

Глава 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-МАССОВОГО СОСТАВА ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ

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

5.1 Выбор оптимальных условий анализа

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

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

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

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

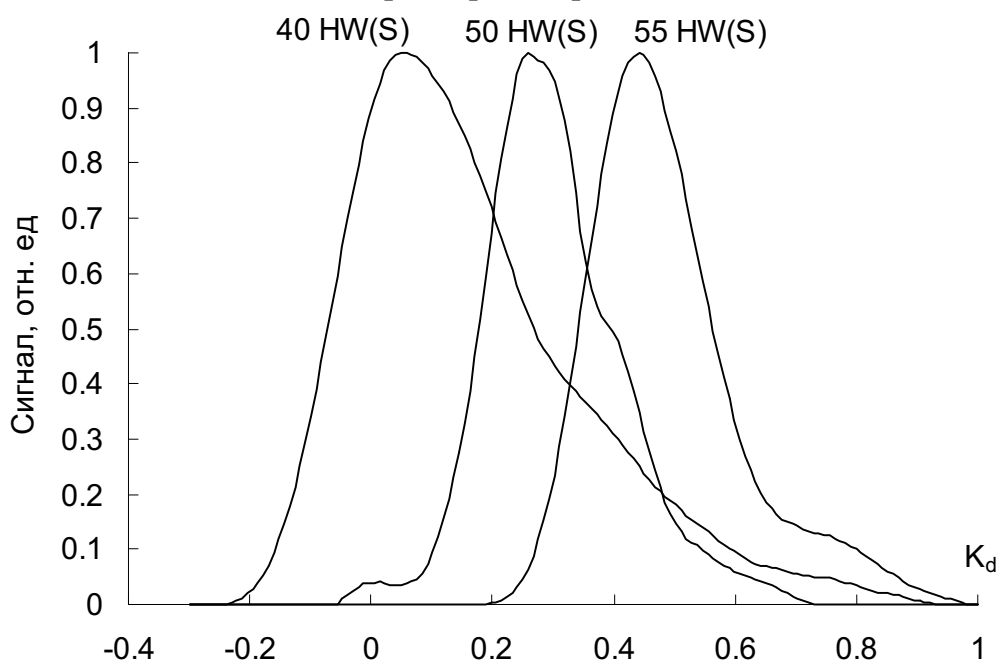


Рис. 5.1. Кривые элюирования препарата АНФ-*RMX2*, полученные на колонках, заполненных гелем *Toyopearl* с различным размером пор.

