	RHF-TН94	13.8±0.5	14.3±0.1
AHF-RND11	–	13.5±0.6	RHF-TMu4	14.0±0.1	14.4±0.1
AHF-RND14	13.7±0.2	13.9±0.3	RHF-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			

ПАУ. Для исследования детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к ПАУ в качестве тест-объекта использовали *Daphnia magna*, тест-откликом служила активность питания. Рабочие концентрации ПАУ, вызывающие 50% снижение тест-отклика, составили $(5, 7 \text{ и } 1.7) \times 10^{-7}$ М для Py, Flt и An, соответственно. Концентрацию гумусовых кислот изменяли в диапазоне 1-25 мг С/л. Значения полученных констант детоксикации приведены в табл. 13.

Таблица 13

Константы детоксикации (K_{OC}^D) ПАУ гумусовыми кислотами ($n = 5, P = 0.95$)

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	RHF-T1H94	4±1.1	3±1.2	–
SHA-PwN	4±1.2	7±3.4	6±1.9	RHF-T4H94	3.7±0.6	5±1	1±0.5
SHA-Pp94	3.0±0.8	4±1.5	4±1.3	RHF-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	RHF-T6H94	3.6±0.6	3±0.8	2±0.6
SHA-Gw94	4±1.3	4±2.2	4±1.1	RHF-T7H94	4±2.6	6.0±0.3	–
SHA-Gp94	4.0±0.8	5±0.8	4±1.2	RHF-TH94	4±1.7	4±0.8	1.8±0.5
SHA-Cm94	6±3.1	8±4.8	6±2.4	RHF-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	–

По величине K_{OC}^D превышали соответствующие K_{OC} . Однако между ними наблюдалась довольно высокая корреляция: $r = 0.86, 0.85 \text{ и } 0.77$ ($n = 26$) для Py, Flt и An, соответственно. Это говорит о том, что детоксикация ПАУ гумусовыми кислотами обусловлена, в основном, процессами химического связывания, приводящего к образованию нетоксичных аддуктов ПАУ-ГФК.

Атразин. Исследование детоксицирующих свойств гумусовых кислот проводили с использованием в качестве тест-объекта водоросли *Chlorella vulgaris*. Тест-откликом служил показатель фотосинтетической активности водоросли F_v/F_m , при расчете которого учитывали собственную флуоресценцию гумусовых кислот. Рабочая концентрация атразина, вызывающая 25 % снижение фотосинтетической активности, составила 6.7×10^{-7} М. Концентрация гумусовых кислот составила $(0.6-5) \times 10^{-6}$ кг С/л. Полученные результаты приведены в табл. 11.

Сравнение полученных величин K_{OC}^D и K_{OC} (табл. 11) показало их несоответствие как по абсолютным величинам, так и по характеру изменчивости. Так, значения K_{OC}^D в среднем на два-три порядка превышали значения K_{OC} , при этом коэффициент корреляции между ними составил 0.12. Это свидетельствует о том, что химическое связывание не является основным механизмом детоксикация атразина гумусовыми кислотами. Она обусловлена, по-видимому, их стимулирующим действием на исследуемый тест-объект, что косвенно подтверждается наличием тесной корреляции между K_{OC}^D и содержанием в гумусовых кислотах низкомолекулярной фракции (<5 КДа, предела проницаемости мембран). Сходное действие гумусовых кислот неоднократно отмечалось для высших растений, но механизм его практически не исследован. Существенный прогресс в этой области может быть достигнут с помощью установления зависимостей “строение – физиологическая активность гумусовых кислот”.

Таким образом, в результате выполненного комплекса экспериментов систематически исследованы связывающие и детоксицирующие свойства гумусовых кислот по отношению к Hg(II), ПАУ и атразину для обширной выборки гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава. Единый методологический подход для оценки связывающих и детоксицирующих свойств гумусовых кислот в рамках концепции связывания/комплексобразования использован впервые. В результате сформирован массив признаков свойств – констант связывания, устойчивости комплексов и детоксикации, что позволило перейти к завершающему этапу работы – получению прогностических моделей “строение – свойство”.

