

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

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

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

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

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

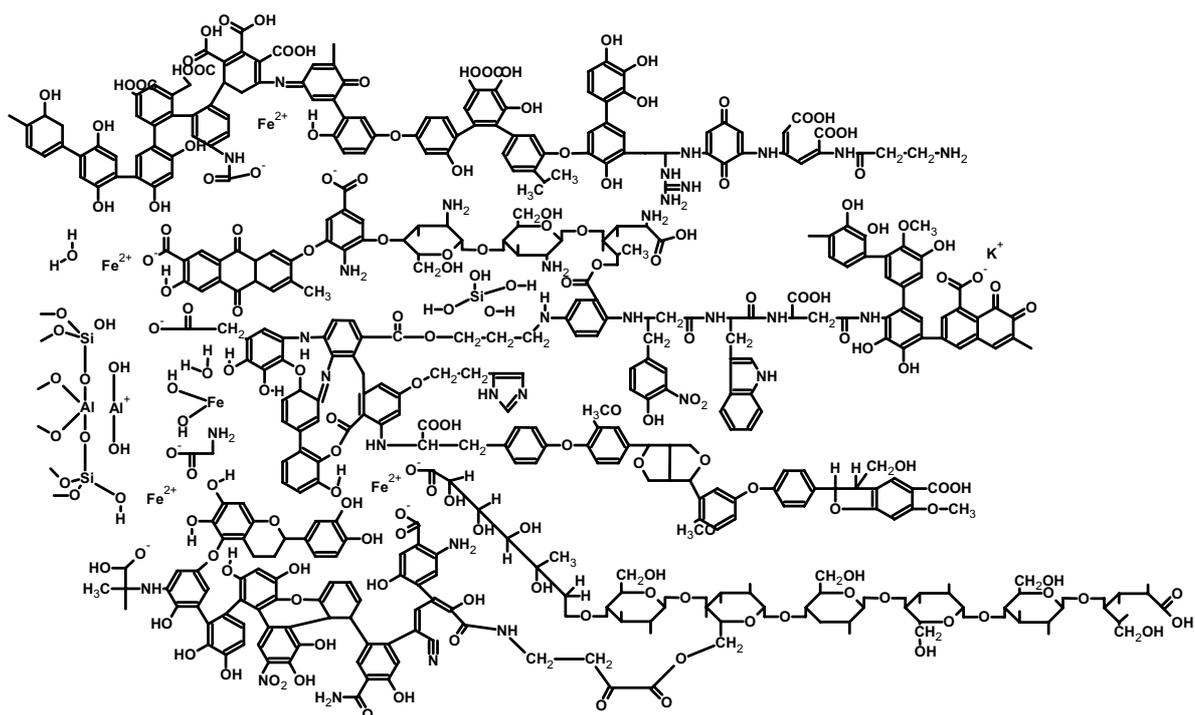


Рис. 1.1. Гипотетический структурный фрагмент гумусовых кислот почв [Kleinhempel, 1970].

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

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

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

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

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

характеристик взаимодействия гумусовых кислот с различными экотоксикантами.

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

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

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

1.1 Элементный состав гумусовых кислот

1.1.1 Элементный состав гумусовых кислот различного происхождения

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



где M – ионы металлов,

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.1.2 Методические аспекты элементного анализа гумусовых кислот

Определение CHN и S. Для определения C, H, N в гумусовых кислотах, как правило, используют метод автоматического полумикроанализа, позволяющего определять содержание всех трех элементов из одной навески 1.5-2 мг [Huffman et al., 1985]. Процесс определения можно схематично разбить на три стадии: окислительный пиролиз образца при 950-1100°C, разделение продуктов пиролиза (CO₂, H₂O и N₂) и их детектирование [Kuwatsuka, 1978].

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Для определения влажности вторым методом образец гумусовых кислот высушивают при повышенной температуре (40-60°C) над P_2O_5 до постоянного веса или вакуумируют при нагревании до тех же температур в течение длительного времени (~24 часа), регистрируя потерю веса [Huffman et al., 1985]. Применяют этот метод и в несколько модифицированном виде. После тщательного высушивания образец экспонируют атмосферной влаге, и регистрируют зависимость набора веса образца от времени [Abbt-Braun et al., 1990]. Экстраполируя график данной зависимости на момент времени $t = 0$, определяют вес абсолютно-сухого образца. По разности между весом воздушно- и абсолютно-сухого образца находят его влажность.

