



МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М. В. Ломоносова

---

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

*УДК 547.992.2*

**Гречищева Наталья Юрьевна**

**Взаимодействие гумусовых кислот с полиядерными  
ароматическими углеводородами: химические и  
токсикологические аспекты**

02.00.03 –Органическая химия

11.00.11 –Охрана окружающей среды и рациональное  
использование природных ресурсов

Научные руководители:

кандидат химических наук

И. В. Перминова

доктор химических наук, профессор

В. С. Петросян

Научный консультант:

доктор биологических наук

Д. Н. Маторин

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва-2000

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	6
1.1. Характеристика структуры и физико-химических свойств гумусовых кислот.....	6
1.2. Структура и физико-химические свойства ПАУ.....	17
1.3. Взаимодействие гумусовых кислот с ПАУ.....	21
1.3.1. Количественная характеристика взаимодействия гумусовых кислот с ПАУ.....	22
1.3.2. Зависимость реакционной способности гумусовых кислот от свойств ПАУ и ГФК.....	35
1.3.3. Взаимосвязь структуры и реакционной способности гумусовых кислот по отношению к ПАУ.....	39
1.3.3.1. Гипотезы о механизме взаимодействия гумусовых кислот с ПАУ.....	44
1.3.4.. Влияние рН и ионной силы на связывание ПАУ гумусовыми кислотами.....	47
1.4. Влияние ГФК на биологическую активность ПАУ.....	52
1.4.1. Влияние ГФК на биоаккумуляцию ПАУ водными организмами.....	52
1.4.2. Количественная оценка влияния ГФК на биоаккумуляцию ПАУ.....	58
1.4.3. Влияние ГФК на токсичность ПАУ.....	61
<b>2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b> .....	65
2.1. Характеристика объекта исследования.....	65
2.2. Изучение связывающей способности ГФК по отношению к ПАУ.....	74
2.2.1. Определение констант связывания ПАУ гумусовыми кислотами.....	74
2.2.2. Установление количественной взаимосвязи между структурой и константами связывания ПАУ гумусовыми кислотами.....	79
2.2.3. Изучение связывающей способности гидролизированных препаратов гумусовых кислот по отношению к пирену.....	88
2.2.3.1. Общая характеристика гидролизированных препаратов гумусовых кислот.....	88

2.2.3.2. Изучение связывающей способности гидролизированных препаратов ГК по отношению к пирену.....	94
2.2.4. Исследование механизма взаимодействия гумусовых кислот с ПАУ.....	97
2.2.5. Исследование влияния рН и ионной силы среды на связывание ПАУ гумусовыми кислотами.....	102
2.3. Исследование детоксицирующей способности ГФК по отношению к ПАУ.....	110
2.3.1. Установление диапазонов токсичности модельных ПАУ.....	112
2.3.2. Количественная оценка детоксицирующей способности ГФК по отношению к ПАУ.....	114
2.3.2.1. Исследование влияния ГФК на хроническую токсичность ПАУ.....	133
2.3.3. Установление взаимосвязи между структурой и детоксицирующей способностью ГФК по отношению к ПАУ.....	135
3. <b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b> .....	141
3.1. Материалы и оборудование.....	141
3.2. Техника эксперимента.....	147
3.2.1. Анализ препаратов гумусовых кислот .....	147
3.2.2. Методика определения констант связывания ПАУ гумусовыми кислотами с помощью метода тушения флуоресценции.....	148
3.2.3. Методика определения констант связывания ПАУ модельными кислотами с помощью метода тушения флуоресценции.....	150
3.2.4. Методики исследования способности гумусовых кислот образовывать комплексы с переносом заряда.....	158
3.2.5. Методики токсикологических экспериментов.....	158
3.2.5.1 Методика альгологического биотестирования.....	160
3.2.5.2 Методика эксперимента с использованием тест-объекта <i>Daphnia Magna</i> .....	
3.2.6. Приготовление тест-растворов, содержащих ПАУ.....	164

<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>168</b>
<b>ВЫРАЖЕНИЕ ПРИЗНАТЕЛЬНОСТИ.....</b>	<b>169</b>
<b>СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>170</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЯ.....</b>	<b>183</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Гумусовые кислоты представляют собой наиболее обширный класс природных соединений, входящих в состав органического вещества почв, природных вод и твердых горючих ископаемых. Наличие в молекулах гумусовых кислот ароматического каркаса, замещенного карбоксильными, гидроксильными и карбонильными группами, обеспечивает их высокое сродство к полиядерным ароматическим углеводородам (ПАУ). В связи с этим взаимодействие с гумусовыми кислотами является важнейшим фактором, контролирующим концентрацию свободной формы ПАУ в водных экосистемах. Учитывая, что именно свободная форма обладает максимальной токсичностью, гумусовые кислоты можно рассматривать как детоксиканты по отношению к ПАУ. Необходимость создания адекватных моделей биогеохимических циклов и прогноза развития токсикологической ситуации в загрязненных экосистемах определяет важность и актуальность изучения связывающей способности гумусовых кислот по отношению к ПАУ и установления количественных соотношений между строением, связывающей способностью и детоксицирующими свойствами гумусовых кислот. Указанные проблемы определили постановку целей и задач настоящей работы.

Целью работы являлось изучение связывающей способности и детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к ПАУ и установление их взаимосвязи со строением гумусовых кислот.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- определить константы связывания ПАУ гумусовыми кислотами различного происхождения и фракционного состава;
- установить корреляционные соотношения между константами связывания и структурными параметрами гумусовых кислот;
- количественно охарактеризовать детоксицирующие свойства гумусовых кислот по отношению к ПАУ;

- установить взаимосвязь детоксицирующих свойств со структурными параметрами и связывающей способностью гумусовых кислот по отношению к ПАУ.

# 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Характеристика структуры и физико-химических свойств гумусовых кислот

Гумусовые кислоты (от латинского “humus” – земля, почва) представляют собой наиболее реакционноспособную часть обширного класса природных соединений, объединяемых под названием гуминовые вещества (ГВ). Гуминовые вещества составляют от 60 до 80% органического вещества водных и почвенных сред [1-4].

Образование ГВ в природных средах происходит в результате химического и биологического разложения растительных и животных остатков [1, 2, 6]. В основе данного процесса лежит отбор устойчивых к биодegradации структур. В отличие от синтеза биополимеров, протекающего по заданному генетическому коду, образование гуминовых веществ - чисто стохастический процесс [7-9]. По этой причине ГВ представляют собой смесь макромолекул переменного состава и нерегулярного строения [10, 11].

Общепринятая классификация ГВ [9, 10, 12] основана на различии в растворимости в кислотах и щелочах. Согласно этой классификации ГВ подразделяют на три основные составляющие: гумин – неизвлекаемый остаток, нерастворимый ни в щелочах, ни в кислотах; гуминовые кислоты (ГК) – фракция ГВ, растворимая в щелочах и нерастворимая в кислотах; фульвокислоты (ФК) – фракция ГВ, растворимая в щелочах и кислотах. Под термином "гумусовые кислоты" понимают сумму гуминовых и фульвокислот. В нашей работе для сокращенного обозначения гумусовых кислот используется аббревиатура ГФК.

Макроэлементами, образующими молекулы ГФК, являются углерод, водород и кислород. Азот и сера содержатся в ГФК на уровне 1-3 %, обязательной составной частью ГФК являются микроэлементы и вода [2, 13]. Молекулярные массы ГФК, по разным данным, составляют от 700 до 200000 Дальтон [6, 14], причем молекулярные массы ГК заметно больше, чем ФК.

Средний элементный состав ГФК, рассчитанный авторами [15] на основании статистической обработки имеющихся литературных данных, приведен в Табл. 1.1.

Таблица 1.1

Средний элементный состав ГФК различного происхождения (n - число препаратов)[15]

Содержание элементов, % (масс)					Атомные соотношения	
C	H	O	N	S	O/C	H/C
<b><i>ГК почв (n=215)</i></b>						
56±3.8	4.9±1	35.4±3.7	3.7±1.3	0.6±0.1	0.47±0.09	1.06±0.25
<b><i>ФК почв (n=127)</i></b>						
44.2±5.4	5±1	47.1±5.2	2.8±1.3	0.9±0.5	0.79±0.16	1.33±0.34
<b><i>ГК торфа (n=23)</i></b>						
57.4±2.5	5.0±0.8	34.5±2.7	2.9±1.0	0.3±0.1	0.46±0.06	1.06±0.17
<b><i>ФК торфа (n=12)</i></b>						
54.1±4.3	4.9±1.1	38.8±3.7	2.2±0.5	0.6±0.2	0.54±0.09	1.04±0.33
<b><i>ГК пресных вод (n=56)</i></b>						
51.7±3	4.7±0.6	40.8±3.8	2.1±1.6	1.1±0.3	0.6±0.08	1.12±0.17
<b><i>ФК пресных вод (n=56)</i></b>						
46.2±4.3	4.3±0.7	46.8±5.1	1.8±1.1	1.0±0.7	0.76±0.14	1.1±0.13
<b><i>ГК морских вод (n=95)</i></b>						
56.4±6.6	5.5±1.4	32.1±7.8	3.7±1.5	2.6±1.4	0.43±0.18	1.2±0.23
<b><i>ФК морских вод (n=12)</i></b>						
45.4±4.0	6.1±0.9	44.5±6.0	4.5±2.3	-	0.73±0.17	1.62±0.13

± - стандартное отклонение

Как видно из Табл. 1.1, содержание углерода в ГК варьирует от 50 до 60%, кислорода – от 30 до 40%. ФК, наоборот, характеризуются более низким содержанием углерода и более высоким - кислорода. Атомные соотношения Н/С и О/С, рассчитываемые из данных элементного анализа, позволяют оценить такие параметры структуры, как содержание ненасыщенных фрагментов и кислородсодержащих функциональных групп. Так, при соотношении Н/С<1 можно говорить о преобладании в структуре ГФК ароматических фрагментов. Если же это отношение >1.4, то структура ГФК носит преимущественно алифатический характер [6]. По



этим критериям можно говорить, что ГК обогащены ароматическими фрагментами и обеднены функциональными группами по сравнению с ФК. Для ГК соотношение Н/С изменяется в ряду: морские воды > пресные воды > торф ≈ почвы.

Относительно большие значения стандартного отклонения для данных по содержанию N и S авторы обзора [15] объясняют большими ошибками в определении этих элементов. Кроме того, возможно, что содержание этих элементов в ГФК в значительной степени случайно.

По своей химической природе ГФК представляют собой высокомолекулярные ароматические оксикарбоновые кислоты. В силу нерегулярности строения ГФК не имеют единой структурной формулы, поэтому можно говорить только о «гипотетических средних» структурах. Гипотетический структурный фрагмент ГФК почвы приведен на Рис. 1.1 [15].

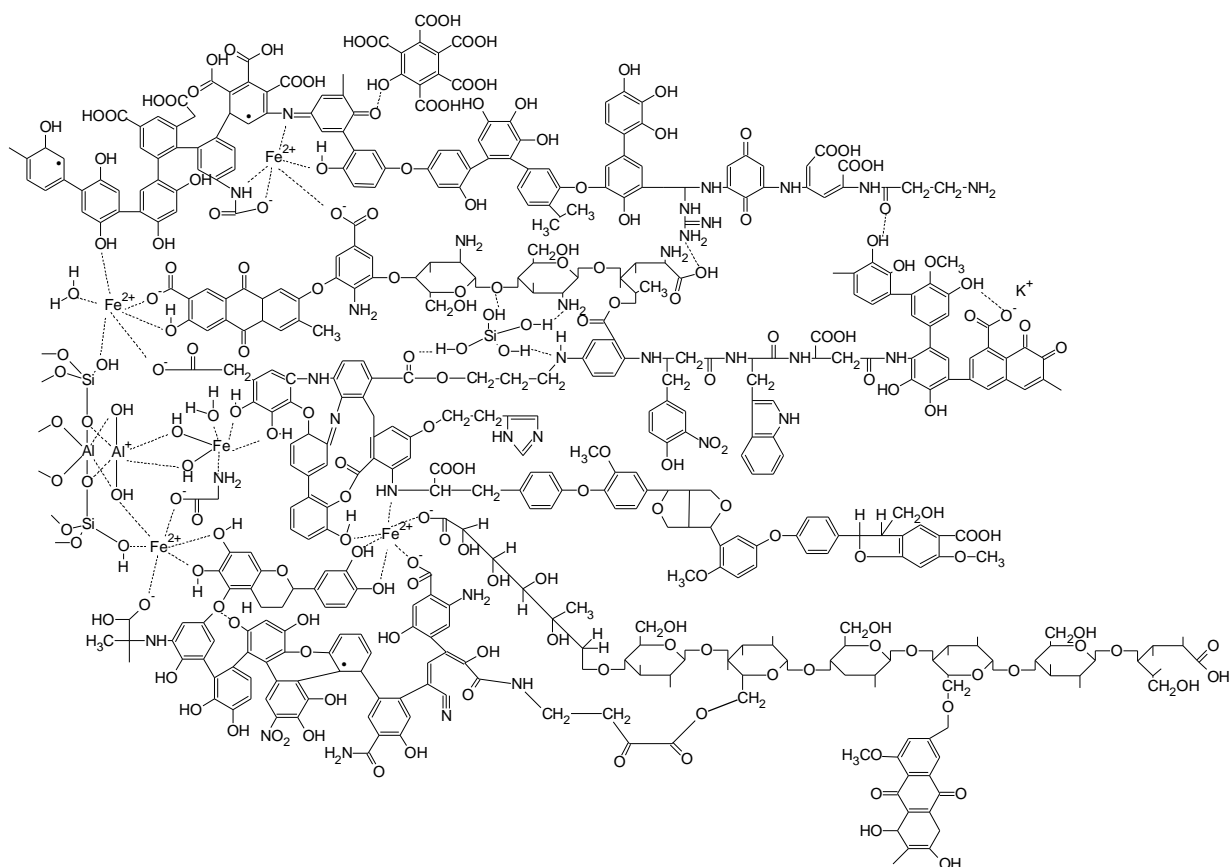


Рис. 1.1. Гипотетический структурный фрагмент ГФК почвы [15].

Согласно наиболее общим представлениям [2, 3, 10, 11] (что и отображено на Рис.1.1), для строения ГФК характерно наличие

структурных блоков, принципиально различающихся по своей химической природе и традиционно определяемых в терминах “ароматический каркас” и “углеводная периферия”. Указанная дифференциация основывается на результатах гидролитического расщепления ГФК, достоверно свидетельствующих о существовании в их составе “негидролизуемой” (каркас) и “гидролизуемой” (периферия) части. Предполагают [16, 17, 18, 19], что гидролитическое расщепление затрагивает только периферическую часть молекул ГФК, расщепляя гликозидные, сложноэфирные и пептидные связи и вызывая разрушение полисахаридно-пептидного комплекса. Согласно [6], при гидролизе 6 М HCl в раствор переходит 30 - 45 % массы ГК почв и 60 - 75 % ФК. Гидролизуемость ГК торфов и бурых углей несколько ниже. Основной частью гидролизатов ГК и ФК почв являются углеводы, массовое содержание которых в ГФК по различным источникам достигает 20-40 %. Более детальное исследование их состава показало, что углеводная часть ГФК представлена в основном гексозами (30 - 60 %, с преобладанием глюкозы), в меньших количествах - метилпентозами и пентозами [6, 20, 21]. Уроновые кислоты составляют обычно 5 - 20 % от суммы сахаров [6]. Высказано предположение, что моно- и полисахариды связаны с каркасной частью ГФК посредством сложноэфирных мостиков [22]. По данным [6], содержание аминокислот в полипептидной периферии в препаратах ГК почв составляет 6 - 10 % от их массы. Содержание аминокислот в соответствующих ФК несколько ниже (5 - 7 %). Аминокислотный состав характеризуется постоянством при значительном преобладании аспарагиновой и глутаминовой аминокислот, глицина и аланина. На сегодняшний день неясно, входят ли аминокислоты в состав ГФК как индивидуальные остатки, или в составе полипептидных цепей. Опыт применения ферментативного гидролиза позволяет предполагать, что значительная часть аминокислот образует пептидные цепи [23]. Кроме того, имеются данные [6,12] о наличии в составе гидролизатов ГК фенолов (до 5 %) и ФК-подобных соединений (10 - 15 %).

Для изучения негидролизуемого каркаса молекул используют в основном методы жесткой (окислительной и пиролизической) деструкции

[6]. При окислении ядра ГФК происходит образование главным образом ароматических карбоновых кислот, что подтверждает наличие в структуре ГФК высокозамещенных ароматических фрагментов. Выход ароматических кислот колеблется от 2 - 5 % (для ФК) до 15 - 20% (для ГК) [6]. Однако в результате деструкции получаются видоизмененные, по сравнению с состоянием в молекулах гумусовых кислот, осколки молекул, что существенно затрудняет интерпретацию получаемых данных. Поэтому в последнее время все большее распространение получает недеструктивный физический метод спектроскопии ЯМР  $^{13}\text{C}$ .

Содержание ароматического углерода в молекулах ГФК различного происхождения, определенного методом спектроскопии ЯМР  $^{13}\text{C}$ , по данным [24] может изменяться в диапазоне 26 - 53 % для ГК почв, 16 - 49 % для ФК почв, 20 - 27 % для ФК природных вод, 30 - 47 % для ГК угля. Анализ данных спектроскопии ЯМР  $^{13}\text{C}$  дает возможность установить различия в структуре ГК и ФК различных природных источников.

Так, согласно данным  $^{13}\text{C}$  ЯМР-исследования, ГК дерново-подзолистых и серых лесных почв содержат примерно в два раза больше ароматических фрагментов по сравнению с соответствующими ФК [25, 26]. В работах [27, 28] отмечалось, что ФК почв по сравнению с ГК характеризуются более высоким содержанием СООН групп, в то время как содержание алифатических фрагментов в них несколько ниже. Согласно большей части опубликованных данных [26, 27, 28], содержание карбогидратных фрагментов в ФК почв превышает таковое для ГК в 1.5-3 раза, однако исследователями [29, 30, 31] отмечается их одинаковое содержание.

Содержание углеводных структур в ФК природных вод находится на уровне такового в ГК или несколько ниже [32-34]. В то же время прочие закономерности, обнаруженные для ГК и ФК почв, сохраняются для ГК и ФК природных вод. Так, содержание СООН групп в ФК природных вод выше, чем в ГК, а содержание ароматических фрагментов - ниже. Согласно [32, 34], ФК содержат больше алкильных фрагментов, однако данные

некоторых исследователей [33, 35] находятся в противоречии с этим выводом.

Следует отметить, что для оценки содержания ароматического углерода в молекулах ГФК ( $C_{Ar}$ ) наряду с спектроскопией ЯМР  $^{13}C$ , используют косвенные методы анализа, а именно УФ-спектроскопию и элементный анализ [6, 36, 37]. Данные методы позволяют оценить вклад ароматических фрагментов в структуру молекул ГФК по таким показателям, как молярное поглощение растворов при 280 нм и атомное соотношение Н/С. Так, в работе [37] найдена тесная корреляция между процентным содержанием ароматического углерода, определенным методом спектроскопией ЯМР  $^{13}C$ , молярным поглощением растворов ГФК при 280 нм ( $ABS_{280}$ ) и средневесовыми значениями молекулярных масс для десяти препаратов ГФК, выделенных из природных вод, и стандартного препарата ГК фирмы Aldrich. Тесные корреляции ( $r = 0.94$ ) между содержанием  $C_{Ar}$  и значениями  $ABS_{280}$  были получены для девяти препаратов ГК различного происхождения авторами [38]. При сопоставлении значений  $ABS_{280}$  и Н/С был сделан вывод о более высоком вкладе ароматических фрагментов в структуру ГК и ФК почв и болотных вод по сравнению с ГК и ФК поверхностных и грунтовых вод.

Наблюдаемые различия в структурах ГФК разных природных сред связаны со спецификой соответствующих источников гумусообразования [4, 6]. Так, в торфах, почвах и пресных водах основными предшественниками ГФК являются продукты разложения лигнина, полифенолы и производные фенолов, синтезируемые микроорганизмами, то есть вещества, обогащенные ароматическими фрагментами [39, 40]. ГФК морских вод и донных отложений образуются, преимущественно, из остатков водорослей и планктона, главными компонентами которых являются липиды, полисахариды и пигменты - соединения алифатического и алициклического рядов [41].

Наличие в структуре ГФК гидрофобных ароматических фрагментов, замещенных полярными функциональными группами, определяет их гидрофобные и поверхностно-активные свойства.

Согласно работам [42-46] поверхностная активность ГФК во многом определяется их происхождением, условиями среды, концентрацией ГФК в растворе, их молекулярными массами, элементарным составом. Показано [42, 43], что для ГФК с низким содержанием углерода, высоким содержанием кислорода и кислотных групп поверхностная активность выражена более сильно. В работах [44, 45] отмечено уменьшение поверхностного натяжения растворов гуминовых и фульвокислот с увеличением их концентрации. При этом большее уменьшение поверхностного натяжения (до 31 дин/см) наблюдалось в случае ФК, что говорит о более высокой поверхностной активности ФК по сравнению с ГК. Так, ФК снижали поверхностное натяжение воды от 72.0 до 46.1 дин/см при рН 7, в то время как соответствующие ГК только до 69.2 дин/см. Аналогичные данные получены исследователями [46]. Однако при увеличении рН до 12, поверхностное натяжение уменьшалось до 43.2 и 44.2 дин/см для ФК и ГК, соответственно [45]. В работе [44] наблюдали увеличение поверхностного натяжения растворов ГК и ФК на 0-5 дин/см с возрастанием температуры от 5 до 25<sup>0</sup> С.

Авторами [42, 43] было отмечено, что величины поверхностного натяжения растворов ГФК, при которых происходит мицеллообразование данных молекул, составляют в среднем 31.3-34.3 дин/см, в случае ФК, и 37.0-51.5 дин/см, для ГК. В среднем концентрация, при которой наблюдается мицеллообразование, выше для ФК, чем для ГК, что указывает на меньшую тенденцию ФК к агрегированию. Полученные результаты авторы связывают с большей гидрофобностью молекул ГК по сравнению с ФК. Согласно [44] концентрация мицеллообразования молекул ГК уменьшалась от 10 до 1.3 г/л с возрастанием молекулярных масс от 10000 до 300000 Дальтон. Причем данные значения не зависели от температуры.

Гидрофобные свойства ГФК различного происхождения были исследованы авторами [47-51] посредством разделения данных молекул на гидрофобные и гидрофильные фракции с помощью обратно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ). Так, для

более гидрофобных фракций ГФК было характерно наличие алифатических, ароматических структур и сопряженных алифатических кетонов. Гидрофильные фракции характеризовались, в основном, обогащенностью функциональными группами кислотного характера, углеводными фрагментами и присутствием уроновых кислот [47-49]. Для ФК природных вод было показано, что при общем выходе 70% гидрофильная фракция составляла 40% от общего содержания образца, в то время как гидрофобная фракция - 30%. Неполноту выхода (70%) авторы объясняют необратимой адсорбцией молекул ФК на неподвижной фазе колонки, а также механическими потерями при проведении эксперимента.

Авторами [50] при фракционировании ГФК различного происхождения с помощью ОФ-ВЭЖХ на октил-сефарозе CL-4B была отмечена более высокая гидрофобность ГК донных отложений по сравнению с почвенными ГК. Вне зависимости от источника происхождения, гидрофобность ГК оказалась выше по сравнению с гидрофобностью ФК. Так, количество несорбированных препаратов ФК почв и донных отложений составило 87 и 64 %, для соответствующих ГК - 23 и 8 %. Увеличение гидрофобности с возрастанием молекулярной массы от 10000 до 300000 Дальтон было отмечено в работе [51] для ГК морских донных отложений. Однако для ФК была продемонстрирована обратная зависимость: увеличение гидрофильности ФК с увеличением молекулярной массы от 10000 до 300000 Дальтон.

В работе [52] были измерены коэффициенты распределения в системе октанол-вода, являющиеся количественной характеристикой гидрофобности молекул, для ГК фирмы Fluka и водных ГФК. Полученные значения были практически одинаковыми и составили 0.084 при pH 6.5. Однако с уменьшением pH до 3.5 было отмечено возрастание коэффициентов на 5000 % и 140 % для ГК Fluka и водных ГФК, соответственно, что, по-видимому, обусловлено увеличением их гидрофобности в результате протонирования ионогенных групп. Различия в значениях полученных коэффициентов могут быть обусловлены различиями в структуре данных препаратов.

Вышеописанные свойства ГФК, обусловленные спецификой их строения определяют способность ГФК связывать как гидрофобные органические экотоксиканты, так и тяжелые металлы. Так, ГФК способны образовывать водородные связи, активно участвовать в сорбционных процессах, вступать в гидрофобные, ионные и донорно-акцепторные взаимодействия с различными классами органических соединений [53, 54]. Следует отметить, что присутствие в молекулах ГФК как электроно-донорных, так и электроно-акцепторных функциональных групп обуславливает их способность выступать, соответственно, как акцепторами, так и донорами по отношению к различным соединениям. В Табл. 2.2 приведены потенциалы ионизации ряда соединений, при взаимодействии с которыми ГФК могут проявлять донорно-акцепторные свойства.

Таблица 2.2

Соединения выступающие донорами или акцепторами по отношению к ГФК [54]

Доноры		Акцепторы	
Соединение	Потенциал ионизации (эВ)	Соединение	Потенциал ионизации (эВ)
п-Фенилендиамин	7.58	Тетрацианэтилен	11.67
Тетраметил-п-фенилендиамин	6.50	Хлоранил	9.58
Гексаметилбензол	7.95	Тринитробензол	10.96
Нафталин	8.12	Тринитротолуол	10.59
Антрацен	7.40	Иод	9.28
Тетрацен	7.00		
Пирен	7.50		

Как видно из таблицы, ГФК проявляют акцепторные свойства по отношению к соединениям со значением потенциала ионизации в диапазоне 6.5 - 8 эВ. Донорные свойства ГФК проявляют к соединениям со значением потенциала ионизации выше 9 эВ.

Таким образом, имеющиеся литературные данные по составу и строению ГФК показывают, что последние обладают рядом свойств, которые должны способствовать их связыванию с органическими соединениями, в частности с ПАУ. При этом для понимания закономерностей взаимодействия ГФК с ПАУ весьма важным является специфика химических свойств ПАУ, рассмотрению которых будет посвящен следующий раздел.

## 1.2. Структура и физико-химические свойства ПАУ

Полиядерные ароматические углеводороды (ПАУ) образуют класс химических соединений, обладающих токсическими, мутагенными и канцерогенными свойствами. Молекулы ПАУ состоят из бензольных колец, сконденсированных при помощи двух или более общих соседних углеродных атомов. Если центры колец в формуле ПАУ расположены на одной прямой, то такие ПАУ являются линейными; если же они могут быть соединены только ломаной линией, то данные ПАУ являются ангулярными [55]. Примеры линейного и ангулярного ПАУ приведены на Рис. 1.2.



Рис. 1.2. Линейный и ангулярный ПАУ.

Как видно из рисунка, антрацен относится к линейным ПАУ, фенантрен - к ангулярным. Соединение бензольных колец в орто-положении называют анеллированием. Антрацен является линейно анеллированным ПАУ. Фенантрен - ангулярно анеллированным. Углеводороды, содержащие большое количество линейно конденсированных колец называются аценами. Углеводороды, содержащие 9,10 - связь аналогично фенантрону называют фенами.



Наличие сопряженных  $\pi$ -электронных систем в молекулах ПАУ во многом определяет их высокую стабильность. Такая стабильность обусловлена размещением  $\pi$ -электронов на связывающих молекулярных орбиталях молекул ПАУ. При этом антисвязывающие орбитали остаются вакантными. Одним из наиболее важных показателей устойчивости ПАУ является количество ароматических секстетов, образуемых данной молекулой [57]. Примером может служить сравнение стабильности молекул антрацена и фенантрена. Как видно из Рис. 1.2 антрацен имеет только один секстет. В случае же фенантрена возможно образование двух секстетов, что повышает стабильность молекулы в целом. Следует отметить, что связь в 9,10-положении является наиболее реакционноспособной как для фенантрена, так и антрацена, ввиду того, что присоединение по 9,10-положению приводит к образованию дополнительного секстета и не сопровождается потерей резонансной стабилизации молекулы [57].

Примерами более высокой реакционной способности антрацена, по сравнению с фенантrenom, могут служить реакции синхронного циклоприсоединения по 9,10-положениям, способность фотодимеризоваться и образовывать эндопероксиды под действием УФ-облучения в присутствии кислорода. Для фенантрена вышеупомянутые реакции протекают в более жестких условиях.

По мере увеличения количества колец в линейном ПАУ наблюдается “размазывание” секстета по кольцам, что приводит к снижению стабильности системы, увеличению реакционноспособности и склонности ПАУ вступать в реакции присоединения по центральным циклам (типа 9,10-положения в молекуле антрацена). При переходе к ангулярным ПАУ реакционноспособность центров в пара-положениях снижается. Для ангулярных ПАУ, содержащих 9,10-связь фенантрена, тенденция к повышению реакционноспособности орто-положения с увеличением степени аннелирования выражена в меньшей степени [77-79].

Принципы построения аценов и фенов повторяются в более конденсированных циклических системах и могут комбинироваться между

собой [56, 57]. Так, в результате линейного аннелирования молекулы пирена возрастает реакционная способность образующихся ПАУ. Ангулярное аннелирование приводит к возникновению новых секстетов и повышению устойчивости молекулы. Некоторые физико-химические свойства ПАУ приведены в Табл. 1.3.

Таблица 1.3

Физико-химические свойства некоторых ПАУ (по данным [58-61])

ПАУ	T <sub>пл</sub> °С	T <sub>кип</sub> °С	Раствори- мость в воде (25°С), мкг/л	Давление пара (20°С)	Потен- циал иониза- ции (I), эВ	lgK <sub>ow</sub>
Антрацен	216	340	30	1.96×10 <sup>-4</sup>	7.40	4.45
Бенз(а) антрацен	158	400	9.4	5.00×10 <sup>-9</sup>	7.52	5.61
Дибенз(а,h) антрацен	262	-	5	1.00×10 <sup>-10</sup>		5.97
Нафталин	80	218	30000	4.92×10 <sup>-2</sup>	8.30	3.37
Пирен	149	360	135	6.85×10 <sup>-7</sup>	7.55	5.22
Бенз(а) пирен	179	496	1.6	5.00×10 <sup>-9</sup>	7.19	6.04
Бенз(g,h,i) перилен	222	-	0.26	1.00×10 <sup>-10</sup>		7.23
Фенантрен	101	340	1290	6.80×10 <sup>-4</sup>	8.02	4.46
Флуорантен	110	-	265	0.60×10 <sup>-6</sup>	7.80	5.16
Бензо(b) флуорантен	167	-	1.2	5.00×10 <sup>-7</sup>		6.57
Флуорен	116	293	1600	1.30×10 <sup>-2</sup>	7.9	4.18
Хризен	255	-	1.8	6.30×10 <sup>-7</sup>		5.66

Как видно из таблицы, ПАУ характеризуются высокими температурами плавления и кипения, низкой растворимостью в воде и

высокими значениями коэффициентов распределения в системе октанол-вода ( $\lg K_{ow}$ ), что свидетельствует о высокой гидрофобности данных молекул. Данные свойства являются следствием высокой стабильности молекул ПАУ. В работах [62-64] между водной растворимостью ПАУ и  $\lg K_{ow}$  найдены линейные корреляционные зависимости.

Согласно авторам работ [65-67], при условии введения температуры плавления ПАУ как корректирующего фактора, угловой коэффициент выше упомянутых зависимостей близок к -1:

$$\lg K_{ow} = a (\lg S) + b (T_{пл}) + c \quad (1.1),$$

где  $S$  - водная растворимость ПАУ;  $T_{пл}$  - температура плавления ПАУ;  $a$ ,  $b$ , и  $c$  - эмпирические коэффициенты.

Следует отметить большой разброс данных по опубликованным величинам водной растворимости ПАУ [68-75]. Так, согласно [76], при уменьшении водной растворимости ПАУ от 1 г/л до 1 мкг/л разброс данных увеличивается от 3% до 70%, соответственно. По-видимому, вероятной причиной этому могут служить погрешности в приготовлении истинных растворов ПАУ ввиду их низкой растворимости в воде.

Как видно из Табл. 1.3, для молекул ПАУ характерны достаточно низкие значениями потенциалов ионизации, что является следствием нахождения  $\pi$ -электронов данных молекул на высокоэнергетических связывающих орбиталях. Данный факт обуславливает возможность молекул ПАУ выступать в качестве доноров (Д) электронов при образовании комплексов с переносом заряда (КПЗ) с различными  $\pi$ -,  $\sigma$ - и  $n$ -акцепторами (А). Подтверждением вышесказанному могут служить данные авторов [56, 80-82], свидетельствующие об образовании КПЗ молекулами ПАУ с такими акцепторами, как полинитроароматические соединения, хлоранил, нитрилы, хиноны, тетрацианоэтилен, пиромеллитовый ангидрид, N,N-диметилпиромеллитовый имид и др. Для большинства случаев необходимым условием образования КПЗ является присутствие реагентов в мольных соотношениях 1:1 [80]. Однако для пикриновой кислоты и 2,4,7-тринитрофлуорен-9-она мольные соотношения реагирующих компонентов (Д:А) могут составлять 1:2 или 2:1,

соответственно [56]. В большинстве случаев образующиеся комплексы весьма нестабильны. Хотя имеются сведения об использовании производных некоторых ПАУ, например тетрагалькогенотетраценов, в синтезе катион-радикальных солей, обладающих высокой проводимостью [83].

Вышеописанные свойства ПАУ во многом определяют их персистентность и распределение в водных экосистемах. Способность ПАУ к гидрофобным взаимодействиям в водных растворах и образованию комплексов с переносом заряда, где молекулы ПАУ могут выступать донорами электронов, могут в существенной степени способствовать их взаимодействию с ГФК.

### **1.3. Взаимодействие гумусовых кислот с ПАУ**

При попадании в водную среду в зависимости от физико-химических свойств (водная растворимость, гидрофобность, летучесть паров и др.) ПАУ могут существовать в различных формах: истинно-растворенной, мицеллярной, адсорбированной на взвешенных частицах, аккумулятивной биотой и др.

Согласно [84-86] ПАУ, содержащие четыре и более конденсированных ароматических кольца, в основном сорбируются на взвешенном веществе, тогда как низкомолекулярные ПАУ существуют преимущественно в растворенной форме и составляют 2-16% от адсорбированного ПАУ.

На формы существования ПАУ в водных средах большое влияние оказывает присутствие растворенного органического вещества (РОВ), которое на 60-80% представлено ГФК [53]. Связывание ПАУ гумусовыми кислотами равносильно процессу выведения ПАУ из свободно растворенного состояния, что может приводить к изменению равновесия, устанавливающегося между взвешенной и растворенной формами ПАУ [87-98], сопровождаться увеличением их растворимости в воде [99, 100], уменьшением летучести [101] и биоаккумуляции [7, 9, 96, 102], ускорением

фотолиза ПАУ [102-108]. В связи с этим, для прогноза состояния ПАУ в водных экосистемах необходимо получение количественных характеристик их взаимодействия с ГФК.

### 1.3.1. Количественная характеристика взаимодействия гумусовых кислот с ПАУ с помощью константы связывания

Связывание ПАУ гумусовыми кислотами можно упрощенно описать следующим уравнением реакции [111, 119]:



Количественной характеристикой такого взаимодействия является константа связывания, записываемая как:

$$K = \frac{[\text{ПАУ-ГФК}]}{[\text{ПАУ}][\text{ГФК}]} \quad (1.3),$$

где  $[\text{ПАУ-ГФК}]$  - равновесная концентрация молекулярного комплекса ПАУ-ГФК;  $[\text{ГФК}]$  и  $[\text{ПАУ}]$  - равновесные концентрации свободно растворенных ГФК и ПАУ, соответственно.

Однако ввиду того, что ГФК представляют собой высокомолекулярные соединения нерегулярного строения, реакция (1.2) не отражает истинной стехиометрии взаимодействия ГФК с ПАУ. Весьма вероятно, что одна макромолекула ГФК содержит несколько реакционных центров, способных связывать молекулы ПАУ. Поэтому уравнение (1.3) описывает, скорее, взаимодействие одной молекулы ПАУ с одним реакционным центром ГФК. В связи с тем, что количество реакционных центров, приходящееся на единицу массы ГФК неизвестно, то обычно для расчета константы связывания используют не молярную, а массовую концентрацию ГФК, выраженную в кг органического углерода (кг С) на литр раствора. В этом случае процесс (1.2) можно рассматривать как сорбцию ПАУ гумусовыми кислотами. Такую константу обозначают с помощью подстрочного индекса ОС ( $K_{oc}$ ), при этом ее размерность - л/кг С, совпадает с размерностью константы сорбции [121]. Последнее обстоятельство позволяет записать  $K_{oc}$  как константу сорбции. Как правило, в природных средах общая концентрация ГФК ( $C_{\text{ГФК}}$ ) намного больше таковой для ПАУ ( $C_{\text{ПАУ}}$ ). Поэтому равновесную концентрацию ГФК можно принять равной общей концентрации ГФК:  $[\text{ГФК}] \cong C_{\text{ГФК}}$ .

Тогда выражение для константы связывания преобразуется к следующему виду:

$$K_{oc} = \frac{1-a}{a} \times \frac{1}{C_{ГФК}} \quad (1.4)$$

где  $K_{oc}$  - константа связывания ПАУ гумусовыми кислотами в расчете на массовую концентрацию ГФК, выраженную в кг органического углерода (кг С) на л,  $\alpha$  - доля свободного ПАУ, которую рассчитывали по формуле:

$$a = \frac{[ПАУ]}{C_{ПАУ}} \quad (1.5)$$

Как видно из уравнения (1.4), для определения  $K_{oc}$  необходимо осуществить измерение концентрации ПАУ, несвязанного ГФК. Для этой цели в литературе описано применение следующих методов: гель-хроматографии [96, 112], ультрафильтрации [96, 113], тонкослойной хроматографии [96], обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) [114-115], диализа [116-117], жидкостной экстракции [118-120], тушения [121-122] и поляризации флуоресценции [123], а также методов, основанных на регистрации изменения водной растворимости [124] и биоусвояемости [125, 126] ПАУ в присутствии ГФК, изменении концентрации углеводов в газовой фазе над раствором ПАУ-ГФК [96]. 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 [114], свободный ПАУ полностью сорбируется, в то время как ПАУ, связанный с ГФК, проходит через колонку, не сорбируясь. В получаемые результаты могут вносить погрешности такие факторы, как десорбция некоторого количества ПАУ из комплекса ГФК-ПАУ вследствие взаимодействия ПАУ с адсорбентом или же недостаточно полная сорбция свободной формы ПАУ. Кроме того,

согласно [127], увеличение концентрации ГФК может вызывать агрегирование их молекул и частичную сорбцию на колонке. Как следствие, возможно занижение определяемых значений  $K_{oc}$ .

Методы диализа и ультрафильтрации позволяют разделить свободную и связанную формы ПАУ с помощью мембран. Однако, согласно данным [114, 128], 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  $K_{oc}$  [96]. Несмотря на указанные погрешности методов, авторами [114] была найдена хорошая корреляция между значениями  $K_{oc}$  антрацена для ГК Aldrich и водных ГФК, определенных с помощью диализа и ОФ-ВЭЖХ. Соответствующие коэффициенты корреляции ( $r^2$ ) составили 0.70 и 0.68.

Одним из наиболее распространенных методов, позволяющим определять концентрацию свободного и связанного с гумусовыми кислотами ПАУ без их предварительного разделения, является метод тушения флуоресценции. Использование данного метода исключает появление артефактов, вызываемых смещением равновесия в системе ПАУ-ГФК. Кроме того, использование данного метода не требует определения точной концентрации ПАУ в растворе. В связи с тем, что метод тушения флуоресценции был использован в нашей работе для определения констант связывания ПАУ гумусовыми кислотами, остановимся более подробно на этом методе.

Метод тушения флуоресценции основан на измерении уменьшения интенсивности флуоресценции флуорофора (ПАУ) в присутствии тушителя (ГФК). При этом механизм тушения флуоресценции может быть динамическим или статическим. Динамическое тушение обусловлено столкновением тушителя и флуорофора в результате диффузии в течение времени жизни возбужденного состояния. Вследствие контакта флуорофор возвращается в основное состояние без излучения фотона. В случае статического тушения между флуорофором и тушителем в основном состоянии образуется комплекс, который не флуоресцирует [129].



Информация о типе тушения позволяет сделать предположение о механизме взаимодействия между тушителем и флуорофором. Для идентификации механизма тушения изучают зависимость тушения флуоресценции от температуры и вязкости растворов, изменение спектров поглощения флуорофора и времени затухания флуоресценции в отсутствие ( $t_0$ ) и в присутствии ( $t$ ) тушителя. Так, в случае статического тушения, флуоресценция обусловлена только несвязанными в комплекс флуорофорами, и, следовательно,  $t_0/t = 1$ . Для динамического тушения наблюдается пропорциональное уменьшение интенсивности ( $F$ ) и времени затухания флуоресценции  $t_0/t = F_0/F$  [129].

Исследованию механизмов тушения ПАУ гумусовыми кислотами посвящен целый ряд работ [122, 124, 130-133]. Однако ввиду сложности изучаемой системы их выводы зачастую противоречивы. Так, в работе [131] была исследована температурная зависимость процессов тушения флуоресценции флуорантена ГК почв. Увеличение температуры от 283 до 313 К оказывало незначительный эффект на степень тушения ( $F_0/F$ ) ПАУ гуминовыми кислотами. В работах [124, 131] отмечена неизменность времен затухания флуоресценции ( $t_0/t$ ) некоторых ПАУ в присутствии и отсутствие различных концентраций ГФК. Авторы [131] наблюдали незначительное уменьшение времени жизни пирена ( $t_0/t = 1.2$ ) в присутствии 50 мг/л ГК Aldrich. Однако измерение интенсивности флуоресценции пирена в присутствии и отсутствие данных ГК не показало аналогичного уменьшения. Описанные результаты позволили авторам вышеуказанных работ предположить преобладание статического механизма тушения ПАУ гумусовыми кислотами над динамическим. Аналогичные выводы были сделаны авторами [121, 122, 131, 132] на основании расчетов бимолекулярных констант тушения флуоресценции в предположении диффузно-контролируемой реакции, а также исходя из постоянства анизотропии флуоресценции ПАУ в присутствии ГФК.

Для количественной оценки константы связывания ПАУ гумусовыми кислотами в предположении образования нефлуоресцирующего комплекса ПАУ-ГФК используют уравнение Штерна-Фольмера. Вывод данного

уравнения основан на предположении, что интенсивность флуоресценции ПАУ в присутствии ГФК пропорциональна концентрации его свободной формы ([ПАУ]). Тогда уравнение (1.5) можно представить в следующем виде:

$$a = \frac{F}{F_0} \quad (1.6)$$

где  $F_0$  и  $F$  - интенсивности флуоресценции ПАУ в отсутствие и в присутствии ГФК, соответственно. Уравнение (1.3), в свою очередь, преобразуется к выражению (1.6), известному как уравнение Штерна-Фольмера [121, 129]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{oc} \times C_{ГФК} \quad (1.7)$$

Согласно [133, 135] уравнение Штерна-Фольмера (1.7) применимо при следующих приближениях: (1) в растворе присутствует только один вид тушителя, (2) за время эксперимента не происходит адсорбции ПАУ на стенках кюветы, (3) квантовый выход флуоресценции комплекса ПАУ-ГФК равен нулю ( $f = 0$ ). Второе приближение необходимо принимать во внимание при рассмотрении взаимодействия высокогидрофобных ПАУ с ГФК. В этом случае возможно уменьшение интенсивности флуоресценции молекул ПАУ не только за счет их тушения ГФК, но и за счет сорбции на стенках кюветы. В связи с этим, во избежание возможных погрешностей при расчете констант связывания необходимо вводить поправки в уравнение Штерна-Фольмера [133-134]. Однако при исследовании кинетики взаимодействия антрацена, пирена и перилена с ГФК методом тушения флуоресценции, авторами [135] было показано, что равновесие между молекулами ПАУ и ГФК устанавливается в течение 3-4 минут. На основании полученных результатов было высказано предположение, что взаимодействие ПАУ с ГФК происходит за более короткий промежуток времени, чем адсорбция ПАУ на стенках кюветы. Исследования авторов [121, 132-135] показали, что условие  $f = 0$  выполняется для широкого круга ГФК.

В случае динамического тушения ПАУ гумусовыми кислотами константа связывания представляет собой произведение бимолекулярной константы скорости тушения флуоресценции ПАУ в присутствии ( $k_q$ ) и времени затухания флуоресценции ПАУ в отсутствие ГФК [129].

В случае комбинации двух типов тушения - статического и динамического уравнение Штерна-Фольмера приобретает вид уравнения второго порядка относительно  $C_{ГФК}$  [129]:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_{дин} \times C_{ГФК}) \times (1 + K_{стат} \times C_{ГФК}) = (1 + K_{каж} \times C_{ГФК}) \quad (1.8)$$

$$K_{каж} = (K_{динам} + K_{стат}) + K_{динам} K_{стат} \times C_{ГФК} \quad (1.9)$$

где  $K_{каж}$  - кажущаяся константа Штерна-Фольмера для комбинации динамического и статического тушения;  $K_{дин}$  - динамическая константа Штерна-Фольмера в случае динамического механизма тушения ПАУ гумусовыми кислотами.

В Табл.1.4 приведены значения констант связывания ПАУ гумусовыми кислотами, определенные различными методами.

