



Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова

Химический факультет

кафедра радиохимии

Получение меченных тритием гуминовых веществ и исследование их свойств

Позднякова В.Ю.

Научный руководитель: к.х.н., доцент Бадун Г.А.

Лаборатория радионуклидов и меченых соединений

Москва-2006

Объекты исследования - ГУМИНОВЫЕ ВЕЩЕСТВА

Гуминовые вещества (ГВ) - это сложные смеси высокомолекулярных темноокрашенных органических соединений природного происхождения, образующихся при разложении растительных и животных остатков.

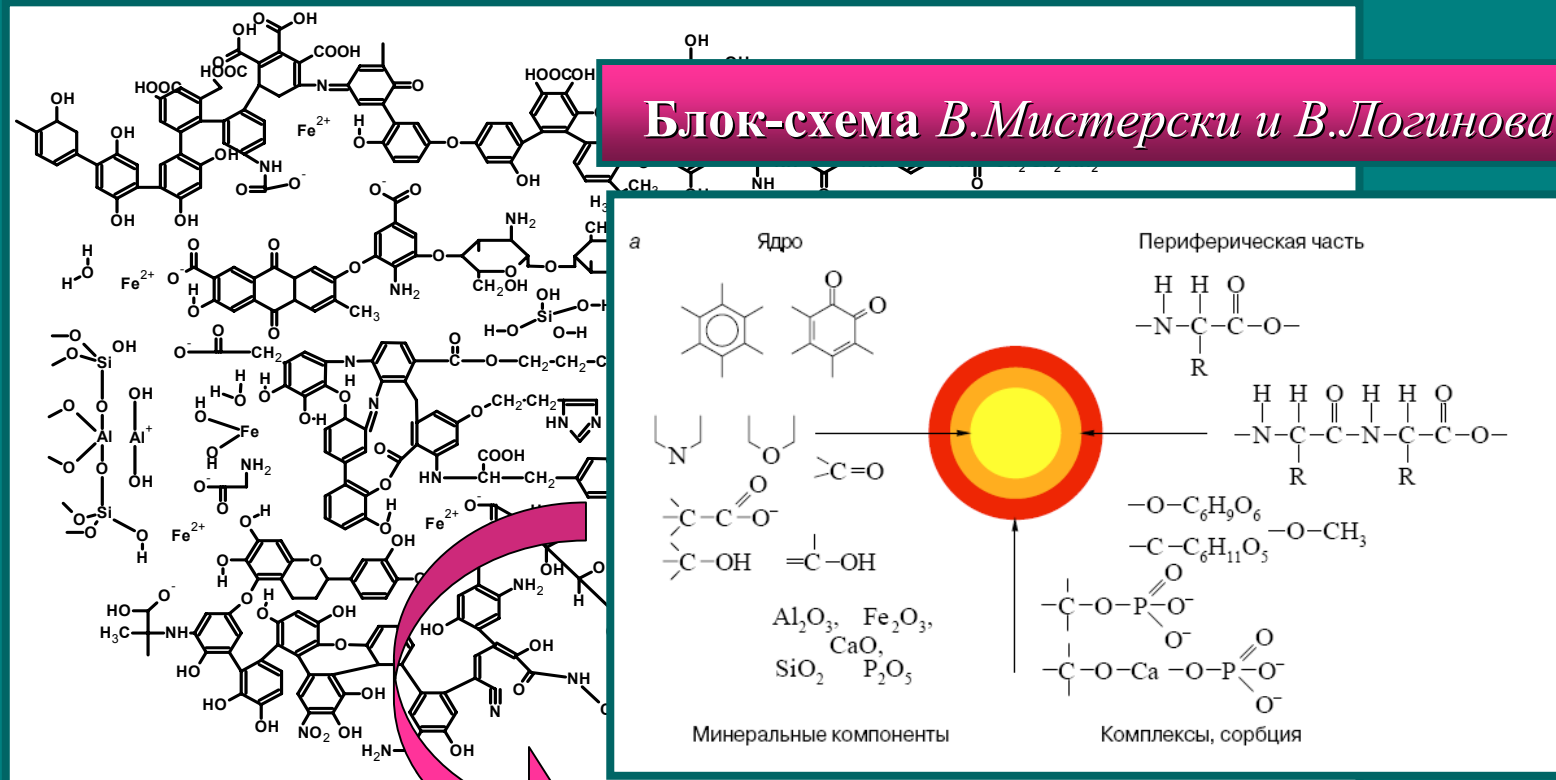
Источники ГВ – почвы, природные воды, твёрдые горючие ископаемые.

Свойства ГВ – нестехиометричность состава, нерегулярность строения, гетерогенность структурных элементов, полидисперсность.

Классификация, основанная на растворимости отдельных компонентов ГВ:

- *Гуминовые кислоты (ГК)* - растворимы только в щелочных растворах
- *Гиматомелановые кислоты (ГМК)* - извлекаемые из ГК ЭТИЛОВЫМ СПИРТОМ
- *Фульвокислоты (ФК)* - растворимы во всём диапазоне рН
- *Гумин* – практически нерастворим

Структура гумусовых кислот почв (Kleinhempel. Albrecht-Thaer-Archiv., 1970, № 14, P.3-10)



Гидрофобность

Поверхностная
активность

Поведение в окружающей среде

Биологическая активность

Использование различных радионуклидов в изучении ГВ

^{14}C

"Characterization of carbon-14 labelled humic substances"
Jussi V.K. Kukkonen (2002).

Введение ^{14}C NaHCO_3 , ^{14}C фенилэтанол, ^{14}C глюкоза

^{131}I

"Use of radioactive tracers for the characterization of humic acids in high performance size exclusion chromatography"
K.F. O'Connell, H.K. Kwon, L. (2000)

^{111}In

"Aluminium ions at polyelectrolyte interfaces. Role in the surface-area-exclusion chromatography of humic acid."
E. Pefferkorn, J. Widmaier, F. Elfarissi (2001)

Введение трития в $-\text{CHO}$ группы ГК с помощью KB^3H_4
 $A_{\text{уд}}$ (ГВ) = 4 кБк/мг

"The evidence for the incorporation of fulvic acid into the bone and cartilage of rats." Wang C, Wang Z., Yang C (1996).

Получение ^3H -ФА с помощью каталитического гетерогенного изотопного обмена. $A_{\text{уд}}$ (ГВ) = 2-37 МБк/мл

^3H

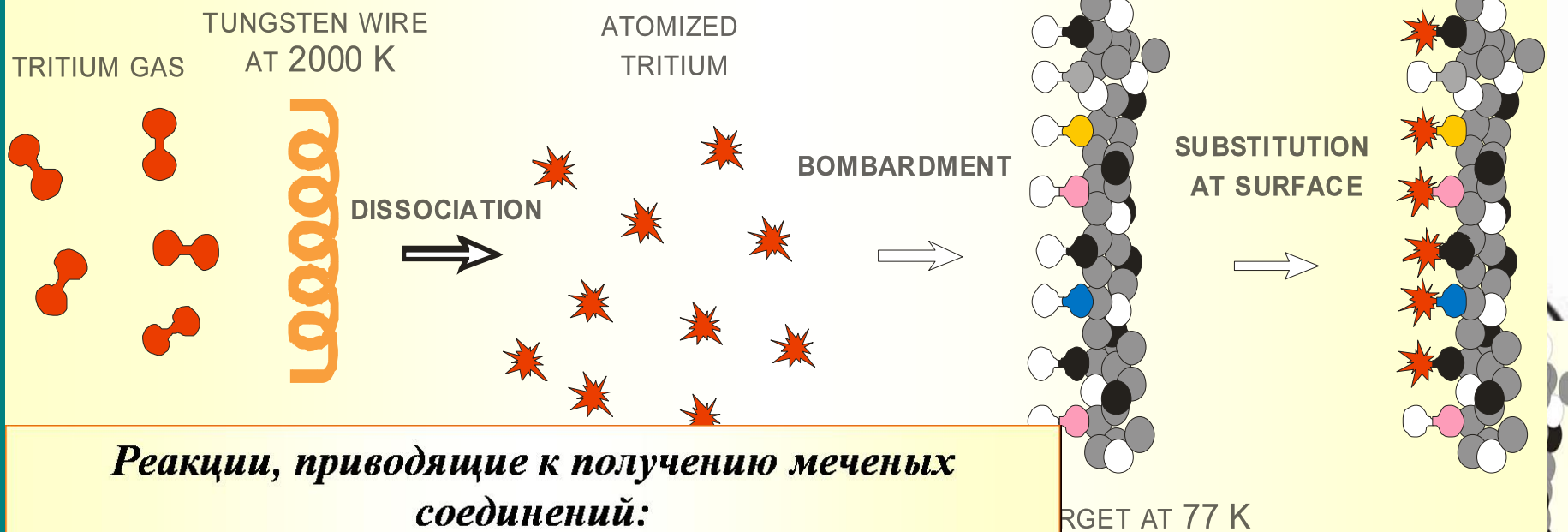
65-80%.

^{18}F

Цель работы

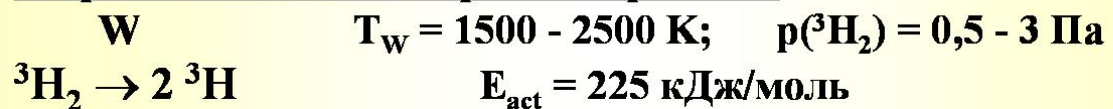
- *разработка способа получения меченных тритием ГВ с равномерным распределением метки по компонентам препаратов и изучение их гидрофобных и поверхностно-активных свойств методом сцинтиллирующей фазы (СФ)*

Принцип метода термической атомизации



Реакции, приводящие к получению меченых соединений:

Образование атомарного трития:



Изотопный обмен по С-Н связям:

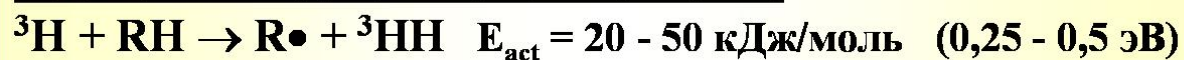
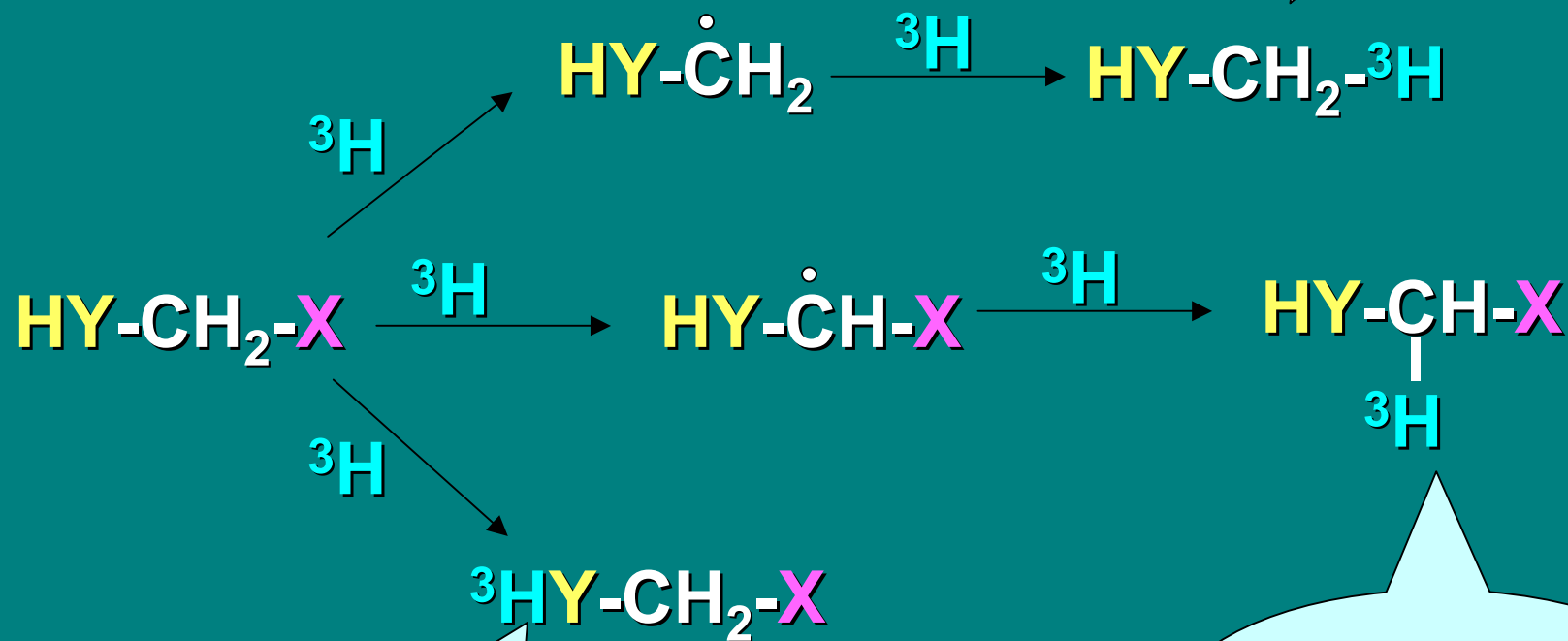


Схема реакций, протекающих в микроволновом излучении при попадании атома трития в молекулу



