



МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М. В. Ломоносова

---

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи  
УДК 547.992.2

**Ковалевский Дмитрий Валерьевич**

**ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ  
МЕТОДАМИ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР  $^1\text{H}$  И  $^{13}\text{C}$**

02.00.03 – Органическая химия  
11.00.11 – Охрана окружающей среды и рациональное  
использование природных ресурсов

Научные руководители:

доктор химических наук, профессор

В. С. Петросян

кандидат химических наук

И. В. Перминова

Научный консультант:

кандидат химических наук

А. Б. Пермин

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва-1998

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	6
1.1. Структура гумусовых кислот: общая характеристика, способы описания и методы исследования.....	6
1.1.1. Элементный состав гумусовых кислот.....	8
1.1.2. Функциональный состав гумусовых кислот.....	12
1.1.3. Строение углеродного скелета ГФК: каркасная и периферическая части молекулы.....	15
1.1.4. Молекулярный уровень описания структуры ГФК. Средние структурные формулы.....	19
1.2. Исследование структуры ГФК методом спектроскопии ЯМР.....	25
1.2.1. Спектроскопия <sup>13</sup> C ЯМР.....	25
1.2.2. Спектроскопия ПМР.....	43
<b>2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b> .....	52
2.1. Выбор препаратов ГФК и характеристика их элементного состава.....	52
2.2. Качественная характеристика фрагментного состава ГФК.....	56
2.2.1. <sup>13</sup> C ЯМР спектры.....	56
2.2.2. Подспектры, полученные при помощи импульсных последовательностей DEPT и QUAT.....	58
2.2.3. Двумерные спектры ЯМР.....	60
2.3. Исследование структуры ГФК методом количественной спектроскопии ЯМР <sup>13</sup> C.....	66
2.3.1. Условия получения количественных <sup>13</sup> C ЯМР спектров.....	66
2.3.2. Распределение углерода в структуре ГФК различного происхождения.....	71
2.4. Исследование структуры ГФК методом спектроскопии ПМР.....	75
2.4.1. Разработка метода количественной характеристики	

распределения водорода функциональных групп и углеродного скелета ГФК.....	75
2.4.2. Распределение водорода в структуре ГФК.....	87
2.5. Фрагментный состав ГФК.....	91
2.5.1. Схема расчета фрагментного состава ГФК из данных спектроскопии ЯМР $^1\text{H}$ и $^{13}\text{C}$ .....	91
2.5.2. Характеристика закономерностей строения ГФК различного происхождения на основании фрагментного состава.....	93
2.6. Применение данных по фрагментному составу ГФК для установления зависимостей структура - свойство.....	102
2.6.1. Установление взаимосвязи между структурой и гель-хроматографическими характеристиками ГФК.....	103
2.6.2. Исследование взаимосвязи между структурой ГФК и их детоксицирующими свойствами по отношению к тяжелым металлам.....	107
<b>3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....</b>	<b>111</b>
3.1. Материалы и оборудование.....	111
3.2. Выделение препаратов ГФК.....	112
3.3. Регистрация спектров ЯМР.....	113
3.4. Методика токсикологических экспериментов.....	118
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>120</b>
<b>СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>121</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЯ.....</b>	<b>122</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Гумусовые кислоты (ГФК) представляют собой обширный класс органических соединений природного происхождения и составляют от 60 до 80% органического вещества водных и почвенных сред. Нерегулярность строения углеродного скелета ГФК в совокупности с обогащенностью гетероэлементами (среди которых преобладает кислород - до 50% масс.) обуславливает разнообразие и переменный состав структурных фрагментов, образующих их молекулы. Однако диапазон вариаций функционального и количественного состава ограничен в связи с единством принципов строения ГФК различного происхождения. Строение ГФК характеризуется наличием ароматического каркаса, замещенного функциональными группами и алкильными цепочками, и периферийного карбогидратно-пептидного комплекса. Указанное строение ГФК обеспечивает их высокую реакционную способность по отношению к тяжелым металлам и органическим экотоксикантам, поступающим в природные среды. Создание прогностических моделей поведения экотоксикантов с учетом влияния ГФК требует установления количественных соотношений между их структурой и свойствами. Принимая во внимание нерегулярность строения ГФК, получение таких соотношений возможно только при условии корректного численного описания их структуры на основе данных по детальному фрагментному составу.

Данное обстоятельство определяет важность и актуальность изучения структуры ГФК методами  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопии, комплексное использование которых позволяет охарактеризовать распределение основных конституционных элементов между структурными фрагментами, составляющими макромолекулы. При этом в связи со сложностью объекта исследования до сих пор отсутствуют единые методические подходы к регистрации количественных спектров  $^{13}\text{C}$  ЯМР ГФК, не разработаны методы определения водорода функциональных групп из ПМР-спектров. Как следствие, имеющиеся сведения о детальном фрагментном составе ГФК весьма противоречивы и не могут быть использованы для количественного описания их структуры. Указанные проблемы определили постановку целей и задач настоящей работы.

Целью работы было исследование структуры гумусовых кислот при помощи расчета детального фрагментного состава из данных спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ .

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- Качественно охарактеризовать фрагментный состав ГФК различного происхождения.
- Разработать методические подходы для количественного исследования структуры ГФК методами  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектроскопии:

- Провести комплексный анализ данных  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектроскопии для определения детального фрагментного состава ГФК различного происхождения.
- Применить данные по фрагментному составу для идентификации препаратов ГФК по источнику происхождения и продемонстрировать их применимость для установления количественных соотношений структура-свойство.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Структура гумусовых кислот: общая характеристика, способы описания и методы исследования.

Гумусовые кислоты (от латинского “гумус” – земля, почва) представляют собой наиболее реакционноспособную часть обширного класса природных соединений, объединяемых под общим названием гумусовые вещества. Гумусовые вещества составляют от 60 до 80% органического вещества водных и почвенных сред [1-5].

Общепринятая классификация гумусовых веществ [6-8] основана на различии в их растворимости в кислотах и щелочах. Согласно этой классификации все гумусовые вещества подразделяют на три основные составляющие: гумин – неизвлекаемый остаток, нерастворимый ни в щелочах, ни в кислотах; гуминовые кислоты (ГК) – фракция, растворимая в щелочах и нерастворимая в кислотах; фульвокислоты (ФК) – фракция, растворимая в щелочах и кислотах. Под термином "гумусовые кислоты" понимают сумму гуминовых и фульвокислот [7]. В нашей работе для сокращенного обозначения гумусовых кислот была использована аббревиатура ГФК.

Образование гумусовых веществ в природных средах происходит в результате химического и биологического разложения растительных и животных остатков [2]. В отличие от синтеза белков, протекающего по заданному генетическому коду, в основе процесса образования гумусовых веществ лежит стохастический отбор устойчивых к биодegradации структур [6, 9, 10]. По этой причине гумусовые вещества представляют собой смесь макромолекул переменного состава и нерегулярного строения [7, 11]. Для их структуры характерно наличие ароматического каркаса, замещенного алкильными цепочками и многочисленными функциональными группами (главным образом, карбоксильными и гидроксильными), и полисахаридно-пептидного комплекса (рис. 1.1) [12]. Соотношение этих фрагментов в структуре ГФК определяется конкретным источником гумусообразования и может существенно различаться для ГФК различных природных сред.

Такое химическое строение обуславливает способность ГФК к широкому спектру химических взаимодействий. В связи с этим функции ГФК в окружающей среде крайне разнообразны.

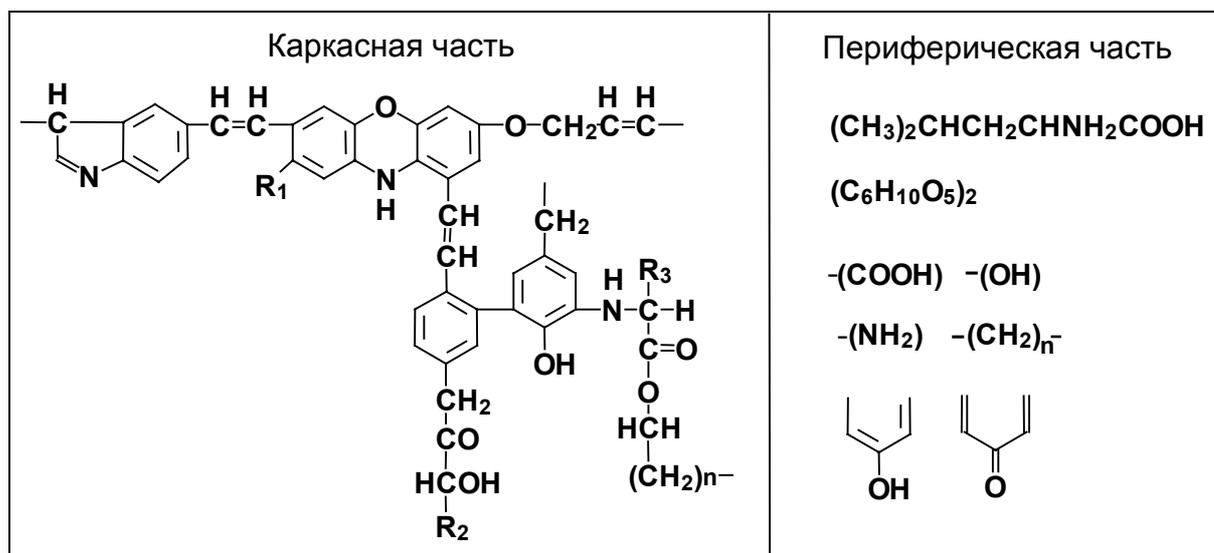


Рисунок 1.1. Схема строения структурной ячейки гуминовых кислот почв по Орлову. [12]

Так, они служат своеобразными депо питательных веществ и микроэлементов, способствуют их транспорту в растения, участвуют в структурировании почвы, повышают ее катионо-обменную и буферную емкость [2]. Однако наибольшее значение имеет способность ГФК взаимодействовать в природных условиях практически со всеми классами загрязняющих веществ, в значительной степени замедляя их биогеохимические циклы, снижая их токсичность и биоусвояемость для живых организмов [6-11]. В связи с этим ГФК можно рассматривать как природные детоксиканты [3, 6, 9]. Следует отметить, что реакционная способность и детоксицирующие свойства ГФК могут существенно различаться в связи со спецификой источника происхождения [3, 4, 6].

Для создания прогностических моделей, адекватно описывающих поведение и биологическую активность экотоксикантов необходимо установление взаимосвязи между структурой и реакционной способностью ГФК в реакциях различных типов. При этом установление количественных соотношений структура-свойство предполагает описание структуры ГФК набором численных дескрипторов [10].

В связи со статистическим характером строения ГФК можно рассматривать как сложную смесь макромолекул, свойства которых характеризуются широким непрерывным распределением. Методы анализа таких многокомпонентных смесей, в частности, угле- и нефтепродуктов, как правило, основаны на фракционировании по какому-либо признаку и количественном определении фракционного состава [13, 14]. Принципиальным отличием ГФК от угле- и нефтепродуктов является высокая химическая неоднородность компонентов, которая в сочетании с широким диапазоном молекулярных масс делает фракционный анализ неприменимым. При этом неопределенно большое в случае ГФК число компонентов приводит к качественному переходу - это уже не смесь

индивидуальных соединений, а **вещество нерегулярного строения**, имеющее аддитивно непредсказуемые физико-химические характеристики [10, 15].

Для описания характеристик такого объекта требуется свертка информации. Предположение, что вещество нерегулярного строения состоит из ограниченного числа более мелких фрагментов, позволяет определить полное их число и охарактеризовать структуру объекта через его **фрагментный состав**. В случае ГФК описание фрагментного состава может быть выполнено на разных уровнях дискретизации. В таком подходе нулевой уровень дискретизации предполагает, что вещество состоит из элементов, следующий уровень - из атомов углерода с ближайшим окружением, и далее - из более крупных молекулярных фрагментов [15]. На каждом уровне дискретизации могут быть получены структурные дескрипторы, позволяющие проводить идентификацию препаратов ГФК. При этом выбор уровня дискретизации в значительной мере определяется возможностями конкретных методов структурного исследования.

Следует отметить, что нерегулярность, нестехиометричность и химическая гетерогенность ГФК серьезно осложняют как получение достоверных экспериментальных данных, так и их корректную интерпретацию. Ниже будут рассмотрены основные подходы к характеристике структуры ГФК на различных уровнях дискретизации и проблемы, возникающие при анализе этих соединений.

### 1.1.1. Элементный состав ГФК.

Основными элементами, образующими молекулы ГФК, являются углерод, водород и кислород. Азот и сера содержатся в ГФК на уровне 1-5% [1-3], обязательной составной частью ГФК являются микроэлементы и вода [2]. Брутто-формулу ГФК можно записать в общем виде следующим образом:



где M – ионы металлов.

Основные проблемы, возникающие при проведении количественного элементного анализа таких веществ, связаны с присутствием влаги и несгораемых минеральных компонентов (зольностью).

Присутствие влаги вызывает завышение результатов определения содержания водорода и занижение содержания прочих элементов [16]. При этом выполнению анализа безводных образцов препятствует высокая гигроскопичность ГФК, которые, будучи высушены, набирают равновесное количество влаги из воздуха (до 10%) в течение нескольких минут [16, 17]. В связи с этим в работе [16] рекомендуется проводить

определение содержания влаги в анализируемых образцах и корректировать данные элементного анализа на равновесную влажность.

Зольность препаратов ГФК определяют при сжигании образца на воздухе или в токе кислорода. Однако далеко не всегда уделяется внимание достижению полноты сжигания. При определении С, Н, N и S в ГФК, особенно для образцов, содержащих значительное количество минеральных компонентов, может происходить неполное сгорание вещества при быстром пиролизе и/или связывание части диоксида углерода в виде термостойких карбонатов щелочных металлов [17]. Для высокозольных образцов некорректно определенное содержание минеральной компоненты может привести к существенным ошибкам определения основных конституционных элементов. По данным работы [12] занижение результатов по углероду может достигать 1-7% абс. на каждые 10 % золы.

Статистический анализ более чем 400 наборов данных по элементному составу ГФК, проведенный авторами обзора [18], показал, что наибольшей достоверностью отличаются данные по содержанию углерода. Содержание водорода определяется менее надежно, что, по-видимому, связано с влиянием влажности анализируемых образцов на результаты определения. Наименьшей точностью при С, Н, N-анализе ГФК отличаются данные по азоту [19]. Причиной этого является низкое содержание азота в ГФК. Поэтому сложно подобрать подходящий стандарт для одновременного определения С, Н и N в ГФК. Несоответствие между содержанием элемента в образце и стандарте, как правило, приводит к значительным ошибкам определения [20].

Данные по элементному составу ГК и ФК, полученные авторами обзора [18] в результате усреднения опубликованных результатов элементного анализа для более чем четырехсот образцов, приведены в табл. 1.1.

Таблица 1.1

## Средний элементный состав ГК и ФК различного происхождения [18]

Тип ГФК	Содержание элементов, % (масс.) Среднее/диапазон значений					Степень окисленности* ω	Ненасыщенность** U
	С	Н	N	O	S		
<b>Гуминовые кислоты</b>							
Почвенные	55	4.8	3.6	36	0.8	-0.15	3.3
	37-64	1.6-8.0	0.5-7.0	27-52	0.1-4.9		
Торфяные	57	5.0	2.8	35	0.4	-0.11	3.5
	50-63	3.6-6.6	0.6-3.9	30-43	0.1-0.7		
Поверхностных вод	51	3.7	2.6	41	1.9	0.06	3.0
	43-56	3.5-6.5	0.6-8.0	31-48	0.3-4.3		
Морских вод	56	5.8	3.8	32	3.1	-0.21	3.1
	37-76	3.7-11.7	1.0-10.5	8-56	1.2-8.3		
<b>Фульвокислоты</b>							

Почвенные	45	5.0	3.6	46	1.3	0.16	2.8
	35-75	3.2-7.0	0.4-5.9	17-56	0.1-3.6		
Торфяные	54	5.3	2.0	38	0.8	-0.01	3.1
	47-61	4.2-7.2	1.2-2.6	31-44	0.2-1.9		
Поверхностных вод	47	4.2	2.3	46	1.2	0.48	2.7
	39-56	0.4-5.9	0.5-8.2	35-56	0.1-3.1		
Морских вод	45	5.9	4.1	45	2.1	-0.14	1.9
	38-50	4.3-6.8	1.0-6.8	37-55	-		

\* Рассчитана из данных таблицы согласно [12] по формуле  $\omega = (2O-H)/C$

\*\* Рассчитана из данных таблицы согласно [19] по формуле  $U=C-H/2+N/2$

Как видно из табл. 1.1, несмотря на химическую гетерогенность и статистический принцип формирования молекул ГФК, изменению элементного состава в зависимости от источника происхождения и фракционного состава (ФК или ГК) присуща внутренняя закономерность. Содержание углерода в ГК в среднем выше, чем в ФК [12]. Для содержания кислорода наблюдается обратная тенденция. Расчет степени ненасыщенности структурных единиц, которые удовлетворяли бы данным табл. 1.1, показывает, что в среднем ФК содержат больше алифатических фрагментов, тогда как ГК обогащены ароматическими.

ГФК различного происхождения существенно отличаются по элементному составу. Так, в работах [21, 22] приводятся данные, что элементный состав ФК поверхностных вод существенно отличается от ФК почв, а ГК почв - от ГК торфа.

Как показано в работах [23, 24] различия в структуре и элементном составе ГФК разных природных сред непосредственно связаны с источниками гумусообразования в этих системах. 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 структурами [25]. ГФК морских вод и донных отложений образуются, преимущественно, из остатков водорослей и планктона, главными компонентами которых являются липиды, полисахариды и пигменты – соединения преимущественно алифатического и алициклического характера [20, 26].

С другой стороны, элементный состав ГФК одного типа может значительно различаться в зависимости от конкретного источника происхождения: различного типа почв [12], вод [4] и т.д.

В качестве основных дескрипторов структуры ГФК используют рассчитываемые из данных элементного анализа атомные соотношения Н/С и О/С [12]. Отличия в этих характеристиках являются значимыми для ГК и ФК [18]. В работе [12] указывается, что

показатель  $O/C$  характеризуется низкой надежностью и предлагается использовать вместо него степень окисленности  $\omega$ , рассчитываемую по следующей формуле:

$$\omega = (2O-H)/C \quad (1.1),$$

где  $O$ ,  $H$  и  $C$  - атомные содержания соответствующих элементов [12].

Рассчитанные нами согласно этой формуле средние значения степени окисленности для данных [18] приведены в табл. 1.1. Показано, что ФК всех рассмотренных природных источников характеризуются более высокой окисленностью по сравнению с ГК. Однако, сами авторы [12] отмечают, что в использовании данного показателя есть неясные и уязвимые места, к примеру, его зависимость как от содержания кислородных заместителей, так и от соотношения алифатических и ароматических фрагментов в структуре ГФК.

Один из первых способов описания закономерностей образования и трансформации ГФК в различных природных средах на основании данных элементного анализа был разработан Ван-Кревеленом для характеристики углей [27]. Метод основывается на использовании диаграмм в координатах  $H/C$  -  $O/C$  и служит удобным приемом для разделения вклада процессов окисления и конденсации структуры ГФК в изменение элементного состава препаратов [12]. Использование диаграмм Ван-Кревелена позволило продемонстрировать, что процессы образования ГК из растительных остатков вызывают снижение как соотношения  $H/C$ , так и  $O/C$  [12, 29]. В работе [29] показано, что протекание прессов гумификации сопровождается увеличением доли конденсированных структур в молекулах ГФК. Резко обособленное положение ФК на диаграмме позволило авторам работы [12] предположить, что механизм их образования из растительных остатков принципиально иной, нежели для ГК.

Таким образом, элементный состав ГФК дает возможность для оценки структурных различий препаратов ГФК, однако данная оценка не дает информации о реакционных центрах и является слишком грубой для установления количественных соотношений структура-свойство. Для прогноза реакционной способности ГФК необходима более детальная информация о строении этих веществ, которую может обеспечить переход на следующий уровень дискретизации описания структуры.

### 1.1.2. Функциональный состав ГФК.

Характеристика структуры ГФК на уровне атомов углерода с ближайшим окружением сводится к описанию распределения углерода между частями углеродного скелета ГФК, такими как ароматической, алифатической, карбогидратной, и определению

основных функциональных групп. Основным способом определения характеристик углеродного скелета ГФК является спектроскопия ЯМР  $^{13}\text{C}$ . В связи с тем, что исследование структуры ГФК при помощи спектроскопии ЯМР являлось целью настоящей работы, применению данного метода будет посвящена отдельная глава, а в настоящем разделе внимание будет уделено функциональному составу ГФК и проблемам его исследования.

Основными функциональными группами ГФК являются фенольные и спиртовые гидроксилы и карбоксильные группы [2, 6, 8]. Прочие функциональные группы, а именно метоксильные, амидные, сложноэфирные, кетонные и хиноидные присутствуют в структуре ГФК в меньших количествах [6, 12]. Наличие указанных функциональных групп подтверждено многими методами исследования, однако данные об их количественном содержании часто противоречивы, что в значительной мере обусловлено ограниченной применимостью традиционных методов функционального анализа для исследования структуры ГФК [30].

Методы определения карбоксильных и гидроксильных групп, основанные на получении их алкильных, ацильных или силильных производных, как правило, неприменимы для анализа ГФК. В первую очередь это обусловлено низкой растворимостью высокомолекулярных ГФК в большинстве органических растворителей, препятствующей количественному протеканию реакций [31]. Кроме того, возможны протекание побочных реакций и частичная деструкция ГФК в условиях эксперимента [6, 32].

В связи с этим в настоящий момент для определения функциональных групп ГФК наиболее широко используются титриметрические методы, основанные на образовании малорастворимых гуматов. Так, для определения  $\text{COOH}$ -групп используется взаимодействие с ацетатом кальция, а взаимодействие с гидроксидом бария позволяет определять сумму карбоксильных и фенольных групп [2, 6, 16].

Однако существенным фактором, который с трудом поддается учету, но может заметно искажать результаты определения, является высокая полидисперсность ГФК. Сложно найти условия для количественного протекания взаимодействия всех функциональных групп с ионами металлов для полиэлектролита, размер молекул которого может отличаться в 10-100 раз.

Некоторые результаты определения функционального состава ГФК обобщены в таблице 1.2.

Из сравнения данных, приведенных в таблице, можно сделать вывод о том, что методы, основанные на химической модификации, дают в среднем более низкие

результаты по сравнению с титриметрическими. Это, по-видимому связано с тем, что стерические факторы препятствуют количественному протеканию реакций с органическими реагентами в большей степени, нежели с ионами металлов.

Сопоставление результатов элементного и функционального анализа позволяет проводить оценку параметров строения углеродного скелета ГФК. Так, на использовании данных элементного анализа и известного содержания COOH и C=O групп основывается эмпирическая формула расчета степени бензоидности  $\alpha$  по Д.С. Орлову [12]:

$$\alpha = C_{\text{бенз}} / (C_{\text{бенз}} + C_{\text{ал}}) \quad (1.2)$$

При этом

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

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

**K** - "коэффициент учета кислородных функций", рассчитываемый из данных функционального анализа.

Табл. 1.2.

