

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

им. М. В. Ломоносова

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра аналитической химии

Беляева Елена Юрьевна

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ НЕЭКСКЛЮЗИОННЫХ ЭФФЕКТОВ
В ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОМ ФРАКЦИОНИРОВАНИИ
ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ

Дипломная работа

Научные руководители:

д.х.н., в.н.с. И. В. Перминова

д.х.н., в.н.с. П. Н. Нестеренко

Москва – 2004

Содержание

Введение	3
1. Обзор литературы.....	4
1.1. Общая характеристика гуминовых веществ	4
1.2. Элементный состав гумусовых кислот	5
1.3. Функциональный состав гумусовых кислот и методы его определения	6
1.4. Молекулярно-массовый состав гумусовых кислот и методы его определения	9
1.5. Определение молекулярных масс гумусовых кислот методом гель- проникающей хроматографии	11
1.6. Неэксклюзионные эффекты в гель-проникающей хроматографии гумусовых кислот.....	13
2. Экспериментальная часть.....	18
2.1. Реактивы и оборудование.....	18
2.2. Техника эксперимента	20
2.3. Обработка гель-хроматограмм	25
2.3. Статистическая обработка данных.....	26
3. Результаты и их обсуждение.....	27
3.1. Характеристика препаратов	27
3.2. Выбор эксклюзионных условий гель-хроматографического фракционирования гумусовых кислот.....	30
3.2.1. Подавление эффекта сверхэксклюзии	32
3.2.2. Подавление эффекта специфической адсорбции	41
3.3. Расчет характеристик молекулярно-массового распределения гумусовых кислот.....	44
3.3.1. Определение оптимальной градуировочной зависимости	44
3.3.2. Расчет молекулярно-массовых характеристик гумусовых кислот.....	48
Выводы.....	51
Список литературы	52

Введение

Одним из интенсивно развивающихся направлений современной аналитической химии является анализ сложных органических матриц – продуктов жизнедеятельности и распада живых организмов. Важным представителем таких объектов являются гуминовые вещества. Они составляют один из самых обширных резервуаров органического углерода, образуясь в результате распада отмерших организмов. Спецификой гуминовых веществ является стохастический характер, обусловленный особенностями их образования в результате естественного отбора устойчивых структур. Как следствие, к фундаментальным свойствам гуминовых веществ относятся нестехиометричность состава, нерегулярность строения, гетерогенность структурных элементов и полидисперсность молекулярных масс. В силу указанных свойств, до сих пор отсутствуют унифицированные методологические подходы к определению структурных и молекулярно-массовых характеристик гуминовых веществ. Разработка таких подходов представляет собой весьма актуальную задачу.

Одной из важных характеристик гуминовых веществ является молекулярная масса. Она определяет их растворимость, способность к миграции в природных экосистемах, возможность поглощения микроорганизмами и растениями. Наиболее распространенным методом ее определения является гель-проникающая хроматография. Достоинством данного метода является возможность получить информацию о полной кривой молекулярно-массового распределения (ММР) гумусовых кислот. Однако в силу полиэлектролитных свойств гумусовых кислот, в процессе гель-хроматографического фракционирования возникают неэксклюзионные эффекты, которые вызывают существенные артефакты в определении численных характеристик ММР гумусовых кислот.

Целью данной работы было изучение влияния неэксклюзионных эффектов на определение молекулярно-массового распределения гумусовых кислот.

1. Обзор литературы

1.1. Общая характеристика гуминовых веществ

Гуминовые вещества (ГВ) представляют собой наиболее распространенный класс органических соединений природного происхождения, являясь одним из главных компонентов органического вещества почв, торфов, природных вод, морских и озерных донных отложений. Они представляют собой смесь макромолекул переменного состава и нерегулярного строения. Общепринятая классификация ГВ [1, 2, 3] основана на их различной растворимости в кислотах и щелочах. Согласно этой классификации ГВ подразделяют на *гумин* (нерастворим во всем диапазоне pH), *гуминовые кислоты* – ГК (нерастворимы при $\text{pH} < 2$) и *фульвокислоты* – ФК (растворимы во всем диапазоне pH). Последние два класса объединяют под общим названием *гумусовые кислоты* (здесь и далее обозначаются как ГФК). Гумусовые кислоты являются наиболее подвижной и реакционноспособной компонентой ГВ, активно участвующей в химических процессах, протекающих в водных и почвенных экосистемах [1, 2].

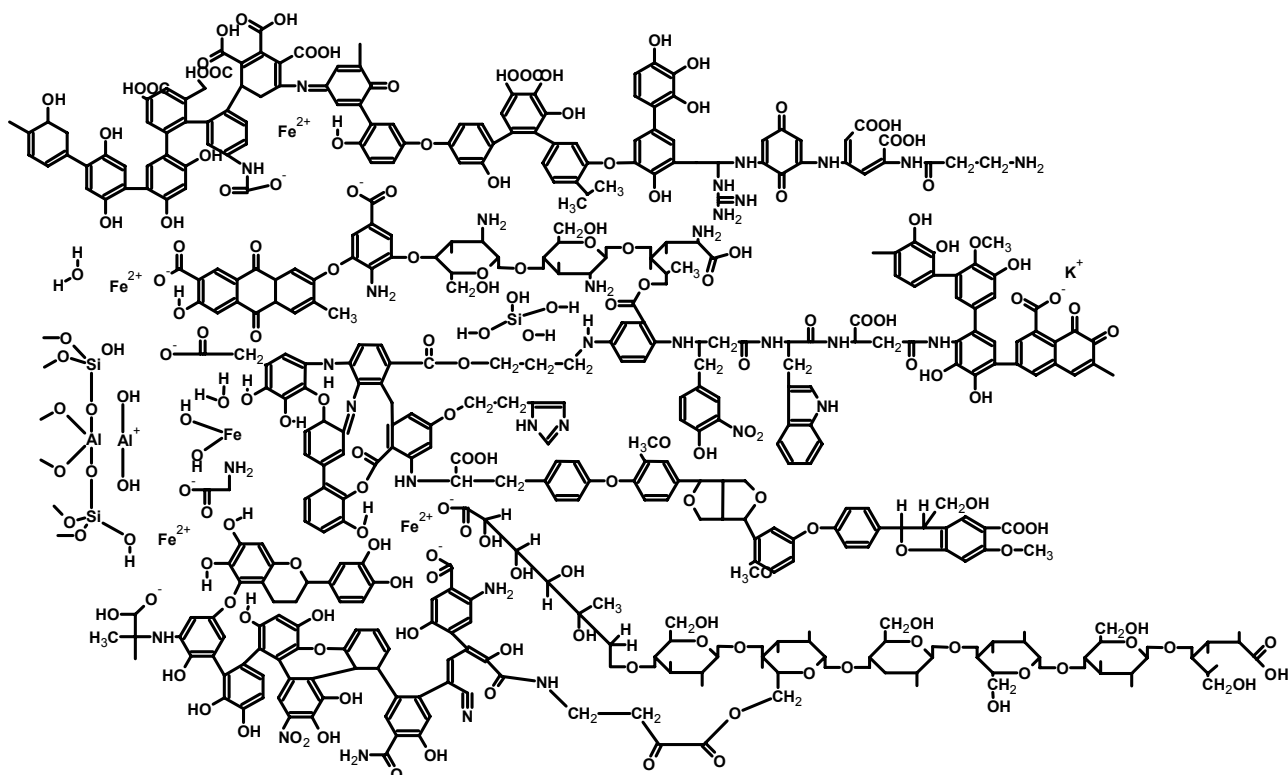


Рис. 1. Гипотетический структурный фрагмент гумусовых кислот почв [4].

Модель структурного фрагмента ГФК почв представлена на рис. 1. Как видно из приведенного структурного фрагмента, по своей химической природе ГФК представляют собой нерегулярные сополимеры ароматических оксиполикарбоновых кислот с включениями азотсодержащих и углеводных фрагментов [4]. Указанное строение – наличие каркасной части, т.е. ароматического углеродного скелета, замещенного алкильными и функциональными группами, среди которых преобладают карбоксильные, гидроксильные и метоксильные, и периферической части, обогащенной полисахаридными и полипептидными фрагментами, – является общим для ГВ всех источников происхождения.

1.2. Элементный состав гумусовых кислот

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



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

Средний элементный состав органической части гумусовых кислот различного происхождения приведен в табл. 1, заимствованной из работы [4]. Авторы этой публикации подвергли статистической обработке данные по элементному составу 650 препаратов гумусовых кислот, опубликованные в более чем 400 литературных источниках. Поэтому приводимая ими сводка является наиболее представительной.

Как видно из табл. 1, содержание углерода в ГК различного происхождения варьирует от 50 до 60%, кислорода – от 30 до 40%. В целом, для ГК характерны более низкие значения атомного соотношения Н/С, чем для ФК, что указывает на их большую ненасыщенность. Данный показатель убывает в ряду: морские донные отложения > пресные воды > торфа ≈ почвы. ФК характеризуются более низким содержанием углерода и более высоким – кислорода. Это предполагает большую степень замещения ароматического каркаса ФК кислородсодержащими

функциональными группами. Максимальное содержание кислорода характерно для ФК пресных вод.

Таблица 1

Средний элементный состав гумусовых кислот различного происхождения
(в расчете на беззольную навеску, n – число препаратов, ± стандартное отклонение) [4]

Препарат	Содержание элементов, % (масс)					Атомные отношения	
	C	H	O*	N	S	O/C	H/C
ГК почв (n = 215)	55,4±3,8	4,8±1	36,0±3,7	3,6±1,3	0,8±0,1 (n = 67)	0,50±0,09	1,04±0,25
ФК почв (n = 127)	45,3±5,4	5,0±1	46,2±5,2	2,6±1,3	1,3±0,5 (n = 45)	0,78±0,16	1,35±0,34
ГК торфа (n = 23)	57,1±2,5	5,0±0,8	35,2±2,7	2,8±1,0 (n = 21)	0,4±0,2 (n = 12)	0,47±0,06	1,04±0,17
ФК торфа (n = 12)	54,2±4,3	5,3±1,1	37,8±3,7	2,0±0,5	0,8±0,2 (n = 11)	0,53±0,09	1,20±0,33
ГК вод (n = 56)	51,2±3	4,7±0,6	40,4±3,8	2,6±1,6	1,1±0,3 (n = 13)	0,6±0,08	1,12±0,17
ФК вод (n = 63)	46,7±4,3	4,2±0,7	45,9±5,1	2,3±1,07	1,2±0,7 (n = 14)	0,75±0,14	1,10±0,13
ГК морских д.о.** (n = 95)	56,3±6,6	5,8±1,4	31,7±7,8	3,8±1,5	3,1±1,4 (n = 66)	0,45±0,18	1,23±0,23
ФК морских д.о. (n = 12)	45,0±4,0	5,9±0,9	45,1±6,0	4,1±2,3	0,8±0,6 (n = 11)	0,77±0,17	1,56±0,13

* данные по содержанию кислорода получены по разности;

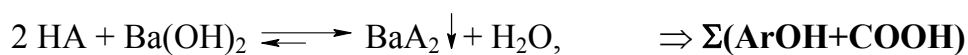
** д.о. – донные отложения.

1.3. Функциональный состав гумусовых кислот и методы его определения

По элементному составу можно получить только общие представления о строении гумусовых кислот, в частности, о соотношении алифатических и ароматических компонентов. Он не позволяет определить конкретные структуры, лежащие в основе молекул ГФК. Такие задачи, как изучение роли гумусовых кислот в природных процессах, а также создание гумусовых препаратов с заданными свойствами возможны лишь на основе глубокого исследования их структуры и свойств [5].

В настоящее время в гумусовых кислотах обнаружено более десяти различных типов функциональных групп. Но, поскольку суммарное содержание серы и азота в ГК обычно не превышает 5% [1], можно считать, что химическое поведение гумусовых кислот определяется кислородсодержащими функциональными группами, представленными, главным образом, карбоксильными и гидроксильными группами.

Традиционные методы определения кислотных групп в гумусовых кислотах основаны на образовании малорастворимых солей с ионами щелочноземельных металлов [6, 7]. Данное свойство позволяет определять как общее содержание кислотных групп (карбоксильных и фенольных гидроксилы), так и содержание наиболее сильных – карбоксильных групп - по реакциям с гидроксидом бария и ацетатом кальция:



(А – кислотный остаток гумусовых кислот)

В обоих случаях реагент берется в избытке. Для оценки числа прореагировавших групп после осаждения гуматов в баритовом методе избыток $\text{Ba}(\text{OH})_2$ титруется HCl (обратное титрование), в Са-ацетатном – определяется количество уксусной кислоты, высвободившейся в результате реакции (вытеснительное титрование). Удаление гумусовых кислот из раствора в виде осадка гуматов бария или кальция приводит к сдвигу равновесия диссоциации вправо и, следовательно, более полному определению групп по сравнению с потенциометрическим титрованием. Однако, несмотря на образование малорастворимых соединений, обе реакции в значительной степени обратимы [8], поэтому для достижения полноты превращения необходим существенный избыток реагента.

Важную информацию о количестве карбоксильных и фенольных групп может дать изучение распределения кислотных групп по величине констант диссоциации (pK) в молекулах ГК. Из-за того, что гумусовые кислоты являются полиэлектролитами распределение кислотных групп по pK представляет собой непрерывный спектр. Поэтому расчет pK -спектров проводится численными методами [9].

Этот метод имеет ряд ограничений:

- 1) он применим только для образцов, растворимых в воде;
- 2) неустойчивость численного метода для расчета рК-спектра приводит к значительным погрешностям;
- 3) область значений рК карбоксильных и фенольных групп может перекрываться.

Несмотря на указанные проблемы, данный метод широко используется для оценки кислотности ГФК [10].

Наиболее распространенный способ определения точки эквивалентности при анализе ГФК заключается в титровании до фиксированного значения рН [10]. Обычно рН 7.0 считают окончанием титрования карбоксильных групп, а рН 10.2-10.3 – всех кислотных групп [11]. Очевидно, что такой способ определения вклада карбоксильных групп весьма условен, т.к. рН точки эквивалентности при титровании многих органических кислот лежит выше 7, а слабых фенольных гидроксидов – выше 11.

Результаты определения кислотных групп с помощью указанных методов в ГФК различного происхождения приведены в табл. 2.

Таблица 2.

Содержание кислотных групп в ГФК различного происхождения и фракционного состава, определяемое титриметрическими методами

Группы	Метод определения		Содерж., ммоль/г	Литература
	реагент	колич. метод		
ГК почв				
COOH	CH ₃ COOСa	Титрование	1,5-4,7	[6]
ГК торфа				
COOH	CH ₃ COOСa	Титрование	2,3-4,6	[12]
COOH ⁺ ArOH	Ba(OH) ₂	Титрование	6,2-8,5	[12]
ГК угля				
COOH	CH ₃ COOСa	Титрование	2,0-3,6	[7]
COOH+ArOH	Ba(OH) ₂	Титрование	7,2-8,7	[7]
ФК почв				
COOH+ArOH	Ba(OH) ₂	Титрование	9-14	[2]

ФК почв обладают наибольшим количеством кислотных групп, тогда как для ГК почв эти значения наименьшие. ГК угля и торфа содержат практически одинаковое число кислотных групп.

Результаты, полученные методами, основанными на реакциях ионного обмена, должны быть интерпретированы с достаточной степенью осторожности. Это связано с наличием большого числа химически неидентичных кислотных групп, диссоциация которых происходит не независимо друг от друга. Диссоциация каждой последующей группы происходит в электрическом поле уже продиссоциировавших групп. В связи с этим кислотные свойства ионогенных групп в полиэлектролитах невозможно охарактеризовать одной константой диссоциации или набором ступенчатых констант [2]. Кроме того, реакции обмена могут быть пространственно затруднены для тризамещенных (и более) фенолов [13]. Нужно также отметить следующие трудности, возникающие при определении кислотных групп данными методами: 1) нерастворимость ГК в воде и большинстве органических растворителей; 2) нежелательные побочные реакции; 3) нестехиометричность реакции.

Однако при соответствующем подборе соли или щелочи обменные реакции гуминовых кислот могут быть использованы для определения в них функциональных групп титриметрическим способом.

1.4. Молекулярно-массовый состав гумусовых кислот и методы его определения

Молекулярная масса – фундаментальная характеристика любого вещества, в том числе и гумусовых кислот. ГФК являются высокомолекулярными соединениями ионогенного характера, что определяет их полиэлектролитные свойства [1, 14]. От размеров и конфигурации макромолекул ГФК зависят их растворимость, реакционная способность и биологическая активность [1].

Молекулярная масса ГФК влияет и на их способность к связыванию ионов различных металлов. В работе [15] рассмотрена способность ГФК к связыванию кадмия. Отмечено, что фракция ГФК с ММ 1000-10000 Дальтон (Да) связывает основную часть ионов кадмия. Авторами [15] было установлено, что именно в этой фракции энергия связи ГФК и металла на порядок выше, чем во фракциях с меньшей или большей молекулярной массой.