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

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

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

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

1.2 Структурно-групповой состав гумусовых кислот

1.2.1 Функциональный состав гумусовых кислот

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

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

Таблица 1.2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Таблица 1.3

Функциональный состав гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава

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

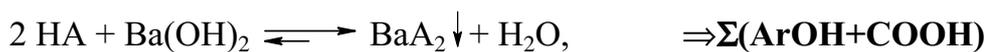
Группы	Метод определения		Содерж., ммоль/г	Литература
	реагент	колич. метод		
ФК почв				
COOH+ ArOH	CH ₂ N ₂ Ba(OH) ₂	Цейзеля Титрование	5.3-5.8 9-14	Драгунов, 1951 Stevenson, 1982 Schnitzer and Gupta, 1965
ArOH+R OH	Ac ₂ O+Py	Титрование	6.7-10	Wright and Schnitzer, 1959
ФК поверхностных вод				
COOH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

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

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

1.2.2 Методические аспекты титриметрического анализа гумусовых кислот

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



(A – кислотный остаток гумусовых кислот)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Модель химических реакций

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

Модель смеси одноосновных кислот

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

получаемых значений зависит от адекватности использованной математической модели.

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

1.2.3 Исследование структурно-группового состава углеродного скелета деструктивными методами анализа

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

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

Таблица 1.4

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2.4 Исследование структурно-группового состава гумусовых кислот методами спектроскопии ЯМР

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

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

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

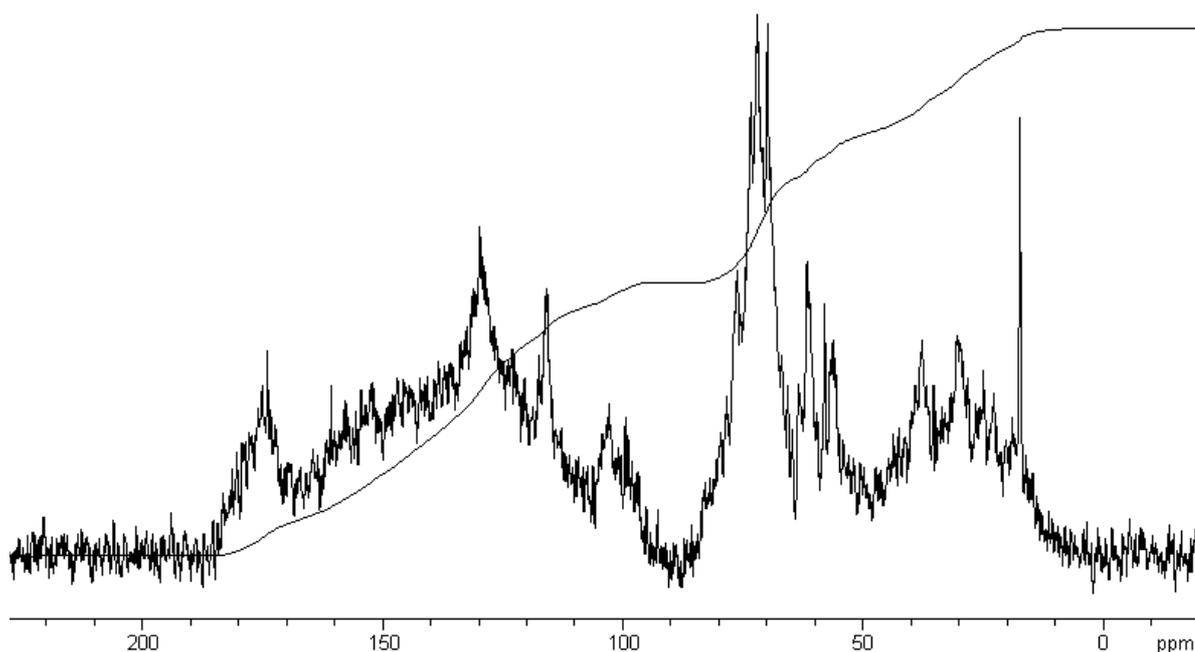


Рис. 1.2. Типичный ^{13}C ЯМР спектр ГК почв.