Таблица 1.4

Константы связывания ПАУ гумусовыми кислотами, определенные различными методами

Источник происхождения ГФК	$\lg K_{oc}$	Метод определения $K_{oc}$	Источник
<b>Антрацен</b>			
ФК почв	4.21; 4.51	<i>Тушение флуоресценции</i>	[121]
ГК почв	4.57; 4.93; 4.81	—"—"	
ФК вод	4.17	—"—"	[135]
ГК вод	3.25	<i>Твердофазная экстракция</i>	[136]
	4.42	<i>Тушение флуоресценции</i>	[135]
РОВ поверхностных вод	4.20	<i>Диализ</i>	[116]
	4.73; 5.70	<i>Диализ</i>	[114]
	4.60	<i>Увеличение растворимости</i>	[124]
	3.95; 4.87; 3.81; 4.62; 4.21	<i>ОФ-ВЭЖХ (SepPak)</i>	[114]

Источник происхождения ГФК	$\lg K_{oc}$	Метод определения $K_{oc}$	Источник
ГК Aldrich	4.15; 3.95	—" —	[114]
	4.46; 4.39	Диализ	[114]
	4.72	Тушение флуоресценции	[121]
	3.75	Твердофазная экстракция	[136]
<b>Аценафтен</b>			
РОВ поверхностных вод	5.84	Жидкостная экстракция	[119]
<b>Бензантрацен</b>			
РОВ поверхностных вод	5.20	Диализ	[116]
	5.90	Жидкостная экстракция	[119]
ГК Aldrich	5.30	ОФ-ВЭЖХ (SerPak)	[114]
	5.25	Твердофазная экстракция	[136]
<b>Бенз(а)пирен</b>			
ФК пресных вод	4.88	Диализ	[137]
ГК пресных вод	5.30	—" —	[138]
	4.60	—" —	[124]
ГФК морских вод	4.30; 4.82	—" —	[131]
	4.57	—" —	[95]
РОВ поверхностных вод	4.21; 5.10	ОФ-ВЭЖХ (SerPak)	[115]
	5.46	Диализ	[120]
	6.00	Жидкостная экстракция	[119]
ГК Aldrich	6.56	Диализ	[139]
	6.21	—" —	[140]
	6.31	—" —	[141]
	5.23	ОФ-ВЭЖХ (SerPak)	[115]
	5.95	—" —	[133]
	5.95	—" —	[114]
	6.30	Тушение флуоресценции	[141]
<b>Нафталин</b>			
ГК почв	4.45	—" —	[122]
ФК почв	3.10	Диализ	[128]
ГК вод	3.00	Твердофазная экстракция	[136]

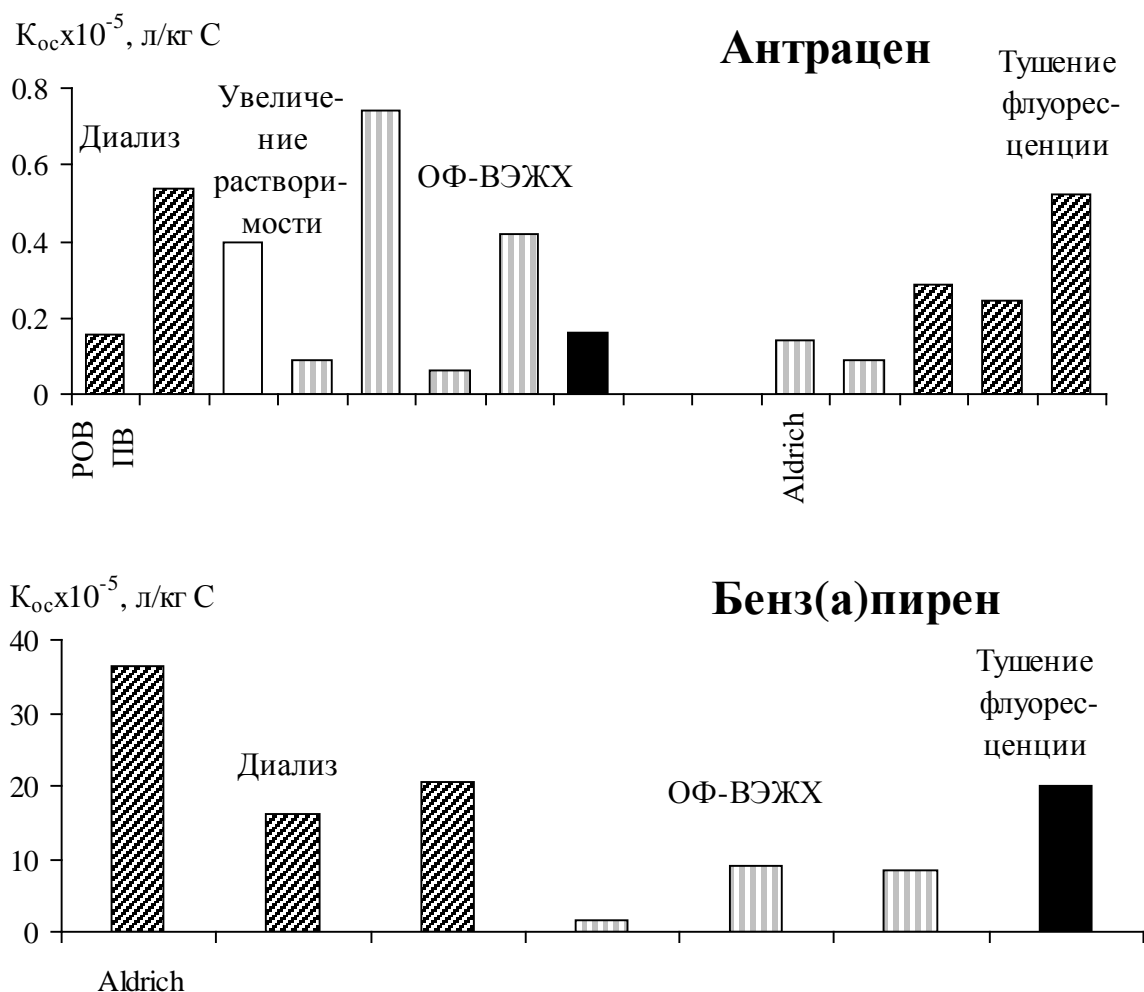
Источник происхождения ГФК	$\lg K_{oc}$	Метод определения $K_{oc}$	Источник
РОВ поверхностных вод	4.87	<i>Жидкостная экстракция</i>	[142]
РОВ почв	4.86	<i>Тушение флуоресценции</i>	[142]
ГК Aldrich	3.5	<i>Твердофазная экстракция</i>	[136]
<b>Пирен</b>			
ФК почв	4.01	<i>Увеличение растворимости</i>	[124]
	4.51; 5.10	<i>Тушение флуоресценции</i>	[121]
	4.10	—"—	[143]
ГК почв	4.81; 4.57; 5.23	—"—	[121]
	5.23	—"—	[143]
	4.33	<i>Увеличение растворимости</i>	[124]
ФК пресных вод	4.21; 4.74; 5.00	<i>Тушение флуоресценции</i>	[121]
	3.88	—"—	[135]
	4.44	—"—	[124]
ГК пресных вод	4.53	—"—	[124]
	4.37	—"—	[135]
	3.70	<i>Твердофазная экстракция</i>	[144]
ГФК моря	3.76	<i>ОФ-ВЭЖХ (SepPak)</i>	[95]
РОВ подземных вод	3.10	<i>Твердофазная экстракция</i>	[144]
РОВ поверхностных вод	4.50 - 5.50	<i>Жидкостная экстракция</i>	[119]
РОВ почв	3.61; 3.61; 3.83; 3.65; 4.18	<i>Тушение флуоресценции</i>	[143]
ГК Aldrich	5.01	—"—	[121]
	4.6	<i>Твердофазная экстракция</i>	[144]
<b>Перилен</b>			
ГК пресных вод	5.98	—"—	[135]
ФК почв	6.20	<i>Поляризация флуоресценции</i>	[123]
РОВ подземных вод	5.83; 4.61; 6.04; 4.61; 6.74; 5.47	<i>Тушение флуоресценции</i>	[133]
	5.42; 4.23; 4.21;	<i>ОФ-ВЭЖХ</i>	[133]

Источник происхождения ГФК	$\lg K_{oc}$	Метод определения $K_{oc}$	Источник
	5.15	( <i>SepPak</i> )	
ГК Aldrich	5.91 5.95; 6.23; 6.38	—" Тушение флуоресценции	[133] [133]
<b>Фенантрен</b>			
ФК почв	4.88	—"	[121]
ГК почв	4.70	—"	[121]
РОВ поверхностных вод	4.64	—"	[121]
РОВ подземных вод	3.31; 4.08; 3.85; 4.91 5.25; 4.81; 4.61; 4.92	ОФ-ВЭЖХ ( <i>SepPak</i> ) Тушение флуоресценции	[133] [133]
ГК Aldrich	3.92 4.78 3.92; 3.99	—" —" ОФ-ВЭЖХ ( <i>SepPak</i> )	[114] [121] [133]
<b>Флуорантен</b>			
ГК почв	4.96	Тушение флуоресценции	[131]
ФК пресных вод	4.59 3.80; 3.90	Увеличение растворимости Твердофазная экстракция	[124] [144]
ГК пресных вод	4.05; 4.35	—"	[144]
РОВ поверхностных вод	5.21	Жидкостная экстракция	[119]
<b>Флуорен</b>			
ГК пресных вод	3.95	Увеличение растворимости	[124]
РОВ поверхностных вод	5.50	Жидкостная экстракция	[119]

Как видно из представленных результатов, величины  $K_{oc}$  существенно различаются в зависимости от используемого метода определения. Согласно приведенным данным, наиболее часто используемыми методами являются диализ, тушение флуоресценции и ОФ-ВЭЖХ. На Рис. 1.3 приведены  $K_{oc}$  некоторых ПАУ для РОВ поверхностных вод и ГК Aldrich, полученные разными методами (по данным Табл. 1.4).

Как видно из рисунка, более высокие значения  $K_{oc}$  дает метод тушения флуоресценции и диализ. Константы связывания, полученные с помощью ОФ-ВЭЖХ имеют более низкие значения. Так, диапазон значений  $K_{oc}$  антрацена, определенных с помощью метода тушения флуоресценции, составил  $(0.2 - 0.8) \times 10^5$ ; с помощью ОФ-ВЭЖХ -  $(0.07 - 0.74) \times 10^5$ , диализа -  $(0.2 - 5) \times 10^5$  л/кг С.

Сравнение значений  $K_{oc}$ , полученных разными методами, проведено также в работах [114, 121, 128]. Авторы [121] при сравнении  $K_{oc}$  антрацена, определенных методом тушения флуоресценции и ОФ-ВЭЖХ, не обнаружили существенной разницы в значениях констант.



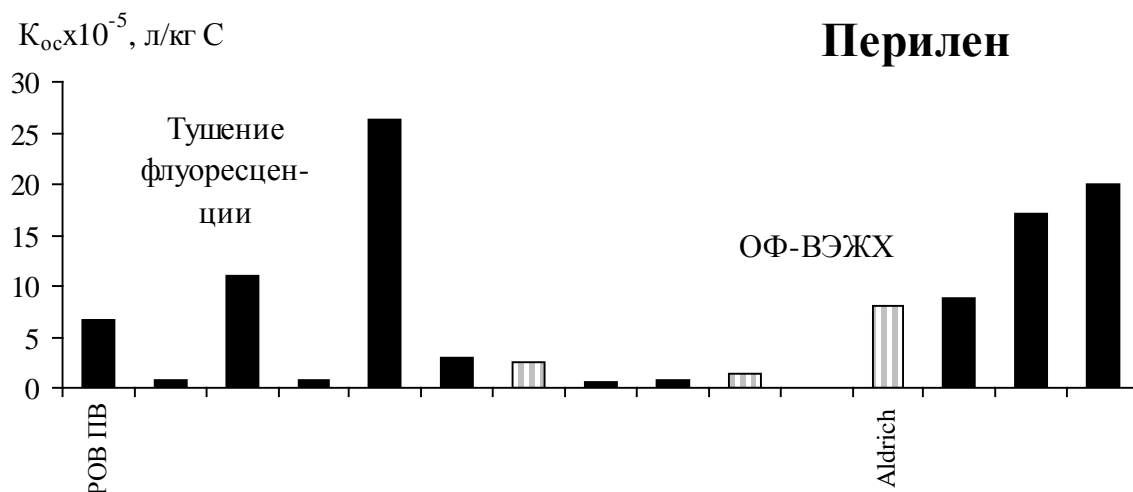


Рис. 1.3. Константы связывания некоторых ПАУ РОВ поверхностных вод и ГК Aldrich, определенные различными методами.

Аналогичные данные были получены в работе [145] при сравнении констант связывания фенантрена различными по происхождению ГФК, определенных методами тушения флуоресценции, ОФ-ВЭЖХ и диализа. Однако авторами [114] с помощью диализа были получены более высокие значения  $K_{oc}$  некоторых ПАУ по сравнению со значениями констант, определенных для тех же гумусовых кислот и ПАУ с использованием картриджей SepPac (ОФ-ВЭЖХ). Подобная зависимость была отмечена в работе [136] при исследовании взаимодействия ГК Aldrich с периленом и фенантrenom методом диализа и ОФ-ВЭЖХ.

Таким образом, как видно из представленного материала существует достаточно большое разнообразие методов, применяемых для количественной оценки степени связывания ПАУ гумусовыми кислотами. Однако сравнение полученных констант, определенных различными методами, не всегда корректно, ввиду наличия погрешностей при использовании того или иного метода. Поэтому при сравнении сродства ГФК к ПАУ необходимо принимать во внимание используемый метод определения  $K_{oc}$ . Кроме того, необходимо применять методы, не нарушающие равновесия в системе ПАУ-ГФК, что снижает погрешности и дает более достоверные оценки.



### 1.3.2. Зависимость констант связывания от свойств ПАУ и гумусовых кислот

Согласно многочисленным исследованиям, реакционная способность ГФК по отношению к ПАУ во многом определяется как гидрофобностью ПАУ ( $\lg K_{ow}$ ), так и источником происхождения ГФК. Исследование влияния гидрофобности ПАУ на их сродство к ГФК проводилось авторами [115, 136, 137, 145]. Отмечено возрастание констант связывания с увеличением гидрофобности ПАУ. Так, диапазон определяемых значений констант связывания наиболее гидрофобных углеводородов - перилена и бенз(а)пирена ( $\lg K_{ow} \sim 6.0$ ) ГФК различного происхождения составил  $(0.2 - 40) \times 10^5$  л/кг С. Для менее гидрофобных ПАУ - антрацена и фенантрена ( $\lg K_{ow} \sim 4.4$ ) наблюдались существенно более низкие  $K_{oc}$ . Диапазон значений  $K_{oc}$  данных ПАУ -  $(0.03 - 1.7) \times 10^5$  л/кг С.

На Рис. 1.5 приведены зависимости констант связывания ряда ПАУ, полученных для ГК Aldrich и ГФК природных вод, от величины  $\lg K_{ow}$ , характерной для ПАУ [136].

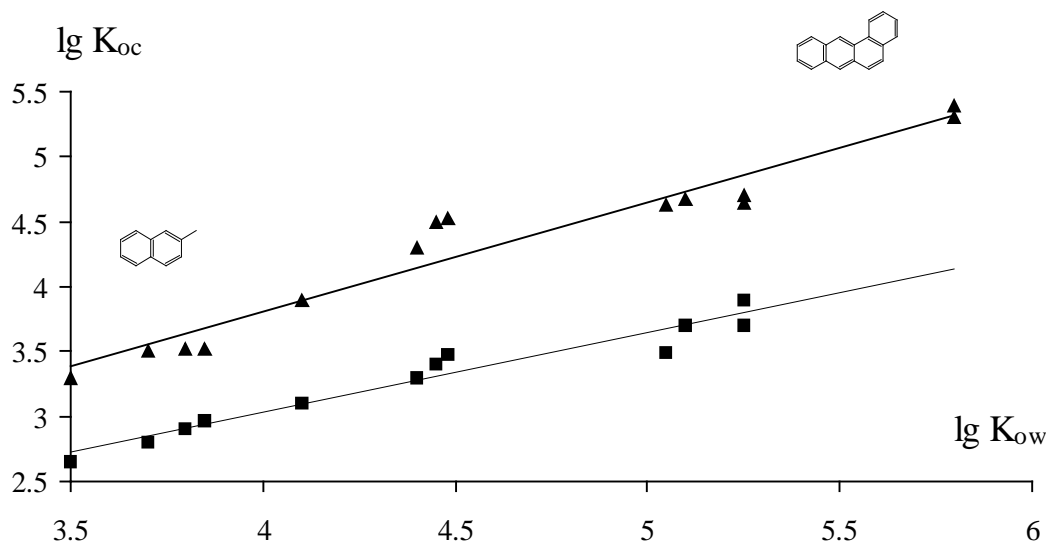


Рис. 1.5. Зависимость констант связывания ПАУ гумусовыми кислотами от гидрофобности ПАУ ( $\lg K_{ow}$ ): **s** - ГК Aldrich; **n** - ГФК природных вод [136].

Как видно из рисунка,  $K_{oc}$  возрастают с увеличением гидрофобности ПАУ. При этом обращает на себя внимание тот факт, что значения  $K_{oc}$

существенно различаются для разных ГФК вне зависимости от ПАУ. Так, в случае связывания ПАУ гуминовыми кислотами Aldrich  $K_{oc}$  значительно выше, чем в случае взаимодействия ПАУ с ГФК природных вод.

Как видно из данных, приведенных в Табл. 1.4 предыдущего раздела, в значениях  $K_{oc}$ , определенных одним и тем же методом для ГФК, выделенных из различных источников, наблюдаются существенные изменения. При этом влияние источника происхождения на величины  $K_{oc}$  прослеживается для всех ПАУ, вне зависимости от величины  $\lg K_{ow}$ . Так, в случае взаимодействия фенантрена с РОВ различных поверхностных вод диапазон значений  $K_{oc}$ , определенных методом тушения флуоресценции, колеблется от  $0.4 \times 10^5$  до  $1.7 \times 10^5$  л/кг С. В случае связывания перилена РОВ поверхностных вод диапазон значений  $K_{oc}$  составляет  $(0.4-11) \times 10^5$  л/кг С.  $K_{oc}$  характеризующие взаимодействие антрацена с ГК различных почв, изменяются от  $0.4 \times 10^5$  до  $0.8 \times 10^5$  л/кг С. Увеличение константы связывания бенз(а)пирена РОВ природных вод на порядок, по сравнению с константой связывания бенз(а)пирена ГК Aldrich наблюдали авторы [115]. Увеличение степени связывания ПАУ гумусовыми кислотами различных природных вод в ряду: ГФК болотных вод > ГФК речных вод > ГФК морских вод было отмечено в работе [148]. При этом содержание ГФК в природных водах различного происхождения изменялось незначительно.

На Рис. 1.6 приведены  $K_{oc}$  пирена и антрацена, полученные в ряде работ для ГФК различного происхождения, определенные методом тушения флуоресценции.

Как видно из представленных данных, стабильно высокие значения  $K_{oc}$  характерны для ГК Aldrich и ГК почв. Более низкие величины  $K_{oc}$  характерны для ГК почв, вод и ГК вод.

Таким образом, сродство ГФК к ПАУ во многом определяется источником происхождения ГФК. По-видимому, это связано с различиями в структуре ГФК, выделенных из различных источников. В связи с этим, выявление структурных параметров ГФК, ответственных за степень

связывания их с ПАУ, необходимо для установления взаимосвязи между структурой и реакционной способностью ГФК по отношению к ПАУ.

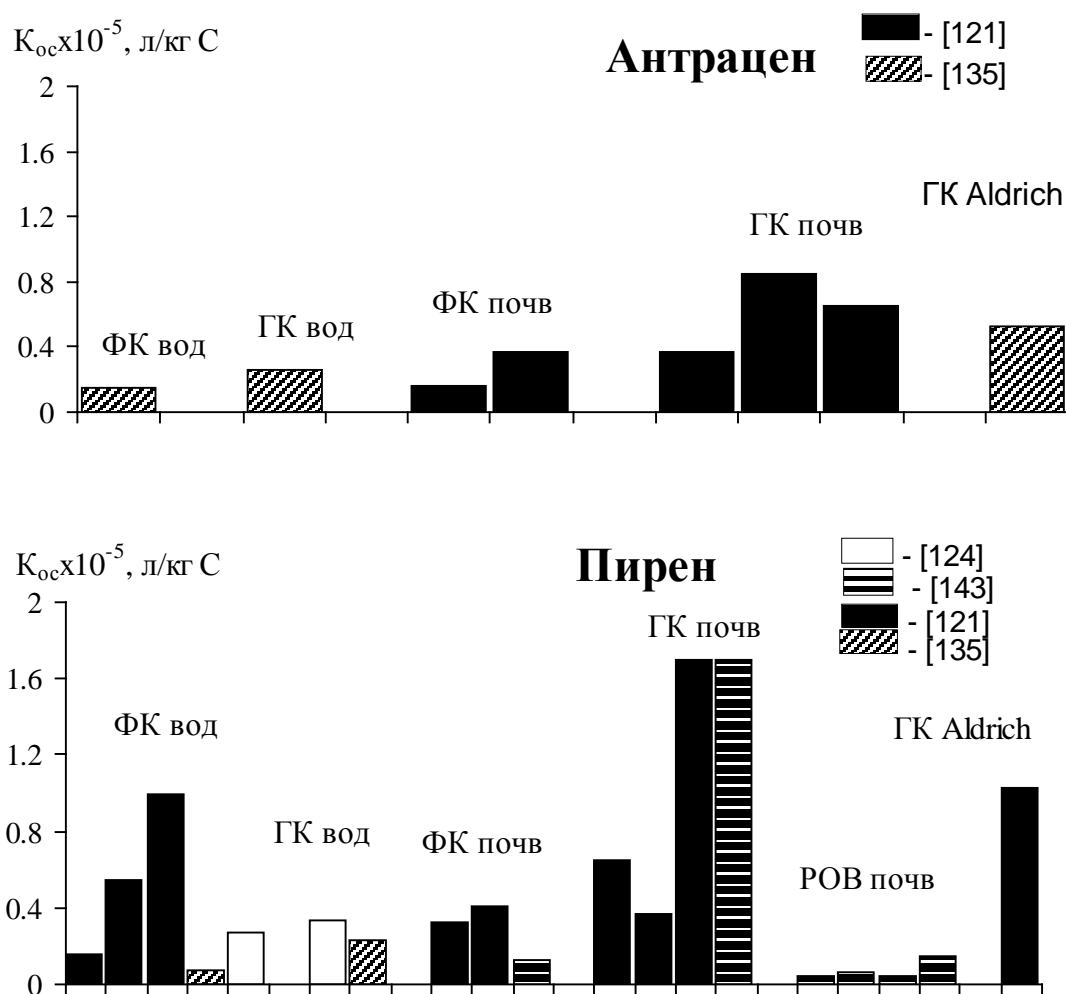


Рис. 1.6. Константы связывания антрацена и пирена ГФК различного происхождения, определенные методом тушения флуоресценции.

### 1.3.3. Взаимосвязь структуры и реакционной способности гумусовых кислот по отношению к ПАУ

Для получения зависимостей “структура-свойство” обычно применяют метод корреляционных соотношений. Данный метод основан на проведении корреляционно-регрессионного анализа между блоком параметров, описывающих структуру исследуемых соединения (так называемых структурных дескрипторов), и физико-химическими параметрами, характеризующими прогнозируемое свойство. Для этих

целей используют дескрипторы состава (атомные отношения и молекулярные массы), химико-топографические (количества, длины и углы связей и др.) и квантово-механические (дипольный момент, поляризуемость и др.), электростатические и др. дескрипторы [146]. Однако существует достаточно ограниченное количество публикаций, посвященных установлению взаимосвязи между структурой и реакционной способностью ГФК по отношению к ПАУ. Нерегулярность строения и нестехиометричность состава ГФК делает невозможным расчет химико-топографических и квантово-химических дескрипторов, обладающих максимальной прогностической способностью. Данное обстоятельство накладывает существенные ограничения на использование метода количественных соотношений для определения зависимости «структура - реакционная способность ГФК» по отношению к ПАУ. Как показал обзор работ, посвященных установлению данной взаимосвязи, для численного описания структуры ГФК используют только дескрипторы состава. При этом выбор последних ограничивается использованием таких дескрипторов, как атомные соотношения, молекулярная масса, коэффициенты молярного поглощения и содержание ароматического углерода. В качестве численной характеристики реакционной способности ГФК используют величины  $K_{oc}$ .

Авторами одной из первых работ [149], посвященной данной проблеме, была показана высокая предсказывающая способность трех параметров ГФК - процентного содержания ароматического углерода ( $C_{Ar}$ ), атомного соотношения Н/С и поглощения при 280 нм ( $ABS_{280}$ ) и величиной  $K_{oc}$  пирена. При этом самый высокий коэффициент корреляции ( $r = 0.99$ ) был получен для  $C_{Ar}$ . Коэффициенты корреляции для  $ABS_{280}$  и Н/С составили 0.97 и 0.97, соответственно. Следует отметить, однако, что приведенные коэффициенты корреляции были получены только для четырех препаратов ГФК и не могут свидетельствовать об общей тенденции. Увеличение размера выборки препаратов до 14 сопровождалось снижением  $r$  до 0.47 и 0.91 для  $ABS_{280}$  и Н/С, соответственно. Аналогичные корреляционные зависимости между параметрами  $C_{Ar}$  и  $ABS_{280}$  и  $K_{oc}$

пирена для пяти препаратов ГФК были получены в работе [150]. Следует отметить, что более часто (по сравнению с  $C_{Ar}$ ) для оценки реакционной способности ГФК к ПАУ используют соотношение Н/С и  $ABS_{280}$ . Это связано со сложностью определения  $C_{Ar}$  с помощью спектроскопии ЯМР  $^{13}C$ .

В работе [116] отмечено наличие тесной корреляции между  $\lg K_{oc}$  бенз(а)пирена и  $ABS_{280}$  и молярным объемом для 12 препаратов РОВ различного происхождения. Соответствующие квадраты коэффициента корреляции ( $r^2$ ) составили 0.90 и 0.58, соответственно. Авторами [139] при исследовании взаимодействия бенз(а)пирена с 19 препаратами РОВ были найдены хорошие корреляции между  $\lg K_{oc}$  и  $ABS_{280}$  и отношением Н/С. Соответствующие  $r^2$  составили 0.76 и 0.58.

В то же время в работах [150, 151] не было отмечено какой-либо значимой зависимости между  $\lg K_{oc}$  бенз(а)пирена и отношением Н/С для семи препаратов ГК и ФК. Для установления взаимосвязи «структура-свойство» данными авторами было предложено использовать соотношения (О+N)/С и Н/О, как параметров, характеризующих полярность и степень окисленности молекул ГФК, соответственно. Соответствующие  $r$  составили 0.79 и -0.81. Уменьшение степени связывания бенз(а)пирена РОВ с возрастанием отношения О/С наблюдали авторы [99, 100]. Однако, в работе [116] отмечается обратная закономерность, а именно, увеличение степени связывания бенз(а)пирена РОВ с увеличением содержания кислорода в последних. Полученные результаты авторы объясняют тем, что диссоциация кислотных групп может способствовать «разворачиванию» молекул гумусовых кислот и тем самым облегчать доступ гидрофобного ПАУ к внутренним гидрофобным областям молекул ГФК. Однако с такой интерпретацией трудно согласиться, так как увеличение заряда макромолекулы приводит, скорее, к обратному эффекту, а именно, уменьшению ее гидрофобности и, как следствие, должно сопровождаться снижением сродства ПАУ к ГФК.

С целью исследования зависимости сродства ГФК к ПАУ от структурны и физико-химических свойств ГФК авторами [116, 152, 153]

было предпринято фракционирование РОВ природных вод по степени их гидрофобности на макроситовых смолах (XAD-8) и оценка способности полученных фракций взаимодействовать с бенз(а)пиреном. Наибольшее связывание наблюдали для гидрофобных кислотных фракций РОВ, характеризующихся высоким содержанием ароматических структур и высокими молекулярными массами. Для гидрофобных нейтральных фракций, с высоким вкладом алифатических структур, сродство к ПАУ было намного ниже. Незначительное взаимодействие наблюдали в случае гидрофильных фракций РОВ, обогащенных гидроксильными и карбоксильными функциональными группами.

Зависимость степени связывания ГФК с ПАУ от молекулярных масс (ММ) ГФК рассмотрена в работах [116, 148, 150, 154-156]. Большинство авторов отмечает увеличение  $K_{oc}$  по мере возрастания молекулярных масс ГФК. Так, уменьшение значений  $K_{oc}$  некоторых ПАУ с РОВ на 45% было отмечено при удалении 10% РОВ с  $MM \geq 100$  КДальтон, очень низкие  $K_{oc}$  наблюдали для фракции РОВ с  $MM \leq 5$  КДальтон [157]. По данным [159] увеличение размеров ГФК может способствовать образованию гидрофобных микрополостей в мицеллоподобных внутримолекулярных структурах ГФК и, следовательно, повышать сродство к ПАУ. Авторы [150, 158] на основании полученной прямой зависимости между ММ и содержанием ароматических фрагментов в структуре ГФК природных вод предположили, что возрастание сродства высокомолекулярных ГФК к ПАУ, по сравнению с низкомолекулярными, обусловлено большим вкладом ароматических фрагментов в структуру высокомолекулярных ГФК. Однако известно, что в силу нерегулярности строения и переменного состава, макромолекулы ГФК с различными ММ могут отличаться по содержанию основных структурных фрагментов. Данный эффект становится более выраженным для ГФК, различающихся по происхождению. В связи с этим, отмеченную тенденцию - возрастание  $K_{oc}$  с увеличением ММ гумусовых кислот, вследствие увеличения вклада ароматических фрагментов, нецелесообразно распространять на все ГФК в целом. Полученная зависимость может нарушаться при переходе от одного

типа ГФК к другому. Так, известно [6], что в случае ГК почв увеличение степени гумификации ГК сопровождается уменьшением их ММ, в связи с отщеплением углеводного комплекса. Данное обстоятельство приводит к возрастанию обогащенности ГК ароматическими фрагментами. В этом случае должна наблюдаться обратная тенденция, а именно, увеличение степени связывания ПАУ данными ГК с уменьшением их ММ.

Таким образом, как видно из вышеприведенного материала, выбор дескрипторов, используемых различными авторами для установления взаимосвязи «структура - реакционная способность ГФК» по отношению к ПАУ достаточно ограничен. Наиболее тесные корреляционные зависимости наблюдаются для прямых ( $C_{Ar}$ ) и косвенных показателей содержания ароматических фрагментов в структуре ГФК. При этом прогностическая способность данных дескрипторов существенно различается. По-видимому, причина такого различия связана с тем, что авторами используются в основном выборки из ограниченного количества препаратов ГФК. Так, наибольшая выборка исследуемых ГФК включала в себя 19 препаратов [121], в то время как наименьшая - только четыре [150]. В связи с этим, для увеличения статистической значимости получаемых зависимостей необходимо использовать большую выборку препаратов ГФК. Кроме того, необходимо разрабатывать новые способы описания структуры ГФК в целях получения новых дескрипторов, обладающих большей прогностической способностью.

Установленные корреляционные взаимосвязи между структурными параметрами ГФК и их связующей способностью по отношению к ПАУ позволили высказать некоторые предположения относительно механизма взаимодействия ГФК и ПАУ. Большинство авторов придерживается мнения об осуществлении гидрофобного связывания между ГФК и ПАУ, включающего в себя Ван-дер-Ваальсово взаимодействие. Согласно [160-162], наличие данного взаимодействия в системе вода - ПАУ - ГФК обусловлено действием энтропийного фактора, а именно, стремлением воды «вытолкнуть» молекулы ПАУ, искажающие пространственную сетку водородных связей и тем самым снижающие энтропию системы. под

воздействием термодинамического градиента, способствующего «выталкиванию» молекул ПАУ из водной среды. Основанием для такой интерпретации, как правило, служит наличие положительной корреляции между  $K_{oc}$  и величиной  $\lg K_{ow}$  соответствующего ПАУ [136, 145] и характеристиками гидрофобности ГФК, к которым относят молекулярную массу, отношение Н/С и др. [116, 149, 150]. Предположение об осуществлении гидрофобного взаимодействия было выдвинуто авторами [149] на основании полученных тесных корреляционных зависимостей между параметрами ароматичности ГФК и их сродством к ПАУ.

В противоположность вышеприведенным гипотезам, авторы [163-167] рассматривают связывание ПАУ гумусовыми кислотами как распределение ПАУ между водной фазой и мицеллоподобными структурами, образуемыми молекулами ГФК. При этом предполагают, что ГФК способны образовывать как меж-, так и внутримолекулярные мицеллоподобные структуры. Согласно [159, 168, 169], в предположении осуществления такого рода механизма полярность (О/С), размер и гибкость молекул ГФК являются наиболее важными параметрами, ответственными за степень связывания ПАУ. Повышенное же содержание ароматических структур в молекулах ГФК, по мнению данных авторов, способствует уменьшению гибкости молекул и предотвращает возможность образования ими внутримолекулярных мицелл. Однако последнее обстоятельство должно приводить к уменьшению степени связывания ПАУ гумусовыми кислотами с возрастанием ароматичности последних, что в действительности не наблюдается. Кроме того, в предположении отмеченного выше механизма, ГФК, как более полярные молекулы, должны проявлять большее сродство к взаимодействию с ПАУ, по сравнению с ГК. Однако в действительности наблюдается обратная тенденция. Авторы полагают, что, по-видимому, в данном случае необходимо рассматривать возможность протекания двух типов механизмов: распределение ПАУ между гидрофобными полостями мицеллоподобных внутримолекулярных структур молекул ГФК и дальнейшее взаимодействие внутри таких



полостей посредством Ван-дер-Ваальсовых сил или же  $\pi$ - $\pi$  взаимодействия.

Уменьшение степени сродства метилированных ГФК к связыванию с некоторыми ПАУ по сравнению с неметилированными позволило авторам [118] выдвинуть гипотезу о существенном вкладе водородных связей в процессы взаимодействия ГФК с ПАУ.

Согласно [134], связывание ПАУ гумусовыми кислотами можно трактовать в терминах “гость-хозяин” по аналогии взаимодействия ПАУ и их производных с синтетическими водорастворимыми макроциклами, имеющими в своем составе гидрофобные полости [170-174]. Следует однако, отметить, что гидрофобные полости в молекулах ГФК были обнаружены только в сухих образцах, полученных вымораживанием водных растворов ГФК [166]. Кроме того, маловероятно, чтобы в разбавленных растворах ГФК с концентрациями, приближающимися к содержанию их в водных экосистемах (0.1-100 мг/л), ГФК находились бы в агрегированном состоянии.

Авторы работы [175] при исследовании взаимодействия водорастворимых ГФК с некоторыми ПАУ наблюдали появление дополнительной полосы в длинноволновой области спектров флуоресценции молекул ГФК при их совместном присутствии с ПАУ. Эксперименты проводились в диметилформамиде, при использовании низких температур. Данный факт позволил авторам предположить образование  $\pi$ -комплексов между реагирующими молекулами, находящимися в триплетном состоянии. Аналогичные выводы были сделаны в работе [176] при исследовании взаимодействия некоторых ПАУ с водорастворимыми ГФК. Образование  $\pi$ -комплексов между молекулами ГФК и ПАУ было подтверждено методом УФ-спектроскопии. К сожалению, в том и другом случае, эксперименты проводились в неводной среде и только для двух препаратов ГФК.

Таким образом, как показывает анализ литературных данных, однозначного мнения о механизме связывания ПАУ гумусовыми кислотами не существует. В целом можно сказать, что взаимодействие в

системе ГФК-ПАУ может включать комплекс процессов с преобладанием одного или нескольких в зависимости от особенностей строения ГФК и характеристик водной среды, в которой осуществляется связывание.

### **1.3.4. Влияние рН и ионной силы на связывание ПАУ гумусовыми кислотами**

Несмотря на достаточно большое количество публикаций, посвященных изучению влияния рН и ионной силы среды на величину константы связывания ПАУ гумусовыми кислотами, имеющиеся сведения весьма противоречивы.

Большинство авторов отмечают уменьшение степени связывания ПАУ гумусовыми кислотами при увеличении рН. Так, изменение  $K_{oc}$  бенз(а)пирена в диапазоне от  $18 \times 10^4$  до  $8.4 \times 10^4$  кг С/л при увеличении рН от 3.5 до 8.5 наблюдали исследователи [177]. Аналогичные данные были получены в работах [121, 178]. Уменьшение констант связывания антрацена, пирена и перилена ГК почв при возрастании рН от 4 до 10 отмечено в работе [134]. При этом наиболее существенное уменьшение наблюдалось для перилена - от  $11.3 \times 10^5$  до  $5.1 \times 10^5$  кг С/л, тогда как для антрацена  $K_{oc}$  практически не изменялись. Значения  $K_{oc}$  пирена уменьшались от  $3.15 \times 10^4$  до  $2.14 \times 10^4$  кг С/л. В случае связывания данных ПАУ ГК соответствующих почв наблюдались в целом подобные тенденции в изменениях величин  $K_{oc}$ . При этом наиболее существенное уменьшение  $K_{oc}$  наблюдалось при увеличении рН от 4 до 7. Для перилена при рН 7 не было зарегистрировано какого-либо связывания с ГК. Уменьшение эффективности тушения флуоресценции антрацена и пирена ГК Aldrich в три раза при изменении рН раствора от 2 до 12 описано в работе [132].

Согласно предположению авторов [134, 135] уменьшение константы связывания ПАУ гумусовыми кислотами по мере возрастания рН может быть обусловлено увеличением заряда макромолекулы, что приводит к их разворачиванию.

В противоположность вышеописанным тенденциям, в работе [140] описывается незначительное изменение константы связывания бенз(а)пирена  $K_{oc}$  различного происхождения при возрастании pH от 5 до 8. Неизменность  $K_{oc}$  перилена ФК в водно-глицериновых растворах при pH 2, 7 и 11 отмечается и в [123]. Кроме того, авторами [144] не было обнаружено какого-либо изменения  $K_{oc}$  нафталина с РОВ при изменении pH. Данный эффект связывают с незначительной степенью взаимодействия РОВ с данным ПАУ.

Таким образом, в литературе имеются достаточно противоречивые сведения о влиянии pH на константу связывания ПАУ гумусовыми кислотами. Большинство авторов отмечают существенное ослабление сродства ГФК к ПАУ с возрастанием pH. Причем степень уменьшения в существенной степени зависит как от источника происхождения ГФК, так и от гидрофобности ПАУ.

Изучению влияния ионной силы на процессы связывания ПАУ гумусовыми кислотами посвящены работы [121, 134, 135, 179, 180].

Авторы [121] сообщают об изменении значений констант связывания пирена почвенными ГК в два раза с возрастанием ионной силы от  $10^{-4}$  до 0.5 М. Характер изменения существенно зависел от состава используемого электролита: при использовании хлорида натрия значения  $K_{oc}$  увеличивались, в то время как в ацетатном буфере - уменьшались. Незначительное увеличение  $K_{oc}$  бенз(а)пирена и фенантрена для РОВ отмечено авторами работы [180] при увеличении солености от 0 до 35 ‰.

Авторами [134] было исследовано одновременное влияние изменения ионной силы и pH раствора на связывание некоторых ПАУ гумусовыми кислотами почв. Полученные данные приведены в Табл. 1.5.

Как видно из таблицы, увеличение ионной силы от 0.001 до 0.1 М NaCl при фиксированном значении pH приводило к уменьшению  $K_{oc}$  перилена и пирена на 20 - 85 % и 30 - 40 %, соответственно. Наибольшее уменьшение  $K_{oc}$  наблюдалось при pH 10. В случае антрацена при pH 4 наблюдали противоположный эффект - увеличение ионной силы приводило к возрастанию  $K_{oc}$  на 20 %.

Увеличение рН от 4 до 10 при фиксированной ионной силе также приводило к уменьшению  $K_{oc}$  на 40 - 95 % в случае взаимодействия пирена и перилена с ГК почв и на 20 - 40 % в случае антрацена. Причем наиболее существенное изменение  $K_{oc}$  наблюдалось при ионной силе 0.1 М. Для ФК также были отмечены подобные тенденции, однако значения  $K_{oc}$  были на порядок ниже, чем для ГК.

Таблица 1.5

Зависимость констант связывания ПАУ гумусовыми кислотами почв (л/кг С) от рН и ионной силы раствора [134]

рН	Ионная сила, М	$K_{oc} \times 10^{-4}$ Антрацен		$K_{oc} \times 10^{-4}$ Пирен		$K_{oc} \times 10^{-5}$ Перилен	
		ГК	ФК	ГК	ФК	ГК	ФК
4	0.001	2.37	1.85	3.15	1.54	11.28	1.49
7	0.001	2.64	1.54	2.33	0.77	9.58	0
10	0.001	2.45	1.74	2.15	0.83	5.1	0
4	0.01	2.6	1.93	2.23	1.42	10.3	1.37
7	0.01	2.37	1.41	1.58	1.6	8.99	0
10	0.01	2	1.67	1.76	0.73	1.95	0
4	0.1	3.19	1.71	2.26	1.2	8.87	1.19
7	0.1	1.74	1.31	1.41	0.65	4.69	0
10	0.1	1.85	1.58	1.41	0.61	0.72	0

Подобные зависимости  $K_{oc}$  от влияния рН и ионной силы были получены авторами [135] при исследовании взаимодействия перилена с ГФК, адсорбированными на поверхности минеральных частиц ( $Al_2O_3$ ). Увеличение ионной силы при рН 4 уменьшало на 30 %  $K_{oc}$  перилена. При рН 7 и 10 не было отмечено какого-либо связывания ПАУ.

Авторы [134] полагают, что изменение рН и ионной силы растворов влияет как на состояние ГФК, так и ПАУ, присутствующих в данных системах. Так, увеличение ионной силы раствора при фиксированном значении рН может приводить, с одной стороны, к электростатическому сжатию макромолекул ГФК и затруднению проникновения молекул ПАУ в

их гидрофобные полости. В этом случае должно наблюдаться уменьшение значений  $K_{oc}$ . С другой стороны, увеличение концентрации электролита в растворе может облегчать подход гидрофобного ПАУ к гидрофобным областям молекул ГФК за счет «солевого эффекта». Последнее обстоятельство может приводить к увеличению значений  $K_{oc}$  в среднем на 20% при изменении концентрации NaCl от 0.001 до 0.1 М. Однако по мнению авторов, первый фактор играет более существенную роль при изменении ионной силы раствора в процессах взаимодействия ГФК с ПАУ, в результате чего наблюдается уменьшение  $K_{oc}$  с увеличением ионной силы.

Возрастание pH среды при фиксированной ионной силе, способствует депротонированию молекул ГФК и увеличению их полярности и оказывает незначительный эффект на поведение ПАУ. В результате наблюдается уменьшение  $K_{oc}$  с увеличением pH среды. Аномальное поведение антрацена, а также независимость степени связывания нафталина с ГФК от pH и ионной силы, отмеченное в работе [144], авторы [134] объясняют небольшими размерами данных молекул по сравнению с другими ПАУ и более свободным проникновением их во внутреннюю полость молекул ГФК.

В работах [127, 134, 178] было отмечено увеличение константы связывания ПАУ гумусовыми кислотами в присутствии  $1 \times 10^{-3}$  М ионов  $Ca^{2+}$  при фиксированной ионной силе. Эффект усиливался с ростом pH и был более выражен в случае взаимодействия ФК, чем ГК с ПАУ. Вероятно, ионы  $Ca^{2+}$  нейтрализуют заряд молекул ГФК при увеличении pH, что способствует увеличению гидрофобности ГФК и, следовательно, возрастанию их сродства к ПАУ.

Таким образом, вышеприведенные результаты указывают на то, что условия эксперимента существенно влияют на величину определяемой константы связывания ПАУ гумусовыми кислотами. Однако имеющиеся данные на этот счет достаточно противоречивы и не позволяют сделать однозначных заключений по поводу влияния водной химии среды на связующую способность ПАУ гумусовыми кислотами. В связи с этим

необходимы дополнительные исследования в этом направлении, предусматривающие использование больших выборок препаратов ГФК различного происхождения с целью получения более достоверных результатов.

## 1.4. Влияние гумусовых кислот на биологическую активность ПАУ

### 1.4.1. Влияние гумусовых кислот на биоаккумуляцию ПАУ водными организмами

Широко известно [55, 56, 182], что ПАУ обладают токсическими, мутагенными, тератогенными и канцерогенными свойствами. Воздействие ПАУ на организмы усугубляется их способностью накапливаться в тканях гидробионтов [56, 183, 184].

Для количественной оценки процессов накопления ПАУ живыми организмами используют коэффициент биоаккумуляции (*BCF*). Данный параметр рассчитывают как отношение равновесных концентраций ПАУ в тканях гидробионтов и в водной среде или же как соотношение скоростей потребления и элиминирования ПАУ водными организмами [183, 185].

Значение *BCF* в существенной степени определяется гидрофобностью ПАУ: чем выше гидрофобность, тем больше *BCF* [183, 184, 186, 187]. Однако от данной зависимости возможны отклонения, обусловленные процессами биотрансформации и деградации ПАУ под действием различных физико-химических факторов, а также присутствием РОВ в водной среде [184, 188-191]. В Табл. 1.6 приведены численные значения коэффициентов биоаккумуляции некоторых ПАУ дафниями (*Daphnia magna*).

Как видно из таблицы, высокие *BCF* характерны для наиболее гидрофобных бенз(а)пирена и хризена с  $\lg K_{ow} \cong 6$ . Минимальным значением *BCF* характеризуется нафталин, для которого  $\lg K_{ow} \cong 3.4$ . Представленные в таблице данные могут служить прямым подтверждением высказанному выше утверждению, о том, что коэффициент биоаккумуляции увеличивается с возрастанием гидрофобности соответствующего ПАУ.

Наиболее чувствительными к токсическому действию ПАУ являются ракообразные, полихеты и, в меньшей степени, рыбы. Такую закономерность авторы [188] объясняют увеличением метаболизма ПАУ по мере возрастания трофического уровня организма. Однако скорость

выведения образующихся метаболитов из организма намного медленнее, чем нетрансформированных ПАУ.