8. ПРОГНОЗ СВОЙСТВ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЕСКРИПТОРОВ СОСТАВА

Создание прогностических моделей “строение – свойство” 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 (16-26 в зависимости от количества констант связывания). Создание прогностических моделей с использованием таких массивов данных требует применения методов, позволяющих снизить размерность матрицы независимых переменных – 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 количество дескрипторов. В методе РГК разложение исходной матрицы проводят только с учетом ее внутренней структуры. В методе ДМНК осуществляется совместное разложение как матрицы дескрипторов, так и прогнозируемых свойств. Это повышает надежность получаемой прогностической модели. В дальнейшей работе использовали все три метода. Для выбора числа значимых компонент использовали метод кросс-валидации. Качество модели оценивали с помощью параметров – R^2 и Q^2 , характеризующих, соответственно, описательную и прогностическую способность (т.е. относительное количество объясненной и предсказанной дисперсии; в идеальном случае обе эти величины равны 1; Q^2 рассчитывается в ходе кросс-валидации).

8.1. Корреляционный анализ дескрипторов состава и признаков свойств

Расчет прогностических моделей предваряли оценкой наличия корреляционных зависимостей между дескрипторами состава, набор которых для всех выборок был стандартным и включал все три уровня дескрипторов (за исключением ПАУ, где набор дескрипторов был расширен за счет ε^*), и прогнозируемыми свойствами – константами связывания и детоксикации Hg(II), ПАУ (Pu, Flt, An) и атразина гумусовыми кислотами.

Корреляционный анализ показал, что тесные корреляционные зависимости между $\lg K_{\text{РСЦ}}$ и индивидуальными дескрипторами состава отсутствуют. Для K_{OC} и K_{OC}^{D} ПАУ наблюдалось наличие корреляции с дескрипторами состава – прямыми и косвенными показателями содержания ароматических фрагментов в составе гумусовых кислот (C_{Ar} , Н/С, ε^*). Усредненные значения r по всем трем ПАУ для указанных дескрипторов в порядке их перечисления составили для K_{OC} : 0.85, 0.82 и 0.65. Данные зависимости имеют очевидный физический смысл, свидетельствуя о ведущей роли гидрофобных взаимодействий в процессах связывания и детоксикации ПАУ гумусовыми кислотами. Наиболее тесная корреляция между K_{OC} и содержанием C_{Ar} была установлена и для атразина ($r = 0.91$), что может трактоваться как проявление сходного с ПАУ механизма связывания – гидрофобного. Однако в отличие от ПАУ, указанная корреляция для K_{OC}^{D} атразина отсутствовала, что свидетельствует о различии механизмов связывания и детоксикации атразина.

8.2 Прогностические модели множественной регрессии

Результаты расчета лучших полиномов по методу МР для различных наборов использованных дескрипторов приведены в табл. 14. Полиномы с 3-4 слагаемыми (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: максимальные Q^2 наблюдаются для смешанного набора дескрипторов всех трех уровней. Из исследованных свойств наиболее удовлетворительные результаты получены для K_{OC} и K_{OC}^D всех трех ПАУ и для K_{OC}^D атразина. Примеры уравнений лучших регрессий приведены в табл. 14. Как видно, использование метода МР позволило выявить вид зависимости между K_{OC}^D атразина и ММ характеристиками гумусовых кислот. Удалось также описать зависимости K_{PC} от дескрипторов состава.

Таблица 14

Наилучшие прогностические модели МР с тремя исходными параметрами

Токсикант	Полином	Q^2	R^2
Hg(II)	$\lg K_{PC} = 13.5 - 6010 / Q_{50} + 5.40 \times C_{Ar}O + 0.106 \times CHO$	0.79	0.89
	$\lg K_{PC}^D = 10.7 + 146 / C_{Ar} - 26.3 \times C + 0.000140 \times Q_{25}$	0.59	0.75
	$\lg K_{PC}^B = 14.1 - 0.552 / E - 20.6 \times C + 2.77 \times 10^{-5} \times M_z$	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	$K_{OC} = 513 - 1620 \times ArO + 0.0196 \times M_z - 134 \times M_w/M_n$	0.90	0.94
	$K_{OC}^D = -34600 + 579000 / (H/C) - 242 \times Q_{25} + 71.3 \times Q_{75}$	0.57	0.76

E – эксцесс ММР, Q – квантили ММР.