В отличие от индивидуальных органических соединений, характеризующихся единственным значением ММ, гумусовые кислоты полидисперсны, то есть обладают набором молекулярных масс. Поэтому их характеризуют молекулярно-массовым распределением (ММР), на основании которого рассчитывают среднюю ММ. В

зависимости от способа усреднения получают три вида молекулярных масс: среднечисловую (M_n), средневесовую (M_w) и z-среднюю (M_z) [1, 16].

Для расчета среднечисловой ММ производят усреднение по числу молекул в полимере:

$$\overline{M}_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i}$$

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

Для расчета средневесовой ММ производят усреднение по массе молекул в полимере и рассчитывают ее по следующей формуле:

$$\overline{M}_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i}$$

z-среднюю ММ рассчитывают по следующей формуле:

$$\overline{M}_z = \frac{\sum n_i M_i^3}{\sum n_i M_i^2}$$

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

$$M_z > M_w > M_n,$$

при этом отношение M_w/M_n используется как показатель полидисперсности. Для характеристики гумусовых кислот наиболее часто используют их средневесовую молекулярную массу [1].

Величины молекулярных масс ГФК, определяемые различными авторами, лежат в широком диапазоне значений - от сотен до миллионов Дальтон [1]. При этом определяемая величина существенно зависит от метода определения. Для определения ММ гуминовых веществ используют целый ряд методов [17]: светорассеяние, гель-проникающую хроматографию, ультрацентрифугирование, вискозиметрию и методы, основанные на измерении коллигативных свойств. Для каждого из способов характерны свои особенности.

Так, методы, основанные на измерении коллигативных свойств полимера (осмометрия, криоскопия, эбулиоскопия) [18], чрезвычайно чувствительны к присутствию низкомолекулярных примесей в анализируемом образце. Поэтому их

применение для анализа препаратов гумусовых кислот, которые практически всегда содержат низкомолекулярные зольные компоненты, может приводить к существенному занижению молекулярной массы. К тому же этими методами определяется среднечисловая ММ (M_n). Величины ММ, найденные этим способом [18], составляют от 500 до 1000 Да. Вискозиметрия [19] очень чувствительна к присутствию высокомолекулярных примесей. Метод светорассеяния [20] позволяет определить только средневесовую ММ (M_w). На определяемые методом ультрафильтрации величины молекулярных масс большое значение оказывает взаимодействие гумусовых кислот с мембранами [21]. Метод гель-проникающей хроматографии [22] дает наиболее полное представление о молекулярно-массовом распределении гумусовых кислот.

1.5. Определение молекулярных масс гумусовых кислот методом гель-проникающей хроматографии

Гель-проникающая, или эксклюзионная, хроматография – наиболее распространенный и доступный метод определения молекулярно-массового распределения гумусовых кислот. Для анализа гумусовых кислот он был применен Познером [23] в 1963 году.

В методе гель-проникающей хроматографии (ГПХ) роль неподвижной фазы играет макропористый сорбент, адсорбционно инертный по отношению к молекулам хроматографируемого вещества [24]. Название метода сложилось исторически и недостаточно полно отражает его суть. Это объясняется тем, что на первых порах в качестве сорбента использовали только набухающие гели: декстрановые – для разделения белков и полистирольные – для анализа полимеров. Они представляют собой трехмерные полимерные сетчатые структуры, внутрь которых с определенной вероятностью могут проникать макромолекулы различных размеров. Эта вероятность зависит от соотношения размеров макромолекул и пространственной сетки геля, а скорость проникновения в гель определяется диффузионной подвижностью макромолекул. Для малых макромолекул она выше, чем для больших. Очень большие молекулы не проникают внутрь геля, а очень малые попадают туда с вероятностью, близкой к единице. В дальнейшем в ГПХ стали использовать жесткие макропористые сорбенты: пористые стекла, силикагели и сфероны, обладающие хорошо развитой пористой структурой.

Метод ГПХ позволяет определять размеры макромолекул, их молекулярные массы и некоторые структурные особенности, например, степень разветвленности полимеров, зависимость размеров макромолекул сополимеров от их состава и молекулярных масс, число изомеров, ассоциатов и комплексов в белковой и полимерной смеси, а также соответствующие равновесные константы изомеризации, ассоциации и комплексообразования [24].

В ГПХ нашли применение следующие типы детекторов: рефрактометрический, фотометрический (спектрофотометрический) и флуоресцентный. Основой для сравнения различных типов детекторов служат следующие параметры: концентрационная чувствительность, физическая чувствительность, объем измерительной кюветы, воспроизводимость дрейфа нулевой линии, короткопериодный шум, а также чувствительность к изменению состава растворителя, разрушающее действие на анализируемые вещества.

Чаще всего при анализе ГФК применяют спектрофотометрический детектор. Выходящий из колонки элюат пропускают через проточную кювету спектрофотометра и непрерывно автоматически регистрируют оптическую плотность. Результаты представляют в виде хроматограммы – графика, на котором по оси абсцисс отложен объем элюирования аналита, а по оси ординат – оптическая плотность [24].

Однако в последнее время используются и другие детекторы: в частности, проточный детектор растворенного органического углерода [25, 26], позволяющий определять содержание органического углерода в образце, а также детектор по светорассеянию [27].

В связи с тем, что ГПХ представляет собой не абсолютный, а относительный метод определения молекулярных масс, то колонку калибруют по веществам с известными молекулярными массами. В качестве образцов сравнения для гумусовых кислот используют белки, полидекстраны, полиэтиленгликоли и полистиролсульфонаты [28].

Молекулярные массы гуминовых веществ, выделенных из различных источников, отличаются по своим значениям [29]. Данные приведены в табл. 3.

Молекулярные массы, полученные для гуминовых веществ различного происхождения

Образцы	Диапазон M_w , кДа
водные ФК	0.3-17
водные ГК и ГФК	1-30
угольные ГК	4-5
торфяные ГК	4-22
дернисто-подзолистые ФК	1-5
дернисто-подзолистые ГК	100-700
почвенные	100-200

Как видно из таблицы, наибольшие значения ММ характерны для почвенных ГВ, тогда как для угольных, водных и торфяных ГВ значения меньше на несколько порядков.

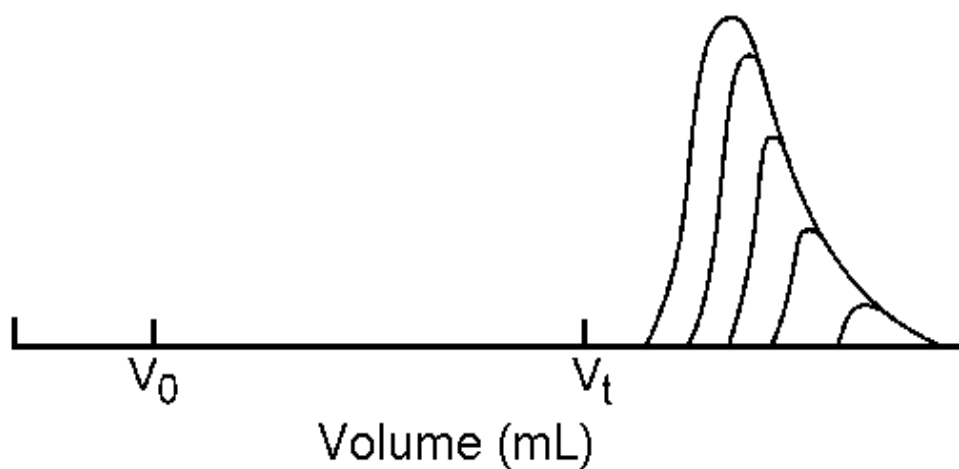
1.6. Неэксклюзионные эффекты в гель-проникающей хроматографии гумусовых кислот

Определение молекулярных масс гумусовых кислот методом ГПХ сопряжено с появлением артефактов: сверхэксклюзии и специфической адсорбции, которые обусловлены взаимодействием аналита с гелем. Влияние этих эффектов [30, 31] на вид гель-хроматограммы полиэлектролитов показано на рис. 2.

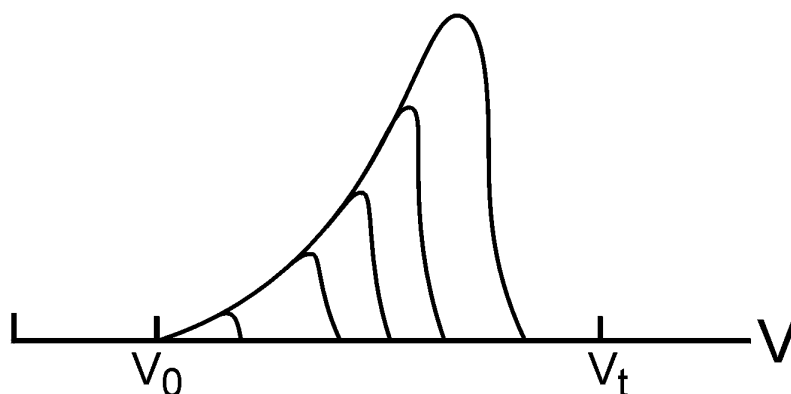
Как видно из рисунка, неэксклюзионные эффекты существенно влияют на вид хроматограмм. Они становятся несимметричными. При специфической адсорбции задний фронт хроматограммы размыт, так как сорбируемый на геле аналит медленно вымывается из колонки. Для эффекта сверхэксклюзии наблюдается прямо противоположная картина.

Гидрофильные гели (декстрановые, полиметакрилатные) содержат остаточные количества карбоксильных групп, ионизация которых приводит к образованию отрицательного заряда на частицах геля. Вследствие этого полианион гумусовых кислот исключается из-за более сильной ионной эксклюзии. В результате объем элюирования анализируемого вещества намного меньше, чем был бы в отсутствие данного эффекта, что приводит к завышению определяемого значения ММ. Если

аналит высоко заряжен, то объем элюирования может быть равен мертвому объему колонки.



специфическая сорбция



сверхэксклюзия

Рис. 2. Влияние неэкслюзионных эффектов на гель-хроматограмму полиэлектролитов.

Специфическая адсорбция возникает в результате образования гидрофобных или водородных связей между анализом и матрицей геля. Как следствие, объем элюирования анализа существенно возрастает и может превысить общий объем колонки. Это приводит к занижению определяемого значения ММ.

Для подавления неэкслюзионных эффектов в ГПХ синтетических полиэлектролитов прибегают к модификации элюента. Эффекты сверхэксклюзии

устраняют путем повышения ионной силы и подбора оптимального рН [30]. Для подавления специфической адсорбции к элюенту добавляют гидрофобный органический растворитель [32].

В литературе описаны различные условия ГПХ-определения ММ гумусовых кислот. Авторы [33] для подавления эффекта сверхэксклюзии вводили в элюент фоновый электролит (NaCl или KCl). Однако в этих условиях возможна [23] сорбция гумусовых кислот на геле. Также необходимо подбирать оптимальную концентрацию фонового электролита, так как при ее увеличении адсорбция на геле увеличивается [34].

В [34] также исследовалось влияние рН среды 0,1М фосфатного буфера на величину сорбции. Значение рН среды варьировали от 3 до 10. При низких значениях рН гумусовые кислоты полностью сорбируются на геле, при дальнейшем увеличении они сорбируются уже частично. Оптимальным рН авторы выбрали 7, при этом значении интеграл пика был максимальным.

При определении ММ на геле Сефадекс [33] для подавления адсорбции использовали в качестве элюента тетраборат натрия с добавлением 0,001М $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (рН 9.18). Другими авторами [35] в качестве элюента использовался 1 М 2-амино-2-гидроксиметил-1,3-пропандиола хлорид (TRIS), причем образцы были соответственно уравновешены. Детектирование проводилось спектрофотометрически при $\lambda = 465$ нм. В работе [36] при выборе элюента, позволяющего подавить неэксклюзионные эффекты, авторы пришли к выводу, что наиболее оптимальным является 10мМ ацетат натрия (рН 7.0).

Подбор стандартных образцов для калибровки колонки является весьма сложной задачей из-за полиэлектролитных свойств и стохастического характера гумусовых кислот. Наиболее распространенными калибровочными веществами являются полистиролсульфонаты (ПСС), полидекстраны (ПД) и белки. Так, в работе Перминовой [28] было показано, что значения ММ, рассчитанные из 4 калибровочных зависимостей – по полидекстранам (ПД), полистиролсульфонатам (ПСС), полиметакрилатам (ПМ) и полиакрилатам (ПА), – различались на порядок, и существенно зависели от плотности заряда стандартов. Чем ниже плотность заряда стандарта, тем больше определяемое значение ММ. Следовательно, при фракционировании в выбранных условиях указанные синтетические

полиэлектролиты испытывают эффект сверхэксклюзии, что приводит к занижению их объемов элюирования. Из вышеперечисленных стандартов [37] плотность заряда ПСС (5.5 мэкв/г) наиболее близка карбоксильной кислотности ГФК (3-7 мэкв/г), что позволяет их рассматривать как оптимальные калибровочные вещества для определения ММР гумусовых кислот.

Помимо выбора элюента и стандартных образцов, важной задачей является выбор длины волны при УФ-детектировании. В работе [38] изучено влияние величины длины волны на определение ММ гумусовых кислот. Показано, что при увеличении длины волны от 220 до 380 нм, наблюдается значительное увеличение M_w и M_n (21 и 63 %, соответственно). При дальнейшем исследовании авторы пришли к выводу, что оптимальной длиной волны детектирования является 280 нм. Однако авторы работы [37] рекомендуют использовать для анализа длину волны 254 нм. Их вывод основан на анализе хроматограмм, полученных при 215, 230, 254, 280 и 350 нм. В качестве элюента они использовали фосфатный буфер (0,002М KH_2PO_4 + 0,002М $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, рН 6,8) в смеси с 0,01М NaCl.

В работе Перминовой с сотрудниками [39] было проведено систематическое исследование по количественной оценке неэксклюзионного эффекта и установлении его взаимосвязи со структурой органического аналита. Так как гумусовые кислоты содержат как ионогенные функциональные группы, гидрофильные углеводные фрагменты, так и гидрофобные ароматические и алкильные фрагменты, то их поведение нельзя объяснить каким-либо одним из описанных выше эффектов. Поэтому авторы рассматривали экспериментально определяемый коэффициент распределения как функцию трех параметров: молекулярной массы исследуемого вещества, плотности его заряда и гидрофобности. Для определения зависимости величины неэксклюзионного эффекта от структуры образца был изучен целый ряд низкомолекулярных аналогов структурных фрагментов гумусовых кислот, способных как к электростатическим, так и сорбционным взаимодействиям с гелем. В их число вошли карбоновые ароматические и алифатические кислоты, спирты, углеводы и аминокислоты. Для них был рассчитан неэксклюзионный эффект и показано, что для всех ароматических оксикислот характерна высокая специфическая сорбция на геле. Авторы объясняют это образованием водородных связей между гидроксилами

оксикислот, которые лишь частично диссоциируют в условиях проведения описанного эксперимента (при рН 6,8), и отрицательно заряженными участками геля.

Для всех карбоновых ароматических и алифатических кислот наблюдался эффект сверхэксклюзии. Так как в состав гумусовых кислот входят карбоксильные группы (от 35 до 50% от общего содержания кислорода для ГК и от 40 до 75% для ФК) и фенольные гидроксилы (от 7 до 14% для ГК и от 1 до 10% для ФК) [1], то было высказано предположение о том, что на результаты эксперимента могут оказать влияние оба типа неэксклюзионных эффектов: специфическая адсорбция и сверхэксклюзия. Для предсказания преобладающего типа неэксклюзионного эффекта для гумусовых кислот в [39] была выведена количественная зависимость “структура – неэксклюзионный эффект”.

Из полученного соотношения был сделан вывод, что ключевым фактором, определяющим хроматографическое поведение исследуемого органического образца в выбранной системе, является относительное содержание кислорода и его распределение между ионогенными функциональными группами – карбоксильными и фенольными гидроксильными. Зная указанные параметры, можно предсказать величину неэксклюзионного эффекта и внести поправку в экспериментально найденные K_d .

В связи с неразработанностью методических основ использования эксклюзионной хроматографии для определения ММ гумусовых кислот, назрела необходимость в систематическом исследовании ограничений и возможностей метода в применении к объекту, обладающему целым рядом специфических свойств, которые могут приводить к появлению неэксклюзионных эффектов, что вызывает существенные сложности при интерпретации экспериментальных данных.

2. Экспериментальная часть

2.1. Реактивы и оборудование

В данной работе использовали следующие препараты гуминовых (ГК) и фульвокислот (ФК) (табл. 4).

Таблица 4.

Шифры и источники происхождения препаратов ГК и ФК

Шифр препарата	Источник происхождения
CHA-Pow	ГК леонардита (Humintech, ФРГ)
PHA-SK3-00	ГК торфа низинного, оз. Сахтыш, Ивановская обл.
PFA-SK3-00	ФК торфа низинного, оз. Сахтыш, Ивановская обл.
CHA-GL-02	ГК бурого угля, Гусиноозерское месторождение, Иркутская обл.
CFA-GL-02	ФК бурого угля, Гусиноозерское месторождение, Иркутская обл.
SHA-Pp-96	ГК дерново-подзолистой почвы (пашня), Московская обл.
SFA-Pw-96	ГК дерново-подзолистой почвы (лес), Московская обл.
SHA-Cm-98	ГК чернозема лугового, Воронежская обл.