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

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

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

Таблица 1.5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Таблица 1.7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

где t – время,

M_0 – равновесное значение намагниченности спиновой системы.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

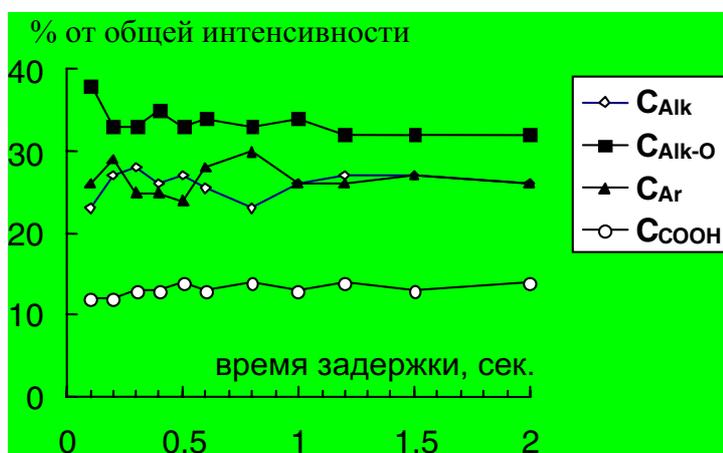


Рис. 1.3. Влияние времени задержки на интенсивность спектральных диапазонов в спектре ^{13}C ЯМР гумусовых кислот. [Preston, 1985].

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

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

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

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

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

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

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

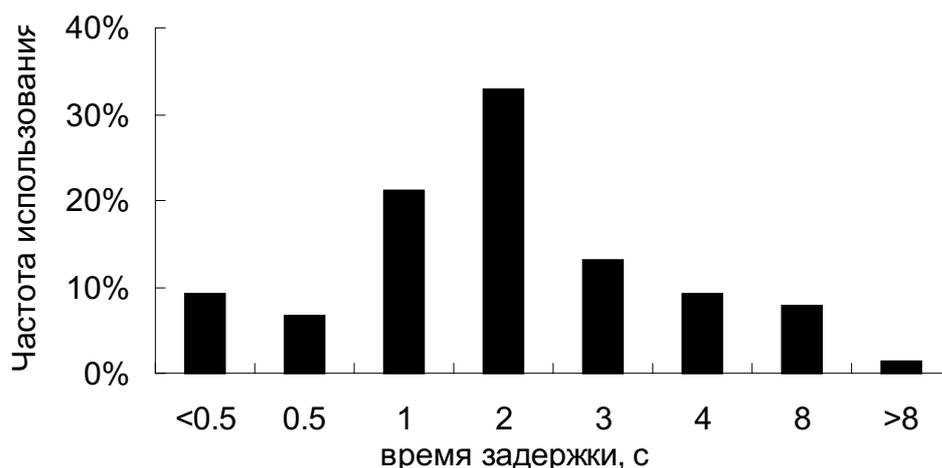


Рис. 1.4. Статистика использования различных времен в ^{13}C ЯМР гумусовых кислот задержки в 56 работах (1984-1999 г.г.).

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

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

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

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

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

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

Таблица 1.9

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

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

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

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

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

Твердофазная спектроскопия ^{13}C ЯМР гумусовых кислот.

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5 Спектроскопия ПМР гумусовых кислот