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

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

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

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

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

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

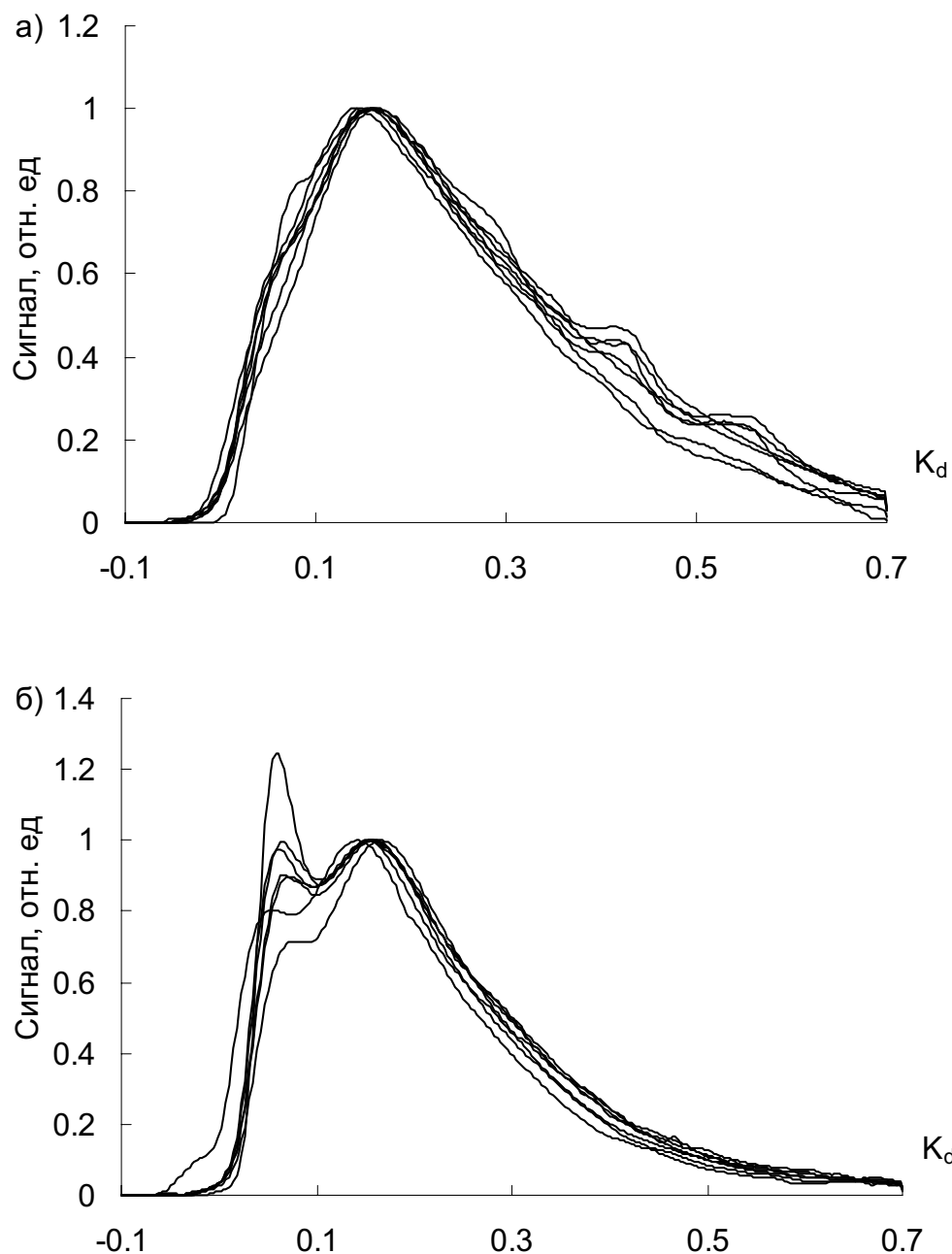


Рис. 5.2. Кривые элюирования, полученные в нескольких повторностях на колонках разного размера (гель – *Toyopearl HW50S*) в течение года для препарата *PHF-TNH94*. Детекция $C_{орг}$ (а) и УФ (б).

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

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

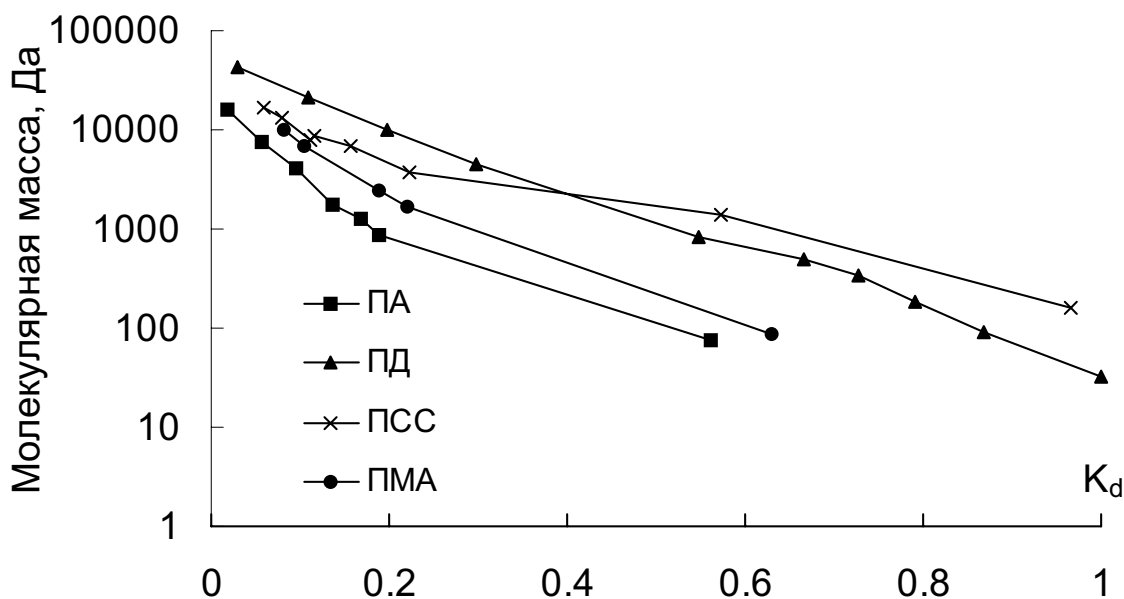


Рис. 5.3. Калибровочные кривые для колонки заполненной *Toyopearl HW50S*, полученные с использованием в качестве образцов сравнения полидекстранов (ПД), полиакрилатов (ПА), полиметакрилатов (ПМА) и полистиролсульфонатов (ПСС).