В работе были использованы также следующие низкомолекулярные соединения: меллитовая, пиромеллитовая, 4-гидроксibenзойная, гомофталиевая и фенилуксусная кислоты квалификации х.ч. (Fluka).

Для определения мертвого объема колонки использовали голубой декстран с молекулярной массой 2 000 000 (Fluka), а полный объем колонки определяли по объему элюирования ацетона (осч).

Для приготовления элюентов использовали KH_2PO_4 (хч), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ (фарм), NaN_3 (хч), NaCl (хч) и метанол квалификации "для ВЭЖХ".

Для калибровки колонки в качестве образцов сравнения использовали полистиролсульфонаты натрия (ПСС) с ММ в пике 2,29; 4,48; 14; 20,7; 45,1 и 80,84 КДа, Polymer Standard Service (Mainz, Germany). Их полидисперсность не превышала 1,2.

Бескарбонатную воду для кальциево-ацетатного и баритового методов готовили кипячением дистиллированной воды в течение 1 часа. После кипячения воду хранили в сосуде, изолированном от атмосферного углекислого газа.

Для потенциометрического титрования готовили стандартный раствор NaOH (0,095 М) из фиксанала.

Для кальциево-ацетатного метода использовали $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (хч). Навеску $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ растворяли в 500 мл бескарбонатной дистиллированной воды для приготовления 0,25М раствора ацетата кальция. Полученный раствор имел рН 8. Раствор ацетата кальция хранили герметично закрытым в холодильнике ($\sim 5^\circ\text{C}$). Для титрования уксусной кислоты готовили стандартный раствор NaOH (0,095 М) из фиксанала.

Для баритового метода использовали BaO (хч). Навеску BaO растворяли в дистиллированной воде для приготовления насыщенного раствора $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ($\sim 0,2$ М). Полученный раствор оставляли на 2-3 дня для осаждения карбонатов, декантировали его с осадка и разбавляли бескарбонатной дистиллированной водой для приготовления рабочего раствора $\text{Ba}(\text{OH})_2$ с концентрацией $\sim 0,03$ М. Стандартный раствор HCl (0,100 М) готовили из фиксанала.

Гель-хроматографическое фракционирование проводили на хроматографической системе Abimed. Система включала в себя: ВЭЖХ насос, автосамплер, стеклянную колонку ($\varnothing 25$ мм, L = 20 см), спектрофотометрический УФ-детектор, плату АЦП для регистрации аналитического сигнала и регистрирующего компьютера. Колонку заполняли гелем “Тоуорепарл” TSK HW-55S (Toso-Haas, Япония) с диапазоном фракционирования 1000-200 000 Да по полидекстранам.

Дистиллированная вода высокой степени очистки готовилась с использованием системы водоподготовки Millipore Simplicity 185.

Взвешивание образцов проводили на аналитических весах Scaltec SPB31.

Для растворения препаратов при снятии ЯМР ^{13}C спектров использовали NaOD и D_2O изотопной чистоты 99+% фирмы Aldrich

Для растворения твердых образцов ГК использовали ультразвуковую баню Sonorex super RK102H.

Элементный состав препаратов ГФК определяли на элементном C, H, N анализаторе фирмы Carlo Erba Strumentazione (Италия), модель – 1106.

pH растворов измеряли с помощью pH-метра 713 pH Meter (Metrohm, Швейцария), оснащенного универсальным стеклянным электродом.

Центрифугирование проводили на центрифуге ОПн-8УХЛ4.2.

Перемешивание проводили на электрической ротационной мешалке (30 об./мин. макс.).

Потенциометрическое титрование проводили на автотитраторе Metrohm модели 716 DMS Titrino (Metrohm, Швейцария), оснащенном стеклянным электродом.

Спектры ЯМР ^{13}C регистрировали на спектрометре Aspect 3000 (Bruker, Германия).

2.2. Техника эксперимента

Методика гель-хроматографического фракционирования.

Приготовление элюентов. Для гель-хроматографического фракционирования препаратов гумусовых кислот в работе использовали восемь элюентов. Их составы приведены в табл. 5, расчет навесок проводили в соответствии со справочными данными [40]. Соответствующие навески компонентов элюента растворяли в дистиллированной воде высокой степени очистки. Затем в течение 45 минут дегазировали под вакуумом с помощью водоструйного насоса. Метанол добавляли в элюент после дегазации.

Для подавления роста микрофлоры на 2 л элюента каждый раз добавляли по 0,3 г азиды натрия.

Приготовление растворов препаратов ГФК для анализа. Растворы препаратов ФК готовили по навеске растворением в элюенте. Образцы ГК предварительно растворяли в небольшом количестве 0,1 М NaOH. Концентрация препаратов в пробе составляла 100 мг/л. Растворы низкомолекулярных кислот готовили аналогично препаратам ФК с концентрацией кислот в пробе 100 мг/л.

Проба объемом 1 мл автоматически отбиралась и поступала в систему, затем проходила через колонку и на выходе из нее детектировалась. Аналитический сигнал регистрировали спектрофотометрически при $\lambda=254$ нм, чувствительность детектора составляла 0,01 у.е. от полной шкалы, скорость потока элюента – 1 мл/мин.

Состав элюентов, использованных в работе

Молярность и состав элюента	Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O, г/л	KH ₂ PO ₄ , г/л	NaCl, г/л
pH 6,8			
0,01 ФБ	1,1	0,9	–
0,03 ФБ	3,0	2,5	–
0,03 ФБ +5%(об.) MeOH	3,0	2,5	–
0,05 ФБ	5,4	4,5	–
0,03 ФБ +0,1 NaCl = 0,13	3,0	2,5	5,8
0,01 ФБ +0,05 NaCl = 0,06	1,1	0,9	2,9
0,01 ФБ +0,1 NaCl = 0,11	1,1	0,9	5,8
pH 6,0			
0,03	0,7	3,3	

Методика определения сильнокислотных групп Са-ацетатным методом. Для определения сильнокислотных групп в гуминовых препаратах использовали модифицированный Са-ацетатный метод [41].

Навеску твердого ГК~20 мг помещали в полипропиленовые центрифужные пробирки емкостью ~42 мл, добавляли 20 мл воды, растворяли в ультразвуковой бане в течение двух часов. Затем добавляли 20 мл рабочего раствора ацетата кальция с концентрацией около ~0,5М, герметично закрывали, встряхивали, перемешивали в течение 2 часов на электрической ротационной мешалке, переворачивающей сосуда, оставляли для полноты осаждения гуматов кальция на 24 часа в холодильнике (~5°C). Центрифугировали в течение 10 минут при 5 тыс. об./мин. Декантировали супернатант. Отбирали 10 мл и проводили потенциметрическое титрование выделившейся уксусной кислоты раствором NaOH точно установленной концентрации (0,095М) на автотитраторе. Для учета гидролиза Са(ОАс)₂ в условиях титрования проводили контрольное титрование раствора с указанной концентрацией Са(ОАс)₂, но в отсутствие ГК. Типичная кривая титрования приведена на рис. 3.

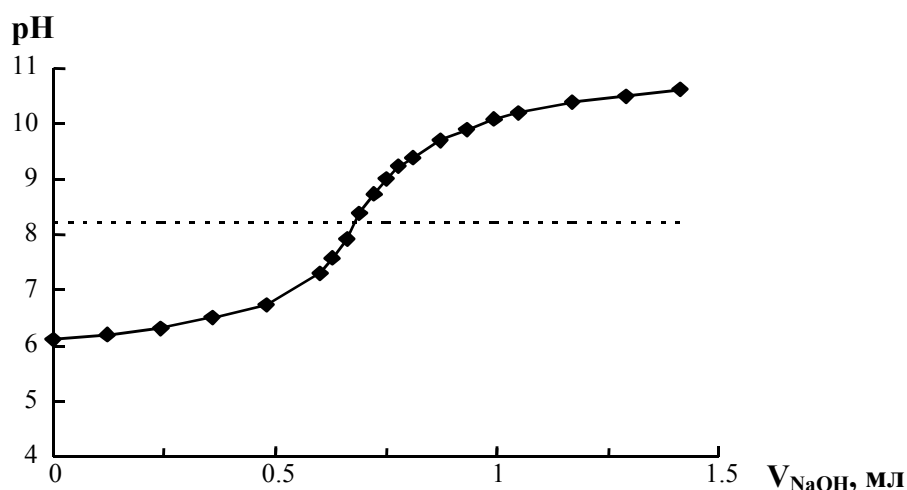


Рис. 3. Типичная кривая титрования уксусной кислоты для Са-ацетатного метода.

Точку перегиба определяли с помощью предусмотренного алгоритма автотитратора. Содержание сильнокислотных групп в образцах гумусовых кислот и их производных (ммоль/г) рассчитывали по следующей формуле:

$$C_{\text{COOH}} = \frac{(V_{\text{NaOH}} - V_0) \cdot C_{\text{NaOH}}}{V_A} \cdot 100 \quad [42]$$

V_{NaOH} – объем щелочи, пошедшей на титрование выделившейся AcOH , мл;

V_0 – объем щелочи, пошедший на титрование $\text{Ca}(\text{AcO})_2$ в холостом опыте, мл;

V_A – объем аликвоты, мл;

C_{NaOH} – концентрация щелочи, моль/л;

C_{COOH} – содержание COOH -групп в твердом препарате ГК, ммоль/г.

Методика определения общей кислотности баритовым методом. Для определения общего содержания кислотных групп в гуминовых препаратах использовали баритовый метод [41].

Навеску сухого образца ГК массой примерно 20 мг помещали в центрифужную пробирку из полипропилена объемом ~ 42 мл, добавляли 20 мл воды и помещали для растворения в ультразвуковую баню на час. Затем добавляли 20 мл рабочего раствора гидроксида бария с ~ 0,02 М концентрацией, герметично закрывали и помещали в электрическую ротационную мешалку на 6 часов. Для полноты осаждения гуматов бария образцы оставляли на 24 часа в холодильнике при температуре ~ 5°C. После этого пробирки центрифугировали при 5 000 об./мин в течение 10 минут. Раствор декантировали с осадка, отбирали аликвоту 10 мл и

проводили визуальное титрование стандартным 0,1 М раствором HCl по фенолфталеину. Параллельно проводили холостое титрование раствора, содержащего такое же количество гидроксида бария и дистиллированную воду вместо раствора ГК.

Общее содержание кислотных групп рассчитывали по формуле:

$$T_A = \frac{(V_0 - V_{HCl}) \cdot C_{HCl}}{m} \quad [43]$$

где:

T_A – общая кислотность, ммоль/г;

V_0 – объем HCl, израсходованный на титрование холостого раствора, мл;

V_{HCl} – объем HCl, израсходованный на титрование образца, мл;

C_{HCl} – концентрация HCl; ммоль/мл;

m – масса твердого вещества ГК в аликвоте, г.

Методика получения рК-спектров. Для прямого потенциометрического титрования использовали растворы препаратов ФК с концентрацией 1 г/л, что обеспечивало хорошую воспроизводимость кривых титрования и рассчитанных по ним рК-спектров.

Для всех исследуемых препаратов ФК были получены кривые прямого потенциометрического титрования в бессолевых растворах.

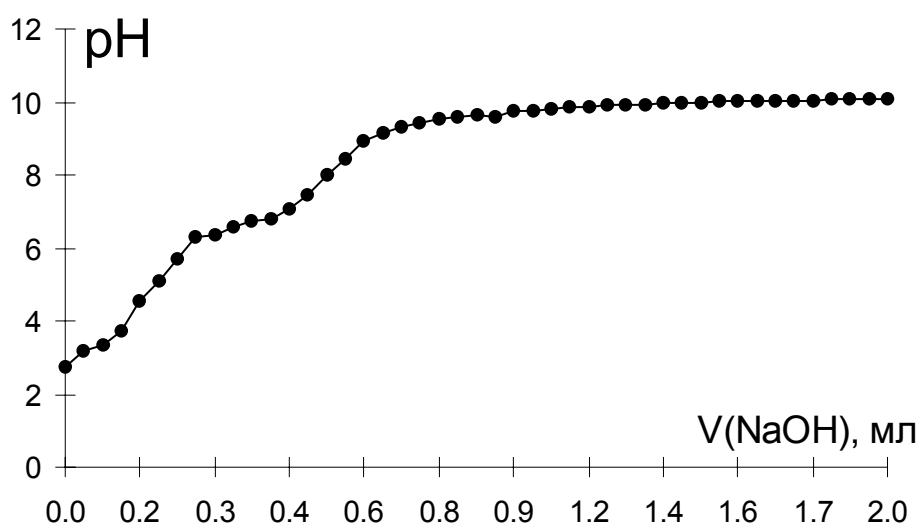


Рис. 4. Типичная кривая прямого потенциометрического титрования.

Как видно, на кривой титрования наблюдаются два слабовыраженных перегиба, по-видимому, соответствующих, последовательной нейтрализации карбоксильных и фенольных групп.

Для получения рК-спектров использовали компьютерную программу, которая позволяет рассчитывать как суммарную концентрацию ионогенных групп, так и доли ионогенных групп с константами K_i (q_i). Расчет основан на использовании линейного МНК с ограничениями на неотрицательность решения. В качестве исходных данных использовали значения объема титранта и соответствующие значения рН во всех точках кривой титрования, а также начальный объем титруемого раствора V_0 и концентрацию титранта C_T . Набор значений рК от 1 до 12 с шагом 1 был задан априори.

Содержание карбоксильных и фенольных гидроксильных групп из рК-спектра определяли, суммируя доли групп с $pK \leq 7$ и $pK \geq 7$, соответственно.

Методики проведения элементного анализа. Определение С,Н,Н в препаратах гумусовых кислот проводили методом автоматического полумикроанализа. В качестве образца сравнения использовали ацетанилид. Зольность препаратов определяли путем их сжигания при 950-1000°C в течение часа.

Методика проведения ЯМР экспериментов. Спектры ^{13}C ГК регистрировали в 5-мм ЯМР-ампуле на приборе Bruker Aspect 3000 при рабочей частоте 100 МГц. Ширина развертки спектра составляла около 26000 Гц, время регистрации сигнала спада свободной индукции (ССИ) 0,6 с, интервал между импульсами (T_d) 8 с, при ширине импульса 90° , длительность накопления спектра 72 часа. При регистрации был использован внешний стандарт MeOH/D₂O ($\delta = 49,0$ м.д.). Навеску препарата 50-70 мг растворяли в 0,7 мл 0,3М NaOD. Фурье-преобразование выполнялось с предварительным экспоненциальным взвешиванием сигнала ССИ с константой времени, эквивалентной уширению линий 35 Гц. Регистрацию спектров проводили в Институте Экологической Химии (GSF, Германия).

2.3. Обработка гель-хроматограмм

Для обработки эксклюзионных хроматограмм гумусовых кислот использовали оригинальное программное обеспечение “Geltreat”, разработанное А.В. Кудрявцевым [44]. “Geltreat” позволяет в интерактивном режиме:

1. Импортировать данные из файла данных бинарного формата (RBF) использованного программно-аппаратного гель-хроматографического комплекса, кроме того, из текстового (TXT, DOS или Windows) и из файла данных собственного формата (SEC).

2. Производить предварительную обработку кривых элюирования (сглаживание, коррекция нулевой линии, устранение артефактов, определение положения пика, необходимые трансформации и т.д.).

3. Рассчитывать калибровочную зависимость.

4. Рассчитывать молекулярно-массовое распределение (ММР) и его параметры.

5. Рассчитывать численные характеристики (дескрипторы) кривых распределения.

6. Сохранять наборы обрабатываемых хроматограмм и кривых распределения в виде файла данных и манипулировать их содержанием (копировать, удалять, переименовывать, сортировать по различным признакам и т.д.), хранить дополнительную информацию, относящуюся к данной хроматограмме (кривой распределения). В частности, название препарата, краткий комментарий, имя исходного файла данных, дату и время, значения “истинных” M_n , M_w , M_n , M_{peak} (например, для гель-хроматографических стандартов). Все это позволяет удобно обрабатывать и хранить большие блоки данных.

7. Графически представлять хроматографические кривые и кривые ММР, калибровочную зависимость. Копировать графическое и текстовое (в виде пар значений отсчет – отклик) представление кривых в сторонние программы текстовой и графической обработки информации. Выводить на печатающее устройство список хроматограмм из текущего файла данных с выбранными характеристиками, текущую или выбранные из списка хроматограммы и/или соответствующие ММР.

Полученные хроматограммы подвергали следующей обработке: сглаживали, проводили коррекцию нулевой линии, устраняли артефакты, определяли положение

пика. Сохранялись хроматограммы в виде файлов с дополнительной информацией к ним относящейся (название препарата, краткий комментарий, дата и время получения и т.д.). Для стандартных образцов рассчитывали калибровочные зависимости, по которым затем рассчитывали молекулярно-массовые характеристики препаратов.