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

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

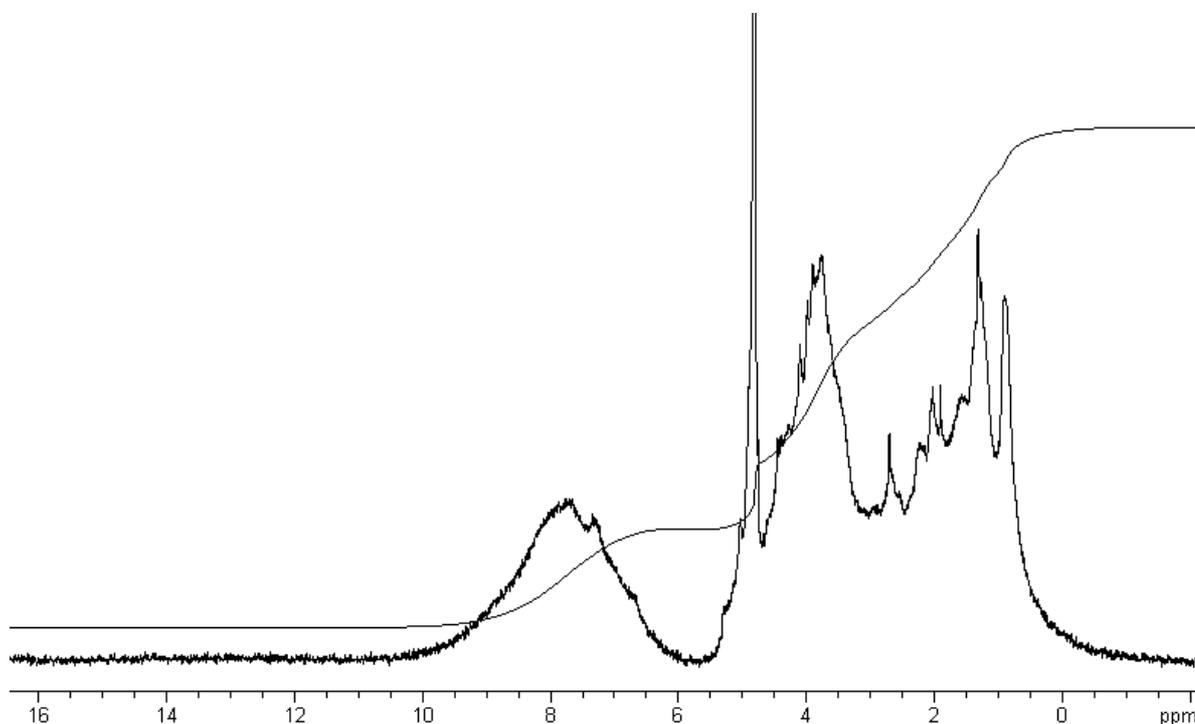


Рис. 1.5. Спектр ПМР ГК почв. Растворитель 0.1 М NaOD/D₂O.

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

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

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

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

В водных растворах происходит быстрый в шкале времени ЯМР обмен подвижных протонов с дейтерием воды, все их сигналы сливаются с пиком Н₂O (около 4.6 м.д.). В связи с этим невозможно не только отдельное, но и суммарное их определение [Humic substances in the Suwannee river, 1994]. Поэтому авторы определяют только распределение С-Н протонов в молекулах гумусовых кислот. Имеющиеся данные для препаратов различного происхождения обобщены в табл. 1.10.

Таблица 1.10

Распределение скелетных протонов в структуре гумусовых кислот различного происхождения

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В работах [Кушнарев, 1997; Kanitskaya, 1996a; Kanitskaya, 1996b] было выполнено определение количеств COOH - и фенольных OH -групп в продуктах гидролиза лигнинов, основанное на сопоставлении их ПМР спектров в гексаметилфосфортриамиде- d_{18} (ГМФА) и дейтерохлороформе. Согласно приводимым данным, использование ГМФА в качестве растворителя позволяет разделить сигналы фенольных гидроксильных и ароматических протонов в спектрах гидролизатов лигнина. Однако, данный метод не может быть напрямую применен к анализу гумусовых кислот в связи с нерастворимостью последних в хлороформе и ограниченной растворимостью в ГМФА.

Второй серьезной проблемой осуществления количественной интерпретации ПМР спектров гумусовых кислот является присутствие сигнала остаточных протонов растворителя, который даже при использовании растворителей высокой чистоты обычно является самым интенсивным пиком в спектре. При использовании как $\text{NaOD}/\text{D}_2\text{O}$, так и $\text{DMSO}-d_6$, пик остаточных протонов растворителя закрывает часть сигналов протонов гумусовых кислот. Пик остаточных протонов DMSO накладывается на сигналы протонов гумусовых кислот в алифатической области спектра, а широкий сигнал HDO в $\text{NaOD}/\text{D}_2\text{O}$ спектре закрывает некоторую часть сигналов карбогидратных протонов. В связи с этим невозможно количественное определение C-H протонов указанных типов.