## Функциональный состав ГФК различного происхождения.

Тип ГФК	Определяемые группы	Метод определения реагент	колич. метод	Содержание ммоль/г	Лит.	
ГК почв	COOH	CH <sub>3</sub> OH+HCl	Цейзеля*	2.1-3.1	[33]	
		-	потенциометрия	3.4	[34]	
		CH <sub>3</sub> COOCa	титрование	1.5-4.7	[6, 35]	
	COOH+ArOH	CH <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	} Цейзеля	}	4.7-7.2	[36]
		CH <sub>2</sub> N <sub>2</sub>			5.7-8.7	[37]
		CH <sub>3</sub> I+Ag <sub>2</sub> O		6-9	[38]	
		-	потенциометрия	3-6	[35, 39]	
ГК торфа	ArOH+ROH	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Цейзеля	3.7-8.3	[40]	
		(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		7.8-10.1	[37]	
		Ac <sub>2</sub> O+Py	титрование	6.9-9.2	[41]	
ГК торфа	COOH	CH <sub>3</sub> COOCa	титрование	2.3-4.6	[33]	
	COOH+ArOH	Ba(OH) <sub>2</sub>	титрование	6.2-8.5	[33]	
ГК угля	COOH	CH <sub>3</sub> OH+HCl	Цейзеля	2.0-3.2	[42]	
	COOH	CH <sub>3</sub> COOCa	титрование	2.0-3.6	[42, 43]	
	ArOH+ROH	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Цейзеля	3.8-4.3	[42]	
	ArOH+ROH	Ba(OH) <sub>2</sub>	титрование	7.2-8.7	[44]	
ГК донных отложений	COOH	CH <sub>3</sub> COOCa	титрование	2.2-3.9	[45]	
	COOH+ArOH		титрование	3.7-5.8	[45]	
ФК почв	COOH	CH <sub>3</sub> OH+HCl	Цейзеля	2.6-3.0	[33]	
		CH <sub>3</sub> COOCa	титрование	8.5-9.1	[32, 46]	
	COOH+ArOH	CH <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	Цейзеля	5.3-5.8	[33]	
		Ba(OH) <sub>2</sub>	титрование	9-14	[32, 46]	
	ArOH+ROH	Ac <sub>2</sub> O+Py	титрование	6.7-10	[41]	

		CH <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	ГЖХ	3.8-4.3	[47]
		CH <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	<sup>1</sup> H-ЯМР	6.8-7.6	[48]
	COOH	(CH <sub>3</sub> Si) <sub>2</sub> NH	<sup>29</sup> Si-ЯМР	5.8	[49]
ФК		-	потенциометрия	4.7-4.8	[50]
		CH <sub>3</sub> COOCa	титрование	4.6-10.1	[45]
поверхност- ных вод		Ac <sub>2</sub> O+Py	ГЖХ	13	[50]
		Ac <sub>2</sub> O+Py	<sup>1</sup> H-ЯМР	4.4	[48]
	ArOH+ROH	(CH <sub>3</sub> Si) <sub>2</sub> NH	<sup>29</sup> Si-ЯМР	6.6	[49]
		-	потенциометрия	6.1-6.7	[50]
		CH <sub>3</sub> COOCa	титрование	12.2	[45]
	ArOH	Ac <sub>2</sub> O+NaHCO <sub>3</sub>	<sup>1</sup> H-ЯМР	1.4	[51]
ФК грун- товых вод	COOH	-	потенциометрия	4.2-5.6	[50]
	COOH+ArOH	-	потенциометрия	4.8-8.1	[50]
ФК	COOH	CH <sub>3</sub> COOCa	титрование	4.4-8.9	[45]
морских вод	COOH+ArOH	Ba(OH) <sub>2</sub>	титрование	5.3-13.4	[45]

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

Развитием такого подхода является метод M. Perdue, позволяющий статистически оценивать наиболее вероятное распределение углерода между ароматическими и алифатическими фрагментами [52]. Исходными данными для расчета являются элементный состав и содержание карбоксильных и хинонных групп. Схема расчета основана на решении системы уравнений,

$$\begin{vmatrix} 1 & 1 & 1 \\ (H/C)_{al} & (H/C)_{ar} & (H/C)_{xs} \\ (U/C)_{al} & (U/C)_{ar} & (U/C)_{xs} \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} C_{total} - [COOH] - [C=O] \\ H_{total} - [COOH] \\ U_{total} - [COOH] - [C=O] \end{vmatrix} \quad (1.3)$$

в которой  $(H/C)_{al}$ ,  $(H/C)_{ar}$ ,  $(H/C)_{xs}$  - „парциальные“ соотношения H/C, а  $(U/C)_{al}$ ,  $(U/C)_{ar}$ ,  $(U/C)_{xs}$  - „парциальные“ количества двойных связей и циклических структур варьируются случайным образом в заданных пределах. ( $C_{xs}$  представляет собой sp<sup>2</sup>-гибридизованный углерод, не включенный в [COOH] и [C=O].) Получаемый в результате массив решений  $\{C_{al}, C_{ar}, C_{xs}\}$  характеризует распределение возможных с точки зрения начальных условий параметров строения углеродного скелета. Помимо этого, решение системы уравнений позволяет определить наиболее вероятные соотношения H/C и U/C для каждого из рассчитанных параметров  $C_i$ .

По данным автора, рассчитанные параметры углеродного скелета  $C_{al}$ , и  $C_{ar}$  в ряде случаев согласуются с данными <sup>13</sup>C ЯМР [52]. Данный подход может быть применен как для расчета дескрипторов структуры ГФК, так и для верификации структурных данных, предоставляемых элементным анализом и <sup>13</sup>C ЯМР спектроскопией.

### 1.1.3. Строение углеродного скелета ГФК: каркасная и периферическая части молекулы.

Основная информация о блочном строении углеродного скелета ГФК получена при помощи деструктивного подхода [12]. Деструктивные методы подразделяются на две группы: основанные на гидролитическом расщеплении, затрагивающем периферическую часть молекул, и жесткой (окислительной и пиролитической) деструкции, вызывающей разрушение негидролизуемого каркаса молекул [53].

Введение представления о разграничении каркасной и периферической частей молекулы позволяет перейти к следующему уровню детализации описания структуры. Такой подход включает задание набора основных структурных компонентов каждой части и способов соединения их в макромолекулы [53].

#### *Состав гидролизуемой периферии ГФК.*

Согласно [12], при гидролизе 6М HCl в раствор переходит 30-45% массы ГК почв и 60-75% ФК. Гидролизуемость гуминовых кислот торфов и бурых углей несколько ниже.

Состав гидролизатов изучен довольно подробно и дает ясное представление об основных компонентах, образующих гидролизуемую периферию молекул ГФК (табл. 1.3).

Табл. 1.3.

Состав гидролизуемой части ГК и ФК почв, % масс. (по данным [12])

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

Как видно из таблицы, основной частью гидролизатов ГК и ФК почв являются углеводы, массовое содержание которых в ГФК достигает по различным источникам 20-40%. Более детальное исследование их состава показало, что углеводная часть ГФК представлена в основном гексозами (30-60%, с преобладанием глюкозы), в меньших количествах присутствуют метилпентозы и пентозы [12, 54, 55]. 5-20% суммы сахаров обычно представлено уроновыми кислотами [12]. Экспериментальные данные позволяют предполагать, что моно- и полисахариды связаны с каркасной частью ГФК посредством сложноэфирных мостиков [56].

Выход аминокислот при гидролизе препарата ГК почв обычно составляет 6-10% от его массы, при этом наиболее низким содержанием аминокислот характеризуются черноземы. Содержание аминокислот в ФК почв несколько ниже (5-7%) [12]. Аминокислотный состав характеризуется постоянством при значительном преобладании аспарагиновой и глутаминовой аминокислот, глицина и аланина. Постоянство аминокислотного состава вытекает из статистического характера строения ГФК и является следствием высокой динамичности гидролизуемой части молекул, участвующей в постоянном обмене с компонентами почвенной среды. 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 связи [12, 57].

Кроме того, имеются данные [8, 12] о наличии в составе гидролизатов гуминовых кислот фенолов (до 5%) и ФК-подобных соединений (10-15%).

### ***Состав негидролизуемого каркаса ГФК***

Для деструкции ГФК чаще всего используют окисление перманганатом калия или оксидом меди в щелочной среде [12, 53]. При окислении образуются  $\text{CO}_2$ , алифатические (преимущественно уксусная и щавелевая) и бензолполикарбоновые кислоты. По данным [12] при этом значительная часть ароматических структур оказывается неучтенной, т.к. бензольные кольца с кислородными заместителями склонны к распаду при окислении перманганатом.

Образующиеся бензолполикарбоновые кислоты составляют 5-20% от массы ГФК почв, однако при этом следует отметить неколичественность метода [7]. Периферическая часть ГК почв практически не содержит неокисляемых перманганатом ароматических фрагментов, в то время как в случае ФК почв гидролизуемая часть может служить источником 30-35% всех бензолкарбоновых кислот. На этом основании в работе [12] сделано заключение, что в ФК ароматические структурные единицы распределены более равномерно, чем в ГК, где они почти полностью сосредоточены в негидролизуемом ядре молекул. Однако следует отметить, что использование понятия "гидролизуемая часть" молекул не вполне корректно по отношению к ФК, часть которых в условиях кислотного гидролиза может не осаждаться.

Степень и характер замещения бензолкарбоновых кислот охватывают собой практически все статистически возможные варианты. Однако главными компонентами продуктов деструкции являются три-, тетра- и пентакарбоновые кислоты и некоторые оксибензойные кислоты [58, 59]. Данный факт не указывает на присутствие таких кислот

в исходных молекулах, но свидетельствует о том, что для ароматических колец ГФК наиболее характерно именно такое число С-заместителей в ароматических кольцах.

Применение пиролитической масс-спектрометрии позволяет детально исследовать продукты распада ГФК в отсутствие окислителей. Показано [60], что в результате пиролиза в образующейся смеси можно идентифицировать наряду с замещенными ароматическими структурами некоторые количества алканов и олефинов с длиной цепи 4-30, а также алкилзамещенные бензолы  $Ar-(CH_2)_n-CH_3$ , с длиной цепи до  $n=17$ . Это может служить доказательством того, что связи между ароматическими кольцами представлены не только короткими мостиками типа  $-O-$ ,  $-NH-$ ,  $-N=$ , и  $-CH_2-$ , но и протяженными полиметиленовыми цепочками  $(-CH_2-)_n$ , где  $n$  может достигать 30 звеньев. Однако вопрос о содержании таких структур в молекулах ГФК является на сегодняшний день предметом дискуссии [30, 32].

### **Использование блок-схем для описания строения ГФК**

Развитие представлений о принципиальных различиях между строением периферической и негидролизуемой частей молекул ГФК нашло свое выражение в описании структуры ГФК при помощи блок-схем.

Одна из первых блок-схем была предложена Мистерски и Логиновым в 1959 г. для ГК почв (рис. 1.2). Она демонстрирует, что молекула ГК содержит "ядро", в которое входят ароматические кольца, хиноны, кислород- и азотсодержащие гетероциклы, гидроксильные, карбоксильные и карбонильные группы. Ядро окружено периферическими алифатическими цепями, в том числе углеводного и полипептидного характера. За счет комплексообразования и сорбции частица ГК содержит также минеральные компоненты, в первую очередь оксид кремния, железо, алюминий, кальций и фосфаты.

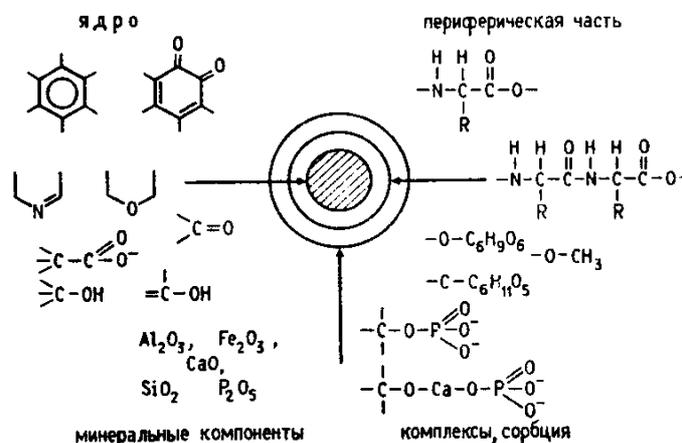


Рис. 1.2. Блок-схема строения ГК почв по Мистерски-Логинову (цит. по [12]).

Серьезным недостатком этой схемы является заострение внимания на "ядре" молекулы, вследствие чего структура подвергалась критике [12, 50]

Несколько более корректно этот вопрос решается во в целом сходной блок-схеме, предложенной Паули (рис. 1.3.) [61]. Согласно данной схеме в основе ГК лежат микроячейки, несущие функциональные группы и боковые мостики. Микроячейки соединены в основные структурные единицы - мононы, которые в свою очередь образуют полиноны.

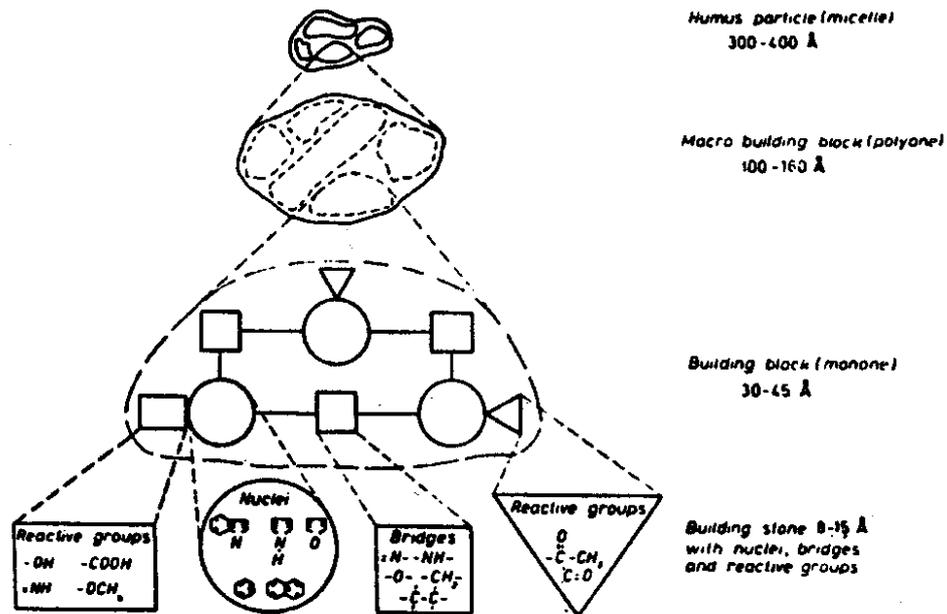


Рис.1.3. Блок-схема строения ГК почв по Паули [61].

С нашей точки зрения, схема строения структурной ячейки, предложенная Орловым [12] (рис. 1.1.), на настоящий момент представляет собой оптимальный вариант блок-схемы. Данная структурная ячейка представляет собой минимальную по размеру часть молекулы, которая содержит все важнейшие структурные фрагменты. Подробно приводятся характерные фрагменты негидролизуемой части молекулы и типичные способы их соединения, а гидролизуемая периферия дана в виде набора структурных компонентов, количество и характер сочленения которых варьируется. Состав и строение структурных ячеек, из которых сложена вся молекула, могут также варьироваться. Данная схема удовлетворительно объясняет конформационные особенности молекул, интенсивную окраску и другие свойства ГК.

В работах [7, 62] были предприняты попытки количественного описания структуры ГФК на блочном уровне дискретизации. Однако, баланс структурных компонентов показал, что неидентифицированной остается от 12 до 45% массы ГФК. Это, по всей видимости, связано с частичным разрушением каркасной части ГФК до  $\text{CO}_2$  при жесткой деструкции.

### 1.1.4. Молекулярный уровень описания структуры.

#### Средние структурные формулы.

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

Одной из первых таких формул, является формула Касаточкина (1953г.), предложенная для описания структур ГК, выделенных из окисленного угля (рис. 1.4) [12]. Данная формула демонстрирует только углеродный скелет ГК, опуская все остальные подробности строения. Как следует из приведенного фрагмента, для ГК характерна плоская атомная сетка циклически полимеризованного углерода с боковыми радикалами в виде молекулярных цепей линейно-полимеризованного углерода, несущими на себе различные атомы и атомные группы.

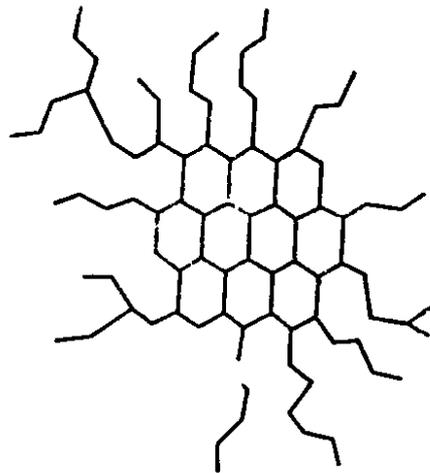


Рис. 1.4. Строение ГК угля по Касаточкину (цит. по [12]).

Комиссаровым и Логиновым, также исследовавшими структуры ГК угля, предложена в 1970 г структурная формула мономерного звена молекулы ГК, содержащая конденсированное ядро (рис. 1.5). При этом наличие конденсированного ароматического углерода подтверждено исследованием продуктов окисления [63].

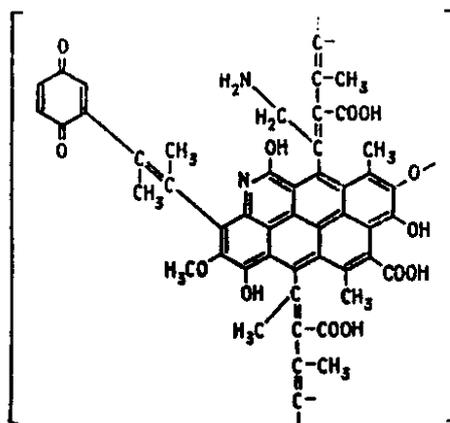


Рис. 1.5. Фрагмент молекулы ГК угля (по Комиссарову-Логинову) [63].

Однако наличие плоского конденсированного ядра противоречит экспериментальным данным о строении ГК других природных сред, хотя следует отметить, что для ГК угля доля конденсированных структур может быть весьма велика.

Структурные формулы с линейным расположением ядер были предложены Драгуновым (рис. 1.6) и Стивенсоном (рис. 1.7).

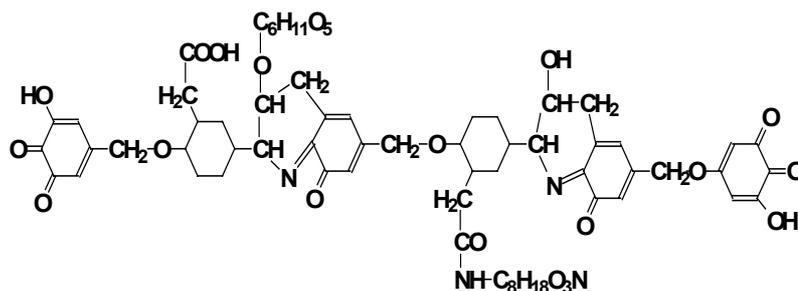


Рис. 1.6. Строение молекулы ГК почв (по Драгунову) (цит по [64])

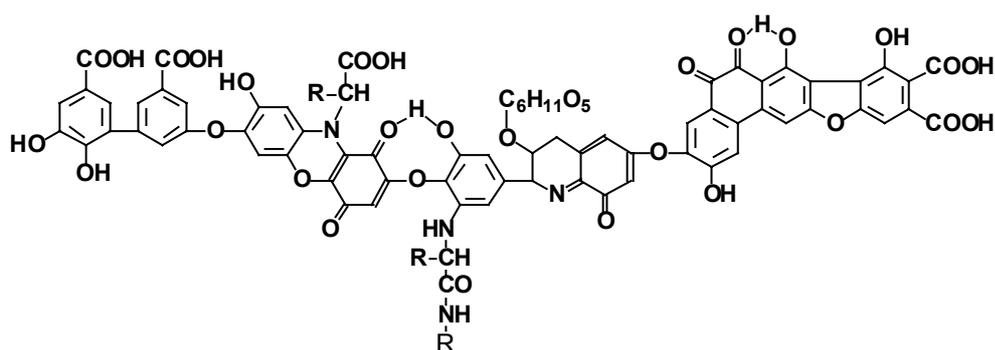


Рис. 1.7. Строение молекулы ГК почв (по Стивенсону) [32]

Достоинством данных структурных формул является присутствие в них практически всех важнейших составляющих структуры ГК. Однако при этом данные формулы плохо согласуются с результатами окислительной деградации, т.к. все бензольные кольца в них имеют кислородные заместители. Помимо этого, использование данных формул может

привести к слишком упрощенной трактовке структуры ГК, что неоднократно отмечалось многими исследователями [12, 30].

Другая точка зрения на строение ГФК отражена в структурной схеме "строительного блока" Шнитцера, представленная на рис. 1.8. Согласно данной схеме основу ГФК составляют фенол- и бензолполикарбоновые кислоты, связанные за счет ван-дер-ваальсовых сил и водородных связей. Однако, такая система не может быть устойчива к действию детергентов и кислот и должна легко распадаться на простые мономерные единицы, что не подтверждается экспериментальными данными. В то же время содержание основных структурных фрагментов в данной структуре хорошо согласуется с результатами различных методов исследования.

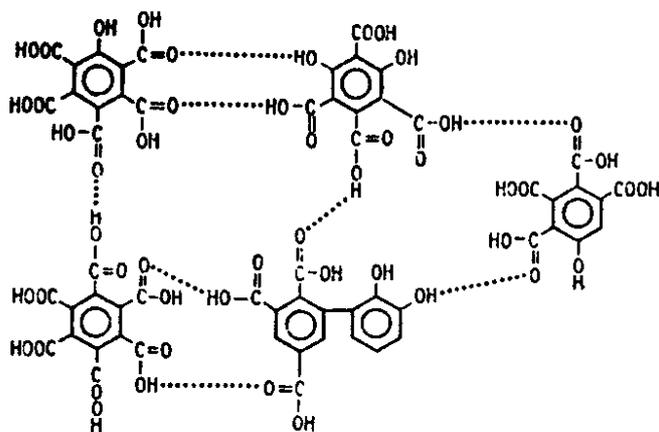


Рис. 1.8. Схема блока ГК почв (по Шнитцеру) (цит. по [50]).

Гипотетическая структурная формула молекулы ГК почв, предложенная Кляйнхемпелем [65] (рис 1.9) представляет собой попытку одновременно сохранить детальное описание структуры ГК и показать ее статистический характер. Это достигается за счет чрезмерной громоздкости формулы, в которой автор приводит практически все возможные элементы структуры и способы их сочленения. Возможно, данная формула наиболее полно отражает набор структурных фрагментов ГФК, хотя она неоднократно подвергалась критике, в частности, в связи с чрезмерно высоким содержанием азота.

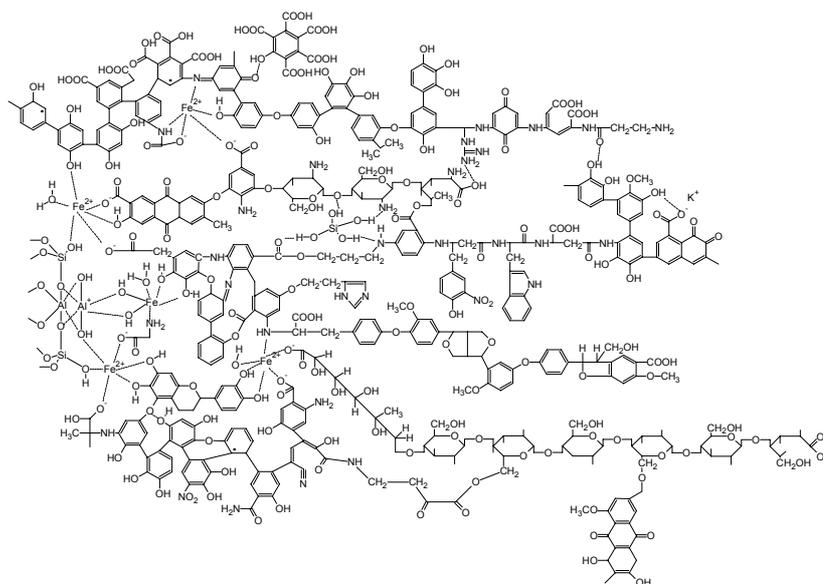


Рис. 1.9. Структура молекулы ГК почв (по Кляйнхемпелю) [65].

Структурная формула ГК почв, включающая в себя длинноцепочечные алифатические мостики, была предложена Шультенем [60] (рис. 1.10). Данная структурная модель была подвергнута обширной критике в связи с тем, что автор не учитывал в расчетах возможные ошибки метода пиролитической масс-спектрометрии [31]. Помимо этого, следует отметить, что данная формула наравне с предыдущей представляется слишком громоздкой для восприятия.

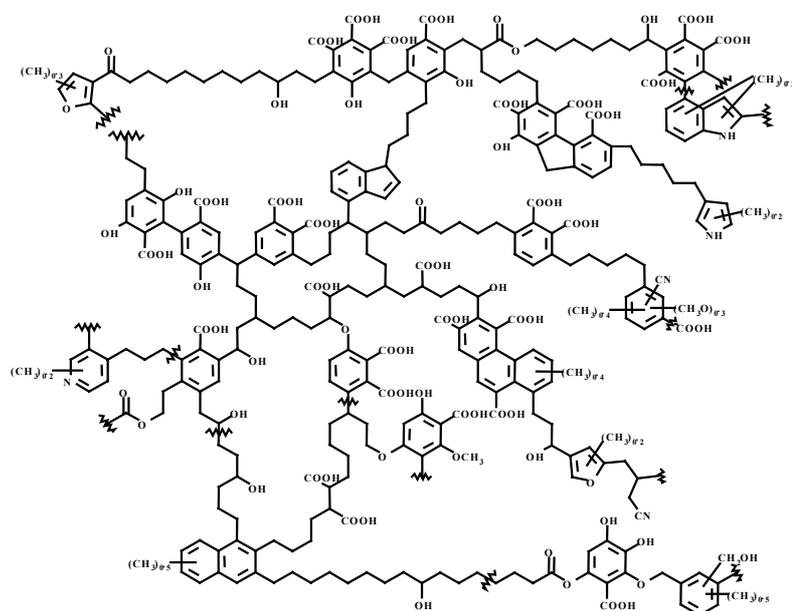


Рис. 1.10. Строение негидролизуемой части молекулы ГК почв (по Шультену) [60].