Меченый
побочный
продукт

Лабильная
метка

Меченое
материнское
соединение

Схема установки для работы с газообразным тритием

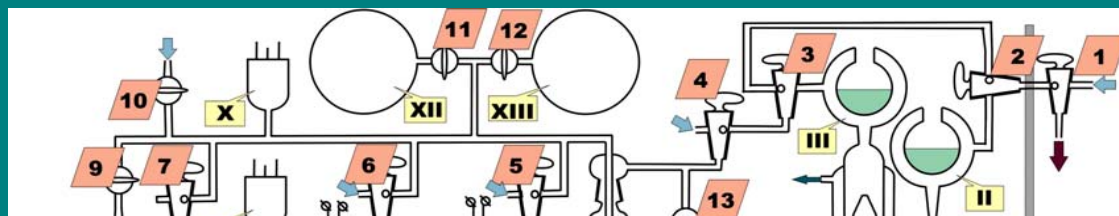
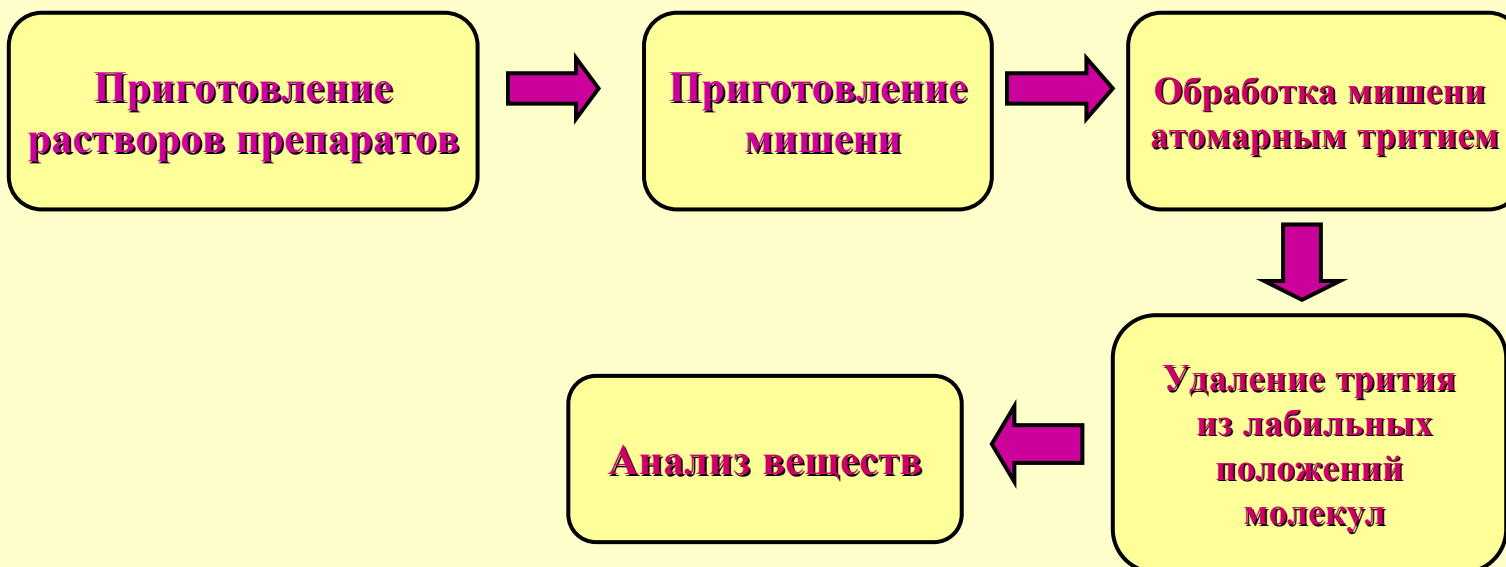


Схема эксперимента



Определение условий введения тритиевой метки в ГВ

Индивидуальные вещества:

- аминокислоты - гомологический ряд альфа-аминокислот от глицина до норлейцина, п-аминобензойная кислота, аспарагиновая кислота и лизин;
- поверхностно-активные вещества (ПАВ) - бромиды алкилтриметил-аммония с алкильными группами $C_{12}H_{25}$, $C_{14}H_{29}$, $C_{16}H_{33}$ (DTAB, TTAB, STAB) и тритон TX-100;
- аминосахар - глюкозамин

Задачи

- влияние времени реакции на соотношение выходов меченых аминокислот и сахаров
- влияние температуры атомизатора на соотношение основной и побочных реакций для ряда аминокислот
- влияние температуры вольфрамовой проволоки на выход бромидов алкилтриметиламмония

➤ **влияние времени реакции на соотношение выходов меченых аминокислот и сахаров**

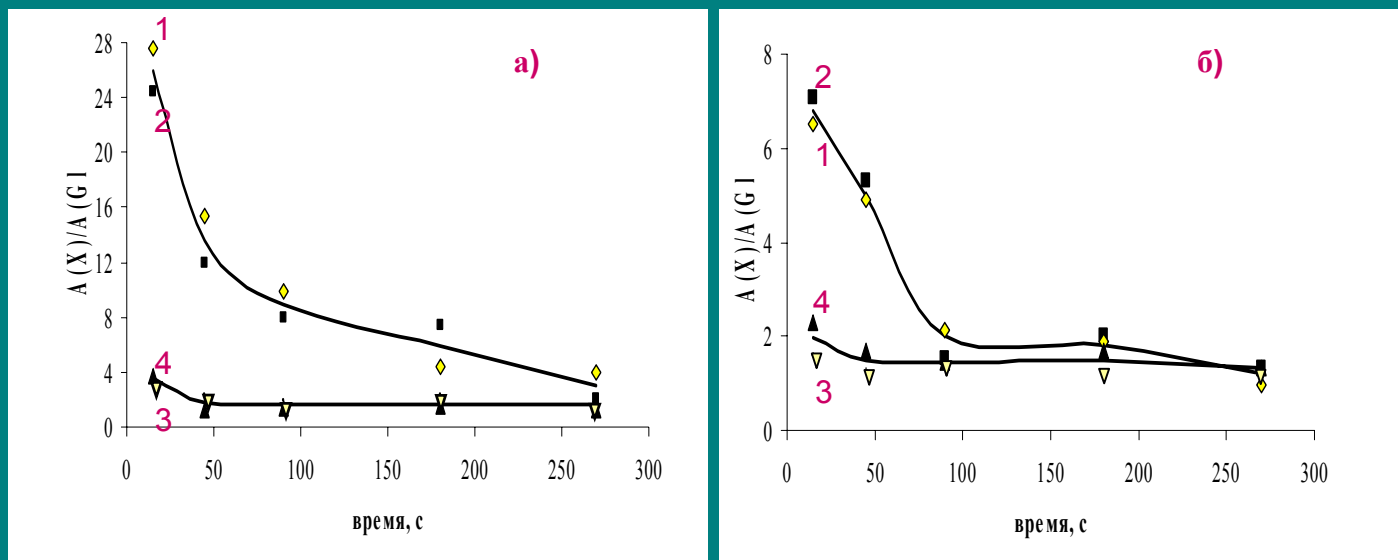
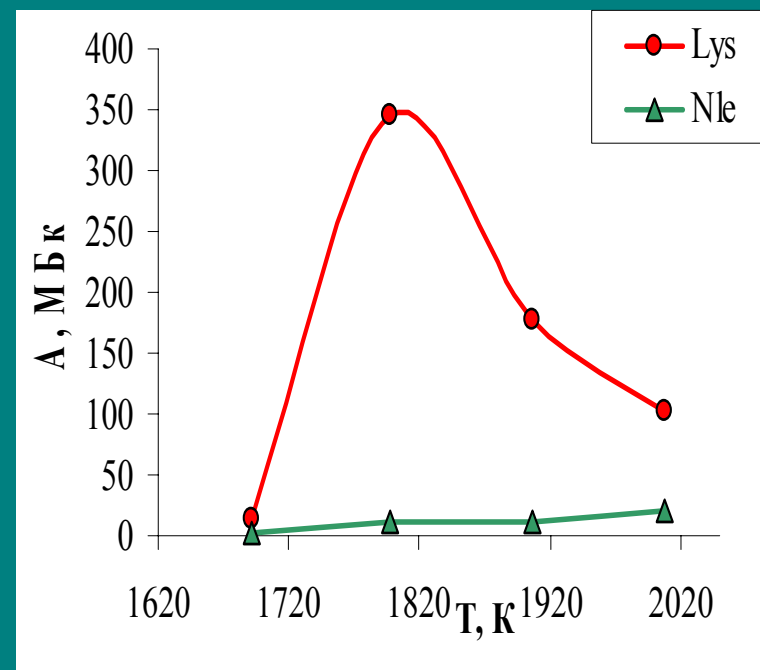
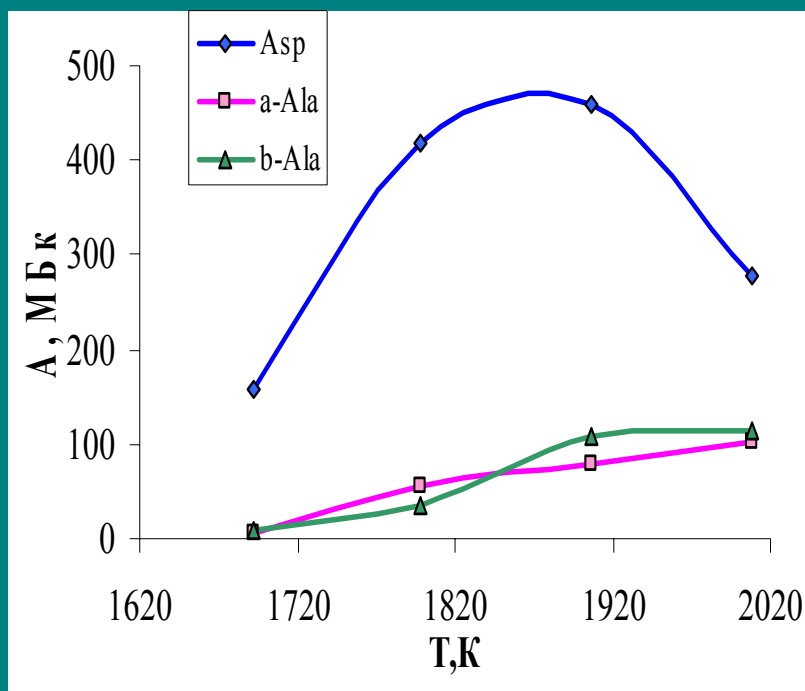


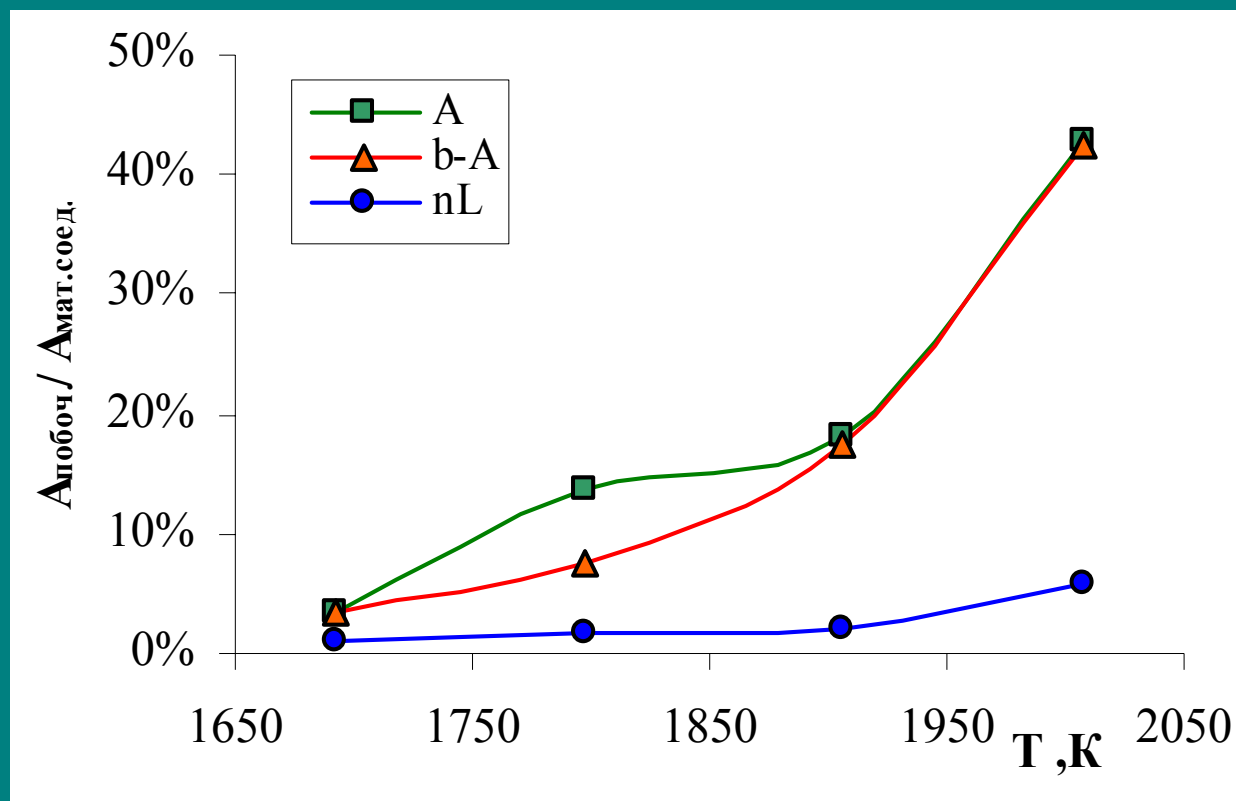
Рисунок 1. Зависимость отношений радиоактивностей от времени реакции для замороженных водных растворов (а) и лиофилизированных смесей (б):
1,2 - глюкозамин/глицин;
3,4 – серин/глицин при давлении трития 0,5 Па (1,3) и 2 Па (2,4).