Для определения полноты выхода препаратов ГФК из колонки и количества вещества, сорбируемого на геле, проводили их бесколоночное определение. Вещества пропускались через детектор, минуя колонку. Интеграл полученного хроматографического пика соответствовал 100%-ному выходу вещества из колонки. Затем его сопоставляли с интегралом хроматограммы, регистрируемой при прохождении образца того же объема и концентрации через колонку, и рассчитывали полноту выхода вещества из колонки.

2.3. Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных была проведена для результатов определения общей и карбоксильной кислотности, молекулярных масс и полидисперсности. Воспроизводимость полученных данных характеризовали стандартным отклонением:

$$s = \sqrt{\frac{(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

где x_i – отдельное значение, \bar{x} – среднее всех x_i , n – общее число измерений.

Погрешность определения характеризовали относительным стандартным отклонением:

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$$

Стандартное отклонение для значений полидисперсности, представляющих собой отношение двух величин (M_w к M_n), определяемых на основе одного и того же градуировочного графика, рассчитывали как сумму s для данных величин.

3. Результаты и их обсуждение

3.1. Характеристика препаратов

Выборка препаратов ГФК включала в себя восемь препаратов ГК и ФК, выделенных из угля, торфа и чернозема. Выбранные препараты отличались как по содержанию кислотных групп, так и по гидрофобности. Препараты с большей гидрофобностью должны больше подвергаться эффекту специфической адсорбции. В табл. 6. приведены результаты элементного анализа.

Таблица 6

Элементный состав препаратов гумусовых кислот, использованных в работе, в расчете на беззольную пробу

Препарат ГФК	Содержание, % масс	Содержание элементов, % масс.				Атомные соотношения	
		С	Н	N	O	H/C	O/C
препараты ГК и ФК угля							
CHA-Pow	9,0	62,7	4,4	1,0	31,9	0,84	0,38
CHA-GL-02	3,5	59,1	3,6	3,0	34,3	0,73	0,44
CFA-GL-02	5,0	49,6	3,8	1,8	44,8	0,92	0,68
препараты ГК и ФК торфа							
PNA-SK3-00	17,7	33,9	3,1	2,1	60,9	1,10	1,35
PFA-SK3-00	2,5	46,2	4,1	2,1	47,6	1,06	0,77
препараты ГК и ФК почв							
SHA-Pp-96	21,2	47,8	5,4	4,9	41,9	1,36	0,66
SHA-Cm-98	1,2	60,7	2,7	4,4	31,2	0,54	0,39
SFA-Pw-96	8,4	51,9	4,3	2,0	41,8	0,99	0,60

Косвенным показателем гидрофобности ГФК служит атомное соотношение H/C, характеризующее степень ненасыщенности (или ароматичности) препаратов: чем оно меньше, тем больше вклад гидрофобного ароматического каркаса в структуру ГФК, и тем более гидрофобным является препарат. Как видно из таблицы, наиболее гидрофобными являются ГК и ФК угля, а также ГК чернозема. Атомное соотношение O/C можно рассматривать как меру окисленности препаратов. По нему можно судить, для каких препаратов вклад кислородосодержащих групп максимальный. Из таблицы видно, что всех ФК соотношение O/C выше, чем для

препаратов ГК. Из общих закономерностей выпадают результаты элементного анализа для ГК торфа. Полученное содержание кислорода намного превосходит типичные значения для этого источника происхождения ГК. Это может быть связано с артефактами, возникающими при выделении препарата, например, его загрязнением продуктами гидролиза целлюлозных остатков торфа.

Помимо элементного анализа, все препараты были охарактеризованы методом ^{13}C ЯМР спектроскопического анализа, который позволяет определить распределение углерода между основными структурными фрагментами ГФК. Результаты приведены в табл. 7.

Таблица 7

Распределение углерода по структурным группам
в препаратах гумусовых кислот по данным ^{13}C ЯМР спектроскопии

Образец	Доля структурной группы, % от общего количества углерода						
	C_{Alk}	$\text{C}_{\text{Alk-O}}$	$\text{C}_{\text{Ar-H,R}}$	$\text{C}_{\text{ArO-H,R}}$	$\text{C}_{\text{COO-H,R}}$	$\text{C}_{\text{C=O}}$	$\Sigma\text{C}_{\text{Ar}}/\text{C}_{\text{Alk-O}}^*$
CHA-Pow	15,2	8,5	46,7	11,4	13,2	5,0	6,84
CHA-GL02	10,2	9,7	44,4	11,2	17,6	7,0	5,73
CFA-GL-02	20,0	12,1	30,6	6,5	25,0	5,7	3,07
PHA-Sk3-00	24,5	16,6	24,8	6,3	19,1	8,7	1,87
SHA-Pp-96	17,0	21,0	32,0	12,0	16,0	2,0	2,10
SHA-Cm-98	9,1	15,5	51,5	6,0	15,9	2,0	3,71
SFA-Pw-96	25,0	18,0	22,0	12,0	20,0	4,0	1,89

$$^*\Sigma\text{C}_{\text{Ar}} = \text{C}_{\text{ArO-H,R}} + \text{C}_{\text{Ar-H,R}}$$

По данным ^{13}C ЯМР спектроскопии тоже можно косвенно оценить гидрофобность препаратов, для этого необходимо рассчитать соотношение содержания углерода в составе гидрофобных ароматических и гидрофильных кислород-замещенных алифатических фрагментов. Из приведенных данных видно, что наиболее высокие значения рассчитанных соотношений наблюдается для обоих ГК угля, затем следуют ГК чернозема, ФК угля, и гораздо меньшие значения характерны для ФК почв, что согласуется с данными элементного анализа. Как и в случае элементного анализа, результаты для ГК торфа выпадают из общего ряда. Полученные результаты позволяют предположить, что для наиболее гидрофобных препаратов ГК и ФК угля, а также для ГК чернозема можно ожидать более

выраженных эффектов специфической сорбции, чем для препаратов ФК и ГК дерново-подзолистых почв и ФК торфа.

Помимо этого, препараты были охарактеризованы титриметрическими методами анализа. Определение карбоксильной кислотности (A_{COOH}) ГФК проводили путем заместительного титрования CH_3COOH , выделившейся при действии избытка ацетата кальция на препарат. Определение суммарного содержания кислотных групп (ТА) в препаратах ГФК проводилось путем обратного титрования избытка гидроксида бария, не прореагировавшего с кислотами. Содержание фенольных кислотных групп (A_{ArOH}) рассчитывали по разности общей и карбоксильной кислотности. Результаты титриметрического анализа приведены в табл. 8.

Таблица 8

Содержание кислотных групп в исследованных препаратах ГФК по данным титриметрического анализа

Препарат	Общая кислотность (ТА)		A_{COOH}		ТА- $A_{\text{COOH}} = A_{\text{ArOH}}$
	$C_{\text{cp}} \pm \Delta C^*$	$\varepsilon^{**}, \%$	$C_{\text{cp}} \pm \Delta C$	$\varepsilon, \%$	
CHA-Pow	5,8±0,5	8,6	2,9±0,1	3,4	2,9 ^{***}
CHA-GL02	6,7±0,1	1,5	3,9±0,2	5,1	2,8
CFA-GL-02	9,3±0,1	1,1	6,3±0,1	1,6	3,0
PHA-Sk300	2,8±0,1	3,6	1,7±0,3	17,6	1,1
PFA-Sk300	8,7±0,1	1,1	4,4±0,1	2,3	4,3
SHA-Pp-96	3,1±0,2	6,5	2,9±0,1	3,4	0,2
SHA-Cm98	6,7±0,3	4,8	5,8±0,4	6,9	0,9
SFA-Pw-96	9,6±0,1	1,0	4,2±0,1	2,4	5,4

* ΔC – доверительный интервал (ммоль/г).

** ε – относительная погрешность (%).

*** – значения фенольной кислотности рассчитывали по разности двух экспериментально определяемых параметров, поэтому погрешность определения данной величины не приводится.

Из таблицы видно, что препараты ФК почв, угля и торфа содержат наибольшее количество кислородосодержащих групп. Полученные значения общей кислотности хорошо согласуются с литературными. Так, для ФК почв общая кислотность лежит в диапазоне от 9 до 14 [2], ГК почв – от 1,5 до 4,7 мэкв/г [6]. Карбоксильная кислотность для ГК угля лежит в пределах от 2,0 до 3,6 мэкв/г [7], а для ГК торфа – от

2,3 до 4,6 [12]. В силу более высокого содержания кислотных групп, ФК характеризуются повышенной плотностью заряда, поэтому они в большей степени могут подвергаться эффекту сверхэксклюзии, чем препараты ГК.

3.2. Выбор эксклюзионных условий гель-хроматографического фракционирования гумусовых кислот

Для определения молекулярно-массового состава гумусовых кислот был выбран метод эксклюзионной хроматографии, позволяющий получить информацию не только о средних ММ, но и о молекулярно-массовом распределении гумусовых кислот. Наряду с несомненными достоинствами метода, подробно обсужденными в обзоре литературы, его применение к анализу любых полиэлектролитов и гумусовых кислот в частности, сопряжено с опасностью появления артефактов – так называемых неэксклюзионных эффектов. Поэтому особое внимание в нашей работе было обращено на определение эксклюзионных условий анализа гумусовых кислот, а также выбор адекватной калибровочной кривой для расчета ММР.

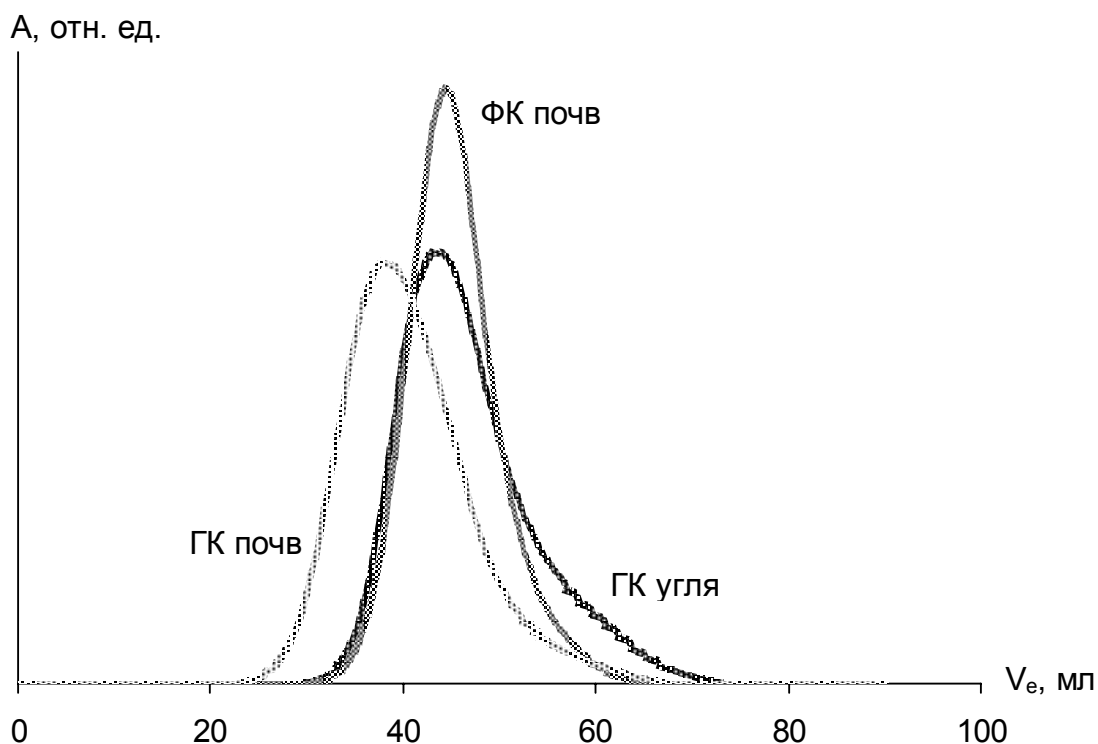


Рис. 5. Типичные гель-хроматограммы препаратов ГК различного происхождения и фракционного состава, полученные в 0,03М фосфатном буфере.

Все полученные в ходе работе хроматограммы характеризовались мономодальным типом распределения. На рис. 5 приведены типичные хроматограммы гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава, полученные в сходных условиях элюирования (0,03М фосфатный буфер). Из рисунка видно, что препараты ГК и ФК почв существенно различаются по молекулярной массе: при более низких значениях объема элюирования выходят ГК почв, тогда как ФК почв – при гораздо более высоких значениях. Это согласуется с известным положением о том, что ГК представляют собой высокомолекулярную фракцию гумусовых кислот, а ФК – низкомолекулярную. Особо следует отметить, что ГК угля выходят при объеме элюирования ФК почв, что говорит о более низких значениях ММ ГК угля по сравнению с ГК почв.

Поскольку условия элюирования менялись, то в ходе работы параметры колонки могли измениться. Для устранения зависимости получаемых гель-хроматографических характеристик от геометрических параметров колонки объема элюирования пересчитывали в коэффициенты распределения. Расчет проводили по следующему соотношению:

$$K_d = \frac{V_R - V_0}{V_t - V_0}$$

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

Так как для расчета коэффициентов распределения использовали объемы элюирования голубого декстрана с молекулярной массой 2×10^6 Да, а общий объем колонки определяли по ацетону (58 Да), то представляло интерес проанализировать изменение данных характеристик в зависимости от условий элюирования.

Для выявления характера неэксклюзионных эффектов, определяемых типом взаимодействия аналита с гелем, фракционирование проводили с использованием различных составов элюентов при неизменности всех остальных параметров (размер колонки, количество вводимого раствора и скорость элюирования). Всего в работе было использовано восемь составов элюентов. При их создании варьировали следующие параметры: рН, ионную силу и соотношение вода-органический растворитель. Последний параметр изменяли путем добавления в водный элюент органического растворителя.

Требуемое значение рН и его постоянство в процессе фракционирования достигали за счет использования буферной смеси. Требуемую ионную силу элюента создавали как за счет изменения концентрации компонентов буферной смеси, так введением фонового электролита (NaCl). Состав и обозначения элюентов приведены в табл. 9. В этой же таблице указаны значения объемов элюирования для голубого декстрана и ацетона.

Таблица 9

Значения объемов элюирования для ацетона и голубого декстрана для различных составов буфера

Обозначение элюента	Ионная сила, М	Объем элюирования ацетона, мл	Объем элюирования голубого декстрана, мл	Поровый объем колонки, мл
0,01М	0,016	76,5	18,6	57,0
0,03М, рН 6,0	0,03	75,3	19,3	56,0
0,03М, рН 6,8	0,044	75,1	18,7	56,4
0,03М + 5% MeOH	0,044	76,6	19,4	57,2
0,05М	0,08	75,2	18,9	56,3
0,06М	0,066	75,6	19,5	56,1
0,11М	0,115	75,1	20,2	54,9
0,13М	0,143	75,6	19,9	55,7

Как видно, увеличение ионной силы элюента приводило лишь к незначительному уменьшению порового объема колонки: для граничных значений – 0,016 и 0,143М – оно не превышало 3 % отн. Поэтому для расчета коэффициентов распределения проводили усреднение значений объемов элюирования голубого декстрана и ацетона по всем сериям экспериментов, и использовали средние значения – 19,3 и 75,6 мл, соответственно.

3.2.1. Подавление эффекта сверхэксклюзии

Как уже отмечалось в обзоре литературы, наиболее распространенными подходами для устранения эффекта сверхэксклюзии являются изменение ионной силы элюента и рН. В данной работе использовались оба эти подхода.

3.2.1.1. Влияние ионной силы элюента на гель-хроматографическое поведение гумусовых кислот и их низкомолекулярных аналогов

Изменение ионной силы элюента, как и следовало ожидать, вызывало существенное изменение гель-хроматографических характеристик ГФК. На рис. 6 представлены хроматограммы всех исследованных препаратов ГФК для элюентов с различной ионной силой.

Как видно из приведенных гель-хроматограмм, положение максимума кривой элюирования существенно зависит от ионной силы элюента. Это свидетельствует о проявлении эффекта сверхэксклюзии при фракционировании всех исследованных препаратов гумусовых кислот. При этом минимальные значения K_d и, следовательно, максимальный эффект сверхэксклюзии характерен для элюента с ионной силой 0,016М. Проявление данного эффекта обусловлено электростатическим взаимодействием между карбоксильными группами ГФК и отрицательно заряженными участками геля. Так, минимальные значения K_d наблюдается для образцов ГФК, обладающих высокой карбоксильной кислотностью (ГК и ФК угля, ФК торфа и почв).

Чтобы установить значение ионной силы элюента, способствующей максимальной компенсации эффекта сверхэксклюзии, для всех препаратов были построены зависимости значения коэффициента распределения в максимуме кривой элюирования от ионной силы элюента.