Детальные исследования с привлечением данных различных методов и рабочих групп были выполнены для характеристики коммерческого препарата ФК из реки Suwannee (США) [66]. На основании полученных данных для этого препарата была

предложена среднестатистическая структурная формула (рис. 1.11). Следует отметить, что данная формула в значительной степени базируется на данных  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектроскопии с применением техник DEPT и QUAT (см. главу 1.2).

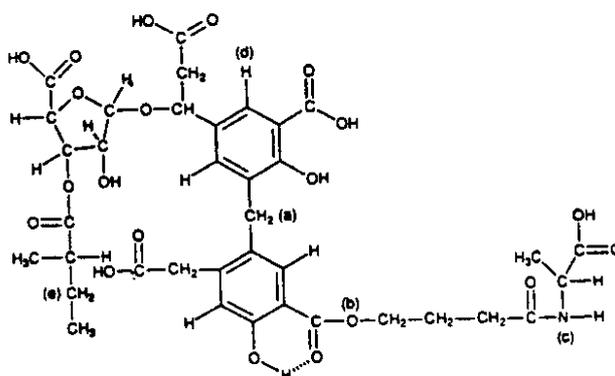


Рис. 1.11. Среднестатистическая структура ФК р. Suwannee [66].

Впоследствии сходное исследование было выполнено для ФК почв [67]. Авторами показано, что предложенная в [66] структурная формула ФК р. Suwannee может быть модифицирована для описания структуры других ФК.

Необходимо отметить, что представление структуры ГФК в виде среднестатистических структурных формул вызывает потерю информации о статистическом строении этих веществ. Более того, как правило, такая молекула не обладает всеми свойствами, присущими ГФК как макрообъекту.

Использование предлагаемых структурных формул в целях исследования количественных взаимосвязей структура-свойство, являющегося насущной задачей современной экотоксикологии, невозможно без параметризации содержащейся в них информации. Вследствие этого для количественной характеристики структуры необходимо снижение уровня дискретизации.

\*\*\*

Изложенный выше материал демонстрирует широкий спектр представлений о структуре ГФК, существующих в настоящее время. Следует особо отметить, что качественные представления о фрагментном составе ГФК на уровне атомов углерода с ближайшим окружением довольно близки, а предлагаемые при дальнейшей детализации блок-схемы и структурные формулы сильно разнятся между собой [64]. Это тесно связано с неколичественностью данных, предоставляемых деструктивными методами анализа [30]. В связи с этим исключительно важное значение приобретают недеструктивные методы исследования, позволяющие определить количественное соотношение структурных фрагментов в структуре немодифицированного вещества [50]. При этом

особое внимание должно уделяться количественной достоверности данных. С нашей точки зрения, на сегодняшний момент оптимальным уровнем детализации для достоверной количественной характеристики структуры ГФК является описание на уровне атомов углерода с ближайшим окружением. На сегодняшний день наиболее мощным неdestructивным методом количественного структурного исследования, предоставляющим информацию именно в таком виде, является спектроскопия ЯМР, применению которой для характеристики ГФК посвящена следующая глава.

## 1.2. Исследование структуры ГФК методом спектроскопии ЯМР.

### 1.2.1. Спектроскопия $^{13}\text{C}$ ЯМР.

Трудно переоценить роль спектроскопии  $^{13}\text{C}$  ЯМР в получении информации о структуре ГФК. В 50-х - 70-х годах нынешнего столетия принципы строения углеродного скелета ГФК оставались предметом оживленной дискуссии, в которой часть исследователей придерживалась концепции об алифатическом характере структуры ГФК, а другая часть рассматривала структуру ГФК как исключительно ароматическую. Получение в 1976 г. первого спектра  $^{13}\text{C}$  ЯМР ГФК почв [68] позволило дать однозначный ответ на вопрос о строении углеродного скелета этих соединений, показав, что в нем в сопоставимых количествах содержатся как ароматические, так и алифатические фрагменты. Впоследствии эти данные были подтверждены для ГФК различного происхождения многочисленными исследованиями. В  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрах ГФК были обнаружены сигналы, отнесенные к разнообразным фрагментам структуры этих веществ, что позволило существенно углубить качественные знания о фрагментном составе ГФК [69, 70].

Типичный  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектр ГФК приведен на рис 1.12. Как видно из рисунка, полидисперсность и химическая гетерогенность ГФК приводит к тому, что  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектры этих соединений не содержат разрешенных сигналов, относимых к ядрам  $^{13}\text{C}$  определенного типа, а представляют собой суперпозицию большого числа слабовыраженных сигналов.

В связи с этим традиционная в спектроскопии ЯМР задача отнесения индивидуальных сигналов не является актуальной в случае спектров ГФК [71]. Общий подход к анализу такого рода спектров предусматривает выделение в них групп сигналов или спектральных областей, соответствующих атомам углерода со сходным химическим окружением, и определение сравнительной интенсивности этих областей. Как видно из рис. 1.12, в типичном  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектре ГФК наблюдается лишь один отчетливый минимум с нулевой интенсивностью сигнала при 90 м.д., в остальных случаях невозможно провести точное разделение различных групп сигналов из-за их частичного перекрывания. В связи с этим выбор разбиения спектров ГФК на группы сигналов представляет собой неоднозначную задачу. Для выбора границ разбиения анализируют положение локальных минимумов в спектрах ГФК и

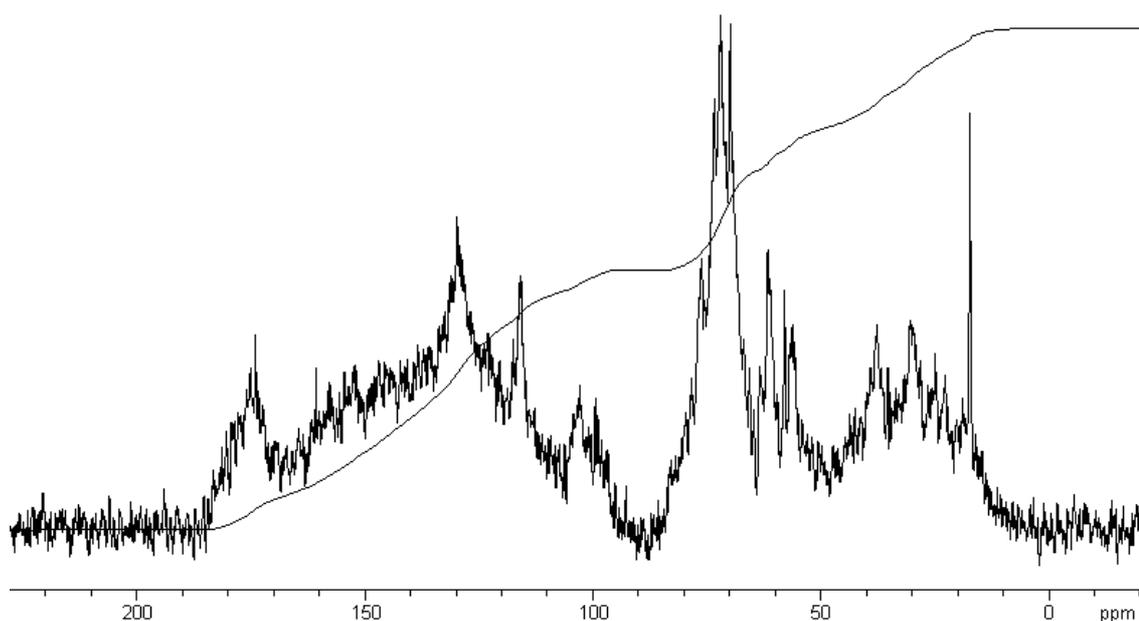


Рис. 1.13. Типичный  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектр ГК почв.

привлекают табличные данные по химическим сдвигам ядер  $^{13}\text{C}$  в органических соединениях в сочетании с имеющейся информацией об основных структурных элементах ГК [72, 73].

Наиболее распространенным является выделение в  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектре ГК пяти наиболее удовлетворительно разделенных диапазонов химических сдвигов, соответствующих незамещенным и О-замещенным алифатическим, ароматическим, карбоксильным и карбонильным атомам углерода (табл. 1.4).

Таблица 1.4.

Основные диапазоны сигналов в спектре ГК [74].

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

В зависимости от цели исследования и желаемой детализации получаемой информации перечисленные в табл. 1.4 основные спектральные диапазоны часто подразделяют на более узкие (табл. 1.5). При этом детализация спектральной информации сопровождается снижением достоверности определяемого количественного состава [70, 72]. Данное обстоятельство обуславливает проблему оптимизации выбора соотношения информативности и достоверности при обработке  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектров ГФК, которая в настоящее время решается каждым исследователем сугубо индивидуально.

Таблица 1.5.

Выделение узких диапазонов сигналов в спектрах  $^{13}\text{C}$  ЯМР ГФК [69].

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

Важно отметить принципиальную нестрогость количественного анализа спектра ГФК при разбиении на диапазоны в связи с невозможностью количественного учета перекрывания групп сигналов. В случае низкомолекулярных соединений для разделения набора перекрывающихся сигналов используют аппроксимацию пиков лоренцевыми кривыми [74]. Для спектров полимеров описаны подходы к такому разделению, основанные на аппроксимации гауссовыми кривыми [75]. Однако, в связи с тем, что в

спектрах ГФК форма пиков в общем случае не является ни лоренцевой, ни гауссовой, а в ряде случаев невозможно определить и положение пиков при детальном разбиении, применение такого подхода не позволяет получить существенного повышения точности и надежности количественного анализа спектров.

Следует отметить, что отнесение некоторых групп сигналов до сих пор является предметом дискуссии. Так, группу сигналов в области 90-110 м.д. длительное время относили к незамещенным ароматическим атомам С в орто-положении к гидроксильной группе. Однако, в последние годы преобладает мнение, что большая часть этих сигналов обусловлена атомами углерода ацетального типа в полисахаридных циклах периферии ГФК. В области 48 - 60 м.д. некоторые исследователи выделяют группу сигналов N-замещенного углерода метиленовых групп, однако отделить эти сигналы от находящихся в этой же области сигналов незамещенных СН-групп представляется невозможным без применения специальных импульсных методик.

Химические сдвиги большинства сигналов ядер  $^{13}\text{C}$  не зависят от выбора условий регистрации спектра и растворителя. Однако сигналы карбоксильных групп и атомов ароматического углерода, замещенного ОН-группой, при переходе от органических апротонных растворителей к воде и растворам щелочей смещаются в слабое поле в связи с ионизацией соответствующих групп. По данным работы [76], химические сдвиги ядер  $^{13}\text{C}$  СООН групп и Ag-ОН фрагментов в спектрах ГФК в ДМСО и NaOD/D<sub>2</sub>O могут различаться на величину до 5 м.д.

### **1.2.2. Фрагментный состав ГФК различного происхождения по данным $^{13}\text{C}$ ЯМР**

На протяжении двух десятилетий основной областью применения спектроскопии  $^{13}\text{C}$  ЯМР для анализа ГФК остается количественная характеристика относительного содержания различных структурных фрагментов в молекулах ГФК. Данные по количественному определению фрагментного состава ГФК различного происхождения приведены в Приложении 1.

Анализ данных  $^{13}\text{C}$  ЯМР дает возможность установить различия в структуре ГК и ФК различных природных источников. Так, согласно данным исследования [89], ГК дерново-подзолистых и серых лесных почв содержат примерно в два раза больше ароматических фрагментов по сравнению с ФК. Аналогичные данные получены в работе [91]. В работах [67, 75, 82, 90, 95, 96] помимо этого отмечается, что ФК почв характеризуются в целом более высоким (на 2-10%) содержанием СООН групп, в то время как содержание алифатических фрагментов в них несколько ниже по сравнению с ГК. Для ГК и ФК черноземов наблюдаются сходные закономерности [97]. Согласно большей части

опубликованных данных, содержание карбогидратных структур в ФК почв превышает таковое для ГК в 1.5-3 раза, однако в ряде работ [67, 82, 95, 96] приводятся результаты исследования, говорящие о том, что содержание карбогидратов в ГК и ФК почв практически идентично.

Одна из возможных причин противоречивости приводимых данных была показана в работе [87]. Автором было проведено исследование структуры ФК почв, выделенных по двум различным общеупотребительным методикам, первая из которых включала выделение в качестве фракции ФК части щелочного экстракта почв, остающейся при осаждении ГК в кислом растворе, а вторая включала стадию сорбции на амберлите XAD-8. Было показано, что в ФК почв, выделенных с использованием XAD-8, содержание карбогидратных структур в 1.5-2 раза ниже. Автором сделан вывод о необходимости стадии сорбции на амберлите при выделении ФК для очистки от полисахаридных примесей.

Косвенным подтверждением сделанного в [87] вывода являются результаты сравнительного исследования структуры ГК и ФК природных вод, выделение которых в обоих случаях включает сорбцию на XAD-8. По данным [87, 66, 75, 104] содержание карбогидратных структур в ФК природных вод находится на уровне такового в ГК или несколько ниже. В то же время прочие закономерности, обнаруженные для ГК и ФК почв, сохраняются для ГК и ФК природных вод. Так, содержание COOH групп в ФК природных вод выше, чем в ГК, а содержание ароматических фрагментов - ниже. Согласно [87, 66] ФК содержат больше алкильных фрагментов, однако данные [75, 104] находятся в противоречии с этим выводом.

В ряде работ было выполнено сопоставление фрагментного состава ГФК различного происхождения. Так, на основании сопоставления результатов  $^{13}\text{C}$  ЯМР исследования структуры препаратов ФК дерново-подзолистых почв и природных вод, в работе [87] показано, что последние характеризуются более высоким содержанием алифатических фрагментов, в то время как фрагментный состав ГК этих природных сред довольно близок. Сходные данные были получены в работе [67].

В работах [77, 109] проводилось сопоставление ГФК торфа и дерново-подзолистых почв. Показано, что ГФК торфа характеризуются более высоким содержанием ароматических и карбогидратных фрагментов, нежели ГФК почв, а содержание карбоксильных и алкильных групп в случае торфа несколько ниже.

Сравнительное исследование структуры ГК бурых углей, ФК и ГК дерново-подзолистых почв, выполненное в работах [100, 67], показало, что содержание COOH групп в ГК угля ниже, чем в ФК почв, однако выше, нежели в ГК почв. По сравнению с

ГФК почв ГК угля характеризуются значительно более высокой ароматичностью, и очень низким содержанием карбогидратных структур.

В работе [84] было выполнено исследование фрагментного состава ГК различных типов почв. При этом был сделан вывод, что почвы тропических регионов содержат меньше ароматических и карбоксильных фрагментов. Результаты исследования приведены в табл. 1.6.

Табл. 1.6.

## Фрагментный состав ГК различных типов почв тропических и умеренных широт

Тип почвы	COOH	Ar	Alk-O	Alk
<b>Тропических регионов</b>				
Интептисоль	10	22	15	53
Ультисоль	8	32	32	28
<b>Умеренных регионов</b>				
Энтисоль	9	34	24	33
Моллисоль	12	37	19	32
Моллисоль	13	41	20	26
Сподосоль	13	55	16	16
Сподосоль	12	33	26	29
Ультисоль	14	36	27	23
Ультисоль	15	38	25	22

В работе [12] указывается, что содержание ароматического углерода, определенное в [84] (табл. 1.6), хорошо согласуется со степенью бензоидности почв Российской федерации, рассчитанной согласно (1.2) как показано в главе 1.1.2.

В работе [101] было показано существование значимой обратной корреляции между содержанием ароматических и карбогидратных структур в молекулах ГФК почв.

В то же время, несмотря на прослеженные во многих работах закономерности, сопоставление данных, полученных различными авторами, практически невозможно. Предпринятая нами попытка применения кластерного анализа к данным приложения 1 показала, что в целом различия данных  $^{13}\text{C}$  ЯМР исследования по количественному содержанию для ГФК различных типов статистически незначимы. Определяемый методом  $^{13}\text{C}$  ЯМР в различных работах фрагментный состав ГФК сходного типа изменяется в очень широких пределах, что едва ли может быть объяснено только структурными различиями препаратов. По всей видимости, результаты различных исследований трудносопоставимы в связи с неколичественностью получаемых спектральных данных. Подтверждением этого тезиса может служить сопоставление приводимых в разных работах результатов исследования структуры коммерческого препарата ГК бурого угля производства фирмы Aldrich и ФК реки Суваннее (табл. 1.7).

Фрагментный состав ГК "Aldrich" и ФК р. Суваннее по данным  $^{13}\text{C}$  ЯМР.

CO	COOH	Ar	Alk-O	Alk	Источник
ФК р. Суваннее					
6	18	33	21	21	[67]
6	19	28	20	27	[66]
7	22	27	13	31	[90]
ГК "Aldrich"					
1	9	39	4	48	[100]
	15	59	9	17	[67]
6	9	26	12	44	[108]

Как видно из таблицы, приводимые данные резко различаются между собой, при этом отличия значительно превышают указываемую авторами погрешность измерения. Столь высокий разброс экспериментально получаемых характеристик фрагментного состава заставил нас провести анализ факторов, влияющих на количественность получаемых спектральных данных, и различий в экспериментальных условиях регистрации спектров  $^{13}\text{C}$  ЯМР ГФК.

### 1.2.3. Проблемы количественной $^{13}\text{C}$ ЯМР спектроскопии ГФК.

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

1. Корректное разделение спектров ГФК на интегрируемые диапазоны, минимизация случайных погрешностей при интегрировании.
2. Регистрация спектров ГФК в условиях, обеспечивающих соответствие интегральных интенсивностей сигналов различных типов ядер в ЯМР спектре их содержанию в образце.

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

#### *Проблемы, возникающие на стадии обработки и преобразования спектров.*

Высокая полидисперсность ГФК, приводящая к «рассеиванию» интенсивности сигналов по всему спектру, оказывает негативное влияние на соотношение сигнал/шум. Этот факт, в сочетании с невысоким природным содержанием изотопа  $^{13}\text{C}$ , низкой чувствительностью данного ядра и ограниченной растворимостью ГФК (20-50 г/л в растворах щелочей), заставляет проводить весьма длительное накопление для получения удовлетворительных с точки зрения соотношения сигнал/шум спектров [110]. Малое значение отношения сигнал/шум приводит, с одной стороны, к возрастанию случайной ошибки интегрирования, с другой – к снижению точности учета искажений базовой линии, ответственных за систематические отклонения [15]. Очевидно, что при интегрировании широких диапазонов перекрывающихся сигналов в спектре ГФК вклад второй ошибки значительно выше.

Наряду с длительным накоплением спада индуцированного сигнала наиболее важными приемами, направленными на увеличение отношения сигнал/шум являются подавление отраженного шума при помощи частотного фильтра, а также экспоненциальное умножение [111].

Однако даже в этом случае величина отношения сигнал/шум для различных областей спектра ГФК, как правило, составляет от 5 до 30 [72, 110], что в соответствии с данными [15] приводит к теоретической величине погрешности интегрирования 5 - 13%.

Ошибка интегрирования, связанная с искажением базовой линии зависит одновременно от особенностей спектрометра, условий эксперимента и исследуемого объекта. Точность ее учета зависит от величины шума, размера участков интерполяции и

правильности выбора аппроксимирующей функции при коррекции базовой линии [112-114].

Коррекция линейных фазовых искажений представляет собой в случае спектров  $^{13}\text{C}$  ЯМР ГФК неоднозначную операцию в связи с отсутствием в спектре выраженных индивидуальных сигналов лоренцевой формы. Данная процедура выполняется оператором вручную и может служить источником последующих ошибок интегрирования.

При интегрировании спектров ГФК особую важность имеет единый подход к корректному разделению спектра на интегрируемые диапазоны. Однако, как уже упоминалось в главе 1.2.1, используемые в различных работах схемы разбиения спектров ГФК в значительной степени произвольны, и могут быть основаны на различающихся значениях границ диапазонов, в общем случае не всегда совпадающими со спектральными минимумами (табл. 1.8).

Различные авторы по разному решали задачу отнесения сигналов, при этом приводимые отнесения как правило выбирались на основании атласов спектральных данных низкомолекулярных соединений [69, 71, 72] или положений локальных минимумов спектров [76, 81, 84]. Различия в отнесении сигналов являются одной из существенных причин несопоставимости приводимых различными авторами количественных данных. Однако, в последние годы было в основном достигнуто единое мнение по поводу деления  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектров ГФК на диапазоны, интервалы химических сдвигов которых приведены в табл. 1.8.

*Анализ используемых различными авторами условий регистрации количественных  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектров ГФК.*

Принципиальная возможность получения корректной количественной информации из спектров ЯМР  $^{13}\text{C}$  может быть реализована только в условиях, обеспечивающих пропорциональность спектральных интенсивностей сигналов атомов углерода различных типов их реальному содержанию в образце. Для установления таких условий определяющее значение имеет информация о релаксационных характеристиках ядер  $^{13}\text{C}$  ГФК [70, 110]. Основными эффектами, вызывающими систематические искажения истинных количественных соотношений между интенсивностями сигналов, являются **насыщение** [117] и **ядерный эффект Оверхаузера** [118].

Различные подходы к определению границ интегрируемых диапазонов сигналов в спектрах  $^{13}\text{C}$  ЯМР ГФК.

Отнесение сигналов атомов углерода	Обозначение	Границы диапазонов, м.д.	
		Нижняя	Верхняя
С- и Н-замещенные алифатические атомы углерода	$C_{\text{Alk}}$	0-5	48-60
О-замещенные алифатические атомы углерода	$C_{\text{Alk-O}}$	48-60	90-110
в том числе:			
Атомы углерода метоксильных групп	$C_{\text{CH}_3\text{O}}$	48-55	59-60
О-замещенные атомы углерода метиленовых групп	$C_{\text{CH}_2\text{-O}}$	59-60	64-68
О-замещенные атомы углерода метиновых групп	$C_{\text{CH-O}}$	64-68	90
Атомы углерода ацетальных групп	$C_{\text{O-C-O}}$	90	105-110
Ароматические атомы углерода	$C_{\text{Ar}}$	90-110	160-170
в том числе:			
С- и Н-замещенные ароматические атомы углерода	$C_{\text{Ar}}$	90-110	140-145
О-замещенные ароматические атомы углерода	$C_{\text{Ar-O}}$	140-145	160-170
Атомы углерода карбонильных фрагментов	$C_{\text{C=O}}$	160-170	220-230
в том числе:			
Атомы углерода карбоксильных групп и их производных	$C_{\text{COOH}}$	160-170	170-187
Атомы углерода кетонных, хинонных и альдегидных групп	$C_{\text{C=O}}$	180-187	220-230

**Насыщение** возникает в случае, если энергия, прилагаемая к спиновой системе, в среднем превышает энергию, рассеиваемую ей в окружающую среду путем релаксации [119]. Мерой подаваемой энергии в импульсной спектроскопии ЯМР служит угол поворота намагниченности  $\theta$ , а мерой эффективности спин-решеточной релаксации - характеристическое время ( $T_1$ ) экспоненциального восстановления намагниченности  $M_z$ :

$$M_z = M_0 [1 - \exp(-t/T_1)], \quad (1.4)$$

где  $t$  - время,

$M_0$  - равновесное значение намагниченности ядра.

При заданной относительной погрешности  $\sigma$  и угле  $\Theta = \pi/2$  время необходимой релаксационной задержки ( $T_d$ ) должно удовлетворять условию [15]:

$$T_d \geq \ln(100/|\sigma|)T_1 \quad (1.5)$$

Очевидно, что в случае использования недостаточного времени задержки спины ядер атомов углерода, характеризующихся более длительной релаксацией, не успевают восстановить первоначальную ориентацию, и относительная интенсивность их сигналов в спектре будет занижена [110]. Для получения количественных спектров рекомендуется использовать  $T_d$  не менее  $3T_1$ .

Следует отметить, что корректное определение времени релаксации различных типов ядер в препаратах ГФК представляет собой трудную экспериментальную задачу по причине значительного перекрытия сигналов [110, 120, 103]. В связи с этим, с точки зрения поиска экспериментальных условий количественного определения ядер  $^{13}\text{C}$  более корректно говорить лишь об оценке относительных скоростей релаксации ядер [70, 110].