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

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

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

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

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

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

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

5.2 Обоснование выбора образца сравнения для определения молекулярных масс гумусовых кислот

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

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

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

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

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

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

График соответствующий регрессионной зависимости показан на рис. 5.4.

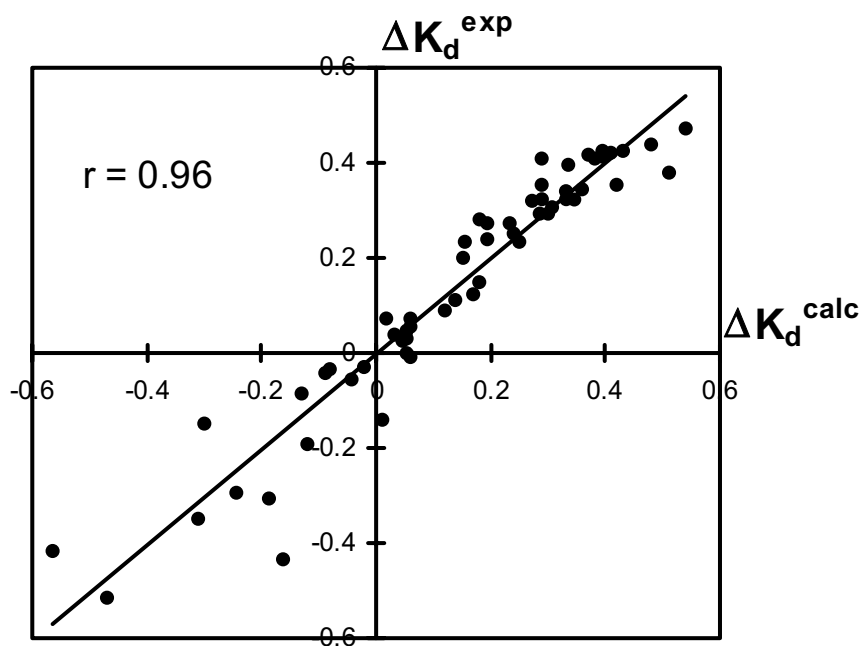


Рис. 5.4. Корреляционная взаимосвязь рассчитанных по уравнению (5.3) ΔK_d^{calc} и экспериментально найденных ΔK_d^{exp} для набора индивидуальных органических соединений (список в Приложении 5.1)