Графики полученных зависимостей для ФК и ГК различного происхождения приведены на рис. 7 и 8, соответственно.

Из рис. 7 видно, что для всех препаратов ФК наблюдается сходный характер полученных зависимостей. По мере увеличения ионной силы элюента, значение коэффициента распределения растет, а при достижении ионной силы 0,066М выходит на плато и не изменяется вплоть до 0,143М – максимального значения ионной силы, использованного в работе. Данный характер зависимости свидетельствует о том, что для исследованных препаратов ФК происходит компенсации эффектов сверхэксклюзии при использовании элюентов с ионной силой 0,08М и выше. Для препаратов ГК, в целом, соблюдаются закономерности, отмеченные для ФК. При этом зависимость выходит на плато при 0,066М.

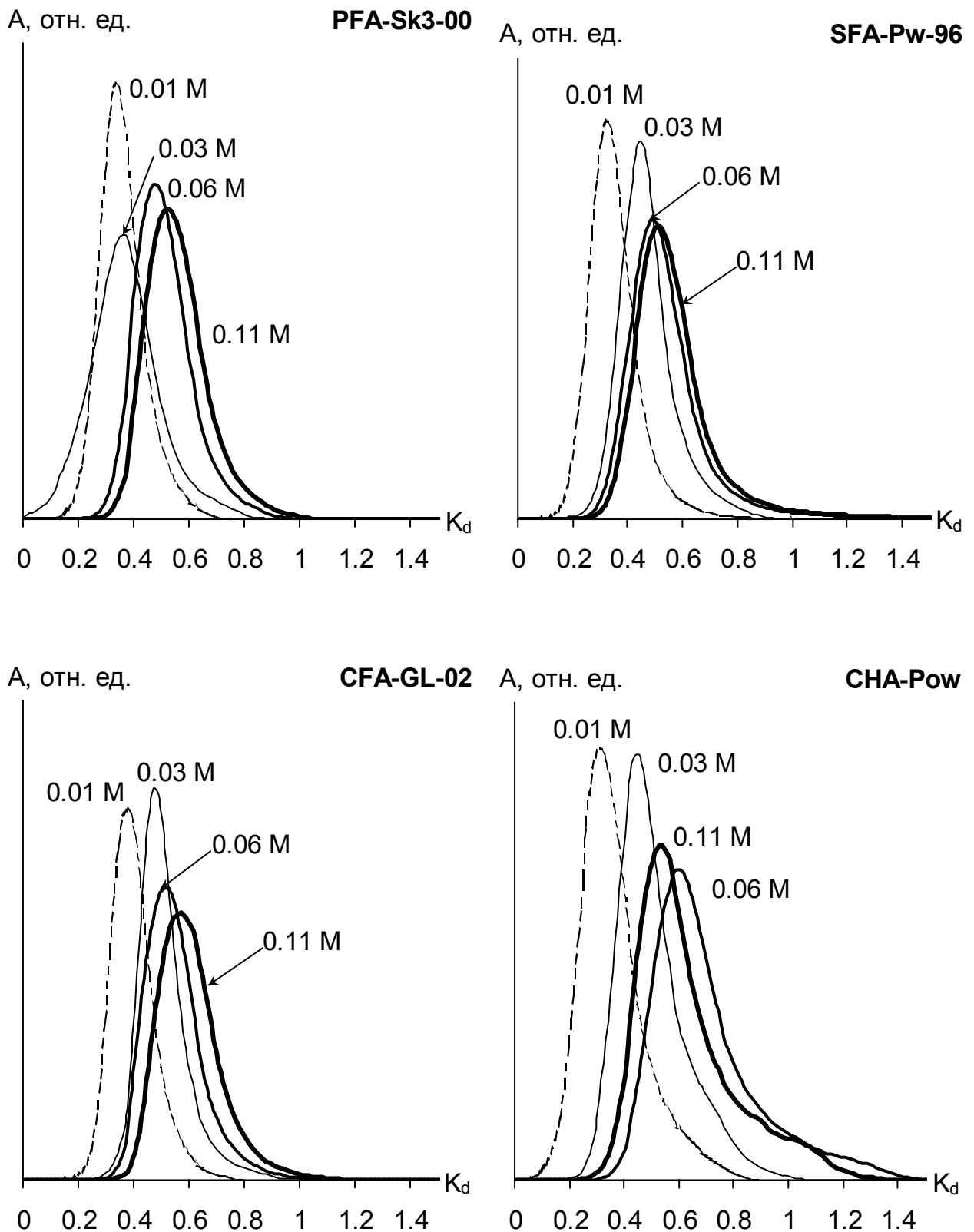


Рис. 6а. Гель-хроматограммы препаратов ФК угля, торфа и почв, полученные для элюентов различного состава.

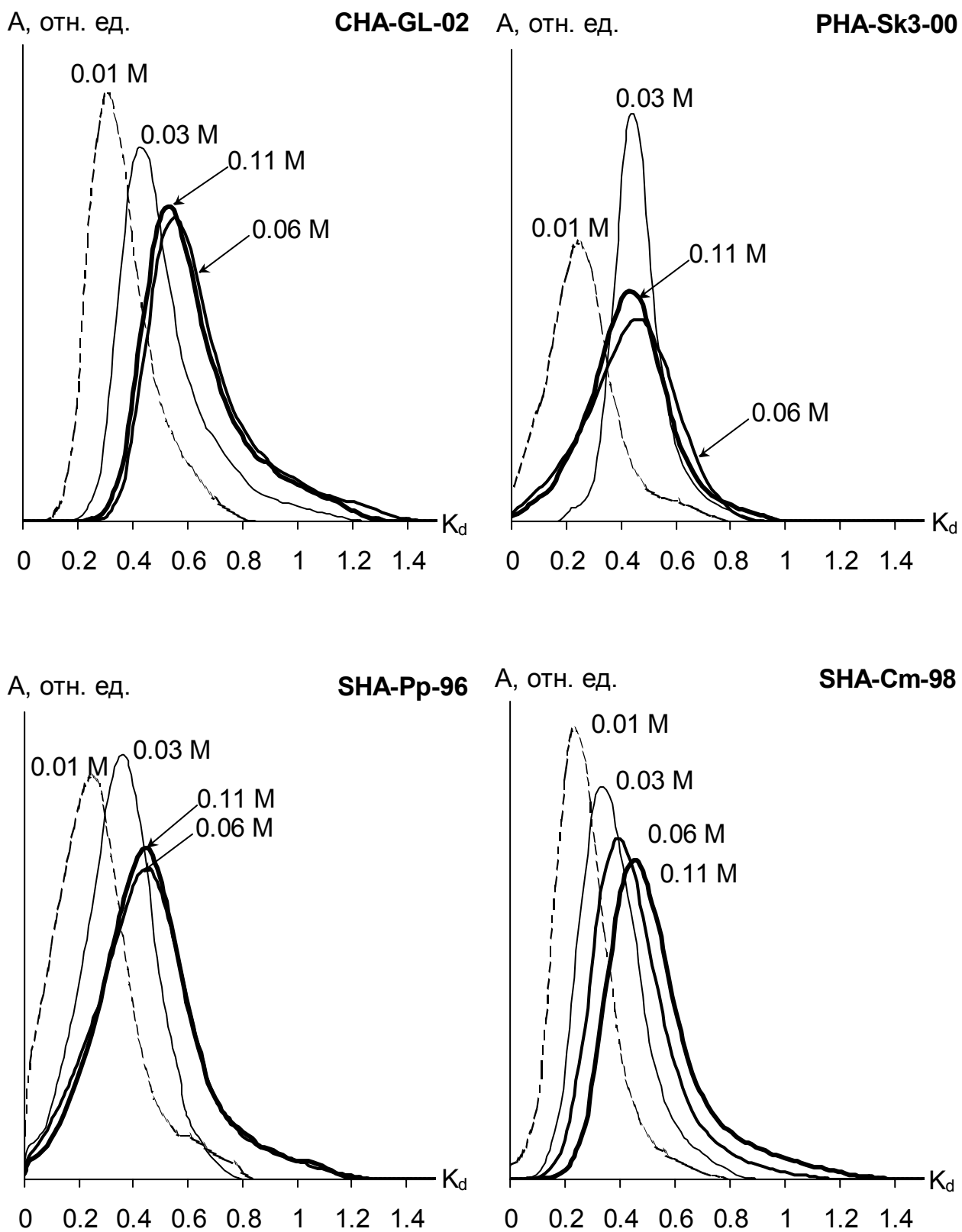


Рис. 36. Гель-хроматограммы препаратов ГК почв, угля и торфа, полученные для элюентов различного состава.

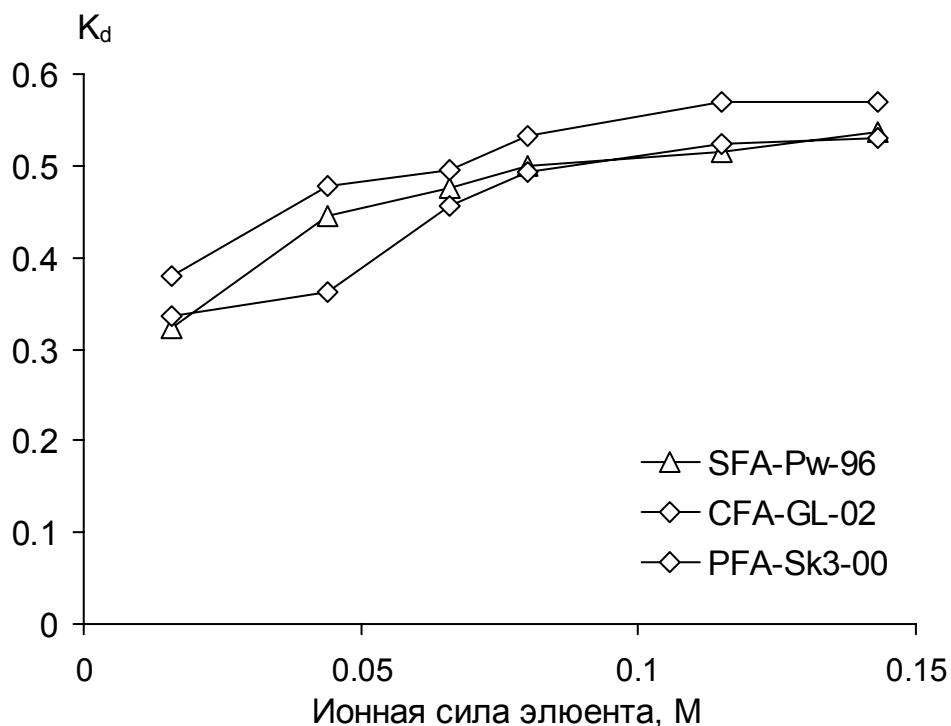


Рис. 7. Зависимость коэффициентов распределения фульвокислот различного происхождения от ионной силы элюента.

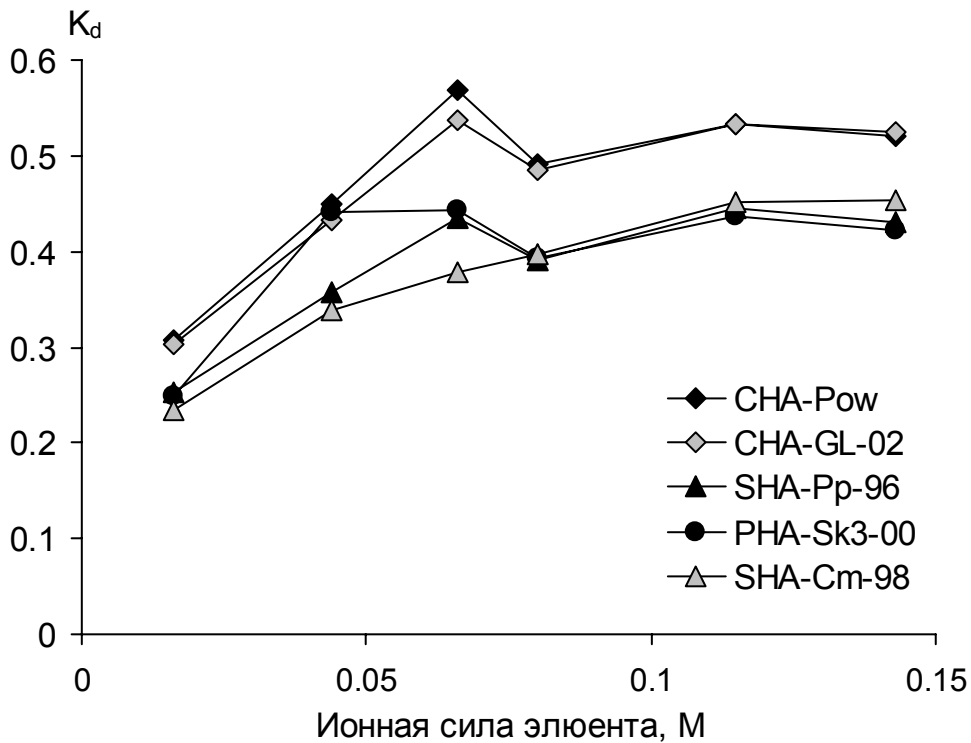


Рис. 8. Зависимость коэффициентов распределения гуминовых кислот различного происхождения от ионной силы элюента.

Анализ характера кривых элюирования ГФК (рис 8), полученных при высоких значениях ионной силы (0,115М) показывает, что в этих условиях возрастают сорбционные взаимодействия аналита с гелем. Так, для хроматограмм характерно наличие вытянутого заднего фронта. Особенно сильно этот эффект проявляется для ГК, структура которых обогащена гидрофобными ароматическими и алкильными фрагментами по сравнению с препаратами ФК.

Для количественной оценки асимметричности полученных хроматограмм рассчитывали параметр скошенности [44]. В табл. 10 представлены значения скошенности для препаратов ГФК для разных составов элюентов. Для симметричных пиков значение скошенности должно быть равно нулю. Если оно положительное, то задний фронт хроматограммы растянут, если значение отрицательное, значит, растянутым является передний фронт хроматограммы.

Таблица 10

Значения параметра скошенности для препаратов ГФК

Препараты	Элюент					
	0,01М	0,03М	0,05М	0,06М	0,11М	0,13М
СНА-Pow	1,23	0,70	0,98	1,15	1,06	1,33
СНА-GL02	0,98	0,80	1,12	1,19	1,07	1,21
СФА-GL-02	1,01	1,08	0,94	1,01	0,79	1,24
РНА-Sk300	0,63	0,01	0,16	-0,16	0,12	0,18
РФА-Sk300	0,74	1,10	0,79	0,83	0,76	0,64
ША-Pp-96	0,80	0,14	0,10	0,59	0,56	0,41
ША-Cm98	0,87	0,82	0,95	0,91	1,28	0,71
СФА-Pw-96	0,81	0,42	0,85	0,96	0,92	1,09

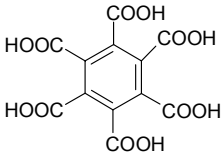
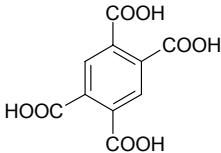
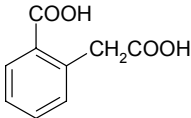
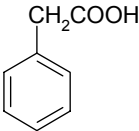
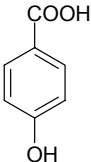
Из полученных значений скошенности можно сделать вывод, что практически все хроматограммы исследованных препаратов гумусовых кислот характеризуются высокой асимметричностью для всех исследованных составов элюента. При этом для них характерна затянутасть заднего фронта хроматограмм, что свидетельствует о наличии специфической сорбции ГФК на геле.

В целях более полной интерпретации полученных данных, в указанных выше условиях определения проводили фракционирование низкомолекулярных

органических кислот, которые можно рассматривать как структурные фрагменты ГФК. Список исследованных соединений и рассчитанные значения их карбоксильной кислотности приведены в табл. 11.

Таблица 11

Низкомолекулярные органические кислоты – структурные аналоги ГФК, использованные в работе, и их карбоксильная кислотность

Соединение	Формула	Карбоксильная кислотность, ммоль/г
меллитовая кислота		18
пиромеллитовая кислота		16
гомофталевая кислота		11,4
фенилуксусная кислота		7,6
4-гидроксибензойная кислота		6,8

Для них проводились те же самые определения, что и для гуминовых веществ. На рис 9. представлена зависимость коэффициентов распределения от ионной силы электролита.

Для низкомолекулярных веществ наблюдается тот же характер зависимостей, что и для гумусовых кислот. Плато достигается при ионной силе элюента 0,066М. Для высокозаряженных меллитовой и пиромеллитовой кислот подавить эффект сверхэксклюзии не удалось: их значение коэффициентов распределения практически не изменилось. Фенилуксусная кислота, которая по своему строению близка к гуминовым веществам, выходит на плато в таком же диапазоне, как и препараты

ГФК. Для 4-гидроксibenзойной кислоты наблюдается преобладание вклада сорбционных взаимодействий над электростатическими, что обусловлено сильной склонностью данного препарата к образованию водородной связи с матрицей геля.