Времена релаксации ядер  $^{13}\text{C}$  для большинства обычных органических молекул в отсутствие кислорода воздуха измеряются десятками секунд, достигая для четвертичных атомов, удаленных от протонированной периферии молекулы, величин более 120 с. В связи с этим регистрация спектров при использовании достаточного для полной релаксации всех типов ядер  $^{13}\text{C}$  времени задержки импульса практически неосуществима при анализе сложных смесей, требующих длительного накопления сигнала [110].

Величину  $T_1$  можно искусственно уменьшить добавлением в образец парамагнитного вещества (релаксанта) [121], в качестве которого обычно используют ацетилацетонаты хрома или железа [122]. Такой метод широко применяют для анализа нефтей и нефтепродуктов, что позволяет на несколько порядков снизить  $T_1$  для наиболее медленно релаксирующих ядер четвертичных атомов углерода [115]. Однако в водных растворах применение ацетилацетонатов невозможно, а использование вместо них свободных солей переходных металлов вызывает образование нерастворимых гуматов вследствие специфического комплексообразования ГФК с ионами металлов. В литературе не удалось обнаружить работ по использованию релаксантов в спектроскопии  $^{13}\text{C}$  ЯМР ГФК. С другой стороны, специфика ГФК заключается в наличии в самих молекулах этих веществ парамагнитных центров, преимущественно семихинонов, а также ионов железа [85, 66, 12]. В работе [85] отмечалось, что локализация этих центров вблизи наиболее медленно релаксирующих ядер  $^{13}\text{C}$  оказывает нивелирующее воздействие на релаксационные характеристики различных типов ядер  $^{13}\text{C}$  в ГФК. Помимо этого величина  $T_1$  всех типов ядер в структуре ГФК снижается благодаря низкой подвижности макромолекул этих

соединений. Эти факторы делают возможным получение количественных  $^{13}\text{C}$  спектров ЯМР ГФК без добавок релаксанта. При этом определяющим фактором, влияющим на количество получаемых данных остается время задержки между импульсами. Существует ряд работ, посвященных исследованию данной проблемы.

Так, в работе [81] было выполнено исследование влияния  $T_d$  в интервале 0.03-5 с на спектральные интенсивности основных диапазонов  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектра ГК почв, полученного при использовании  $90^\circ$  импульса. Согласно полученным данным, для получения количественных спектров величина  $T_d$  должна быть не ниже 5 с.

В работе [91] было выполнено исследование влияния времени задержки импульса ( $T_d$ ) на интенсивность четырех диапазонов  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектра ГФК в интервале времен задержки 0.1 - 2 с (рис. 1.14). При этом ширина импульса составляла  $45^\circ$ .

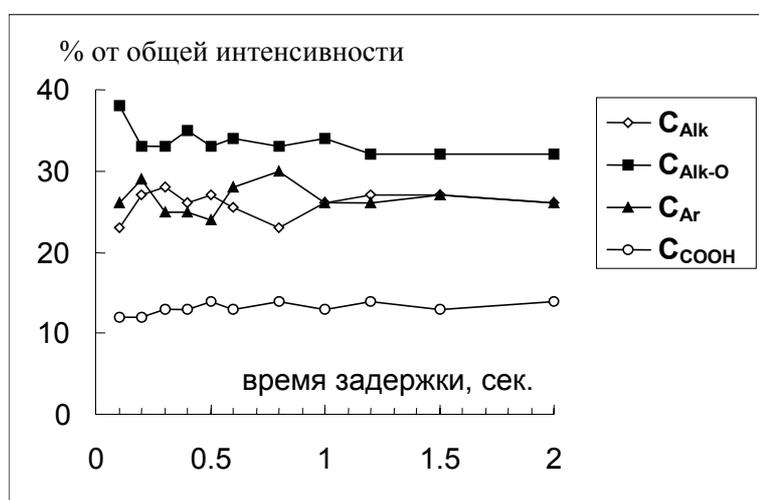


Рис. 1.14. Влияние времени задержки на интенсивность спектральных диапазонов в спектре  $^{13}\text{C}$  ЯМР ГФК. [91]

Согласно данным, полученным в этой работе, увеличение времени задержки свыше 1 с не вызывало изменений в относительной интенсивности указанных спектральных диапазонов. Аналогичные данные были получены в работе [85]. Авторы [91, 85] сделали вывод, что использование  $T_d=0.5-1$  с позволяет получать количественные  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектры ГФК. В работе [91] подчеркивалось, что дальнейшее увеличение времени задержки невыгодно, так как при этом существенно возрастают временные затраты на регистрацию спектров.

Следует отметить, что спектры с  $T_d=0.1-0.5$  с задержкой, полученные в перечисленных работах, имели крайне невысокое качество. Этот факт не позволяет однозначно оценить достоверность сделанных заключений и безоговорочно принять рекомендации авторов.

Наиболее подробное исследование влияния релаксационной задержки на интегральные интенсивности различных областей спектра было выполнено в работе [66]. Авторами были зарегистрированы спектры растворов препаратов ГК и ФК речных вод в  $^{12}\text{C}$  ДМСО в интервале  $T_d$  от 0.2 до 10 с при использовании  $90^\circ$  импульса. Полученные данные позволили оценить величину  $T_1$  для различных типов углерода в обоих препаратах (табл.1.9).

Таблица 1.9.

Времена спин-решеточной релаксации для ядер  $^{13}\text{C}$  в структуре ФК и ГК речных вод [403].

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

Авторы рекомендуют для получения количественных  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектров ГФК использовать  $T_d$  порядка 6 с. Однако данные о скорости релаксации, полученные для растворов ГФК в ДМСО, вряд ли корректно переносить на водные растворы без дополнительной проверки. Одной из причин, осложняющих применение вышеизложенной информации может быть различное содержание парамагнитных центров в растворах ГФК в воде и органических растворителях [90].

Серьезная проблема, возникающая при интерпретации подобного рода данных, связана с фрагментной неоднородностью исследуемых областей спектра. В работе [70] был проведен анализ изменения высоты 12-ти наиболее интенсивных пиков в спектре ГК почв при увеличении времени задержки от 0.5 до 20 с. При этом было показано, что группы сигналов в пределах одной спектральной области характеризуются значительно различающимися скоростями релаксации. Таким образом, выбор времени задержки в значительной мере может определяться желаемой детализацией спектральной информации.

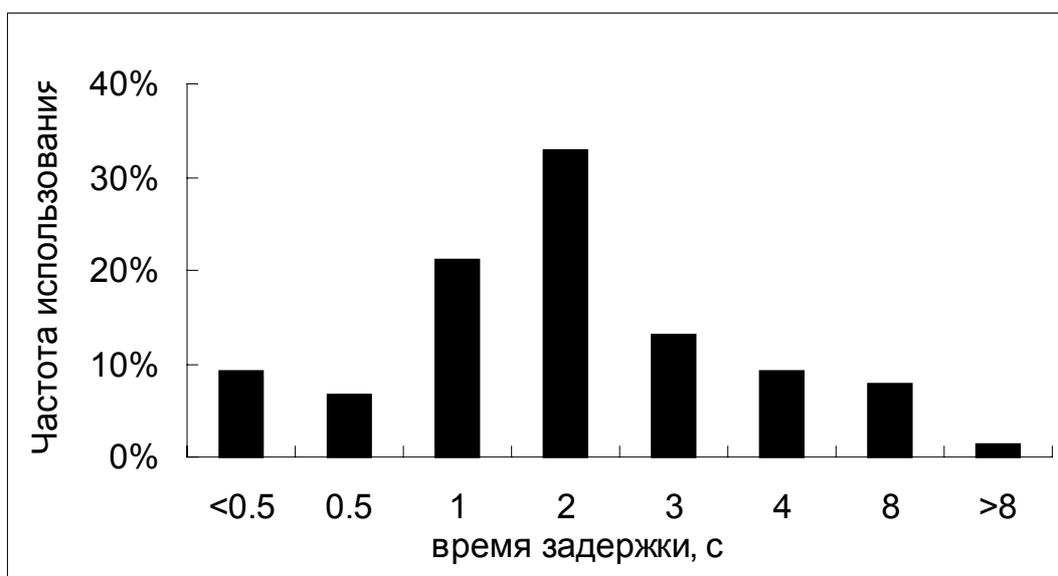


Рис. 1.15. Статистика использования различных времен в  $^{13}\text{C}$  ЯМР ГФК задержки в 56 работах (1984 - 1997 г.г.)

Таким образом, в настоящий момент не существует единого мнения относительно величины оптимального времени задержки между импульсами, позволяющего получать количественные спектры  $^{13}\text{C}$  ЯМР ГФК с высоким соотношением сигнал/шум при разумных затратах времени на регистрацию спектра, а используемый различными исследователями диапазон времен релаксационной задержки крайне широк (рис. 1.15).

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

Наиболее важный для количественного анализа ГФК случай проявления **ядерного эффекта Оверхаузера** - регистрация спектров ЯМР  $^{13}\text{C}$  в условиях полной развязки от протонов [118]. Фактор ЯЭО ( $\eta$ ) рассчитывается по формуле:

$$\eta = (I^{\text{ЯЭО}} - I)/I, \quad (1.6)$$

где  $I^{\text{ЯЭО}}$  и  $I$  - интегральная интенсивность сигнала при наличии и в отсутствие ядерного эффекта Оверхаузера, соответственно [110].

Величина  $\eta$  для ядер углерода может достигать максимального значения 1.988, если доминирующий вклад в спин-решеточную релаксацию вносит диполь-дипольный механизм [69]. Благодаря присутствию в молекулах ГФК парамагнитных центров, обеспечивающих эффективный электронно-ядерный механизм релаксации, эта величина в случае ГФК существенно ниже.

Оценка величины фактора ЯЭО для ГК и ФК почв была проведена в работе [91]. Согласно данным, полученным на спектрометре с рабочей частотой 62.8 МГц для ядер  $^{13}\text{C}$ , величина  $\eta$  для различных типов ядер  $^{13}\text{C}$  в структуре ГФК не превышает 1. При этом фактор ЯЭО уменьшается в ряду алифатические - карбогидратные - ароматические - карбоксильные атомы  $^{13}\text{C}$ .

Аналогичная закономерность обнаружена в работе [66], выполненной при рабочей частоте спектрометра 75 МГц для ГК и ФК речных вод (табл. 1.10).

Таблица 1.10.

Факторы ЯЭО для различных областей спектра ГФК речных вод [66]

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

Для устранения ядерного эффекта Оверхаузера широко используемым приемом является выключение шумовой развязки от протонов на период релаксационной задержки [68, 70, 66, 110]. В упомянутых работах сделан вывод, что при этом ядерный эффект Оверхаузера снимается полностью.

Существует метод количественного анализа без сохранения истинных соотношений интенсивностей в спектре - метод весовых факторов, предусматривающий калибровку сигналов по образцам известной концентрации [15]. Этот метод экспрессен, поскольку не требует подавления ядерного эффекта Оверхаузера и позволяет использовать оптимальное соотношение между углом  $\Theta$  и временем повторения импульсов. Принципиально этот метод способен учесть в итоге все систематические ошибки. Однако он требует строгой стандартизации условий эксперимента и условий релаксации всех интересующих ядер, что накладывает серьезные ограничения по составу и концентрации образца, способу приготовления, вязкости и т.д. Тем не менее, существуют работы, обосновывающие применение метода весовых факторов для анализа нефтепродуктов [123]. Однако, применение данного метода для анализа препаратов ГФК представляется на настоящий момент крайне сложной задачей, в первую очередь, с точки зрения выбора калибровочных стандартов, поскольку соответствующие релаксационные характеристики ГФК неизвестны.

### Твердофазная спектроскопия $^{13}\text{C}$ ЯМР ГФК.

В настоящее время общепринятой техникой получения твердофазных  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектров является сочетание перекрестной поляризации с вращением под «магическим углом» (Cross Polarisation Magic Angle Spinning, CPMAS) [69, 70, 110]. Поскольку при регистрации  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектров в твердой фазе достигается максимальная концентрация ГФК, то по сравнению с ЯМР растворов получение спектров аналогичного качества требует значительно меньше времени [124, 110]. В связи со сравнительной дешевизной и экспрессностью данный метод широко применяется для исследования ГФК. Однако, выигрыш в качестве получаемых спектров за счет увеличения соотношения сигнал/шум нивелируется существенно большим уширением сигналов [69, 110, 125]. Данный фактор приводит к еще более значительному перекрыванию спектральных областей, что увеличивает погрешность за счет разбиения спектра на интегрируемые диапазоны [66].

Существенным недостатком твердофазной спектроскопии  $^{13}\text{C}$  ЯМР считается то, что в связи с особенностями метода высока доля непроявляющихся в спектре ядер углерода. По некоторым оценкам количество невидимых ядер может достигать 50-70% общего содержания углерода в структуре ГФК [69, 124], что вызывает обоснованные сомнения в адекватности получаемой структурной информации [30].

Помимо этого, при регистрации CPMAS спектров может возникать значительная непропорциональность интенсивностей групп сигналов содержанию соответствующих атомов углерода в образце. Так, в работе [66] указывается, что причинами этого для ГФК могут являться неблагоприятные соотношения времен, характеризующих скорости кросс-поляризации  $T_{\text{CH}}$  и спин-решеточной релаксации протонов  $T_{1\text{H}}$ ; а также присутствие парамагнитных центров и особенности молекулярного движения. В случае, если каждая интенсивная полоса в CPMAS спектре ГФК характеризуется отличным от остальных оптимальным временем кросс-поляризационного импульса, то получение количественного спектра может оказаться неосуществимым [69, 110, 66].

Хотя широко используемые параметры регистрации CPMAS спектров, основанные на времени контакта 1 мс и релаксационной задержке 1 с позволяют получать количественные  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектры большинства простых органических молекул [126, 127], вопрос о возможности получения в этих условиях количественных спектров ГФК остается предметом дискуссии.

В работах [128-130] при сопоставлении спектров CPMAS и в растворе был сделан вывод, что использование времени контакта 1 мс и релаксационной задержки 1 с позволяют получить количественные CPMAS спектры лигнина, ГФК почв и морских осадков. Эти исследования послужили основой для проведения различными

исследователями многочисленных последующих работ, выполненных в указанных условиях или с незначительной их модификацией. К примеру, в работе [120] указывается, что оптимальное время контакта необходимо подбирать индивидуально для каждого препарата ГФК, при этом оно, как правило, ниже 1 с.

Однако другими исследователями в разное время неоднократно отмечалось, что определяемое из СPMAS спектров ГФК содержание ароматических ядер  $^{13}\text{C}$  обычно ниже такового из спектров растворов ГФК [91, 81, 85, 131, 132]. В работе [66] сообщается, что содержание ароматических фрагментов в ГФК речных вод, определенное из СPMAS спектра в стандартных условиях, было на 50% ниже полученного из спектра раствора этого препарата с длительной релаксационной задержкой. О еще более значительном недоопределении ароматического углерода из спектров СPMAS сообщалось в работе [96]. В работах [66, 132] указывается, что многочисленные данные о содержании ароматического углерода, полученные при помощи метода СPMAS без тщательного анализа количественности получаемых данных, должны рассматриваться с осторожностью.

В работе [120] была высказана противоположная гипотеза, объясняющая получаемую диспропорцию занижением результатов определения алифатического углерода при регистрации спектров ГФК в растворе. Гипотеза предполагает существования в структуре ГФК больших углеводородных радикалов, которые в щелочном растворе оказываются внутри „мицелл" ГФК в связи с конформационными изменениями и могут быть „экранированы" от излучения гидрофильной частью молекул. Однако, по нашему мнению, такое объяснение представляется неубедительным.

Таким образом, результаты спектроскопии  $^{13}\text{C}$  растворов позволяют получать более полную и корректную структурную информацию как в качественном, так и в количественном аспектах. В связи с этим в последнее время все чаще отмечается [132, 66, 110], что данный метод представляется предпочтительным, несмотря на требуемые большие затраты приборного времени.

### 1.2.2. Спектроскопия ПМР.

Задача структурного исследования ГФК методом ПМР спектроскопии, также как и в случае спектроскопии  $^{13}\text{C}$  ЯМР, сводится к выделению групп сигналов, по возможности относящихся к атомам водорода сходного структурного типа и их количественному анализу [110, 70]. Однако спектроскопия ПМР ГФК имеет ряд специфических проблем, в числе которых можно выделить следующие:

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

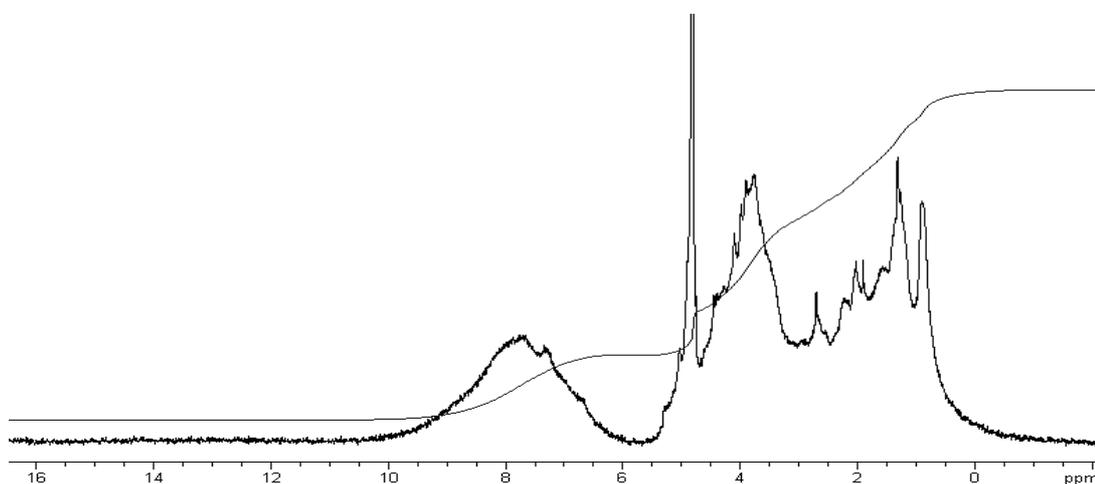


Рис. 1.16. Спектр ПМР ГК почв. Растворитель 0.1 М NaOD/D<sub>2</sub>O. [70]

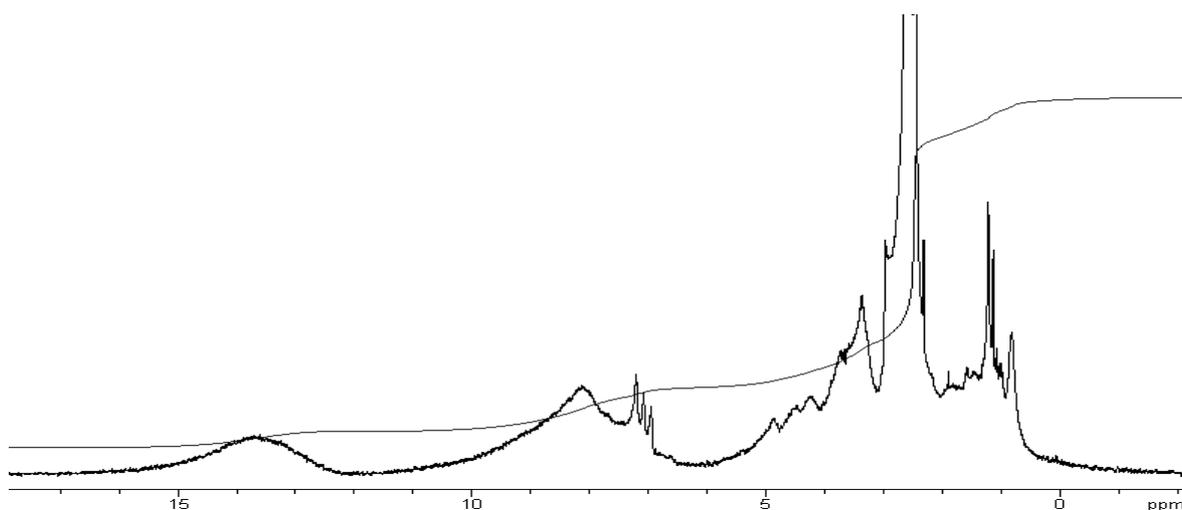


Рис. 1.17. Спектр ПМР ГК почв. Растворитель ДМСО-d<sub>6</sub>. [133]

Обычно растворителем в спектроскопии ПМР ГФК является 0.1 М NaOD/D<sub>2</sub>O. Из органических растворителей для немодифицированных ГФК описано использование

ДМСО-d<sub>6</sub>, ДМФА-d<sub>7</sub> и метанола-d<sub>4</sub> [69, 133]. Общий вид спектров в NaOD/D<sub>2</sub>O и ДМСО-d<sub>6</sub> приведен на рис. 1.16 и 1.17.

В структуре ГФК можно выделить два типа протонов - С-Н протоны, связанные с углеродным скелетом, и протоны функциональных групп [66, 70]. Положение сигналов скелетных С-Н протонов идентично в водных растворах и органических растворителях. Принципиально отлично поведение протонов функциональных групп, способных к быстрому обмену, положение которых в спектре может изменяться в широких пределах [68, 70]. В связи с этим такие протоны часто называют подвижными [68, 70].

В спектрах ГФК наблюдаются две хорошо разрешенные группы сигналов С-Н протонов, соответствующие алифатическим и ароматическим протонам, при этом интенсивность сигналов последних значительно ниже. В алифатической области спектра, представленной группой относительно узких сигналов, обычно выделяют диапазон химических сдвигов протонов О-замещенных алифатических фрагментов СН<sub>n</sub>-О, большая часть которых относится к карбогидратным структурам (в дальнейшем называемых карбогидратными протонами), и протонов незамещенных алифатических структур (далее алифатические протоны).

Так же как и в случае <sup>13</sup>С спектров ГФК, не существует единого мнения о точном положении границ диапазонов сигналов в связи с перекрыванием сигналов протонов различных типов. В табл. 1.11 приведены использовавшиеся различными исследователями разбиения спектров ГФК на области, соответствующие сигналам алифатических, карбогидратных и ароматических протонов.

Некоторыми авторами предлагается проводить разделение спектра ГФК на более узкие области [137]. Пример такого разбиения приведен в табл. 1.12. Следует отметить, что при проведении такого детального разбиения точность количественных результатов снижается в связи с меньшей разрешенностью этих групп сигналов. Кроме того, в ряде случаев разделение довольно субъективно.

Таблица 1.11.

Диапазоны химических сдвигов С-Н протонов в спектрах ПМР ГФК, м.д.

Тип атома водорода				
Алифатические	Карбогидратные	Ароматические	Растворитель	Источник
СН <sub>n</sub>	СН <sub>n</sub> -О	Ar-Н		
0.5-3	3-5	6-8	DMCO-d <sub>6</sub>	[134]
0.5-2.8	2.8-5.5	6-9.5	DMCO-d <sub>6</sub>	[137]
0.8-3	3-4.75	6.4-9	NaOD/D <sub>2</sub> O	[136]
0.5-3	3-5	6-8.4	NaOD/D <sub>2</sub> O	[135]
0.0-3	3-4.3	6-9	NaOD/D <sub>2</sub> O	[138]

Таблица 1.12.

Детальное отнесение сигналов в спектре ГФК в DMCO-d<sub>6</sub> [137]

Тип протонов	Химический сдвиг, м.д.
СН <sub>3</sub> -группы в γ-положении и далее от ароматического кольца или СООН группы	0.5-1.0
СН <sub>3</sub> -группы в β-положении, СН <sub>2</sub> и СН-группы в β-положении и далее от ароматического кольца или СООН группы	1.0-1.9
СН <sub>3</sub> , СН <sub>2</sub> и СН-группы в α-положении к ароматическому кольцу или СООН группе*	1.9-2.8
Протоны метоксильных групп и карбогидратов	2.8-4.0
Протоны лактоновых фрагментов**	4.0-5.5
Протоны ароматических колец ***	6.0-10.5
Протоны карбоксильных групп	10.5-13.5

\* В этой же области находится сигнал остаточных протонов DMCO-d<sub>6</sub>

\*\* В настоящее время считается, что основная часть сигналов в данной области относится к протонам спиртовых гидроксидов ГФК [66]

\*\*\*В данной области находятся также сигналы фенольных протонов ГФК [133]

Поскольку в водных растворах происходит быстрый в шкале времени ЯМР обмен подвижных протонов с дейтерием воды, все их сигналы сливаются с пиком НДО (около 4.6 м.д.). В связи с этим невозможно не только отдельное, но и суммарное их определение [66, 110].