➤ влияние температуры атомизатора на соотношение основной и побочных реакций для ряда аминокислот

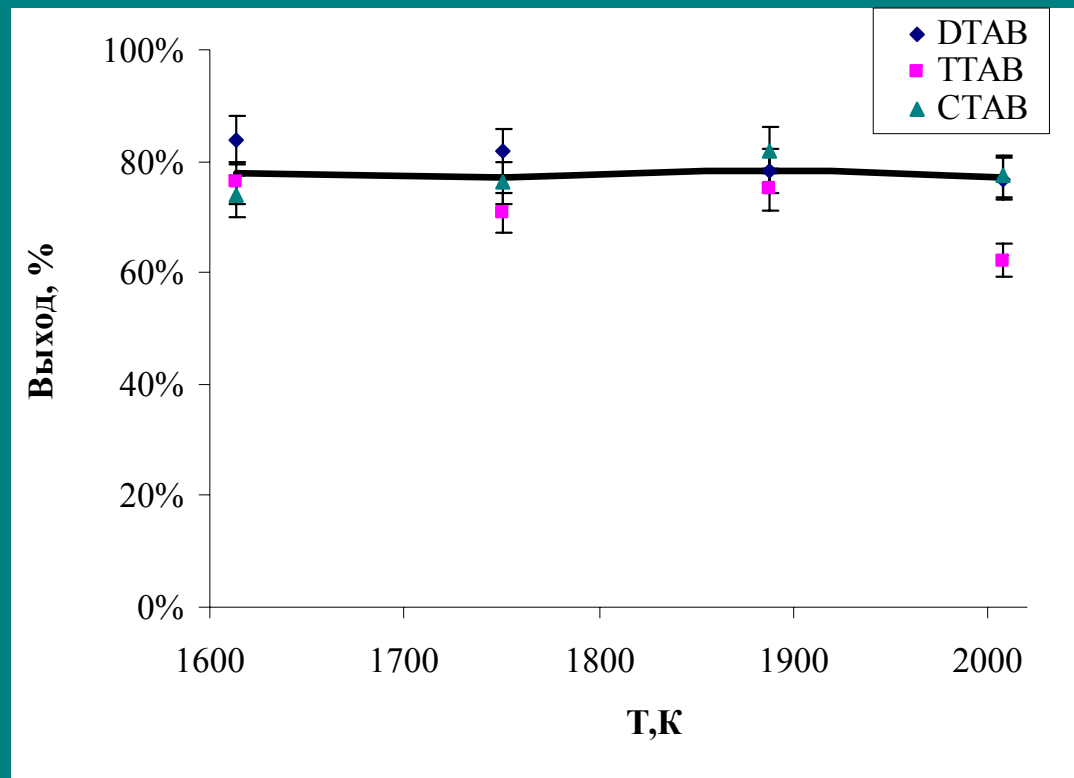
Радиоактивность материнского соединения и побочных продуктов при разных значениях температуры атомизатора



Соотношения выходов меченых побочного продукта и материнского соединения для аспарагиновой кислоты (реакция декарбоксилирования) и лизина (реакция дезаминирования)



Зависимость выхода ПАВ от температуры атоизатора



- ❖ Наиболее высокий выход меченых сахаров и аминокислот достигается при времени реакции 10 с
- ❖ Скорости побочных реакций декарбоксилирования и дезаминирования резко возрастают с увеличением температуры вольфрамовой проволоки
- ❖ Наибольший выход меченых аминокислот достигается при температуре атомизатора 1800–1900 К
- ❖ Глубина реакционной зоны ограничена 1 нм, то есть тритиевая метка должна включаться в основном в периферическую часть молекул ГВ

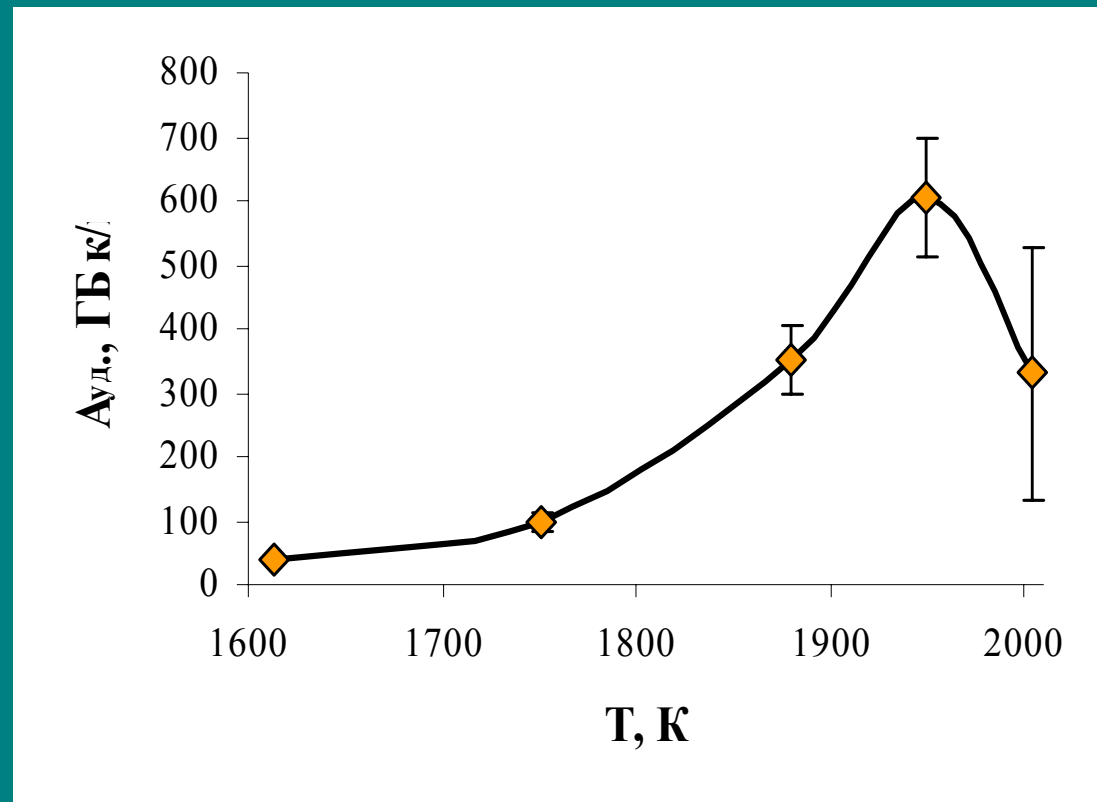
Анализ влияния условий проведения эксперимента по введению трития на характеристики меченого коммерческого препарата ГК леонардита

Таблица 1. Условия экспериментов и основные результаты

СЕРИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА	УСЛОВИЯ ВВЕДЕНИЯ МЕТКИ				Уд.р/акт. Ки/г (100% тритий)	Выход %
	давление трития Па	масса мишен и мг	время реакции* с	температура атомизатора К		
1-АЯ СЕРИЯ	0,5	2	20	1950	14,0	23,4**
2-АЯ СЕРИЯ	0,5	0,26	10	1950	726	94,9
	0,5	0,26	20	1950	197	86,8
	0,5	0,26	40	1950	571	83,1

ПРИМЕЧАНИЕ: (*) - РЕАКЦИЯ ПРОВОДИЛАСЬ ИМПУЛЬСАМИ ПО 10 СЕКУНД С ПОЛНЫМ ОБНОВЛЕНИЕМ СОСТАВА ГАЗОВОЙ ФАЗЫ, (**) - ОЧИСТКА ПРЕПАРАТОВ ПЕРВОЙ СЕРИИ ПРОВОДИЛАСЬ С ПОМОЩЬЮ ДИАЛИЗНОЙ МЕМБРАНЫ MWCO 12 кДА, ДЛЯ ОСТАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ИСПОЛЬЗОВАЛИ МЕМБРАНЫ MWCO 2 кДА.

Рисунок Зависимость удельной радиоактивности препаратов ГК угля от температуры атомизатора



Оптимальные условия для введения тритиевой метки в ГВ методом термической активации трития