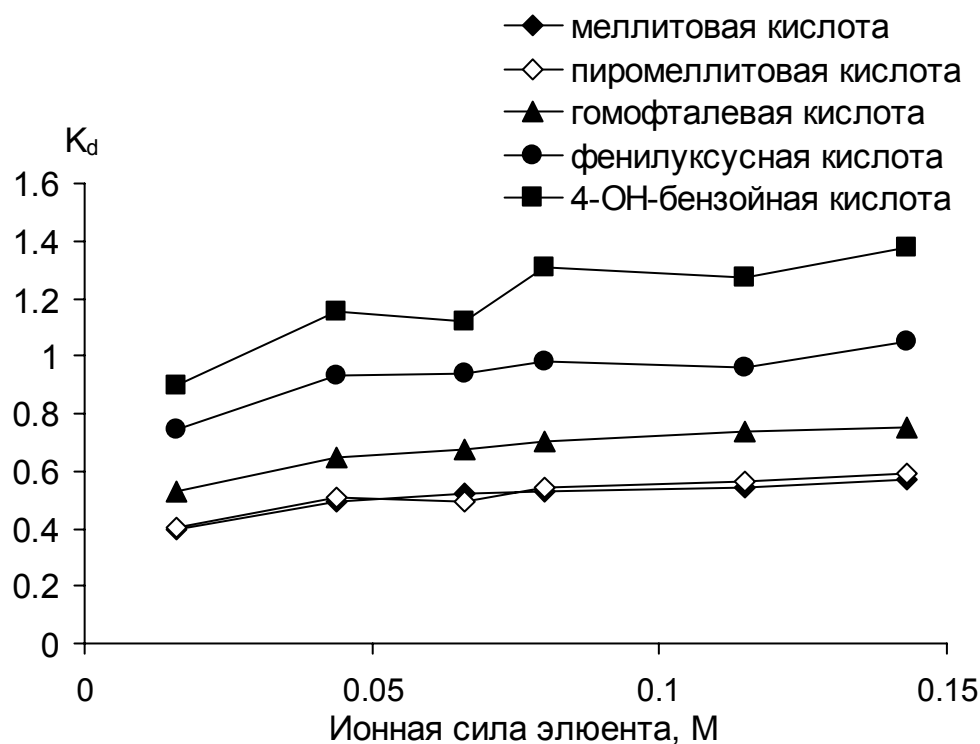


Рис. 9. Зависимость коэффициентов распределения органических кислот от ионной силы элюента.

Рассмотрев влияние изменения ионной силы элюента на коэффициенты распределения гумусовых кислот и низкомолекулярных соединений, можно рекомендовать в качестве оптимальной ионную силу элюента в диапазоне от 0,066 до 0,115М.

3.2.1.2. Влияние рН элюента на гель-хроматографическое поведение гумусовых кислот и их низкомолекулярных аналогов

Еще одним подходом для устранения эффекта сверхэксклюзии является изменение рН элюента. Понижение рН приводит к уменьшению степени диссоциации карбоксильных групп, что может приводить к ослаблению эффектов сверхэксклюзии. Результаты фракционирования гумусовых кислот и их низкомолекулярных аналогов при использовании буфера с одинаковой ионной силой, но с разным рН – 6,0 и 6,8, приведены на рис. 10 и 11, соответственно.

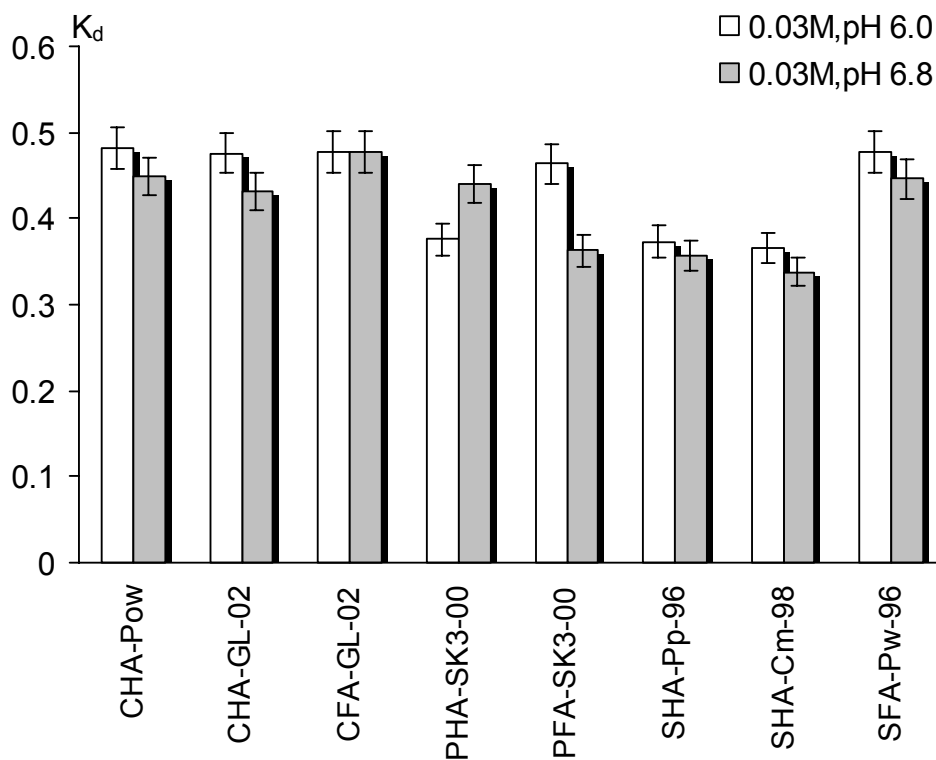


Рис. 10. Влияние pH элюента на коэффициенты распределения гумусовых кислот.

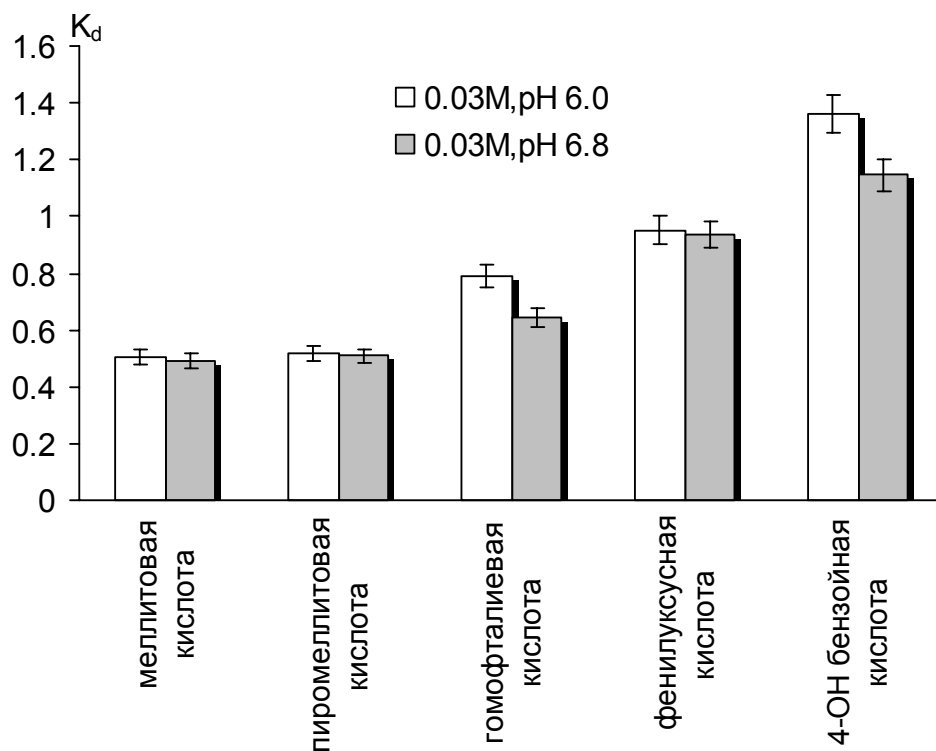


Рис. 8. Влияние pH элюента на коэффициенты распределения низкомолекулярных аналогов гумусовых кислот.

Для гумусовых кислот наблюдается некоторое увеличение коэффициентов распределения с уменьшением рН, что говорит об уменьшении эффекта сверхэксклюзии. Однако почти для всех образцов оно незначительно. Поэтому трудно отдать предпочтение какому-то одному из указанных рН. Фракционирование можно проводить как при рН 6.0, так и рН 6.8.

Для низкомолекулярных соединений следовало бы ожидать изменения коэффициентов распределения для меллитовой и пиромеллитовой кислот, так как они содержат большее количество карбоксильных групп. Однако для них не наблюдается никакого изменения. Для 4-гидроксибензойной и гомофталевой кислот коэффициенты распределения увеличиваются, но это может быть связано с их возрастающей адсорбцией на геле по мере уменьшения рН. Поэтому изменение рН элюента не принесло ожидаемых результатов для низкомолекулярных соединений.

3.2.2. Подавление эффекта специфической адсорбции

Для оценки специфической адсорбции исследованных препаратов гумусовых кислот на геле определяли полноту их элюирования с гель-хроматографической колонки. Для этого проводили бесколоночное определение гумусовых кислот, пропуская образцы через детектор, минуя колонку. Тем самым полностью исключается взаимодействие гумусовых кислот с гелем, поэтому можно считать, что интеграл полученного хроматографического пика соответствуют 100%-ному выходу образца из колонки. Сопоставляя его с интегралом хроматограммы, регистрируемой при прохождении образца того же объема и концентрации через колонку, можно определить полноту выхода и, соответственно, количество вещества, сорбированного на колонке. Результаты определения полноты выхода всех исследованных препаратов гумусовых кислот при использовании 0,03М элюента приведены на рис. 12. На этом же рисунке приведены результаты аналогичных определений, выполненных при использовании 0,03М элюента, содержащего 5% об. метанола. Модификация элюента органическим растворителем является приемом, широко используемым для подавления эффекта специфической адсорбции в гель-хроматографии полиэлектролитов.

Как видно из рис. 12, полнота выхода исследованных препаратов гумусовых кислот с хроматографической колонки варьирует в диапазоне 20-90%. Самые низкие значения характерны для наиболее гидрофобных препаратов ГК угля и торфа (20-

40%). Значения в диапазоне 40-50% наблюдаются для ГК почв и ФК угля. Максимальный выход с колонки (90%) наблюдается для ФК торфа. Характер изменения полноты выхода гумусовых кислот с колонки хорошо согласуется с гидрофобностью препаратов: наименьшие значения наблюдаются для наиболее гидрофобных препаратов ГК угля, максимальное – для наиболее гидрофильного препарата ФК торфа.

Определение полноты выхода исследованных препаратов гумусовых кислот в присутствии метанола показало, что введение органического растворителя в состав элюента лишь незначительно увеличило полноту выхода ГФК с колонки. Уменьшение объема выхода с колонки в присутствии метанола, наблюдаемое для ГК почв, по-видимому, является выпавшей точкой эксперимента. Полученные результаты демонстрируют низкую эффективность использованного способа подавления эффектов специфической сорбции. Это может быть связано с существенным вкладом водородного связывания в сорбционные взаимодействия гумусовых кислот с гелем, которые не устраняются при введении метанола в выбранную хроматографическую систему.

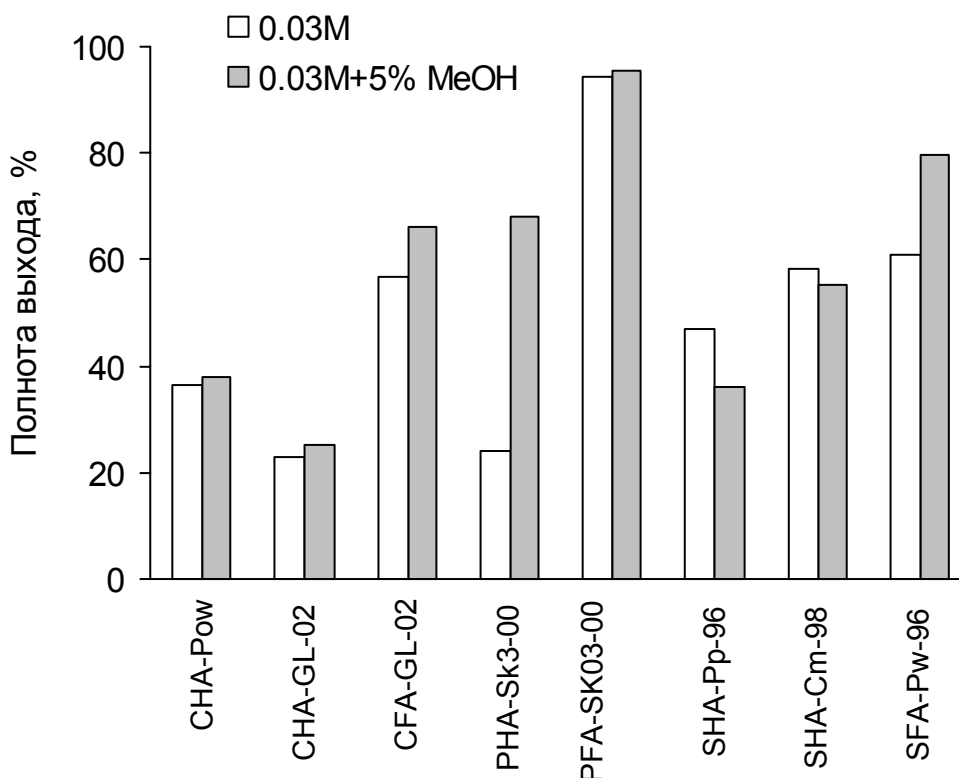


Рис. 12. Полнота выхода препаратов гумусовых кислот с гель-хроматографической колонки при использовании 0.03 М элюента без и с добавлением метанола (5% об).

Сделанный вывод подтверждается и результатами фракционирования исследованных препаратов гумусовых кислот при использовании описанного выше элюента, модифицированного метанолом (рис. 13). Так, вопреки ожидаемому уменьшению коэффициентов распределения при введении метанола, наблюдается их некоторое увеличение почти для всех образцов, кроме ГК торфа. Скорее всего, это связано с тем, что сорбционные взаимодействия между гелем колонки и аналитом обусловлены не гидрофобным, а водородным связыванием, поэтому метанол не может в полной мере устранить эти взаимодействия. По-видимому, более подходящим модификатором элюента для устранения специфической сорбции ГФК на геле является мочевины, которая снимает водородные взаимодействия.

Введение метанола также не оказало видимого воздействия и на гель-хроматографическое поведение низкомолекулярных органических кислот – структурных аналогов ГФК. Соответствующие результаты приведены на рис 14.

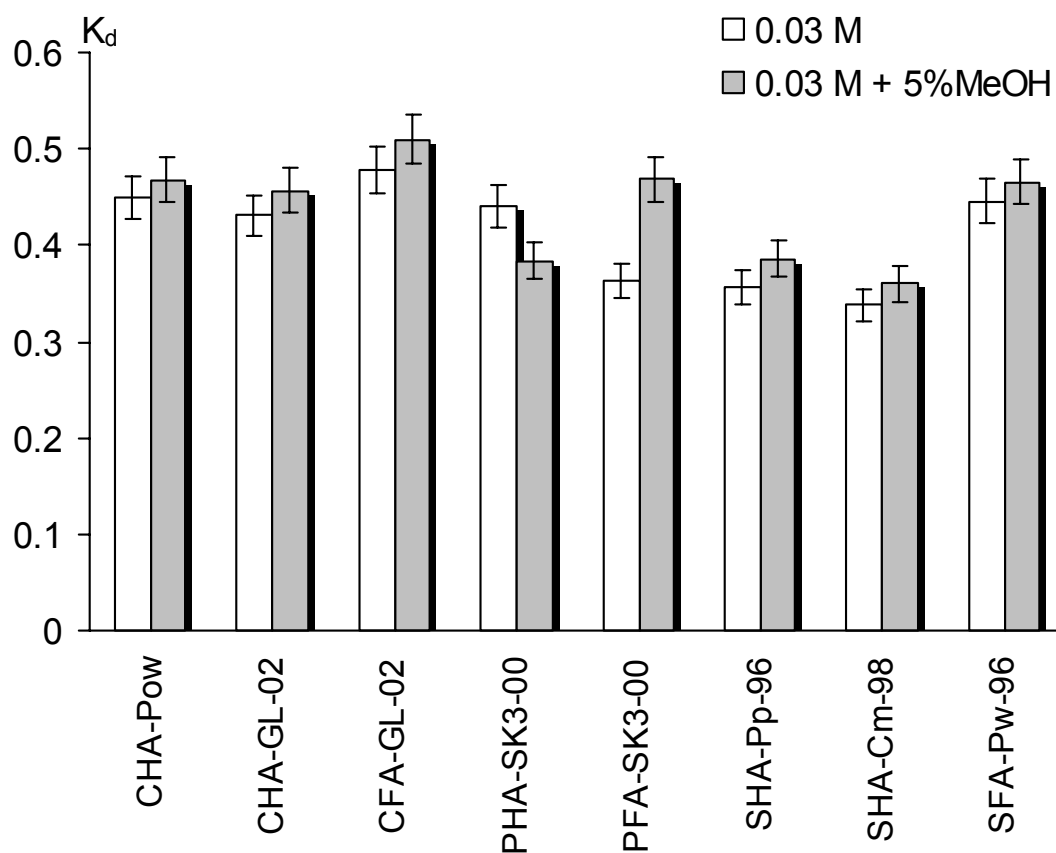


Рис. 13. Влияние модификации элюента метанолом на коэффициенты распределения гумусовых кислот.