Применение апротонных органических растворителей позволяет наблюдать в спектре группы сигналов протонов основных функциональных групп ГФК. Так, в растворе в сухом DMCO-d<sub>6</sub>, протонный обмен протекает медленно в шкале времени ЯМР,

давая возможность наблюдать разделенные пики протонов карбоксильных групп (14-10.5 м.д.), фенольных (10.5 - 7 м.д.) и спиртовых (3.5 - 5 м.д.) гидроксидов [139]. Однако в этом случае широкие пики протонов функциональных групп перекрываются с сигналами скелетных С-Н протонов, не позволяя проводить их отдельное определение. Так, пик спиртовых ОН-протонов накладывается на сигналы „карбогидратных С<sub>Н</sub>-О, а сигнал фенольных ОН-протонов закрывает часть области ароматических. Это не позволяет проводить отдельное определение протонов углеродного скелета и функциональных групп в данных областях.

В работах [15, 146 и 147] было выполнено определение количеств СООН- и фенольных ОН-групп в продуктах гидролиза лигнинов, основанное на сопоставлении их ПМР спектров в гексаметилфосфортриамиде-d<sub>18</sub> (ГМФА) и дейтерохлороформе. Согласно приводимым в [15] данным, использование ГМФА в качестве растворителя позволяет разделить сигналы фенольных гидроксидов и ароматических протонов в спектрах гидролизатов лигнина. Однако, данный метод определения функциональных групп не может быть напрямую применен к анализу ГФК в связи с нерастворимостью последних в хлороформе и ограниченной растворимостью в ГМФА. Работ по применению спектроскопии ПМР для определения подвижных протонов в структуре ГФК, в литературе обнаружить не удалось.

Положение сигналов подвижных протонов ГФК в спектре ПМР крайне чувствительно к присутствию даже следовых количеств воды вследствие ее каталитического действия на процессы протонного обмена [133]. Увеличение количества воды в образце приводит к уширению и сближению сигналов протонов функциональных групп вплоть до полного их слияния. Обычно в спектрах ГФК в органических растворителях наблюдается широкий пик подвижных протонов при 6.5-8.5 м.д. [66]. Чувствительность к присутствию воды является крайне неблагоприятным фактором для спектроскопии ПМР ГФК в связи с упоминавшейся в главе 1.1.1 высокой гигроскопичностью этих соединений. При этом химический сдвиг результирующего сигнала подвижных протонов  $\nu$  определяется соотношением количества протонов функциональных групп и воды [139]:

$$\nu = \chi_{\text{H}_2\text{O}} \nu_{\text{H}_2\text{O}} + \sum (\chi_{\text{COOH}} \nu_{\text{COOH}})_i + \sum (\chi_{\text{ArOH}} \nu_{\text{ArOH}})_i + \sum (\chi_{\text{ROH}} \nu_{\text{ROH}})_i \quad (1.7),$$

где  $\chi$  и  $\nu$  - доля и химический сдвиг подвижных протонов с различным химическим окружением.

Таким образом, для количественного определения С-Н протонов из спектров ГФК в органических растворителях необходимо удаление сигналов подвижных протонов и воды

[66, 69, 70, 110, 142]. Существует ряд работ, в которых эта проблема решалась различными способами.

В работе [133] к раствору ГК почв в ДМСО- $d_6$  для удаления воды были добавлены молекулярные сита. После 10-дневного выдерживания раствора над ситами в спектре ПМР наблюдали уменьшение интенсивности сигнала в ароматической области, при этом в области слабого поля появился слабовыраженный широкий пик. Авторы объясняют полученный эффект тем, что удаление воды из раствора ГК вызвало замедление процессов протонного обмена. В связи с этим сигналы протонов  $COOH$  и спиртовых  $OH$  групп, дававшие до этого один сигнал в ароматической области спектра, сместились в другие области (в частности,  $COOH$  - в слабое поле). Отмечалось, что при добавлении к осушенному раствору ГК небольшого количества воды все сигналы подвижных протонов перешли в интенсивный пик  $H_2O$  при 4 м.д., полностью освободив область ароматических протонов (рис. 1.18).

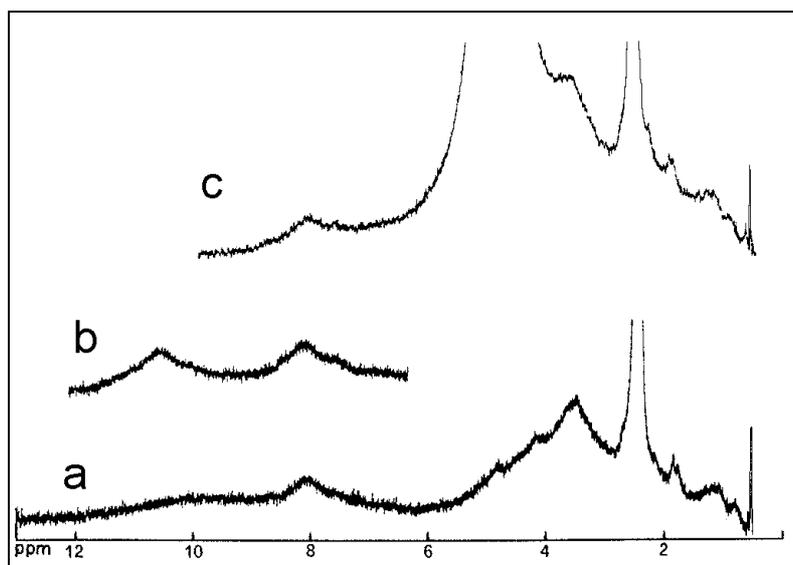


Рис.1.18. ПМР спектр ГК почв в ДМСО- $d_6$ . а) После 5 дней над молекулярными ситами, б) после 10 дней над молекулярными ситами, в) после добавления небольшого количества воды [37].

Однако, полного удаления воды авторам не удалось добиться даже после 10-дневной осушки, пики протонов функциональных групп оставались значительно уширены. В связи с этим описанный способ удаления воды, по-видимому, неприменим.

В работах [140] для устранения перекрытия скелетных протонов использовали смещение сигналов подвижных протонов и воды в слабое поле, происходящее при добавлении к раствору ГФК в ДМСО- $d_6$  дейтеротрифторуксусной кислоты. Кислота аналогично воде ускоряет протонный обмен, однако положение результирующего сигнала

при избытке кислоты смещено в слабое поле. В результате области ароматических и карбогидратных С-Н протонов освобождаются от сигналов подвижных протонов. Аналогичный эффект дает применение DCl [141]. Авторы обеих работ использовали добавление кислоты для удаления интенсивного сигнала воды из карбогидратной области спектра ГФК.

Другой способ удаления сигналов подвижных протонов, использованный в работе [140], основан на предварительном дейтерообмене препарата ГФК. Образец ГФК растворяли в D<sub>2</sub>O, при этом происходит замещение протонов функциональных групп на дейтерий. После отгонки воды и растворения высушенного образца ГФК в DMSO-d<sub>6</sub> в спектре ПМР наблюдается снижение интенсивности областей 6-10 м.д. и 4-6 м.д. по отношению к спектру исходного препарата. Указывалось, что снижение интенсивности области 6-10 м.д. составляет около 35% для ФК почв и около 18% для ГК почв. Авторы объяснили происходящие в спектре изменения замещением С-Н протонов ароматических фрагментов на дейтерий, однако позже было показано [141], что наблюдаемый эффект обусловлен удалением сигналов протонов функциональных групп.

В настоящее время предварительный обмен с D<sub>2</sub>O считается наиболее надежным способом удаления сигналов подвижных протонов и воды из спектров ПМР ГФК в органических растворителях [66].

Таким образом, в спектроскопии ПМР ГФК описан ряд методов удаления сигналов подвижных протонов для определения перекрывающихся с ними сигналов скелетных протонов, однако метода определения водорода функциональных групп на сегодняшний день не существует.

Второй серьезной проблемой осуществления количественной интерпретации ПМР спектров ГФК является присутствие сигнала остаточных протонов растворителя, который даже при использовании растворителей высокой чистоты обычно является самым интенсивным пиком в спектре. Как видно из рисунков 1 и 2, при использовании как NaOD/D<sub>2</sub>O, так и DMSO-d<sub>6</sub>, пик остаточных протонов растворителя перекрывается с сигналами протонов ГФК. Пик остаточных протонов DMSO (2.49 м.д.) накладывается на сигналы протонов ГФК в алифатической области спектра, а широкий сигнал HDO в NaOD/D<sub>2</sub>O спектре (около 4.6 м.д.) закрывает некоторую часть сигналов „карбогидратных протонов ГФК в области 4-5 м.д. В связи с этим невозможно количественное определение С-Н протонов ГФК в указанных областях.

Широко используемым приемом для решения данной проблемы является подавление сигнала HDO в ПМР спектрах ГФК в NaOD/D<sub>2</sub>O при помощи облучения дополнительным узкополосным импульсом на соответствующей частоте. Типичный

спектр ГФК с подавлением пика HDO приведен на рис. 3. Как показано в работах [69, 70], при этом важно тщательно подбирать интенсивность облучения, так как при избыточной мощности импульсов возникают значительные искажения базовой линии. Для минимизации искажений рекомендуется выключать облучение на время считывания спада свободноиндуцированного сигнала [70]. Основным недостатком использования такой методики является то, что вместе с сигналом растворителя частично происходит подавление сигналов протонов ГФК, находящихся вблизи частоты облучения [72]. По данным [70, 110] недоопределение карбогидратных протонов ГФК при подавлении пика HDO может составлять 5-15% отн. Тем не менее, данная методика получило широкое распространение при регистрации спектров ГФК в NaOD/D<sub>2</sub>O. В спектрах ПМР ГФК в ДМСО-d<sub>6</sub> подавление пика растворителя не может быть использовано в связи с наличием достаточно интенсивных сигналов ГФК в области 2-3 м.д.

Из вышесказанного следует невозможность определения суммарной интегральной интенсивности протонов ГФК. Как уже упоминалось, при регистрации спектров ГФК в водных растворах в спектре наблюдаются только сигналы С-Н протонов. В связи с неизвестной общей интенсивностью сигналов протонов ГФК в спектре, возможно определить только их относительные содержания. При регистрации спектров в органических растворителях не представляется возможным провести точный учет перекрывания сигналов С-Н протонов с сигналами остаточных протонов растворителя, с одной стороны, и с сигналами подвижных протонов и воды, с другой стороны. Совокупность указанных проблем является причиной того, что на настоящий момент задача количественного определения протонов ГФК при помощи спектроскопии ПМР остается нерешенной.

В связи с вышеизложенным в настоящее время спектроскопия ПМР используется только для определения соотношений количества ароматических, карбогидратных и алифатических протонов из спектров в NaOD/D<sub>2</sub>O [66, 143, 144]. Такие данные трудно сопоставимы с результатами других методов структурного исследования ГФК. В результате сложилось мнение о низкой информативности данного метода применительно к количественному исследованию структуры ГФК [66, 70, 110]. Отсутствие метода количественного определения распределения водорода в структуре ГФК вызвало потерю интереса к спектроскопии ПМР среди исследователей этих веществ, и за последние 10 лет появлялись лишь единичные работы, посвященные этому вопросу. Имеющиеся в литературе данные о распределении скелетных протонов в молекулах ГФК различного происхождения обобщены в табл. 1.13.

Распределение скелетных протонов в структуре ГФК различного происхождения  
[66, 70, 77, 126-145].

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

Как видно из таблицы, ГФК различного происхождения характеризуются отличающимся распределением водорода, связанного с углеродным скелетом молекул. В связи с этим такие соотношения могут быть использованы для идентификации препаратов ГФК наряду с другими параметрами. Так, ГК почв и торфа характеризуются более высокими значениями соотношения  $C_{Ar-H}/C_{Alk-H}$ , а ГФК морских вод практически не содержат ароматических протонов. Следует отметить, что величина  $CH_n-O/CH_n$  более сильно изменяется внутри каждого класса исследованных гумусовых веществ. В связи с этим можно рассматривать первое соотношение как характеристику, определяющуюся типом ГФК, а величину  $CH_n-O/CH_n$  - как индивидуальную характеристику препарата, зависящую от свойств конкретного природного объекта внутри данного класса ГФК. Однако, интерпретация этих величин может быть неоднозначной, так как отношение  $C_{Ar-H}/C_{Alk-H}$ , к примеру определяется как содержанием ароматических фрагментов в структуре ГФК, так и степенью замещения ароматических колец.

\* \* \*

На основании проанализированных литературных данных можно сделать вывод, что несмотря на широкое применение спектроскопии ЯМР для исследования структуры ГФК, вопросам получения количественной информации уделяется недостаточно внимания как в случае спектроскопии  $^{13}C$  ЯМР, так и в случае ПМР. В то же время существующая необходимость использования данных спектроскопии ЯМР при описании количественных взаимосвязей структура-свойство настоятельно требует корректной

количественной характеристики структуры ГФК. В связи с вышеизложенным в рамках данной работы были выбраны следующие направления исследований:

- Проведение структурного исследования препаратов ГФК различного происхождения в рамках одной работы методом количественной спектроскопии  $^{13}\text{C}$  ЯМР.
- Разработка метода полного описания распределения водорода в молекулах ГФК при помощи спектроскопии ПМР, включающего определение как скелетных протонов, так и функциональных групп.
- Комплексная обработка структурных данных, полученных различными методами для их перекрестной верификации и расчета на их основе детального фрагментного состава ГФК.

Решению этих задач и была посвящена представленная работа.

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

### 2.1. Выбор препаратов ГФК и характеристика их элементного состава.

В качестве объектов исследования были выбраны ГФК верховых и низинных торфов, ГК черноземных, дерново-подзолистых и серых лесных почв, ФК почв, ГК бурого угля и ГФК природных вод. Такой выбор позволил охватить почти все (за исключением морских вод) важнейшие природные источники ГФК. Внутри каждой группы гумусовых веществ препараты были выбраны по принципу максимального различия условий образования ГФК. Для сравнения было также использовано по одному препарату водных экстрактов торфов и почв, ФК болотных вод и донных отложений, а также нефракционированный препарат ГФК почв.

Твердые препараты ГФК даже в обессоленной форме характеризуются наличием несгораемого остаток (зольность), обусловленный присутствием Na, K, Ca, Mg, Fe, SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и др. Помимо этого они содержат значительное количество влаги. В связи с этим для правильного определения элементного состава ГФК необходимо проведение корректировки первичных данных на несгораемый остаток и равновесную влажность препаратов.

Для учета влияния влажности на результаты определения элементного состава препаратов ГФК проводили анализ уравновешенных с влагой воздуха образцов, предварительно определяя их влажность согласно методике, описанной в [16], и корректируя на нее первичные данные элементного анализа. Для различных образцов влажность составляла 6-9%.

Исходя из полученных величин влажности, были рассчитаны поправки к содержанию элементов по следующим формулам [16]:

$$\Delta a = \frac{x \cdot a}{100 - x}; \quad \Delta h = \frac{(9h - 100)x}{9(100 - x)}; \quad \Delta q = \frac{(9q - 800)x}{9(100 - x)}, \quad (2.1)$$

где  $a$  – процентное содержание С, N

$x$  – влажность образца, %;

$h$  – процентное содержание Н;

$q$  – процентное содержание О;

$\Delta$  – соответствующие поправки на влажность.

Величина поправок составляла для С – от +3 до +6% (абс.); для Н от –0.4 до –0.7%; для О от –3 до –6%. Эти значения являются весьма существенными, т.к. они сопоставимы с диапазонами колебания содержаний элементов в пределах одного класса ГФК.

В связи с присутствием в препаратах ГФК несгораемого остатка (1-15%) нами была выполнена корректировка данных элементного анализа с учетом этого фактора. Как показано в работе [16], в условиях стандартного определения элементного состава на С, Н, N - анализаторах в случае ГФК полнота сгорания не достигается. Это влечет за собой недоопределение содержания С, N и Н, а также вызывает завышение содержания О при использовании метода расчета по разности согласно формуле (1):

$$O = 100\% - C - N - H - n/o \quad (2.2)$$

где n/o - содержание несгораемого остатка.

В то же время в условиях прямого определения кислорода при правильном выборе калибровочного стандарта (содержание кислорода в калибровочном веществе должно находиться в том же диапазоне, что и в анализируемых пробах) обеспечивается полнота определения. Нами было использовано определение кислорода с использованием в качестве стандарта сульфаниловой кислоты, удовлетворяющей этому условию.

На основании вышеизложенного для корректировки на несгораемый остаток исправленных на влажность данных элементного анализа была предложена следующая схема расчета:

$$A_{\text{корр}} = A_{\text{вл}} \times (100\% - O_{\text{вл}}) / (C_{\text{вл}} + H_{\text{вл}} + N_{\text{вл}}), \quad (2.3)$$

где  $A_{\text{корр}}$  - содержание элемента в пересчете на сухую беззольную пробу ( $A=C, H, N$ )

$A_{\text{вл}}, O_{\text{вл}}, C_{\text{вл}}, H_{\text{вл}}, N_{\text{вл}}$  - скорректированные на влажность процентные содержания этих элементов.

Результаты определения содержания кислорода корректировке на несгораемый остаток не подвергались.

Согласно приведенной схеме был рассчитан элементный состав использовавшихся препаратов ГФК в пересчете на сухую беззольную пробу. Полученные результаты приведены в табл. 3.1.1.

## Описание и элементный состав (масс. %) препаратов ГФК

Препарат	Описание	С	Н	N	О	Н/С	О/С
ГК дерново-подзолистых и серых лесных почв							
НВW	ГК дерново-подзолистой почвы (лес)	51.1	4.2	5.2	39.4	0.99	0.58
НВР	ГК дерново-подзолистой почвы (пашня)	52.0	4.6	5.2	38.2	1.06	0.55
НВG	ГК дерново-подзолистой почвы (огород)	55.1	5.1	4.7	35	1.11	0.48
НВWN	ГК дерново-подзолистой почвы (лес)	54.3	4.6	4	37.1	1.02	0.51
НGW	ГК серой лесной почвы (лес)	49.2	4.3	5.0	41.5	1.04	0.63
НGP	ГК серой лесной почвы (пашня)	48.3	4.2	4.8	42.7	1.05	0.66
ГК черноземов							
НС	ГК чернозема лугового	54.3	3.9	4.6	37.2	0.86	0.51
НST	ГК чернозема типичного	54.8	3.5	4.0	37.8	0.77	0.52
НMG	ГК лугово-глеевого чернозема	54.9	4	2.6	38.5	0.87	0.53
ФК почв							
FA1N	ФК дерново-подзолистых почв (лес)	51.9	4.3	2	41.8	0.99	0.60
FA3N	ФК дерново-подзолистых почв (огород)	50.7	4.4	2.6	42.3	1.04	0.63
ГФК торфа							
T1	ГФК верхового фускум-торфа	52.1	4.5	2.0	41.4	1.04	0.60
T4	ГФК верхового сфагнум-торфа	54.0	4.8	2.3	38.9	1.07	0.54
T5	ГФК верхового торфа	51.3	4.5	2.2	42	1.05	0.61
T6	ГФК верхового пушицевого торфа	53.5	4.2	1.3	41	0.94	0.57
T7	ГФК верхового фрезерного торфа	54.8	4.4	1.7	39.1	0.96	0.54
T10	ГФК низинного осокового торфа	50.9	4.2	3.2	41.7	0.99	0.61
НTL	ГФК верхового сосново-пушицевого торфа	52.2	4.3	1.7	41.8	0.99	0.60
TTL	ГФК низинного древесного торфа	51.1	4.1	2.5	42.3	0.96	0.62
НТО	Коммерческий препарат НПО Биолар	52.7	4.6	2.8	39.9	1.05	0.57
ГФК природных вод							
FMX-8	ГФК р.Москва	51.2	4.9	1.6	42.3	1.15	0.62
FIX-8	ГФК р.Истра	52.7	5	1.6	40.7	1.14	0.58
FG1FA	ФК грунтовых вод	54.6	5.2	1.0	39.2	1.14	0.54
ГК бурого угля							
AGK	Коммерческий препарат АО Спецбиотех	59	4.6	0.5	36	0.94	0.46
ANA	Коммерческий препарат Aldrich	57.5	4.6	0.7	37.2	0.96	0.49
Прочее							
BS1FA	ФК водного экстракта почвы	53.2	4.5	0.7	41.6	1.02	0.59
SEL	ГФК почвы	51.4	4.4	4.1	40	1.03	0.58
НTW	ОВ водного экстракта верхового торфа	50.6	6.3	1.7	41.4	1.49	0.61
HO10FA	ФК болотных вод	53.8	4.5	0.9	40.8	1.00	0.57
FWME-4	ОВ болотных вод	52.5	4.9	1.7	40.9	1.12	0.58
SWM4	ГФК болотных донных отложений	50.1	4.5	1.9	43.5	1.08	0.65

Как видно из данных элементного анализа, основными элементами в структуре ГФК являются С, Н и О, содержание азота и серы на порядок ниже. В связи с этим далее азот- и серосодержащие фрагменты отдельно не рассматривали, а включали их при расчете в число аналогичных кислородсодержащих.

При рассмотрении элементного состава препаратов ГФК различного происхождения можно отметить, что в препаратах ГК черноземов и бурого угля характеризуются наиболее низкими соотношениями Н/С и О/С.

Следует отметить что для препаратов ГК почв рассчитанные содержания О и С хорошо согласуются с эмпирической формулой Д.С. Орлова, полученной им в работе [12] для беззольных препаратов этого класса.

$$O = 82.5 - 0.84C \quad (2.4)$$

## 2.2. Качественная характеристика фрагментного состава ГФК

Для описания структуры ГФК в первую очередь требовалось качественно охарактеризовать основные структурные фрагменты, набором которых могут быть представлены молекулы ГФК. В качестве таких фрагментов мы рассматривали атомы углерода с ближайшим окружением.

Характеристика фрагментного состава была проведена на основании анализа  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектров ГФК, подспектров  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}$  и  $\text{C}$  фрагментов, полученных при помощи импульсных последовательностей DEPT и QUAT, а также двумерных  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY и  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY спектров.

### 2.2.1. $^{13}\text{C}$ ЯМР спектры

На рис. 2.1 приведены  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектры ГФК различных природных источников. Как видно из рисунка, спектры ГФК не содержат индивидуальных пиков, представляя собой суперпозицию большого числа слабовыраженных сигналов. В связи с этим для их интерпретации выделяли нижеперечисленные спектральные области, в которых находятся группы сигналов атомов углерода со сходным химическим окружением:

- 5-48 м.д. - алифатические C- и H-замещенные атомы углерода ( $\text{C}_{\text{Alk}}$ );
- 48-90 м.д. - алифатические атомы углерода, связанные простой связью с гетероатомом (кислородом или азотом), в основном карбогидратного типа ( $\text{C}_{\text{Alk-O}}$ );
- \* 90-108 м.д. - ацетальные атомы углерода, связанные простыми связями с двумя атомами кислорода ( $\text{C}_{\text{O-Alk-O}}$ );
- 108-145 м.д. - ароматические C- и H-замещенные атомы углерода ( $\text{C}_{\text{Ar-H,C}}$ );
- 145-165 м.д. - ароматические O-замещенные атомы углерода ( $\text{C}_{\text{Ar-O}}$ );
- 165-187 м.д. - атомы углерода карбоксильных групп и их производных ( $\text{C}_{\text{COOH(R)}}$ );
- 187-220 м.д. - атомы углерода кетонных и хинонных групп ( $\text{C}_{\text{C=O}}$ ).

Качественное сопоставление полученных спектров показывает отсутствие существенных структурных различий в структуре ГФК различных природных сред. Согласно общему виду спектров, все препараты характеризуются сходным набором структурных фрагментов. Однако число структурных фрагментов ГФК, непосредственно наблюдаемых из спектров  $^{13}\text{C}$  ЯМР, невелико в связи с сильным перекрыванием групп сигналов. Для более

---

\* Подробное обсуждение отнесения диапазона проводится позже.