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

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

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

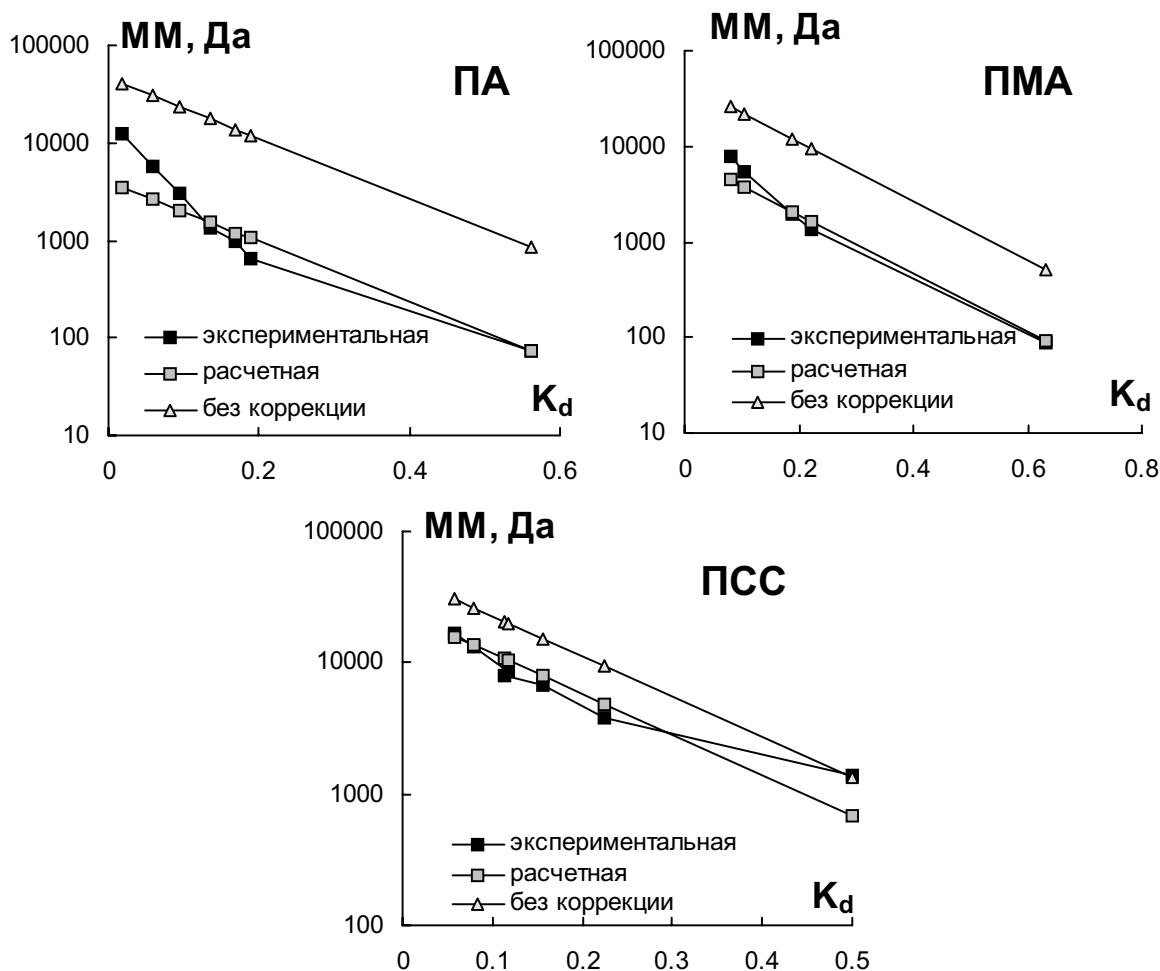


Рис. 5.5. Калибровочные зависимости для модельных полиэлектролитов, найденные экспериментально, и рассчитанные с помощью соотношения (5.3).

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

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

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

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

5.3 Характеристика молекулярно-массового состава исследованных препаратов гумусовых кислот