Анализ качества моделей, полученных для выборок препаратов разного размера позволил обнаружить завышение R^2 и Q^2 при использовании малых выборок, что может указывать на случайность подбора дескрипторов в моделях. Данное предположение проверяли с помощью численного эксперимента путем последовательного исключения препаратов из выборки случайным образом. Результаты показали, что при $n < 15$ значения R^2 и Q^2 начинают резко возрастать. Это позволяет сделать вывод о том, что для адекватного построения прогностической модели МР на основании данных аналогичного качества размер выборки должен быть не менее 20 препаратов.

8.3. Прогностические модели, полученные методами многокомпонентного анализа

Для расчета использовали наборы данных, включающие индивидуальные дескрипторы и их комбинации. Прогностическая способность полученных моделей оказалась значительно хуже ($Q^2 = 0.3-0.6$), чем моделей МР. Для объяснения этого факта проводили анализ главных компонент, которые выделяли с помощью указанных методов из исходной матрицы дескрипторов. Число компонент, используемых для прогноза по методу РГК, составляло от 2 до 9, по методу ДМНК оно, как правило, не превышало 2.

Рассмотрение пяти первых РГК компонент для выборки из 19 препаратов, использованных при изучении связывания ПАУ, позволило сделать следующие заключения. Первая компонента преимущественно описывает совместный вклад ароматических и углеводных фрагментов в структуру гумусовых кислот, а также их

полидисперсность (максимальные вклады имеют C_{Ar} , CHO , CH_2O , M_w/M_n , M_z/M_w). Вторая компонента определяется в основном ММ характеристиками и частично – составом углеводной части гумусовых кислот. Третья компонента описывает N и O/C, четвертая – содержание карбониллов, пятая – алифатического незамещенного углерода. Аналогичный анализ первых двух РГК компонент для выборок “Hg(II)” и “атразин” показал их существенное сходство с описанными выше для выборки “ПАУ”. Это позволяет сделать важный вывод об адекватности использованного принципа формирования выборок для установления зависимостей “строение – свойство”, который предусматривал задание максимального различия препаратов по строению путем включения в выборку препаратов различного происхождения и фракционного состава.

В отличие от метода РГК, ДМНК-компоненты содержат информацию о взаимосвязи дескрипторов и прогнозируемых свойств. Сопоставление первых ДМНК-компонент, полученных для одной выборки препаратов, но двух разных констант – K_{OC} и K_{OC}^D , показало, что в случае ПАУ выделяемые компоненты оказались практически идентичны, что согласуется с наличием тесной корреляции между K_{OC} и K_{OC}^D для ПАУ. В тоже время в случае атразина наблюдалось принципиальное различие между первыми компонентами. Для K_{OC} она была весьма сходна с таковой для ПАУ, тогда как для K_{OC}^D явно преобладали дескрипторы ММ состава. В случае Hg(II) для всех трех наборов данных (K_{PCIC} , K_{PCIC}^D , K_{PCIC}^B) наблюдалось хорошее совпадение первых компонент. При этом они существенно отличались от таковых для ПАУ и атразина. 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.