Таблица 1. 6

Коэффициенты биоаккумуляции ПАУ *Daphnia magna*.

ПАУ	<i>BCF</i>	Ссылка
Антрацен	400	[192]
	512	
	970	
Бенз(а)антрацен	2920	
	10261	
	3000	
Бенз(а)пирен	3050	[193]
	8000	[187]
	5770	
	5500	[192]
Нафталин	40	
	19	
Пирен	2700	
	2200	[194]
Фенантрен	600	
	324	
Флуорантен	1700	
Хризен	5500	
	6100	

Взаимодействие ГФК с ПАУ является одним из основных факторов, влияющих на биоаккумуляцию ПАУ водными организмами. Это связано с тем, что образование комплексов ГФК-ПАУ в значительной степени снижает долю ПАУ, находящихся в свободно растворенном состоянии и уменьшает их биодоступность [178].

Так, авторы [193, 195] наблюдали уменьшение аккумуляции некоторых ПАУ дафниями от 25 до 95% в присутствии ГК Aldrich. Аналогичные данные были получены авторами [117, 194, 196] в присутствии РОВ природных вод. Однако в работе [178] не было отмечено значительного снижения степени аккумуляции фенантрена моллюсками в



присутствии РОВ морских вод. О снижении накопления ПАУ амфиподами в присутствии ГФК различного происхождения сообщается в работах [125, 126]. Авторы [197] сообщают об уменьшении *BCF* флуорантена рыбами от 33 до 70% в присутствии различных концентраций РОВ (0.5 - 5.0 мг С/л).

Согласно данным работы [178], существенное уменьшение биоаккумуляции ПАУ в присутствии ГФК наблюдается лишь для углеводородов с  $\lg K_{ow}$  выше 4. В случае менее гидрофобных ПАУ для заметного снижения *BCF* необходимы более высокие концентрации ГФК. На Рис. 1.7 показана зависимость снижения *BCF* в присутствии ГФК в зависимости от типа ПАУ.

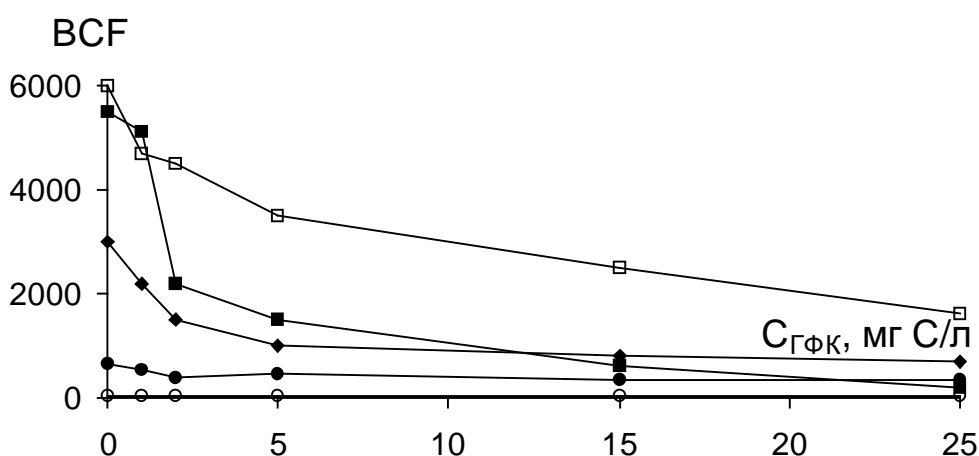


Рис. 1.7. Коэффициенты биоаккумуляции некоторых ПАУ в присутствии ГК Aldrich (тест-объект - дафнии): **п** - бенз(а)пирен, **u** - бензантрацен, **l** - антрацен, **I** - нафталин; **o** - бенз(а)пирен в присутствии РОВ торфяных болот. По данным [117, 192].

Как видно из рисунка, коэффициент биоаккумуляции 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 [126, 117] 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.

На Рис. 1.8 приведены зависимости, демонстрирующие эффект уменьшения биоаккумуляции бенз(а)пирена в присутствии ГФК различного происхождения.

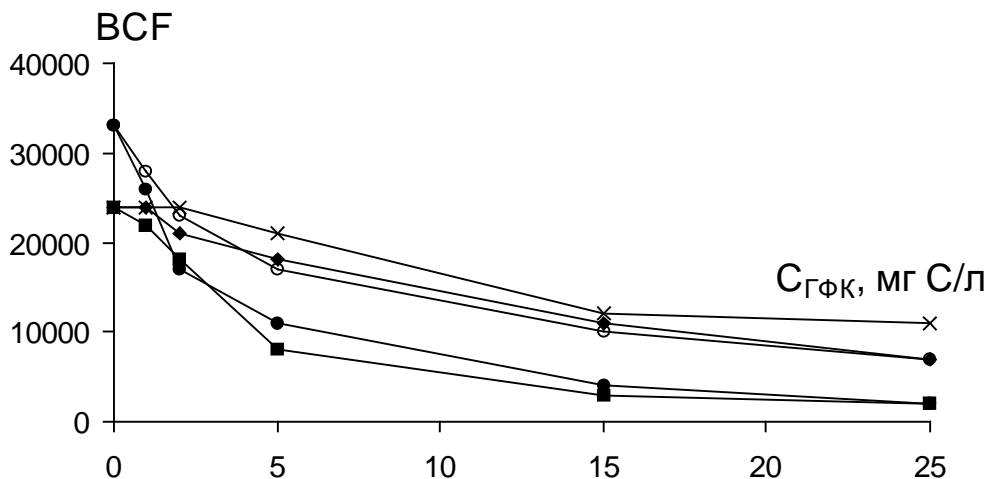


Рис. 1.8. Коэффициенты биоаккумуляции бенз(а)пирена в присутствии ГФК различного происхождения (тест-объект - нематоды): n - РОВ marsh, u - РОВ swamp, \* - РОВ point pelee, I - ГК природных вод, o - ФК подземных вод. По данным [192].

Как видно из рисунка, снижение *BCF* бенз(а)пирена существенно зависит от источника происхождения ГФК. Так, присутствие ГК природных вод и РОВ marsh вызывает более существенное уменьшение *BCF* по сравнению с ФК подземных вод и РОВ болотных вод. При этом наиболее существенное уменьшение наблюдается в диапазоне низких концентраций ГФК (~0.5-5 мг С/л). Подобные зависимости снижения *BCF* от источника происхождения ГФК были получены авторами [117]: присутствие ГК Aldrich (0.15 мг С/л) вызывало уменьшение *BCF* бенз(а)пирена на 20% для дафний, в то время как добавление РОВ природных вод практически не влияло на накопление ПАУ.

Согласно предположениям некоторых исследователей [157, 178, 192, 198], влияние источника происхождения ГФК на биоаккумуляцию ПАУ водными организмами связано с особенностями структуры ГФК

различного происхождения, которые обуславливают различное сродство ГФК к ПАУ. Для подтверждения данного факта авторами [153] было предпринято фракционирование РОВ природных вод по степени их гидрофобности на макроситовых смолах (ХАД-8) и проведена оценка способности полученных фракций влиять на биоаккумуляцию ПАУ. Согласно полученным результатам, наиболее существенное уменьшение *BSCF* наблюдалось в присутствии кислотной фракции РОВ, проявляющей наибольшее сродство к ПАУ и характеризующейся высоким содержанием ароматических структур и высокими молекулярными массами. Способность нейтральной фракции уменьшать аккумуляцию ПАУ была намного ниже. При этом данная фракция характеризовалась незначительной связующей способностью ПАУ и высоким вкладом алифатических структур. Для достижения эффекта снижения коэффициента накопления ПАУ, наблюдаемого в присутствии гидрофобной кислотной фракции РОВ, требовался пятикратный избыток гидрофильной фракции РОВ.

Авторами [152] была исследована зависимость уменьшения *BSCF* некоторых ПАУ в присутствии РОВ различного происхождения от содержания гидрофобных кислотных фракций и параметров, характеризующих ароматичность ГФК: поглощения при 280 нм и соотношения Н/С. Наиболее значительное снижение аккумуляции ПАУ наблюдалось для РОВ, которые характеризовались наибольшим вкладом ароматических фрагментов в их структуру и содержанием гидрофобных фракций. Полученные результаты могут служить подтверждением гипотезы о том, что снижение накопления ПАУ в присутствии ГФК обусловлено связыванием ПАУ гумусовыми кислотами.

Однако, наряду с данными об уменьшении биоаккумуляции ПАУ в присутствии ГФК, в работе [153] сообщается об увеличении накопления нафталина в 2-3 раза под воздействием РОВ в концентрации до 4 мг С/л. Подобный эффект отмечен и в работе [198] в случае аккумуляции бенз(а)пирена в присутствии 20 мг С/л РОВ различного происхождения. Предполагают, что полученные результаты могут быть связаны с

непосредственным воздействием РОВ на дафнии, хотя специально данный вопрос не изучался.

Для количественной оценки влияния ГФК на степень накопления ПАУ водными организмами используют кинетическую и термодинамическую модели.

Термодинамическая модель. Данная модель позволяет оценить коэффициент аккумуляции ПАУ в гидробионтах в присутствии и в отсутствие ГФК. В основе модели лежит предположение о доступности для биоты только растворенной формы ПАУ [117, 125, 141, 192]. Исходя из данной гипотезы, можно записать следующее выражение для коэффициента биоаккумуляции ПАУ в присутствии ГФК ( $BCF_{ПАУ-ГФК}$ ):

$$BCF_{ПАУ-ГФК} = \alpha \times BCF \quad (1.10)$$

где  $\alpha$  - доля ПАУ, находящегося в растворенном состоянии.

Выражая  $\alpha$  из уравнения (1.4), и подставляя полученное уравнение в (1.10), получаем:

$$BCF_{ПАУ-ГФК} = BCF \times \frac{1}{1 + K_{oc} \times C_{ГФК}} \quad (1.11)$$

Таким образом, термодинамическая модель позволяет рассматривать биоаккумуляцию ПАУ в водных организмах в присутствии ГФК как функцию сродства ГФК к ПАУ, концентрации ГФК в системе и гидрофобности ПАУ (ввиду наличия взаимосвязи между  $BCF$  и  $\lg K_{ow}$ ).

В Табл. 1.7 приведены рассчитанные по уравнению (1.11) и определенные экспериментальным путем  $BCF$  нафталина и бенз(а)пирена дафниями в присутствии различных концентраций РОВ.

Таблица 1.7

Рассчитанные и экспериментальные  $BCF$  нафталина и бенз(а)пирена в присутствии различных концентраций РОВ (тест-организм - дафнии) [152]

ПАУ	РОВ (мг С/л)	$BCF_{ПАУ-ГФК}$ эксп.	$BCF_{ПАУ-ГФК}$ расщ.
Бенз(а)пирен	0	5990±680	-
	1	4690±790	5240
	2	4480±560	4650

ПАУ	РОВ (мг С/л)	$BCF_{ПАУ-ГФК}$ эксп.	$BCF_{ПАУ-ГФК}$ расщ.
	5	3540±1090	3480
	15	2460±340	1900
	25	1620±550	1300
Нафталин	0	37±4	-
	5	60±20	37
	10	30±2	36
	25	30±4	35
	50	26±3	34

Как видно из таблицы, между рассчитанными и экспериментальными значениями  $BCF_{ПАУ-ГФК}$  наблюдается хорошее соответствие, что подтверждает вышеприведенную гипотезу о доступности для биоты только свободно растворенной формы ПАУ.

Многокомпонентная кинетическая модель. Данная модель позволяет оценить влияние ГФК на скорость накопления ПАУ водными организмами. Согласно данной модели общее количество ПАУ в водной среде рассматривается как распределенное между растворенной, связанной с ГФК и аккумулированной биотой формами ПАУ. Потребление и элиминирование ПАУ описываются соответствующими константами скоростей [117, 185]. При этом для оценки степени накопления ПАУ в водных организмах используют следующее выражение:

$$dC_a/dt = (k_u \times D_w) + (k_s \times S_w) - (k_d \times C_a) \quad (1.12)$$

где  $C_a$  - концентрация ПАУ в организме (нг/г);  $D_w$  и  $S_w$  - количество свободного и связанного с ГФК ПАУ, соответственно (нг/г);  $k_u$  и  $k_s$  - константы скорости потребления свободного и связанного с ГФК ПАУ, соответственно ( $ч^{-1}$ );  $k_d$  - константа элиминирования ПАУ ( $ч^{-1}$ ).

Уменьшение скорости потребления различных ПАУ гидробионтами при увеличении концентрации ГФК различного происхождения было отмечено многими исследователями [117, 126, 141, 142, 178, 184]. При этом скорость потребления ( $k_u$ ) и элиминирования ПАУ ( $k_d$ ) в присутствии ГФК во многом определялась как гидрофобностью ПАУ, так и степенью их связывания с ГФК. Особо следует отметить, что для всех исследованных

ПАУ, во всем диапазоне концентраций используемых ГФК значения  $k_s$  были статистически неотличимы от нуля, что может свидетельствовать об отсутствии потребления комплекса ГФК-ПАУ. Незначительное уменьшение скорости потребления антрацена и фенантрена (20 %) амфиподами в присутствии 20 мг/л ГК Aldrich авторы [126] связывают с низкой степенью взаимодействия данных ПАУ с ГК.

Следовательно, справедлива исходная гипотеза о том, что гидробионтами накапливается только свободно растворенная форма ПАУ. Недоступность связанной формы ПАУ можно объяснить тем, что образующийся комплекс ГФК-ПАУ более полярен и имеет размеры, значительно превышающие размеры свободно растворенных ПАУ. Это затрудняет проникновение комплекса через мембраны клеток, а также уменьшает количество свободного ПАУ, взаимодействующего с поверхностью мембран [199]. Данный вывод подтверждается также результатами [125] о наличии обратной корреляции между  $K_{oc}$  различных ПАУ и концентрацией ГФК, вызывающей 50 %-ное уменьшение скорости

#### **1.4.2. Влияние ГФК на токсичность ПАУ**

Вследствие низкой водной растворимости ПАУ проявляют, в основном, хроническую токсичность, которая тем выше, чем больше гидрофобность соответствующего ПАУ. При этом острый токсический эффект, вызываемый более гидрофобными ПАУ, наблюдался только в концентрациях, превышающих предел их водной растворимости [55, 56]. Примеры токсического воздействия ПАУ на некоторые водные организмы приводятся ниже.

Авторами работы [55] отмечено стимулирующее действие целого ряда ПАУ на рост водорослей *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* при концентрации ПАУ 10 - 20 мкг/л. В работе [187] наблюдали увеличение степени ингибирования роста морских красных водорослей по мере возрастания дозы от 10 до 300 мкг/л производных бенз(а)антрацена. Авторы [56] отмечали резкое подавление роста бактерий *Es-chrichia Coli* и

*Serratia marinorubra* в присутствии  $10^{-5}$  -  $10^{-7}$  М некоторых ПАУ. Причем ингибирующее действие нафталина на рост бактерии при концентрации 12.8 мг/л было сопоставимо с действием бенз(а)пирена при концентрации 5 мкг/л. Данными авторами также отмечено ингибирование фотосинтеза различных водорослей в присутствии 1 - 20 мкг/л нафталина на 40 - 90 %.

Зависимость воздействия фенантрена (200 мкг/л) и нафталина (125 - 500 мкг/л) на выживаемость крабовых личинок от температуры и солености среды исследована в [56]. О возможном токсическом воздействии некоторых ПАУ на активность питания, скорость фильтрации и потребление кислорода водными организмами сообщалось в работах [56, 142]. Так, бенз(а)пирен в концентрации 0.2 - 1.0 мкг/л вызывал значительное уменьшение скорости фильтрации моллюсков; нафталин и фенантрен замедляли дыхание некоторых гидробионтов в диапазоне мг/л ПАУ.

В литературе описано два основных механизма токсического воздействия ПАУ на гидробионты. Один из них обусловлен высокой растворимостью ПАУ в липидах и непосредственным взаимодействием ПАУ с различными электронодефицитными центрами мембранных поверхностей по механизму переноса заряда. Другой механизм обусловлен взаимодействием метаболитов ПАУ, образующихся в реакциях окисления как кислородом воздуха, так и ферментами клеток, с клеточными структурами [56, 181, 200]. Метаболиты ПАУ, будучи более гидрофильными и электрофильными, способны к образованию ковалентных связей со многими клеточными структурами [181, 182, 201].

В литературе имеются сведения о фототоксичности ПАУ по отношению к различным водным организмам [202-208]. При этом фототоксичность проявляется при концентрациях ПАУ, значительно ниже их водной растворимости. Так, в работе [208] отмечено уменьшение концентрации ПАУ, вызывающей 50 %-ную гибель организмов ( $LC_{50}$ ), пропорционально времени облучения их водных растворов. Согласно предположению авторов работ [209, 210], фототоксичность могут проявлять лишь те ПАУ, для которых разность энергий между занятой

высшей молекулярной орбиталью и низшей незанятой составляет 6.5 - 8.0 эВ, причем максимальный эффект проявляется для  $7.1 \pm 0.4$  эВ. Кроме того, фототоксичность ПАУ во многом зависит как от длины волны возбуждающего света, так и от времени их облучения [200].

В качестве возможных механизмов в литературе приводятся следующие [209, 210]: непосредственное взаимодействие между возбужденной молекулой ПАУ и биомолекулой организма; образование комплекса с переносом заряда между триплетным состоянием ПАУ и основным состоянием кислорода, сопровождающееся образованием синглетного кислорода. Последний способен оказывать токсическое действие на мембранную поверхность клеток. Кроме того, предполагают, что увеличение токсичности некоторых ПАУ при облучении УФ-светом связано с образованием свободных радикалов и пероксидов ПАУ.

При достаточно большом количестве работ, посвященных влиянию ГФК на биоаккумуляцию ПАУ, токсичность ПАУ в присутствии ГФК изучена крайне недостаточно.

Так, авторы работы [208] отмечали уменьшение фототоксичности 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 [197] при исследовании влияния данных ГК на фототоксичность флуорантена для рыб в диапазоне концентраций данного ПАУ от 4.8 до 34 мкг/л.

Согласно предположению, высказанному в работах [197, 199, 208], возможным механизмом воздействия ГФК на фототоксичность ПАУ является их способность поглощать УФ-излучение солнечного света.

Следует отметить, что при оценке токсичности ПАУ в присутствии ГФК исследователи не рассматривают непосредственного влияния самих ГФК на тест-объект. При этом в литературе имеются малочисленные и достаточно противоречивые сведения о физиологической активности ГФК различного происхождения и фракционного состава на водные организмы. Имеющиеся данные на этот счет посвящены в основном исследованию



влияния ГФК на рост дафний и их выживаемость при низких рН. Так, согласно [211-214], низкие концентрации ГФК (0.1 - 10 мг С/л) увеличивали выживаемость дафний при рН 5 на 60 %, в то время как повышение их концентрации до 22 мг С/л приводило к противоположному эффекту. При рН 7 не было отмечено какого-либо влияния ГФК. В работе [215] авторы наблюдали повышение выживаемости дафний рН 6 в присутствии 7 - 20 мг С/л ГФК. Авторами [212] сообщается о токсическом воздействии низкомолекулярных ФК на *D. magna*. Получение подобной информации о влиянии ГФК на тест-организмы в присутствии ПАУ, возможно, внесло бы определенный вклад в рассмотрение проблемы механизма изменения токсичности ПАУ в присутствии ГФК.

\*\*\*

Рассмотренный литературный материал позволяет сделать следующие выводы:

Существует достаточно большое разнообразие методов, применяемых для количественной оценки степени связывания ПАУ гумусовыми кислотами. Однако сравнение полученных констант, определенных различными методами, не всегда корректно, ввиду наличия погрешностей при использовании того или иного метода. При этом способы описания реакционной способности ГФК по отношению к ПАУ не позволяют получить характеристик, имеющих явный термодинамический смысл.

Данные по влиянию условий эксперимента на величины определяемых констант связывания ПАУ гумусовыми кислотами достаточно противоречивы и не позволяют сделать однозначных заключений по этому поводу.

Выбор дескрипторов для установления взаимосвязи «структура - реакционная способность ГФК» по отношению к ПАУ достаточно ограничен. Прогностическая способность данных дескрипторов существенно различается. При этом для установления взаимосвязи

«структура - свойства ГФК» по отношению к ПАУ используются в основном выборки из ограниченного количества препаратов ГФК.

Данные о механизме взаимодействия ГФК с ПАУ достаточно противоречивы.

ГФК могут уменьшать токсичность ПАУ для водных организмов, однако количественная взаимосвязь между реакционной способностью и снижением токсичности ПАУ в присутствии ГФК отсутствует.

В связи с этим целью данной работы было комплексное исследование влияния гумусовых кислот на поведение ПАУ в водной среде, включающее в себя химические и токсикологические аспекты наблюдаемых эффектов, а также установление природы детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к ПАУ

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 2. 1. Характеристика объекта исследования

Для проведения экспериментов по исследованию взаимодействия ГФК с ПАУ было использовано 28 препаратов ГФК, имеющих в распоряжении нашей группы. Выборка образцов охватывала основные источники происхождения ГФК - верховые и низинные торфа, почвы различной зональности (черноземы, дерново-подзолистые (П<sup>Д</sup>), серые лесные (Л)) и сельско-хозяйственного использования (огородные, пахотные, целинные) и природные воды. Кроме того, в работе использованы два коммерческих препарата угля.

Твердые препараты ГФК почв, торфа и угля представляли собой аморфные порошки от темно-желтого до черного цвета, более светлая окраска была характерна для образцов водного происхождения и ФК почв.

Исследование растворимости препаратов показало, что они практически нерастворимы в бензоле, хлороформе, хлористом метиле, пиридине, ТГФ, эфире, ограниченно растворимы в полярных апротонных растворителях (ДМСО и ДМФА) и дистиллированной воде, но обладают значительной растворимостью в растворах щелочей (до 20 г/л). Препараты не имели фиксированной точки плавления и разлагались при нагревании свыше 150 °С.

Все препараты были охарактеризованы методами элементного анализа, гель-хроматографии, УФ-спектрофотометрии и спектроскопии ЯМР <sup>13</sup>С.

Содержание С, Н, N в препаратах определяли методами количественного полумикроанализа. В связи с гигроскопичностью твердых препаратов ГФК и наличием в них несгораемого остатка (зольности), обусловленного присутствием Na, K, Ca, Mg, Fe, SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и др., была проведена корректировка первичных данных элементного анализа на несгораемый остаток и равновесную влажность препаратов. Зольность определяли ручным сжиганием при 750 °С, влажность - по обратному набору веса после высушивания образца в вакууме.

В целях корректировки на несгораемый остаток данные элементного анализа пересчитывали на органическое вещество, то есть на беззольную часть препарата.

Содержание кислорода в препаратах ГФК рассчитывали по разности между общей массой органического вещества в препарате и массой остальных элементов:  $O = 100\% - \Sigma(\%C, \%H, \%N, \%S)$ .

Полученные результаты элементного анализа в пересчете на беззольное безводное вещество приведены в Табл. 2.1.

Как видно из Табл. 2.1, ГФК различного происхождения характеризуются существенно различным элементным составом. Так, содержание углерода возрастает в ряду: ФК почв < ГФК вод <ГК почв <ГФК торфов << ГК углей. Для образцов водного происхождения характерно более высокое содержание кислорода, которое снижается в вышеприведенном ряду. Из данных элементного анализа рассчитывали атомные соотношения Н/С и О/С, которые являются косвенными характеристиками, соответственно, ненасыщенности и окисленности молекул ГФК. Для водных ГФК атомные соотношения Н/С лежат в диапазоне от 0.86 до 1.14, О/С - от 0.54 до 1.00; для торфяных образцов диапазон Н/С составляет 0.89-1.01, О/С - 0.48-0.62; почвенные ГК характеризуются соотношениями Н/С и О/С, диапазоны значений которых изменяются от 0.51 до 1.1 и от 0.39 до 0.78, соответственно. Для ФК почв диапазоны Н/С и О/С составляют 0.81-1.06 и 0.63-0.91. Н/С и О/С для ГК угля - ~0.73 и ~0.31. Более низкие соотношения Н/С в ГК угля и почв говорят о большем содержании в них ароматических фрагментов. При этом характерное для водных ГФК и ФК почв более высокое отношение О/С предполагает повышенное содержание в этих препаратах кислородсодержащих функциональных групп.

Таблица 2.1

Характеристики выделенных препаратов гумусовых кислот

Препарат ГФК	Источник происхождения	Содержание элементов (% масс)				H <sub>2</sub> O %	Золь- ность %	Атомные соотноше- ния		ε* <sub>280</sub> л/мгС ×см	ММ КДэ
		С	Н	N	О			Н/С	О/С		
<b>ГК почв</b>											
НВW	П <sup>Д</sup> лес, Москва	50.2	3.9	4.7	41.2	12.4	8.9	0.93	0.57	0.08	12.2
НВWN	П <sup>Д</sup> лес, Новгород	57.2	4.5	4.1	34.3	7.2	8.7	0.95	0.45	0.09	14.3
НВР	П <sup>Д</sup> пашня, Москва	58.9	4.2	3.9	33.0	11.9	6.3	0.86	0.39	0.07	16.2
НВG	П <sup>Д</sup> огород, Москва	52.6	4.4	4.4	38.6	12.1	22.0	1.1	0.53	0.11	17.3
НGW	Л лес, Тула	43.8	3.6	4.2	48.4	9.8	1.0	0.97	0.78	0.07	16.4
НGR	Л пашня, Тула	49.5	3.6	4.5	42.3	12.4	6.8	0.88	0.62	0.08	14.5
НС	Ч луг., Воронеж	58.3	3.1	4.8	33.8	12.3	9.7	0.62	0.39	0.07	12.0
НST	Ч тип., Воронеж	56.2	2.3	3.8	37.7	11.6	4.1	0.51	0.48	0.12	12.6
<b>ФК почв</b>											
FBW	П <sup>Д</sup> лес, Москва	42.9	3.2	1.8	52.0	8.6	13.9	0.90	0.91	0.04	7.9
FBR	П <sup>Д</sup> пашня, Москва	45.9	4.1	4.4	45.6	8.2	7.0	1.06	0.74	0.04	7.9
FBG	П <sup>Д</sup> огород, Москва	46.8	3.6	3.1	46.5	9.2	8.0	0.92	0.75	0.03	10.6
FGW	Л лес, Тула	50.1	4.1	3.8	42.1	10.1	4.5	0.98	0.63	0.04	11.0
FST	Ч тип., Воронеж	50.2	3.4	3.7	42.6	8.6	4.2	0.81	0.64	0.05	9.6
<b>ГФК почв</b>											

SEL	Ч тип., Ставрополь	50.2	4.3	3.8	41.0	7.5	8.7	1.15	0.57	0.03	13.6
<b>ГФК торфа</b>											
T1	Верховой, фускум	54.6	4.6	2.1	38.7	8.1	2.4	1.01	0.48	0.07	18.5
T4	Верховой, сфагнум	52.6	4.3	2.6	40.1	7.3	1.5	1.07	0.55	0.06	18.5
T5	Верховой, сфагнум-	53.6	4.4	2.5	39.4	8.2	3.0	0.98	0.54	0.06	16.4
T6	Верховой, пушица	54.3	4.2	1.3	40.3	7.6	3.3	0.93	0.53	0.03	18.2
T7	Верховой, древесный	53.8	4.2	2.1	39.9	9.1	4.0	0.93	0.52	0.07	18.2
HTL	Верховой, древесно- травяной	55.3	4.1	2.4	38.1	9.3	1.4	0.89	0.49	0.05	17.3
TTL	Низинный, древесный	55.4	4.1	2.7	37.8	8.5	2.1	0.89	0.48	0.06	19.8
HTW	Водный экстракт верхового торфа	49.7	5.0	1.1	44.1	11.2	1.2	1.21	0.62	0.02	6.3
<b>ГФК природных вод</b>											
FMX	р.Москва	50.5	4.4	2.6	42.5	7.1	2.4	1.14	0.54	0.03	6.1
FMC	р.Москва	47.4	4.7	2.6	45.2	6.6	4.8	1.21	0.62	0.02	6.4
WM3X	р.Сев. Двина	40.2	4.7	1.4	53.3	6.3	23.0	1.41	1.00	0.04	6.6
SWA	Болотная вода	43.2	3.1	-	-	7.8	19.6	0.86	0.93	0.03	-
<b>Коммерческие ГК угля</b>											
ANA	ГК Aldrich	68.6	4.3	1.2	26.1	13.7	27.0	0.74	0.28	0.12	13.0
AGK	ГК АО Спецбиотех	64.0	3.9	0.6	30.4	11.7	14.6	0.73	0.34	-	18.5

Спектральные характеристики ГФК исследовали методом УФ-спектрофотометрии. Для этой цели измеряли эффективный коэффициент поглощения  $\epsilon^*_{280}$ , представляющий собой оптическую плотность при 280 нм, отнесенную к массовой концентрации ГФК в расчете на органический углерод. Данные коэффициенты могут служить характеристиками ненасыщенности молекул ГФК. Значения полученных коэффициентов приведены в Табл. 2.1.

Исследование оптических свойств растворов ГФК показало, что более высокие значения  $\epsilon^*_{280}$  характерны для ГК почв и торфяных ГФК, что указывает на их большую ненасыщенность [6]. Для ГФК вод и ГК почв  $\epsilon^*_{280}$  были значительно меньше. Средние значения для ГФК вод и ГК почв составили ~0.04 и 0.05 л/мг Схсм, соответственно.

Средние молекулярные массы (ММ) используемых препаратов ГФК определяли гель-хроматографически с калибровкой по полидекстранам. Полученные значения пиковых ММ (определяемых по времени удерживания, соответствующего положению максимума на гель-хроматограмме) приведены в Табл. 2.1. Как видно из таблицы, препараты ГФК значительно различаются по молекулярным массам. Так, для торфяных препаратов она составляет:(в килодальтонах, КДа) - 16.4 - 19.8, для почвенных ГК - 12.0-17.3, для почвенных ГК - 7.9-11.0 и для водных ГФК - около 6.5. Обращают на себя внимание низкие значения молекулярных масс ГК черноземов по сравнению с дерново-подзолистыми

и серыми лесными почвами. По-видимому, это является следствием того, что макромолекулы ГК серых лесных и дерново-подзолистых почв имеют в своем составе менее трансформированные полисахаридные цепочки, тогда как в черноземных ГК, в результате высокой микробиологической активности среды их формирования, достигается самая высокая степень деградации углеводного комплекса.

Распределение углерода между различными структурными фрагментами для большинства выделенных препаратов ГФК было охарактеризовано методом спектроскопии ЯМР  $^{13}\text{C}$ . Выбору условий и количественной обработке спектров ГФК посвящена диссертационная работа сотрудника нашей группы Ковалевского Д.В., защищенная в 1998 году [24]. К сожалению, из-за недостаточных количеств препаратов, соответствующие данные по большинству водных ГФК и фульвокислотам почв получить не удалось. Данные по  $^{13}\text{C}$  ЯМР-исследованию препаратов ГФК приведены в Табл. 2.2.

Согласно Табл. 2.2, содержание ароматического углерода в исследуемых классах ГФК уменьшается в ряду: ГК угля > ГК почв > ГФК торфа > ГФК природных вод. При этом максимальное содержание ароматического углерода среди ГК почв (54-55%) наблюдается для ГК черноземов, тогда как в ГК дерново-подзолистых и серых лесных почв оно не превышает 45-47%. Минимальным содержанием углеводных фрагментов характеризуются ГК черноземов (13%) и коммерческие препараты угля (6%). Высокая обратная корреляция между содержанием углеводных и ароматических фрагментов ( $r = -0.91$ ) свидетельствует о том, что увеличение доли ароматических фрагментов в структуре ГФК в значительной степени обуславливается отщеплением полисахаридов. Содержание алкильного углерода выше для ГФК природных вод и ГК угля, в то время как их наименьшее количество обнаружено в ГК почв.

Полученная структурная информация хорошо согласуется с известным положением о том, что черноземные ГК представляют собой продукт более глубокой гумификации, которому присуща меньшая химическая гетерогенность [6]. На молекулярном уровне это проявляется в обогащенности черноземных ГК ароматическими фрагментами и уменьшении вклада углеводной периферии в структуру молекулы.

Таблица 2.2

Распределение углерода в структуре ГФК по данным спектроскопии ЯМР  $^{13}\text{C}$ 

Препарат ГФК	Доля углерода в составе фрагментов, %						$\Sigma C_{Ar}$	$\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$
	$C_{C=O}$	$C_{COOH(R)}$	$C_{Ar-O}$	$C_{Ar-H(R)}$	$C_{Alk-O}$	$C_{Alk-H(R)}$		
<b>ГК почв</b>								
HBW	1	17	13	32	20	18	45	1.19
HBWN	2	15	13	30	20	20	43	1.07
HBP	2	16	12	32	21	17	44	1.16
HBG	1	15	13	33	21	17	46	1.21
HGW	1	19	13	34	16	17	47	1.42
HGP	3	15	12	34	18	19	46	1.24
HS	2	14	9	48	14	14	57	2.04
HST	3	16	11	43	15	13	54	1.93
<b>ГФК почв</b>								
SEL	1	18	13	32	22	14	45	1.25
<b>ГФК торфа</b>								
T1	1	15	10	29	25	20	39	0.87
T4	1	16	12	31	24	16	43	1.08
T5	1	16	10	27	22	24	37	0.81
T6	2	15	10	38	22	14	48	1.31
T7	2	17	15	34	18	15	49	1.52
HTL	2	15	14	31	20	17	45	1.22
TTL	3	15	13	32	20	17	45	1.21
HTW	4	11	3	13	58	15	16	0.22
<b>ГФК природных вод</b>								
FMX	2	19	11	25	19	24	36	0.84
<b>Коммерческие ГК угля</b>								
ANA	1	15	13	43	7	21	56	2.0
AGK	1	17	17	48	4	21	48	2.32

Согласно литературным данным (разд. 1.1), содержание ароматических фрагментов в структуре ГФК может служить одним из важнейших параметров, определяющих их способность к связыванию с ПАУ. В связи с этим количественная оценка ароматичности ГФК важна для предсказания их связывающей способности по отношению к ПАУ. Традиционным подходом для оценки содержания ароматического углерода в молекулах ГФК является расчет косвенных показателей: атомного соотношения Н/С и эффективного коэффициента поглощения  $\epsilon^*_{280}$ . Нами было проведено сопоставление данных по процентному содержанию ароматического углерода в молекулах ГФК, полученных методом спектроскопии ЯМР  $^{13}\text{C}$ , с косвенными параметрами ароматичности. Для этих целей был проведен корреляционный анализ косвенных и прямых параметров ароматичности.

В качестве параметров ароматичности, получаемых обработкой спектра ЯМР  $^{13}\text{C}$ , нами были выбраны следующие:

$C_{\text{Ar-H(R)}}$  - процентное содержание незамещенных или С-замещенных атомов ароматического углерода;

$\Sigma C_{\text{Ar}} = C_{\text{Ar-O}} + C_{\text{Ar-H(R)}}$  - суммарное содержание ароматического углерода в ГФК;

$\Sigma C_{\text{Ar}} / \Sigma C_{\text{Alk}}$  - соотношение суммарного содержания ароматического и алифатического углерода. Показатель  $\Sigma C_{\text{Alk}} = C_{\text{Alk-O}} + C_{\text{Alk-H,R}}$  представляет собой общее содержание алифатического углерода в молекулах ГФК. Соотношение  $\Sigma C_{\text{Ar}} / \Sigma C_{\text{Alk}}$  использовали как показатель вклада ароматического каркаса ГФК по сравнению с алифатической периферией в структуру их макромолекул. Данное соотношение может также служить характеристикой гидрофильно-гидрофобного баланса макромолекул ГФК.

В качестве косвенных параметров ароматичности использовали атомное соотношение Н/С и  $\epsilon^*_{280}$  (Табл. 2.1).

Результаты корреляционного анализа косвенных и прямых параметров ароматичности приведены в Табл. 2.3.



Таблица 2.3

Коэффициенты корреляции ( $r$ ) между прямыми и косвенными параметрами ароматичности ГФК ( $n = 20$ )

	$C_{Ar-H(R)}$	$\Sigma C_{Ar}$	$\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$	H/C	$\epsilon^*_{280}$
$C_{Ar-H(R)}$	1				
$\Sigma C_{Ar}$	0.96	1			
$\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$	0.97	0.95	1		
H/C	-0.75	-0.69	-0.71	1	
$\epsilon^*_{280}$	0.58	0.62	0.59	-0.68	1

Как видно из Табл. 2.3, наиболее тесная корреляционная взаимосвязь наблюдается между соотношением H/C и прямыми параметрами ароматичности  $C_{Ar-H(R)}$ ,  $\Sigma C_{Ar}$  и  $\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$ . Соответствующие обратные коэффициенты корреляции составляют -0.75, -0.69 и -0.71, что указывает на статистическую достоверность исследуемых взаимосвязей при  $P = 0.99$ . Это подтверждает адекватность использования H/C для характеристики обогащенности молекул ГФК ароматическими фрагментами. В то же время взаимосвязь между  $\epsilon^*_{280}$  и  $C_{Ar-H(R)}$ ,  $\Sigma C_{Ar}$  и  $\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$  оказалась гораздо слабее, но также статистически достоверной при  $P = 0.99$ : соответствующие коэффициенты корреляции составляли 0.58, 0.62 и 0.59. Следовательно, использование соотношения H/C для характеристики содержания ароматических фрагментов в структуре ГФК более предпочтительно, чем  $\epsilon^*_{280}$ .

Адекватность использования H/C и  $\epsilon^*_{280}$  как косвенных параметров, характеризующих содержание ароматического углерода в органических соединениях, была также проверена на наборе 33 модельных кислородсодержащих ароматических и алифатических кислот. С этой целью в аналогичных условиях были экспериментально определены соответствующие  $\epsilon^*_{280}$ , а соотношения H/C и  $C_{Ar}$  рассчитаны из соответствующих формул (Приложение 1). Результаты корреляционного анализа полученных данных приведены в Табл. 2.4.

Таблица 2.4

Коэффициенты корреляции ( $r$ ) между параметрами ароматичности модельных органических кислот ( $n = 33$ )

	$\epsilon^*_{280}$	H/C	$C_{Ar}$
$\epsilon^*_{280}$	1		
H/C	-0.27	1	

$C_{Ar}$	0.31	-0.79	1
----------	------	-------	---

Как видно из данных Табл. 2.4, для модельных кислот существует хорошая корреляция ( $r = - 0.8$ ) между соотношением Н/С и содержанием ароматического углерода  $C_{Ar}$ . При этом значимой корреляции между  $\epsilon^*_{280}$  и  $C_{Ar}$  обнаружено не было. Отсутствие корреляции между  $\epsilon^*_{280}$  и истинным содержанием ароматического углерода ( $C_{Ar}$ ) в случае модельных кислот и наличие ее для ГФК может свидетельствовать о существовании данной взаимосвязи только внутри группы соединений со сходным функциональным составом и характером замещения ароматических колец.


Таким образом, вышеприведенные результаты показывают, что при отсутствии данных спектроскопии ЯМР  $^{13}C$  о содержании ароматического углерода в структуре ГФК, для оценки данного параметра можно использовать как величину соотношения Н/С, так и  $\epsilon^*_{280}$ . При этом использование атомного соотношения Н/С - предпочтительнее, так как позволяет получать более достоверные оценки.

## 2.2. Изучение связывающей способности ГФК по отношению к ПАУ

### 2.2.1. Определение констант связывания ПАУ гумусовыми кислотами

Изучение связывающей способности ГФК по отношению к ПАУ проводили на примере трех представителей этого класса соединений - пирена (Py), флуорантена (Flt) и антрацена (An). Основные физико-химические характеристики используемых ПАУ приведены в Табл. 2.5.

Таблица 2.5  
Основные физико-химические характеристики модельных ПАУ по данным [57, 60]

ПАУ	Структура	$T_{mp}$ $^{\circ}C$	$T_{bp}$ $^{\circ}C$	Растворимость в воде, мкг/л ( $25^{\circ}C$ )	Давление паров, ( $20^{\circ}C$ )	$lg K_{ow}$	I, (эВ)
Пирен		149	360	135	$6.85 \cdot 10^{-7}$	5.18	7.55
Флуорантен		110	-	265	$0.60 \cdot 10^{-6}$	5.22	7.8
Антрацен		216	340	30	$1.96 \cdot 10^{-4}$	4.44	7.44

Для исследования связывания ПАУ гумусовыми кислотами был использован метод тушения флуоресценции. Данный метод позволяет определять степень связывания ПАУ гумусовыми кислотами путем измерения концентрации свободной и связанной форм ПАУ без их предварительного разделения. Кроме того, использование данного метода не требует определения точной концентрации ПАУ в растворе [134]. Расчет констант связывания ПАУ гумусовыми кислотами ( $K_{oc}$ ) проводили с помощью уравнения Штерна-Фольмера (1.7), вывод которого приведен в обзоре литературы.

Для определения  $K_{oc}$  измеряли интенсивности флуоресценции растворов ПАУ в отсутствие ( $F_0$ ) и в присутствии ( $F$ ) различных концентраций ГФК. С этой целью готовили концентрационные серии ГФК в присутствии постоянной концентрации ПАУ. Концентрация ПАУ составляла  $5 \times 10^{-7}$ ,  $6.4 \times 10^{-7}$  и  $1.7 \times 10^{-7}$  М для Py, Flt и An, соответственно. Концентрации ГФК варьировали от 0.5 до  $7 \times 10^{-6}$  кг С/л.

На Рис. 2.1. приведены типичные спектры флуоресценции Py в присутствии различных концентраций ГФК. Типичные концентрационные зависимости тушения флуоресценции ПАУ гумусовыми кислотами различного происхождения приведены на Рис. 2.2.

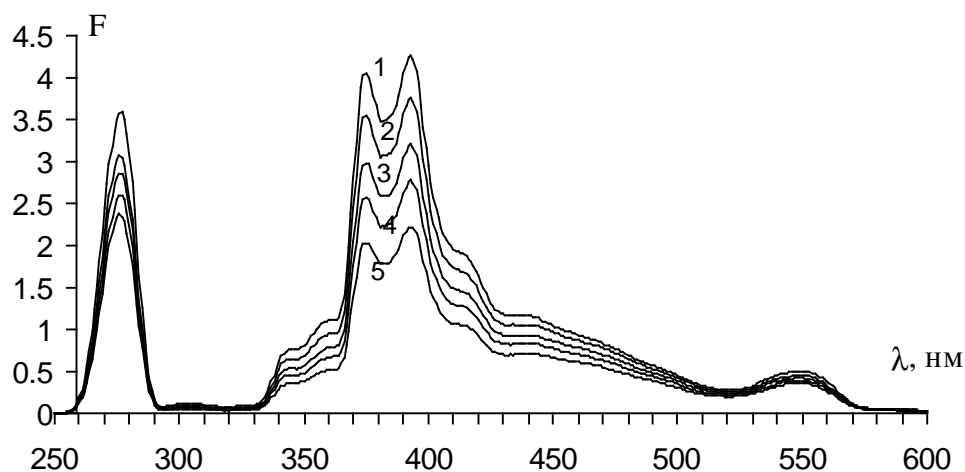


Рис. 2.1. Спектры флуоресценции Py в присутствии различных концентраций ГФК: 1 - 0 мг С/л, 2 - 1 мг С/л, 3 - 3 мг С/л, 4 - 5 мг С/л, 5 - 7 мг С/л.

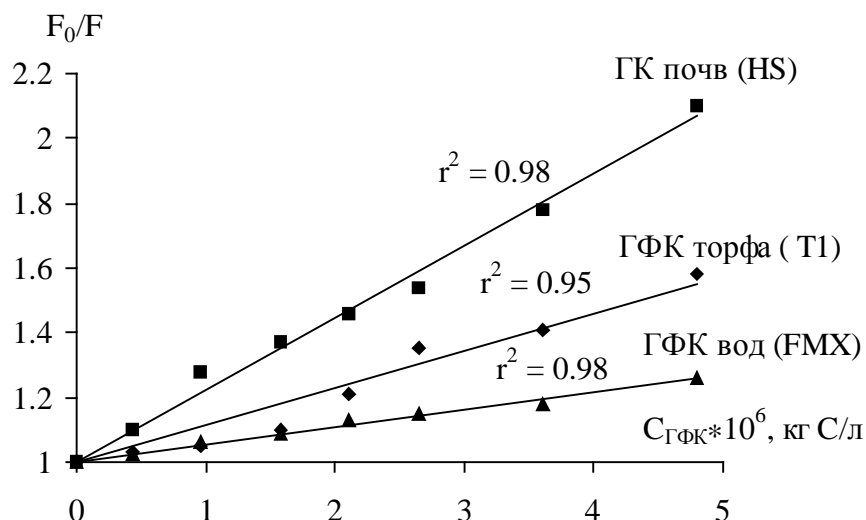


Рис. 2.2. Тушение флуоресценции  $F_0$  в присутствии различных концентраций ГФК различного происхождения.

Как видно из данных Рис. 2.2, в исследуемом диапазоне концентраций ГФК полученные зависимости линейны.

Рассчитанные по уравнению Штерна-Фольмера значения констант и их доверительные интервалы приведены в Табл. 2.6.