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

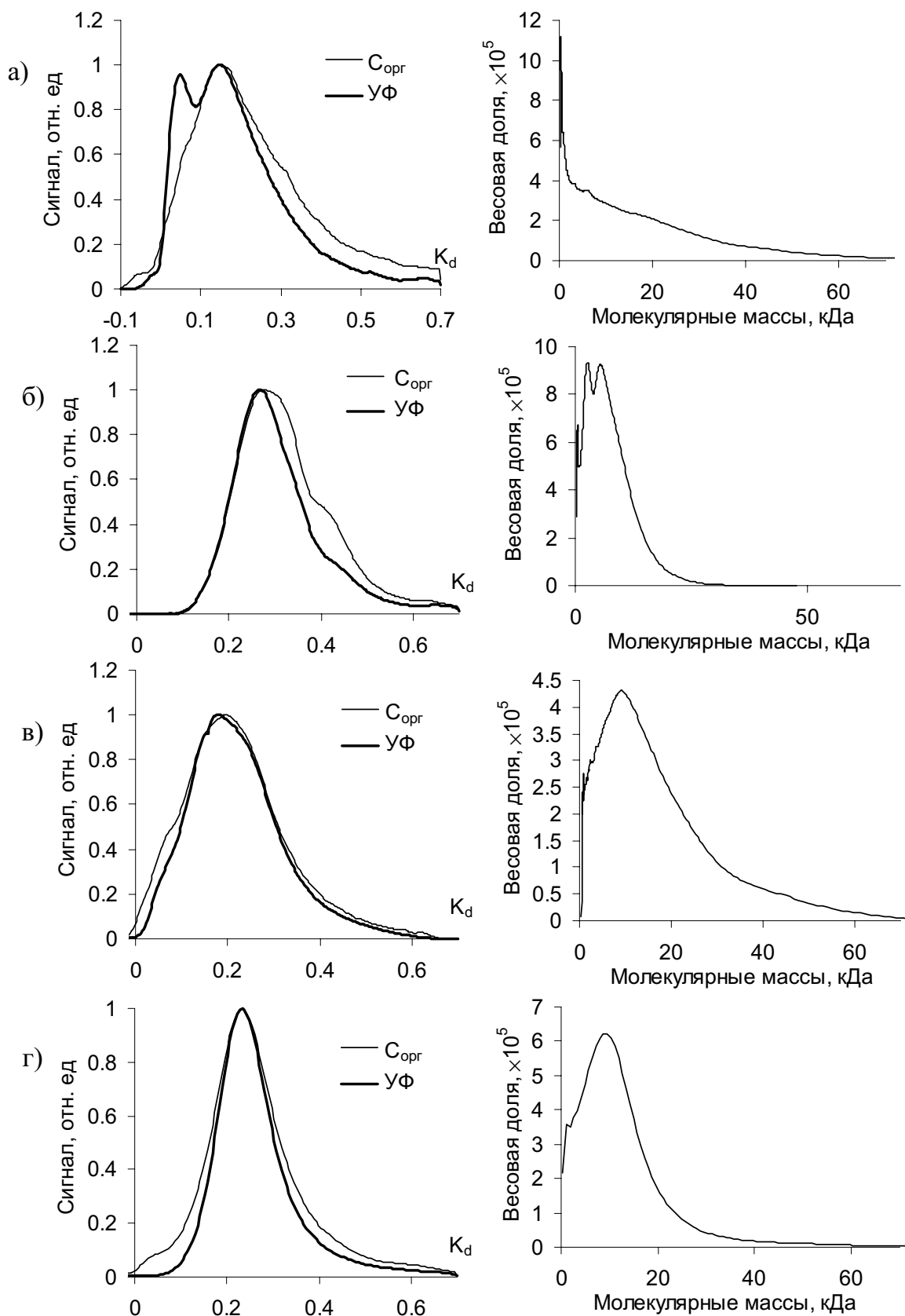


Рис. 5.6. Типичные кривые элюирования и соответствующие им кривые ММР для препаратов гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава: ГФК торфа (а), ГФК вод (б), ГК почв (в) и ФК почв (г).

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

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

Таблица 5.2

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

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

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

*Препарат с небольшой примесью гидролизованной ДЭАЭ-целлюлозы

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

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

Объединенная выборка (n = 27)										
M_n	5.4	5.0	3.1	9.0	4.6	6.0	2.2	0.750	0.231	–
M_w	15.8	17.1	7.0	22.2	11.0	19.2	22.6	–0.381	–1.040	–
M_z	27.9	30.0	11.7	39.2	21.4	34.0	56.0	–0.594	–0.567	–
M_p	16.7	16.4	6.1	32.0	10.0	22.1	50.8	0.330	–0.689	–
M_w/M_n	3.0	2.7	2.1	4.0	2.4	3.6	0.4	0.322	–1.274	–
M_z/M_w	1.8	1.7	1.5	2.6	1.6	1.8	0.1	1.807	2.856	–
ε^*	0.063	0.060	0.030	0.117	0.048	0.077	0.0004	0.73	0.62	–

\bar{x} , X_{\min} , X_{\max} и Med – средние, мин. и макс. значения и медиана, соответственно. Q_{25} и Q_{75} – нижние и верхние квартили, A – коэффициент асимметрии, E – эксцесс.

Как видно из полученных данных, вопреки весьма распространенному мнению о том, что ММ гумусовых кислот варьируют от сотен до сотен тысяч Дальтон [De Nobili and Gjessing, 1989], весь диапазон изменения M_w исследованных препаратов гумусовых кислот различного фракционного состава и происхождения составил от 7000 до 22200 Да, а M_w/M_n – от 2.1 до 4.0. При этом по величине M_w препараты расположились в следующий ряд: водные ГФК < почвенные ФК < почвенные ГК < ГФК торфа. По полидисперсности ряд был несколько иной: почвенные ФК < почвенные ГК \cong водные ГФК < ГФК торфа. Легко заметить, что процедура фракционирования препаратов на ФК и ГК существенно снижает их полидисперсность, в то время как исходные экстракты характеризуются высокой полидисперсностью (5 и выше). Этот показатель существенно ниже для гумусовых кислот вод, макромолекулы которых практически не содержат включений полисахаридных фрагментов. Как следствие, их распределение по ММ гораздо уже, чем торфа – полидисперсность препаратов составляет, в среднем, 3.2.