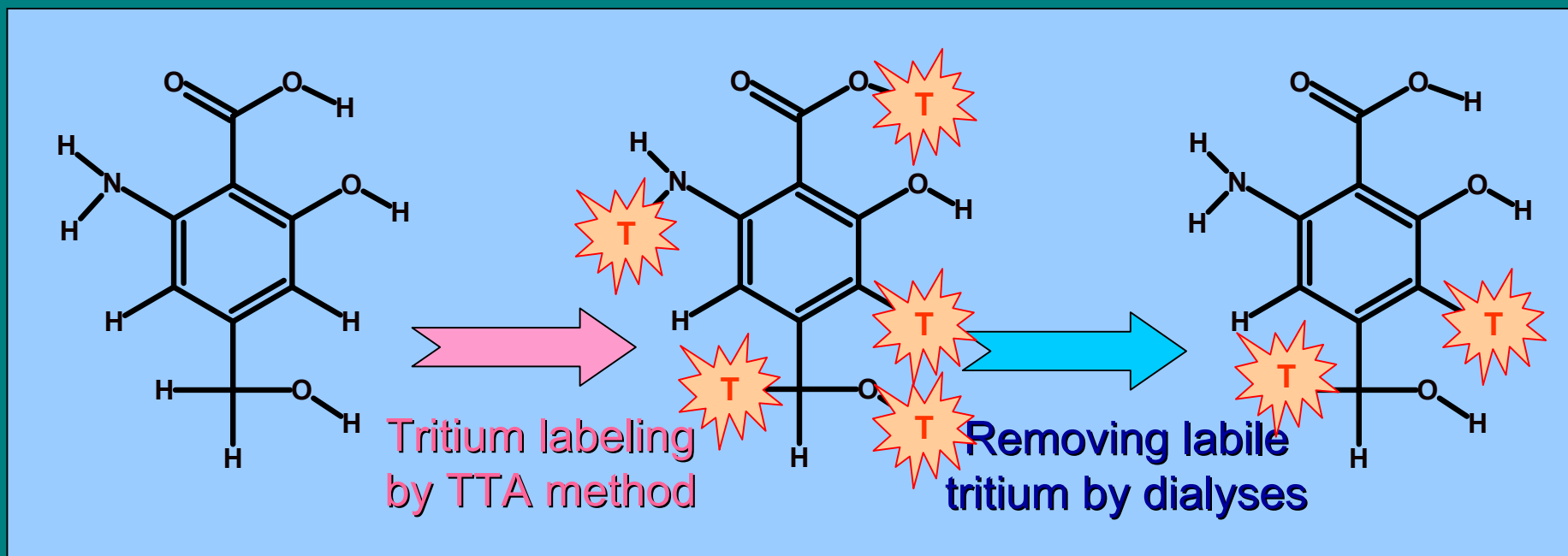
Температура атомизатора: 1900-1950 К

Давление трития: 0,5 Ра

Масса мишени: 0,2-0,3 мг

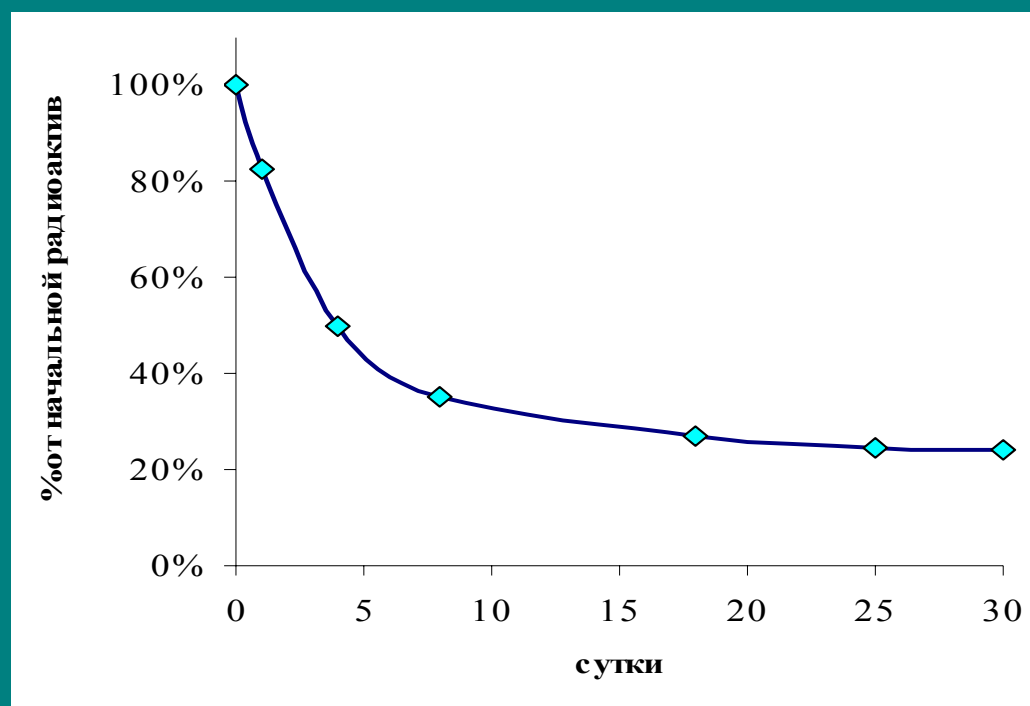
Время реакции: 10 секунд

Схема введения трития и удаления лабильной метки



Очистка меченных тритием ГВ от лабильного трития

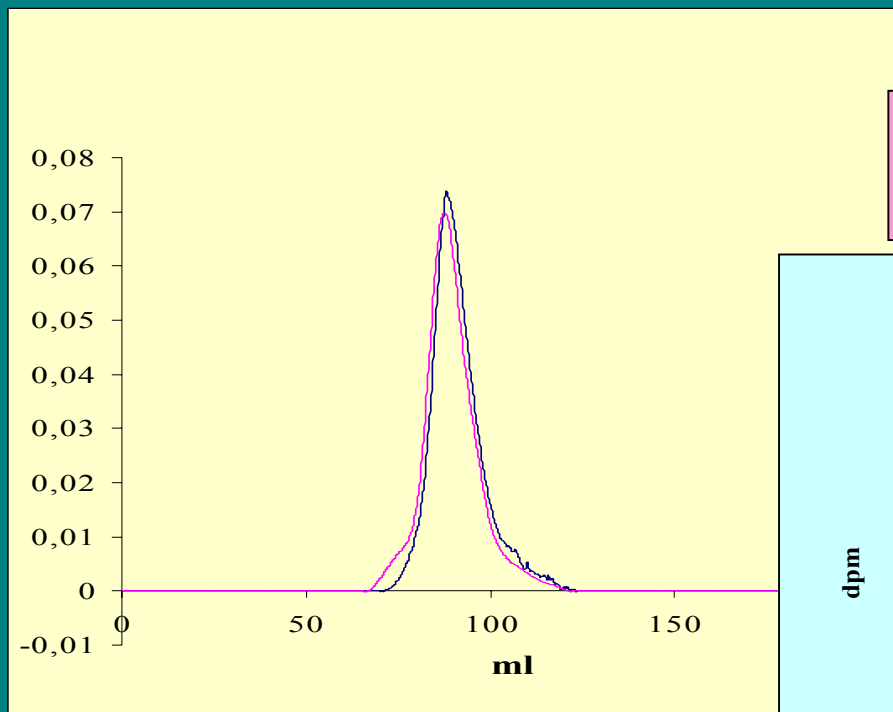
*Диализ ^3H -ГВ в фосфатном буфере 0.028М при рН 6.8
через мембраны 2кДа*



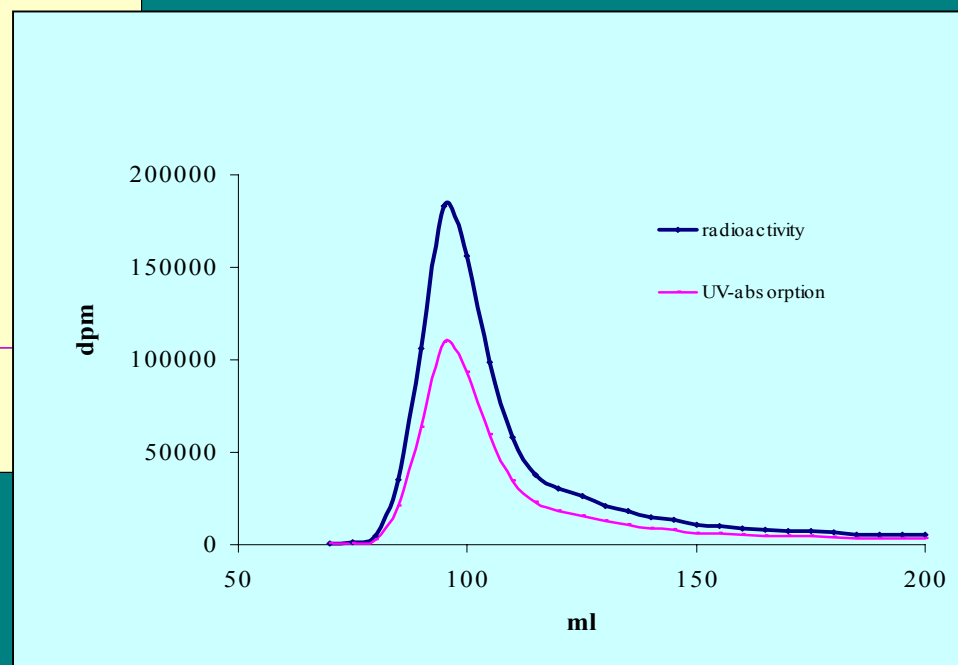
*Рисунок . Изменение радиоактивности препарата ГВ
угля при диализной очистке через мембрану 2 кДа*

Подтверждение равномерности введения метки в ГВ

УФ-профили ГК и ^3H -ГК угля

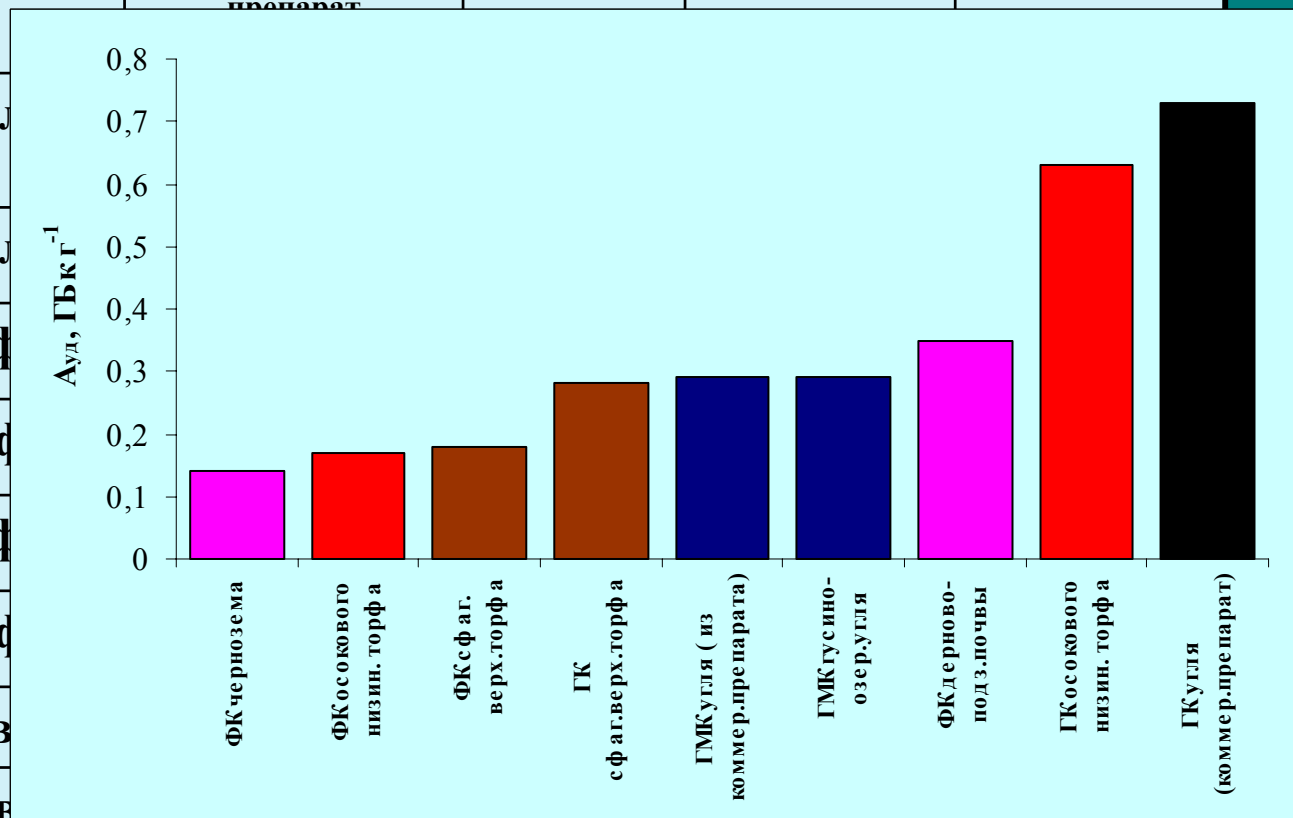


Профили радиоактивности и
УФ-поглощения ^3H -ГК угля



Характеристика меченных тритием ГВ

Препарат ГВ	Источник	Мр, кДа	Удельная р/акт-ть, ТБк/г	Выход, %
ГК угля	Коммерческий препарат	20.0	0,73	96
ГМК угля				
ГМК угля				
ГК торфа				
ФК торфа				
ГК торфа				
ФК торфа				
ГК почвы				
ФК почвы				
ФК почвы	Дерново-подзолистые почвы	11.1	0,35	82



Изучение гидрофобных и поверхностно-активных свойств ГВ

Коэффициент распределения -количественная мера определения гидрофобности

(Leo, A., Hansch, C. and Elkins, D. 1971. Partition coefficients and their uses. Chem. Rev. 71:525-616.).

Общая форма:

$$K_p = [X]_{\text{org}} / [X]_{\text{water}}$$

Октанольно-водный
коэффициент распределения

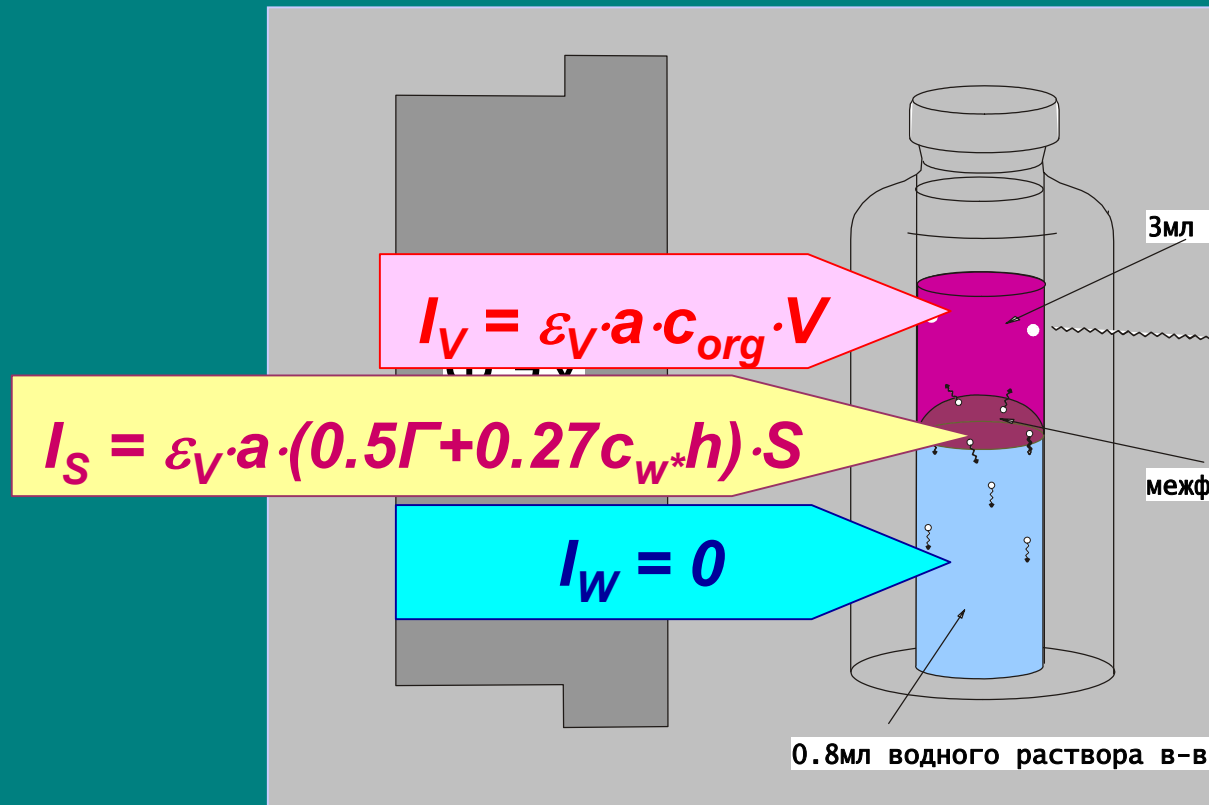
$$K_{ow} = [X]_{\text{oct}} / [X]_{\text{water}}$$

Методы определения K_{ow}

“ Shake flask” метод – метод медленного перемешивания или встряски
QSAR-метод – основан на количественной взаимосвязи между структурой
и свойством вещества

RP-HPLC метод – основан на корреляции коэффициента распределения
с временем удержания

Метод сцинтилирующей фазы



где C_{org} и C_w – концентрации меченого соединения в органической и водной фазах,
 Γ – величина удельной адсорбции поверхностно-активного вещества на границе раздела фаз,

ε – эффективность регистрации излучения в органической фазе,
 V – объем органической фазы,
 S – площадь границы раздела,
 h – толщина зоны водной фазы, из которой возможна регистрация излучения трития,
 a – удельная радиоактивность меченого соединения.