Таблица 2.6

Константы связывания ПАУ гумусовыми кислотами различного происхождения

Препарат ГФК	$K_{oc} \times 10^{-5}$ , л/кг С		
	Пирен	Флуорантен	Антрацен
<b>ГК почв</b>			
HBW	$1.0 \pm 0.1^*$	$0.8 \pm 0.1^*$	$< 0.1^{**}$
HBWN	$1.3 \pm 0.1$	$0.8 \pm 0.1$	$0.5 \pm 0.1^*$
HBP	$1.2 \pm 0.2$	$0.8 \pm 0.1$	$0.5 \pm 0.1$
HBG	$0.7 \pm 0.1$	$0.5 \pm 0.1$	$< 0.1$
HGW	$1.4 \pm 0.5$	$0.9 \pm 0.2$	$0.5 \pm 0.2$
HGP	$1.8 \pm 0.2$	$1.2 \pm 0.1$	$0.7 \pm 0.1$
HS	$2.2 \pm 0.2$	$1.3 \pm 0.2$	$1.0 \pm 0.1$
HST	$2.4 \pm 0.3$	$1.6 \pm 0.3$	$1.0 \pm 0.4$
<b>ФК почв</b>			
FBW	$0.13 \pm 0.08$	$< 0.1$	$< 0.1$
FBP	$< 0.1$	$< 0.1$	$< 0.1$
FBG	$< 0.1$	$< 0.1$	$< 0.1$

Препарат ГФК	$K_{oc} \times 10^{-5}$ , л/кг С		
	Пирен	Флуорантен	Антрацен
FGW	0.5±0.1	0.3±0.1	<0.1
FST	1.1±0.2	0.7±0.1	<0.1
<b><i>ГФК почв</i></b>			
SEL	1.0±0.1	0.6±0.1	0.5±0.1
<b><i>ГФК торфа</i></b>			
T1	1.2±0.2	0.9±0.2	0.12±0.05
T4	1.4±0.1	0.9±0.1	0.22±0.05
T5	0.8±0.2	0.6±0.2	0.16±0.03
T6	0.7±0.1	0.7±0.1	0.25±0.07
T7	1.7±0.1	1.1±0.2	0.6±0.2
HTL	1.4±0.2	0.9±0.2	0.5±0.1
TTL	1.0±0.2	0.8±0.1	<0.1
HTW	<0.1	<0.1	<0.1
<b><i>ГФК природных вод</i></b>			
FMC	<0.1	<0.1	<0.1
FMX	0.7±0.1	0.5±0.1	<0.1
WM3X	0.4±0.1	0.2±0.1	<0.1
SWA	1.2±0.2	0.9±0.2	<0.1
<b><i>Коммерческие ГК угля</i></b>			
АНА	2.3±0.3	1.8±0.2	1.0±0.2

\*± доверительный интервал для n = 7, P = 0.95; \*\* минимально определяемое значение  $K_{oc}$

Как видно из таблицы, рассчитанные с помощью метода тушения флуоресценции  $K_{oc}$  лежат в диапазоне  $(0.1 - 2.5) \times 10^5$ ,  $(0.2 - 1.7) \times 10^5$  и  $(0.1 - 1.0) \times 10^5$  л/кг С для Py, Flt и An, соответственно. Полученные значения хорошо согласуются с  $K_{oc}$  приводимыми в литературе. Так, согласно [121, 124, 134, 145, 149], диапазон полученных с помощью метода тушения флуоресценции  $K_{oc}$  Py составляет  $(0.2 - 5.5) \times 10^5$  л/кг С и  $(0.2 - 0.6) \times 10^5$  л/кг С для An. Диапазон значений констант связывания Flt гуминовыми кислотами почв  $(0.7 - 1.6) \times 10^5$  л/кг С, определенных в данной работе, соответствует  $K_{oc}$  Flt  $(0.9 \times 10^5$  л/кг С), полученными авторами [131].

Для оценки минимально определяемых величин  $K_{oc}$  использовали 3S критерий [217]. Для этой цели по результатам трех параллельных

измерений рассчитывали стандартное отклонение минимального из всех определенных значений константы. Умножая полученную величину на три, получали минимально определяемое значение  $K_{oc}$ . Наименьшим значением характеризовалось связывание An препаратом T1. Величины соответствующей  $K_{oc}$  и стандартного отклонения составили  $0.12 \times 10^5$  и  $0.034 \times 10^5$  л/кг С. Поэтому минимально определяемое значение  $K_{oc}$  составило  $0.1 \times 10^5$  л/кг С.

Как видно из представленных данных значения  $K_{oc}$  Py и Flt превышают таковые для An. По-видимому, такая разница обусловлена более высокой гидрофобностью Py и Flt ( $\lg K_{ow} \sim 5.2$ ) по сравнению с An ( $\lg K_{ow} \sim 4.4$ ). Аналогичные закономерности получены в [121, 146, 158].

По величине  $K_{oc}$  препараты ГФК различного происхождения можно расположить в следующий ряд:

ГК Aldrich  $\cong$  ГК чернозема > ГК Л и П<sup>Д</sup> почв > ГФК торфов >  
> ГФК природных вод > ФК чернозема > ФК Л и П<sup>Д</sup> почв

Наибольшее сродство к ПАУ было зафиксировано для ГК Aldrich ( $2.3 \times 10^5$ ,  $1.7 \times 10^5$  и  $1 \times 10^5$  л/кг С для Py, Flt и An, соответственно), а также ГК черноземов. ГК П<sup>Д</sup> и Л почв также характеризовались высокими  $K_{oc}$ , но в среднем их значения были ниже на 20% по сравнению с ГК черноземов. Для торфяных ГФК значения  $K_{oc}$  были ниже в среднем на 30-40% по сравнению с ГК почв. Относительно низкими константами связывания характеризовалось взаимодействие водных ГФК с модельными ПАУ. Так, в случае An не было зафиксировано тушения флуоресценции ни с одним из водных препаратов. Это означает, что соответствующие константы были ниже минимально определяемой величины ( $0.1 \times 10^5$  л/кг С). Для Py и Flt связывание наблюдалось только для препаратов WM3X, FMX и SWA. Водная вытяжка торфа не вызывала тушения флуоресценции ни одного из ПАУ. Аналогичный эффект наблюдался и в случае ФК почв. Исключение составили ФК, выделенные из чернозема типичного (FST), а также препарат FGW. Значения данных констант были в среднем в 2-3 раза ниже по сравнению с соответствующими ГК почв. Полученные результаты согласуются с данными авторов [121, 140, 149].

Таким образом, как видно из представленных данных сродство ГФК к ПАУ определяется как свойствами ПАУ, так и источником происхождения ГФК. Наблюдаемые различия в величинах  $K_{oc}$  в зависимости от источника происхождения ГФК, по-видимому, связаны с особенностями строения соответствующих ГФК. Для подтверждения

данного предположения необходимо было установить количественные соотношения между структурными параметрами ГФК и их сродством к связыванию с ПАУ.

### **2.2.2. Установление количественной взаимосвязи между структурой и константами связывания ПАУ гумусовыми кислотами**

Для установления взаимосвязи между структурой и связывающей способностью ГФК по отношению к ПАУ использовали метод количественных соотношений, основанный на проведении корреляционно-регрессионного анализа между блоком параметров, описывающих структуру (так называемых молекулярных дескрипторов) и свойства соединения [218]. Как было показано в литобзоре, в связи с нерегулярностью строения и нестехиометричностью состава ГФК для численного описания их структуры используют только дескрипторы состава. Наряду с традиционно используемыми дескрипторами состава для установления взаимосвязи между структурой и реакционной способностью ГФК по отношению к ПАУ, такими как данные по элементному составу, молекулярные массы и эффективные коэффициенты поглощения (Табл. 2.1), нами были использованы дескрипторы состава, которые включали в себя данные по распределению углерода между основными структурными фрагментами (Табл. 2.2). Для описания структуры ГФК были использованы индивидуальные и комбинированные  $^{13}\text{C}$  ЯМР-дескрипторы. В качестве индивидуальных дескрипторов использовали содержание углерода в соответствующем структурном фрагменте ГФК; комбинированные дескрипторы представляли собой суммы, произведения или отношения индивидуальных дескрипторов. Так, в качестве комбинированных дескрипторов ароматического каркаса использованы:  $\Sigma C_{\text{Ar}}/\Sigma C_{\text{Alk}}$ ; отношение  $C_{\text{Ar-O}}/\Sigma C_{\text{Ar}}$ , характеризующее степень окисленности ароматического каркаса;  $C_{\text{Ar-H,R}} \times C_{\text{COO}}$  и  $C_{\text{Ar-H,R}} \times C_{\text{Alk}}$ , отражающие степень замещенности ароматического каркаса карбоксильными и алкильными группами, соответственно и др. Для описания сродства ГФК к ПАУ были использованы величины  $K_{\text{oc}}$ , численно характеризующие связывающую способность ГФК (Табл. 2.6.).

Важно отметить, что данные по элементному составу, молекулярным массам и коэффициентам поглощения были получены для 26 препаратов

ГФК, тогда как  $^{13}\text{C}$  ЯМР исследование было проведено только для 19 препаратов. Это определило различие размеров блоков данных, использованных для получения тех или иных корреляционных зависимостей.

В Табл. 2.7 приведен ряд основных индивидуальных и комбинированных  $^{13}\text{C}$  ЯМР-дескрипторов, использованных в нашей работе, и соответствующие коэффициенты корреляции ( $r$ ) с  $K_{oc}$ .

Как видно из приведенных данных, для всех трех ПАУ наиболее тесная взаимосвязь наблюдается между  $K_{oc}$  и параметрами ароматичности:  $\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$ ,  $C_{Ar-H,R}$  и  $\Sigma C_{Ar}$ .

Таблица 2.7

Коэффициенты корреляции между  $^{13}\text{C}$  ЯМР-дескрипторами и  $K_{oc}$  пирена, флуорантена и антрацена

Параметры	$K_{oc}^{Py}$	$K_{oc}^{Flt}$	$K_{oc}^{An}$
$C_{C=O}$	0.46	0.48	0.37
$C_{COOH(R)}$	0.08	0.07	-0.04
$C_{Ar-O}$	0.40	0.43	0.23
$C_{Ar-H(R)}$	0.90	0.84	0.78
$C_{Alk-O}$	-0.72	-0.75	-0.54
$C_{Alk-H(R)}$	-0.18	-0.08	-0.28
$\Sigma C_{Alk}$	-0.77	-0.78	-0.63
$\Sigma C_{Ar}$	0.89	0.85	0.72
$C_{Ar-O}/\Sigma C_{Ar}$	0.23	0.19	0.36
$\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$	0.92	0.87	0.84
$C_{Ar-H(R)}+C_{Alk-H(R)}/C_{Alk-O}$	0.71	0.77	0.65
$C_{Ar-H(R)}/C_{Alk-O}$	0.75	0.81	0.71
$C_{Ar-H,(R)} \times C_{COO(H,R)}$	0.76	0.75	0.65
$C_{Ar-H,(R)} \times C_{Alk}$	0.63	0.72	0.48

Для  $\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$  (Рис.2.4) и  $C_{Ar-H,R}$  (Рис.2.5) соответствующие  $r^2$  составляют 0.86, 0.78, 0.71 и 0.84, 0.73, 0.62 для Py, Flt, An. Зависимости между  $K_{oc}$  и  $\Sigma C_{Ar}$  характеризуются немного более низкими значениями  $r^2$  (0.81, 0.73 и 0.53, соответственно).

Полученные результаты свидетельствуют об определяющей роли ароматического каркаса в процессах связывания ПАУ гумусовыми кислотами. При этом наиболее тесная взаимосвязь между  $K_{oc}$  и параметром



$\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$  указывает на то, что большим сродством к ПАУ обладают ГФК с меньшим содержанием углеводных фрагментов. По-видимому, это является следствием того, что отношение  $\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$  характеризует также гидрофобно-гидрофильный баланс молекул ГФК. Чем больше содержание ароматических фрагментов, тем выше гидрофобность макромолекул ГФК и выше их сродство к гидрофобным молекулам ПАУ.

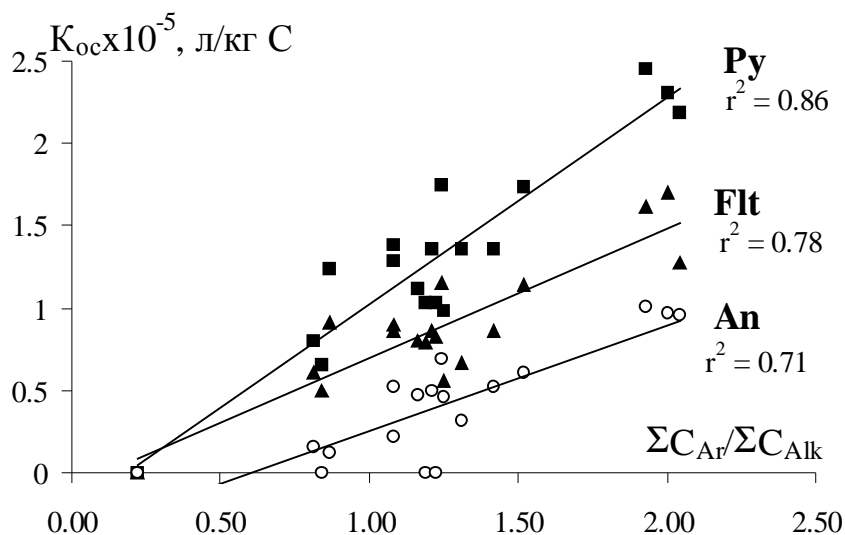


Рис. 2.4. Зависимость  $K_{oc}$  пирена, флуорантена и антрацена от соотношения ароматических и алифатических фрагментов в молекулах ГФК.

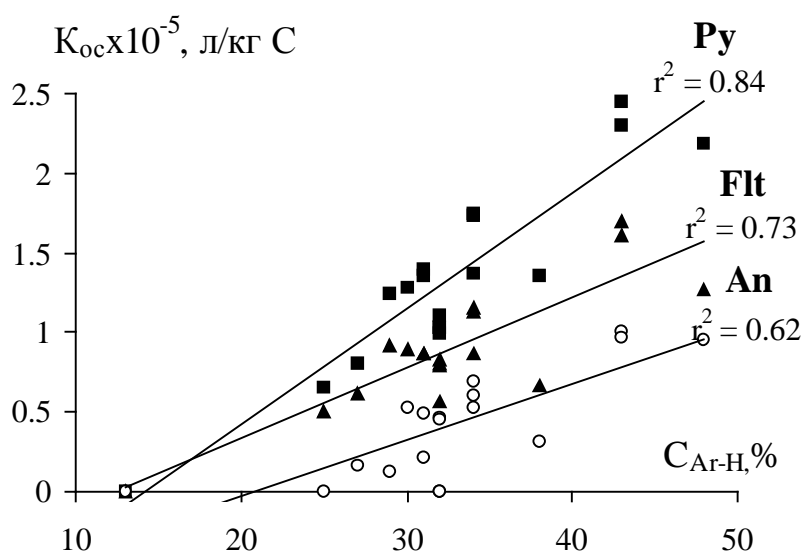


Рис. 2.5. Зависимость  $K_{oc}$  пирена, флуорантена и антрацена от содержания Н- и С-замещенного ароматического углерода в структуре ГФК.

Полученные результаты о зависимости связывающей способности гумусовых кислот ПАУ от содержания ароматических фрагментов в молекулах ГФК согласуются с данными работ [149, 150], где авторами показана высокая степень корреляции между содержанием ароматического углерода в ГФК и их константами связывания некоторых ПАУ.

Корреляционная взаимосвязь двух косвенных показателей ароматичности ГФК -  $H/C$  и  $\epsilon^*_{280}$  - с константами связывания  $Py$ ,  $Flt$  и  $An$  существенно слабее, чем для  $^{13}C$  ЯМР-дескрипторов. Графики соответствующих регрессионных уравнений приведены на Рис. 2.6 и 2.7, соответственно. Зависимости построены для тех препаратов, которые были исследованы методом спектроскопии ЯМР  $^{13}C$ . Для всех трех ПАУ значения соответствующих коэффициентов корреляции существенно ниже, чем для  $^{13}C$  ЯМР-дескрипторов и составляют: 0.73, 0.71, 0.58 и 0.43, 0.55, 0.30 для  $H/C$ ,  $\epsilon^*_{280}$ , соответственно. Несмотря на это, полученные зависимости являются значимыми при  $P = 0.95$ .

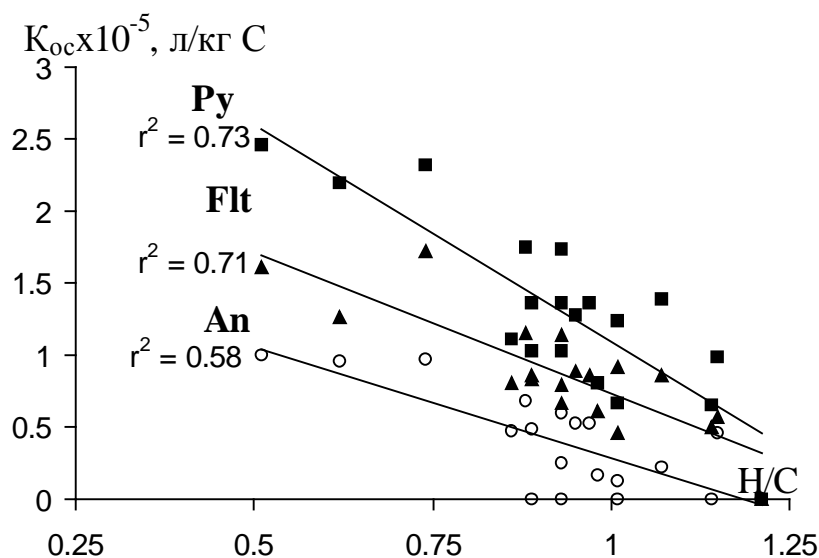


Рис. 2.6. Зависимость  $K_{oc}$  пирена, флуорантена и антрацена от соотношения  $H/C$ .

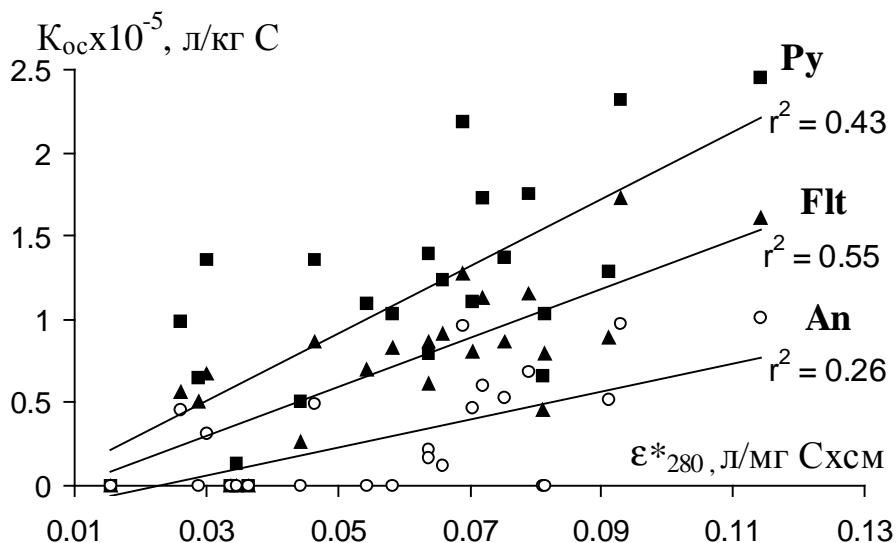


Рис. 2.7. Зависимость  $K_{oc}$  пирена, флуорантена и антрацена от  $\epsilon^*_{280}$ .

Более низкие значения  $r^2$ , полученные для  $\epsilon^*_{280}$  по сравнению с Н/С, позволяют сделать вывод о более высокой предсказательной способности дескриптора Н/С. Это делает его более предпочтительным для прогноза связывающей способности ГФК по отношению к ПАУ. Следует отметить, что и для модельных кислот наблюдалось гораздо лучшее соответствие между соотношением Н/С и содержанием ароматического углерода в структуре ГФК.

Полученные результаты не согласуются с данными, полученными авторами [149, 150] о более высокой предсказательной способности  $\epsilon^*_{280}$  по сравнению с Н/С.

Увеличение размера выборки препаратов от 19 до 26 сопровождалось уменьшением значений соответствующих  $r^2$  между  $K_{oc}$  и Н/С до 0.5, 0.48 и 0.40. Понижение  $r^2$ , по-видимому, связано с включением в выборку ФК почв. Для данных препаратов соотношение Н/С (~0.94) достаточно близко к таковому для торфяных ГФК (~0.96). Однако при этом ФК практически не проявляют сродства к ПАУ. В противоположность вышеполученной тенденции для Н/С, увеличение количества препаратов до 26 приводило к небольшому увеличению значений  $r^2$  между  $K_{oc}$  и  $\epsilon^*_{280}$  до 0.52, 0.58 и 0.41 для Py, Flt и An, соответственно.

Следует отметить, что окисленность ГФК, характеризуемая величиной атомного соотношения О/С, и содержание карбоксильных групп не влияли на величину  $K_{oc}$ .

Зависимости между  $K_{oc}$  модельных ПАУ и молекулярными массами ГФК приведены на Рис. 2.8. Данные зависимости построены для 26 препаратов ГФК. Как видно из представленных данных, явной тенденции

увеличения степени сродства ГФК к ПАУ по мере возрастания ММ не наблюдалось ни для одного из трех ПАУ. Наиболее высокие  $K_{oc}$  оказались характерные для ГФК с ММ от 10000 до 15000 Дальтон. Гумусовые кислоты с ММ ниже 10000 характеризовались весьма слабым сродством к ПАУ. Соответствующие значения  $K_{oc}$  для данных препаратов лежат в диапазоне от 0.1 до  $0.6 \times 10^5$  л/кг С. Исключение составляют ФК чернозема, для которых  $K_{oc}$  пирена составляет  $1.1 \times 10^5$  л/кг С при ММ = 9600 Дальтон.

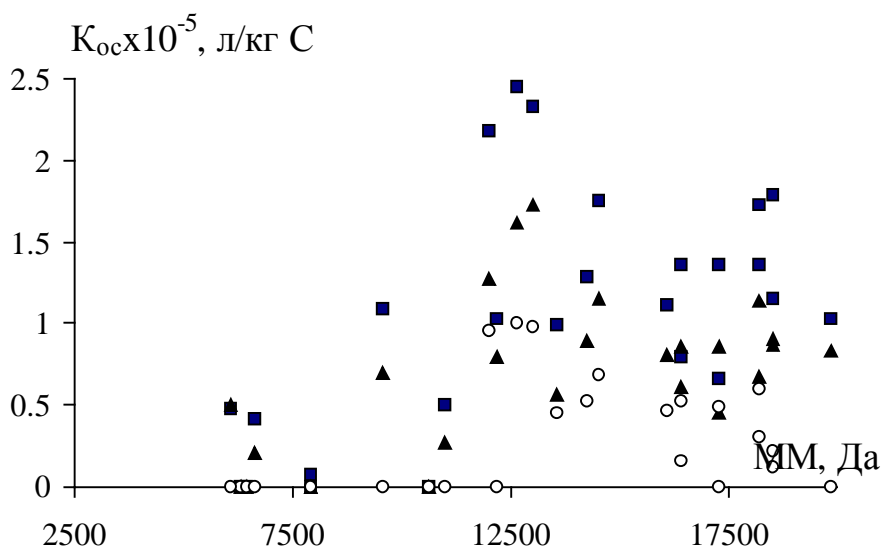


Рис. 2.8. Зависимость  $K_{oc}$  модельных ПАУ от молекулярной массы ГФК (■ - Py, □ - Flt, ▲ - An).

Для препаратов ГФК с ММ выше 15000 Дальтон наблюдается небольшое уменьшение соответствующих  $K_{oc}$  по мере дальнейшего возрастания молекулярных масс.

Для оценки устойчивости полученных корреляционных соотношений и корректности применения вышеописанных дескрипторов ( $\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$ ,  $\Sigma C_{Ar}$ ,  $C_{Ar-H,R}$ , Н/С,  $\epsilon^*_{280}$  и ММ) для прогноза сродства к ПАУ гумусовых кислот различного происхождения, была осуществлена процедура кросс-валидации. С этой целью исходная выборка препаратов (полная - 26 и охарактеризуемая методом спектроскопии ЯМР  $^{13}C$  - 19 препаратов) была разбита на непересекающиеся подмножества препаратов, сгруппированных по сходству источника происхождения и/или фракционного состава. Указанные подмножества включали в себя: 8 препаратов ГФК торфа (ГК+ФК), 8 ГК и 5 ФК почв. Одна из выборок была сформирована из 5 препаратов ГФК (SEL, АНА, FMX, WM3X), не вошедших ни в одно из подмножеств, и была обозначена как ГФК\*. Полученные зависимости между  $K_{oc}$  Py и их молекулярными дескрипторами приведены на Рис. 2.9.

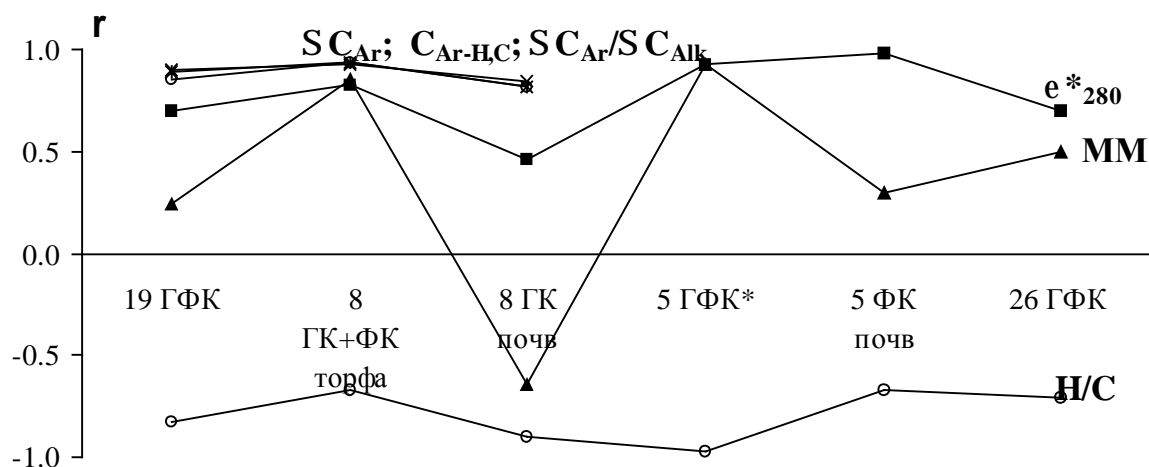


Рис. 2.9. Зависимость коэффициента корреляции, характеризующего взаимосвязь между  $K_{oc}$  и исследуемыми молекулярными дескрипторами, от состава выборки препаратов ГФК.

Аналогичные результаты были получены для Flt и An.

Как видно из представленных данных, вне зависимости от состава выборки препаратов ГФК наиболее высокие значения  $r$  наблюдаются для  $^{13}C$  ЯМР-дескрипторов ( $C_{Ar-H,R}$ ,  $\sum C_{Ar}$ ,  $\sum C_{Ar}/\sum C_{Alk}$ ), характеризующих ароматичность ГФК ( $r = 0.87, 0.87, 0.89$ , соответственно). Для соотношения H/C наблюдалась в целом более слабая корреляционная взаимосвязь. В то же время, как и в случае с  $^{13}C$  ЯМР-дескрипторами, она характеризовалась высокой устойчивостью, несущественно изменяясь в зависимости от состава выборок препаратов ( $-0.67 \leq r \leq -0.98$ ). Диапазон изменений значений  $r$  для  $\epsilon^*_{280}$  был более широким (от 0.46 для 8 ГК почв до 0.98 для выборки ГФК из 5 препаратов). Наиболее чувствительным дескриптором к изменению состава выборки препаратов ГФК оказалась молекулярная масса. Как видно из рисунка, корреляция между  $K_{oc}$  и MM является значимой только для выборок из 8 препаратов торфяных ГФК, 5 ГФК\* и 8 ГК почв. Причем в двух первых случаях корреляция прямая, а для ГК почв - обратная. Следовательно, MM можно использовать для прогноза сродства к ПАУ только для ГФК аналогичных по происхождению и/или фракционному составу.

На основании полученных данных был сделан вывод о том, что максимальной предсказательной силой по отношению к  $K_{oc}$  обладают дескрипторы ароматичности ГФК, определяемые из данных спектроскопии ЯМР  $^{13}C$ . Регрессионные уравнения с наибольшими коэффициентами корреляции приведены ниже :

$$K_{oc} \times 10^{-5} = 1.26 \times \sum C_{Ar} / \sum C_{Alk} - 0.26 \quad (P_y, r^2 = 0.81) \quad (2.1)$$

$$K_{oc} \times 10^{-5} = 0.78 \times \sum C_{Ar} / \sum C_{Alk} - 0.11 \quad (Flt, r^2 = 0.74) \quad (2.2)$$

$$K_{oc} \times 10^{-5} = 0.64 \times \sum C_{Ar} / \sum C_{Alk} - 0.41 \quad (An, r^2 = 0.66) \quad (2.3)$$

Полученные корреляционные зависимости свидетельствуют о том, что основным фактором, определяющим связывающую способность ГФК по отношению к Ру, является вклад ароматического каркаса в структуру ГФК по сравнению с углеводно-обогащенной периферией.

Для получения экспериментального подтверждения найденным корреляционным взаимосвязям следующий этап работ был посвящен исследованию связывающей способности каркасной (ароматической) и периферической (углеводно-обогащенной) частей молекул ГФК по отношению к ПАУ.

### **2.2.3. Изучение связывающей способности гидролизованных препаратов гумусовых кислот по отношению к пирену**

#### **2.2.3.1. Общая характеристика гидролизованных препаратов**

##### **гумусовых кислот**

Для изучения связывающей способности каркасной и периферической частей ГФК по отношению к ПАУ использовали препараты, подвергнутые кислотному гидролизу (0.2 М HCl, t = 110°C, 15 часов). Согласно многочисленным исследованиям [6, 16-19], в данных условиях происходит расщепление макромолекул ГФК на ароматический каркас и углеводную периферию. При этом каркасные фрагменты образуют нерастворимые продукты гидролиза, а периферийные переходят в раствор. В работе использовали гидролизованные препараты 4 торфяных ГК (Т3, Т4, Т5, Т6), ФК торфа (Т4) и почвенные ГК (НСК).

Исходные препараты ГФК и продукты их гидролиза характеризовали методами элементного анализа и спектроскопии ЯМР <sup>13</sup>C (Табл. 2.8 и 2.9, соответственно). При этом для обозначения нерастворимых и растворимых продуктов гидролиза к шифру исходного препарата добавляли одну и две звездочки, соответственно (ГК\*, ФК\* - нерастворимые (каркасная часть препарата), ГК\*\*, ФК\*\* - образовавшиеся растворимые продукты гидролиза (периферическая часть)). Типичные <sup>13</sup>C ЯМР-спектры исходных препаратов ГК, ФК и продуктов их гидролиза на примере препарата Т4 приведены на Рис. 2.10 и 2.11, соответственно.

Следует отметить, что элементный состав удалось определить только для нерастворимых продуктов гидролиза ГК (ГК\*), ввиду низких

содержаний растворимых продуктов в гидролизате ГК и малого количества нерастворимой фракции, образующейся при гидролизе ФК. Сравнение элементного состава исходных препаратов ГК и их гидролизованных остатков показало, что для гидролизованных препаратов характерны более низкие соотношения Н/С, чем для соответствующих исходных ГК и составляют для ГК\* торфа ~0.9, а для ГК\* чернозема ~0.57.

Таблица 2.8

Элементный состав исходных и нерастворимых продуктов гидролиза препаратов ГФК в расчете на беззольное органическое вещество

Препарат ГФК	Источник происхождения	Содержание элементов (% масс)				Золь- ность %	Атомные соотношения	
		С	Н	N	О		Н/С	О/С
<b><i>ГК и ГК* торфа</i></b>								
T3	Низинный осоковый торф	52.6	4.7	2.4	41.0	1.2	1.07	0.60
T4	Верховой сфагнум торф	50.7	4.9	2.1	42.3	5.7	1.16	0.63
T5	Верховой сфагнум торф	51.4	4.9	2.2	41.5	5.8	1.14	0.61
T6	Верховой пушицевый торф	49.4	4.6	1.5	44.4	0.0	1.12	0.67
T3*	--"--	54.9	4.2	1.1	39.8	0.0	0.92	0.54
T4*	--"--	58.1	4.3	1.2	36.4	1.0	0.90	0.47
T5*	--"--	57.7	4.3	1.0	37.1	0.6	0.89	0.48
T6*	--"--	57.2	4.1	0.8	38.0	0.4	0.86	0.50
<b><i>ФК торфа</i></b>								
T4	--"--	49.3	4.4	0.0	46.2	0.0	1.07	0.70
<b><i>ГК и ГК* почв</i></b>								
НСК	Ч типичный	57.7	3.9	2.8	35.7	27.4	0.80	0.46
НСК*	--"--	57.1	2.7	1.9	38.3	0.0	0.57	0.51

Данный факт может свидетельствовать о большем вкладе ароматических фрагментов в структуру гидролизованных препаратов ГК. Следует отметить, что величина соотношения Н/С для ГК\* чернозема на 40% ниже, чем в исходном препарате и составляет - 0.57. Это

свидетельствует о практически полном отсутствии алифатических фрагментов в составе нерастворимых продуктов гидролиза ГК чернозема.

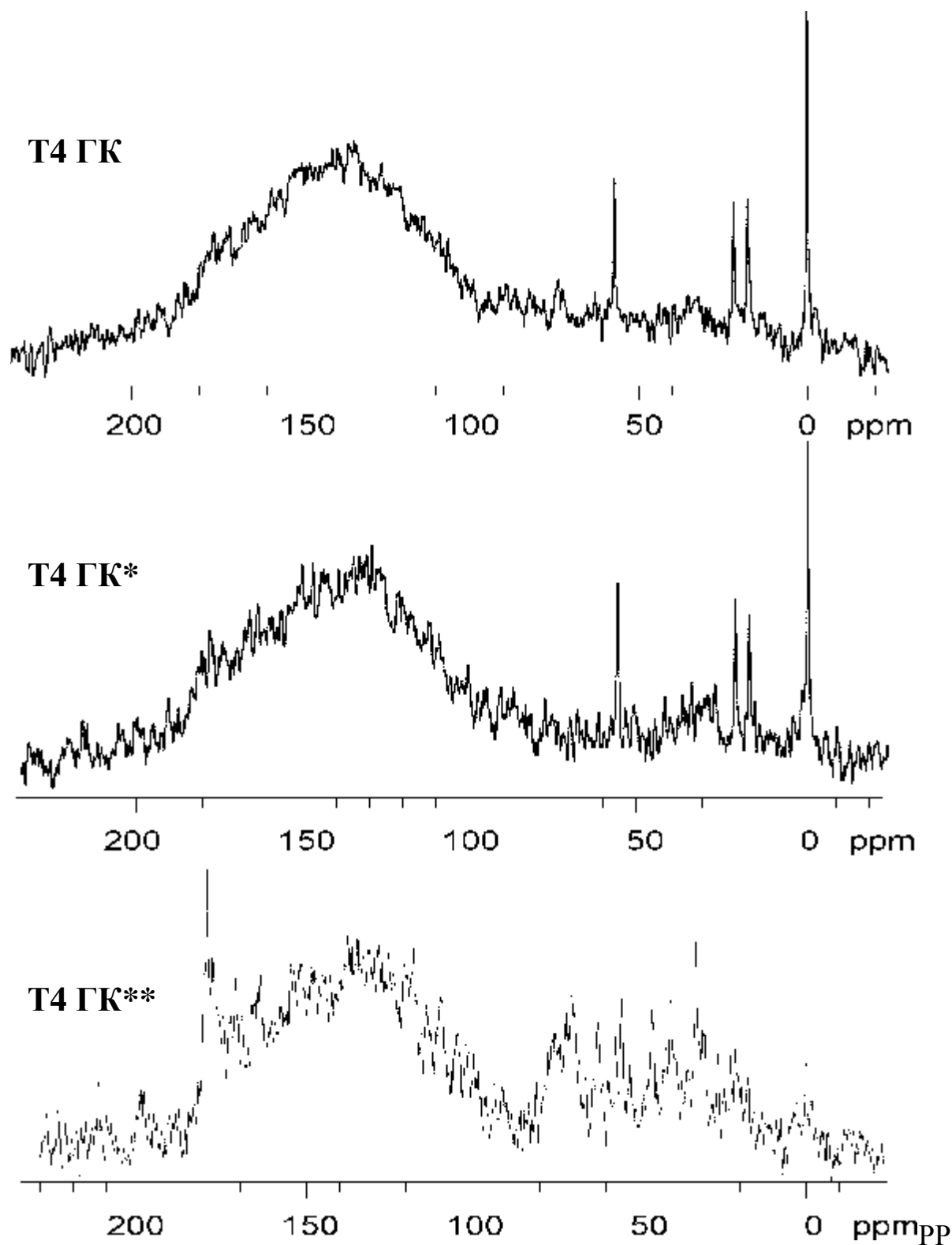
Таблица 2.9

Распределение углерода между основными структурными фрагментами в исходных препаратах ГФК и продуктах их гидролиза по данным спектроскопии ЯМР  $^{13}\text{C}$ .

Пре- парат ГФК	Доля углерода в составе фрагментов, %						$\Sigma\text{C}_{\text{Ar}}$	$\Sigma\text{C}_{\text{Ar}}/\Sigma\text{C}_{\text{Alk}}$
	$\text{C}_{\text{C=O}}$	$\text{C}_{\text{COOH(R)}}$	$\text{C}_{\text{Ar-O}}$	$\text{C}_{\text{Ar-H(R)}}$	$\text{C}_{\text{Alk-O}}$	$\text{C}_{\text{Alk-H(R)}}$		
<b><i>ГК, ГК*, ГК** торфа</i></b>								
T3	6	13	23	37	8	13	60	2.8
T3*	3	15	23	36	8	12	59	2.9
T4	7	17	21	38	9	9	58	3.2
T4*	5	13	18	45	9	9	64	3.6
T4**	4	16	17	30	20	13	47	1.4
T6	6	12	18	41	13	10	58	1.9
<b><i>ФК и ФК* торфа</i></b>								
T4	2	16	13	32	26	10	45	1.2
T4*	4	14	22	44	7	12	61	3.2
T4**	4	13	17	36	20	11	53	1.7

Как видно из Рис. 2.10 и 2.11, форма спектров продуктов гидролиза как ГК, так и ФК во многом схожи. Однако сходство между спектрами гидролизатов и исходных препаратов гораздо выше в случае ГК и менее выражено для ФК. По-видимому, это связано с различным содержанием углеводных фрагментов в исходных препаратах ГК и ФК.





ис. 2.10.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектры исходного препарата T4 GK, его гидролизованного остатка (T4 GK\*) и растворимых продуктов гидролиза (T4 GK\*\*).

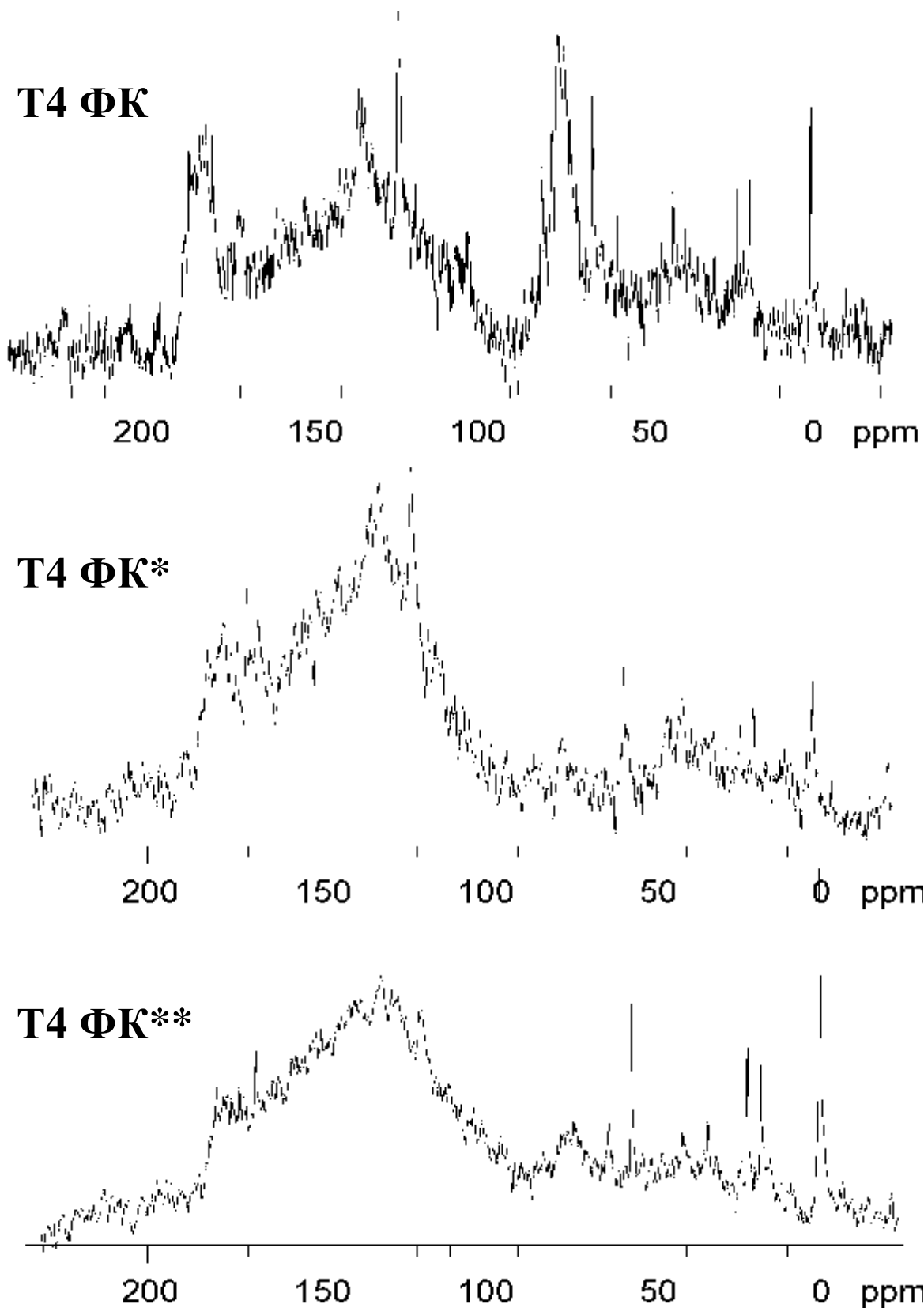


Рис. 2.10.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектры исходного препарата Т4 ФК, его гидролизованного остатка (Т4 ФК\*) и растворимых продуктов гидролиза (Т4 ФК\*\*).

Так, согласно Табл. 2.9, содержание углеводных фрагментов в препарате Т4 ФК в два раза выше по сравнению с Т4 ГК. Сопоставление спектров продуктов гидролиза препарата Т4 ГК позволяет установить появление выраженного пика в области углеводных фрагментов в спектре

T4 ГК\*\*. Это подтверждает литературные данные о том, что при гидролизе ГК разбавленными растворами кислот происходит отщепление полисахаридных цепочек от ароматического каркаса ГФК [6]. Об этом свидетельствует и спектр нерастворимого остатка - T4 ГК\*, в котором отсутствуют сигналы углерода фрагментов  $C_{Alk-O}$ . Однако, как следует из спектра T4 ГК\*\*, в результате гидролиза отщепляются не только углеводные, но и фульвоподобные фрагменты. Так, количественная обработка спектров показала, что содержание ароматического углерода в составе T4 ГК\*\* (47%) весьма близко к таковому в T4 ФК (45%) и намного ниже, чем в исходном препарате T4 ГК (58%). О вкладе “ФК-подобных” фрагментов в периферию ГК также сообщается в [6]. Кроме того, как видно из Табл. 2.9 фрагментный состав нерастворимых продуктов гидролиза ФК\* и ГК\* практически идентичен, что позволяет предположить выпадение ГК-подобных веществ при гидролитическом отщеплении от фульвокислот гидрофильных периферических фрагментов.

Сравнение данных по распределению углерода в исходных препаратах ГК и ФК T4 показывает увеличение вклада ароматических фрагментов в ГК по сравнению с ФК почти в три раза (3.2 и 1.2, соответственно). При этом в процессе гидролиза ГК наблюдается небольшое увеличение этого соотношения в нерастворимом продукте T4 ГК\* и значительное уменьшение (до 1.4) в растворимом продукте T4 ГК\*\*. Для ФК наблюдается иная картина, а именно, заметное увеличение отношения  $\sum C_{Ar} / \sum C_{Alk}$  как в растворимом, так и нерастворимом продукте гидролиза. Увеличение содержания ароматического углерода в процессе гидролиза ФК, возможно, связано с трансформацией отщепившихся моносахаров. В процессе кислотного гидролиза сахара могут претерпевать постадийную дегидратацию с образованием фурфурола и его производных. Образующиеся вещества могут служить причиной увеличения доли ароматического углерода в продуктах гидролиза ФК. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о большем вкладе ароматических фрагментов в структуру гидролизованных препаратов ГК, как по сравнению с исходными, так и с соответствующими ФК. В связи с этим, дальнейшие исследования по оценке связывающей способности исходных и гидролизованных препаратов ГФК проводили на примере ГК.

### 2.2.3.2. Изучение связывающей способности

#### гидролизированных препаратов ГК по отношению к пирену

Для проведения сравнительной оценки связывающей способности исходных и гидролизированных препаратов ГК по отношению к Ру были измерены  $K_{oc}$  нерастворимых и растворимых продуктов их гидролиза. Для этой цели использовали метод тушения флуоресценции аналогично описанному в главе (2.2.1) для определения  $K_{oc}$  исходных препаратов ГФК. Полученные  $K_{oc}$  и их доверительные интервалы приведены в Табл. 2.10.