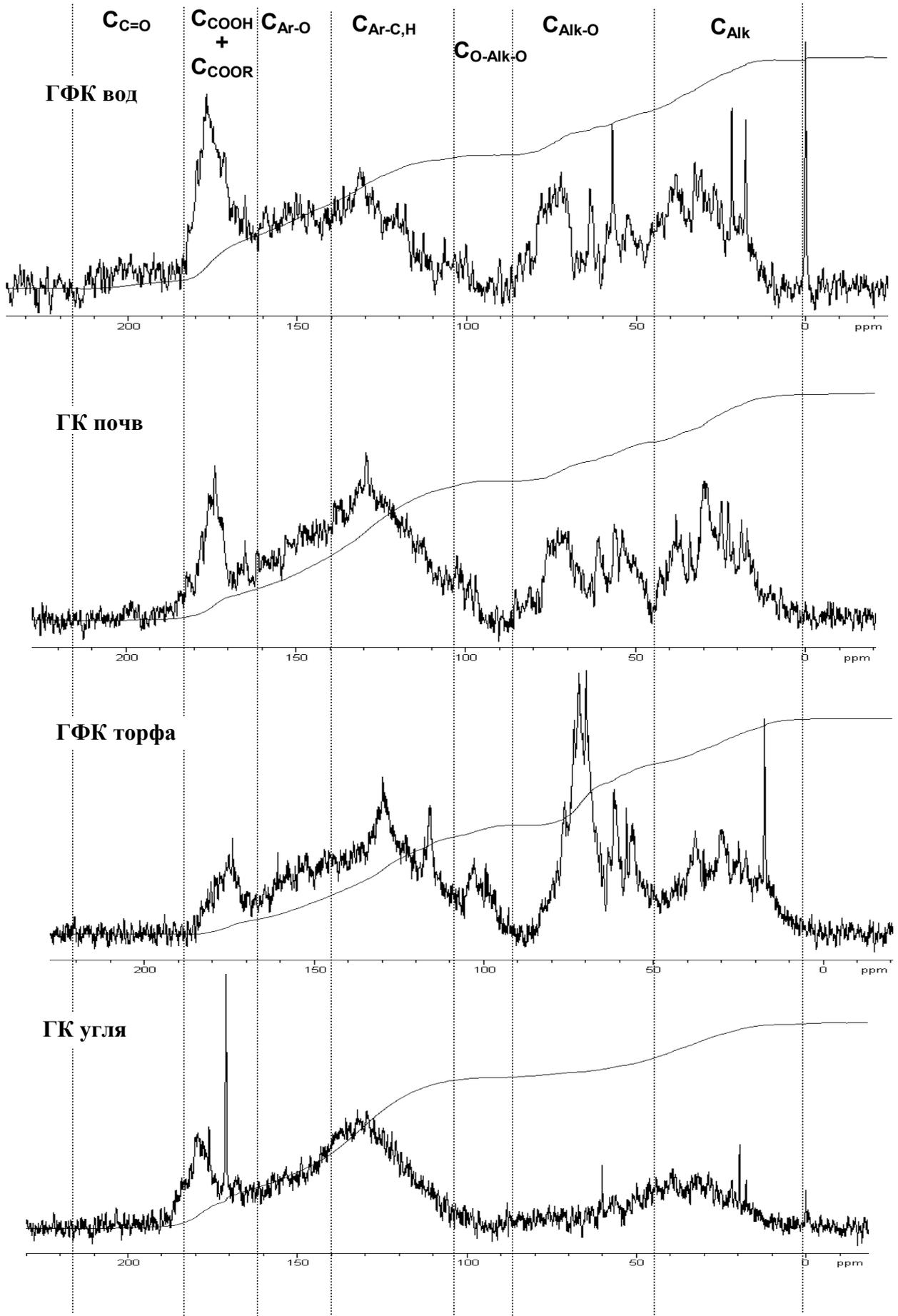


Рис. 2.1. Типичные спектры  $^{13}\text{C}$  ЯМР ГФК различного происхождения.

подробной характеристики фрагментного состава ГФК были получены подспектры  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}$  и  $\text{C}$  фрагментов при помощи импульсных последовательностей DEPT и QUAT.

### 2.2.2. Подспектры, полученные при помощи последовательностей DEPT и QUAT

Импульсная последовательность DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), основанная на переносе поляризации протонов на ядра  $^{13}\text{C}$ , позволяет получать подспектры отдельно для  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$ , и  $\text{CH}_3$  фрагментов. Данные подспектры получают линейной комбинацией спектров, зарегистрированных при  $\tau_1 = 1/2J$ , ширине импульса  $\alpha = \pi/4, \pi/2, 3\pi/4$ , где  $J$  - прямая константа спин-спинового взаимодействия углерод - протон. Относительные коэффициенты для интенсивности в получаемых спектрах сигналов ядер  $^{13}\text{C}$  различной степени протонированности приведены в табл. 2.2.

Табл. 2.2.

Относительные коэффициенты для интенсивности в спектрах DEPT с шириной импульса  $\alpha$  для сигналов ядер  $^{13}\text{C}$  различной степени протонированности

$\alpha$	$\text{CH}$	$\text{CH}_2$	$\text{CH}_3$
$\pi/4$	0.5	1	1
$\pi/2$	1	0	0
$3\pi/4$	0.5	-1	1

Импульсная последовательность QUAT позволяет получить подспектр четвертичных атомов углерода.

Типичные спектры, полученные для препарата FA3 приведены на рис. 2.2.

При рассмотрении подспектров метильных групп можно выделить группу сигналов при 15-30 м.д., по видимому, относящихся к  $\text{CH}_3$  группам, присоединенным к вторичным, третичным и четвертичным алифатическим и ароматическим атомам углерода, а также отчетливый пик метиловых эфиров при 58 м.д.

Метиленовые атомы углерода дают группу сигналов при 25-45 м.д., соответствующую  $\text{CH}_2$  фрагментам, не связанным с гетероатомом, а также пик при 64 м.д., по всей вероятности, соответствующий  $-\text{CH}_2\text{OH}$  и  $-\text{CH}_2\text{OR}$  фрагментам.

В случае метиновых групп наблюдаются группа сигналов при 45-55 м.д., интенсивный пик карбогидратных  $\text{CH}$  при 72 м.д., пик ацетальных  $\text{CH}$  при

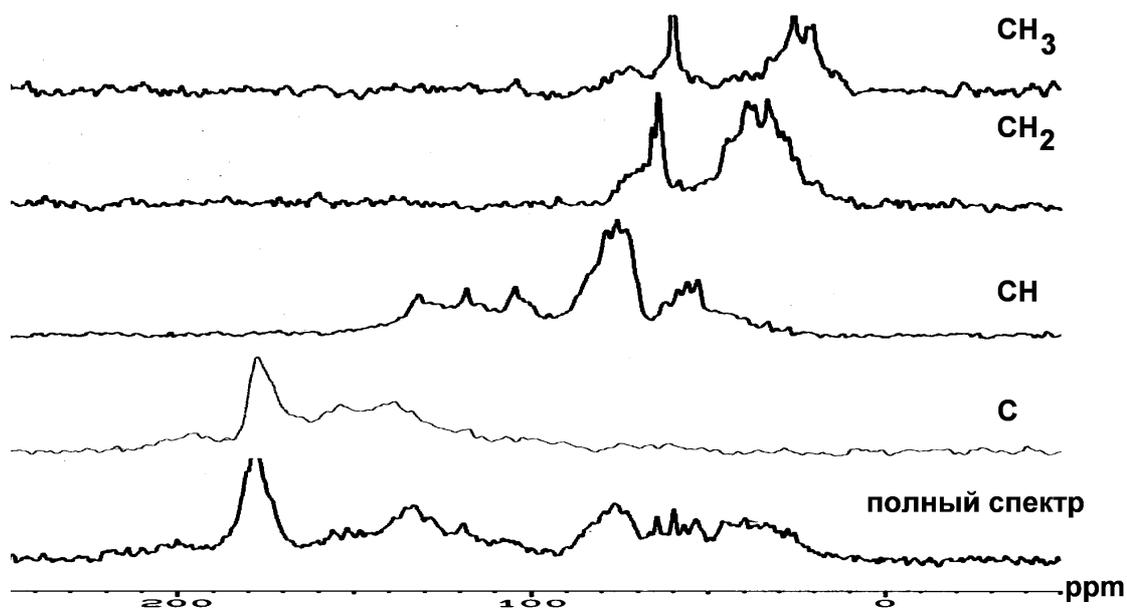


Рис. 2.2. Подспектры  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}$ ,  $\text{C}$  и полный  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектр препарата FA3

105 м.д., а также два широких пика незамещенных ароматических атомов углерода с максимумами при 117 и 130 м.д., первый из которых, по-видимому, относится к  $\text{CH}$  фрагментам в орто-положении к кислородному заместителю. В QUAT-спектре присутствуют слабый уширенный сигнал хинонных групп при 185-205 м.д., интенсивный пик карбоксильных групп и их производных при 175 м.д., а также группа сигналов 110-160 м.д. с максимумами интенсивности при 148 и 130 м.д., соответствующими О- и С-замещенным ароматическим фрагментам.

Анализ подспектров DEPT и QUAT позволил проверить и уточнить разбиение  $^{13}\text{C}$  спектров ГФК на интегрируемые диапазоны, а также позволяет дать заключение о возможности выделения в спектре областей, соответствующих сигналам различных структурных фрагментов. Так, в  $^{13}\text{C}$  спектре ГФК не представляется возможным разделить сигналы незамещенных и С-замещенных атомов углерода в ароматической области ввиду их сильного перекрытия. Однако, как видно из спектра QUAT, возможно с достаточной точностью разделить сигналы С- и О-замещенных ароматических фрагментов. В области 48-90 м.д.  $^{13}\text{C}$  спектра, соответствующей сигналам гетерозамещенных алифатических атомов углерода, раздельное интегрирование сигналов метильных, метиленовых и метиновых фрагментов, предлагаемое рядом авторов [69], представляется необоснованным в связи с довольно существенным перекрытием. В области спектра 0-48 м.д. наложение сигналов метильных и метиленовых фрагментов делает их раздельное интегрирование невозможным.

В подспектрах препаратов НТЛ, НТО, и FMX8 наблюдаются те же самые сигналы, что дает основания предполагать качественное сходство фрагментного состава ГФК различного происхождения.

### 2.2.3. Двумерные спектры ЯМР

Как было показано выше, применение одномерной спектроскопии ЯМР для исследования структуры ГФК основано на выделении групп сигналов атомов сходного структурного типа. Это не дает возможности охарактеризовать детальные различия между атомами, входящими в такие группы, и во многих случаях не позволяет дать однозначное отнесение сигналов из-за их сильного перекрывания. Использование двумерной спектроскопии ЯМР, основанной на регистрации попарных взаимодействий между магнитными ядрами, открывает возможности для проведения такого анализа. Можно выделить два важных типа взаимодействий в спиновых системах: скалярное спин-спиновое взаимодействие, передающееся через химические связи при помощи валентных электронов, и передающееся через пространство диполь-дипольное взаимодействие. Оба типа взаимодействий могут быть использованы для получения двумерных спектров.

Основой двумерной ЯМР спектроскопии является введение второй частотной переменной и регистрация набора спектров в зависимости от изменения последней. Информация о взаимодействии через электроны химических связей отражает последовательность соединения атомов в молекуле. Диполь-дипольное взаимодействие вызывает перенос поляризации между пространственно близкими атомами благодаря ядерному эффекту Оверхаузера, предоставляя информацию о пространственном строении молекул [149].

Анализ двумерных ЯМР-спектров помогает при интерпретации сложных одномерных спектров ГФК. С другой стороны, двумерные ЯМР спектры позволяют осуществить более детальную качественную характеристику фрагментного состава ГФК. Однако получение количественных данных из двумерных спектров таких сложных соединений на настоящий момент является практически неразрешимой задачей.

Двумерная ЯМР спектроскопия широко применяется для анализа биологических объектов, однако использованию этого метода для исследования ГФК посвящены лишь единичные работы [149, 150].

В большинстве двумерных ЯМР экспериментов проводится установление корреляции химического сдвига одного ядра с химическим сдвигом другого благодаря спин-спиновому взаимодействию между ними. Описано получение двумерных гетероядерных  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  и гомоядерных  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  двумерных спектров ГФК.

*Двумерные  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  НМРС спектры ГФК*

Двумерная спектроскопия  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  НМРС (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) позволяет получать корреляционные сигналы непосредственно связанных ядер  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . Типичный спектр НМРС, полученный для препарата ФАЗ, приведен на рис. 2.3. Отнесение сигналов в  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  НМРС спектре приведено в табл. 2.3.

Полученные данные подтверждают отнесения, сделанные при рассмотрении подспектров DEPT.

Кроме того, на основании  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  НМРС спектров было дано отнесение сигналов в области 90-108 м.д. в  $^{13}\text{C}$  спектре, в которой, как было показано при рассмотрении подспектров DEPT, наблюдаются сигналы СН фрагментов. Наличие корреляционного пика 102/5.1 свидетельствует о том, что данные сигналы относятся к ацетальным атомам углерода  $\text{C}_{\text{O-alk-O}}$ . В литературе имеются и другое мнение по поводу отнесения этих сигналов - в частности, эти сигналы относят к незамещенным атомам углерода ароматического кольца в орто-положении к которым находятся два ОН-заместителя. Однако отсутствие корреляционных пиков между сигналами  $^{13}\text{C}$  ядер в области 90-108 м.д. и ароматических протонов (6.5-8.5 м.д.) противоречит такому отнесению.

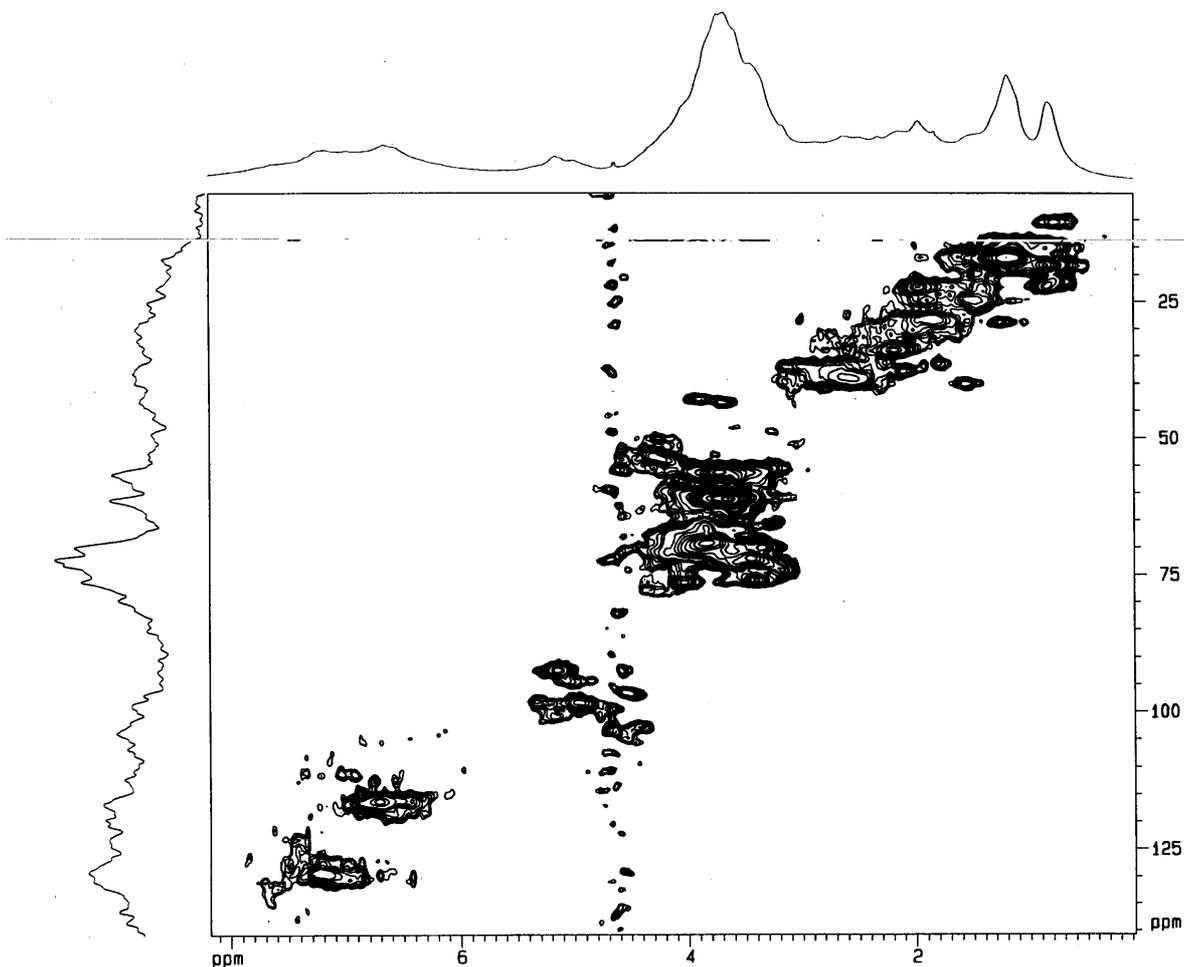


Рис. 2.3. Двумерный  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  НМРС спектр препарата ФАЗ.

Таблица 2.3.

Отнесение корреляционных пиков в  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрах ГК почв.

Химический сдвиг		Отнесение
$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	
0.7	10, 15	$\text{CH}_3$ -группы, связанные с $\text{CH}_2$ - и $\text{CH}$ -фрагментами алкильных радикалов
	18	$\text{CH}_3$ -группы, связанные с $\text{CH}$ -фрагментами алициклических структур
	22	$\text{CH}_3$ -группы, связанные с ароматическим кольцом
1.5	17-40	$\text{CH}_2$ -группы алкильных радикалов
1.2-2.4	17-42	Группа неразрешенных сигналов $\text{CH}_n$ -групп в $\alpha$ , $\beta$ и $\gamma$ -положениях к ароматическим и карбоксильным заместителям
3.7	58	$\text{CH}_3$ -O группы
3.7	64	$\text{CH}_2$ -OH группы
4.2	54	Гетерозамещенные $\text{CH}_n$ -группы в аминокислотах
5.1	103	Ацетальные фрагменты циклических полисахаридов
6.6	118	Ароматические $\text{CH}$ группы в орто-положении к кислородному заместителю
7.2	130	Прочие ароматические $\text{CH}$ группы

Следует отметить, что в алифатической области спектра пик, соответствующий полиметиленовым цепям (28/1.2) не имеет высокой интенсивности. Это может свидетельствовать о нехарактерности для структуры ГФК длинноцепочечных алкильных мостиков, существование которых предполагалось в работе [60].

Двумерные НМРС спектры, полученные для препаратов FA3, NTL, НТО и FA1, оказались практически идентичны. Это показывает единство фрагментного состава ГФК различного происхождения.

#### *Двумерные $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY и TOCSY спектры ГФК*

Гомоядерные двумерные спектры  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Correlation spectroscopy) позволяют получить корреляционные пики от пар ядер  $^1\text{H}$ , разделенных двумя или тремя химическими связями. Для регистрации  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY спектров существенно, чтобы константа спин-спинового взаимодействия (KCCB) коррелирующих ядер была не меньше спектральной ширины линии их сигналов. Вследствие замедленного молекулярного движения молекул ГФК ширина спектральных линий протонов, как правило, велика, что ограничивает применение данного метода для исследования структуры ГФК. Типичный спектр COSY препарата FA3 приведен на рис. 2.4.

В спектрах  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY наблюдается корреляционный пик 1.4/2.2 м.д., характерный для алифатических  $\text{CH}_{(1-2)}$  фрагментов в  $\alpha$ - и  $\beta$ -положениях к ароматическому кольцу или

карбоксильной группе. Это подтверждает данные о том, что в молекулах ГФК алифатические структуры присутствуют в виде мостиков, соединяющих ароматические фрагменты структуры. Корреляционные пики при 3.2/3.9 м.д., были отнесены к O-(СН-)-СН<sub>2</sub>-ОН фрагментам циклических полисахаридов. Корреляционный сигнал 1/3.5 м.д., по видимому, относится к метильным группам, входящим в состав полипептидных фрагментов.

Метод <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY (Total correlation spectroscopy) основан на изотропном переносе синхронизированной по фазе намагниченности ядер в течение периода смешивания. При соответствующем подборе времени смешивания возможно получать корреляционные сигналы достаточно удаленных (на 3-5 химических связей) ядер. Для больших молекул ГФК данный метод дает определенные преимущества по сравнению с COSY, не будучи связан с величиной КССВ. Типичный спектр TOCSY, полученный для препарата FA3, приведен на рис. 2.5.

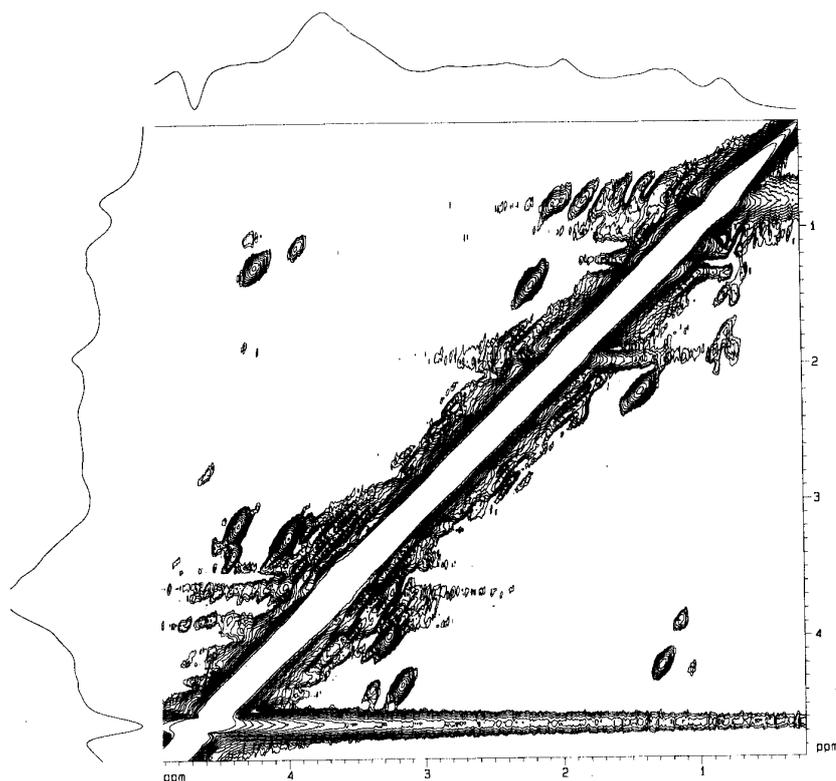


Рис. 2.4. Двумерный <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY спектр препарата FA3.

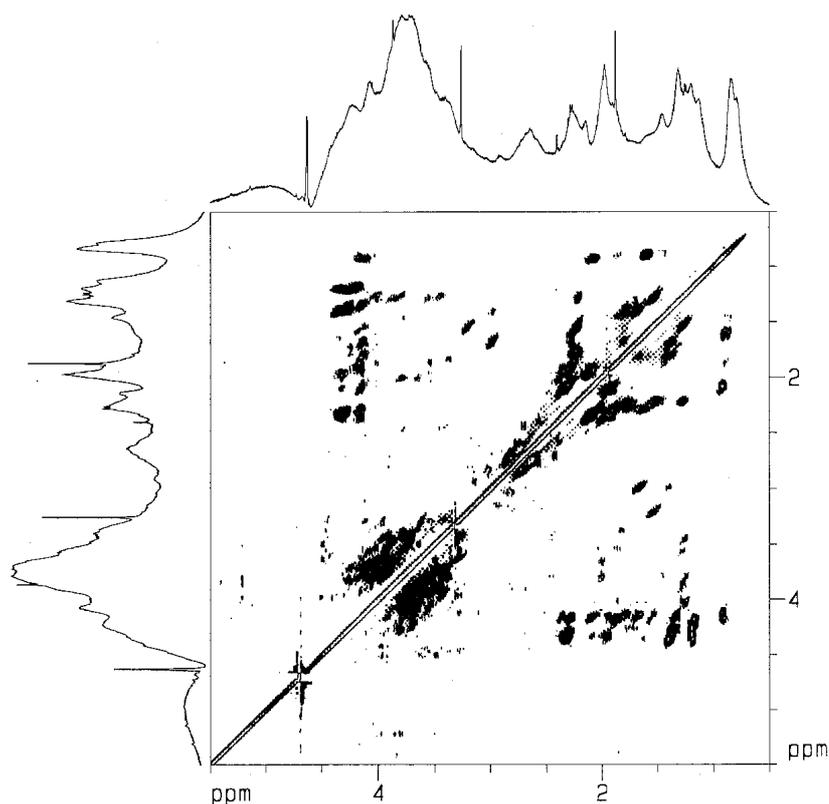


Рис. 2.5. Двумерный  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY спектр препарата FA3.