Определение I_v и I_s

I – скорость счета двухфазной системы (V)

$$D_{\text{тв}} = C_{\text{толуол}} / C_{\text{вода}}$$

I_2 – скорость счета остатка (V_2)

I_1 – скорость счета орг. фазы (V_1)

Liquid scintillation spectrometer

0.8 ml of ^3HHS solution

$$I_v = (V/V_1) \cdot I_1$$

$$I_s = I - (V/V_1) \cdot I_1$$
$$I_s = I_2 - (V/V_1 - 1) \cdot I_1$$

Рисунок . Зависимость равновесной концентрации ГВ в орг.фазе от их концентрации в водной фазе

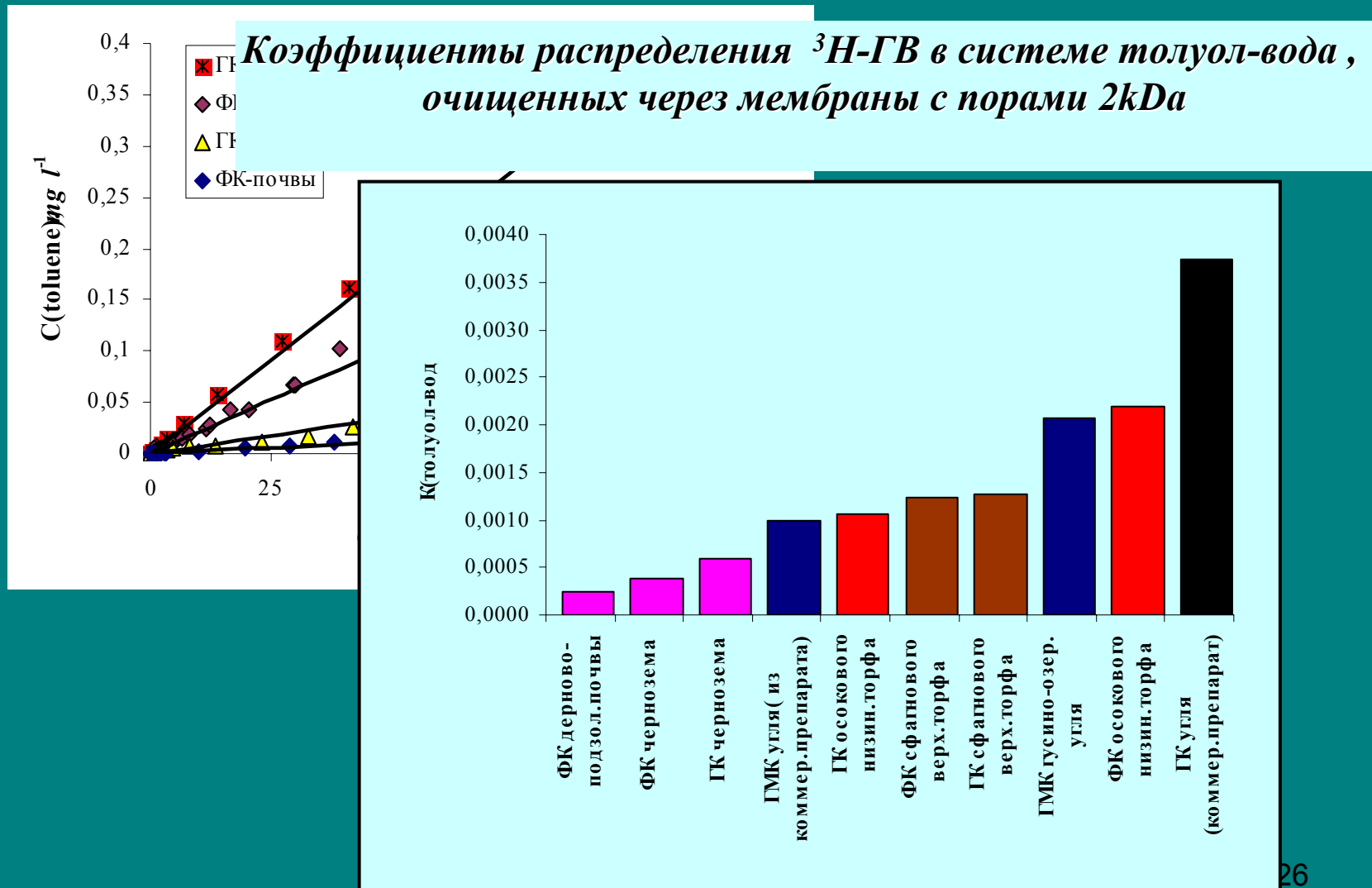
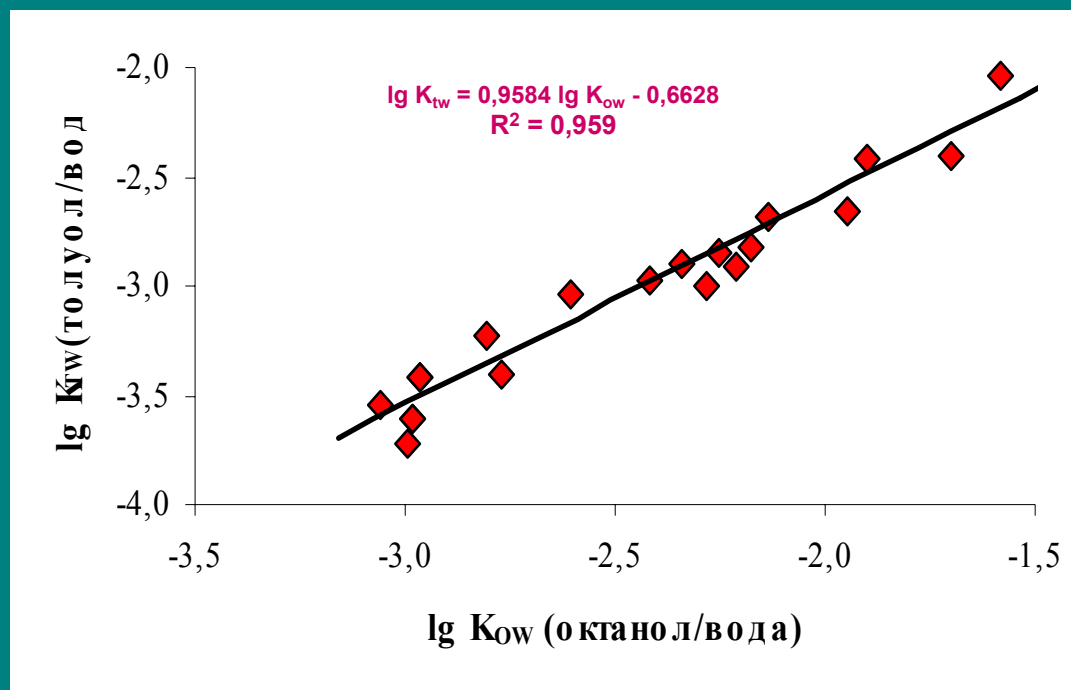


Рисунок . Корреляция между коэффициентами распределения ГВ в системах толуол-вода (K_{tw}) и октанол-вода (K_{ow})



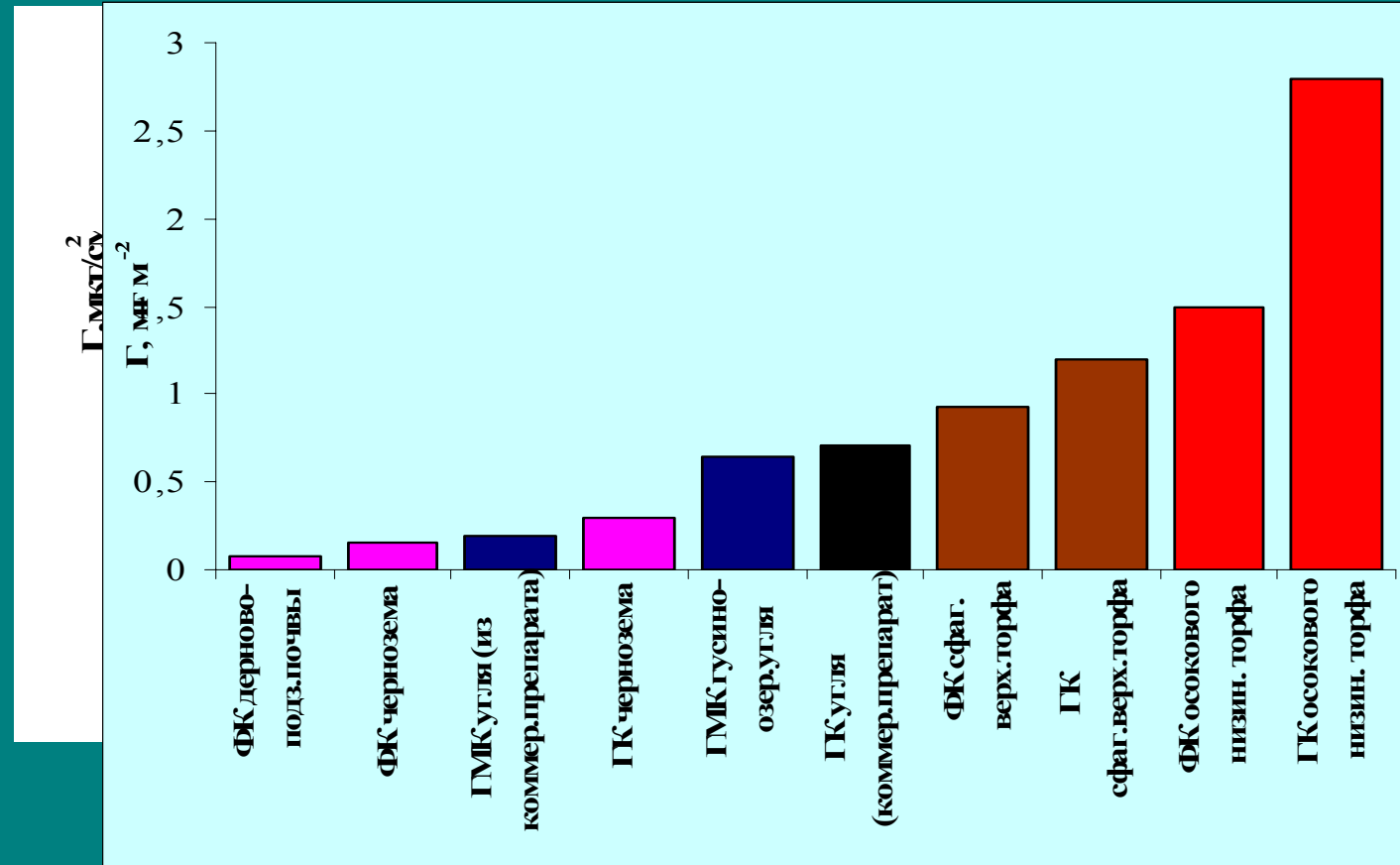
Шкала гидрофобности ГВ

гидрофобность ГВ увеличивается в следующем порядке:

ФК почв < ГК почв < ГК торфа ≈ ФК торфа < ГК угля

Рисунок . Изоте
на гра

Максимальное значение адсорбции ГВ
на границе раздела толуол-вода



Ряд изменения адсорбции препаратов ГВ на границе толуол-вода :
ФК почв < ГК почв < ГК угля < ФК торфа < ГК торфа

А) Б)
 погл
 още
 ние
 при
 254
 нм
 254
 нм
Таблица Влияние размера пор диализных мембран на потери препаратов в процессе очистки.

Препарат	MWCO мембраны для диализа, кДа	% от исходного количества	Удельная радиоактивность, ГБк/г**
ГК угля	12	23	14***
ГК угля	2	96	197
ГК торфа	12	69	255
ГК торфа	2	81	280
ФК торфа	12	24	179
ФК торфа	2	53*	177

Примечания: (*) – произошли неконтролируемые потери препарата в процессе очистки;
 (***) – в пересчете на 100 %-ное содержание трития в газе при введении метки;
 (***) – условия введения метки в препараты существенно различались.

Таблица Коэффициенты распределения K_{tw} и величины адсорбции в интервале 50-100 мг/л очищенных диализом мембранами с разными размерами пор.

Препарат	MWCO мембраны для диализа, кДа	Коэффициенты распределения, $K_{tw} \times 10^3$	Адсорбция на интерфейсе толуол-вода, мг*м ⁻²
СНА-Pow	12	5.6±0.6	2.9±0.4
СНА-Pow	2	3.7±0.2	0.7±0.07
РНА-T5H-98	12	1.5±0.2	1.3±0.1
РНА-T5H-98	2	1.2±0.1	1.2±0.1
РФА-T5H-98	12	1.5±0.2	1.3±0.2
РФА-T5H-98	2	1.3±0.1	0.9±0.2

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗРАБОТАННЫХ МЕТОДОВ
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО
ПРЕПАРАТА – ЛИГФОЛА**

Лигфол (гуминоподобное вещество)-продукт переработки целлюлозы

Таблица . Характеристика меченых препаратов лигфола.