Широко используемым приемом для решения данной проблемы является подавление сигнала HDO в ПМР спектрах гумусовых кислот в $\text{NaOD}/\text{D}_2\text{O}$ при помощи облучения дополнительным узкополосным импульсом на соответствующей частоте. При этом крайне важно тщательно подбирать интенсивность облучения, так как при избыточной мощности импульсов возникают значительные искажения базовой линии. Основным недостатком использования такой методики является то, что вместе с сигналом растворителя частично происходит подавление сигналов протонов гумусовых кислот, находящихся вблизи частоты облучения. По данным [Wilson, 1987, Steelink, 1987] недоопределение карбогидратных протонов гумусовых кислот при подавлении пика HDO может составлять 5-15% отн. Тем не менее, данная методика получило широкое распространение при регистрации спектров гумусовых кислот в $\text{NaOD}/\text{D}_2\text{O}$. В спектрах ПМР гумусовых кислот в $\text{DMSO}-d_6$ подавление пика растворителя не может быть рекомендовано в связи с наличием достаточно интенсивных сигналов гумусовых кислот в области 2-3 м.д.

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

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

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

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

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

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

1.6 Молекулярно-массовый состав гумусовых кислот

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

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

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

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

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

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

Средняя ММ выражается уравнением:

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

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

$$M_z > M_w > M_n,$$

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

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

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

1.6.1 Исследование молекулярно-массового распределения гумусовых кислот методом эксклюзионной хроматографии

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

Молекулярные массы гумусовых кислот различного происхождения, определенные методом эксклюзионной хроматографии

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

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

¹ в работе приведены значения пиковых ММ.

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

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

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

1.6.2 Методические аспекты определения молекулярных масс гумусовых кислот методом эксклюзионной хроматографии

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

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

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

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

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

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

1.7 Описание строения гумусовых кислот и проблемы классификации

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

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

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

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

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

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

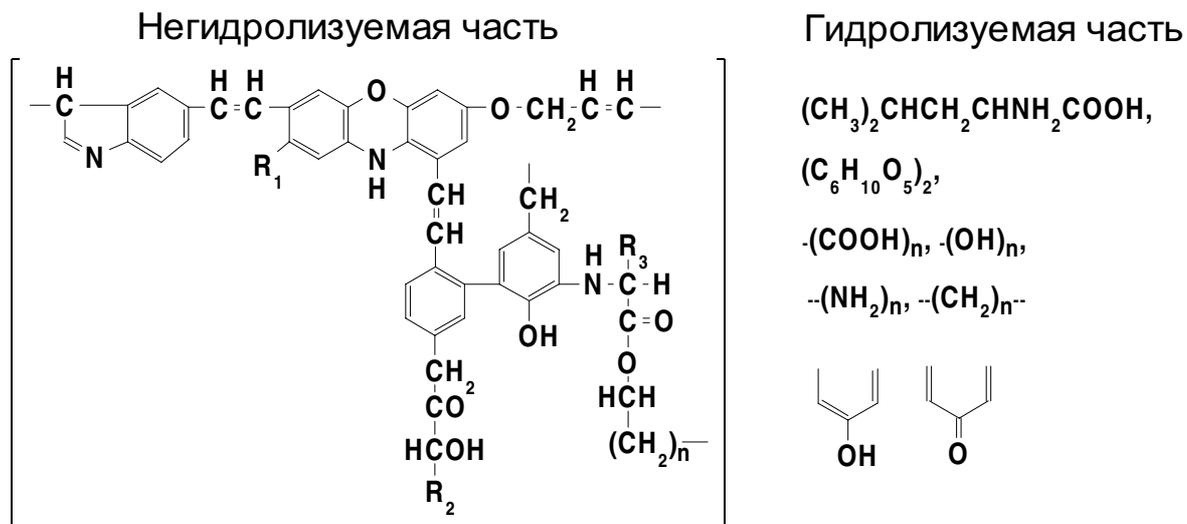


Рис. 1.6. Структура структурной ячейки ГК почв [Орлов, 1990].

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

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

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

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

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

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

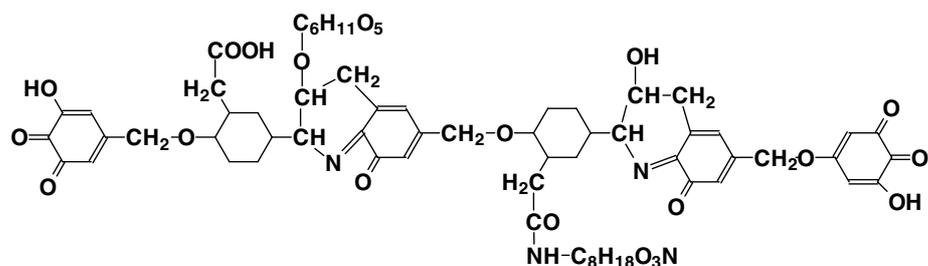


Рис. 1.7. Строение молекулы ГК почв (по Драгунову) (цит по [Ziechmann, 1988]).