Установив ММР препаратов гумусовых кислот, рассчитывали распределение ε^* по ММ. Задача осложнялась тем, что в использованной хроматографической системе отклик УФ-детектора регистрировался не в единицах оптической плотности, а в Вольтах. Поэтому в качестве первого этапа необходимо было определить “постоянную ячейки”. Для этой цели использовали хроматограммы низкомолекулярных индивидуальных соединений, зарегистрированные при той же длине волны, что и для гумусовых кислот – 254 нм и в кювете с такой же длиной оптического пути – 1 см. Рассчитывали площадь под УФ-хроматограммой, относили ее к площади под С-хроматограммой, пересчитанной в массовую концентрацию

анализируемого вещества с помощью соответствующей калибровки по гидрофталату калия (мг С/л), а затем соотносили полученную величину ($I_{УФ}/I_{Сорг}$) с экспериментально измеренным ϵ^*_{exp} . Последний определяли как отношение оптической плотности раствора индивидуального соединения в 0.028 М фосфатном буфере, измеренной на спектрофотометре при $\lambda = 254$ нм и $l = 1$ см, к его массовой концентрации (мг С/л). Список использованных индивидуальных соединений, соответствующие ϵ^*_{exp} при 254 нм и график для расчета “постоянной ячейки” приведены в Приложении 5.4. Рассчитанная “постоянная ячейки” составила 0.0821 ± 0.0014 ед. изм. отклика УФ-детектора. Это позволило прокалибровать шкалу отклика УФ-детектора в единицах ϵ^* .

Для проверки правильности предложенной процедуры и ее применимости для расчета распределения ϵ^* гумусовых кислот по ММ было проведено сопоставление средних ϵ^* , определенных для каждого препарата гумусовых кислот, двумя способами: (1) путем расчета из соответствующей УФ-хроматограммы, перестроенной в ϵ^* – координатах (ϵ^*_{calc}), и (2) экспериментальным путем, измеряя оптическую плотность раствора препарата в 0.028 М фосфатном буфере при $\lambda = 254$ нм и $l = 1$ см, и относя ее к известной массовой концентрации препарата (мг С/л) (ϵ^*_{exp}). Значения ϵ^*_{exp} приведены в табл. 5.4. Их сопоставление с рассчитанными из хроматограмм (ϵ^*_{calc}) приведено на рис. 5.7.

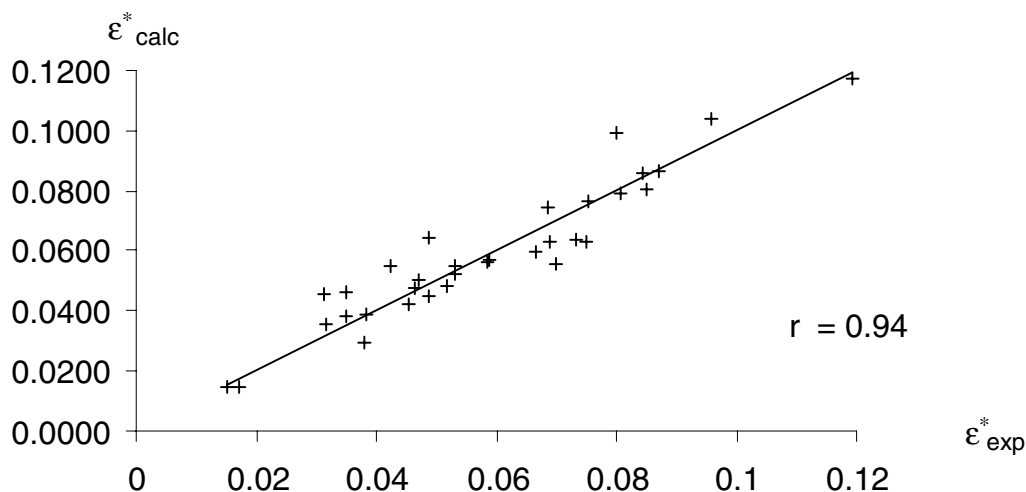


Рис. 5.7. Зависимость экспериментально найденных значений ϵ^*_{exp} препаратов гумусовых кислот, указанных в табл. 5.4, и рассчитанных для них с помощью “постоянной ячейки” из соотношения УФ- и $C_{орг}$ -хроматограмм ϵ^*_{calc}