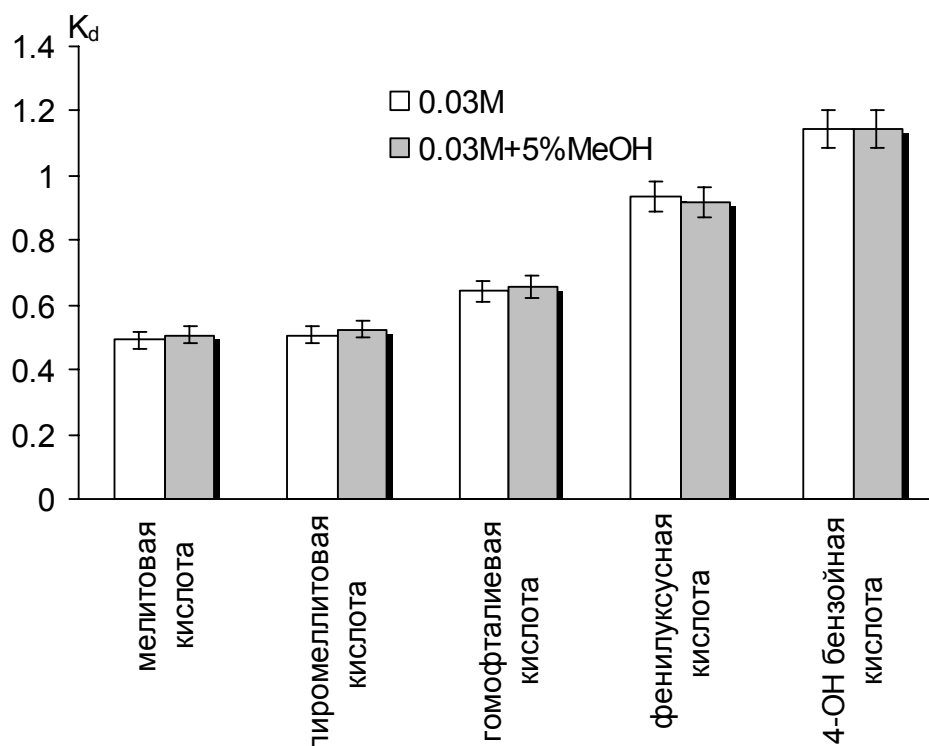


Рис. 14. Влияние метанола на коэффициенты распределения низкомолекулярных соединений.

Таким образом, можно сделать вывод, что оптимальным диапазоном ионной силы элюента, обеспечивающим подавление эффектов сверхэксклюзии при фракционировании гумусовых кислот, является 0,066-0,143М. Уменьшение рН буфера до 6,0 при сохранении постоянной ионной силы элюента и введение метанола не оказывают существенного влияния на гель-хроматографическое поведение гумусовых кислот. Поэтому можно работать при любом из указанных значений рН. Использование метанола для подавления специфической адсорбции гумусовых кислот на геле неэффективно. Для этой цели необходимо использовать органический модификатор, подавляющий образование водородных связей аналита с гелем, – например, мочевины.

3.3. Расчет характеристик молекулярно-массового распределения гумусовых кислот

3.3.1. Определение оптимальной градуировочной зависимости

В связи с тем, что эксклюзионная хроматография представляет собой не абсолютный, а относительный метод определения ММ, то весьма важным и необходимым этапом анализа является калибровка хроматографической колонки. Сложности осуществления этой процедуры для определения ММР гумусовых кислот,

связанные с отсутствием адекватных образцов сравнения, обсуждались в обзоре литературы. В нашей работе в качестве стандартов для калибровки колонки использовались полистиролсульфонаты (ПСС), плотность заряда которых наиболее близка к карбоксильной кислотности ГФК. Молекулярные массы калибровочных веществ составляли: 4480, 14000, 20700, 45100 и 80840 Да.

ПСС, будучи синтетическими полиэлектролитами, также могут вступать в электростатические и сорбционные взаимодействия с гелем при гель-хроматографическом фракционировании. При этом в силу различия строения ПСС и гумусовых кислот, характер их неэксклюзионных эффектов может существенно различаться. Поэтому для всех составов элюентов, использованных для фракционирования гумусовых кислот, были получены гель-хроматограммы для ПСС. Характер изменения хроматограмм, полученных для ПСС с различной молекулярной массой, был весьма схожим. Поэтому на рис. 15 приведены типичные хроматограммы ПСС (на примере ПСС с $M_p = 14000$ Да) при фракционировании в элюентах различного состава.

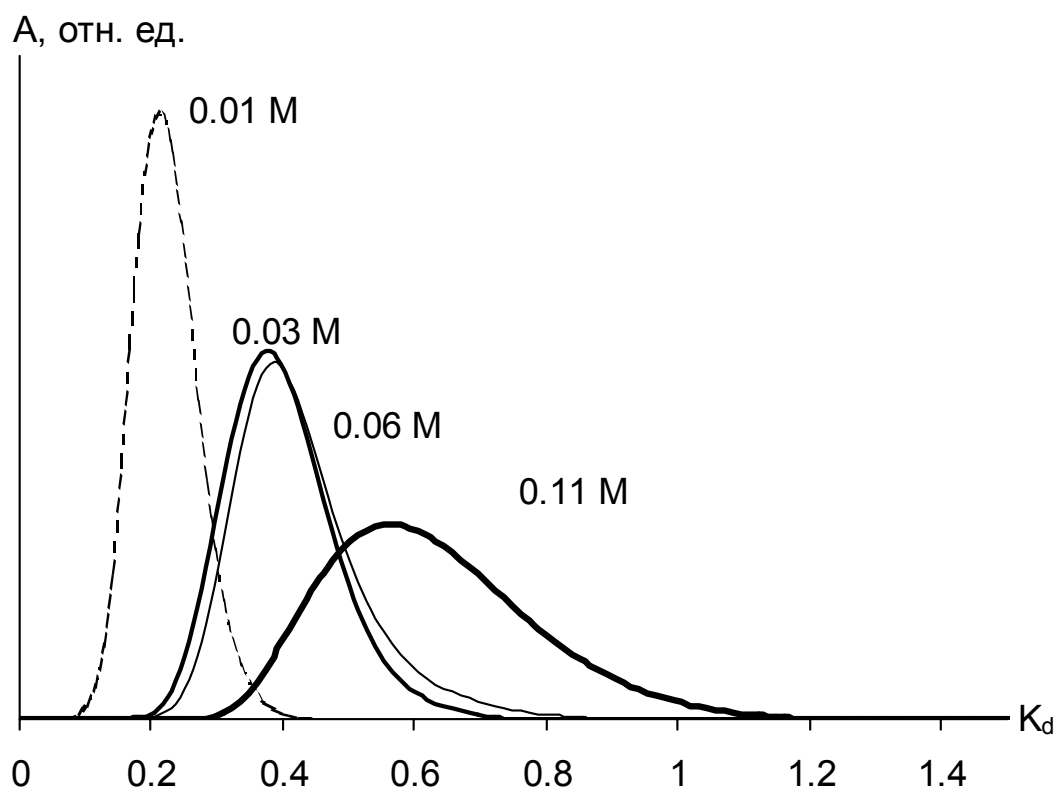


Рис. 15. Гель-хроматограммы полистиролсульфоната с $M_p = 14000$ Да, полученные для элюентов различного состава при pH 6.8.

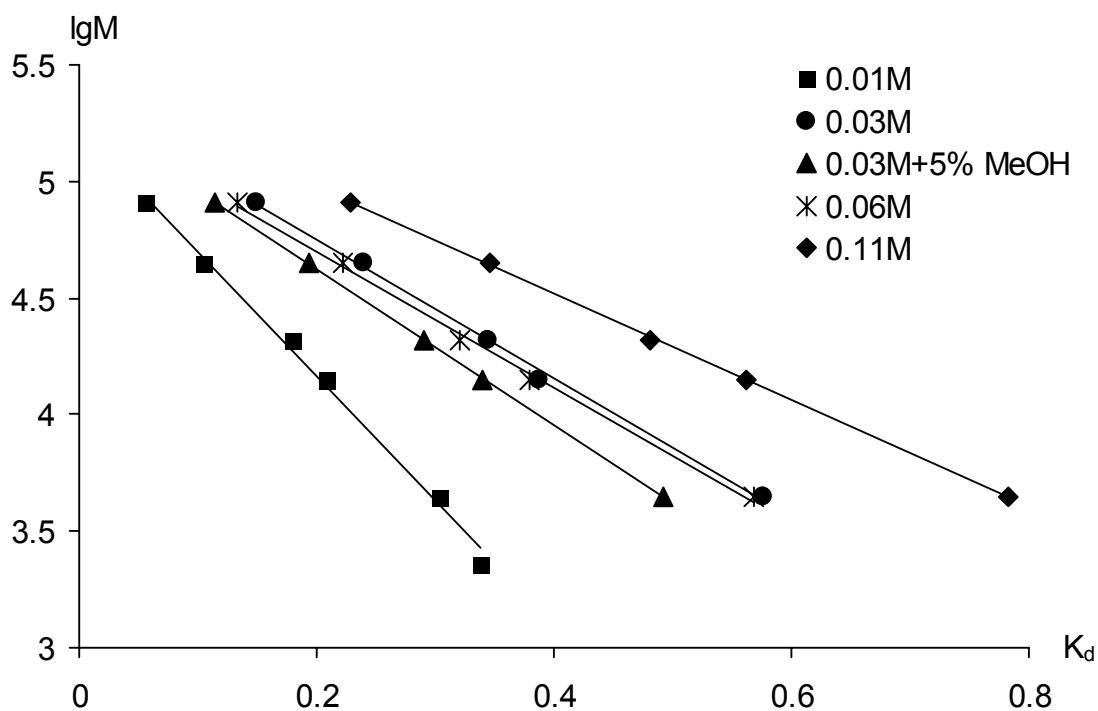


Рис. 16. Градуировочные графики, рассчитанные по ПСС для разных составов элюентов.

Из рис. 15 видно, что по мере увеличения ионной силы элюента, происходит увеличение коэффициентов распределения ПСС и уширение хроматографического пика. При достижении ионной силы 0,115M хвост хроматографического пика выходит за пределы общего объема колонки, что говорит о существенном эффекте специфической сорбции в данных условиях фракционирования. Следовало ожидать, что калибровочные кривые, рассчитанные по приведенным кривым элюирования стандартных образцов, также будут существенно различаться. Полученные градуировочные графики приведены на рис. 16.

Уравнения градуировочных графиков и соответствующие значения коэффициентов корреляции приведены в табл. 12.

Как видно из рис. 16, полученные градуировочные графики имеют разный угол наклона: чем меньше концентрация электролита, тем больше угол наклона. Поэтому можно говорить о том, что с увеличением ионной силы элюента происходит компенсация электростатических взаимодействий и эффект сверхэксклюзии подавляется. Использование указанных градуировочных графиков для расчета численных характеристик ММ будет приводить к существенно различным значениям

ММ. Поэтому до расчета кривых ММР гумусовых кислот необходимо было определить условия эксклюзионного фракционирования ПСС.

Таблица 12

Уравнения градуировочных графиков, рассчитанные по ПСС, и значения коэффициентов корреляции для различных составов элюентов

Состав элюента	Уравнение градуировочного графика	Коэффициент корреляции R^2
0,01М	$\lg M = -5,33 \times K_d + 5,23$	0,9941
0,03М	$\lg M = -2,98 \times K_d + 5,34$	0,9965
0,03М + 5% MeOH	$\lg M = -3,34 \times K_d + 5,29$	0,9998
0,06М	$\lg M = -2,92 \times K_d + 5,28$	0,9967
0,11М	$\lg M = -2,28 \times K_d + 5,43$	0,9995

Для этого строили зависимости коэффициентов распределения каждого калибровочного стандарта от ионной силы элюента. Полученные графики приведены на рис. 17. Обращает на себя внимание существенное различие характера показанных зависимостей от полученных для гумусовых кислот.

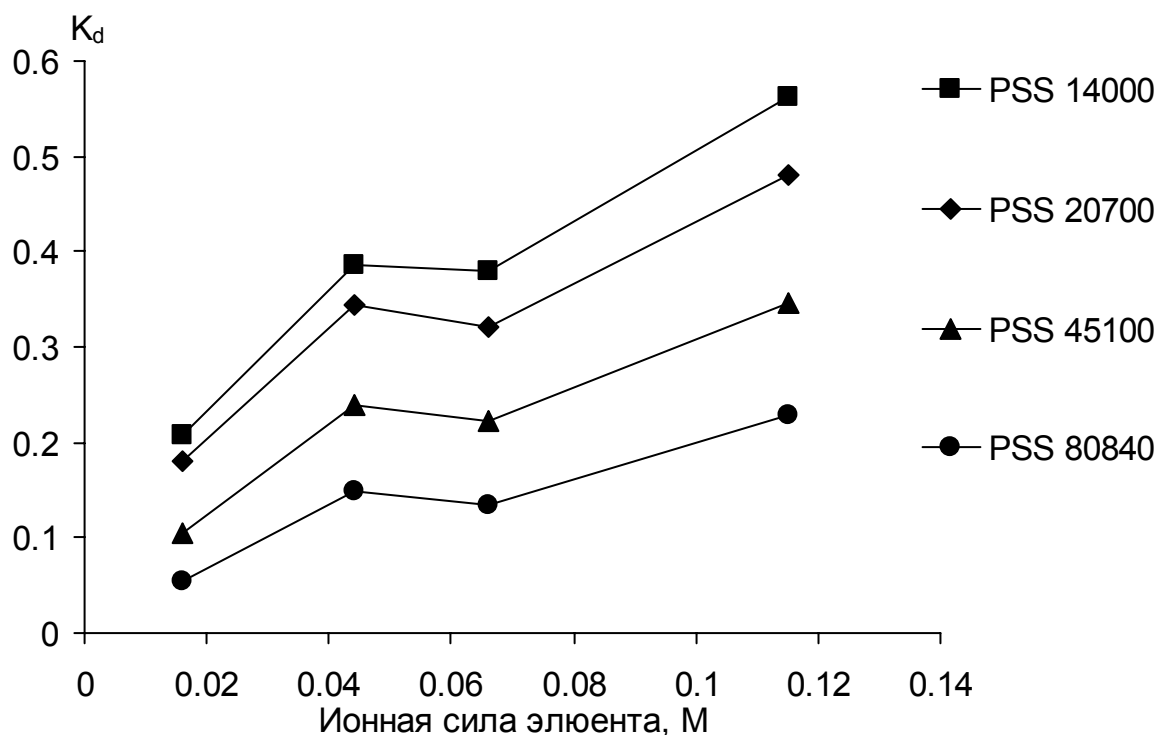


Рис. 17. Зависимость коэффициентов распределения полистиролсульфонатов от ионной силы элюента.

Как и в случае фракционирования ГФК, минимальные значения K_d для всех ПСС наблюдаются при самой низкой ионной силе элюента – 0,016М. При возрастании ионной силы зависимость выходит на плато при 0,044М в отличие от гумусовых кислот, где выход на плато достигался при 0,066-0,08М. Самым существенным отличием является возрастание значений K_d при дальнейшем повышении ионной силы элюента.

Полученный характер зависимости говорит о том, что в диапазоне 0,044-0,066М наблюдается компенсация эффекта сверхэксклюзии. Возрастание коэффициентов распределения при дальнейшем увеличении ионной силы говорит о значительном эффекте специфической сорбции ПСС в данных условиях фракционирования. Это главное отличие в поведении полистиролсульфонатов и гумусовых кислот. Оно обусловлено существенным различием структурно-группового состава данных соединений.

Сопоставление диапазонов ионной силы элюента, в которых наблюдается компенсация эффектов сверхэксклюзии для ПСС и гумусовых кислот, позволяет выбрать единственное значение ионной силы – 0,066М, при котором достигается почти полная компенсация сверхэксклюзионных эффектов для гумусовых кислот, и еще не проявляются эффекты специфической сорбции для ПСС. На этом основании расчет ММ характеристик гумусовых кислот проводили по калибровочной кривой, полученной при ионной силе элюента 0,066М.

3.3.2. Расчет молекулярно-массовых характеристик гумусовых кислот

Молекулярно-массовые распределения (ММР) всех исследованных препаратов гумусовых кислот приведены на рис. 18.

Количественные характеристики молекулярно-массового распределения приведены в табл. 13.