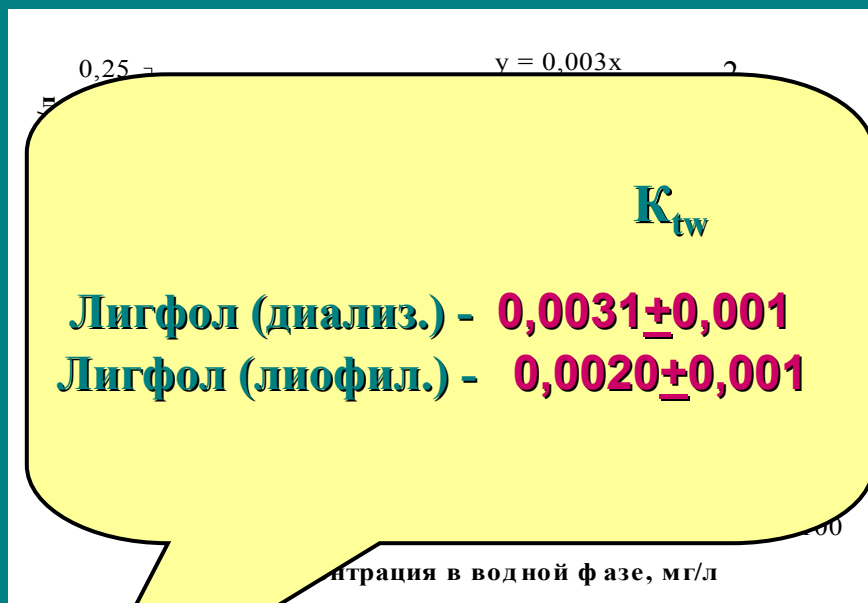
П р е п а р а т	Способ очистки от лабильной метки	Исходная р/акт-ть, МБк	Р/акт-ть после очистки, МБк	Удельная радиоактивность очищенного препарата, ГБк/г		Выход (остаток после очистки)
				реальная (25%-ный третий)	пересчет на 100%-ный третий	
1	диализ	165	49,7	115	460	67%
2	лиофилизация	149	58,3	93	370	98%

При
пр
1 -

2 – меченый препарат, подвергнутый
при очистке лиофилизации;
3 – меченый препарат, очищенный
с помощью диализа.

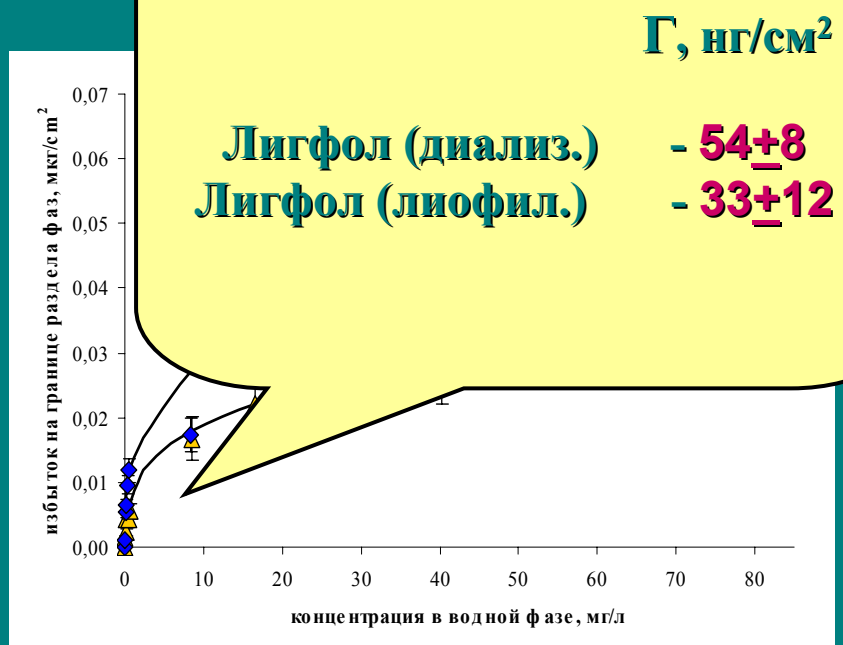
1 – меченый препарат, подвергнутый
при очистке лиофилизации;
2 – меченый препарат,
очищенный с помощью диализа.

Зависимость концентрации лигфола в толуоле от его концентрации в водной фазе



- 1 – меченый препарат, подвергнутый лиофилизации при очистке;
- 2 – меченый препарат, очищенный с помощью диализа.

Изотерма адсорбции лигфола на границе раздела



- 1 – меченый препарат, подвергнутый лиофилизации при очистке;
- 2 – меченый препарат, очищенный с помощью диализа.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ ГВ
В ЭКСПЕРИМЕНТАХ ПО ИССЛЕДОВАНИЮ
ИХ СВЯЗЫВАНИЯ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ
МЕМБРАНАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ И
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИХ ПОСТУПЛЕНИЯ
В РАСТЕНИЯ ЧЕРЕЗ КОРНЕВУЮ СИСТЕМУ**

Выводы

- Разработан способ получения меченных тритием гуминовых веществ с равномерным распределением метки по компонентам препарата. Для выбора оптимальных условий введения тритиевой метки в гуминовые вещества были проведены модельные эксперименты с индивидуальными веществами. Было установлено, что наилучшие условия для получения меченых гуминовых веществ с минимальным количеством побочных продуктов и равномерным распределением трития по компонентам препаратов создаются при давлении газа не выше 0.5 Па, времени реакции 10 секунд и температуре атомизатора от 1900 до 2000 К. Равномерность распределения трития по компонентам меченых препаратов гуминовых веществ подтверждена с помощью эксклюзионной хроматографии.
- Для очистки меченых препаратов гуминовых веществ от лабильной метки предложено использовать диализ через мембраны с размером пор MWCO 2000-12000 Да в фосфатном буфере при pH 6.8 в течение 30 суток при 40 С. Показано, что при использовании мембран с большим диаметром пор возможно обеднение препаратов низкомолекулярными фракциями, однако удельная радиоактивность препаратов оставалась при этом постоянной, что подтверждало равномерность распределения трития по компонентам препарата.
- Разработан новый вариант метода сцинтиллирующей фазы с целью его использования для определения гидрофобности и поверхностной активности гуминовых и гуминоподобных веществ. Достоверность получаемых результатов была подтверждена при исследовании меченных тритием аминокислот и поверхностно-активных веществ.

- С помощью метода сцинтиллирующей фазы определены коэффициенты распределения гуминовых веществ различного происхождения в системе толуол-вода, а также получены изотермы адсорбции гуминовых веществ на границе раздела вода-толуол. Найдена хорошая корреляция между коэффициентами распределения гуминовых веществ в системах вода-толуол и вода-октанол, что позволило построить шкалу гидрофобности, согласно которой гидрофобность гуминовых веществ увеличивается в следующем порядке: $\text{ФК почв} < \text{ГК почв} < \text{ГК торфа} \approx \text{ФК торфа} < \text{ГК угля}$. Получен ряд адсорбционной способности гуминовых веществ на границе вода-толуол, который выглядит следующим образом: $\text{ФК почв} < \text{ГК почв} < \text{ГК угля} < \text{ФК торфа} < \text{ГК торфа}$.
- Разработанные методики были использованы для получения меченного тритием биологически активного препарата лигфол (гуминоподобное вещество). Равномерность распределения трития по компонентам лигфола подтверждена с помощью эксклюзионной хроматографии. С помощью меченного тритием лигфола и метода сцинтиллирующей фазы были определены коэффициенты распределения лигфола между водой и толуолом, а также найдена величина адсорбции на границе раздела вода-толуол.
- С помощью жидкостного сцинтилляционного счета и автордиографии на примере бактерий *Escherichia coli* и растений мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L была показана возможность использования меченных тритием препаратов ГВ в биологических исследованиях, направленных на изучение поглощения и распределения сложных смесей органических веществ природного происхождения в живых организмах.

Автор выражает благодарность

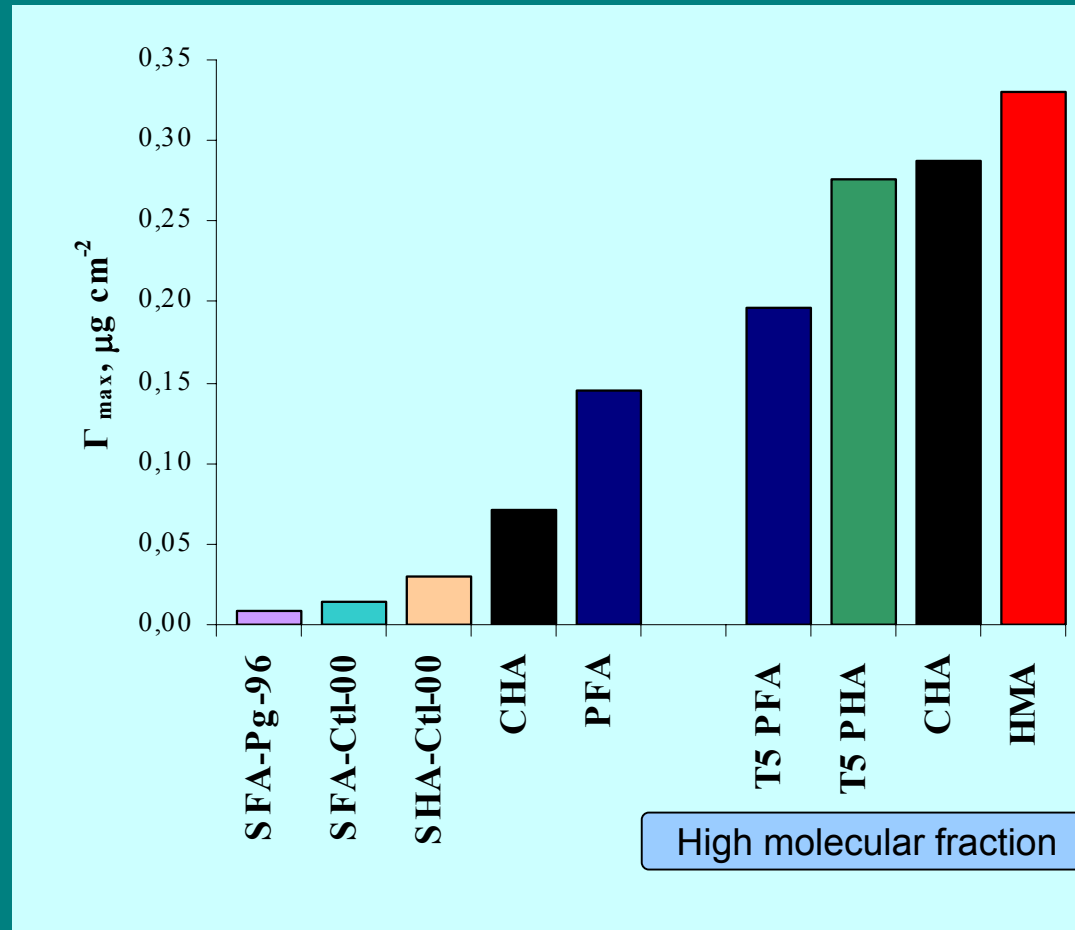
- своему научному руководителю к.х.н. Бадуну Г.А. и его научной группе
- профессору д.х.н. Федосееву В.М.
- д.х.н. Перминовой И.В. и ее научной группе
- к.х.н. Куликовой Н.А.
- к.х.н. Коробкову В.И.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

Характеристика ГВ

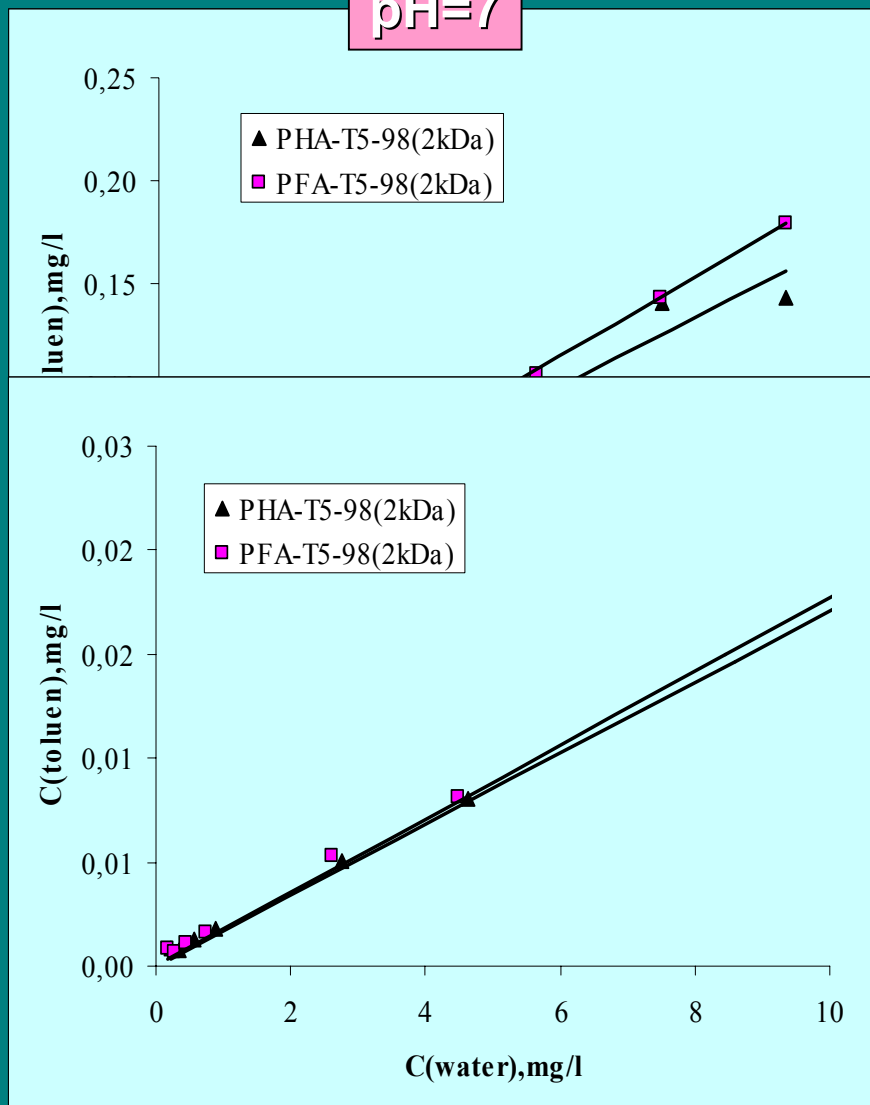
ГВ	Источник	Atomic ratio			KDa	13C-ЯМР
		H/C	O/C	N/C	M _p	CArC,H
CHA-Pow	Коммерческий препарат(леонардит)	0,87	0,50	0,02	20,0	49,9
CHM-Pow	Получен из коммер. препарата(леонардита)	0.82	0.49	0.07	18.0	42,6
CHM-G102	Торф(Арюна)	1,22	0,50	15	43,8	43,7
SHA-Ctl-00	Гор. А чернозема типичного (Липец. обл.)	0,79	0,35	0.07	15,1	40,8
SFA-Ctl-00	гор. А чернозема типичного (Липец. обл.)	0,81	0,52	0.06	11,3	
SFA-Pg-96	гор. А дерново подзолистой почвы (Московская обл.)	0,88	0,61	0.05	11,1	28,2
PHA-Sk3-00	торф (оз. Сахтыш, Ивановская обл.)	1,15	0,66	0.06	14,2	29,2
PFA-Sk3-00	торф (оз. Сахтыш, Ивановская обл.)	1,18	0,89	0.04	8,2	
PHA-T5H-98	сфагновый торф (Тверская обл.)	0,93	0,50	0,02	32,2	32,2
PFA-T5H-98	сфагновый торф (Тверская обл.)	1,02	0,67	0,04	15,4	24,3

Максимальное значение адсорбции ГВ на границе раздела толуол-вода.