В спектре  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY наблюдаются большое количество корреляционных сигналов полисахаридных структур в области 3.3-4.3 м.д. Ряд корреляционных пиков 4.3/(1.2-2.3) м.д., по нашему мнению, обусловлен преимущественно сигналами полипептидных фрагментов. Помимо этого часть сигналов в данной области может относиться к  $\text{CH}_n$  фрагментам в  $\alpha$ -положении к ароматическому кольцу и гетерозамещенному алифатическому фрагменту. Алифатические протоны в  $\alpha$ -положении к ароматическому кольцу, взаимодействуя с более удаленными протонами незамещенной алкильной цепи, дают корреляционные сигналы при 2.3/(2.1-1.5).

\* \* \*

На основании анализа вышеприведенных качественных ЯМР спектров был определен набор структурных фрагментов, образующих молекулы ГФК. Как уже указывалось в главе 2.1, в связи с низким содержанием азота и серы в структуре ГФК, фрагменты, содержащие указанные элементы не учитывались отдельно при рассмотрении фрагментного состава.

В качестве основных структурных фрагментов ГФК были выбраны карбонильные ( $\text{C}_{\text{C=O}}$ ), карбоксильные/сложноэфирные группы ( $\text{C}_{\text{COOH(R)}}$ ); атомы углерода ароматических колец с соответствующими заместителями: незамещенные ( $\text{C}_{\text{Ar-H}}$ ), C-замещенные ( $\text{C}_{\text{Ar-C}}$ ),

связанные с гидроксильной/алкоксильной ( $C_{Ar-OH(R)}$ ) группами; ацетальные ( $C_{O-Alk-O}$ ) фрагменты, вторичные ( $C_{CH-OH}$ ) и первичные ( $C_{CH_2-OH}$ ) кислородзамещенные алифатические фрагменты, метоксильные группы ( $C_{OCH_3}$ ) и алифатические фрагменты, не связанные с гетероатомами ( $C_{Alk}$ ).

Такой фрагментный состав в целом согласуется с литературными данными, полученными независимыми методами [8, 12].

Указанный фрагментный состав характерен для ГФК всех исследованных природных источников, при этом различия наблюдаются лишь в относительном содержании структурных фрагментов. В связи с этим нами было предпринято исследование структуры ГФК методами количественной спектроскопии на ядрах  $^{13}C$  и  $^1H$ .

## 2.3. Исследование структуры ГФК методом количественной $^{13}\text{C}$ ЯМР спектроскопии

### 2.3.1. Условия регистрации количественных $^{13}\text{C}$ спектров ЯМР ГФК

Как уже указывалось в главе 1, одна из основных проблем регистрации количественных  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектров ГФК заключается в необходимости корректного выбора условий, позволяющих исключить насыщение и ядерный эффект Оверхаузера.

Влияние ядерного эффекта Оверхаузера на количественность получаемой информации было оценено при помощи регистрации спектра препарата HBW при полном отсутствии ядерного эффекта Оверхаузера (без развязки от протонов) и сопоставления его со спектром, полученным в рекомендуемых в литературе условиях (генератор развязки включен при считывании сигнала и выключен на период релаксационной задержки, импульсная последовательность INVGATE). При сопоставлении этих спектров не было выявлено различий в интенсивностях всех спектральных областей. Полученные данные свидетельствуют, что использование импульсной последовательности INVGATE позволяет полностью устранить влияние ядерного эффекта Оверхаузера.

На сегодняшний день не существует единого мнения о величине релаксационной задержки ( $T_d$ ), достаточной для получения количественных спектров. Это связано с отсутствием информации о времени релаксации  $T_1$  ядер  $^{13}\text{C}$  в различных структурных фрагментах ГФК. Рекомендуемые в литературе величины  $T_d$  составляют от 0.5 до 10 и более секунд. В связи с этим на первом этапе работы были проведены эксперименты по оценке необходимого времени релаксационной задержки. Для этого были получены спектры 12 препаратов ГФК различного происхождения с задержкой между импульсами 1, 2, 3, 4 и 8 с. Спектры интегрировали и для каждой спектральной области рассчитывали изменения относительной интенсивности ( $I_T$ ) по отношению к таковой для спектра с  $T_d = 1$ . Такое представление данных позволяет обобщить изменения, происходящие в спектрах различных препаратов ГФК при увеличении  $T_d$ .

На рис. 2.6 показаны изменения интегральных интенсивностей спектральных областей при увеличении времени задержки. Результаты интегрирования спектров приведены в Приложении 2.

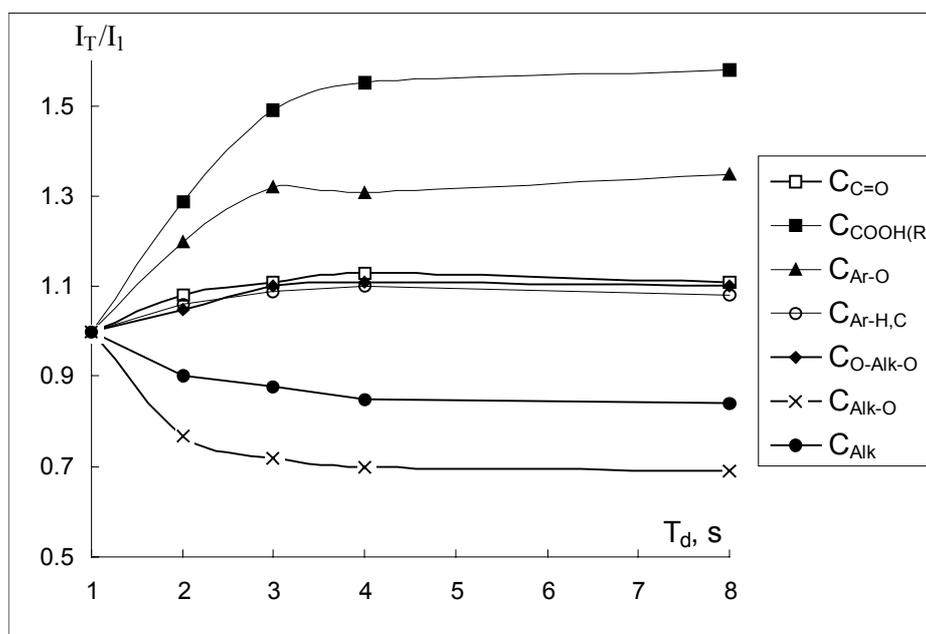


Рис. 2.6. Зависимость относительной интегральной интенсивности сигнала различных спектральных областей от времени задержки (приведены величины, усредненные для 12 препаратов различного происхождения).

Как видно из рис. 2.6, при увеличении времени задержки относительная интенсивность сигналов в областях, соответствующих четвертичным  $C_{COOH(R)}$  и  $C_{Ar-O}$  атомам углерода, значительно возрастает. В то же время существенно снижается относительная интенсивность сигналов в областях  $C_{Alk}$  и  $C_{Alk-O}$ . Данный эффект обусловлен тем, что средние времена релаксации четвертичных атомов углерода превышают таковые для гидрогенизированных атомов C алкильных и карбогидратных фрагментов. Промежуточное положение занимают области сигналов  $C_{Ar}$  и  $C_{O-Alk-O}$ , для углерода которых количество C-H связей в среднем меньше 1.

Относительно высокая скорость релаксации ядер, дающих сигналы в области 220-187 м.д. и отнесенных к кетонным и хинонным четвертичным атомам  $C_{C=O}$ , по-видимому, объясняется тем, что именно на этих фрагментах локализуется парамагнитность ГФК. В связи с этим ускорение релаксационных процессов за счет взаимодействия с неспаренными электронами в наибольшей степени выражено для таких ядер.

Следует отметить, что согласно полученным данным, карбогидратные атомы углерода в структуре ГФК характеризуются меньшими временами  $T_1$  по сравнению с алкильными, несмотря на большую степень гидрогенизованности последних. Это противоречит общим соображениям об относительных скоростях релаксации ядер  $^{13}C$  в органических соединениях, которая протекает преимущественно по диполь-дипольному механизму. С нашей точки зрения, в случае ГФК указанный эффект может быть обусловлен меньшей подвижностью карбогидратных фрагментов в связи с образованием

внутримолекулярных водородных связей, в то время как алкильные радикалы могут претерпевать свободное вращение вокруг  $\sigma$ -C–C связей. Для обычных температур и вязкостей раствора снижение подвижности, как правило, приводит к уменьшению времен релаксации ядер. Указанные закономерности согласуются с полученными авторами работ [91, 66].

Как видно из рисунка 2.2, все кривые  $I_T/I_1(T_d)$  практически выходят на плато при  $T_d=4с$ . Это дает основание предполагать, что в таких условиях спектры ГФК близки к количественным. Использование меньших времен задержки, по всей видимости, вызывает переопределение доли алифатических и карбогидратных фрагментов и недоопределение четвертичных O-замещенных ароматических и карбоксильных атомов углерода.

Следует отметить еще одну немаловажную методическую проблему получения спектров. В связи с отсутствием отчетливых пиков и нулевой линии практически во всем спектральном диапазоне сложно провести однозначное фазирование спектра ГФК. С целью уменьшения и усреднения субъективной ошибки, вносимой процедурой фазовой коррекции в нулевую линию спектра, фазирование каждого преобразованного сигнала спада свободной индукции (ССИ) проводилось вручную с использованием стандартной процедуры семикратно, причем каждый раз начиная с нулевых значений множителей фазовой коррекции. Затем полученные результаты интегрирования усредняли. Влияние фазирования на результаты интегрирования различных спектральных диапазонов продемонстрировано в табл. 2.4. на примере препарата НТО.

Как видно из таблицы, ошибка максимальна для для интервалов 90 - 108 м.д. и 185 - 220 м.д. в связи с низкой интенсивностью сигналов в этих областях. Из анализа спектров 32 препаратов ГФК следует, что при 7-кратном фазировании для этих интервалов в среднем ошибка составляет около 20%, а для остальных - не превышает 5%. Данная процедура была использована как при обработке спектров, обсуждавшихся выше, так и при дальнейшей работе.

Интегральные интенсивности (%) спектральных областей препарата НТО  
(7 различных фазирований).

Спектральная область, м.д.						
220-187	187-165	145-108	165-145	108-90	90-48	48-5
2.4	13.1	14.9	33.4	1.4	20.0	15.0
1.0	13.0	14.4	29.9	1.2	23.9	16.8
3.6	13.8	15.0	27.0	0.8	23.8	16.1
3.6	14.0	15.4	29.1	1.2	21.2	14.5
2.7	13.1	14.9	30.4	1.3	22.1	15.5
3.2	12.5	14.8	31.5	2.1	21.5	14.4
1.8	12.6	15.0	31.7	1.2	22.0	15.9
2.6±0.9	13.2±0.6	14.9±0.4	30.4±2.1	1.3±0.4	22.1±1.4	15.5±0.9

Нами был предложен метод оценки соотношения Н/С из данных спектроскопии ЯМР  $^{13}\text{C}$ , позволяющий сопоставить получаемые спектральные данные с результатами элементного анализа для их перекрестной проверки. Соотношение рассчитывали по уравнению

$$\text{H/C} = (2/3(C_{\text{Ar-H,C}} + \tilde{N}_{\text{Ar-O}}) + 5/3C_{\text{Alk-O}} + 2C_{\text{Alk}}) / \Sigma\text{C} \quad (2.5)$$

Формула (2.5) основана на предположении, что все структурные фрагменты ГФК соединены в незамкнутую цепь. В связи с неизвестной, но достаточно высокой молекулярной массой ГФК при расчете мы пренебрегали концевыми атомами водорода. Кроме того, все без исключения атомы  $\text{C}_{\text{Alk-O}}$  рассматривались как углерод циклических полисахаридных фрагментов  $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ . В связи с этим полученные атомные соотношения представляют собой минимально возможные величины. Их завышение по сравнению с данными элементного анализа может указывать на переопределение обогащенных водородом фрагментов из  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектров.

Данный способ расчета был применен для анализа литературных данных для 79 препаратов ГК почв. Приведенные на рис. 2.7а результаты расчетов свидетельствуют, что соотношение Н/С, рассчитанное из данных ЯМР  $^{13}\text{C}$  существенно выше рассчитанного из элементного анализа. Проведенный анализ показал, что наиболее значимым отличием

условий регистрации спектров было использованием различных времен релаксационной задержки. Распределение  $T_d$ , использованных в рассматриваемых работах приведено в главе 1.2.1. на рис. 1.15. С целью проверки данного тезиса были проведен дополнительный расчет атомных соотношений Н/С для препаратов, спектры которых были зарегистрированы при использовании  $T_d \geq 4$  с (рис 2.7б). При этом было получено удовлетворительное совпадение рассчитанных и экспериментально определенных величин. Таким образом, завышение рассчитанного значения Н/С хорошо объясняется переопределением обогащенных водородом фрагментов при использовании недостаточного времени задержки.

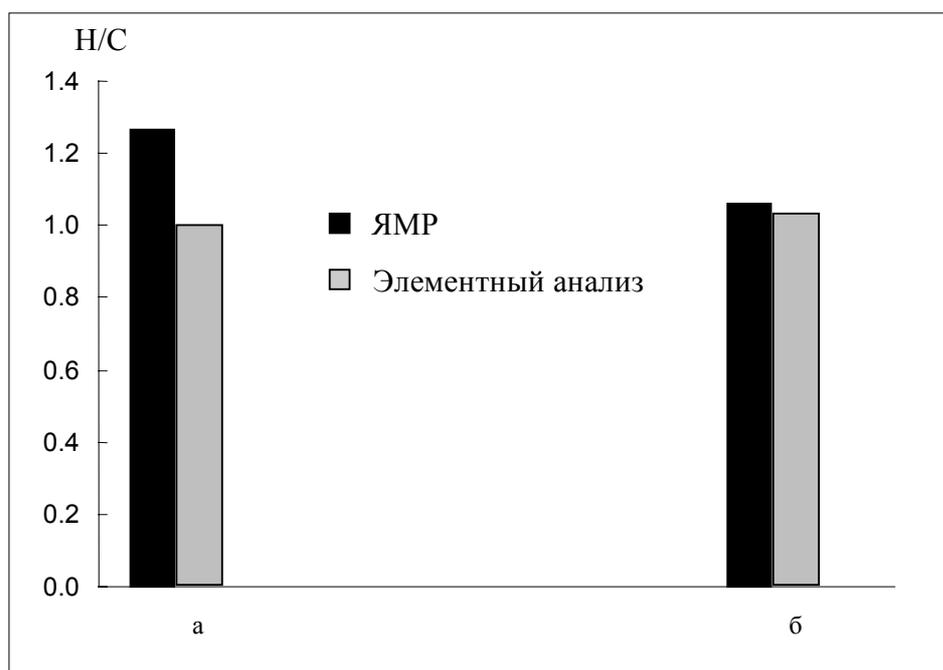


Рис. 2.7. Сопоставление атомных соотношений Н/С, рассчитанных из данных  $^{13}\text{C}$  ЯМР и элементного анализа (по литературным данным).

а) для 79 препаратов, спектры которых регистрировались в широком диапазоне  $T_d$ ; б) для 14 препаратов, спектры которых регистрировались при  $T_d \geq 4$  с

Сопоставление результатов расчета соотношения С/Н по уравнению (2.5) из полученных нами спектральных данных с данными элементного анализа (табл 2.1) продемонстрировало хорошую сходимость (рис.2.8) со значимой при  $p=0.99$  корреляцией ( $r=0.89$ ). Это дает основание предполагать, что полученные в нашей работе  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектры близки к количественным.

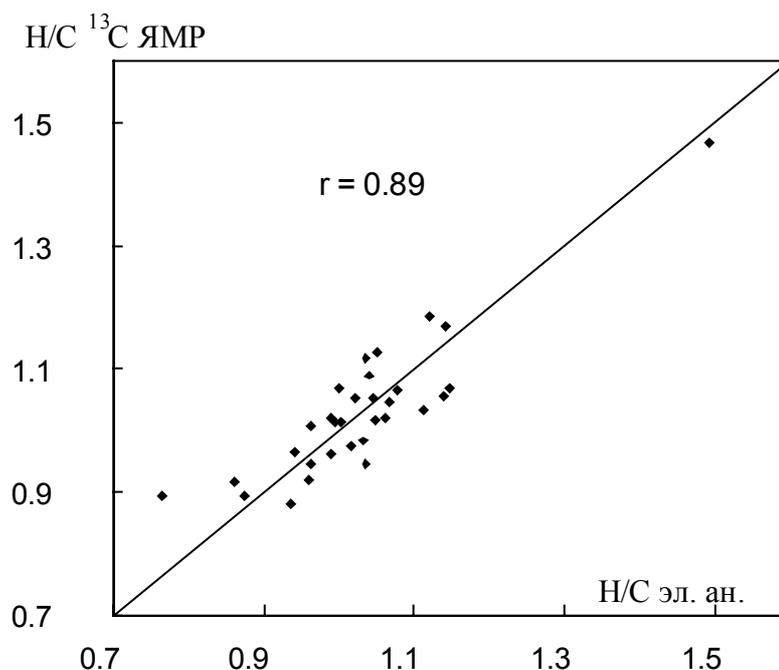


Рис.2.8. Сопоставление атомных соотношений Н/С, рассчитанных из данных ЯМР С-13 и элементного анализа.

### 3.2.2. Распределение углерода в структуре ГФК различного происхождения

В установленных условиях была проведена регистрация количественных  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектров 31 препарата ГФК. Типичные спектры ГФК различного происхождения были приведены на рис. 2.1. Результаты интегрирования полученных спектров приведены в табл. 2.5.

Полученные данные позволили сделать ряд заключений о структурных особенностях различных классов ГФК (табл. 2.6).

Максимальной ароматичностью характеризовались ГК бурого угля и черноземов, в структуре которых более 50% углерода принадлежало ароматическим фрагментам. В то же время окисленность ароматического ядра, рассчитанная как  $C_{\text{Ar-O}} / (C_{\text{Ar-H,C}} + C_{\text{Ar-O}})$ , возрастала при уменьшении содержания ароматических структур (рис. 2.9). Коэффициент корреляции между этими параметрами составлял -0.68 (корреляция значима при  $p=0.99$ ).

Содержание карбоксильных групп и их производных оказалось выше для ГФК природных вод и ФК почв, что в совокупности с более высокой окисленностью ароматического ядра может быть объяснено более глубоким протеканием процессов окислительной дегградации, характерным для генезиса этих соединений. Высокое содержание  $C_{\text{COOH(R)}}$  в препаратах ГФК бурого угля, предположительно, обусловлено окислительной деструкцией угля при выделении ГФК по промышленным технологиям.

Интегральные интенсивности спектральных областей в  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрах препаратов гумусовых кислот (%).

Препарат	Спектральная область						
	ГФК 220 - 187	187-165	165-145	145-108	108-90	90-48	48-5
	$\text{C}_{\text{C=O}}$	$\text{C}_{\text{COOH(R)}}$	$\text{C}_{\text{Ar-O}}$	$\text{C}_{\text{Ar}}$	$\text{C}_{\text{O-Alk-O}}$	$\text{C}_{\text{Alk-O}}$	$\text{C}_{\text{Alk}}$
ГК дерново-подзолистых и серых лесных почв							
HBW	1%	17%	13%	32%	2%	18%	18%
HBP	2%	16%	12%	32%	4%	17%	17%
HBG	1%	15%	13%	33%	3%	18%	17%
HGW	1%	19%	13%	34%	2%	14%	17%
HGP	2%	15%	12%	34%	3%	15%	19%
HBWN	2%	15%	13%	30%	3%	17%	20%
ГК черноземов							
HS	2%	14%	9%	48%	2%	12%	14%
HST	3%	16%	11%	43%	3%	12%	13%
HMG	2%	15%	11%	46%	2%	10%	15%
ФК дерново-подзолистых почв							
FA1N	3%	20%	12%	23%	2%	17%	24%
FA3N	3%	18%	12%	29%	2%	17%	19%
ГФК торфа							
T1	1%	15%	10%	29%	3%	22%	20%
T4	1%	16%	12%	31%	4%	21%	16%
T5	1%	16%	10%	27%	3%	19%	24%
T6	2%	15%	14%	36%	2%	16%	15%
T7	2%	17%	15%	34%	2%	16%	15%
T10	2%	16%	15%	33%	1%	16%	16%
HTL	1%	15%	14%	31%	3%	18%	17%
TTL	3%	15%	13%	32%	3%	17%	17%
HTO	3%	13%	13%	31%	4%	20%	16%
ГФК природных вод							
FMX-8	2%	19%	11%	25%	3%	16%	24%
FIX-8	2%	18%	12%	26%	3%	19%	20%
FG1FA	1%	16%	9%	25%	4%	20%	26%
OH10FA	1%	18	13	30%	4%	17	18%
ГФК бурого угля							
AGK	1%	17%	10%	48%	0%	4%	21%
ANA	1%	15%	13%	43%	0%	7%	21%
Прочее							
SEL	1%	18%	13%	32%	4%	18%	14%
FWME-4	2%	17%	11%	19%	6%	28%	18%
SWM4	2	16	12	26	5	25	14
HTW	0%	11%	3%	13%	9%	50%	15%
BS1FA	3%	17%	10%	35%	2%	14%	19%

Распределение углерода в структуре ГФК различного происхождения, %.

Тип ГФК	C <sub>C=O</sub>	C <sub>COOH</sub>	C <sub>Ar-OH</sub>	C <sub>Ar</sub>	C <sub>Alk-O</sub>	C <sub>Alk</sub>
ГК черноземов	2±1	15±1	10±1	46±3	14±2	14±1
ГК П <sup>Д</sup> и Л почв	2±1	16±2	13±1	33±2	19±2	18±1
ФК П <sup>Д</sup> почв	2±1	18.5±1	10.5±1	25±5	23.5±1	20.5±5
ГФК торфа	2±1	15±1	13±2	31±3	23±2	16±3
ГФК природных вод	1.5±1	18±1	11±2	26.5±2	21±3	22±4
ГК бурого угля	1±0.3	16±1	11.5±1	45.5±4	5±2	21±2

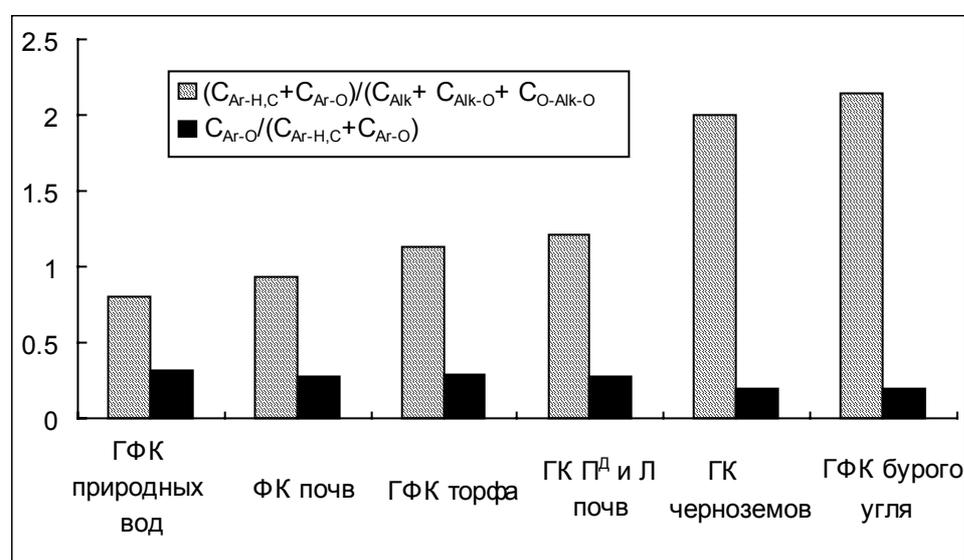


Рис. 2.9. Характеристики ароматической части препаратов ГФК различного происхождения.

Содержание хинонных и кетонных групп во всех исследовавшихся препаратах составляло от 1 до 3%.

Полученные спектры позволили подтвердить отнесение группы сигналов в области 90-108 м.д., сделанное в главе 2.2.3 при анализе двумерных  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  НМРС спектров ГФК. Косвенным доказательством принадлежности сигналов в данной области к ацетальным атомам циклических полисахаридных фрагментов может служить высокий ( $r=0.82$ ) коэффициент корреляции между интегральными интенсивностями области C<sub>Alk-O</sub> и данной области. Отношение интенсивностей сигналов этих областей, равное 5 для спектров циклических полисахаридов и возрастающее при протекании процессов окислительной деструкции, для исследованных препаратов составляет  $5.9 \pm 1.2$ . В то же время с областью C<sub>Ar-O</sub> корреляции не наблюдается. На основании вышеизложенного

сигналы в области 90-108 м.д. далее рассматривались нами как сигналы ацетальных атомов циклических полисахаридов.