Массовые коэффициенты поглощения ε^* препаратов гумусовых кислот ($\lambda = 254$ нм, $l = 1$ см, $C_{ГФК}$ в мг С/л, $n = 3$, $P = 0.95$)

Препарат	ε^* , л/(мг С×см)	Препарат	ε^* , л/(мг С×см)
ГФК торфа		ФК почв	
PHF-T10L94	0.065±0.008	SFA-Am	0.056±0.002
PHF-T1H94	0.056±0.005	SFA-CtV94	0.074±0.002
PHF-T4H94	0.060±0.005	SFA-Cm94	0.052±0.004
PHF-T5H94	0.063±0.003	SFA-Gw94	0.048±0.002
PHF-T6H94	0.064±0.006	SFA-Pg94	0.055±0.001
PHF-T7H94	0.077±0.009	SFA-Pp94	0.050±0.001
PHF-TH94	0.057±0.002	SFA-Pw94	0.047±0.001
PHF-TTL94	0.068±0.005	ГФК почвенного раствора	
РОВ торфа		SDFA-BS1FA	0.053
PDOM-TH	0.015±0.001	ГК углей	
PDOM-TT	0.015±0.001	CHA-AGK	0.099±0.009
ГФК почв		ГФК природных вод	
SHF-Co94	0.056±0.006	AHF-RND3	0.042±0.002
ГК почв		AHF-MMu8	0.038±0.001
SHA-Cm94	0.099±0.002	AHF-RMC	0.030±0.001
SHA-CtV94	0.117±0.006	AHF-RMX2	0.039±0.001
SHA-Gp94	0.081±0.007	AHF-RMX8	0.044±0.001
SHA-Gw94	0.086±0.004	ФК природных вод	
SHA-Pg94	0.079±0.001	AFA-SHo10	0.056
SHA-Pp94	0.077±0.001	AFA-GFg1	0.034
SHA-Pw94	0.086±0.002	ГК природных вод	
SHA-PwN	0.104	ANA-SHo10	0.066
ГФК донных отложений		РОВ природных вод	
BHF-RND13	0.055±0.004	ADOM-SMu4	0.046±0.002
BHF-SMu2	0.075±0.012	ADOM-SMu8	0.045±0.003

Как следует из приведенных данных, между $\varepsilon^*_{\text{exp}}$ и $\varepsilon^*_{\text{calc}}$ наблюдается хорошее соответствие:

$$\varepsilon^*_{\text{exp}} = 1.0006 \times \varepsilon^*_{\text{calc}} \quad (r = 0.95) \quad (5.5)$$

Это говорит о том, что указанная процедура может быть применена для конвертации шкалы отклика УФ-детектора в ε^* -шкалу.

Расчет распределения ϵ^* по ММ проводили в две стадии – ординату УФ-хроматограммы делили на ординату С-хроматограммы и умножали полученную величину на “постоянную ячейки”. Абсциссу (объемы удерживания, V_R) конвертировали с помощью калибровочной зависимости в ММ, что позволяло получить искомое распределение ϵ^* по ММ. Типичные кривые указанного распределения для препаратов гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава приведены на рис. 5.8, а для препаратов (см. табл. 2.2) в Приложении 5.5.