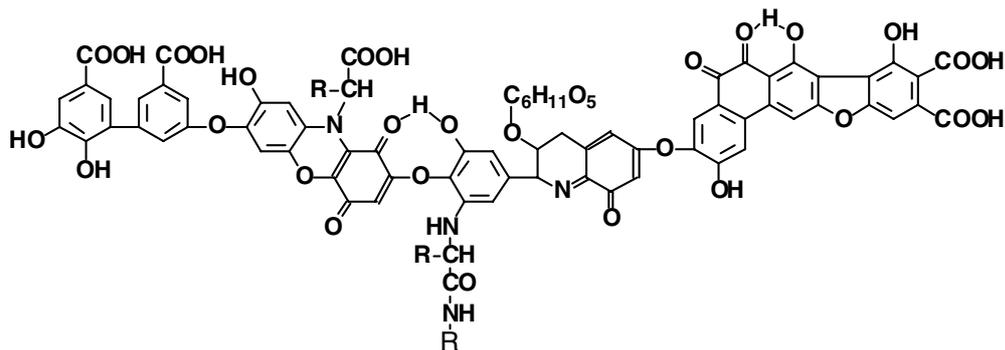


Рис. 1.8. Строение молекулы ГК почв [Stevenson, 1982].

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

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

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

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

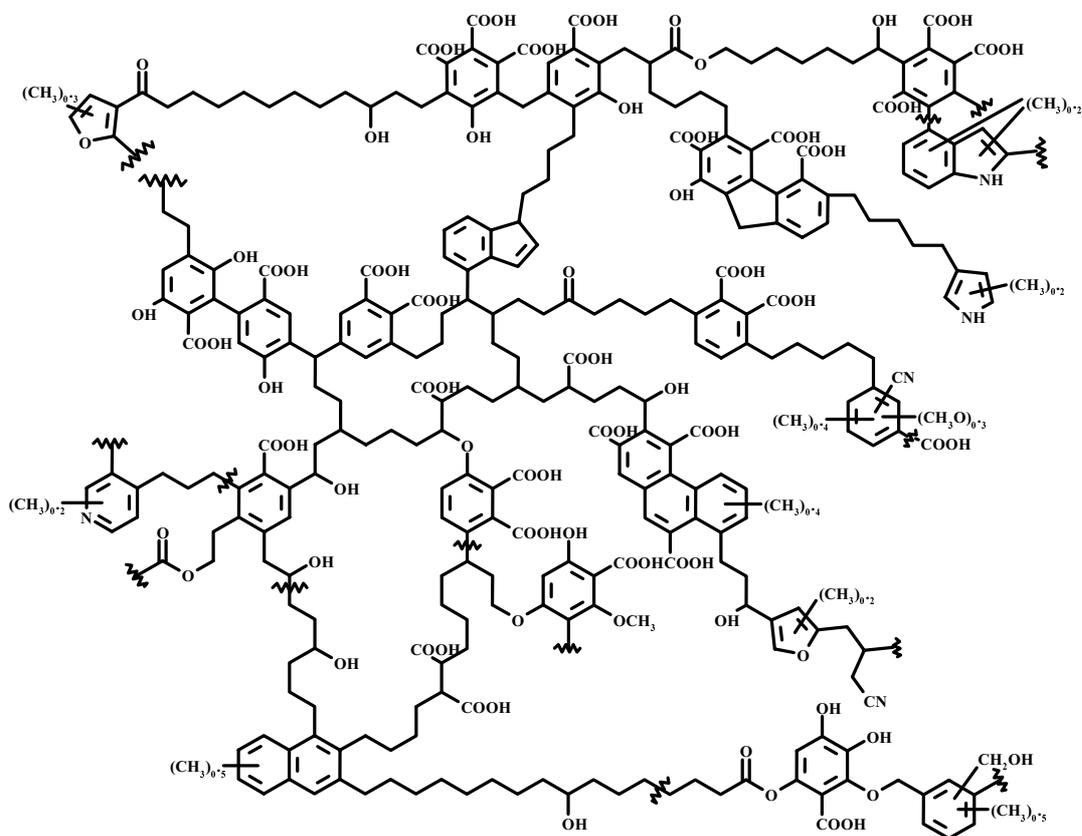


Рис. 1.9. Строение негидролизуемой части молекулы ГК почв [Schulten, 1994].