Следует отметить, что для всех нерастворимых продуктов гидролиза (ГК\*) гуминовых кислот наблюдается возрастание  $K_{oc}$  по сравнению с исходными. По-видимому, увеличение  $K_{oc}$  обусловлено тем, что, во-первых, в результате отщепления периферической части облегчается доступ Ру к ароматическому каркасу молекул ГК, а во-вторых возрастает гидрофобность образовавшегося продукта гидролиза. Следует отметить, что наибольшее увеличение  $K_{oc}$  (30%) наблюдается для ГК чернозема. В случае же торфяных ТЗ ГК значения констант практически не изменяются.

Таблица 2.10

Константы связывания Ру исходными препаратами ГК и продуктами их гидролиза

Препарат ГК	$K_{oc} \times 10^{-5}$ л/кг С	Препарат ГК*	$K_{oc} \times 10^{-5}$ л/кг С	Препарат ГК**	$K_{oc} \times 10^{-5}$ л/кг С
<i>ГК, ГК*, ГК** торфа</i>					
Т3	1.2±0.3	Т3*	1.3±0.2	Т3**	<0.1
Т4	1.2±0.3	Т4*	1.7±0.3	Т4**	<0.1
Т5	1.2±0.2	Т5*	1.4±0.2	Т5**	<0.1
Т6	1.4±0.2	Т6*	1.8±0.4	Т6**	<0.1
<i>ГК, ГК*, ГК** почв</i>					
НСК	2.8±0.3	НСК*	3.4±0.4	НСК**	<0.1

\* ± доверительный интервал для  $n = 7$ ,  $P = 0.95$ ; \*\* минимально определяемое значение  $K_{oc}$

Как следует из данных, приведенных в Табл. 2.9, для ТЗ ГК было характерно наименьшее содержание углеводных фрагментов. Как видно из таблицы,  $K_{oc}$  Ру для всех растворимых продуктов гидролиза (ГК\*\*) ниже минимально определяемой величины  $0.1 \times 10^{-5}$  л/кг С. Это позволяет сделать вывод о том, что периферическая часть молекул ГК либо не обладает способностью связывать Ру, либо связывание очень слабое и не может быть зарегистрировано с помощью данного метода.

Для выявления взаимосвязи между структурой продуктов гидролиза ГК и их связывающей способностью по отношению к Ру ( $K_{oc}$ ), для гидролизованных и исходных продуктов рассчитывали уже описанное ранее соотношение  $\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$ , которое позволяет количественно оценить вклад ароматических и углеводных фрагментов. Полученная зависимость на примере препарата ГК Т4 приведена на Рис. 2.12.

Как видно из рисунка, наличие тесной корреляции между величиной  $K_{oc}$  и параметром  $\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$  ( $r^2=0.83$ ,  $P=0.95$ ) позволяет сделать вывод об определяющей роли соотношения ароматических и алифатических фрагментов при связывании Ру гумусовыми кислотами.

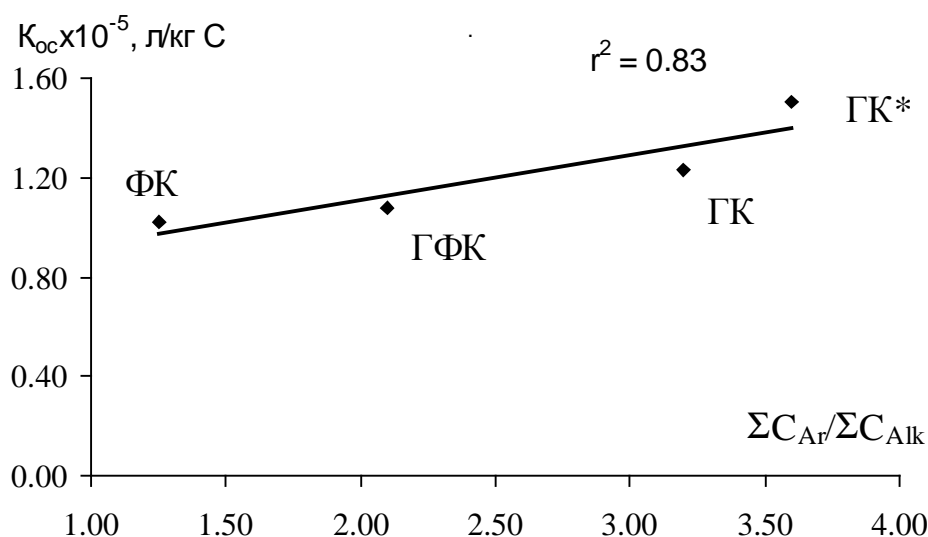


Рис. 2.12. Зависимость  $K_{oc}$  пирена для ГК, ФК, ГФК Т4 и гидролизованного остатка ГК от соотношения  $\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$ .

Чем более развита ароматическая система ГФК, и чем меньше она экранирована углеводно-обогатненными периферическими фрагментами, тем выше их связывающая способность по отношению к Ру.

Полученные данные являются экспериментальным подтверждением ведущей роли ароматического каркаса в связывании ПАУ гумусовыми кислотами. Учитывая гидрофобный характер ароматического каркаса и наличие в его составе акцепторных фрагментов - карбоксил- и карбонилзамещенных ароматических колец можно предположить, что в связывание ПАУ гумусовыми кислотами вносят вклад как гидрофобные, так и донорно-акцепторные взаимодействия. При этом характер зависимости констант связывания от гидрофобности ПАУ (возрастание по мере увеличения  $\lg K_{ow}$ ) и потенциала их ионизации (уменьшение по мере снижения потенциала ионизации) позволяет судить о преимущественном вкладе гидрофобных взаимодействий. Так, потенциалы ионизации

модельных ПАУ составляют 7.55, 7.81 и 7.41 эВ для Py, Flt и An [61]. Поэтому, в случае донорно-акцепторного механизма связывания, следовало бы ожидать более высокого сродства к An, чем к Py и Flt. Однако полученные значения  $K_{oc}$  данных ПАУ говорят об обратном: сродство к ПАУ уменьшается в ряду:  $Py \geq Flt > An$ . В целях выяснения механизма связывания ПАУ гумусовыми кислотами были определены константы связывания Py, Flt и An низкомолекулярными карбоновыми кислотами.

#### 2.2.4. Исследование механизма взаимодействия гумусовых кислот с ПАУ

Для подтверждения гипотезы о вкладе донорно-акцепторного механизма взаимодействия в процессы связывания ПАУ гумусовыми кислотами, наряду с гидрофобными взаимодействиями, были проведены эксперименты по тушению флуоресценции Py, Flt и An низкомолекулярными ароматическими кислотами, моделирующими потенциальные реакционные центры ГФК. При этом ожидалось, что в случае преобладания донорно-акцепторного механизма взаимодействия между модельными кислотами и ПАУ, соответствующие константы будут определяться величиной потенциала ионизации ПАУ, а также возрастать по мере увеличения основности ароматических кислот.

Исходя из характера замещения ароматического кольца в ГФК, в качестве модельных кислот были выбраны ароматические карбоновые кислоты, имеющие -ОН и -COOH заместители. Константы связывания Py, Flt и An данными кислотами были определены с помощью метода тушения флуоресценции в условиях, аналогичным определению  $K_{oc}$  для ГФК. Следует отметить, что для заметного тушения ПАУ в случае модельных кислот требовались концентрации, на порядок превышающие концентрации ГФК. Полученные значения  $K_{oc}$  и соответствующие стандартные отклонения приведены в Табл. 2.11.

Таблица 2.11

Константы связывания ПАУ модельными кислотами

Модельные кислоты	$K_{oc} \times 10^{-5}$ л/кг С		
	Пирен	Флуорантен	Антрацен
Бензойная	$0.123 \pm 0.008^*$	$0.068 \pm 0.008$	$< 0.003^{**}$
4-ОН-бензойная	$0.920 \pm 0.004$	$0.05 \pm 0.01$	$< 0.003$

2,4-ди-ОН-бензойная	<0.003	<0.003	<0.003
Фталевая	0.160±0.003	0.110±0.003	<0.003
Терефталевая	<0.003	<0.003	<0.003
Меллитовая	<0.003	<0.003	<0.003
Пиромеллитовая	<0.003	<0.003	<0.003
Коричная	0.120±0.003	0.095±0.008	<0.003

\* ± доверительный интервал для n = 7, P = 0.95; \*\* минимально определяемое значение  $K_{oc}$

Как видно из Табл. 2.11, тушение флуоресценции ПАУ наблюдалось только для четырех из восьми модельных кислот. При этом в число соединений, не вызывающих тушения флуоресценции ПАУ, вошли все наиболее сильные акцепторы из использованных модельных соединений, в качестве которых предполагались многоосновные ароматические кислоты (терефталевая, меллитовая и пиромеллитовая кислоты). Для кислот, обладающих сродством к ПАУ, связывание наблюдалось только для Ру и Ft. В тоже время константы связывания наиболее донорного из использованных ПАУ - An - всеми модельными кислотами были ниже минимально определяемых значений  $K_{oc}$  ( $0.003 \times 10^5$  л/кг С), которые были определены с использованием 3S-критерия, аналогично  $K_{oc}$  для ГФК. Полученная тенденция наблюдается для связывания ПАУ как гумусовыми, так и модельными кислотами. Кроме того, обращает на себя внимание гораздо более низкие значения констант связывания ПАУ модельными индивидуальными кислотами, чем макромолекулами ГФК. Полученные закономерности показывают незначительную роль донорно-акцепторных взаимодействий в связывании ПАУ гумусовыми кислотами и могут служить подтверждением высказанному выше предположению о преимущественном вкладе гидрофобных взаимодействий в связывание ПАУ гумусовыми кислотами. Наличие данных взаимодействий в системе вода-ПАУ-ГФК обусловлено действием энтропийного фактора, а именно, стремлением воды “вытолкнуть” молекулы ПАУ, искажающие пространственную сетку водородных связей и тем самым снижающие энтропию системы [160]. Поэтому появление в растворе макромолекул ГФК, обладающих гидрофобным ароматическим каркасом, может сопровождаться увеличением локальной концентрации ПАУ в непосредственной близости от их макромолекул. Данный вид взаимодействия отсутствует в случае низкомолекулярных кислот, обуславливая более низкие значения констант их связывания с ПАУ по сравнению с ГФК.

Дополнительно нами были проведены эксперименты по обнаружению комплексов с переносом заряда между ПАУ и различными препаратами ГФК, с использованием методов УФ-спектрофотометрии и спектроскопии ЯМР  $C^{13}$ . Принимая во внимание, что молекулы ГФК могут выступать как донорами, так и акцепторами по отношению к различным органическим соединениям (Табл. 1.1), эксперименты по обнаружению межмолекулярных комплексов были проведены как для относительно сильных доноров - Ру, Flt и An ( $I = 7.55, 7.81$  и  $7.41$  эВ, соответственно), так и для сильного акцептора - хлоранила ( $I = 9.58$  эВ).

Для проведения экспериментов с ПАУ (на примере Ру), согласно рекомендации авторов [176], были выделены бутанол-растворимые (более акцепторные) фракции из двух препаратов ГФК - ГФК торфа (НТЛ) и природных вод (SWA). После этого растворы были упарены досуха и к сухому остатку был добавлен пентанол. К полученным растворам добавляли Ру в концентрации  $10$  мкг/л. УФ-спектры полученных растворов регистрировали через  $10$  суток. При этом параллельно регистрировались спектры исходных растворов Ру и ГФК в пентаноле. По истечении указанного времени в растворе ГФК-ПАУ никаких видимых изменений (выпадение осадка) не наблюдалось. Полученный спектр ГФК-ПАУ представлял собой суперпозицию спектров растворов ГФК и ПАУ, появления дополнительного длинно-волнового максимума не наблюдалось.

Следующий набор экспериментов был посвящен изучению взаимодействия хлоранила и Ру с ГФК в водной среде на примере ГК Aldrich, согласно методике, приведенной в [219]. Концентрация водных растворов ГК составляла  $6.8$  мгС/л, хлоранила -  $6 \times 10^{-6}$  М, Ру - на уровне его водной растворимости ( $\sim 1.3 \times 10^{-7}$  М). Полученные спектры поглощения хлоранила и ГК приведены на Рис. 2.13.



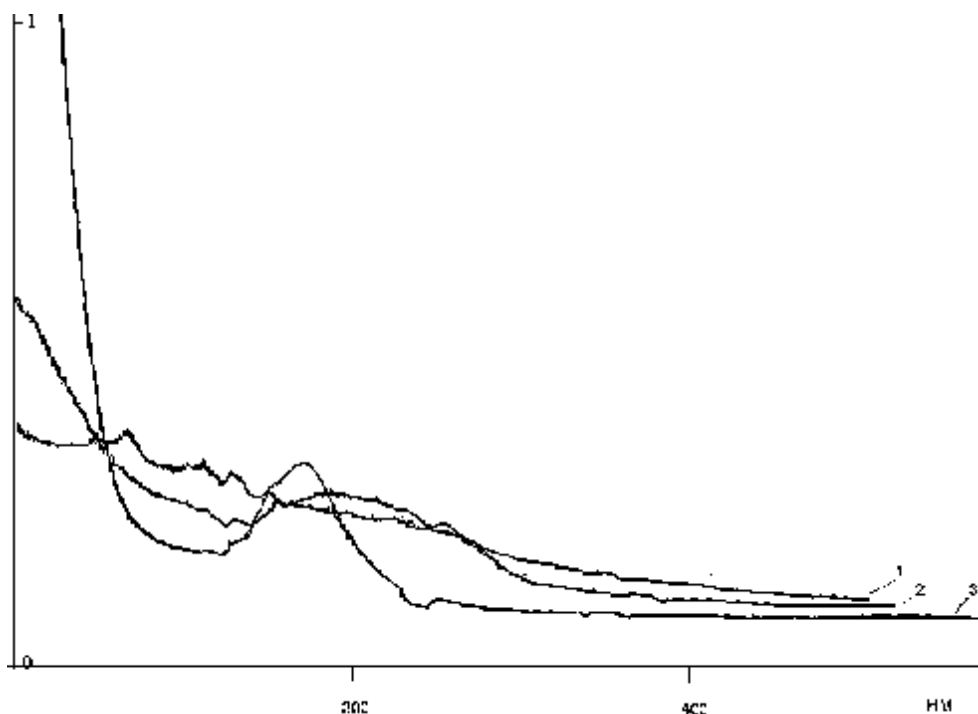


Рис. 2.13. УФ-спектры поглощения растворов: 1-ГК Aldrich, 2-ГК Aldrich и хлоранил при совместном присутствии, 3-хлоранил.

Как видно из рисунка, в присутствии ГК происходит существенное изменение положения максимума поглощения раствора хлоранила по сравнению с его исходным раствором: батохромный сдвиг на 13 нм (от 382 до 395 нм) и существенное уширение полосы поглощения хлоранила по сравнению с исходным. Полученные изменения могут свидетельствовать об образовании межмолекулярного комплекса между ГК и хлоранилом [80, 81, 176].

Аналогичные эксперименты по исследованию взаимодействия ГК с Ру не показали каких-либо достоверных изменений в спектре поглощения Ру в присутствии ГК. Это может быть связано с низкой растворимостью данного ПАУ в воде, что не позволяет регистрировать происходящие в спектре изменения на фоне высоких оптических плотностей концентрированных растворов ГК. Образование межмолекулярных комплексов между хлоранилом и ГФК могут свидетельствовать о способности ГФК вступать в донорно-акцепторные взаимодействия.

Поскольку проведенные эксперименты не позволили зарегистрировать образование комплексов с переносом заряда между Ру и ГФК, нами были проведены соответствующие исследования при более высоких концентрациях реагентов с использованием в качестве растворителя ДМСО. С этой целью были приготовлены растворы трех модельных ПАУ в ДМСО при концентрациях около 5 мг/мл. Концентрация

раствора торфяного препарата НТЛ в ДМСО также была на уровне 5 мг/мл. Спектры поглощения регистрировали относительно раствора ГФК в ДМСО.

Полученные результаты также не позволили сделать каких-либо выводов об образовании межмолекулярных  $\pi$ -комплексов, так как высокие значения оптических плотностей концентрированных растворов ПАУ и ГФК не позволили зарегистрировать достоверное изменение положения максимумов спектров поглощения всех трех ПАУ в присутствии торфяного препарата НТЛ.

Эксперименты с применением спектроскопии ЯМР  $^{13}\text{C}$  также не показали каких-либо изменений в значениях м.д. спектров модельных ПАУ в присутствии ГФК. Эксперименты проводили на примере Ру и препарата ГК Aldrich в ДМСО.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о несущественной роли донорно-акцепторных взаимодействий в процесс связывания ПАУ гумусовыми кислотами и позволяют высказать предположение о преобладающем вкладе гидрофобных взаимодействий в данное связывание.

### **2.2.5. Исследование влияния pH и ионной силы среды на связывание ПАУ гумусовыми кислотами**

В связи с тем, что полученные с помощью метода тушения флуоресценции константы связывания являются условными, то есть их величина зависит от pH и ионной силы раствора, было изучено влияние pH и ионной силы среды на величины данных констант. Установление количественной зависимости  $K_{oc}$  от pH и ионной силы особенно важно для расчета распределения ПАУ по формам существования в природных водных средах с учетом их связывания гумусовыми кислотами.

Для исследования влияния pH среды на связывающую способность ГФК по отношению к Ру, Flt и An были выбраны препараты ГФК, существенно различающиеся по величине  $K_{oc}$ : ГК Aldrich; ГК почв - HS, HBWN, HGP; ГФК торфа - НТЛ, Т4, Т6; ГФК природных вод - WM3X и SWA. Определение констант связывания проводили согласно методике, описанной в разд. 2.2.1, предварительно создавая требуемый pH в растворах ГФК-ПАУ с помощью 0.1 М NaOH и HCl конц. Диапазон изменений pH составил 2.1-8.4.

Полученные зависимости  $K_{oc}$  от pH среды приведены на Рис. 2.13.

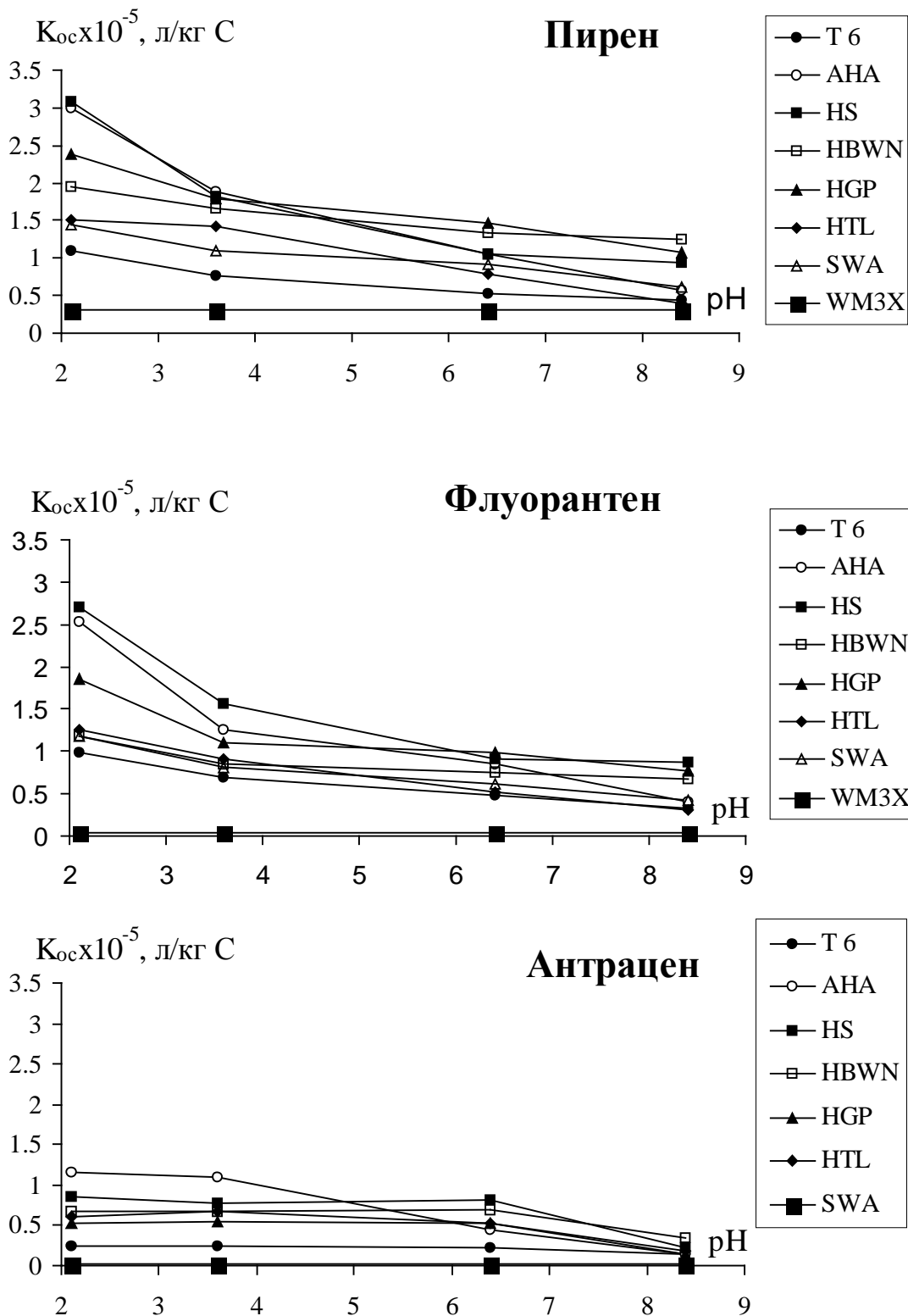


Рис. 2

.13. Зависимость  $K_{oc}$  модельных ПАУ от pH среды.

Как видно из представленных данных величина  $K_{oc}$  увеличивалась с уменьшением pH среды. При этом понижение pH от 8.5 до 3.8 сопровождалось лишь незначительным увеличением  $K_{oc}$  (на 10-20%). В то же время дальнейшее уменьшение pH от 3.8 до 2 вызывало двухкратное

возрастание  $K_{oc}$ . В наибольшей степени данный эффект был выражен для Py и Flt, в меньшей - для An. Максимальное изменение  $K_{oc}$  наблюдалось в присутствии препаратов ГК Aldrich и чернозема для Py и Flt. Так, в случае Py, значения соответствующих констант уменьшались от  $3.0 \times 10^5$  до  $0.6 \times 10^5$  и от  $3.0 \times 10^5$  до  $1.0 \times 10^5$  л/кг С при увеличении рН от 2.1 до 8.4. Для Flt соответствующие изменения составили  $2.5 \times 10^5 - 0.4 \times 10^5$  и  $2.7 \times 10^5 - 0.8 \times 10^5$  л/кг С. В меньшей степени эффект был выражен для ГК дерново-подзолистых и серых лесных почв. Так,  $K_{oc}$  пирена НГР уменьшалась в диапазоне  $2.4 \times 10^5 - 1.1 \times 10^5$  л/кг С при изменении рН от 2.1 до 8.4. В случае Flt - от  $1.8 \times 10^5$  до  $0.7 \times 10^5$  л/кг С.  $K_{oc}$  модельных ПАУ гумусовыми кислотами природных вод, характеризующиеся минимальными величинами, практически не зависели от рН среды. В случае An наиболее существенное уменьшение  $K_{oc}$  наблюдалось при изменении рН от 6.4 до 8.4. Исключение составили ГК Aldrich, для которых  $K_{oc}$  уменьшались во всем диапазоне увеличения рН.

Увеличение степени связывания ПАУ гумусовыми кислотами при снижении рН, по-видимому, связано с возрастанием гидрофобности ГФК, в результате протонирования ионогенных групп в их макромолекулах.

Для установления аналитического выражения, которое описывало бы зависимость  $K_{oc}$  от рН среды, полученные зависимости были аппроксимированы следующей двухпараметрической функцией:

$$K_{oc}^{pH} = K_{oc}^0 \left( (1 - b) \times (pH^0/pH)^c + b \right) \quad (2.4),$$

где  $K_{oc}^0$  - константа связывания ПАУ гумусовыми кислотами при рН 2;  $K_{oc}^{pH}$  - константа связывания при заданном рН;  $b$ ,  $c$  - эмпирические коэффициенты:

для Py:	$b = -0.30;$	$c = 0.50;$
для Flt:	$b = 0.20;$	$c = 1.30;$
для An:	$b = -450;$	$c = 0.001;$

Значения коэффициентов  $b$ ,  $c$  рассчитывали путем минимизации суммы квадратов отклонений расчетной и экспериментальной кривых рН-зависимостей  $K_{oc}$ . Примеры аппроксимации экспериментальных зависимостей с помощью функции (2.4) приведены на Рис. 2.14 для Py. Аналогичные зависимости были получены для Flt и An.

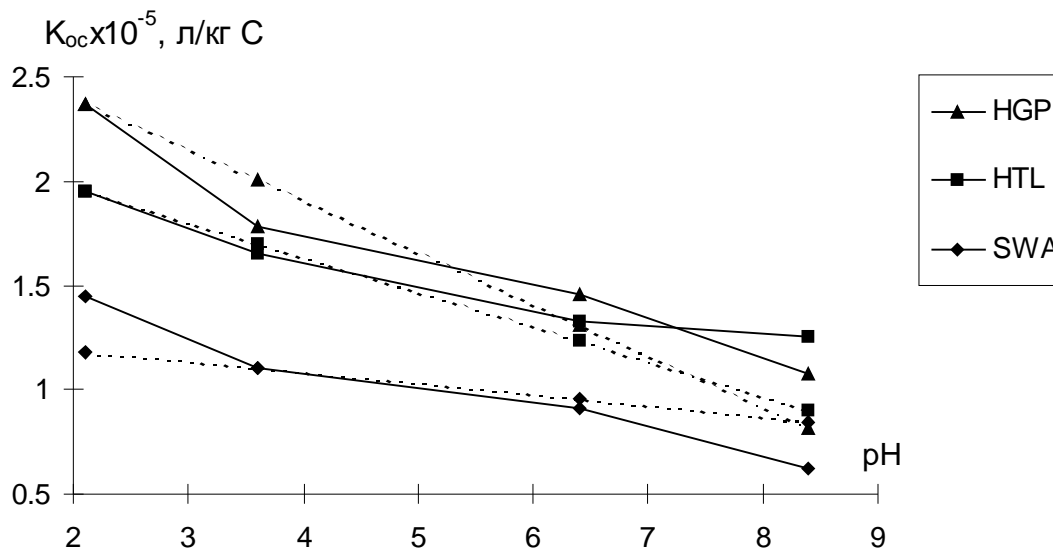


Рис. 2.14. Зависимость  $K_{oc}$  пирена от pH среды: линии - экспериментальные данные; пунктир - рассчитанные.

Как видно из рисунка, используемое уравнение (2.14) позволяет аппроксимировать экспериментальные кривые с достаточно высоким уровнем статистической достоверности. Соответствующие  $r^2$  составили, в среднем, 0.92 в случае Py и 0.95 и 0.80 для Flt и An.

Исследование влияния ионной силы среды на связывающую способность гумусовых кислот по отношению к Py, Flt и An проводились на той же выборке препаратов гумусовых кислот, существенно различающихся по величине  $K_{oc}$ . В случае An вместо водных ГФК (SWA и WM3X) были использованы торфяные ГФК (Т6), т.к. какого-либо связывания данного ПАУ с водными ГФК зарегистрировано не было. Определение констант связывания проводили согласно методике, описанной в разд. 2.2.1, предварительно создавая требуемую ионную силу (I) в растворах ГФК-ПАУ с помощью NaCl. Диапазон изменения I составил  $1 \times 10^{-4}$ - $2.5 \times 10^{-1}$  М.

Полученные зависимости  $K_{oc}$  от логарифма ионной силы среды приведены на Рис. 2.15.

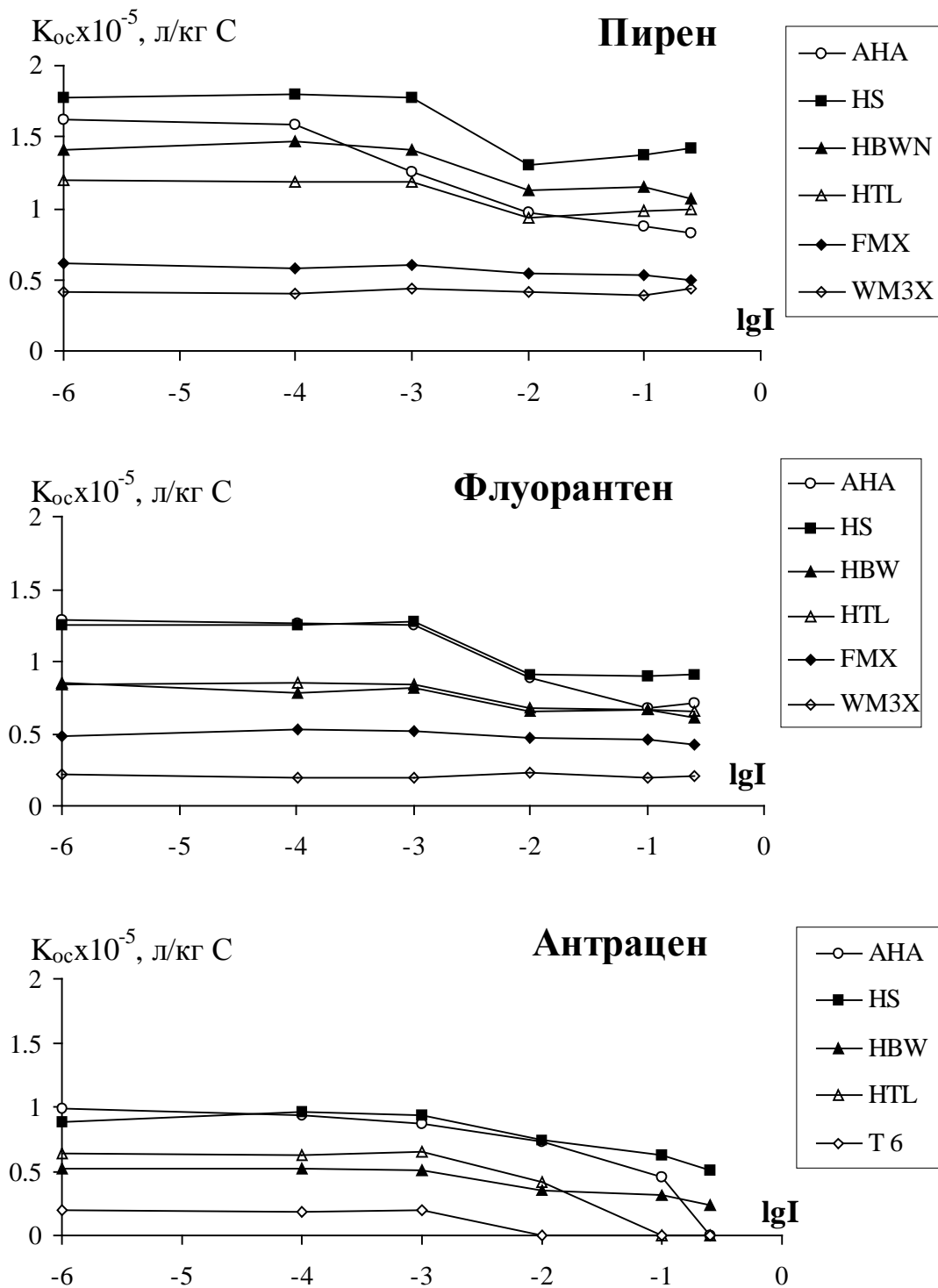


Рис. 2.15. Зависимость  $K_{oc}$  модельных ПАУ от ионной силы среды.

Как видно из рисунка, для всех исследованных препаратов ГФК наблюдалось уменьшение  $K_{oc}$  по мере возрастания ионной силы. При этом наиболее существенное изменение  $K_{oc}$  (20 - 30%) было характерно для препаратов с высоким сродством к ПАУ - ГК Aldrich и ГК чернозема в интервале концентраций электролита  $1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-2}$  М. Дальнейшее увеличение концентрации NaCl до 0.25 М практически не влияло на

степень связывания ГФК ни с Ру, ни с Flt. В то же время для An наблюдалось снижение  $K_{oc}$  во всем диапазоне изменения ионной силы.

Уменьшение степени связывания ПАУ с возрастанием ионной силы, по-видимому, обусловлено конформационными изменениями макромолекул ГФК в растворе электролита. Так, увеличение ионной силы вызывает экранирование заряда гумусового полианиона и, следовательно, способствует принятию ими более компактной конформации. Как следствие, уменьшается эффективная площадь контакта гидрофобной поверхности макромолекул ГФК с ПАУ, что приводит к уменьшению их констант связывания.

Для установления аналитического выражения, которое описывало бы зависимость  $K_{oc}$  от I, были аппроксимированы полученные зависимости следующей двухпараметрической функцией:

$$K_{oc}^I = (1 - b)K_{oc}^{I=0} \cdot \text{EXP}(-cI + b), \quad (2.5),$$

где  $K_{oc}^{I=0}$  - константа связывания ПАУ гумусовыми кислотами при ионной силе раствора равной нулю;  $K_{oc}^I$  - константа связывания при ионной силе I;  $b, c$  - эмпирические коэффициенты:

для Ру:  $b = 0.75; \quad c = 184;$

для Flt:  $b = 0.70; \quad c = 102;$

для An:  $b = 0.32; \quad c = 38;$

Коэффициенты  $b, c$  из уравнения (2.5) были определены путем минимизации суммы квадратов отклонений экспериментальных и теоретических зависимостей. Примеры лучших аппроксимационных кривых приведены на Рис. 2.16 для Ру. Аналогичные зависимости были получены для Flt и An.

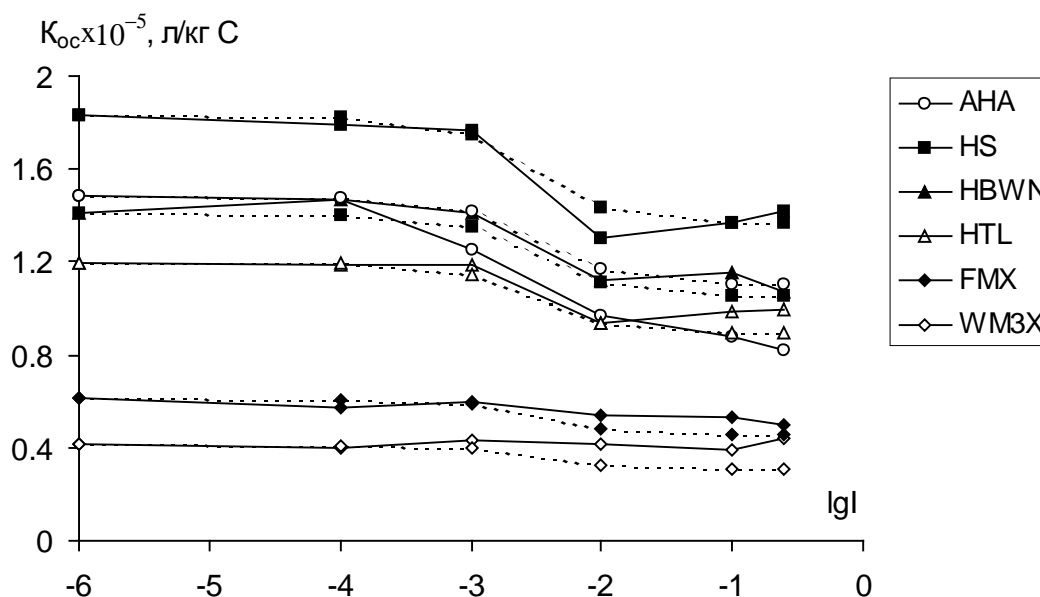


Рис. 2.16. Зависимость  $K_{oc}$  пирена от ионной силы раствора: линии - экспериментальные данные; пунктир - рассчитанные.

Как видно из представленных зависимостей, используемое уравнение (2.15) позволяет аппроксимировать экспериментальные кривые с достаточно высоким уровнем статистической достоверности. Соответствующие  $r^2$  составили, в среднем, 0.83 в случае Py и 0.88 и 0.92 для Flt и An.

Следует отметить, что в литературе имеются данные о возможном тушении флуоресценции ПАУ галогенид-ионами [111, 165]. Данное обстоятельство может вносить погрешности в определение  $K_{oc}$  при высоких значениях ионной силы раствора, не связанные с образованием комплексов ПАУ-ГФК. В связи с этим нами была исследована зависимость интенсивности флуоресценции модельных ПАУ при постоянстве их концентрации в растворе от концентрации фонового электролита (NaCl). Результаты измерений показали, что интенсивность флуоресценции ПАУ не изменялась во всем диапазоне изменения ионной силы от  $1 \times 10^{-4}$  до  $2.5 \times 10^{-1}$  М. Данный факт может свидетельствовать об отсутствии эффекта тушения флуоресценции ПАУ хлорид-ионами в условиях эксперимента.

Таким образом, вышеприведенные исследования показывают, что сродство ГФК к ПАУ зависит не только от структурных особенностей ГФК, но также и от параметров водной среды, в которой происходит взаимодействие. Описанный характер зависимости  $K_{oc}$  от pH и ионной силы хорошо согласуется с предположением о преобладающем вкладе гидрофобных взаимодействий в связывание ПАУ гумусовыми кислотами.



При этом, полученные двухпараметрические зависимости  $K_{oc}$  от pH и ионной силы могут быть использованы для корректировки значений констант связывания при изменении параметров водной среды.

### 2.3. Исследование детоксицирующей способности ГФК по отношению к ПАУ

Как показали проведенные исследования, присутствие ГФК в природных средах приводит к уменьшению концентрации свободного ПАУ в растворе за счет связывания их ГФК:



Долю ПАУ, находящегося в свободном состоянии ( $a$ ) можно оценить с помощью следующего уравнения

$$a = \frac{[\text{ПАУ}]}{[\text{ПАУ}] + [\text{ПАУ-ГФК}]} = \frac{1}{1 + C_{\text{ГФК}} \times K_{oc}} \quad (2.7)$$

Принимая, что именно данная (несвязанная) форма ПАУ обладает максимальной биологической активностью, взаимодействие с ГФК можно рассматривать как один из важнейших факторов, определяющих биодоступность ПАУ для водных организмов. Это подтверждается целым рядом работ по изучению биоаккумуляции ПАУ, в которых наблюдается уменьшение коэффициента накопления ПАУ ( $BCF$ ) живыми организмами в присутствии ГФК пропорционально доли ПАУ, находящегося в свободном состоянии [125, 126, 153, 157, 178]:

$$BCF_{\text{ПАУ-ГФК}} = a \cdot BCF_{\text{ПАУ}} \quad (2.8)$$

$$a = \frac{BCF_{\text{ПАУ+ГФК}}}{BCF_{\text{ПАУ}}} = \frac{1}{1 + C_{\text{ГФК}} \times K_{oc}^{BCF}} \quad (2.9)$$

где  $K_{oc}^{BCF}$  - константа связывания ПАУ гумусовыми кислотами, рассчитанная исходя из значений  $BCF$  в присутствии и отсутствие ГФК.

Выражение (2.8) было использовано многими авторами для расчета  $K_{oc}^{BCF}$ . При справедливости высказанной выше гипотезы о доступности для биоты только свободного ПАУ, можно ожидать равенства значений констант связывания, определенных физико-химическими методами и рассчитанных из данных по биоаккумуляции ПАУ, т.е.  $K_{oc} = K_{oc}^{BCF}$ .

Принимая во внимание, что токсичность ПАУ также пропорциональна концентрации ПАУ, находящегося в свободном состоянии можно было бы ожидать выполнения следующих зависимостей:

$$T_{ПАУ-ГФК} = \alpha \times T_{ПАУ} \quad (2.9)$$

$$a = \frac{T_{ПАУ+ГФК}}{T_{ПАУ}} = \frac{1}{1 + C_{ГФК} \times K_{oc}^{tox}} \quad (2.10)$$

$$K_{oc} = K_{oc}^{tox} \quad (2.11)$$

где  $K_{oc}^{tox}$  - константа связывания ПАУ гумусовыми кислотами, рассчитанная из данных по оценке токсичности ПАУ в присутствии и отсутствие ГФК.

Однако ввиду возможной физиологической активности ГФК по отношению к водным организмам (разд. 1.4.3), такой подход неприемлем для оценки констант связывания ПАУ гумусовыми кислотами из токсикологических данных. Следовательно, для расчета констант связывания ПАУ гумусовыми кислотами из данных по оценке токсичности ПАУ в присутствии и отсутствие ГФК необходимо отдельно оценить уменьшение токсичности ПАУ, вызываемое только снижением концентрации свободной формы ПАУ в результате связывания их ГФК (собственно детоксикация ПАУ) и возможное стимулирующее влияние ГФК на тест-объект.

Для исследования детоксицирующей способности ГФК по отношению к ПАУ был использован метод биотестирования. В качестве тест-объекта была выбрана *Daphnia magna*. В качестве тест-отклика использовали активность питания дафний ( $R$ ). Активность питания регистрировали по изменению концентрации хлорофилла в суспензии водоросли *Chlorella pyrenoidosa*, которую вносили в тест-систему как пищу для рачков. Предварительные эксперименты с другим тест-объектом - зеленой водоросли *Chlorella pyrenoidosa* - показали его непригодность для подобных исследований ввиду низкой чувствительности к токсическому действию ПАУ.

Применение методики биотестирования с использованием в качестве тест-объекта *D. magna* позволило регистрировать токсический эффект ПАУ уже на первые сутки экспозиции.

### 2.3.1. Установление диапазонов токсичности модельных ПАУ

Для определения диапазонов токсичности Py, Flt и An готовили серии из пяти растворов для каждого ПАУ с концентрациями в диапазоне: 20-100, 10-140 и 7.5-35 мкг/л, или  $(1-5) \times 10^{-7}$ ,  $(0.5-7) \times 10^{-7}$  и  $(0.2-1.7) \times 10^{-7}$  М, соответственно.

Токсический эффект ПАУ ( $T_{ПАУ}$ ) оценивали как относительное уменьшение тест-отклика в присутствии ПАУ ( $R_{ПАУ}$ ) по сравнению с тест-откликом в контрольном растворе ( $R_0$ ):

$$T_{ПАУ} = \frac{R_0 - R_{ПАУ}}{R_0} \quad (2.12),$$

Зависимости «концентрация ПАУ - токсический эффект» для Py, Flt и An приведены на Рис. 2.17.

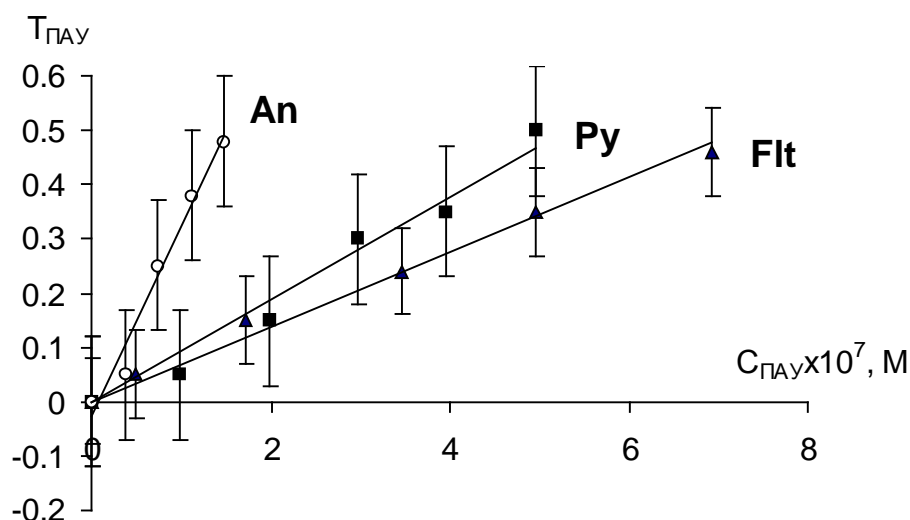


Рис. 2.17. Зависимости «концентрация ПАУ - токсический эффект» для пирена, флуорантена и антрацена (тест-объект *D.magna*).

Как видно из рисунка, экспериментальные зависимости «концентрация - токсический эффект» в указанном диапазоне концентраций были линейными для всех модельных ПАУ и аппроксимировались уравнением прямой:

$$T_{ПАУ} = k \cdot C_{ПАУ} \quad (2.13),$$

где  $k$  - угловой коэффициент зависимости «концентрация - токсический эффект» ПАУ;  $C_{ПАУ}$  - общая концентрация ПАУ в растворе.

Для  $P_y$ , Flt и An  $k$  ( $\pm$  стандартное отклонение при  $n=5$ ) составил  $(0.94 \pm 0.05) \times 10^8$ ,  $(6.4 \pm 0.3) \times 10^7$  и  $(3.3 \pm 0.2) \times 10^8$   $m^{-1}$ . Соответствующие коэффициенты корреляции ( $r^2$ ) для  $P_y$ , Flt и An - 0.96, 0.98, 0.97.

Максимальная токсичность для модельных ПАУ по отношению к *D. magna* была зарегистрирована для самых высоких концентраций, достигнутых при приготовлении водных растворов соответствующих ПАУ (разд. 3.6.2), а именно, 0.5, 0.7 и 0.17  $\mu M$  для  $P_y$ , Flt и An, соответственно. Данные концентрации вызывали уменьшение активности питания дафний на  $54 \pm 8\%$ ,  $52 \pm 7\%$  и  $50 \pm 9\%$  ( $P = 0.95$ ,  $n = 3$ ), для  $P_y$ , Flt и An, соответственно. Максимальная токсичность водных растворов ПАУ составляла примерно 50 % от контроля.

Указанные выше концентрации были выбраны для проведения экспериментов по изучению детоксицирующей способности ГФК по отношению к ПАУ.