Таблица 15

Характеристики прогностической и описательной способности моделей (Q^2 и R^2), рассчитанных по методами ДМНК и РГК

Токсикант	св-во	ДМНК				РГК			
		Q^2	R^2	Число дескрип.	Число компонент	Q^2	R^2	Число дескрип.	Число компонент
Hg (II)	lgK_{PCIC}	0.98	1.00	14	11	0.80	0.89	5	4
	lgK_{Hg}^D	0.38	0.52	8	1	0.39	0.44	4	2
	lgK_{Hg}^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}	0.83	0.90	4	1	0.86	0.92	5	4
	K_{OC}^D	0.57	0.73	9	2	0.60	0.71	15	5

В тоже время анализ компонент показал, что многие дескрипторы входят во все компоненты с малыми коэффициентами. Это может свидетельствовать об избыточности исходного набора, что приводит к информационному шуму. По-видимому, данной причиной обусловлены и низкие значения Q^2 , полученные для РГК- и ДМНК-моделей. Указанную проблему решали путем пошагового исключения дескрипторов. Характеристики лучших моделей приведены в табл. 15.

Введение описанной процедуры позволило существенно улучшить качество рассчитываемых РГК- и ДМНК-моделей, хотя в среднем оно оставалось хуже, чем для МР-моделей. Анализ частоты встречаемости дескрипторов, вошедших в 22 лучшие модели, позволил выявить наибольшую значимость дескрипторов углеводной части, полидисперсности, содержания Н и N. Полученный ряд дескрипторов весьма близок найденному ранее из результатов классификаций.

Таким образом, проведенный комплекс исследований позволил разработать методические подходы к прогнозированию свойств гумусовых кислот с использованием обширного набора дескрипторов состава. Получен набор прогностических моделей “строение – связывающие/детоксицирующие свойства” гумусовых кислот по отношению к ПАУ, атразину и Hg(II). Тем самым дан утвердительный ответ о возможности прогноза свойств органических объектов стохастического характера при использовании интегральных дескрипторов состава для численного описания их строения.

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, методика гель-хроматографического определения молекулярных масс, включая теоретическое обоснование выбора образца сравнения, 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 с использованием интегральных дескрипторов состава, описывающих элементный, фрагментный и молекулярный уровни структурной организации гумусовых кислот 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.

Основное содержание работы изложено в статьях:

1. Kudryavtsev A.V., Perminova I.V., Petrosyan V.S. Size-exclusion chromatographic descriptors of humic substances. // *Anal. Chim. Acta*. 2000. V. 407. N 1-2. P.193-202.
2. Гармаш А.В., Данченко Н.Н., Перминова И.В. Модель взаимодействия гумусовых кислот с ацетатом кальция. 2. Модель комплексообразования. // *Вестник МГУ, сер. 2. Химия*. 2000. Т. 41. С. 109-115.
3. Жилин Д.М., Перминова И.В., Петросян В.С. Экспресс-методика определения ртути (II) в присутствии гумусовых кислот. // *Вестник МГУ, сер. 2. Химия*. 2000. Т. 41. С. 214-215.
4. Ковалевский Д.В., Пермин А.Б., Перминова И.В., Коннов Д.В., Петросян В.С. Количественное определение обменных и скелетных протонов гумусовых кислот с помощью спектроскопии ПМР. // *Вестник МГУ, сер. 2. Химия*. 2000. Т. 41. С. 375-380.
5. Ковалевский Д.В., Пермин А.Б., Перминова И.В., Петросян В.С. 2000. Выбор времени задержки импульса для количественной ^{13}C ЯМР спектроскопии гумусовых кислот. // *Вестник МГУ, сер. 2. Химия*. 2000. Т. 41. С. 39-42.
6. Kulikova N.A., Perminova I.V., Lebedeva G.F. Binding constants of humic substances to atrazine and their relationship to the structure. // *Proceedings of the 10th International Meeting of the International Humic Substances Society (IHSS-10)*, 24-28 July 2000, Toulouse, France, 2000. P.112-115.
7. Perminova I.V., Kudryavtsev A.V., Frimmel F.H., Abbt-Braun G., Hesse S., Petrosyan V.S. Classification of humic substances by the origin on the basis of size exclusion chromatographic descriptors. // *Proceedings of the Symposium on the refractory humic substances in the environment (ROSE-II)*. 1-3 August 2000, Karlsruhe, Germany, 2000. P.28-32.
8. Steinberg C.E.W., Haitzer M., Brueggemann R., Perminova I.V., Yashchenko N.Yu., Petrosyan V.S. Towards a quantitative structure activity relationship (QSAR) of dissolved humic substances as detoxifying agents in freshwaters. // *Int. Rev. Hydrobiol.* 2000. V.85. P.253-266.
9. Данченко Н.Н., Гармаш А.В., Перминова И.В. Моделирование взаимодействия гумусовых кислот с ацетатом кальция: модель ионного обмена. *Вестник МГУ, сер. 2. Химия*. 1999. Т. 40. С.183-187.
10. Ященко Н.Ю., Перминова И.В., Петросян В.С., Филиппова Е.М., Фадеев В.В. Взаимодействие гумусовых кислот с полиядерными ароматическими углеводородами: влияние рН и ионной силы. // *Вестник МГУ, сер. 2. Химия*. 1999. Т.40. С.188-193.
11. Perminova I.V. Size-exclusion chromatography of humic substances: complexities of data interpretation attributable to non-size exclusion effects. // *Soil Sci.* 1999. V.164. N 11. P.834-840.