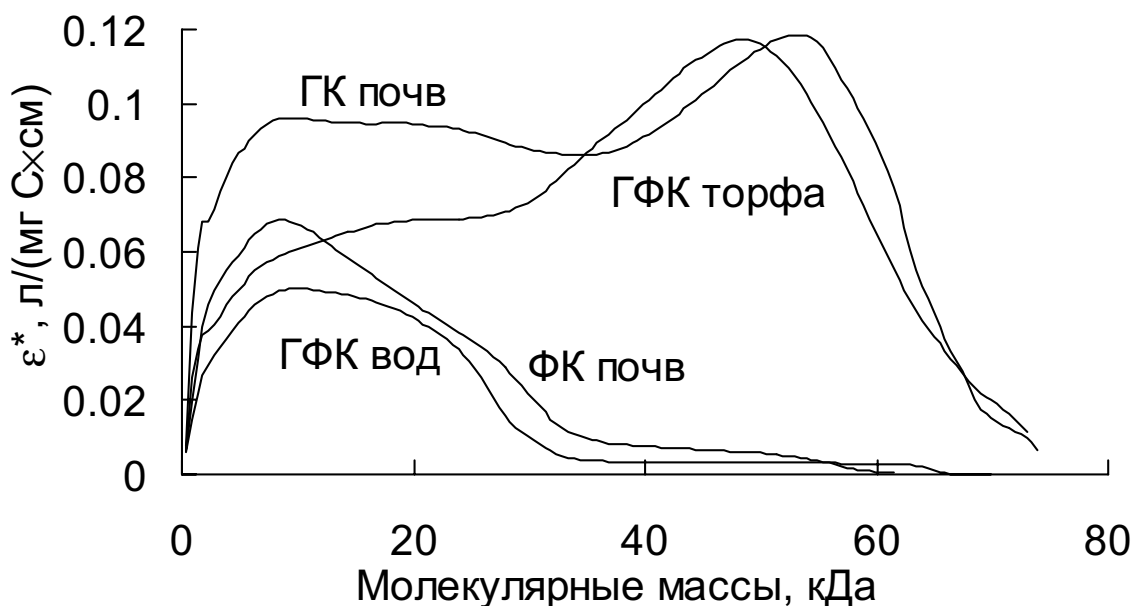


Рис. 5.8. Типичные кривые распределения ϵ^* по ММ для гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава.

На основании полученных данных можно, прежде всего, сделать вывод о размахе варьирования величины ϵ^* в пределах фракций одного препарата. Для всех исследованных препаратов его величина не превышала порядка, составляя, в среднем 2-4 раза. Полученный результат согласуется с предыдущими данными автора [Першина и др, 1989] по “прямому” определению ϵ^* для низко- и высокомолекулярной фракций препарата гумусовых кислот реки Москва (путем гравиметрического определения массы фракций), которые показали их различие на порядок. Наибольшие значения ϵ^* наблюдались для ГК почв, а в их ряду – для черноземов. Минимальные значения ϵ^* были характерны для водной вытяжки торфа. При одинаковой ММ (10 КДа) ГФК вод и ФК почв характеризуются весьма близким значением ϵ^* , тогда как для ГК и ФК аналогичного происхождения величина ϵ^* различается, в среднем, в 1.5 раза (ГК поглощают сильнее, чем ФК).

Наблюдаемые величины ϵ^* хорошо согласуются с содержанием ароматических фрагментов в препаратах, достигая максимума для максимально ароматических черноземов и минимума – для препарата с наименьшим содержанием ароматических фрагментов – водной вытяжки торфа. В целом для всех препаратов в диапазоне от 1 КДа до соответствующего M_w наблюдается монотонное возрастание ϵ^* . По мере дальнейшего возрастания ММ для низкомолекулярных ФК почв и ГФК вод наблюдается снижение ϵ^* , а для высокомолекулярных ГК почв и ГФК торфа наблюдается дальнейшее увеличение ϵ^* вплоть до ММ 40-50 КДа. Наличие ниспадающего участка в районе максимальных ММ для всех препаратов, с нашей точки зрения, связано с возрастанием вклада полисахаридных фрагментов в структуру макромолекул, обладающих наибольшими ММ. Полученные распределения ϵ^* по ММ использовали в дальнейшем для расчета дескрипторов молекулярно-массового состава. С нашей точки зрения, такие дескрипторы должны были обладать большей дискриминирующей способностью, чем традиционно используемые средние ММ и полидисперсность. Это подтвердилось при их дальнейшем использовании для классификации препаратов гумусовых кислот по источнику происхождения и фракционному составу.

Таким образом, проведенный комплекс исследований позволил определить оптимальные условия определения ММ гумусовых кислот методом эксклюзионной хроматографии и обосновать выбор адекватного образца сравнения. Кроме того, предложен подход и создано соответствующее программное обеспечение для получения численной информации, детально характеризующей экспериментальные данные эксклюзионной хроматографии гумусовых кислот. Получен расширенный набор численных дескрипторов ММ состава гумусовых кислот, включающий в себя характеристики трех распределений, получаемых с помощью эксклюзионно-хроматографического фракционирования гумусовых кислот: кривых элюирования в шкале K_d , ММР и распределения ϵ^* по ММ. Весь набор полученных дескрипторов был в дальнейшем использован для классификации гумусовых кислот по происхождению и фракционному составу.