### 2.3.2. Количественная оценка детоксицирующей способности ГФК по отношению к ПАУ

Для оценки детоксицирующего действия ГФК была введена величина «коэффициент детоксикации» ( $D$ ), соответствующая относительному уменьшению токсического эффекта ПАУ в присутствии ГФК ( $T_{ГФК+ПАУ}$ ) по сравнению с исходным токсическим эффектом ПАУ ( $T_{ПАУ}$ ). Изменение уровня токсичности ПАУ в присутствии ГФК может быть обусловлено как изменением концентрации свободной формы ПАУ, в результате химического связывания между ПАУ и ГФК, так и собственным воздействием ГФК на тест-объект. Поэтому составляющую токсического эффекта, обусловленную только воздействием свободно-растворенного ПАУ, на фоне собственного воздействия ГФК ( $T_{ГФК+ПАУ}$ ), рассчитывали, используя в качестве контроля тест-отклик в присутствии ГФК ( $R_{ГФК}$ ):

$$T_{ГФК+ПАУ} = \frac{R_{ГФК} - R_{ГФК+ПАУ}}{R_{ГФК}} \quad (2.14)$$

Выражение (2.14) позволяет оценить остаточную токсичность ПАУ в присутствии ГФК с учетом непосредственного воздействия самих ГФК на дафнии.

В связи с вышесказанным, коэффициент  $D$  рассчитывали с помощью следующего уравнения:

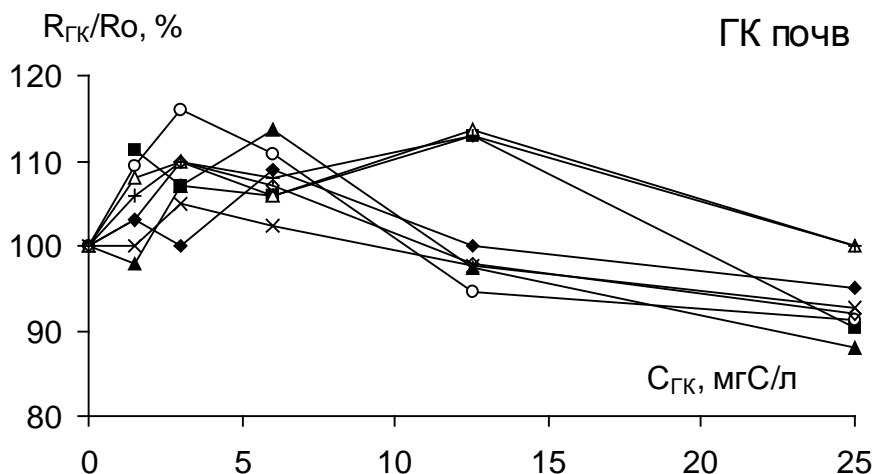
$$D = \frac{T_{\text{ПАУ}} - T_{\text{ГФК+ПАУ}}}{T_{\text{ПАУ}}} = \frac{\frac{R_0 - R_{\text{ПАУ}}}{R_0} - \frac{R_{\text{ГФК}} - R_{\text{ГФК+ПАУ}}}{R_{\text{ГФК}}}}{\frac{R_0 - R_{\text{ПАУ}}}{R_0}} \quad (2.15)$$

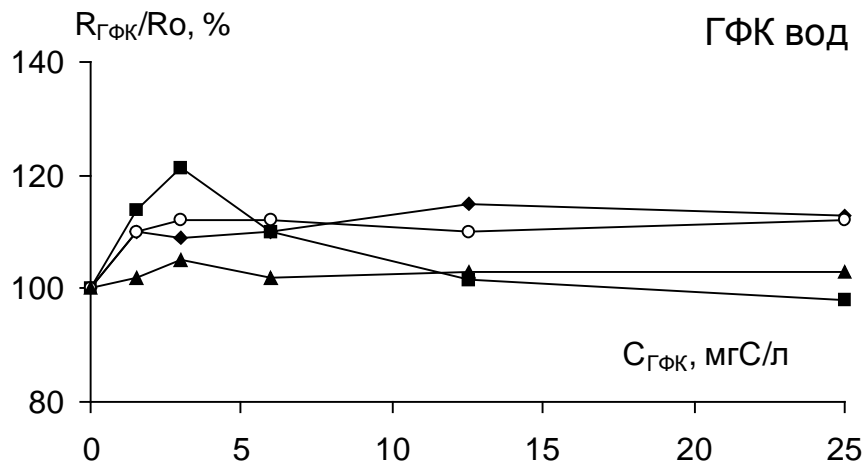
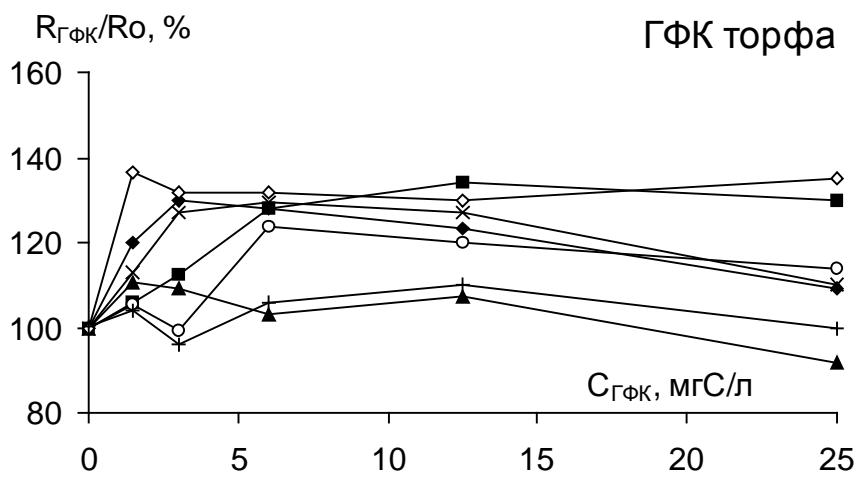
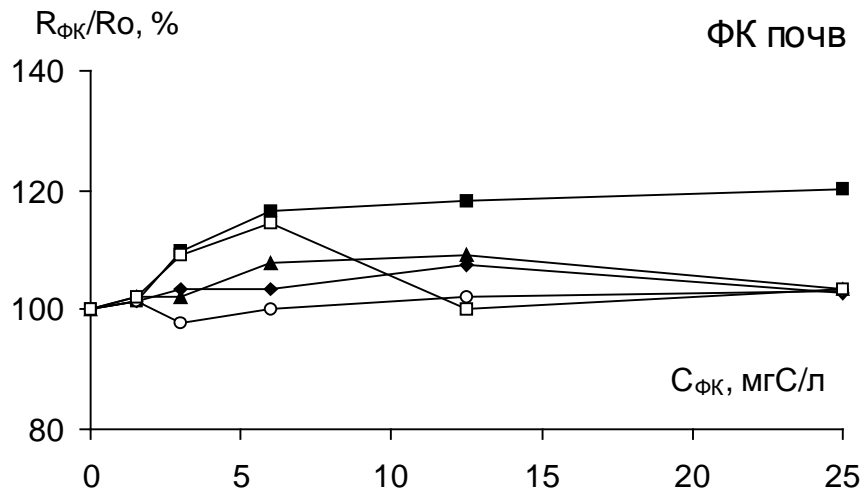
Такой способ расчета позволяет оценить величину детоксицирующего эффекта, вызываемого уменьшением концентрации свободного токсиканта на фоне собственного воздействия ГФК на тест-организмы (т.е. значение коэффициента  $D$  зависит только от связывающей способности ГФК по отношению к ПАУ).

Как следует из уравнения (2.15), для исследования детоксицирующей способности ГФК необходимо было оценить токсический эффект ПАУ в отсутствие и в присутствии ГФК и возможное стимулирующее влияние ГФК на дафний. С этой целью были измерены активности питания дафний в следующих растворах: (1) в контрольном, (2) в растворе при определенной концентрации ПАУ, (3) в растворе при определенной концентрации ГФК и (4) при совместном присутствии ПАУ и ГФК в концентрациях, аналогичным растворам (2) и (3). Таким образом, можно сказать, что коэффициент  $D$  является “точечной” величиной, характеризующей детоксицирующий эффект ГФК и может быть использован для оценки и сравнения детоксицирующей способности ГФК различного происхождения только при определенных концентрациях ГФК и ПАУ.

С целью измерения активности питания дафний проводили биотестирование растворов, содержащих постоянные концентрации ПАУ и различные концентрации ГФК в диапазоне 1.5 - 25 мг С/л.

Зависимости изменения активности питания дафний от концентрации ГФК различного происхождения приведены на Рис. 2.18.





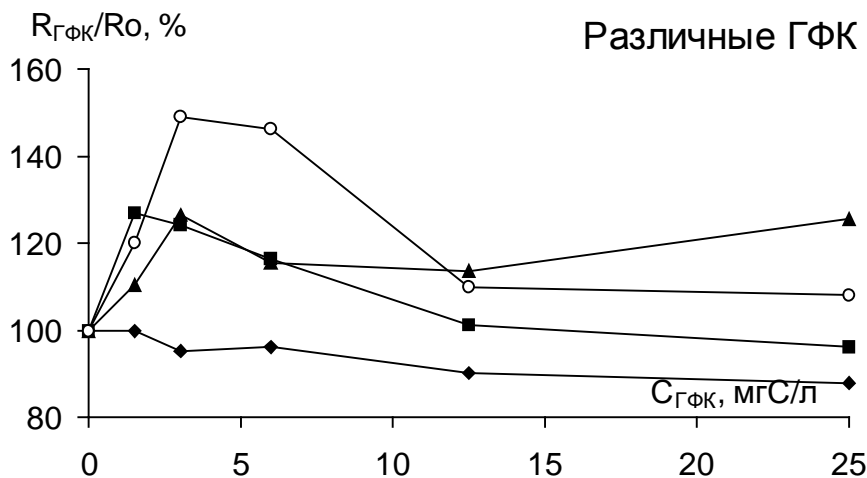


Рис. 2.18. Зависимость активности питания дафний (в процентах от контроля) от концентрации ГФК различного происхождения. ГК почв - **u**HS, **s**HST, **n**HBP, **m**HGP, \*HBWNd, **l** HBG, **o**HBW, ; HGW; ФК почв - ; FGW, **s**FST, **o**FBW, **n**FBP, **l** FBG; ГФК торфа - \*T1, **l** T4, **m**T5, **s**T6, **u**T7, **n**TTL, **o**HTL, ; HTW; ГФК вод - HS, **o**FMX, **n**SWA, \*FMC, **u**WM3X; Различные ГФК - **n**ANA, **u**AGK, **s**SEL.

Как видно из представленных зависимостей, присутствие ГФК в диапазоне концентраций 1.5-25 мг С/л оказывало заметный стимулирующий эффект на *D. magna*, что выражалось в увеличении их активности питания. При этом в большей степени стимулирующий эффект оказывали ГФК торфа (увеличение  $R_{ГФК}$  до 140% относительно  $R_0$ ). ГК и ФК почв вызывали увеличение  $R_{ГФК}$  в среднем до 110 % относительно контроля. Однако при 25 мг С/л и выше практически все ГК почв вызывали снижение  $R_{ГК}$  до 90%. Активность питания дафний в присутствии водных ГФК возрастала до 110% во всем диапазоне концентраций ГФК. Не было отмечено заметного стимулирующего действия в присутствии АГК.

Типичные зависимости токсического эффекта  $P_u$ ,  $Flt$  и  $Ap$  от концентрации ГФК различного происхождения (ГК почв, ФК почв, ГФК торфа, ГФК вод) приведены на Рис. 2.19.

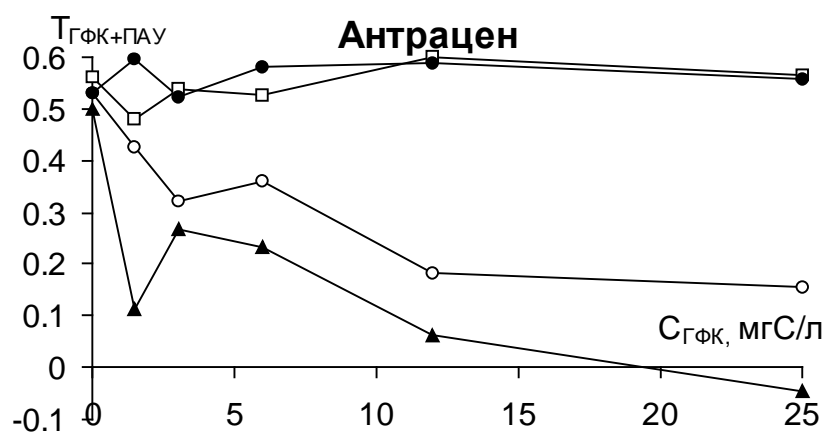
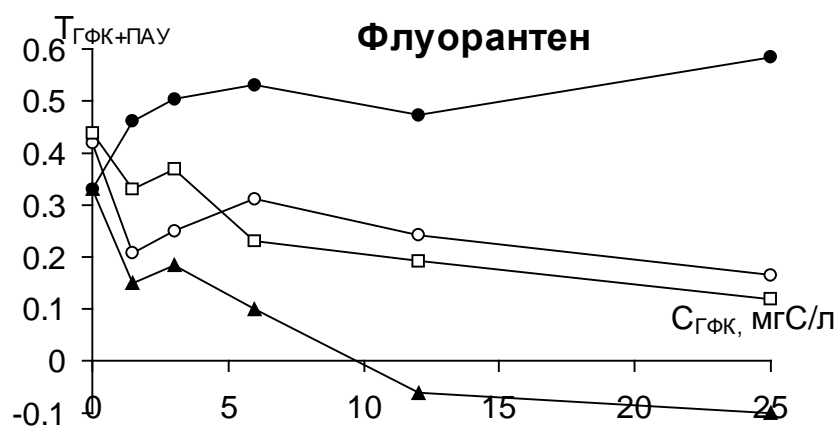
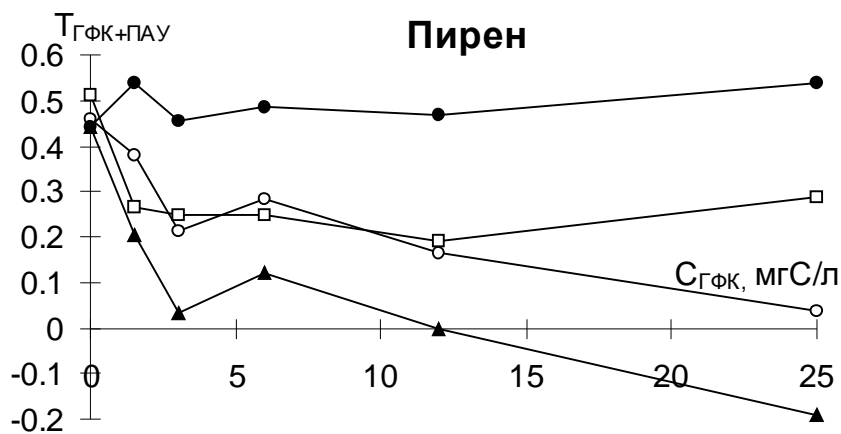


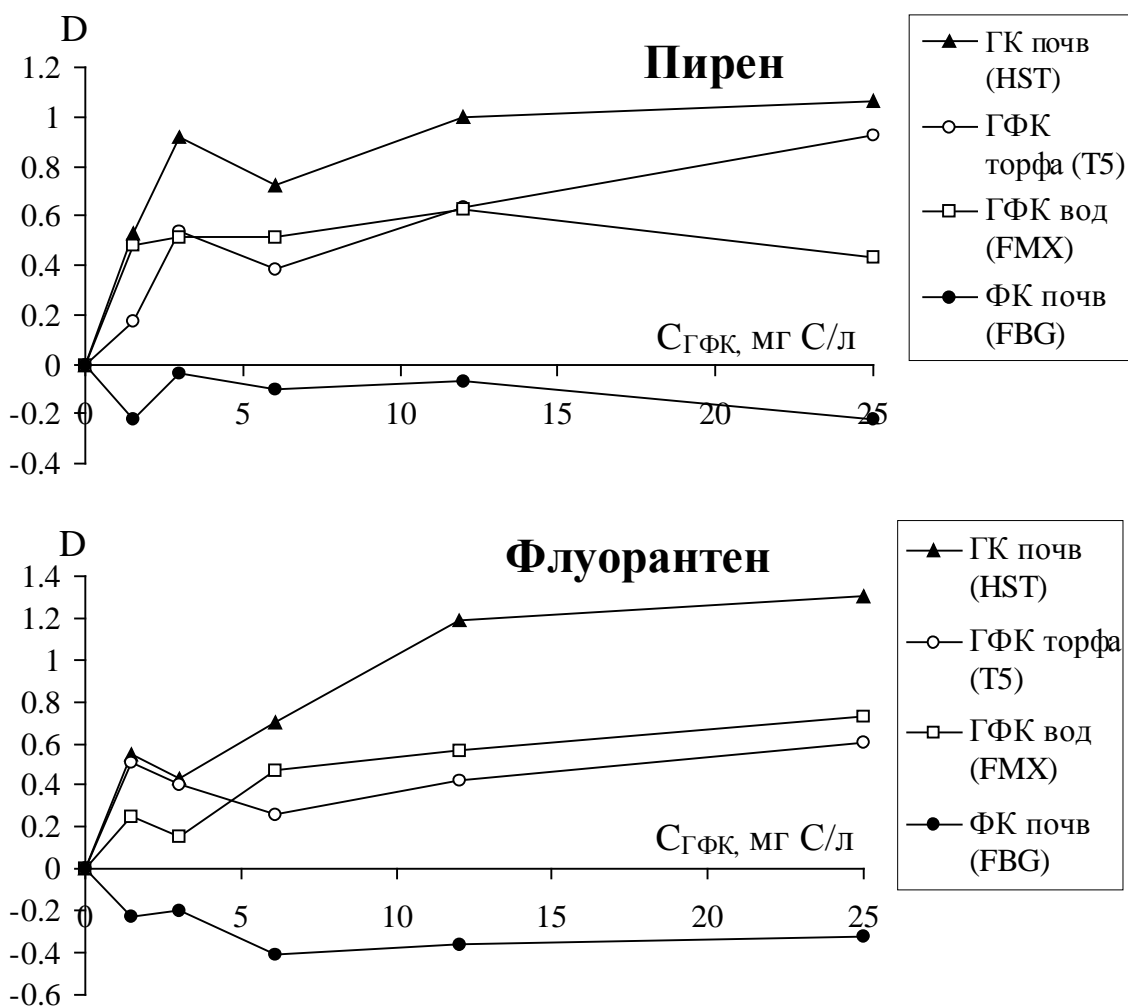
Рис. 2.19. Зависимость токсического эффекта модельных ПАУ от концентрации ГФК различного происхождения (тест-объект *D. magna*): **s** - ГК почв (HST); **l** - ГК почв (FBG); **m** - ГФК торфа (T5); **o** - ГФК природных вод (FMX).

Как видно из представленных зависимостей, увеличение концентрации препаратов ГФК от 1.5 до 25 мг С/л при постоянной концентрации ПАУ способствует снижению токсического действия ПАУ.



Данный эффект наблюдается практически для всех препаратов ГФК, за исключением ФК почв и ГФК природных вод в случае Ап.

Полученные экспериментальные данные по влиянию препаратов ГФК различного происхождения на токсическое действие Ру, Flt, Ап, а также по воздействию ГФК на активность питания дафний позволили оценить детоксицирующий эффект данных препаратов. Типичные концентрационные зависимости детоксицирующего эффекта препаратов ГФК различного происхождения по отношению к ПАУ - так называемые кривые детоксикации, рассчитанные с помощью выражения (2.15), приведены на Рис. 2.20.



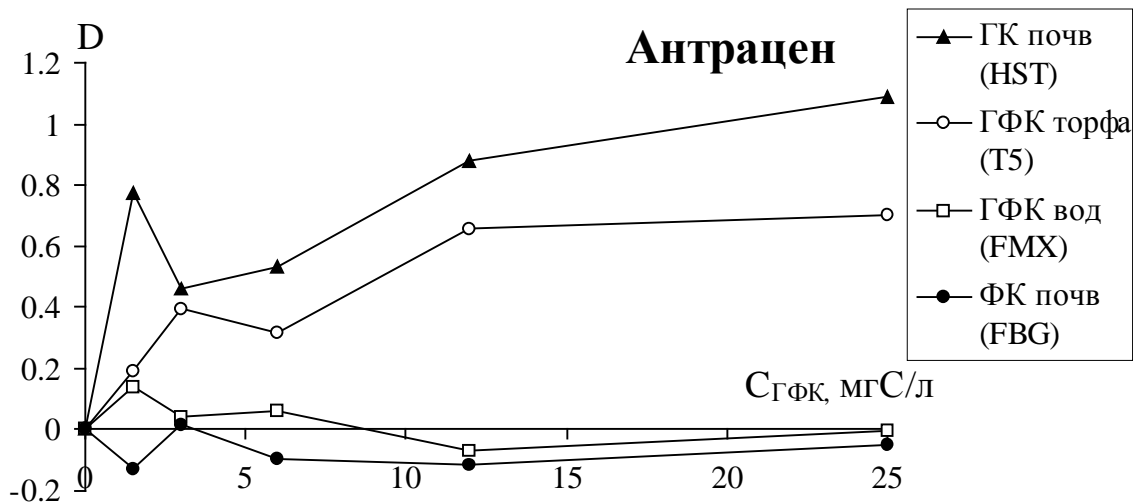


Рис. 2.20. Типичные кривые детоксикации ГФК различного происхождения по отношению к модельным ПАУ.

Как видно из приведенных зависимостей, наибольший детоксицирующий эффект по отношению к исследуемым ПАУ проявляют ГК почв. Детоксицирующий эффект ГФК торфа несколько ниже. Менее выраженной детоксицирующей способностью обладают ГФК вод. При этом в случае Ан детоксикации в присутствии данных ГФК вообще не наблюдается. ФК почв не обладают детоксицирующим действием ни к одному из модельных ПАУ. Следует отметить, что наиболее существенное изменение в значениях  $D$  наблюдается в диапазоне концентраций ГФК  $\sim 1.5 - 6$  мг С/л. Дальнейшее увеличение концентрации ГФК до 25 мг С/л практически не влияло на их детоксицирующую способность.

Как было показано выше, коэффициент  $D$  является “точечной” величиной оценки детоксицирующей способности ГФК и поэтому не может быть использован для прогноза детоксицирующего эффекта ГФК при их различном содержании в природных средах по отношению к ПАУ. В целях получения параметра, характеризующего детоксицирующую способность ГФК во всем диапазоне концентраций, нами были рассчитаны константы связывания ПАУ гумусовыми кислотами ( $K_{oc}^{tox}$ ) из токсикологических данных. Ввиду того, что показатель  $D$  отражает снижение токсичности ПАУ, обусловленное только уменьшением концентрации свободной формы ПАУ, в результате связывания их гумусовыми кислотами в нетоксичные комплексы, на фоне собственного воздействия ГФК на тест-организмы, можно записать следующее выражение для расчета  $K_{oc}^{tox}$ .

$$D = \frac{K_{oc}^{tox} \times C_{ГФК}}{1 + K_{oc}^{tox} \times C_{ГФК}} \quad (2.16)$$

где  $K_{oc}^{tox}$  - константа связывания ПАУ гумусовыми кислотами, рассчитанная из данных токсикологического эксперимента.

Таким образом, экспериментальные зависимости коэффициента  $D$  от концентрации ГФК можно использовать для расчета константы связывания ПАУ гумусовыми кислотами, аппроксимируя их с помощью уравнения (2.16).

Для подтверждения справедливости использования уравнения (2.16) дополнительно было введено следующее предположение: тест-отклик  $D. magna$  как на токсическое действие свободной формы ПАУ, так и на стимулирующее влияние ГФК не изменяется при совместном присутствии в растворе ПАУ и ГФК. Данное предположение описывается следующим выражением:

$$\frac{R_{ГФК}}{R_{ГФК+ПАУ}} = \frac{R_0}{R_{[ПАУ]}} \quad (2.17),$$

где  $R_{[ПАУ]}$  - активность питания дафний в растворе ПАУ при условии равенства общей концентрации ПАУ концентрации свободной формы ПАУ в присутствии ГФК.

Выражая из (2.17)  $R_{ГФК+ПАУ}$  и подставляя полученное уравнение в формулу для коэффициента  $D$  (2.15), получаем выражение (2.18):

$$D = \frac{T_{ПАУ} - T_{[ПАУ]}}{T_{ПАУ}} \quad (2.18)$$

Так как тест-отклик в присутствии ПАУ ( $T_{ПАУ}$ ) линейно зависит от его содержания в растворе ( $C_{ПАУ}$ ) (2.13), уравнение (2.18) можно переписать в следующем виде:

$$D = \frac{(kC_{ПАУ} - k[ПАУ])}{kC_{ПАУ}} = 1 - a \quad (2.19)$$

Как видно из вышеприведенного уравнения, при условии выполнения предположений (1) токсический эффект ПАУ как в присутствии, так и в отсутствие ГФК линейно зависит от концентрации его свободно растворенной формы, и (2) собственное действие ГФК на тест-объект не изменяется при добавлении ПАУ,  $D$  пропорционален доли ПАУ,

связанного гумусовыми кислотами. Полученное выражение может служить подтверждением справедливости уравнения (2.16).

Значения  $K_{oc}^{tox}$  были рассчитаны с помощью нелинейного метода наименьших квадратов. При этом минимизировалась сумма квадратов отклонений, рассчитанных по уравнению (2.16) коэффициентов детоксикации от экспериментальных значений. Примеры соответствующих экспериментальных зависимостей и аппроксимирующих их кривых приведены на Рис. 2.21.

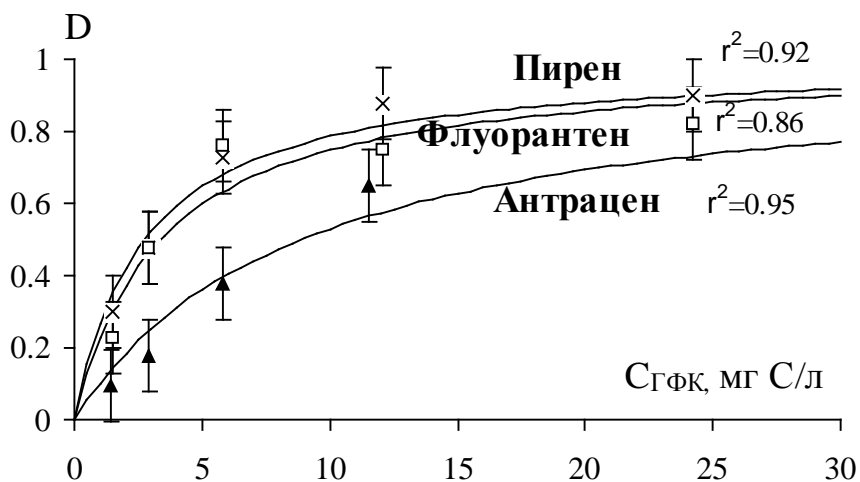


Рис. 2.21. Кривые детоксикации модельных ПАУ гумусовыми кислотами на примере ГК почв (НВW). Точками обозначены экспериментальные данные, сплошными линиями - аппроксимирующие расчетные кривые.

Как видно из рисунка, использование уравнения (2.16) позволяет аппроксимировать экспериментальные кривые с довольно высоким уровнем статистической достоверности. Рассчитанные значения  $K_{oc}^{tox}$  для Py, Flt и An и соответствующие стандартные отклонения приведены в Табл. 2.18.

Таблица 2.18

Константы связывания ПАУ гумусовыми кислотами различного происхождения (л/кг С), рассчитанные из токсикологических данных

Препарат ГФК	Пирен		Флуорантен		Антрацен	
	$K_{oc}^{tox} \times 10^{-5}$	$r^2$	$K_{oc}^{tox} \times 10^{-5}$	$r^2$	$K_{oc}^{tox} \times 10^{-5}$	$r^2$
<b>ГК почв</b>						
НВW	$4 \pm 1.4^*$	0.95	$5 \pm 1.3$	0.95	$6 \pm 2.4$	0.91

Препарат ГФК	Пирен		Флуорантен		Антрацен	
	$K_{oc}^{tox} \times 10^{-5}$	$r^2$	$K_{oc}^{tox} \times 10^{-5}$	$r^2$	$K_{oc}^{tox} \times 10^{-5}$	$r^2$
HBWN	4±1.2	0.82	7±3.4	0.97	6±1.9	0.88
HBP	3±0.8	0.92	4±1.5	0.86	4±1.3	0.95
HBG	2.1±0.5	0.90	2.1±0.2	0.93	2±0.6	0.86
HGW	4±1.3	0.91	4±2.2	0.88	4±1.1	0.88
HGP	4±0.8	0.96	5±0.8	0.90	4±1.2	0.93
HS	6±3.1	0.96	8±4.8	0.95	6±2.4	0.88
HST	5±1.6	0.86	6±3.5	0.91	6±2.5	0.88
<b>ФК почв</b>						
FBW	<0.3**		<0.3		<0.3	
FBP	<0.3		<0.3		<0.3	
FBG	<0.3		<0.3		<0.3	
FGW	<0.3		<0.3		<0.3	
FST	3.0±0.8	0.89	2.2±0.6	0.94	<0.3	
<b>ГФК почв</b>						
SEL	3.6±0.6	0.91	3.4±0.4	0.93	2±0.5	0.98
<b>ГФК торфа</b>						
T1	4±1.1	0.86	3±1.2	0.89	<i>n.d.</i>	
T4	3.7±0.6	0.81	5±1	0.88	1±0.5	0.88
T5	2±0.8	0.91	4.4±2.5	0.98	1.2±0.2	0.91
T6	3.6±0.6	0.96	3±0.8	0.91	1.3±0.6	0.86
T7	4±2.6	0.96	6.0±0.3	0.96	<i>n.d.</i>	
HTL	4±1.7	0.98	4±0.8	0.92	1.8±0.5	0.87
TTL	4±2.7	0.97	4±1	0.96	0.3±0.1	0.96
HTW	0.8±0.2	0.95	0.3±0.1	0.97	<0.3	0.91
<b>ГФК вод</b>						
FMX	3±1.1	0.91	2±0.5	0.96	<0.3	
WM3X	1.1±0.3	0.93	0.4±0.1	0.88	<0.3	
FMC	1.9±0.5	0.91	2.5±0.5	0.96	<0.3	
SWA	1.9±0.7	0.98	2±0.6	0.91	<0.3	
<b>ГК угля</b>						
АНА	6±3.4	0.84	6±2.8	0.94	5±1.3	0.91
AGK	6±0.6	0.97	5±0.8	0.87	<i>n.d.</i>	

\* ±стандартное отклонение при n=5; \*\* минимально определяемое значение  $K_{oc}^{tox}$

Как видно из приведенных данных, максимальное детоксицирующее действие ГФК наблюдается для Ру и Flt. В случае An детоксицирующий эффект ГФК минимален. Зависимость величины детоксицирующего эффекта ГФК от используемого ПАУ, по видимому, обусловлена их различной гидрофобностью:  $\lg K_{ow} = 4.45$  для An и  $\lg K_{ow} \cong 5.0$  для Ру и Flt. Полученные результаты согласуются с данными авторов [126, 139, 143, 192] по влиянию ГФК на биоаккумуляцию различных ПАУ дафниями.

Сопоставление препаратов по источнику происхождения показало, что ГК черноземов и ГК угля обладают наибольшей детоксицирующей способностью по отношению к Ру, Flt и An. Близкими к ним значениями  $K_{oc}^{tox}$  характеризовались ГК дерново-подзолистых и серых лесных почв. Для торфяных ГФК значения  $K_{oc}^{tox}$  ниже в среднем на 30 - 40% по сравнению с ГК почв. Относительно низкие константы наблюдаются в случае взаимодействия водных ГФК с Ру и Flt. Для An значения констант оказались ниже минимально определяемой величины  $K_{oc}^{tox}$  ( $0.3 \times 10^5$  л/кг С), рассчитанной с использованием 3S критерия [217]. Константы связывания Ру, Flt и An в случае ФК почв также были ниже минимально определяемой величины. Исключение составили ФК чернозема для Ру и Flt ( $(3.0 \pm 0.8) \times 10^5$  и  $(2.2 \pm 0.6) \times 10^5$  л/кг С, соответственно). Таким образом, полученные результаты позволяют расположить препараты ГФК по величине их детоксицирующего потенциала по отношению к ПАУ в следующий ряд,:

ГК угля, ГК чернозема  $\gg$  ГК П<sup>Д</sup> и Л почв  $>$  ГФК торфа  $>$  ГФК вод  $\cong$   
ФК чернозема  $\gg$  ФК П<sup>Д</sup> и Л почв

Следует отметить, что аналогичный ряд был получен для связывающей способности ГФК по отношению к ПАУ (разд. 2.2.1). Полученные результаты о зависимости детоксицирующего действия ГФК по отношению к ПАУ от источника их происхождения согласуются с литературными данными по влиянию ГФК различного происхождения на биоаккумуляцию ПАУ. Так, исследователи [178] отмечали, что присутствие ГК Aldrich способствует более существенному снижению ВСФ бенз(а)пирена, чем ГФК природных вод. Незначительное уменьшение ВСФ некоторых ПАУ в присутствии ФК почв по сравнению с соответствующими ГК наблюдали авторы [125, 197].

Следует отметить, что аналогичные зависимости от источника происхождения и гидрофобности ПАУ были получены при оценке детоксицирующей способности ГФК различного происхождения с помощью коэффициента  $D$  (Рис. 2.20). Коэффициенты корреляции между

$D$ , определенным при концентрации ГФК 6 мг С/л и  $K_{oc}^{tox}$  составляют 0.90, 0.81 и 0.84 для Ру, Flt и An, соответственно, что свидетельствует о наличие линейной взаимосвязи между ними.

При справедливости исходного предположения о том, что механизмом детоксикации ПАУ гумусовыми кислотами является образование нетоксичных аддуктов ПАУ-ГФК, можно ожидать равенства значений констант связывания, определенных по методу тушения флуоресценции и рассчитанных из токсикологических данных, т.е.  $K_{oc}^{tox} = K_{oc}$ . В связи с этим нами было проведено сравнение значений  $K_{oc}^{tox}$  и  $K_{oc}$  с использованием  $t$ -критерия Стьюдента. Возможность применения данного критерия для сравнения двух средних обеспечивалась существенным различием стандартных отклонений  $K_{oc}^{tox}$  и  $K_{oc}$ . Так, согласно Табл. 2.18 стандартное отклонение  $K_{oc}^{tox}$  в среднем в 20 раз превышает таковое для  $K_{oc}$  (Табл. 2.6). Данный факт позволил нам применить формулы параметрической статистики для расчета угловых коэффициентов зависимости  $K_{oc}^{tox}$  от  $K_{oc}$ . Графики соответствующих корреляционных зависимостей приведены на Рис. 2.22.

Высокие значения  $r^2$  соответствующих вышеприведенных зависимостей позволяют судить о хорошей сопоставимости данных констант. Так, 74, 72 и 60 % дисперсии  $K_{oc}^{tox}$  Ру, Flt и An объясняются изменением соответствующих величин  $K_{oc}$ . Это обстоятельство позволяет использовать линейную модель взаимосвязи между данными константами:

$$K_{oc}^{tox} = a \times K_{oc} \quad (2.20)$$

где  $a$  - угловой коэффициент графиков соответствующих зависимостей.

Полученные данные подтверждают предположение о том, что образование нетоксичных аддуктов ПАУ-ГФК является основным механизмом детоксикации ПАУ гумусовыми кислотами.

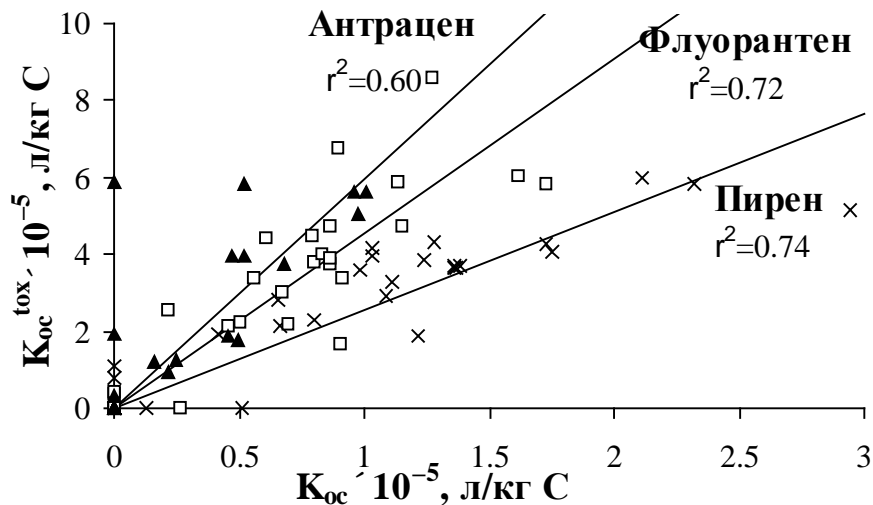


Рис. 2.22. Корреляционные зависимости между константами связывания, определенными методом тушения флуоресценции, и рассчитанными из токсикологических данных.

Рассчитанные угловые коэффициенты соответствующих зависимостей (Рис. 2.20) для Ру, Flt и An составили:  $2.6 \pm 0.3$ ,  $4.6 \pm 0.6$  и  $6 \pm 1.4$

( $\pm$  доверительный интервал,  $P = 0.95$ ,  $n = 26$ ), соответственно. Это указывает на то, что  $K_{oc}^{tox}$  и  $K_{oc}$  статистически значимо различаются по абсолютной величине.

С нашей точки зрения различия в абсолютных значениях констант связывания, рассчитанных из токсикологических данных и определенных с помощью метода тушения флуоресценции, могут быть обусловлены (1) различными экспериментальными условиями определения этих констант, ввиду того, что данные константы являются условными; (2) не выполнением высказанного предположения о том, что токсичностью обладает только свободная форма ПАУ, либо независимостью тест-отклика *D. magna* на токсическое действие свободной формы ПАУ от присутствия ГФК в системе. Гипотеза (2) была предложена на основании имеющихся в литературе [212] данных о повышении резистентности водных организмов к действию токсикантов в присутствии ГФК. В этом случае детоксикация ПАУ будет обусловлена не только связыванием их гумусовыми кислотами, но также и непосредственным воздействием самих ГФК на тест-объект, степень которого во многом будет определяться источником происхождения ГФК. Однако, как видно из Рис. 2.22 наклон зависимостей  $K_{oc}$  и  $K_{oc}^{tox}$  не зависит от «качества» используемых ГФК. В то же время, полученные хорошие корреляции между данными условными константами



связывания предполагают, что уменьшение токсического действия ПАУ и понижение концентрации свободной формы ПАУ в присутствии ГФК обусловлены одним механизмом - образованием комплексов ПАУ-ГФК.

Таким образом, наблюдаемые различия в значениях констант, скорее всего, связаны с различными условиями проведения экспериментов. Поводом для данного предположения может служить то, что в случае определения  $K_{oc}$  с помощью метода тушения флуоресценции, для приготовления соответствующих растворов ПАУ и ГФК, использовали бидистиллированную воду; токсикологические эксперименты же проводили в отстоянной водопроводной воде, предварительно пропущенной через фильтр “Родничок”. С целью подтверждения высказанной гипотезы о влиянии условий проведения экспериментов на значения констант, нами было проведено сравнение констант связывания  $A_n$  гумусовыми кислотами Т6, определенных методом тушения флуоресценции в различной воде: бидистиллированной, дистиллированной и водопроводной воде, пропущенной через фильтр “Родничок”. Полученные результаты приведены на Рис. 2.23.

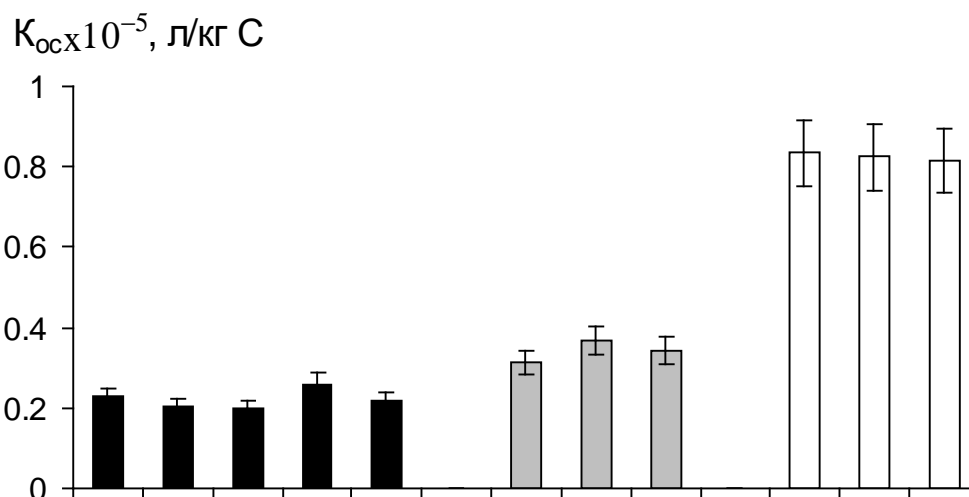


Рис. 2.23. Константы связывания  $A_n$  гумусовыми кислотами Т6, определенные в различных условиях. ■ - бидистиллированная вода, ▨ - дистиллированная вода, □ - водопроводная вода, пропущенная через фильтр “Родничок”.

Как видно из рисунка, значения  $K_{oc}$   $A_n$  существенно различаются в зависимости от используемой воды. Наибольшее связывание  $A_n$  наблюдается в водопроводной воде, пропущенной через фильтр ( $0.8 \times 10^5$  л/кг С), наименьшее - в бидистиллированной воде ( $0.25 \times 10^5$  л/кг С). Видимо, различие в рН, ионной силе, содержании ионов металлов в

существенной степени влияет на степень связывания ПАУ гумусовыми кислотами. Приведенные зависимости подтверждаются экспериментальными данным, полученными при изучении влияния рН и ионной силы среды на связывающую способность ГФК по отношению  $R_u$ ,  $Flt$  и  $An$ , приведенными в разд. 2.2.4. Следует отметить, что значение  $K_{oc}$   $An$ , измеренное при использовании водопроводной воды, близко по значению к  $K_{oc}^{tox}$  ( $1.3 \times 10^5$  л/кг С), полученной в условиях проведения токсикологических экспериментов (Табл. 2.18).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о существенном влиянии ГФК на токсическое действие ПАУ по отношению к *D. magna*. Данное влияние заключается в уменьшении токсичности ПАУ как в результате взаимодействия их с ГФК (т.е. детоксикация ПАУ), так и в стимулирующем воздействии ГФК на тест-объект. Следовательно, для оценки токсичности среды, содержащей ПАУ в присутствии ГФК, необходимо учитывать оба эффекта. В качестве параметра, позволяющего производить такие оценки токсического действия ПАУ в водных средах, нами было предложено использование тест-отклика в присутствии ГФК, в процентах от контроля ( $R_{ПАУ+ГФК}/R_0$ ). Токсическое действие ПАУ в присутствии ГФК было оценено с помощью следующего выражения, полученного путем преобразования (2.15):

$$\frac{R_{ПАУ+ГФК}}{R_0} = \frac{R_{ГФК}}{R_0} \times \left[ D + \frac{R_{ПАУ}}{R_0} (1 - D) \right] \quad (2.21)$$

Как видно из вышеприведенного выражения, для оценки токсического эффекта ПАУ в присутствии ГФК необходимо знание как коэффициента  $D$ , являющегося функцией концентрации ГФК ( $C_{ГФК}$ ) и  $K_{oc}^{tox}$ , так и отклика тест-объекта в присутствии ГФК ( $R_{ГФК}$ ) и ПАУ ( $R_{ПАУ}$ ) при их определенном содержании в водной среде. Коэффициент  $D$  можно рассчитать подстановкой соответствующих значений  $K_{oc}^{tox}$  и  $C_{ГФК}$  в уравнение (2.16). Исходя из полученных ранее линейных зависимостей между  $K_{oc}^{tox}$  и  $K_{oc}$ , токсикологическую константу связывания ПАУ можно оценить с помощью уравнения (2.20). Однако здесь следует отметить, что в этом случае  $K_{oc}$  должна быть определена в условиях, приближенным к тестируемой среде. При не соблюдении данных условий необходимо введение поправочных коэффициентов, учитывающих различия в водной химии сред (рН, ионная сила, наличие ионов металлов). Отклики  $R_{ПАУ}$  и  $R_{ГФК}$  можно определить из соответствующих зависимостей «концентрация -

токсический эффект». Однако, в случае  $R_{ГФК}$  необходимо построение таких зависимостей для каждого конкретного препарата ГФК. Как было показано выше (Рис. 2.18), отклик  $R_{ГФК}$ , в случае ГФК природных вод, во всем диапазоне используемых концентраций (1.5 - 25 мг С/л) практически постоянен и соответствует в среднем 110 % от контроля. Данное значение можно принять за постоянную величину и использовать для расчета  $R_{ПАУ+ГФК}/R_0$  по уравнению (2.21).

Так, например, требуется оценить токсичность водной среды, содержащей  $3 \times 10^{-7}$  М пирена в присутствии 6 мг С/л гумусовых кислот. Согласно уравнению (2.13) данная концентрация  $P_u$  вызывает токсический эффект равный 28% от контроля, что соответствует  $R_{ПАУ}/R_0 = 72$  % от контроля. Как было показано выше, отклик  $R_{ГФК}/R_0$  в случае ГФК природных вод можно принять равным 1.1. Значение  $K_{oc}^{tox}$  рассчитывается с помощью уравнения (2.20) при  $a \cong 2$  и  $K_{oc} = 0.5 \times 10^5$  л/кг С (данное значение является средним значением констант, приведенных в Табл. 2.6 для ГФК природных вод) и составляет  $1 \times 10^5$  л/кг С. Подставляя данную величину в формулу (2.15) для расчета коэффициента  $D$  при  $C_{ГФК} = 6 \times 10^{-6}$  кг С/л получаем  $D \sim 0.4$ . Подстановка полученных значений в выражение (2.21) дает, что  $R_{ПАУ+ГФК}/R_0 = 0.9$  или 90 % от контроля. Полученное значение тест-отклика существенно выше, чем  $R_{ПАУ}/R_0 = 72$  %, величины, полученной без учета воздействия ГФК.