12. Perminova I.V., Grechishcheva N.Yu., Petrosyan V.S. Relationships between structure and binding affinity of humic substances for polycyclic aromatic hydrocarbons: relevance of molecular descriptors. // *Environ. Sci. Technol.* 1999. V.33. P.3781-3787.
13. Schmitt-Kopplin Ph., Hertkorn N., Freitag D., Kettrup A., Garmash A.V., Kudryavtsev A.V., Perminova I.V., Petrosyan V.S. Mobility distribution of synthetic and natural polyelectrolytes with capillary zone electrophoresis. // *J. AOAC International.* 1999. V. 82. P.1594-1603.
14. Данченко Н.Н., Перминова И.В., Гармаш А.В., Кудрявцев А.В. Определение карбоксильной кислотности гумусовых кислот титриметрическими методами. // *Вестник МГУ, сер. 2. Химия.* 1998. Т. 39. N 2. С.127-131.
15. Anisimova M.A., Kulikova N.A., Lebedeva G.F., Perminova I.V. Detoxifying ability of soils and extracted from them humic acids in relation to atrazine. // *Proceedings of the 3rd World Congress of the International Soil Science Society.* 28-30 August, Montpellie, France, 1998. P.17-23.
16. Perminova I.V., Frimmel F.H., Kovalevskii D.V., Abbt-Braun G., Kudryavtsev A.V., Hesse S. Development of a predictive model for calculation of molecular weight of humic substances. // *Wat. Res.* 1998. V.32. P.872-881.
17. Данченко Н.Н., Перминова И.В., Капланова Т.Г., Петросян В.С. Определение общего содержания гидроксильных групп в нефракционированных гумусовых кислотах. // *Вестник МГУ, сер. 2. Химия.* 1997. Т.38. N 2. С.112-114.
18. Куликова Н.А., Перминова И.В., Лебедева Г.Ф., Маторин Д.Н. Влияние органического вещества водной и щелочной вытяжек торфа на фотосинтез растений. // *Вестник МГУ, сер. 16. Биология.* 1997. N 2. С.36-41.
19. Филиппова О.И., Лебедева Г.Ф., Перминова И.В. Взаимосвязь химического состава торфа и его детоксицирующих свойств по отношению к хлорсулфурону. // *Вестник МГУ, сер. 17. Почвоведение.* 1997. N 4. С.37-41.
20. Perminova I.V., Frimmel F., Kovalevsky D.V., Abbt-Braun G., Kudryavtsev A.V., Hesse S. Development of a predictive model for calculation of molecular weight of humic substances. // *Water Research.* 1998. V. 32. P.872-881.
21. Жилин Д.М., Перминова И.В., Петросян В.С. Исследование взаимодействия гумусовых кислот со ртутью(II). // *Экологическая химия.* 1996. Т.5. N 2. С.131-137.
22. Perminova I.V., Kovalevsky D.V., Yashchenko N.Yu., Danchenko N.N., Kudryavtsev A.V., Zhilin D.M., Petrosyan V.S., Kulikova N.A., Philippova O.I., Lebedeva G.F. Humic substances as natural detoxicants. // *Humic substances and organic matter in soil and water environments: characterization, transformations and interactions.* Eds.: C.E. Clapp, M.H.B. Hayes, N. Senesi, S.M. Griffith. St. Paul, MN, USA, 1996. P.399-406.
23. Данченко Н.Н., Перминова И.В., Капланова Т.Г., Петросян В.С. Определение общей кислотности баритовым методом - условия применимости для анализа гумусовых кислот. // *Экологическая химия.* 1995. Т.4. N 4. С.313-317.