Как видно из полученных данных, диапазон изменения M_w исследованных препаратов гумусовых кислот различного фракционного состава и происхождения составил от 3 до 20 кДа, а M_w/M_n — от 1,5 до 6,6. Воспроизводимость единичного определения M_w довольно высокая – 6%, M_n – 11%, M_p – 5%, M_z – 9%. При этом по величине M_w препараты расположились в следующий ряд: ГК почв, торфа > ФК почв, торфа > ГК, ФК угля. Полученные значения согласуются с литературными данными о значениях средневесовых ММ для ГК торфа [29]. Для ГФК почв и угля значения ММ

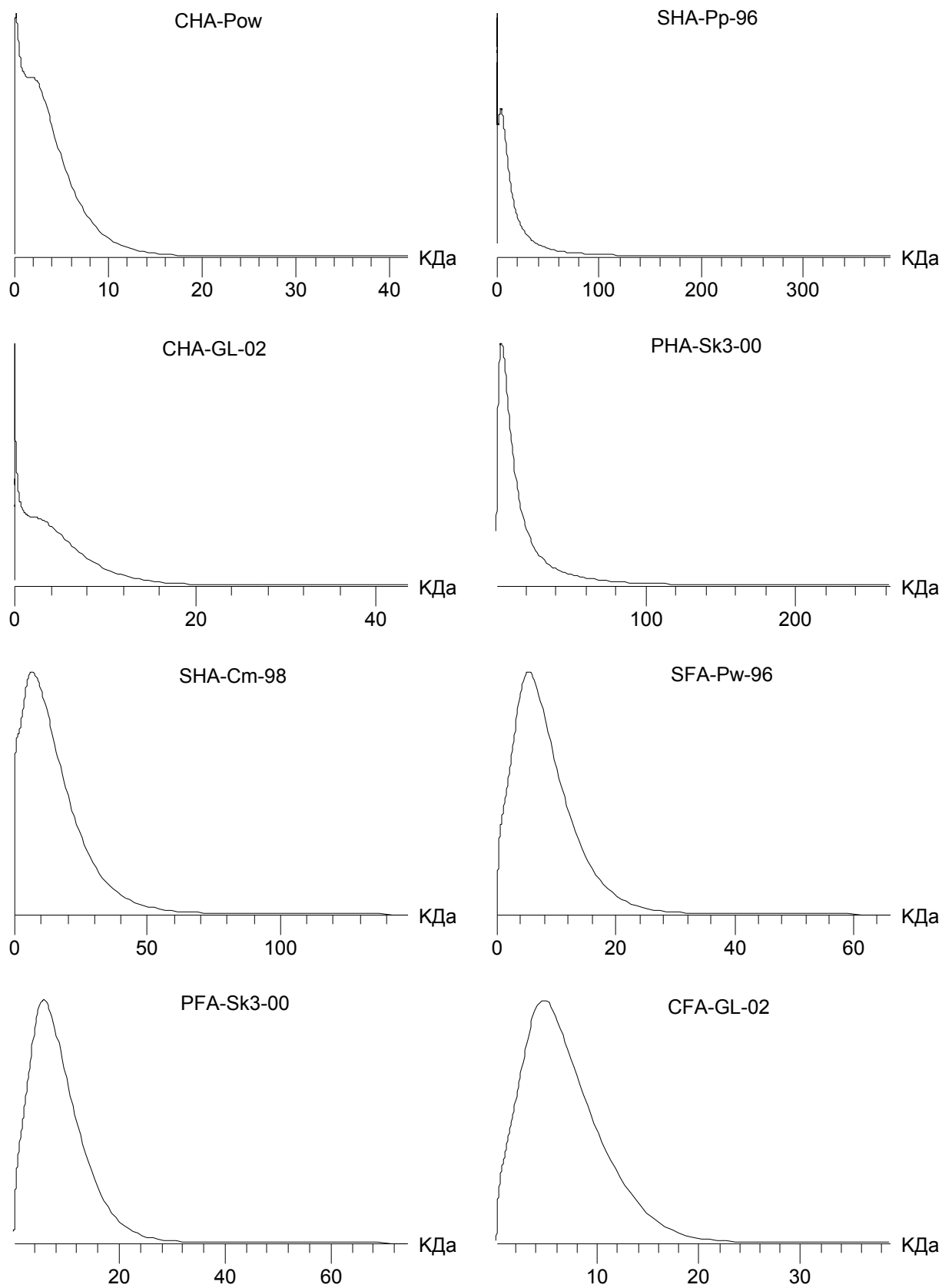


Рис. 18. Молекулярно-массовое распределение исследуемых гумусовых кислот, рассчитанное по градуировочному графику ПСС при ионной силе элюента 0,066М.

различаются, но в литературе приводятся значения ММ, рассчитанные с использованием в качестве стандартных образцов белков и полидекстранов, что ограничивает возможность их сопоставления с данными, полученными в нашей работе.

Таблица 13

Молекулярно-массовые характеристики исследованных гумусовых кислот

Препараты	M_p , кДа	M_w , кДа	M_z , кДа	M_n , кДа	M_w/M_n
CHA-Pow	3,6±0,2	3,2±0,2	5,7±0,5	0,6±0,01	5,4±0,9
CHA-GL-02	7,9±0,4	7,0±0,4	11,7±1,1	2,1±0,03	3,4±0,6
CFA-GL-02	5,8±0,3	5,6±0,3	7,3±0,7	3,7±0,4	1,5±0,3
PHA-Sk3-00	8,5±0,4	18,7±1,1	51,7±4,7	6,2±0,7	3,0±0,5
PFA-Sk3-00	7,7±0,4	7,7±0,5	10,6±0,9	4,6±0,5	1,7±0,3
SHA-Pp-96	9,1±0,5	19,9±1,2	63,5±5,7	3,0±0,3	6,6±1,1
SHA-Cm-98	13,4±0,7	13,8±0,1	23,3±2,1	5,2±0,6	2,6±0,4
SFA-Pw-96	6,8±0,3	7,2±0,4	10,4±0,9	4,0±0,4	1,8±0,3

Полидисперсность препаратов изменяется следующим образом: ФК почв, угля, торфа < ГК торфа < ГК почв, угля. Величина полидисперсности зависит, в основном, от процедуры фракционирования и очистки препаратов, а не их источника. Поэтому для препаратов ФК, которые выделяют на макроситовых смолах, являются более узкодисперсными, чем препараты ГК.

Таким образом, в результате комплекса проведенных исследований изучено влияние неэксклюзионных эффектов на гель-хроматографическое фракционирование гумусовых кислот. Показано, что для выбранного фракционирующего геля подавление эффекта сверхэксклюзии достигается при работе с элюентами с ионной силой в диапазоне 0,066-0,143М и рН 6,0-6,8. При этом модификация растворителя метанолом оказалось неэффективной для устранения специфической адсорбции. Выявлено существенное различие в характере неэксклюзионных эффектов гумусовых кислот и полистиролсульфонатов, широко используемых в качестве калибровочных стандартов для определения ММР гумусовых кислот. Данное различие необходимо учитывать при получении численных характеристик молекулярно-массового распределения гумусовых кислот. По-видимому, более адекватными стандартными образцами являются неионогенные полидекстраны.

Выводы

1. Установлено, что гумусовые кислоты при гель-хроматографическом фракционировании вступают в существенные электростатические и сорбционные взаимодействия с гелем, что приводит к проявлению неэксклюзивных эффектов – сверхэксклюзии и специфической адсорбции.
2. Установлено, что использование элюентов с ионной силой в диапазоне 0,066-0,143М позволяет достичь компенсации эффекта сверхэксклюзии для гумусовых кислот без нарастания эффекта специфической адсорбции, при этом изменение рН элюента от 6,0 до 6,8 не влияет на результаты фракционирования.
3. Установлено, что специфическая сорбция гумусовых кислот на геле составляет 10-80%, достигая максимума для наиболее гидрофобных гуминовых кислот угля, и минимума – для гидрофильных фульвокислот торфа. Показана неэффективность использования метанола для модификации элюента с целью устранения специфической сорбции.
4. Установлено, что гель-хроматографическое поведение полистиролсульфонатов, используемых в качестве калибровочных стандартов, существенно отличается от гумусовых кислот: для них проявляется эффект специфической сорбции при ионной силе элюента свыше 0,066М. Для определения молекулярно-массовых характеристик гумусовых кислот рекомендован элюент с ионной силой 0,066М.
5. Установлено, что молекулярные массы всех исследованных гумусовых кислот лежат в диапазоне 3-20 кДа, при этом наиболее высокими значениями характеризуются гуминовые кислоты почв, а наиболее низкими – гуминовые и фульвокислоты угля. Найдено, что полидисперсность гумусовых кислот составляет от 1,5 до 6,6, при этом минимальные значения характерны для фульвокислот, а максимальные – для гуминовых кислот.

Список литературы

1. Орлов Д.С. Химия почв. М.: МГУ, 1992, 399с.
2. Stevenson F.J. Humic chemistry: genesis, composition, reactions. In: Humus chemistry. John Wiley & Sons. N.Y., 1982, 443pp.
3. Rice, J.A., MacCarthy, P. Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances. // *Org. Geochem.*, 1991, V.17(5), P.635-648.
4. Kleinhempel D. Ein Beitrag zur Theorie des Huminstoffzustandes. // *Albrecht-Thaer-Archiv*. 1970, V.14(1), P.3-14.
5. Дударчик В.М., Смычник Т.П., Скаковский Е.Д. Исследование фракций торфяных гуминовых кислот и продуктов их деструкции методом ^1H ЯМР-спектроскопии. // *Хим. Тверд. Топл.*, 1997, Т.5, с.96-101.
6. Schnitzer M., Khan S.U. Humic substances: chemistry and reactions the analysis of humic substances-non-degradative methods. In: Humic substances in the environment. Decker M. (Ed.), N.Y., 1972, P.12-17.
7. Кухаренко Т.А. Реакции гуминовых кислот с нейтральными солями. // *Хим. Тверд. Топл.*, 1937, Т.8(12), С.1064-1072.
8. Perdue E.M. Acidic functional groups of humic substances. In: Humic substances in soil, sediment and water. Aiken G.R., McKnight D.M., Wershaw R.L., MacCarthy P. (Eds.) N.Y., 1985, P.493-525.
9. Данченко Н.Н. Функциональный состав гумусовых кислот: определение и взаимосвязь с реакционной способностью. Дисс. канд. хим. наук, М., 1997, 138с.
10. Herbert B.E., Bortsch M., Novak, J.M. Pyrene sorption by water-soluble organic carbon. // *Environ. Sci. Technol.*, 1993, V.27, P.398-403.
11. Buffle J., Deloey M. D., Haerdi L. The use of ultrafiltration for the separation and fractionation of organic ligands in fresh waters. // *Anal. Chim. Acta*, 1978, V. 101, P.339-350.
12. Драгунов С.С. Труды почв. инст. им. Докучаева, 1951, Т.38, С.86-98.
13. Кухаренко Т.А., Бороздина Л.А. К вопросу о сущности реакции обмена гумусовых кислот с ацетатом кальция. // *Коллоидн. журн.*, 1949, Т.11(4), С.244-250.

14. Perminova I.V. Size-exclusion chromatography of humic substances: complexities of data interpretation attributable to non-size exclusion effects. // *Soil Science*, 1999, V.164(11), P.834-840.
15. Славинская Г.В., Селеменев В.Ф. Фульфоокислоты природных вод. Воронеж: Воронеж. Ун-т., 2001, 165с.
16. Лачинов М.Б., Пшежецкий В.С. Общие представления о полимерах. Москва, 1987, 38с.
17. Swift R. Molecular weight, shape, size and charge characteristics of humic substances: some basic considerations. In: *Humic substances II*. Hayes H.B., MacCarthy P., Malcom R.L., Swift R.S. (Eds.), John Wiley and Sons Ltd., 1989, P.449-465.
18. Aiken G., Gillam A. Determination of molecular weights of humic substances by colligative property measurements. In: *Humic substances II*. Hayes H.B., MacCarthy P., Malcom R.L., Swift R.S. (Eds.), N.Y., 1989, P.515-543.
19. Clapp C., Emerson W., Olness A. Size and shapes of humic substances by viscosity measurements. In: *Humic substances II*. Hayes H.B., MacCarthy P., Malcom R.L., Swift R.S. (Eds.), N.Y., 1989, P.497-514.
20. Wershaw R. Size and shapes of humic substances by scattering techniques. In: *Humic substances II*. Hayes H.B., MacCarthy P., Malcom R.L., Swift R.S. (Eds.), N.Y., 1989, P.545-559.
21. Swift R. Molecular weight, shape and size of humic substances by ultracentrifugation. In: *Humic substances II*. Hayes H.B., MacCarthy P., Malcom R.L., Swift R.S. (Eds.), N.Y., 1989, P.468-495.
22. De Nobili M., Cjessing E., Sequi P. Size and shapes of humic substances by gel chromatography. In: *Humic substances II*. Hayes H.B., MacCarthy P., Malcom R.L., Swift R.S. (Eds.), N.Y., 1989, P.561-597.
23. Posner A. Importance of electrolyte in the determination of molecular weights by Sephadex gel filtration, with especial reference to humic acid. // *Nature*, 1963, V.196, P.1161-1163.
24. Беленький Б.Г., Виленчик Л.З. Хроматография полимеров. М.: Химия, 1978, 343с.

25. Huber S., Frimmel F. A new method for the characterization of organic carbon in aquatic systems. // Intern. J. Environ. Anal. Chem., 1992, V.49, P.49-57.
26. Huber S., Frimmel F. Direct gel chromatographic characterization and quantification of marine dissolved organic carbon using high-sensitivity DOC detection. // Environ. Sci. Technol., 1994, V.28(6), P.1194-1197.
27. Von Wandruszka R., Schimpf M., Hill M., Engebretson R. Characterization of humic acid size fractions by SEC and MALS. // Organic Geochemistry, 1999, V.30, P.229-235.
28. Перминова И.В. Анализ, классификация и прогноз свойств гумусовых кислот. Дисс. док. хим. наук, М., 2000, 359с.
29. Perminova I.V., Frimmel F., Kudryavtsev A., Kulikova N., Abbt-Braun G., Hesse S., Petrosyan V.S. Molecular weight characteristics of humic substances from different environments as determined by size exclusion chromatography and their statistical evaluation. // Environ. Sci. Technol., 2003, V.37, P.2477-2485.
30. Perminova I.V. Size-exclusion chromatography of humic substances: complexities of data interpretation attributable to non-size exclusion effects. // Soil Science, 1999, V.164(11), P.834-840.
31. Химическая энциклопедия в 5-ти т. М.: Большая Российская энциклопедия, 1999, с.410-414.
32. Piccolo A. New insight on the conformation structure of humic substances as revealed by size-exclusion chromatography. In: The role of humic substances in the ecosystems and in environmental protection. Drozd J., Gonet S.S., Senesi N., Weber J. (Eds), Poland, 1997, P.19-35.
33. Town R., Powell K. Elimination of adsorption effects in gel permeation chromatography of humic substances. // Anal. Chim. Acta, 1992, V.256, P.81-86.
34. Mori S., Hiraide M., Mizuike A. Aqueous size-exclusion chromatography of humic acids on a sephadex gel column with diluted phosphate buffers as eluents. // Anal. Chim. Acta, 1987, V.193, P.231-238.
35. Piccolo A., Mirabella A. Molecular weight distribution of peat humic substances extracted with different inorganic and organic solution. // The Science of the Total Environment, 1987, V.62, P.39-46.

36. Peuravuori J., Pihlaja K. Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. // *Anal. Chim. Acta*, 1997, V.337, P.133-149
37. Zhou Q., Cabaniss S., Maurice P. Considerations in the use of high-pressure size exclusion chromatography (HPSEC) for determining molecular weights of aquatic humic substances. // *Wat. Res.*, 2000, V.34(14), P.3505-3514.
38. O'Loughlin, E., Chin Y.-P. Effect of detector wavelength on the determination of the molecular weight by high-pressure size exclusion chromatography. // *Wat.Res.*, 2001, V.35(1), P.333-338.
39. Perminova I.V., Frimmel F., Kovalevskii D., Abbt-Braun G., Kudryavtsev A., Hesse S. Development of a predictive model for calculation of molecular weight of humic substances. // *Wat. Res.*, 1998, V.32(3), P.872-881.
40. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. М.: Химия, 1989, 488с.
41. Swift R.S. Organic matter characterization. Part 3. In: *Chemical methods. Methods of soil analysis*, 1996, P.1011-1036.
42. Perdue E.V. Analytical constraints on the structural features of humic substances. // *Geochim.Cosmochim.Acta*, 1984, V.48, P.1435.
43. Stuermer D.H., Payne J.R. Investigation of seawater and terrestrial humic substances with carbon-13 and proton nuclear magnetic resonance. // *Geochim.Cosmochim.Acta*, 1976, V.40, P.1109.
44. Kudryavtsev A.V., Perminova I.V., Petrosyan V.S. Size-exclusion chromatographic descriptors of humic substances. // *Anal. Chim. Acta*, 2000, V.407(1-2), P.193-202.