### **2.3.2.1. Исследование влияния ГФК на хроническую токсичность ПАУ**

Для более полной оценки влияния ГФК на токсичность ПАУ были проведены эксперименты по исследованию действия ГФК различного происхождения на хроническую токсичность Flt. С этой целью осуществляли контроль выживаемости дафний в растворе Flt в присутствии различных концентраций ГФК различного происхождения в течение 5 суток. Концентрацию ГФК варьировали от 1.5 до 25 мг С/л при концентрации Flt  $7 \times 10^{-7}$  М. Выборка препаратов ГФК состояла из 7 торфяных и 5 водных ГФК.

Полученные данные приведены на Рис. 2.27 а-с.

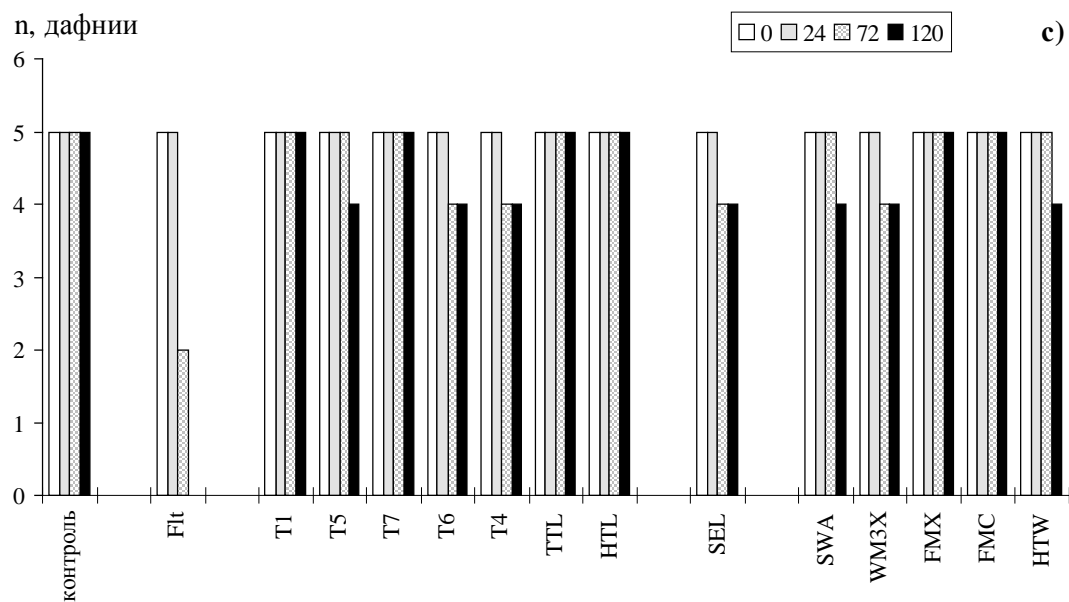
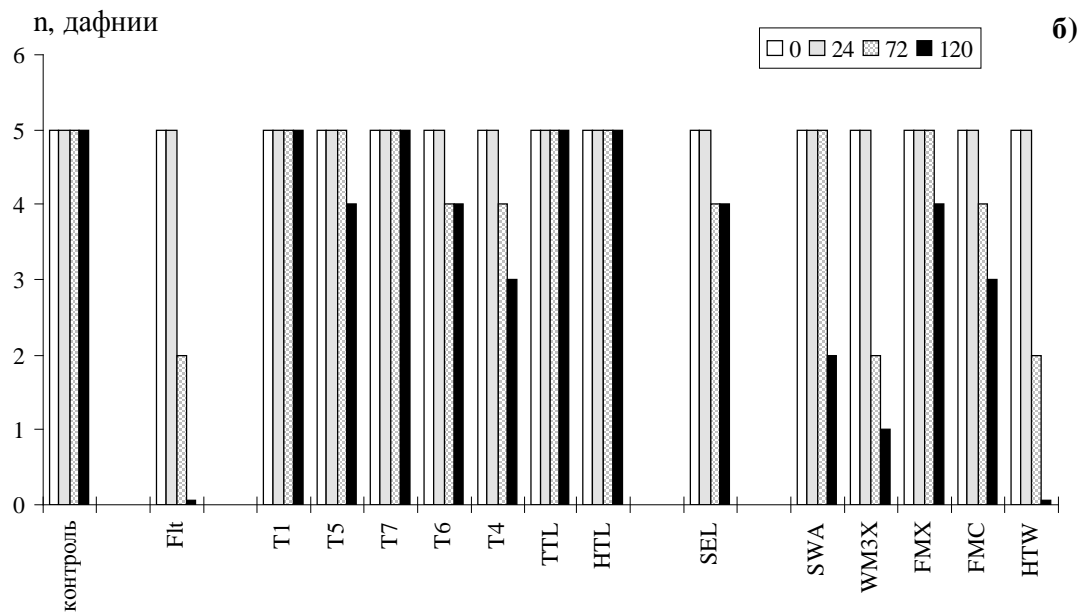
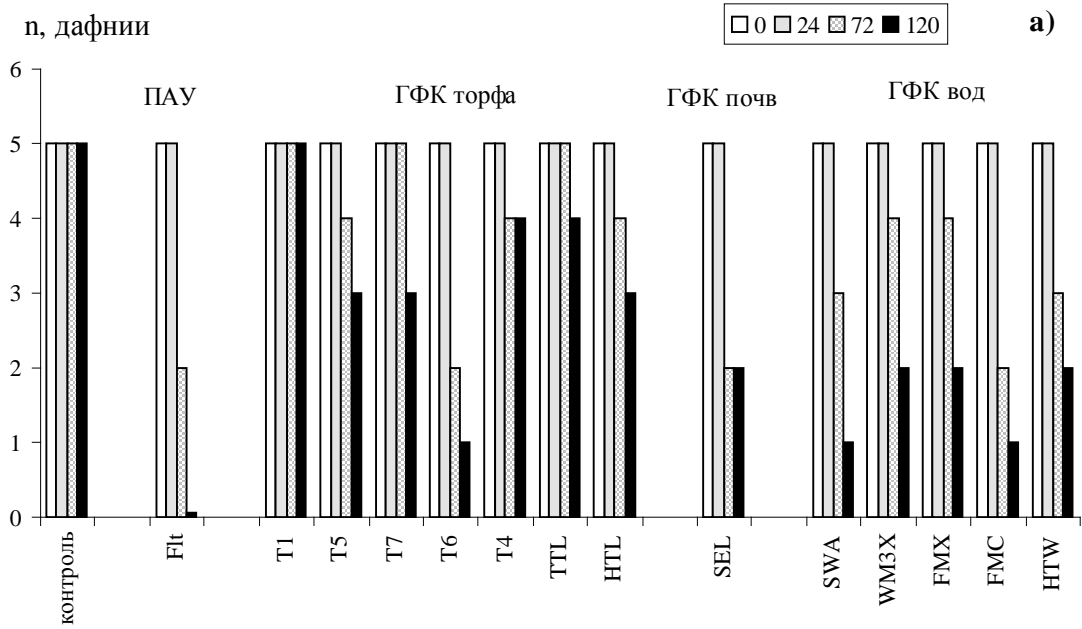


Рис. 2.27 а-с. Влияние ГФК на хроническую токсичность флуорантена ( $7 \times 10^{-7}$  М): а) 1.5 мг С/л ГФК; б) 6 мг С/л ГФК; с) 25 мг С/л ГФК.

Как видно из представленных зависимостей, увеличение содержания ГФК в тест-системах способствует уменьшению токсичности Flt, что выражается в уменьшении летальных исходов дафний при увеличении времени экспозиции. Торфяные ГФК обладали наибольшим детоксицирующим действием по сравнению с водными препаратами. Полученные данные согласуются с результатами по исследованию острой токсичности ПАУ (разд. 2.4.2). По-видимому, уменьшение хронической токсичности также обусловлено образованием нетоксичных комплексов ГФК-ПАУ.

### 2.3.3. Установление взаимосвязи между структурой и детоксицирующей способностью ГФК по отношению к ПАУ

Для установления взаимосвязи между структурой и детоксицирующей способностью ГФК, в целях подтверждения гипотезы о механизме детоксицирующего действия ПАУ гумусовыми кислотами, использовали метод количественных соотношений. Корреляционный анализ проводили между величинами токсикологических констант связывания  $K_{oc}^{tox}$  Py, Flt и An, характеризующих детоксицирующую способность ГФК (Табл. 2.18) и молекулярными дескрипторами состава ГФК (Табл. 2.1 и 2.2), аналогично описанному для  $K_{oc}$  (разд. 2.2.2). Молекулярные дескрипторы генерировали аналогично процедуре, описанной в разд. 2.2.2.

В Табл. 2.19 приведен ряд основных индивидуальных и комбинированных  $^{13}\text{C}$  ЯМР-дескрипторов, использованных в нашей работе, и соответствующие коэффициенты корреляции ( $r$ ) с  $K_{oc}^{tox}$ .

Таблица 2.19

Коэффициенты корреляции между  $^{13}\text{C}$  ЯМР-дескрипторами и  $K_{oc}^{tox}$  пирена, флуорантена и антрацена

Параметры	$K_{oc}^{tox}$ Py	$K_{oc}^{tox}$ Flt	$K_{oc}^{tox}$ An
$\text{C}_{\text{C=O}}$	0.46	0.47	0.21
$\text{C}_{\text{COOH(R)}}$	0.14	0.04	0.05

Параметры	$K_{oc}^{tox Py}$	$K_{oc}^{tox Flt}$	$K_{oc}^{tox An}$
$C_{Ar-O}$	0.42	0.38	0.27
$C_{Ar-H(R)}$	0.87	0.80	0.64
$C_{Alk-O}$	-0.79	-0.65	-0.53
$C_{Alk-H(R)}$	-0.04	-0.18	-0.14
$\Sigma C_{Alk}$	-0.82	-0.72	-0.57
$\Sigma C_{Ar}$	0.85	0.76	0.62
$C_{Ar-O}/\Sigma C_{Ar}$	0.19	0.17	0.23
$\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$	0.80	0.86	0.67
$C_{Ar-H(R)}+C_{Alk-H(R)}/C_{Alk-O}$	0.71	0.53	0.51
$C_{Ar-H(R)}/C_{Alk-O}$	0.74	0.58	0.56
$C_{Ar-H(R)}\times C_{COO}$	0.80	0.68	0.61
$C_{Ar-H(R)}\times C_{Alk}$	0.75	0.56	0.51

Как видно из приведенных данных, для всех трех ПАУ наиболее тесная взаимосвязь наблюдалась между параметрами ароматичности, определяемыми из данных спектроскопии ЯМР  $^{13}C$ . Для дескриптора  $\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$  (Рис. 2.23) соответствующие квадраты коэффициентов корреляции ( $r^2$ ) составили 0.63, 0.74 и 0.45 для Py, Flt и An. Практически такими же значениями  $r^2$  характеризовались зависимости между  $K_{oc}^{tox}$  и  $\Sigma C_{Ar}$ -и  $C_{Ar-H,C}$ : 0.74, 0.61, 0.38 и 0.76, 0.64, 0.41 для Py, Flt и An.

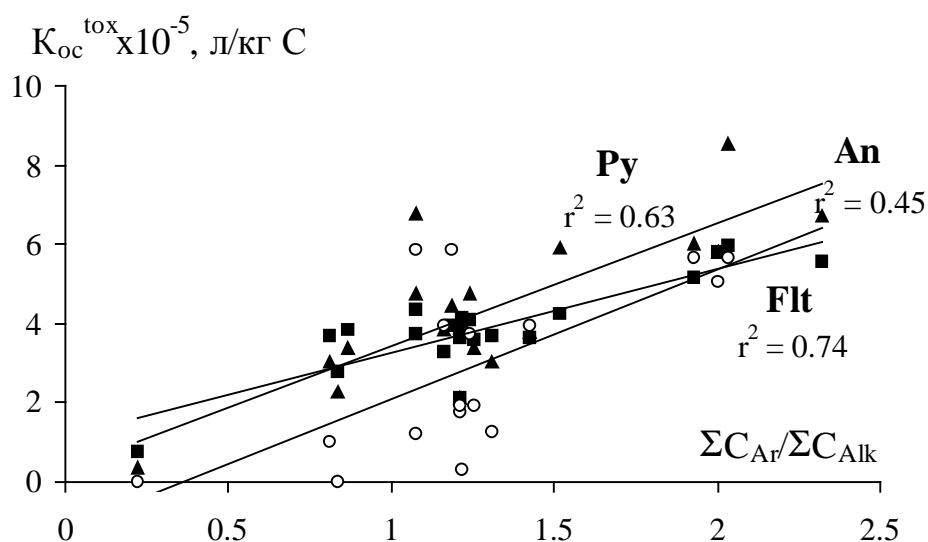


Рис. 2.23. Зависимость  $K_{oc}^{tox}$  пирена, флуорантена и антрацена от соотношения ароматических и алифатических фрагментов в молекулах ГФК различного происхождения.

Наличие тесной взаимосвязи между содержанием ароматического углерода в молекулах ГФК и  $K_{oc}^{tox}$  позволяет судить о важной роли ароматических фрагментов в процессах детоксикации ГФК ПАУ.

Корреляционные зависимости для двух косвенных параметров ароматичности - атомного соотношения Н/С и  $\epsilon_{280}^*$  приведены на Рис. 2.24 и 2.25, соответственно. Данные зависимости были построены для тех же препаратов, для которых были получены  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектры. Как видно из Рис. 2.24, значения  $r^2$  для Н/С и  $\epsilon_{280}^*$  (0.63, 0.55 и 0.45 для Py, Flt и An, соответственно) несколько ниже, чем для  $^{13}\text{C}$  ЯМР-дескрипторов.

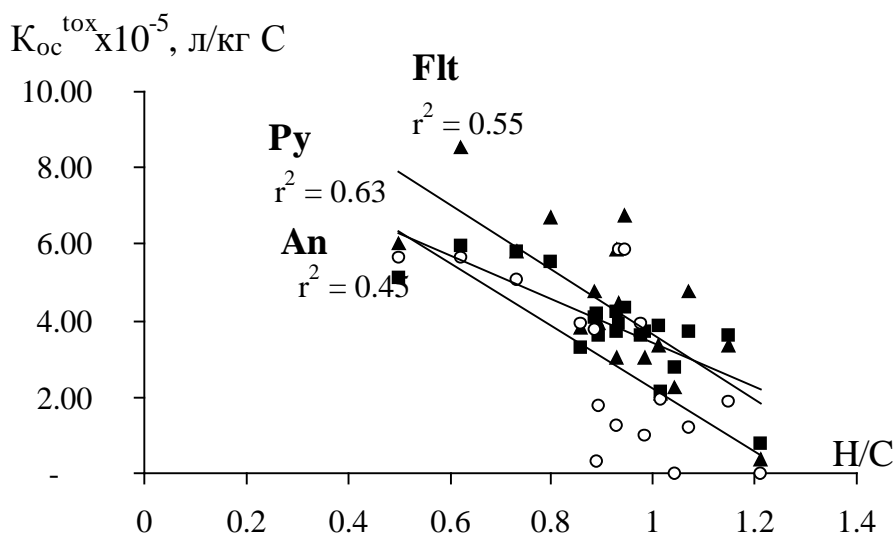


Рис. 2.24. Корреляционная зависимость между  $K_{oc}^{tox}$  пирена, флуорантена и антрацена и соотношения Н/С.

Увеличение количества препаратов от 20 до 27 сопровождалось уменьшением значений  $r^2$  до 0.31, 0.30 и 0.32, соответственно. Следует, однако, отметить, что корреляция оставалась значимой при  $P=0.95$ . По-видимому, как и в случае констант связывания, определенных с помощью метода тушения флуоресценции, понижение  $r^2$  связано, в основном, с включением в коррелируемые данные ФК почв. При достаточно близких значениях Н/С ( $\sim 0.95$ ) ФК и ГФК торфа, ФК не обладают детоксицирующим действием по отношению к ПАУ. Исключение составляют только ФК чернозема, оказывающие существенное детоксицирующее влияние на Py и Flt.

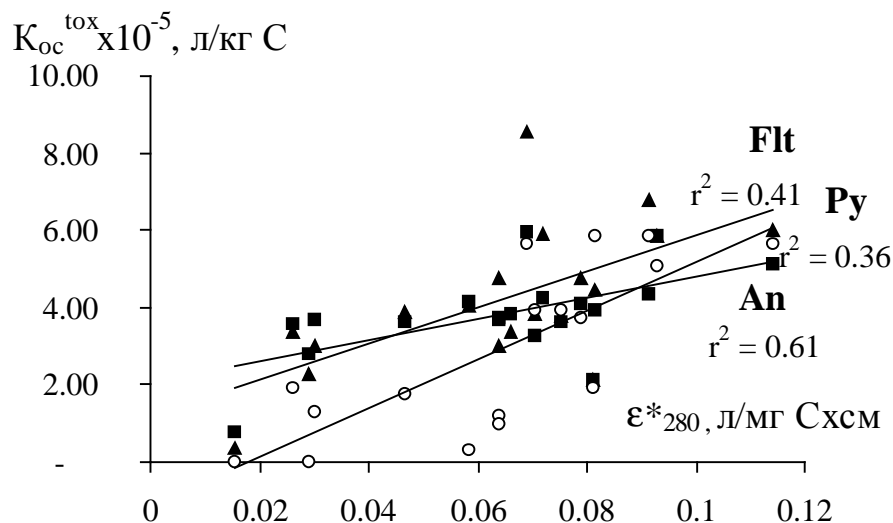


Рис. 2.25. Корреляционная зависимость между  $K_{oc}^{tox}$  пирена, флуорантена и антрацена и  $\epsilon^*_{280}$ .

Корреляционные зависимости между  $K_{oc}^{tox}$  и  $\epsilon^*_{280}$  для 20 препаратов гумусовых кислот приведены на Рис. 2.25. Как видно из рисунка соответствующие коэффициенты корреляции ( $r^2$ ) для Py, Flt и An составили 0.36, 0.41 и 0.61. Увеличение количества препаратов до 27 приводило к возрастанию соответствующих  $r^2$  до 0.46, 0.53 и 0.67.

Между показателем окисленности ФК - О/С и  $K_{oc}^{tox}$  значимой корреляции обнаружено не было ( $r^2 \sim 0.20$ ). При этом корреляция с содержанием карбоксильных групп также отсутствовала для всех ПАУ.

Корреляционные зависимости между  $K_{oc}^{tox}$  модельных ПАУ и молекулярными массами ГФК приведены на Рис. 2.26. Данные зависимости построены для 27 препаратов ГФК.



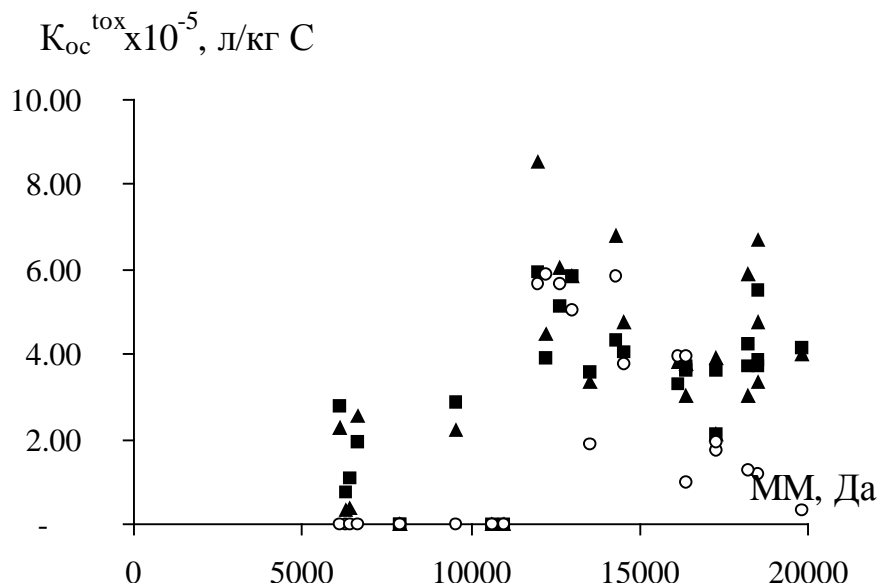


Рис. 2.26. Зависимость  $K_{oc}^{tox}$  ПАУ от молекулярной массы ГФК различного происхождения. (■ - пирен, s - флуорантен, Φ - антрацен).

Как видно из представленных данных, явной тенденции увеличения детоксицирующей способности гумусовых кислот по отношению к ПАУ по мере возрастания молекулярных масс ГФК не наблюдается ни для одного из ПАУ. ГФК с ММ ниже 10000 Да характеризуются достаточно низкими  $K_{oc}^{tox}$ . Соответствующие значения констант лежат в диапазоне от 0 до  $0.29 \times 10^6$  л/кг С. Наиболее высокие  $K_{oc}^{tox}$  характерны для ГФК с ММ от 10000 до 15000 Да. Для препаратов ГФК с ММ выше 15000 Да наблюдается небольшое уменьшение соответствующих  $K_{oc}^{tox}$  с возрастанием молекулярных масс.

Следует отметить, что аналогичные тенденции были получены при установлении взаимосвязи между  $K_{oc}$  ПАУ и молекулярными дескрипторами ГФК (разд. 2.2.2.). Данное обстоятельство может свидетельствовать в пользу того, что основным механизмом детоксикации ПАУ гумусовыми кислотами является образование нетоксичных ассоциатов ГФК-ПАУ.

### 1.3. Взаимодействие гумусовых кислот с ПАУ

При попадании в водную среду в зависимости от физико-химических свойств (водная растворимость, гидрофобность, летучесть паров и др.) ПАУ могут существовать в различных формах: истинно-растворенной, мицеллярной, адсорбированной на взвешенных частицах, аккумулярованной биотой и др.

Согласно [84-86] ПАУ, содержащие четыре и более конденсированных ароматических кольца, в основном сорбируются на взвешенном веществе, тогда как низкомолекулярные ПАУ существуют преимущественно в растворенной форме и составляют 2-16% от адсорбированного ПАУ.

На формы существования ПАУ в водных средах большое влияние оказывает присутствие растворенного органического вещества (РОВ), которое на 60-80% представлено гумусовыми кислотами [53]. Связывание ПАУ гумусовыми кислотами равносильно процессу выведения ПАУ из свободно растворенного состояния, что может приводить к изменению равновесия, устанавливающегося между взвешенной и растворенной формами ПАУ [87-98], сопровождаться увеличением их растворимости в воде [99, 100], уменьшением летучести [101] и биоаккумуляции [7, 9, 96, 102], ускорением фотолиза ПАУ [102-108]. В связи с этим, для прогноза состояния ПАУ в водных экосистемах необходимо получение количественных характеристик их взаимодействия с ГФК.

#### 1.3.1. Количественная характеристика взаимодействия гумусовых кислот с ПАУ

Связывание ПАУ гумусовыми кислотами можно упрощенно описать следующим уравнением реакции [111, 119]:



Количественной характеристикой такого взаимодействия является константа связывания, записываемая как:

$$K = \frac{[\text{ПАУ-ГФК}]}{[\text{ПАУ}][\text{ГФК}]} \quad (1.2),$$

где  $[\text{ПАУ-ГФК}]$  - равновесная концентрация молекулярного комплекса ПАУ-ГФК;  $[\text{ГФК}]$  и  $[\text{ПАУ}]$  - равновесные концентрации свободно растворенных ГФК и ПАУ, соответственно.

Однако ввиду того, что ГФК представляют собой высокомолекулярные соединения нерегулярного строения, реакция (1.1) не отражает истинной стехиометрии взаимодействия ГФК с ПАУ. Весьма вероятно, что одна макромолекула ГФК содержит несколько реакционных центров, способных связывать молекулы ПАУ. Поэтому уравнение (1.1) описывает, скорее, взаимодействие одной молекулы ПАУ с одним реакционным центром ГФК. В связи с тем, что количество реакционных центров, приходящееся на единицу массы ГФК неизвестно, то обычно для расчета константы связывания используют не молярную, а массовую концентрацию ГФК, выраженную в кг органического углерода (кг С) на литр раствора. В этом случае процесс (1.1) можно рассматривать как сорбцию ПАУ гумусовыми кислотами. Такую константу обозначают с помощью подстрочного индекса ОС ( $K_{oc}$ ), при этом ее размерность - л/кг С, совпадает с размерностью константы сорбции [121]. Последнее обстоятельство позволяет записать  $K_{oc}$  как константу сорбции. Как правило, в природных средах общая концентрация ГФК ( $C_{\text{ГФК}}$ ) намного больше таковой для ПАУ ( $C_{\text{ПАУ}}$ ). Поэтому равновесную концентрацию ГФК можно принять равной общей концентрации ГФК:  $[\text{ГФК}] \cong C_{\text{ГФК}}$ . Тогда выражение для константы связывания преобразуется к следующему виду:

$$K_{oc} = \frac{1-a}{a} \times \frac{1}{C_{\text{ГФК}}} \quad (1.3)$$

где  $K_{oc}$  - константа связывания ПАУ гумусовыми кислотами в расчете на массовую концентрацию ГФК, выраженную в кг органического углерода (кг С) на л,  $\alpha$  - доля свободного ПАУ, которую рассчитывали по формуле:

$$a = \frac{[\text{ПАУ}]}{C_{\text{ПАУ}}} \quad (1.4)$$

Как видно из уравнения (1.3),  $K_{oc}$  можно рассчитать как тангенс угла наклона зависимости  $([\text{ПАУ}]/C_{\text{ПАУ}} - 1)$  от  $C_{\text{ГФК}}$ . Для определения  $K_{oc}$  необходимо осуществить измерение концентрации ПАУ, несвязанного гумусовыми кислотами.

Для этой цели в литературе описано применение следующих методов: гель-хроматографии [96, 112], ультрафильтрации [96, 113], тонкослойной хроматографии [96], обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) [114-115], диализа [116-117], жидкостной экстракции [118-120], тушения [121-122] и поляризации флуоресценции [123], а также методов, основанных на регистрации изменения водной растворимости [124] и биоусвояемости [125, 126] ПАУ в присутствии ГФК, изменении концентрации углеводородов в газовой фазе над раствором ПАУ-ГФК [96].

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 [114], свободный ПАУ полностью сорбируется, в то время как ПАУ, связанный с ГФК, проходит через колонку, не сорбируясь. В получаемые результаты могут вносить погрешности такие факторы, как десорбция некоторого количества ПАУ из комплекса ГФК-ПАУ вследствие взаимодействия ПАУ с адсорбентом или

же недостаточно полная сорбция свободной формы ПАУ. Кроме того, согласно [127], увеличение концентрации ГФК может вызывать агрегирование их молекул и частичную сорбцию на колонке. Как следствие, возможно занижение определяемых значений  $K_{oc}$ .

Методы диализа и ультрафильтрации позволяют разделить свободную и связанную формы ПАУ с помощью мембран. Однако, согласно данным [114, 128], 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  $K_{oc}$  [96]. Несмотря на указанные погрешности методов, авторами [114] была найдена хорошая корреляция между значениями  $K_{oc}$  антрацена для ГК Aldrich и водных ГФК, определенных с помощью диализа и ОФ-ВЭЖХ. Соответствующие коэффициенты корреляции ( $r^2$ ) составили 0.70 и 0.68.

Одним из наиболее распространенных методов, позволяющим определять концентрацию свободного и связанного с гумусовыми кислотами ПАУ без их предварительного разделения, является метод тушения флуоресценции. Использование данного метода исключает появление артефактов, вызываемых смещением равновесия в системе ПАУ-ГФК. Кроме того, использование данного метода не требует определения точной концентрации ПАУ в растворе. В связи с тем, что метод тушения флуоресценции был использован в нашей работе для определения констант связывания ПАУ гумусовыми кислотами, остановимся более подробно на этом методе.

Метод тушения флуоресценции основан на измерении уменьшения интенсивности флуоресценции флуорофора (ПАУ) в присутствии тушителя (ГФК). При этом механизм тушения флуоресценции может быть динамическим или статическим. Динамическое тушение обусловлено столкновением тушителя и флуорофора в результате диффузии в течение времени жизни возбужденного состояния. Вследствие контакта флуорофор

возвращается в основное состояние без излучения фотона. В случае статического тушения между флуорофором и тушителем в основном состоянии образуется комплекс, который не флуоресцирует [129].

Информация о типе тушения позволяет сделать предположение о механизме взаимодействия между тушителем и флуорофором. Для идентификации механизма тушения изучают зависимость тушения флуоресценции от температуры и вязкости растворов, изменение спектров поглощения флуорофора и времени затухания флуоресценции в отсутствие ( $\tau_0$ ) и в присутствии ( $\tau$ ) тушителя. Так, в случае статического тушения, флуоресценция обусловлена только несвязанными в комплекс флуорофорами, и, следовательно,  $\tau_0/\tau = 1$ . Для динамического тушения наблюдается пропорциональное уменьшение интенсивности ( $F$ ) и времени затухания флуоресценции  $\tau_0/\tau = F_0/F$  [129].

Исследованию механизмов тушения ПАУ гумусовыми кислотами посвящен целый ряд работ [122, 124, 130-133]. Однако ввиду сложности изучаемой системы их выводы зачастую противоречивы. Так, в работе [131] была исследована температурная зависимость процессов тушения флуоресценции флуорантена гуминовыми кислотами почв. Увеличение температуры от 283 до 313 К оказывало незначительный эффект на степень тушения ( $F_0/F$ ) ПАУ гуминовыми кислотами. В работах [124, 131] отмечена неизменность времен затухания флуоресценции ( $\tau_0/\tau$ ) некоторых ПАУ в присутствии и отсутствие различных концентраций ГФК. Авторы [131] наблюдали незначительное уменьшение времени жизни пирена ( $\tau_0/\tau = 1.2$ ) в присутствии 50 мг/л ГК Aldrich. Однако измерение интенсивности флуоресценции пирена в присутствии и отсутствие данных ГК не показало аналогичного уменьшения. Описанные результаты позволили авторам вышеуказанных работ предположить преобладание статического механизма тушения ПАУ гумусовыми кислотами над динамическим. Аналогичные выводы были сделаны авторами [121, 122, 131, 132] на основании расчетов бимолекулярных констант тушения флуоресценции в

предположении диффузно-контролируемой реакции, а также исходя из постоянства анизотропии флуоресценции ПАУ в присутствии ГФК.

Для количественной оценки константы связывания ПАУ гумусовыми кислотами в предположении образования нефлуоресцирующего комплекса ПАУ-ГФК используют уравнение Штерна-Фольмера. Вывод данного уравнения основан на предположении, что интенсивность флуоресценции ПАУ в присутствии ГФК пропорциональна концентрации его свободной формы ([ПАУ]). Тогда уравнение (1.4) можно представить в следующем виде:

$$a = \frac{F}{F_0} \quad (1.5)$$

где  $F_0$  и  $F$  - интенсивности флуоресценции ПАУ в отсутствие и в присутствии ГФК, соответственно. Уравнение (1.3), в свою очередь, преобразуется к выражению (1.6), известному как уравнение Штерна-Фольмера [121, 129]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{oc} \times C_{ГФК} \quad (1.6)$$

Согласно [133, 135] уравнение Штерна-Фольмера (1.6) применимо при следующих приближениях: (1) в растворе присутствует только один вид тушителя, (2) за время эксперимента не происходит адсорбции ПАУ на стенках кюветы, (3) квантовый выход флуоресценции комплекса ПАУ-ГФК равен нулю ( $\phi = 0$ ). Второе приближение необходимо принимать во внимание при рассмотрении взаимодействия высокогидрофобных ПАУ с ГФК. В этом случае возможно уменьшение интенсивности флуоресценции молекул ПАУ не только за счет их тушения ГФК, но и за счет сорбции на стенках кюветы. В связи с этим, во избежание возможных погрешностей при расчете констант связывания необходимо вводить поправки в уравнение Штерна-Фольмера [133-134]. Однако при исследовании кинетики взаимодействия антрацена, пирена и перилена с ГФК методом тушения флуоресценции, авторами [135] было показано, что равновесие

между молекулами ПАУ и ГФК устанавливается в течение 3-4 минут. На основании полученных результатов было высказано предположение, что взаимодействие ПАУ с ГФК происходит за более короткий промежуток времени, чем адсорбция ПАУ на стенках кюветы. Исследования авторов [121, 132-135] показали, что условие  $\phi=0$  выполняется для широкого круга ГФК.

В случае динамического тушения ПАУ гумусовыми кислотами константа связывания представляет собой произведение бимолекулярной константы скорости тушения флуоресценции ПАУ гумусовыми кислотами ( $k_q$ ) и времени затухания флуоресценции ПАУ в отсутствие ГФК [129].

В случае комбинации двух типов тушения - статического и динамического уравнение Штерна-Фольмера приобретает вид уравнения второго порядка относительно  $C_{ГФК}$  [129]:

$$\frac{F_0}{F} = (1+K_{дин} \times C_{ГФК}) \times (1+K_{стат} \times C_{ГФК}) = (1+K_{каж} \times C_{ГФК}) \quad (1.6)$$

$$K_{каж} = (K_{динам} + K_{стат}) + K_{динам} K_{стат} \times C_{ГФК} \quad (1.7),$$

где  $K_{каж}$  - кажущаяся константа Штерна-Фольмера для комбинации динамического и статического тушения;  $K_{дин}$  - динамическая константа Штерна-Фольмера в случае динамического механизма тушения ПАУ гумусовыми кислотами.

В Табл.1.3 приведены значения констант связывания ПАУ гумусовыми кислотами, определенные различными методами.

Таблица 1.3

Константы связывания ПАУ гумусовыми кислотами, определенные различными методами

Источник происхождения ГФК	$\lg K_{oc}$	Метод определения $K_{oc}$	Источник
<b>Антрацен</b>			
ФК почв	4.21; 4.51	Тушение флуоресценции	[121]



ГК почв	4.57; 4.93; 4.81	—"—	
ФК вод	4.17	—"—	[135]
ГК вод	3.25	<i>Твердофазная экстракция</i>	[136]
	4.42	<i>Тушение флуоресценции</i>	[135]
РОВ поверхностных вод	4.20	<i>Диализ</i>	[116]
	4.73; 5.70	<i>Диализ</i>	[114]
	4.60	<i>Увеличение растворимости</i>	[124]
	3.95; 4.87; 3.81; 4.62; 4.21	<i>ОФ-ВЭЖХ (SerPak)</i>	[114]
ГК Aldrich	4.15; 3.95	—"—	[114]
	4.46; 4.39	<i>Диализ</i>	[114]
	4.72	<i>Тушение флуоресценции</i>	[121]
	3.75	<i>Твердофазная экстракция</i>	[136]
<b>Аценафтен</b>			
РОВ поверхностных вод	5.84	<i>Жидкостная экстракция</i>	[119]
<b>Бензантрацен</b>			
РОВ поверхностных вод	5.20	<i>Диализ</i>	[116]
	5.90	<i>Жидкостная экстракция</i>	[119]
ГК Aldrich	5.30	<i>ОФ-ВЭЖХ (SerPak)</i>	[114]
	5.25	<i>Твердофазная экстракция</i>	[136]
<b>Бенз(а)пирен</b>			
ФК пресных вод	4.88	<i>Диализ</i>	[137]
ГК пресных вод	5.30	—"—	[138]
	4.60	—"—	[124]
ГФК морских вод	4.30; 4.82	—"—	[131]
	4.57	—"—	[95]
РОВ поверхностных вод	4.21; 5.10	<i>ОФ-ВЭЖХ (SerPak)</i>	[115]
	5.46	<i>Диализ</i>	[120]
	6.00	<i>Жидкостная экстракция</i>	[119]
ГК Aldrich	6.56	<i>Диализ</i>	[139]
	6.21	—"—	[140]
	6.31	—"—	[141]
	5.23	<i>ОФ-ВЭЖХ</i>	[115]

	5.95	(СерПак) —"	[133]
	5.95	—"	[114]
	6.30	Тушение флуоресценции	[141]

### Нафталин

ГК почв	4.45	—"	[122]
ФК почв	3.10	Диализ	[128]
ГК вод	3.00	Твердофазная экстракция	[136]
РОВ поверхностных вод	4.87	Жидкостная экстракция	[142]
РОВ почв	4.86	Тушение флуоресценции	[142]
ГК Aldrich	3.5	Твердофазная экстракция	[136]

### Пирен

ФК почв	4.01	Увеличение растворимости	[124]
	4.51; 5.10	Тушение флуоресценции	[121]
	4.10	—"	[143]
ГК почв	4.81; 4.57; 5.23	—"	[121]
	5.23	—"	[143]
	4.33	Увеличение растворимости	[124]
ФК пресных вод	4.21; 4.74; 5.00	Тушение флуоресценции	[121]
	3.88	—"	[135]
	4.44	—"	[124]
ГК пресных вод	4.53	—"	[124]
	4.37	—"	[135]
	3.70	Твердофазная экстракция	[144]
ГФК моря	3.76	ОФ-ВЭЖХ (СерПак)	[95]
РОВ подземных вод	3.10	Твердофазная экстракция	[144]
РОВ поверхностных вод	4.50 - 5.50	Жидкостная экстракция	[119]
РОВ почв	3.61; 3.61; 3.83; 3.65; 4.18	Тушение флуоресценции	[143]
ГК Aldrich	5.01	—"	[121]
	4.6	Твердофазная	[144]

		экстракция	
<b>Перилен</b>			
ГК пресных вод	5.98	—"—	[135]
ФК почв	6.20	<i>Поляризация флуоресценции</i>	[123]
РОВ подземных вод	5.83; 4.61; 6.04; 4.61; 6.74; 5.47	<i>Тушение флуоресценции</i>	[133]
	5.42; 4.23; 4.21; 5.15	<i>ОФ-ВЭЖХ (СерПак)</i>	[133]
ГК Aldrich	5.91	—"—	[133]
	5.95; 6.23; 6.38	<i>Тушение флуоресценции</i>	[133]
<b>Фенантрен</b>			
ФК почв	4.88	—"—	[121]
ГК почв	4.70	—"—	[121]
РОВ поверхностных вод	4.64	—"—	[121]
РОВ подземных вод	3.31; 4.08; 3.85; 4.91	<i>ОФ-ВЭЖХ (СерПак)</i>	[133]
	5.25; 4.81; 4.61; 4.92	<i>Тушение флуоресценции</i>	[133]
ГК Aldrich	3.92	—"—	[114]
	4.78	—"—	[121]
	3.92; 3.99	<i>ОФ-ВЭЖХ (СерПак)</i>	[133]
<b>Флуорантен</b>			
ГК почв	4.96	<i>Тушение флуоресценции</i>	[131]
ФК пресных вод	4.59	<i>Увеличение растворимости</i>	[124]
	3.80; 3.90	<i>Твердофазная экстракция</i>	[144]
ГК пресных вод	4.05; 4.35	—"—	[144]
РОВ поверхностных вод	5.21	<i>Жидкостная экстракция</i>	[119]
<b>Флуорен</b>			
ГК пресных вод	3.95	<i>Увеличение растворимости</i>	[124]
РОВ поверхностных вод	5.50	<i>Жидкостная экстракция</i>	[119]

Как видно из представленных результатов, величины  $K_{oc}$  существенно различаются в зависимости от используемого метода определения. Согласно приведенным данным, наиболее часто

используемыми методами являются диализ, тушение флуоресценции и ОФ-ВЭЖХ. На Рис. 1.2 приведены  $K_{oc}$  некоторых ПАУ для РОВ поверхностных вод и ГК Aldrich, полученные разными методами (по данным Табл. 1.3).

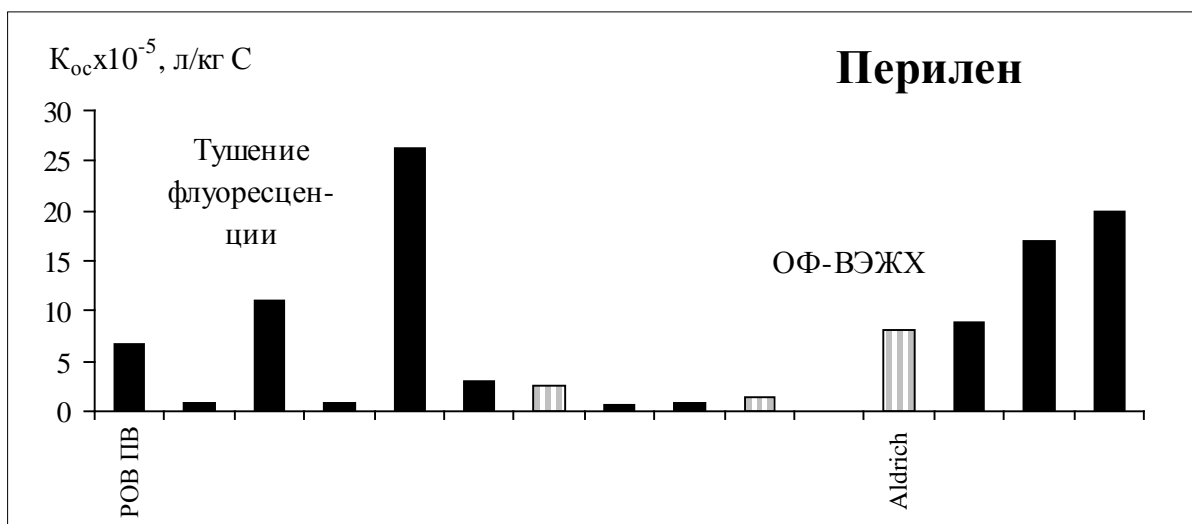
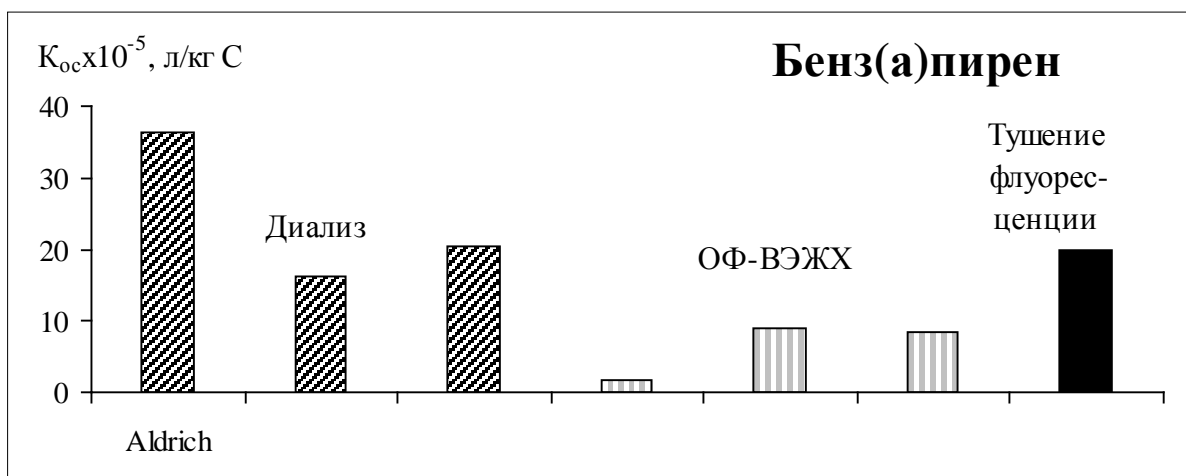
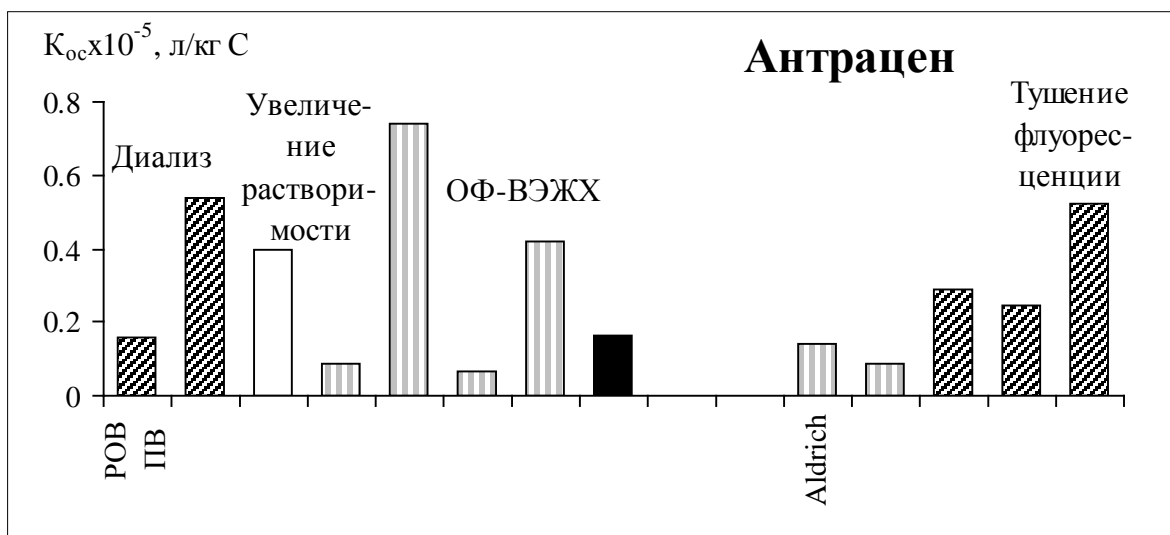


Рис. 1.2. Константы связывания некоторых ПАУ РОВ поверхностных вод и ГК Aldrich, определенные различными методами.

Как видно из рисунка, более высокие значения  $K_{oc}$  дает метод тушения флуоресценции и диализ. Константы связывания, полученные с помощью ОФ-ВЭЖХ имеют более низкие значения. Так, диапазон значений  $K_{oc}$  антрацена, определенных с помощью метода тушения флуоресценции, составил  $(0.2 - 0.8) \times 10^5$ ; с помощью ОФ-ВЭЖХ -  $(0.07 - 0.74) \times 10^5$ , диализа -  $(0.2 - 5) \times 10^5$  л/кг С.