24. Перминова И.В., Яценко Н.Ю., Польшов В.А., Петросян В.С., Венедиктов П.С. Влияние фульвокислот на токсичность флуорантена и фенантрена в водной среде. // Экологическая химия. 1995. Т. 4. N 3. С.234-238.
25. Перминова И.В., Данченко Н.Н., Яценко Н.Ю., Лебедева Г.Ф., Ковалевский Д.В., Куликова Н.А., Филиппова О.И., Венедиктов П.С., Польшов В.А., Детоксикация тяжелых металлов, полиароматических углеводородов и пестицидов гумусовыми веществами в водах и почвах. // Материалы международного конгресса "Вода: экология и технология", Москва., 6-9 сент. 1994. Т.IV. С.1136-1143.
26. Perminova I.V., Petrosyan V.S. Marine humic acids in the organic carbon flux in the Bering/Chukchi Seas ecosystems. // Proceedings of the Conference on Carbon Cycling in the Boreal Forests and Subarctic Ecosystems. OSU, Corvallis, September 9-13, 1991. Eds. T.Vinson and T. Kolchugina, 1993. EPA/MR-126546. P.37-42.
27. Першина И.В. Гуминовые кислоты. // Исследование экосистем Берингова и Чукотского морей. Вып. 3, С-Петербург: Гидрометеоиздат, 1992. С. 637-641.
28. Pershina, I.V. Humic acids in the Bering and Chukchi Seas ecosystems. // P.A. Nagel (Ed.) Results of the Third Joint US-USSR Bering&Chukchi Seas Expedition (BERPAC), Summer 1988. U.S. Fish and Wildlife Service, Washington, DC, 1992. P. 231-237.
29. Першина И.В., Вермул В.М., Поленова Т.В., Иванова Е.К. Исследование молекулярно-массового распределения и спектральных параметров фульвокислот природных вод. 1. Фракционирование фульвокислот методом гель-проникающей хроматографии. // Вестник МГУ, сер. 2. Химия. 1989. Т.30. С.176-182.
30. Першина И.В., Вермул В.М., Поленова Т.В., Иванова Е.К. Исследование молекулярно-массового распределения и спектральных параметров фульвокислот природных вод. 2. Фракционирование фульвокислот и определение коэффициента поглощения фракций. // Вестник МГУ, сер. 2. Химия. 1989. Т.30. С.277-281.
31. Першина И.В., Вермул В.М., Аброскин А.Г., Поленова Т.В., Иванова Е.К. Исследование молекулярно-массового распределения и спектральных параметров фульвокислот природных вод. 3. Влияние молекулярно-массового состава на флуоресцентные свойства фульвокислот. // Вестник МГУ, сер. 2. Химия. 1989. Т.30. С.368-372.
32. Першина* И.В., Попов Д.В., Иванова Е.К., Поленова Т.В. Газохроматографическое определение некоторых фосфорорганических пестицидов в водной среде в присутствии фульвокислот. // Журн. аналит. химии. 1989. Т.44. С.1475-1479.
33. Першина И.В., Иванова Е.К. и др. Флуориметрический метод определения фульвокислот в морских водах. // Журн. аналит. химии. 1986. Т.41. С.1256-1259.
34. Першина И.В., Иванова Е.К., Поленова Т.В. Стандартные образцы для флуориметрического определения фульвокислот. // Журн. аналит. химии. 1986. Т.41. С.2084-2087.

* В настоящее время автор поменяла фамилию Першина на Перминова.