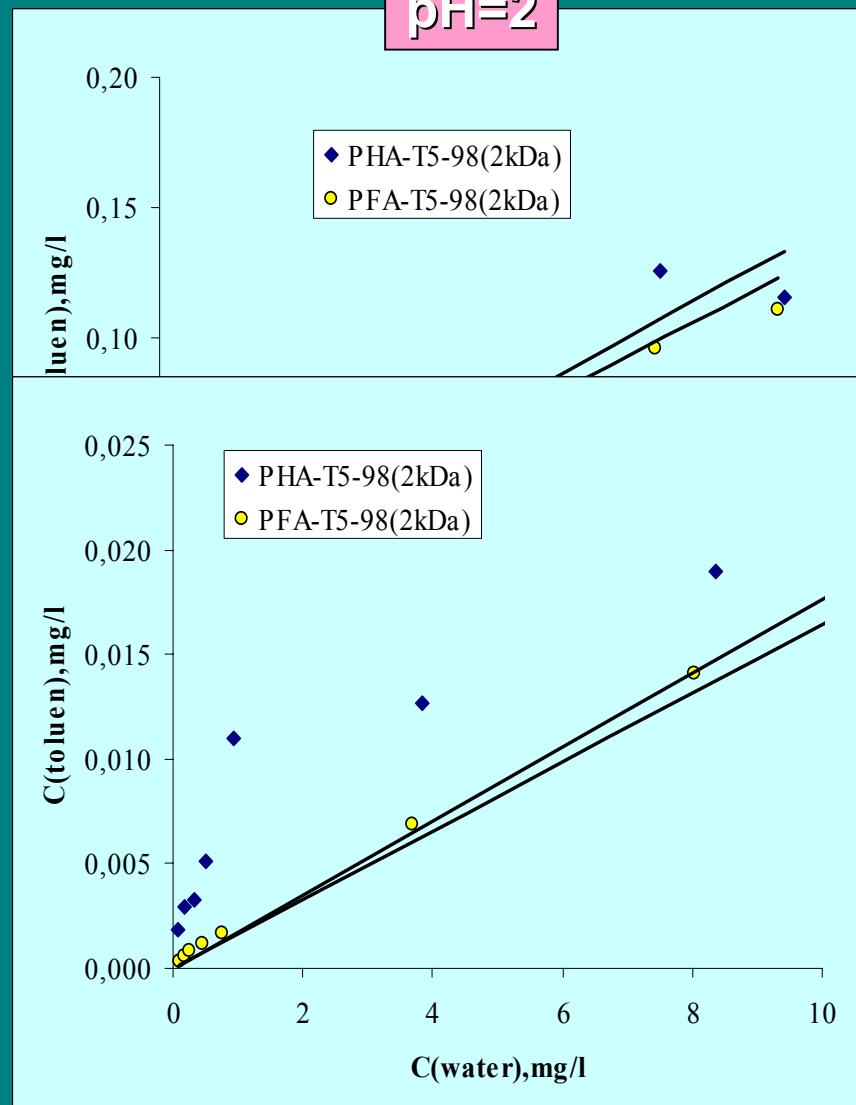


Зависимость равновесной концентрации ГВ торфа в орг.фазе от их концентрации в водной фазе (pH=7и pH=2).