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

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

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

1.7.2 Численное описание строения гумусовых кислот

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

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

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

При этом

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

где в квадратных скобках приведены равновесные молярные концентрации соответствующих компонентов.

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

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

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

1.8.1 Подходы к описанию стехиометрии взаимодействия гумусовых кислот с тяжелыми металлами

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.8.2 Установление концентрации металлсвязывающих центров в растворах гумусовых кислот

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

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

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

Для полного описания системы необходимо ввести уравнения материального баланса:

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

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

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

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

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

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

Таблица 1.12

Содержание МСЦ в различных препаратах ГФК

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

*Максимальная комплексообразующая способность

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

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

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

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

Кислотно-основные равновесия с участием ГФК выражаются уравнением:



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

уравнение имеет вид

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

где

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

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

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

1.8.4 Методы исследования комплексообразования гумусовых кислот с тяжелыми металлами

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

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

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

Экспериментальные методы исследования комплексообразования
гумусовых кислот с тяжелыми металлами

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

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

** Включая обращенно-фазовую и гель-фильтрацию

*** Атомно-абсорбционная спектроскопия

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

1.8.5 Комплексообразование гумусовых кислот с Hg(II)

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

будут подробно рассмотрены только процессы комплексообразования и восстановления.

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

Таблица 1.14

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.9.1 Связывание органических экотоксикантов гумусовыми кислотами

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



Количественной характеристикой такого взаимодействия является константа связывания:

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

где $[\text{ЭТ-ГФК}]$ – равновесная концентрация молекулярного аддукта ЭТ-ГФК; $[\text{ГФК}]$ и $[\text{ЭТ}]$ – равновесные концентрации свободнорастворенных ГФК и ЭТ, соответственно.

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

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

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

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

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

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

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

Таблица 1.15

Константы связывания ПАУ гумусовыми кислотами, определенные различными методами

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

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

Таблица 1.16

Константы связывания (K_{OC}) атразина гумусовыми кислотами

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

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

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

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

1.9.2 Методические аспекты определения констант связывания органических экотоксикантов гумусовыми кислотами

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.9.3 Исследование детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к органическим экотоксикантам

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

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

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

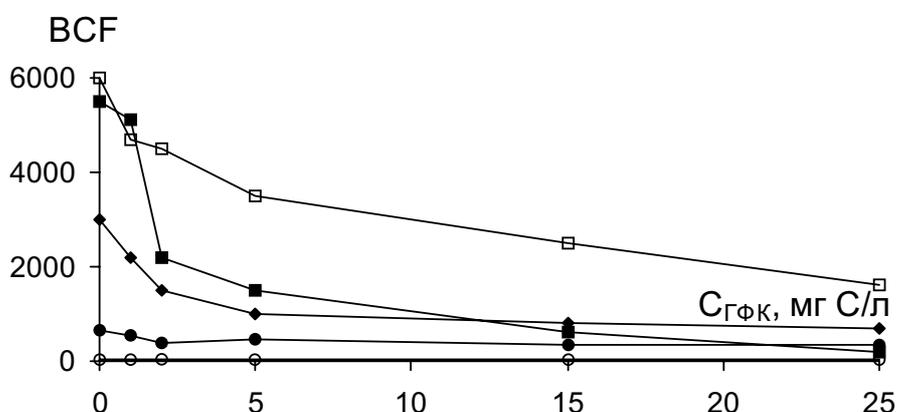


Рис. 1.10. Коэффициенты биоаккумуляции некоторых ПАУ в присутствии ГК Aldrich (тест-объект – дафнии): ■ – бенз(а)пирен, ◆ – бензантрацен, ● – антрацен, ● – нафталин; □ – бенз(а)пирен в присутствии РОВ торфяных болот. По данным [McCarthy, 1985].

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

тринитрофенола в присутствии низкомолекулярных водорастворимых гумусовых кислот.

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

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

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

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

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

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