Сравнение значений  $K_{oc}$ , полученных разными методами, проведено также в работах [114, 121, 128]. Авторы [121] при сравнении  $K_{oc}$  антрацена, определенных методом тушения флуоресценции и ОФ-ВЭЖХ, не обнаружили существенной разницы в значениях констант. Аналогичные данные были получены в работе [145] при сравнении констант связывания фенантрена различными по происхождению ГФК, определенных методами тушения флуоресценции, ОФ-ВЭЖХ и диализа. Однако авторами [114] с помощью диализа были получены более высокие значения  $K_{oc}$  некоторых ПАУ по сравнению со значениями констант, определенных для тех же гумусовых кислот и ПАУ с использованием картриджей SepPak (ОФ-ВЭЖХ). Подобная зависимость была отмечена в работе [136] при исследовании взаимодействия ГК Aldrich с периленом и фенантrenom методом диализа и ОФ-ВЭЖХ.

Таким образом, как видно из представленного материала существует достаточно большое разнообразие методов, применяемых для количественной оценки степени связывания ПАУ гумусовыми кислотами. Однако сравнение полученных констант, определенных различными методами, не всегда корректно, ввиду наличия погрешностей при использовании того или иного метода. Поэтому при сравнении сродства ГФК к ПАУ необходимо принимать во внимание используемый метод определения  $K_{oc}$ . Кроме того, необходимо применять методы, не

нарушающие равновесия в системе ПАУ-ГФК, что снижает погрешности и дает более достоверные оценки.

## ВЫВОДЫ

1. Количественно охарактеризована связывающая способность обширной выборки гумусовых кислот различного происхождения (28 препаратов) по отношению к трем ПАУ. Значения констант связывания уменьшались по мере пирена, флуорантена и антрацена составили  $(0.13-2.4) \times 10^5$ ,  $(0.3-1.8) \times 10^5$  и  $(0.5-1.0) \times 10^5$  л/кг С, соответственно. Константы связывания ПАУ убывали в ряду: ГК угля > ГК почв > ГФК торфов >> ГФК природных вод > ФК почв.
2. Установлены корреляционные зависимости между структурой ГФК и константами связывания ПАУ и проверена их устойчивость на выборках препаратов различного происхождения. Найдено, что максимальной предсказательной силой обладают дескрипторы ароматичности. Взаимосвязь между ароматичностью гумусовых кислот и их сродством к ПАУ впервые подтверждена экспериментально.
3. Исследовано влияние рН и ионной силы на константы связывания пирена, флуорантена и антрацена. Установлено, что наибольшее увеличение констант (на 20-30 %) наблюдалось при рН < 4 и ионной силе > 0.001 М. Получены двухпараметрические зависимости констант связывания от рН и ионной силы, которые могут быть использованы для расчета констант при различных условиях водной среды.
4. На основании характера зависимости констант связывания от гидрофобности ПАУ, ароматичности ГФК, рН и ионной силы среды сделан вывод о доминирующей роли гидрофобных взаимодействий в процессах связывания ПАУ гумусовыми кислотами.
5. Разработан подход к количественной оценке детоксицирующей способности гумусовых кислот по отношению к ПАУ с помощью константы связывания, рассчитываемой из токсикологических данных. Установлено, что по величине детоксицирующей способности препараты гумусовых кислот располагаются в ряд, аналогичный их связывающей способности по отношению к ПАУ.
6. Установлены корреляционные соотношения между структурой гумусовых кислот и константами их связывания с ПАУ, рассчитанными из токсикологических данных. Показано, что как и в случае связывающей способности, максимальной прогностической силой обладают дескрипторы ароматичности ГФК.
7. На основании установленного соответствия констант связывания, рассчитанных из данных химических и токсикологических экспериментов, и тесной корреляционной взаимосвязи между ароматичностью и детоксицирующей способностью гумусовых кислот сделан вывод о том, что основным механизмом детоксикации ПАУ гумусовыми кислотами является образование нетоксичных аддуктов ПАУ-ГФК.

## **ВЫРАЖЕНИЕ ПРИЗНАТЕЛЬНОСТИ**

Автор выражает глубокую признательность сотрудникам кафедры квантовой радиофизики Физического факультета МГУ профессору, д.ф.-м.н. Фадееву В.В., к.ф.-м.н., н.с. Филипповой Е. М., к.ф.-м.н., с.н.с. Чубарову В.В. за оказанную помощь в организации флуориметрических экспериментов; сотрудникам кафедры органической химии Химического факультета МГУ к.х.н., с.н.с. Ильиной И.Г.; к.х.н., в.н.с. Демьянову П.И.; к.х.н., н.с.

Пермину А.Б. за помощь в экспериментальной работе и участие в обсуждении результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке: Российского Фонда фундаментальных исследований (гранты №96-04-49838 и №98-03-33186а); Фонда INTAS (грант INTAS-1997 №1129); Международного научного фонда (фонд Сороса) (гранты № NBN000 и NBN300).



## СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кононова М. М. Органическое вещество почвы. М: Изд-во МГУ, 1963.
2. Орлов Д. С. Химия почв. М., Изд-во МГУ, 1992.
3. Орлов Д. С. Свойства и функции гуминовых веществ. В сб.: Гуминовые вещества в биосфере. М.: Наука, 1993, с.16-27.
4. Rashid M.A. Geochemistry of marine humic compounds. Springer-Verlag, Oxford, 1985, 243 p.
5. Лапин И.А., Красюков В.Н.// Водн. рес., 1991, №3, с. 195-199.
6. Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. М.: МГУ, 1992.
7. *Humic substances and their role in the environment*. John Wiley & Sons 1988. p. 133-148.
8. Bollag J.-M., Mayers K.//Sci. Total Environ., 1992, v. 117/118, p. 357-366.
9. Schnitzer M., Khan S.U. *Humic substances in the environment*. N.Y., Marcel Decker, 1972, p. 12-17.
10. Орлов Д. С. Гумусовые кислоты почв. М.: Изд-во МГУ, 1974.
11. Ziechmann W.//Huminstoffen. Problemen, Methoden, Ergebnisst. Weinheim: Verlag Chemie, 1980, 480 p.
12. Stevenson F.J.// Geochemistry of Soil Humic Substances. In: *Humic substances in soil, sediment and water*. Aiken G.R., McKnight D.M., Wershaw R.L., MacCarthy P. (Eds.), N.Y., John Wiley & Sons, 1985, p.13-52.
13. Huraide M.// Anal. Sci., 1992, v.8, p.453-459.
14. Clapp C.E., Emerson W.W., Olness A.E.// *Humic substances II*. Hayes M.H.B., McCartney P., Malcolm R.L., Swift R.S. J. (Eds). Wiley & sons, 1986.
15. Rice J.A., MacCarthy P.// Org. geochem., 1991, v. 17, No5, p. 635-648.
16. Parsons J.W. Hydrolytic degradations of humic substances. In: *Humic substances II*. Hayes M.H.B., Malkolm R.L. and Swift R.S. (Eds), 1989.
17. Cheshire M.V. *Nature and origin of carbohydrates in soils*. Academic press, London, 1970.
18. Schnitzer M., Preston C.M. Effects of acid hydrolysis on the  $^{13}\text{C}$  spectra of humic substances. //Plant and soil, No. 75, p. 201-211, 1983.
19. Grasset L., Ambles A. // Org. Geochem., 1998, v. 29, N 4, p. 881-891.
20. Hayashi T., Nagai T. // Soil Sci. Plant Nutr., 1962, v. 8, N. 4, p. 22.
21. Stevenson F.J. *Humus chemistry. Genesis, composition, reactions*. N.Y., Wiley Interscience, 1982, p. 221-237.
22. Clark F.E., Tan K.H. // Soil Biol. Biochem., 1969, v. 1, p. 75.
23. Зырин Н.Г., Овчинникова М.Ф., Орлов Д.С. // Агрохимия, 1964, N. 4, с. 168.
24. Ковалевский Д.В. Исследование структуры гумусовых кислот методами спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ . Дисс. канд. хим. наук, Москва, 1998, 142 с.
25. Krosshavn M., Bjorgum J.O., Krane J. and Steinnes E.J.//Soil Sci., 1990, v. 232, p.141-148.

26. Preston C.M., Blackwell B.A. // Soil Sci., 1985, v. 139, No 1, p. 88-96.
27. Shin H.S., Moon H. // Soil Sci., 1996, v. 161, No 4, p. 250-256.
28. Frund R., Ludemann H. D. // Sci. Total Environ., 1989, v. 81/82, p. 157-168.
29. Ricca G. and Severini F. // Geoderma, 1993, v. 58, p. 233-244.
30. Conte P., Piccolo A., Van Lagen B., Buurman P. and De Jager P.A. // Geoderma, 1997, v. 80, p. 339-352.
31. Cook R.L., Langford C.H. // Environ. Sci. Technol., 1998, v. 32, p. 719-725.
32. *Humic substances in the Suwannee river, Georgia: Interactions, properties, and proposed structures.* Averett R.C., Leenheer J.A., McKnight D.M., and Thorn K.A. (Eds.) U.S. Geological survey water-supply paper 2373, 1994.
33. Knulst J.C., Boershke R.C., Loemo S. // Environ. Sci. Tech., 1998, v. 32, N 1, p. 8-12.
34. Malcolm R.L. Variations between humic substances isolated from soils, stream waters and groundwaters as revealed by <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. In: *Humic substances in soil and crop science.* Eds. P. MacCarthy, C.E. Clapp, R.L. Malcolm and P.R. Bloom. 1990, p. 13-37.
35. Михайленко В.И., Михальчук В.В. // Ж. Прикл. Спектр., 1987, т. 46, N. 4, с.535-543.
36. Gerstein B.C., Murphy P.D., Ryan L.M. // Aromaticity in Coal. In: *Coal Structure.* Meyers R.A. (Eds.), Academic Press, N.Y., London, 1982, p.87-130.
37. Chin Y., Aiken G., O'Loughlin // Environ. Sci. Technol., 1994, v. 28, p. 1853-1858.
38. Traina S.J., Novak J., Smeck N.E. // J. Environ. Qual., 1990, v. 19, p. 151-153.
39. Кауричев И.С., Панов Н.П., Розов Н.Н. *Почвоведение.* 1989, М., Агропромиздат, с.719.
40. Белькевич П.И., Чистова Л.Р. Торф и проблема защиты окружающей среды. 1979, Минск "Наука и Техника", с.61.
41. Harvey G.R., Deborah A.B., et al. // Marine Chem., 1983, v. 12, p. 119-132.
42. Shinozuka N., Lee C. // Marine Chem., 1991, v. 33, p. 229-241.
43. Hayano S., Shinozuka N. // Yukagaku, 1982, v. 31, p. 357-362.
44. Hayase K., Tsubota H. // Geochim. Cosmochim. Acta, 1983, v. 47, p. 947-952.
45. Chen Y., Schnitzer M. // Soil Science, 1978, v. 125, No 1, p. 7-15.
46. Shinozuka N., Lee C., Hayand S. // Sci. Total Envir., 1987, v. 62, p. 311-314.
47. Saleh F.Y., Ong W.A., Kim I., et al. // Structural features of aquatic acids by analytical and preparative HPLC followed by spectroscopic characterization. In: *Humic Substances in the Aquatic and Terrestrial Environment.* Alland B., Baren H. (Eds.), Proc. Int. Symp., Link., Sweden, 1991, p. 47-61.
48. Saleh F.Y., Chang D.Y. // Sci. Total Environ., 1987, v. 62, p. 67-74.
49. Saleh F.Y., Ong W.A. // Anal. Chem., 1989, v. 61, p. 2792-2800.
50. Blondeau R., Kalinowski E. // J. Chromatog., 1986, v. 351, p. 585-589.
51. Hayase K., Tsubota H. // J. Chromatog., 1984, v. 295, p. 530-532.

52. Petersen R.C., Kullberg A. // *Vatten*, 1985, v. 41, p. 236-239.
53. Senesi N. // Nature of interactions between organic chemicals and dissolved humic substances and the influence of environmental factors. In: *Organic Substances in Soil and Water: Natural Constituents and Their Influences on Contaminant Behaviour*. Beck A.J., Jones K.C., Hayes M.H.B. (Eds.), Royal Soci. Chem., 1993, p. 73-101.
54. Khan S.U. // The interaction of organic matter with pesticides. In: *Soil Organic Matter*. Schnitzer M., Khan S.U. (Eds.), Elsev. Sci. Pub. Comp., Amsterdam, 1978, p. 137-171.
55. Neff J.M. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon in the Aquatic Environment*. 1979, Applied Sci. Pub. LTD, London, p. 266.
56. Lee M.L., Novotny M.V., Bartle K.D. // *Analytical Chemistry of Polycyclic Aromatic Compounds*. 1981, Academic Press, INC. LTD, London, p. 462.
57. Clar E. // *Polycyclic Hydrocarbons*. 1964, Academic Press, London and New York, p. 442.
58. Гурвич Л.В., Карачевцев Г.В. // *Энергии разрыва химических связей. Потенциалы ионизации и сродство к электрону*. 1974, М., "Наука", с. 351.
59. Гутман Ф., Лайонс Л. // *Органические полупроводники*. 1970, М., "Мир", с.670.
60. Кирсо У.Э., Стом Д.И., Белых Л.И., Ирха Н.И. // *Превращение канцерогенных веществ в гидросфере*. 1988, Валгус, Таллин, с. 214.
61. Hansch C., Leo A., Hoekman D. // *Exploring QSAR Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants*. American Chemical Society: Washington, DC, 1995.
62. Miller M.M., Wasik S.P., Huang G.-L., Sniu W.-Y. // *Environ. Sci. Technol*, 1985, v. 19, p. 522-529.
63. Chiou C.T., Schmedding D.W. // *Environ. Sci. Technol*, 1982, v. 16, p. 4-10.
64. Brooke D.N., Dobbs A.J., Williams N. // *Ecotox. Environ. Safety*, 1986, v. 11, p. 251-260.
65. Mackay D., Shiu W.Y., *Environ. Sci. Technol*. 1977, v. 22, p. 399-402.
66. Isnard P., Lambert S. // *Chemosphere.*, 1989, v. 18, p. 1837-1853.
67. Bruggeman W.A., Steen J., Hutzinger O. // *J. Chromatog.*, 1982, v. 238, p. 335-345.
68. Banerjee S., Yalkowsky S.H., Valvani S.C. // *Environ. Sci. Technol.*, 1980, v. 14, p. 1227-1229.
69. Whitehouse B.G. // *Marin. Chem.*, 1984, v. 14, p. 319-332.
70. Hashimoto Y., Tokura K., Kishi H., Strachan W.M.J. // *Chemosphere.*, 1984, v. 13, p. 881-888.
71. Wise S.A., Bonnett W.J., Guenther F.R., May W.E. // *J. Chromatog. Sci.*, 1981, v. 19, p. 457-464.
72. May W.E., Wasik S.P., Miller M.M., et al. // *J. Chem. Eng. Data*, 1983, v. 28, p. 197-200.

73. May W.E., Wasik S.P.// *Anal. Chem.*, 1978, v. 50, p. 175-179.
74. Maagd P. G. J., Hulscher D.T., Heuvel H., et al.// *Environ. Tox. Chem.*, 1998, v. 17, p. 251-257.
75. Kishi H., Hashimoto Y.// *Chemosphere.*, 1989, v. 18, p. 1749-1759.
76. Hashimoto Y., Tokura K., Ozaki K.// *Chemosphere.*, 1982, v. 11, p. 991-1001.
77. Tipson R. S. // *Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. A review of the literature.* 1987. Department of commerce National Bureau of Standards, p. 52.
78. Рыбакова М.Н. // *Конспект лекций по химии конденсированных ароматических углеводов.* 1975, Пермь, с. 29.
79. Проскуряков В.А., Чистяков Л.Н. // *Окисление конденсированных ароматических углеводов,* 1973, Л., с. 102.
80. Эндрюс Л. Дж., Кифер Р.М. // *Молекулярные комплексы в органической химии,* 1967, М., "Мир", с. 207.
81. Калниньш К. // *Электронное возбуждение в химии.* 1998, Санкт-Петербург, ИВС РАН, с. 323.
82. Фрейманис Я.Ф. // *Органические соединения с внутримолекулярным переносом заряда,* 1985, Рига, "Зинатне", с. 190.
83. Нейланд О.Я., Балодис К.А., Кацен Я.Я. Крейцберга Я. Н. // *Известия Академии Наук Латвийской ССР, Серия Хим.,* 1986, N 1, с. 64-79.
84. Ильницкий А.П., Королев А.А., Худoley В.В. // *Канцерогенные вещества в водной среде,* 1993, М., "Наука", с. 219.
85. Readman J.W., Mantoura R.F.C., Rhead M.M. // *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 1984, v. 319, p. 126-131.
86. Burns W.A., Mankiewicz P.J., Bence A.E., et al.// *Envir. Tox. Chem.*, 1997, v. 16, p. 1119-1131.
87. Herbes S.E. // *Wat. Res.*, 1977, v. 11, p. 493-496.
88. Landrum P.F., Dupuis W.S. and Kukkonen J. // *Environ. Toxic. Chem.*, 1994, v. 13, p. 1769-1780.
89. Wilcke W., Zech W.// *Z. Pflanzenernahr. Bodenk.*, 1997, v. 160, p. 573-579.
90. Nam K., Chung N., Alexander M. // *Environ. Sci. Technol.*, 1998, v. 32, p. 3785-3788.
91. Voice T.C., Weber W.J. // *Water Res.*, 1983, v. 17, p.1433-1441.
92. Karickhoff S.W., Brown D.S., Scott T.A. // *Water Res.*, 1979, v. 13, p. 241-248.
93. Means J.C., Wood S.G., Hasset J.J. // *Environ. Sci. Technol.*, 1980, v. 14, p. 1524-1528.
94. Xing B. // *Nonlinearity and competitive sorption of hydrophobic organic compounds in humic substances.* In: *Humic Substances Structures, Properties and Uses.* Davies G., Ghabbour E.A., Khairy K.A. (Eds.), 1998, Royal Society of Chemistry, Cambridge CB4 OWF, UK, p. 173-183.
95. Eadie B.J., Morehead N.R., Landrum P.F. // *Chemosphere*, 1990, v. 20, p. 161-178.

96. Suffet I.H., MacCarthy P. // *Aquatic Humic Substances: Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. 1989. American Chemical Society. Advances in Chemistry Series.
97. Liu H., Amy G. // *Environ. Sci. Technol.*, 1993, v. 27, p. 1553-1562.
98. Jafvert C.T. // *Environ. Sci. Technol.*, 1991, v. 25, p. 1039-1045.
99. Chiou C.T., Malcolm R.L., Brinton T.I., Kile D.E. // *Environ. Sci. Technol.*, 1986, v. 20, p. 502-508.
100. Chiou C.T., Kile D.E., Brinton T.I., Malcolm R.L. // *Environ. Sci. Technol.*, 1987, v. 21, p. 1231-1234.
101. Swan R.L., Eschenroeder A. // *Fate of chemicals in the environment*. Washington, Amer. Chem. Soc., 1983, Ser. 225, p. 228.
102. Guna S., Jaffe P.R., Peters C.A. // *Environ. Sci. Technol.*, 1998, 32, 2317-2324.
103. Korfmacher W.A., Natusch D.F.S., Taylor D.R., et al. // Thermal and photochemical decomposition of particulate PAH. In: *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons*. Jones P.W., Leber P. (Eds.). 1979. Ann Arbor Science Publishers, Inc., p. 165-170.
104. Katz M., Chan C., Tosine H., Sakuma T. // Relative rates of photochemical and biological oxidation (*in vitro*) of PAHs. In: *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons*. Jones P.W., Leber P. (Eds.). 1979. Ann Arbor Science Publishers, Inc., p. 171-187.
105. Zepp G.R., Schlotzhauer P.F. // Photoreactivity of selected aromatic hydrocarbons in water. In: *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons*. Jones P.W., Leber P. (Eds.). 1979. Ann Arbor Science Publishers, Inc., p. 141-157.
106. Mill T., Mabey W.R., Lan B.Y. and Baraze A. // *Chemosphere*, 1981, v. 10, p. 1281-1290.
107. Amador J.A., Alexander M. // *Environ. Toxic. Chem.*, 1991, v. 10, p. 475-482.
108. Wang C.X., Yediler A., Kettrup A. // *Chemosphere*, 1995, v. 30, p. 501-510.
109. Губергриц М.Я., Кирсо У.Э., Паальме Л.П. // *Превращения канцерогенных веществ в биосфере*. 1975. М., "Знание", с. 42.
110. Ильницкий А.П., Шилина А.И. // *Канцерогенные вещества в окружающей среде*. 1979. М., Гидрометеоиздат, с. 73.
111. Паркер С. // *Фотолюминесценция растворов*. 1972. М., "Мир", с. 510.
112. Hasset J.P., Milicic E. // *Environ. Sci. Technol.*, 1985, v. 19, p. 638-643.
113. Means J.C., Wijayarathne R.D. // *Sci.*, v. 215, p. 968-970.
114. Landrum P.F., Nihart S.R., Eadie B.J., Gardner W.S. // *Environ. Sci. Technol.*, 1984, v. 18, p. 187-192.
115. Morehead N.R., Eadie B.J., Lake B., Landrum P. // *Chemosphere*, 1986, v. 15, p. 403-412.
116. McCarthy J.F., Roberson L.E., Burriss L.W. // *Chemosphere*, 1989, v. 19, p. 1911-1920.
117. McCarthy J.F., Jimenez B.D., Barbee T. // *Aquat. Toxicol.*, 1985, v. 7, p. 15-24.
118. Carlberg G.E., Martinsen K. // *Sci. Total Environ.*, 1982, v. 25, p. 245-254.

119. Johnsen S.// Sci. Total Environ., 1987, v. 67, p. 269-278.
120. Johnsen S., Gribbestad I.S.// Sci. Total Environ., 1991, v. 107, p. 99-108.
121. Gauthier T.D., Shane E.C., Guerin W.F.// Environ. Sci. Technol., 1986, v. 20, p. 1162-1166.
122. Morra M.J., Corapcioglu M.O., Wadruszka R.M.A., Marshall D.B.// Soil Sci. Am. J., 1990, v. 54., p.1283-1288.
123. Roemelt P.M., Seitz W.R.// Environ. Sci. Technol., 1982, v. 16, p. 613-616.
124. Danielsen K.M., Chin Y.P., Buterbaugh J.S., Gustafso, T.L., Traina S.J.// Environ. Sci. Technol., 1995, v. 29, p. 2162-2165.
125. Landrum P.F, Reinhold M.D, Nihart S.R, Eadie B.J. // Environ. Toxicol. Chem., 1985, v. 4, p. 459-467.
126. Landrum P.F, Sheila R.N, Eadie B.J, Herche L.R. // Environ. Toxicol. Chem., 1987, v. 6, p. 11-20.
127. Carter C.W., Suffet I.H. // Environ. Sci. Technol., 1982, v. 16, p. 735-740.
128. Kukkonen, J., Pellinen J.// Sci. Total Environ., 1994, v. 152, p. 19-29.
129. Лакович // Тушение флуоресценции.
130. Chin Y.-P., Gschwend P. M.// Environ. Sci. Technol., 1992, v. 26, p. 1621-1626.
131. Chen S., Inskeep, W.P., Williams S.A., Callis P.R.// Environ. Sci. Technol., 1994, v. 28, p. 1582-1588.
132. Kumke M.U., Lohmannsroben H.-G., Roch T.// Analyst, 1994, v. 119, p. 991-1001.
133. Bakhus D.A., Gschwend P.M.// Environ. Sci. Technol., 1990, v. 24, p. 1214-1223.
134. Shlautman M.A., Morgan J.J.// Environ. Sci. Technol., 1993, v. 27, p. 2523-2532.
135. Shlautman M.A., Morgan J.J.// Environ. Sci. Technol., 1993, v. 27, p. 961-969.
136. Kopinke F.-D., Lebelt A.G.I. *Reversible and Irreversible Interactions between Hydrophobic Organic Compounds and Dissolved Humic Substances*. Symposium on Refractory Organic Substances in the Environment, Rose, Karlsruhe, 1997, p. 53-55.
137. Chin Y.-P., Weber W.J.// Environ. Sci. Technol., 1989, v. 23, p. 978-984.
138. Chiou C.T., McGroddy S.E., Kile D.E. // Environ. Sci. Technol., 1998, v. 32, p. 264-269.
139. Kukkonen J., Oikari A. // Wat. Res., 1991, v. 25, p. 455-463.
140. Paolis F., Kukkonen J. // Chemosphere, 1997, v. 34, p. 1693-1704.
141. Black M.C., McCarthy J.F. // Environ. Toxicol. Chem., 1988, v. 7, p. 593-600.
142. McCarthy J.F., Bartell S.M. In: *Functional Testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of Chemicals, ASTM STP 988*. Cairns J., Pratt J.R. (Eds.), American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1988, p. 3-16.
143. McCarthy J.F., Jimenez B.D. // Environ. Sci. Technol., 1985, v. 19, p. 1072-1076.

144. Traina S.J., Spontak D.A., Logan T.J. // *J. Environ. Quality*, v. 19, p. 221-227.
145. Herbert B.E., Bertsch P.M., Novak J.M.// *Environ. Sci. Technol.*, 1993, v. 27, p. 398-402.
146. Kopinke, F.D.; Porschmann, J.; Stottmeister, U.// *Environ. Sci. Technol.*, 1995, v. 29, p. 941-950.
147. Amy G.L., Conklin H.L., Cawein C. // Polynuclear aromatic hydrocarbon binding to natural organic matter: a comparison of natural organic matter fractions. In: *Organic Substances and Sediments in Water*, Baker R.A. (Eds.). 1992. V. 1, Humic and Soils. Levis, p. 99-110.
148. Whitehouse B.// *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 1985, v. 20, p. 393-402.
149. Gauthier T.D., Seitz W.R., Grant C.L.// *Environ. Sci. Technol.*, 1987, v. 21, p. 243-248.
150. Chin Y.P., Aiken G.R., Danielsens K.M.// *Environ. Sci. Technol.*, 1997, v. 31, p. 1630-1635.
151. Grathwohl P. // *Environ. Sci. Technol.*, 1990, v. 24, p. 1687-1693.
152. Kukkonen J., McCarthy J.F., Oikari A.// *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 1990, v. 19, p. 551-557.
153. Kukkonen J., McCarthy J.F., Oikari A. // Binding and bioavailability of organic micropollutants in natural waters: effects of the quality and quantity of dissolved organic material. In: *Organic Substances and Sediments in Water*, Baker R.A. (Eds.). 1992. V. 1, Humic and Soils. Levis, p. 111-127.
154. Hassett J.P., Anderson M.A.// *Environ. Sci. Technol.*, 1979, v. 13, p. 1526-1529.
155. Liu H., Amy G. // *Environ. Sci. Technol.*, 1993, v. 27, p. 1553-1562.
156. MacCarthy P.; Rice J.A. In *Proceedings of Chapman Conference on the Gaia Hypothesis*, San Diego, CA, March 7-11, 1988. Schneider, S.H.; Boston, P.J., Eds., MIT Press: Cambridge, MA, 1990; pp 339-345.
157. Kukkonen J. // The role of natural organic material on the fate and toxicity of xenobiotics in aquatic environment. In: *The Contaminants in the Nordic Ecosystem: Dynamics, Process and Fate*. Munawar M., Luotola M. (Eds.), SPB Academ. Publ., Amsterdam, 1995, p. 95-108.
158. Chin Y.P., Weber W.I. // *Environ. Sci. Technol.*, 1994, v. 28, p. 1853.
159. Kenworthy I.P., Hayes M.H.B. Investigation of Some Structural Properties of Humic Substances by Fluorescence Quenching. In: *Humic Substances in Soils, Peats and Waters*. Hayes M.H.B., Wilson W.S. (Eds.), The Royal Society of Chemistry, 1997, p. 39-46.
160. Пчелин В.А. // *Гидрофобные взаимодействия в дисперсных системах*. 1976. М., "Знание", с. 65.
161. Voice T.C., Weber W.J. // *Wat. Res.*, 1983, v. 17, p. 1433.
162. Valsaraj K.T., Thibodeaux L.J. // *Wat. Res.*, 1989, v. 23, p. 183-189.
163. Wershaw R.L. // *J. Contamin. Hydrol.*, 1986, v. 1, p. 29-45.

164. Schnitzer M., Khan S.U. // *Humic Substances in the Environment*. 1972. Marcel Dekker: New York.
165. Engebretson R.R., Wandruszka R.V. // *Environ. Sci. Technol.*, 1994, v. 28, p. 1934-1941.
166. Dem`yanov P.Y. // *SAR and QSAR Environ. Res.*, 1995, v. 4, p. 211-218.
167. Boehm P.D., Quinn J.G. // *Geochim. Cosm. Acta.*, 1973, v. 37, p. 2459-2477.
168. Engebretson R.R., Wandruszka R.V. // *Org. Geochem.*, 1997, v. 26, p. 759-767.
169. Engebretson R.R., Amos T., and Wandruszka R.V. // *Environ. Sci. Technol.*, 1996, v. 30, p. 990-997.
170. Petty M.A., Shepodd T.J., Dougherty D.A. // *Tetrahedron Lett.*, 1986, v. 27, p. 807-810.
171. Shepodd J., Petti M.A., Dougherty D.A. // *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, v. 110, p. 1983-1985.
172. Soga T., Odashima K., Koga K. // *Tetrahedron Lett.*, 1980, v. 21, p. 4351-4354.
173. Foote C.S., Shook F.C., Abaketli R.A. // *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, v. 102, p. 2504-2505.
174. Odashima K., Soga T., Koga K. // *Tetrahedron Lett.*, 1981, v. 22, p. 5311-5314.
175. Kress B.M., Ziechmann W. // *Chem. Erde Bd.*, 1977, v. 36, p. 209-217.
176. Ziechman W. *Huminstoffen. Problemen, Methoden, Ergebniss*. Weicheim: Chemie, 1980, 480 p.
177. Kukkonen J. // *Effects of pH and Natural Humic Substances on the Accumulation of Organic Pollutants in two Freshwater Invertebrates*. In: *Humic Substances in the Aquatic and Terrestrial Environments*. Proceedings of International Symposium. Zinkoping, Sweden, August 21-23, 1989. Lecture Notes in Earth Sciences, v. 33, p. 413-422.
178. McCarthy JF. // *Bioavailability and toxicity of metals and hydrophobic organic contaminants*. In: *Aquatic Humic Substances: Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. Suffet I.H., MacCarthy P. (Eds.), ACS Symposium Series 219, American Chemical Society: Washington, DC, 1989, pp 263-277.
179. Ko S.-O., Schlautman M.A. and Carraway E.R. // *Environ. Sci. Technol.*, 1998, v. 32, p. 3542-3548.
180. Hegeman W. J.M., Weijden C.H., Loch J.P. // *Environ. Sci. Technol.*, 1995, v. 29, p. 363-371.
181. Дъячков П.Н. // *Итоги науки и техники. Токсикология*. Т.16. 1990, М., ВИНТИ, с. 280.
182. Cerniglia C.E. // *Adv. Appl. Microbiol.*, 1984, v. 30, p. 31-69.
183. Maruya K.A., Risebrough R.W., Horne A.J. // *Environ. Toxic. Chem.*, 1997, v. 16, p. 1087-1097.
184. Southworth G.R., Beauchamp J.J., Schmieder P.K. // *Wat. Res.*, 1978, v. 12, p. 973-977.
185. Laversee G.J., Giesy J.P., Landrum P.F., et al. // *Disposition of Benzo(a)Pyrene in Aquatic Systems Components: Periphyton, Chironomids, Daphnia, Fish*. In: *Chemical Analysis and biological fate: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*.



- Cooke M., Dennis A.J. (Eds.). 5th Inter. Symp. on PAH, Battelle press, 1981, p. 357-365.
186. Mackay D. // *Environ. Sci. Technol.*, 1982, v. 16, p. 274-278.
  187. Geyer H.J., Scheunert I., Bruggemann R., et al. // *Sci. Total Environ.*, 1991, v. 109/110, p. 387-394.
  188. Broman D., Naf C., Lundbergh I., Zebuhr Y. // *Environ. Toxicol. Chem.*, 1990, v. 9, p. 429-442.
  189. Servos M.R., Muir D.C.G. // *Environ. Toxicol. Chem.*, 1989, v. 8, p. 141-150.
  190. Servos M.R., Muir D.C.G. and Webster G.R.B. // *Aquat. Toxicol.*, 1989, v. 14, p. 169-184.
  191. Kooijman S.A.L.M. and Bedaux J.J.M. // *The Analysis of Aquatic Toxicity Data*. VU University Press, Amsterdam, 1996, p. 146.
  192. Haitzer M., Hoess S., Transpurger W., Steinberg C. // *Environ. Toxicol. Chem.*, 1999, "in Press".
  193. Leverssee G.J., Landrum J.P., Fannin T. // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1983, v. 40, p. 63-69.
  194. Grainer L.K., Lafrance P., Campbell G.C. // *Chemosphere*, 1999, v.38, p. 335-350.
  195. McCarthy J.F. // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 1983, v. 12, p. 559-568.
  196. Kukkonen J., Oikari A. // *Sci. Tot. Environ.*, 1987, v. 62, p. 399-402.
  197. Weinstein J.E., Oris J.T. // *Environ. Toxicol. Chem.*, 1999, v. 18, p. 2087-2094.
  198. Kukkonen J., Oikari A. // *Sci. Tot. Environ.*, 1989, v. 79, p. 197-207.
  199. Steinberg C.E.W., Sturm A., Keibel J., et al. // *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 1992, v. 20, p. 326-332.
  200. Huang X.-D., McConkey B.J., Babu T.S. // *Environ. Toxicol. Chem.*, 1997, v. 16, p. 1707-1715.
  201. Shipman L.L. // *Ab Initio Quantum Mechanical Characterization of the Ground Electronic State of Benzo(a)pyrene. Implications for the Mechanism of Polynuclear Aromatic Hydrocarbon Oxidation to Epoxides by Cytochrome P-450*. In: *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons*. Jones P.W., Leber P. (Eds.). V.3, 1979, Ann Arbor Science Publishers, Inc., p. 139-143.
  202. Duxbury C.L., Dixon D.G., Greenberg B.M. // *Environ. Toxicol. Chem.*, 1997, v. 16, p. 1739-1748.
  203. Pelletier M.C., Burgess R.M., Ho K.T., et al. // *Environ. Toxicol. Chem.*, 1997, v. 16, p. 2190-2199.
  204. Kagan J., Kagan E.D., Kagan P.A., Quigley S. // *Chemosph.*, 1985, v. 14, p. 1829-1834.
  205. Swartz R.C., Ferraro S.P., Lamberson J.O., et al. // *Environ. Toxicol. Chem.*, 1997, v. 16, p. 2151-2157.
  206. Kagan J., Kagan E.D., Kagan I.A. // *Do Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Acting as Photosensitizers, Participate in the Toxic Effects of Acid Rain*. In:

- Photochemistry of Environmental Aquatic Systems*. Zika R.G., Cooper W.J. (Eds)., Amer. Chem. Soc., 1987, p. 191-204.
207. Bowling J.W., Leversee G.J., Landrum P.F. and Giesy J.P. // *Aquat. Toxicol.*, 1983, v. 3, p. 79-90.
208. Oris J.T., Hall A.T., Tylka J.D. // *Environ. Toxicol. Chem.*, 1990, v. 9, p. 575-583.
209. Newsted J.L., Giesy J.P. // *Environ. Toxicol. Chem.*, 1987, v. 6, p. 445-461.
210. Mekenyan O.G., Ankley G.T., Veith G.D., Call D.J. // *SAR QSAR Environ. Res.*, 1994, v. 2, p. 237-240.
211. Bataikin G.A., Galushko A.M., Makhno L.Yu., Khristeva L.A. // *On the nature of physiological activity of humic acids*. Proc. IVth Intern. Symp. "Peat: properties and perspectives of application", Minsk, 1982, c. 115–117.
212. Visser S.A. // Effect of humic substances on plant growth. In *Humic Substances. Effects on Soil and Plants*, Visser S.A. (Eds)., REDA, Rome, 1986, p. 89-135.
213. Hargeby A., Petersen R.C. // *Fresh. Biol.*, 1988, v. 19, p. 235-247.
214. Petersen R.C., Persson U. // Comparison of the biological effects of humic materials under acidified conditions. *Sci. Total Environ.*, 1987., v. 62, p. 387-398.
215. Petersen R.C. // The contradictory biological behavior of humic substances in the aquatic environment. In: *Humic Substances in the Aquatic and Terrestrial Environment*. Allard B. (Eds)., Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 1991, p. 369-389.
216. Филенко О.Ф. // Водная токсикология. Черноголовка: МГУ, 1988, с.155.
217. Doerffel K. // *Statistik in der analytischen Chemie*. Deutscher Verlag fuer Grundstoffindustrie GmbH: Leipzig, 1990, p. 258.
218. Katritzky A.R., Lobanov V.S., Karelson M. // *Chem. Soc. Rev.*, 1995, p. 279-287.
219. Melcer M.E., Zalewski M.S., Brisk M.A. and Hasset J.P. // *Chemosphere*, 1987, v. 16, p. 1115-1121.
220. Polynov V.A. 1992. Development and application of fluorescent methods of biotesting of natural and waste waters. Ph.D. Thesis. Lomonosov Moscow State University, Moscow (*In Russian*).

## Показатели ароматичности модельных органических кислот

Кислота	$C_{Ar}$	H/C	$\epsilon^*_{280}$
Алгиновая	0	0.07	0.05
3-ОН- бензойная	0.86	0.07	0.02
4-ОН-бензойная	0.86	0.11	0.01
2,3-ОН-бензойная	0.86	0.07	0.02
2,4-ОН-бензойная	0.86	0.07	0.04
2,6-ОН-бензойная	0.86	0.07	0.02
3,5-ОН-бензойная	0,6	0.07	0.02
2,3,4-ОН-бензойная	0.85	0.07	0.03
2,4,6-ОН-бензойная	0.85	0.07	0.01
Бензилмалоновая	0.60	0.08	0.01
Ванилиновая	0.75	0.09	0.14
Вератровая	0.67	0.09	0.04
Галловая	0.86	0.14	0.01
D-глюкуроновая	0	0.14	0.01
Глуконовая	0	0.10	0.01
Глутаровая	0	0.13	0.01
Гомофталева	0.67	0.09	0.03
Карминовая	0.55	0.07	0.12
Коричная	0.67	0.07	0.02
2-Метоксибензойная	0.70	0.08	0.03
Пимелиновая	0	0.14	0.01
Сиреневая	0.67	0.06	0.01
Терефталева	0.75	0.06	0.02
а-Толуиловая	0.86	0.08	0.04
4-ОН-фенилуксусная	0.75	0.08	0.03
3-ОН-фенилуксусная	0.75	0.08	0.02
2-ОН-фенилуксусная	0.75	0.08	0.02
3-Фенилпропионовая	0.67	0.09	0.01
Формилсалициловая	0.75	0.06	0.04
Фталева	0.75	0.06	0.01
Хинная	0.86	0.08	0.01
Янтарная	0	0.13	0.01

Значения активностей питания дафний в растворе пирена ( $R_{Py+ГФК}/R_0$ , %) (100 иёã/ё) в присутствии различных концентраций ГФК различного происхождения

ГФК	Концентрации ГФК, мгС/л					
	0	1.5	3	6	12	25
<b>ГК почв</b>						
НВW	56	78	77	96	98	94
НВWN	56	68	76	87	95	82
НВР	56	60	76	83	89	90
НВG	60	76	87	90	101	98
НGW	50	72	78	82	101	111
НGP	56	74	80	89	94	100
НС	56	77	103	100	97	116
НST	56	66	78	93	103	102
<b>ФК почв</b>						
FBW	52	56	45	58	56	60
FBP	58	42	38	44	38	41
FBG	56	51	59	59	53	48
FGW	60	62	54	56	50	67
FST	58	68	76	96	110	113
<b>ГФК почв</b>						
SEL	56	56	60	84	84	97
<b>ГФК торфа</b>						
T1	53	86	104	110	110	130
T4	57	88	90	107	107	108
T5	53	65	78	88	100	110
T6	56	65	63	94	104	107
T7	53	63	73	88	90	92

HTL	57	86	86	94	110	108
TTL	60	81	106	115	96	84
HTW	56	82	80	83	87	83

**ГФК вод**

FMX	49	112	98	84	88	81
WM3X	56	56	63	83	98	100
FMC	49	72	77	82	81	86
SWA	60	80	94	115	105	96

**ГК угля**

АНА	62	83	111	110	92	94
АГК	62	87	89	115	120	94

Значения активностей питания дафний в растворе флуорантена ( $R_{Flt+\Gamma\Phi K}/R_0$ , %) (140 ìã/ë) в присутствии различных концентраций ГФК различного происхождения

ГФК	Концентрации ГФК, мгС/л					
	0	1.5	3	6	12	25
<b>ГК почв</b>						
НВW	67	86	88	91	96	101
НВWN	66	73	81	86	89	91
НВP	67	63	87	87	84	89
НВG	63	78	82	86	96	98
НGW	63	73	78	85	96	101
НGP	65	77	86	93	86	93
НС	66	92	87	91	103	97
НST	61	75	79	88	92	87
<b>ФК почв</b>						
FBW	61	69	55	53	53	51
FBP	64	30	27	31	30	29
FBG	67	55	54	54	53	43
FGW	70	68	65	68	67	60
FST	68	74	76	93	109	123
<b>ГФК почв</b>						
SEL	63	84	88	99	112	115
<b>ГФК торфа</b>						
T1	71	91	105	117	121	120
T4	61	78	86	93	98	110
T5	58	83	74	85	91	95
T6	64	93	86	86	105	131
T7	60	78	93	96	104	96

HTL	61	65	78	96	110	115
TTL	67	72	89	116	108	70
HTW	58	75	65	75	76	78

**ГФК вод**

FMX	56	83	97	86	91	105
WM3X	62	77	83	78	103	96
FMC	56	55	73	70	84	93
SWA	60	70	79	110	105	90

**ГК угля**

АНА	66	84	96	110	98	93
АГК	66	87	98	115	102	110

Значения активностей питания дафний в растворе антрацена ( $R_{\text{Ап+ГФК}}/R_0$ , %) (35 иёã/ё) в присутствии различных концентраций ГФК различного происхождения

ГФК	Концентрации ГФК, мгС/л					
	0	1.5	3	6	12	25
<b>ГК почв</b>						
НВW	53	85	93	85	95	96
НВWN	45	85	89	90	106	106
НВР	52	85	69	80	100	106
НВG	53	77	79	81	84	88
НGW	51	67	86	86	100	96
НGP	53	82	88	96	112	105
НС	49	87	72	87	91	92
НST	54	69	78	86	88	84
<b>ФК почв</b>						
FBW	47	53	58	50	48	46
FBP	48	46	52	47	55	49
FBG	47	52	58	47	47	42
FGW	47	49	55	48	52	50
FST	47	56	52	48	47	56
<b>ГФК почв</b>						
SEL	48	65	73	95	94	98
<b>ГФК торфа</b>						
T1	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
T4	43	56	57	67	98	102
T5	46	60	67	79	98	96
T6	47	55	53	68	102	110
T7	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d





Значения активностей питания дафний ( $R_{ГФК}/R_0$ , %) в присутствии различных концентраций ГФК различного происхождения

ГФК	Концентрации ГФК, мгС/л					
	0	1.5	3	6	12	25
<b>ГК почв</b>						
НВW	100	103	110	107	98	92
НВWN	100	100	105	102	96	92
НВР	100	111	107	106	113	90
НВG	100	96	109	106	113	100
НGW	100	106	110	108	113	100
НGP	100	109	115	110	94	91
НС	100	106	110	106	94	88
НST	100	98	107	113	97	88
<b>ФК почв</b>						
FBW	100	102	102	107	109	113
FBP	100	102	97	100	102	91
FBG	100	116	114	114	111	100
FGW	100	101	103	106	102	107
FST	100	101	109	116	112	120
<b>ГФК почв</b>						
SEL	100	110	110	115	113	106
<b>ГФК торфа</b>						
T1	100	120	130	128	123	109
T4	100	136	132	131	141	135
T5	100	105	99	124	120	114
T6	100	110	108	102	107	90
T7	100	120	130	128	123	109

HTL	100	103	96	98	92	86
TTL	100	106	112	126	123	131
HTW	100	120	140	140	110	108

**ГФК вод**

FMX	100	106	110	110	115	115
WM3X	100	110	109	110	115	120
FMC	100	102	105	102	103	100
SWA	110	113	120	110	101	98

**ГК угля**

АНА	100	120	124	119	101	96
АГК	100	110	105	110	105	100

**Коэффициенты детоксикации ГФК различного происхождения по отношению к ПАУ**

ГФК	Пирен	Флуорантен	Антрацен
<b>ГК почв</b>			
HBW	79	83	52
HBWN	85	87	78
HBP	54	48	47
HBG	49	54	40
HGW	87	81	54
HGP	80	76	80
HS	100	91	77
HST	100	89	79
<b>ФК почв</b>			
FBW	0	0	0
FBP	0	0	0
FBG	0	0	0
FGW	0	0	0
FST	39	45	0
<b>ГФК почв</b>			
SEL	56	64	61
<b>ГФК торфа</b>			
T1	73	76	<i>n.d.</i>
T4	67	76	21
T5	56	63	36
T6	66	71	28
T7	70	78	<i>n.d.</i>
<i>HTL</i>	68	71	53
<i>TTL</i>	84	85	15

<i>HTW</i>	28	28	0
<b>ГФК вод</b>			
<i>FMX</i>	60	50	0
<i>WM3X</i>	43	40	0
<i>FMC</i>	40	20	0
<i>SWA</i>	43	50	0
<b>ГК угля</b>			
<i>AGK</i>	100	100	<i>n.d.</i>
<i>ANA</i>	90	88	78