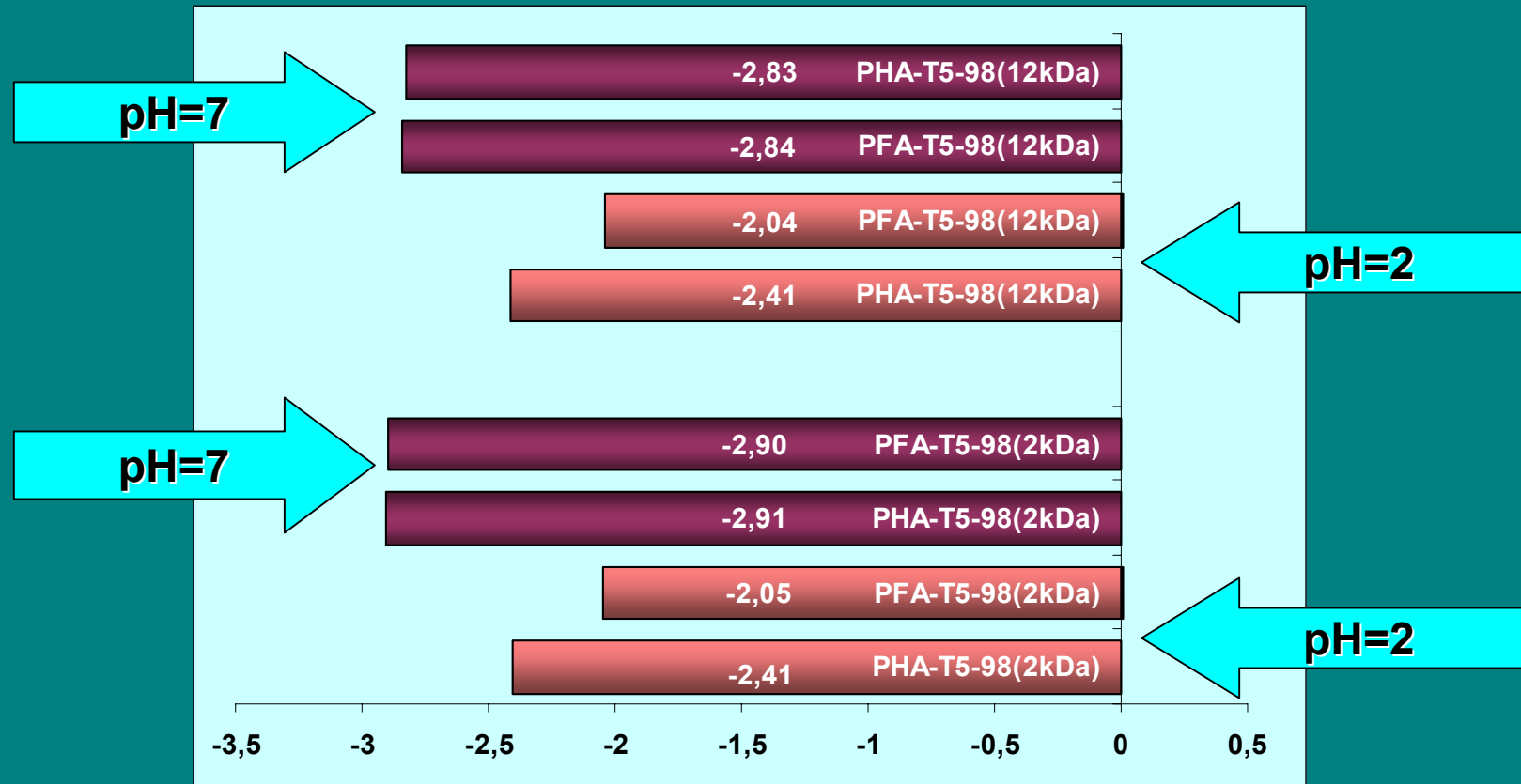
pH=7



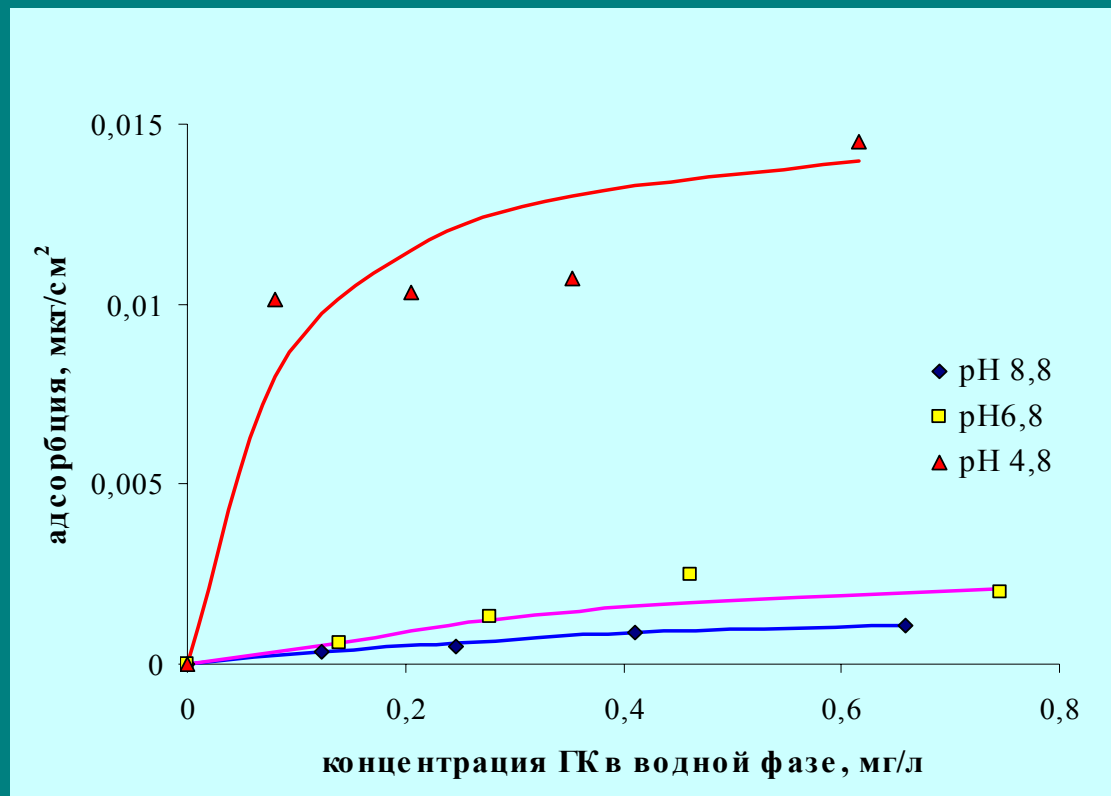
pH=2



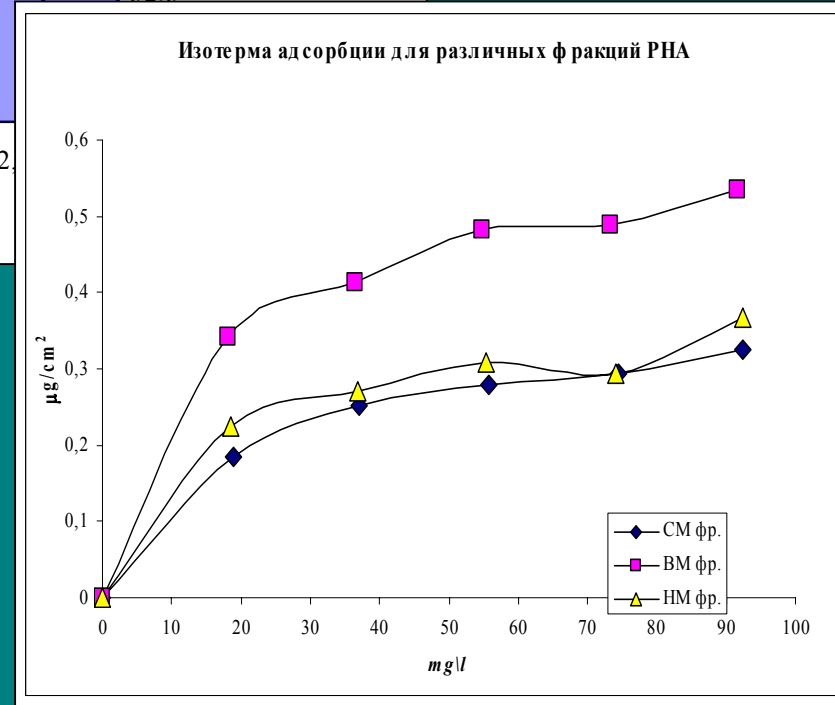
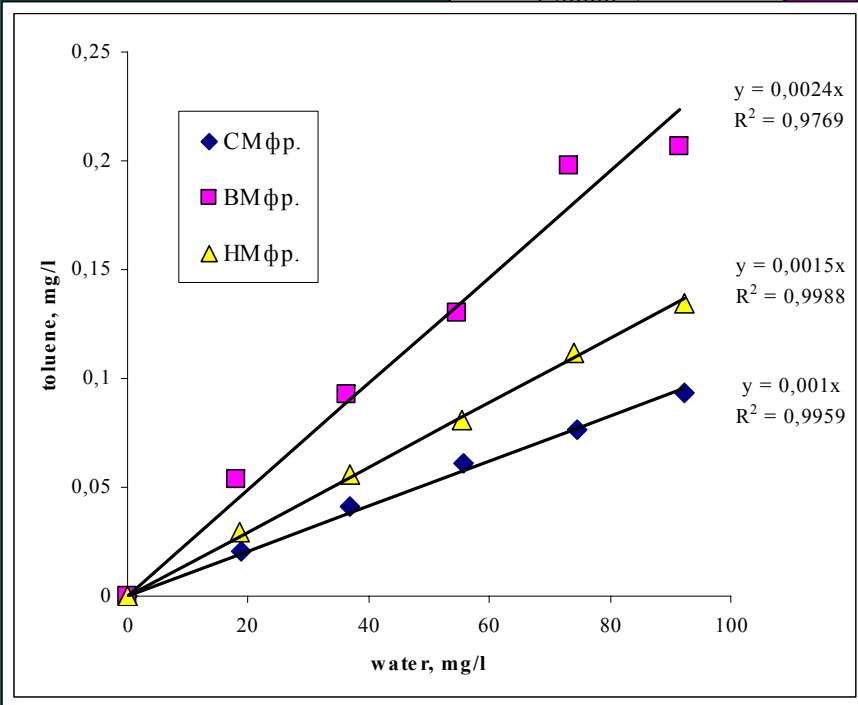
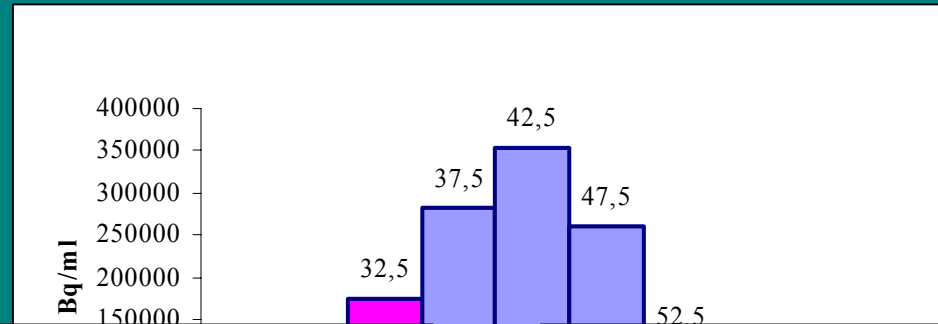
Коэффициенты распределения PFA-T5-98 и PHA-T5-98, очищенных через мембраны с порами 2kDa и 12kDa при pH=2 и 7.



Изотерма адсорбции SFA-Pg-96 на границе вода-толуол при pH=4,8-8,8 водного буфера.



Двухфазный эксперимент с разными фракциями препарата РНА Sk03



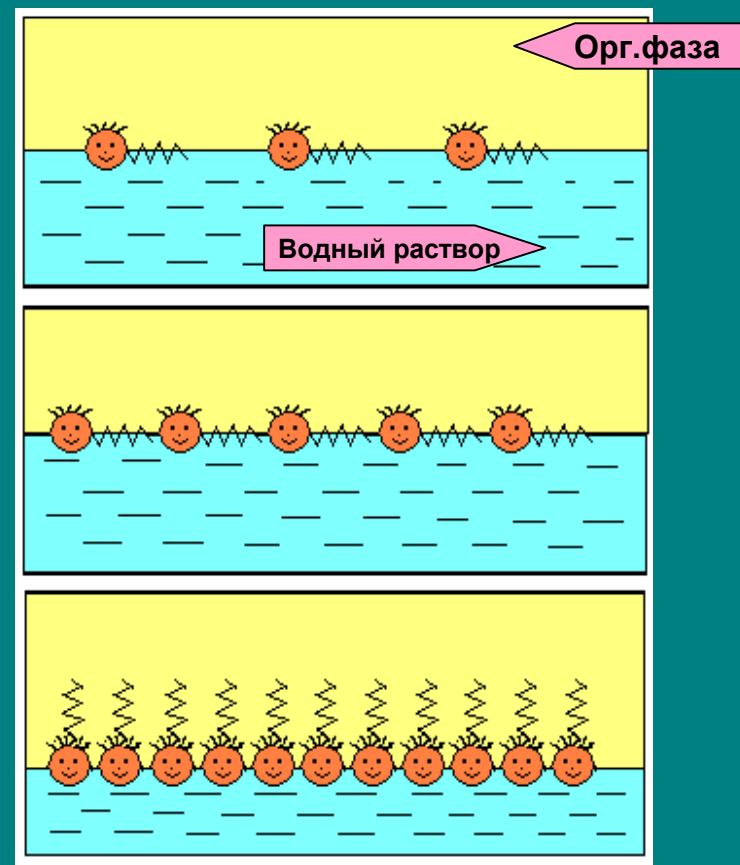
➤СТАВ

*Коэффициент распределения
СТАВ в системе толуол-вода
при концентрации ПАВ
в воде $2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$
 $D=0,019 \pm 0,002$*

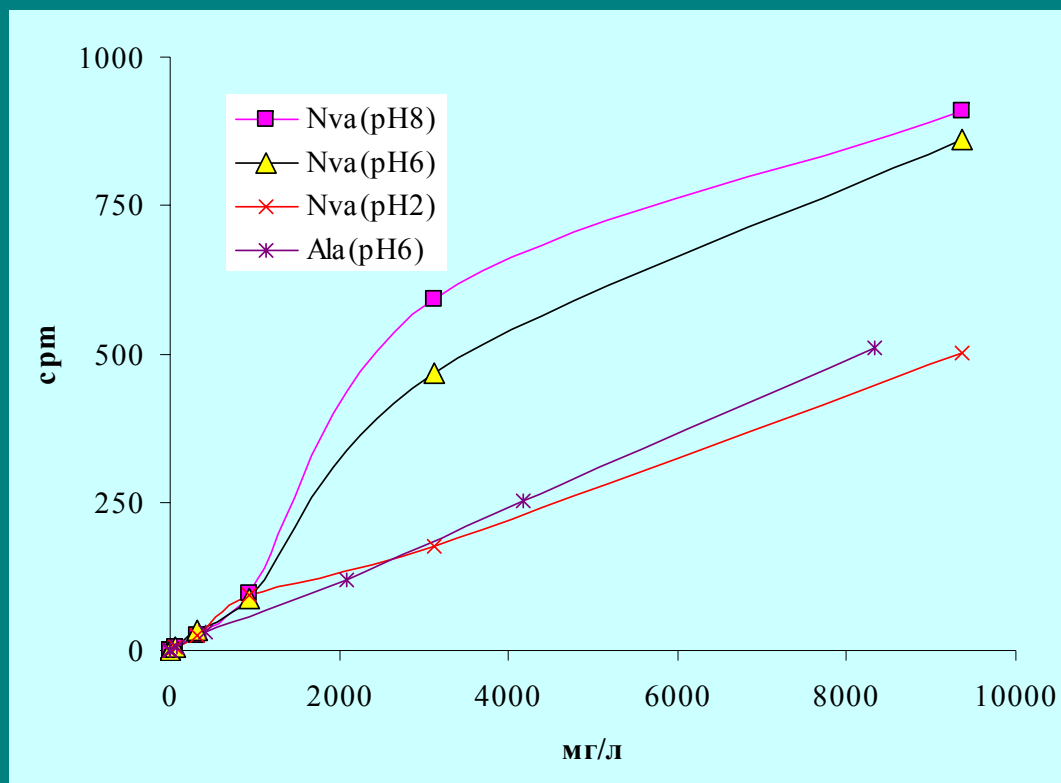
При $C(\text{СТАВ})=0,17 \text{ мкМ}$
Толщина слоя $0,26 \text{ \AA}$

При $C(\text{СТАВ})=0,03 \text{ мМ}$
Толщина слоя 2 \AA
 $0,9$ молекулярных слоя

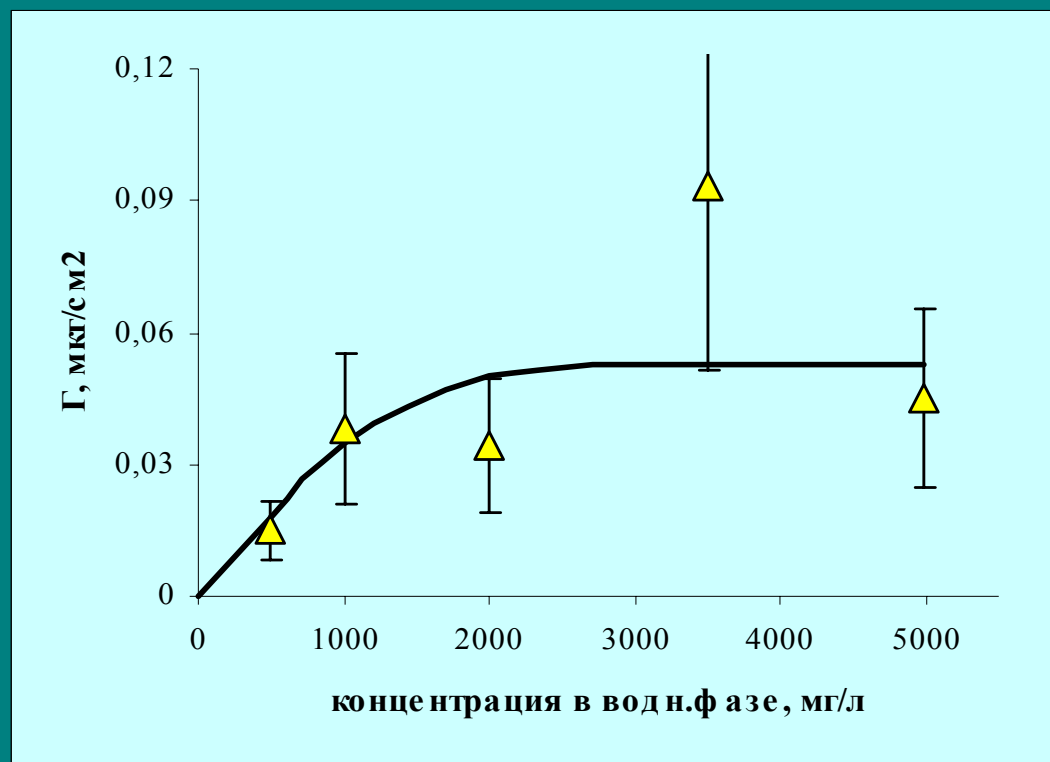
При $C(\text{СТАВ})=0,43 \text{ мМ}$
Толщина слоя $14,3 \text{ \AA}$
 $0,96$ молекулярных слоя



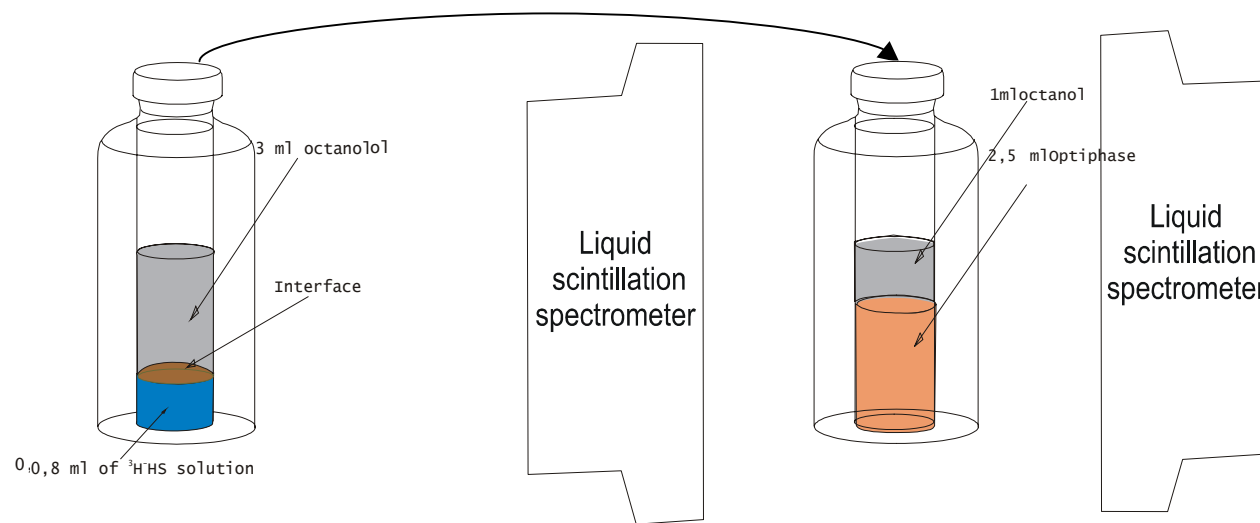
Зависимость скорости счета с границы раздела фаз от концентрации аминокислоты в водной фазе.



Изотерма адсорбции норлейцина (pH=6).



Определение октанольно-водного коэффициента



Зависимость концентрации ГВ в октаноле от времени выдерживания