Содержание карбогидратных  $C_{\text{Алк-О}}$  фрагментов оказалось довольно близко для ФК почв, ГФК торфа и природных вод, и убывало при переходе к ГК П<sup>Д</sup> и Л почв и, далее, к ГК черноземов. В ГК угля такие структуры практически не содержатся. С другой стороны, препарат НТW (водный экстракт торфа), более чем наполовину представлял собой полисахаридные структуры, в связи с чем его принадлежность к гумусовым веществам вызывает сомнения. На этом основании можно сделать вывод о непригодности водной экстракции как метода выделения из торфов водорастворимых гумусовых веществ, если в дальнейшем не производится отделение ГФК от полисахаридов, например, с использованием сорбентов XAD.

Содержание алифатических фрагментов во всех исследованных препаратах составляло от 14 до 26%. При этом обнаружить зависимость данной структурной характеристики от источника происхождения ГФК не удалось.

\* \* \*

Таким образом, анализ количественных  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектров позволил получить информацию об основных закономерностях строения углеродного скелета ГФК различного происхождения. Однако этот метод не позволяет определить такие важные характеристики структуры как функциональный состав, замещенность ароматических фрагментов и т.д. Для получения этой информации нами были проведены исследования структуры ГФК при помощи спектроскопии ПМР.

### 2.3. Исследование структуры ГФК методом спектроскопии ПМР.

#### 2.3.1. Разработка метода количественной характеристики распределения водорода функциональных групп и углеродного скелета ГФК

Как показано в главе 1.2.2, на сегодняшний день проблема количественной характеристики распределения водорода в структуре ГФК остается нерешенной. В первую очередь это обусловлено наличием в структуре ГФК водорода двух типов - подвижных протонов функциональных групп, положение сигналов которых может изменяться в зависимости от условий, и скелетных СН-протонов. Можно выделить две основные задачи, решение которых представляется необходимым для определения протонов обоих типов:

1. Определение протонов функциональных групп, положение сигналов которых может существенно различаться в зависимости от растворителя и присутствия следовых количеств воды.
2. Определение полной интегральной интенсивности сигналов протонов ГФК, существенно затрудняемое их перекрыванием с сигналами остаточных протонов растворителя.

Для решения этих задач нами была предложена схема комплексного ПМР - эксперимента, включающая в себя:

- разделение сигналов протонов карбоксильных, фенольных и спиртовых гидроксильных групп при помощи регистрации ПМР-спектров ГФК в ДМСО-d<sub>6</sub>, в условиях замедленного в шкале времени ЯМР протонного обмена в данном растворителе.
- разделение сигналов О-Н протонов функциональных групп и С-Н протонов углеродного скелета в спектре ГФК в ДМСО-d<sub>6</sub> путем сдвига первых в слабое поле в условиях ускорения процессов обмена при добавлении дейтеротрифторуксусной кислоты.
- устранение мешающего определению подвижных протонов влияния влаги при помощи предварительного осушения препаратов ГФК и ДМСО-d<sub>6</sub> и последующего приготовления образцов для ПМР-спектроскопии в условиях высокого вакуума.
- расчет суммарной интенсивности сигналов протонов ГФК путем сопоставления спектров в ДМСО-d<sub>6</sub> и 0.1 М NaOD/D<sub>2</sub>O.

Выбор ДМСО-d<sub>6</sub> в качестве растворителя был обусловлен двумя причинами. Во первых растворимость ГФК в ДМСО-d<sub>6</sub> максимальна для органических растворителей. Это позволяет уменьшить сигнал остаточных протонов растворителя в спектре ПМР и повысить точность интегрирования. Вторая причина заключалась в том, что сигнал остаточных протонов ДМСО, в отличие от ДМФА (который также позволяет наблюдать в

спектре разделенные сигналы протонов карбоксильных, фенольных и спиртовых групп), не перекрывается с сигналами подвижных протонов. В случае же перекрывания протонов ДМСО одновременно с сигналами скелетных и подвижных протонов ГФК, для определения всех типов протонов в областях перекрывания необходима совместная обработка трех спектров, что негативно сказывается на точности определения.

*Общая характеристика спектров.*

Согласно вышеизложенной схеме были получены спектры ПМР препаратов ГФК в ДМСО-d<sub>6</sub>, в ДМСО-d<sub>6</sub> с добавкой CF<sub>3</sub>COOD и в 0.1 М NaOD/D<sub>2</sub>O. На рис. 2.10 приведен типичный набор таких спектров, полученный для препарата **HMG**. Отнесение сигналов в этих спектрах дано в табл.2.5. Как видно из таблицы, в спектрах ГФК можно выделить сигналы

- протонов углеродного скелета: ароматических (C<sub>Ar</sub>-H), протонов карбогидратных, спиртовых и метоксильных фрагментов (CН<sub>n</sub>-O), алифатических в α-положении к карбоксильной группе или ароматическому кольцу (α-CН<sub>n</sub>), и алифатических, находящихся к указанным группам не ближе, чем в β-положении (СН<sub>n</sub>).
- подвижных протоны функциональных групп: COOH, C<sub>Ar</sub>-OH, C<sub>Alk</sub>-OH;

Как видно из рис. 2.10а и Табл. 2.7, в спектрах ГФК в ДМСО-d<sub>6</sub> сигналы ароматических C<sub>Ar</sub>-H протонов перекрываются с сигналами протонов фенольных OH-групп C<sub>Ar</sub>-OH, а пик остаточных протонов ДМСО частично закрывает область α-CН<sub>n</sub> - протонов алифатических фрагментов. Сигналы подвижных протонов спиртовых групп C<sub>Alk</sub>-OH перекрываются с сигналами скелетных СН<sub>n</sub>-O - протонов карбогидратных фрагментов.

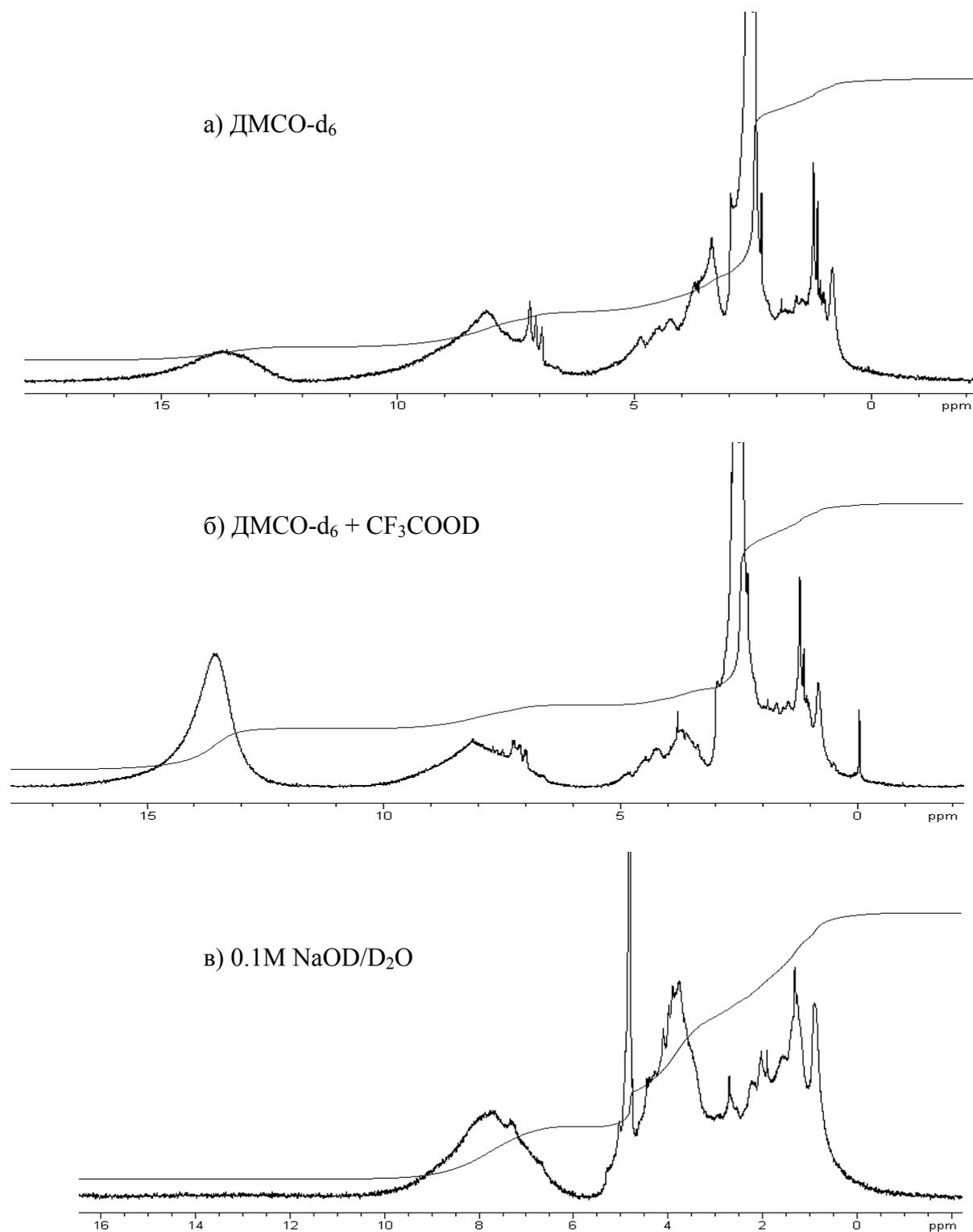


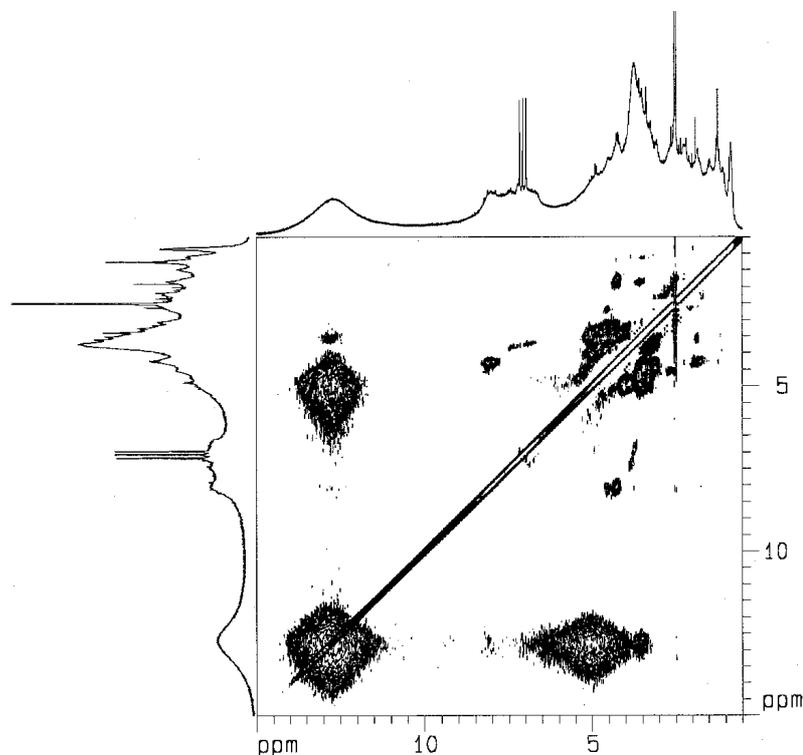
Рис.2.10. Спектры ПМР препарата НМГ в ДМСО- $\text{d}_6$  (а), в ДМСО- $\text{d}_6$  с добавкой  $\text{CF}_3\text{COOD}$  (б), и в  $0.1\text{M NaOD/D}_2\text{O}$  (в).

Отнесение сигналов в спектрах ПМР ГФК в различных растворителях.

Спектр	Спектральные области, м.д.					
	16.5-11.5	11.5-6	6-4.48	4.48-3.2	3.2-2.05	2.05-0.5
DMCO-d <sub>6</sub>	COOH	C <sub>Ar</sub> -OH +C <sub>Ar</sub> -H	C <sub>Alk</sub> -OH+ CH <sub>n</sub> -O		α-CH <sub>n</sub> +DMCO	CH <sub>n</sub>
DMCO-d <sub>6</sub> + CF <sub>3</sub> COOD	COOH	C <sub>Ar</sub> -H	CH <sub>n</sub> -O		α-CH <sub>n</sub> +DMCO	CH <sub>n</sub>
0.1M NaOD/D <sub>2</sub> O	–	C <sub>Ar</sub> -H	HDO*	CH <sub>n</sub> -O*	α-CH <sub>n</sub>	CH <sub>n</sub>

\* пики частично перекрываются.

Непосредственное наблюдение сигналов подвижных протонов возможно при помощи <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H EXSY двумерной спектроскопии. Данная методика позволяет регистрировать корреляционные сигналы связанных спиновых систем благодаря ядерному эффекту Оверхаузера или химическому обмену.

Рис. 2.11. Двумерный спектр <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H EXSY препарата FA3 в DMCO-d<sub>6</sub>.

В спектре <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H EXSY ГФК в DMCO-d<sub>6</sub> (рис. 2.11) благодаря замедленному обмену можно наблюдать корреляционные пики COOH и спиртовых OH групп в области 5/12.5

м.д., спиртовых и фенольных  $\text{OH}$  в области 4.5/8 м.д., а также  $\text{COOH}$  и фенольных  $\text{OH}$  при 8/12.5 м.д. Помимо этого можно отметить выраженные сигналы иона аммония при 7 м.д., дающие корреляционные пики как с карбоксильными, так и со спиртовыми группами. Следует отметить низкую интенсивность корреляционных сигналов протонов фенольных гидроксидов, которая может свидетельствовать об отличающейся для этих групп скорости протонного обмена.

При добавлении дейтеротрифторуксусной кислоты в спектре происходят следующие изменения (рис. 2.10б). Интенсивность группы сигналов в области 16.5-14 м.д. возрастает за счет уменьшения интенсивности областей 11.5-6 м.д. и 6-3.2 м.д., а также добавления остаточных протонов  $\text{CF}_3\text{COOD}$ . В связи с ускорением процессов обмена протоны спиртовых и фенольных гидроксидов дают с остаточными протонами кислоты общий пик, смещенный в слабое поле из-за наличия избытка кислоты. При условии полноты сдвига сигналов подвижных протонов в областях 11.5-6 и 6-4.48 остаются только сигналы скелетных протонов  $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$  и  $\text{C}\text{H}_n\text{-O}$ , соответственно. Интенсивность сигналов алифатических протонов (часть которых по-прежнему закрыта пиком остаточных протонов ДМСО) остается неизменной.

В спектре ГФК в 0.1M  $\text{NaOD/D}_2\text{O}$  (рис. 2.10в), химический сдвиг остаточных протонов растворителя (4.8 м.д.) существенно отличается от такового для ДМСО- $\text{d}_6$  (2.49 м.д.). Это позволяет наблюдать сигналы  $\alpha\text{-C}\text{H}_n$  протонов ГФК в области 3.2 - 2.05 м.д., закрытой в спектре в ДМСО- $\text{d}_6$  сигналами остаточных протонов растворителя. При этом в спектре ПМР ГФК в 0.1M  $\text{NaOD/D}_2\text{O}$  все подвижные протоны входят в пик  $\text{H}_2\text{O}$  (6-4.48 м.д.), частично закрывающий область  $\text{C}\text{H}_n\text{-O}$ -протонов.

#### *Схема расчета распределения водорода в структуре ГФК*

##### *из данных спектроскопии ПМР*

Сопоставление спектров в ДМСО- $\text{d}_6$  и ДМСО- $\text{d}_6$  с добавкой  $\text{CF}_3\text{COOD}$  открывает возможность отдельного определения вклада скелетных и подвижных протонов в интегральные интенсивности интервалов 11.5-6 и 6-3.2 в спектре ГФК в ДМСО- $\text{d}_6$  (рис. 2.10а). Для проведения такого сопоставления необходимо выполнить нормирование интегральных интенсивностей данных областей спектров на интенсивность сигналов областей, остающихся неизменными в данных условиях. Необходимость данной процедуры вызвана тем, что общее количество протонов в образце увеличивается за счет добавления остаточных протонов  $\text{CF}_3\text{COOD}$ . В качестве реперных областей можно использовать  $\text{C}\text{H}_n$ ,  $\alpha\text{-C}\text{H}_n$ , или всю алифатическую область. С нашей точки зрения, использование для этой цели области 2.05 - 3.2 м.д. более обосновано, так как в данной

спектральной области находится выраженный пик остаточных протонов ДМСО. В связи с этим указанная область характеризуется меньшей зависимостью результатов интегрирования от корректности фазирования и установки нулевой линии. Формулы для расчета относительных содержаний подвижных и скелетных протонов в данных областях приведены ниже.

$$C_{Ar-OH} / C_{Ar-H} = \frac{I_{11.5-6}^{DMSO} \cdot I_{3.2-2.05}^{DMSO+CF_3COOD}}{I_{11.5-6}^{DMSO+CF_3COOD} \cdot I_{3.2-2.05}^{DMSO}} - 1 \quad (2.6)$$

$$C_{Alk-OH} / C_{CH_n-O} = \frac{I_{6-3.2}^{DMSO} \cdot I_{3.2-2.05}^{DMSO+CF_3COOD}}{I_{6-3.2}^{DMSO+CF_3COOD} \cdot I_{3.2-2.05}^{DMSO}} - 1 \quad (2.7)$$

где  $I_{\Delta}^{DMSO}$  и  $I_{\Delta}^{DMSO+CF_3COOD}$  - относительные интенсивности данных спектральных диапазонов в спектрах в ДМСО-d<sub>6</sub> и ДМСО-d<sub>6</sub> с добавкой CF<sub>3</sub>COOD, соответственно.

Применение описанной выше процедуры нормирования позволяет рассчитать соотношения C<sub>Ar-OH</sub>/C<sub>Ar-H</sub> и C<sub>Alk-OH</sub>/C<sub>CH<sub>n</sub>-O</sub>. Однако из-за присутствия остаточных протонов ДМСО-d<sub>6</sub> в обоих спектрах невозможно вычислить абсолютные количества соответствующих протонов в структуре ГФК. Данную проблему можно решить путем сопоставления спектров в ДМСО-d<sub>6</sub> и NaOD/D<sub>2</sub>O, вычисляя отношение интенсивностей сигналов α-СН<sub>n</sub>-протонов и остаточных протонов ДМСО, перекрывающихся в первом спектре. При этом нормирование проводится на область СН<sub>n</sub>-протонов, которая не изменяется при переходе от одного растворителя к другому:

$$H_{DMSO} / \alpha-CH_n = 1 - \frac{I_{2.05-0.5}^{DMSO} \cdot I_{3.2-2.05}^{D_2O}}{I_{2.05-0.5}^{D_2O} \cdot I_{3.2-2.05}^{DMSO}} \quad (2.8)$$

Описанная процедура дает возможность вычесть из спектра в ДМСО-d<sub>6</sub> сигнал остаточных протонов растворителя и рассчитать абсолютные величины содержаний каждого из рассмотренных типов протонов в структуре ГФК.

Таким образом, для ПМР-исследования ГФК была предложена схема эксперимента и обработки результатов, представленная на рис. 2.12.

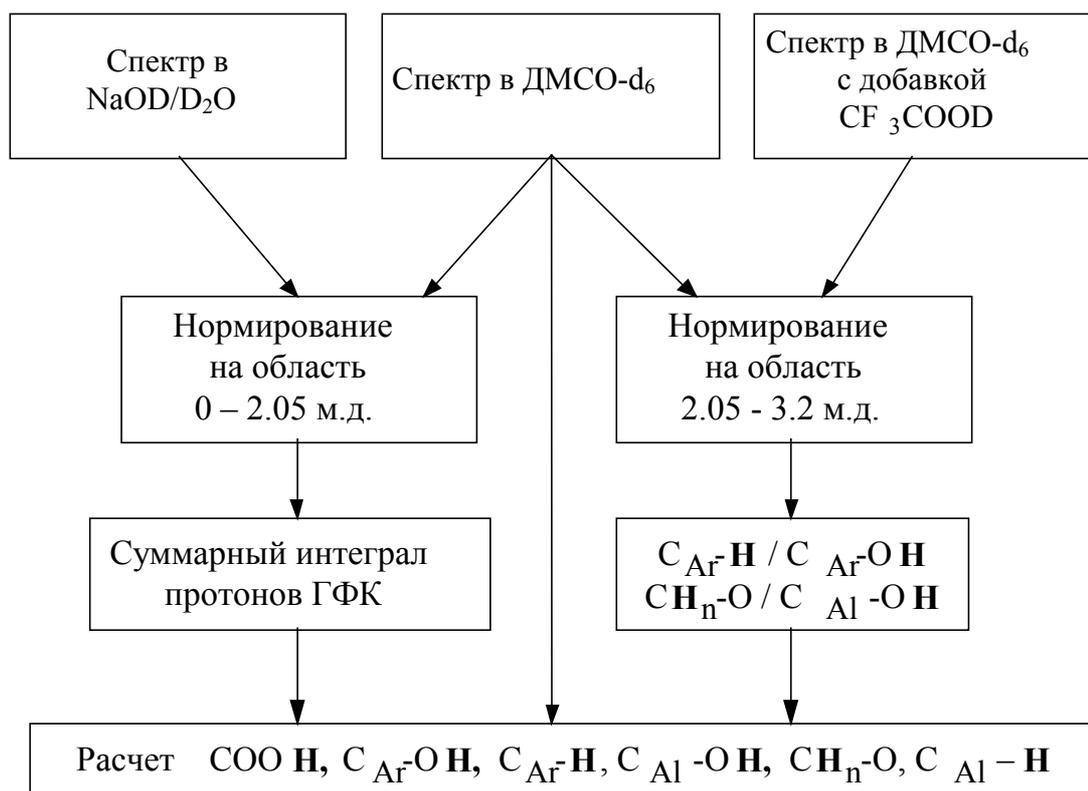


Рис. 2.12. Схема расчета распределения водорода в структуре ГФК.

При использовании ДМСО- $d_6$  высокой изотопной чистоты, характеризующегося постоянством изотопного состава (например, использовавшегося в данной работе ДМСО- $d_6$  производства фирмы Merck, 99.95 ат.-%D) можно избежать необходимости регистрации спектров в NaOD/D $_2$ O. В этом случае долю сигналов  $\alpha$  остаточных протонов ДМСО в интегральной интенсивности спектра можно рассчитать как

$$\alpha_{\text{ДМСО}} = (m_{\text{ДМСО}} * H_{\text{ДМСО}}) / (m_{\text{ДМСО}} * H_{\text{ДМСО}} + m_{\text{ГФК}} * H_{\text{ГФК}}) \quad (2.9)$$

где  $m_{\text{ДМСО}}$  и  $m_{\text{ГФК}}$  – массы внесенного ДМСО- $d_6$  и навески препарата ГФК,

соответственно;

$H_{\text{ДМСО}}$  и  $H_{\text{ГФК}}$  – массовое содержание протонов в ДМСО- $d_6$  и ГФК,

соответственно.

В условиях нашего эксперимента – навеска ГФК 15 мг с содержанием водорода 3.5–5% и количестве ДМСО- $d_6$  0.7 мл 99.95 ат.-%D – сигнал остаточных протонов ДМСО мог составлять от 2 до 3.5% общей интенсивности спектра.

Справедливость такого способа расчета была подтверждена при сравнении результатов расчета распределения водорода по формуле (2.9) с данными полученными при расчете по схеме (рис. 2.12), основанной на сопоставлении спектров в ДМСО- $d_6$  и NaOD/D $_2$ O. Результаты расчетов совпадали в пределах погрешности интегрирования (~5% от величины).

*Проверка полноты разделения сигналов подвижных и скелетных протонов  
при добавлении CF<sub>3</sub>COOD.*

Предложенная схема расчета базируется на предпосылке о полноте разделения сигналов подвижных и скелетных протонов при добавлении CF<sub>3</sub>COOD и отсутствии в этих условиях обмена для С-Н протонов. Для доказательства этой предпосылки были проведены эксперименты на модельных соединениях, в качестве которых были выбраны 2,4-дигидроксибензойная кислота (содержащая COOH, C<sub>Ar</sub>-OH и C<sub>Ar</sub>-H протоны) и полидекстран (C<sub>Alk</sub>-OH и CH<sub>n</sub>-O).

В спектре 2,4-дигидроксибензойной кислоты в отсутствие CF<sub>3</sub>COOD (рис. 2.13а) наблюдались три сигнала подвижных протонов при 12.2 м.д. (COOH), 11.3 м.д. (орто-OH) и 10.3 м.д. (пара-OH). При последовательном добавлении аликвотных частей (10 мкл) кислоты эти сигналы смещались в слабое поле (рис. 2.13б), и в итоге сливались в один пик при 13.4 м.д. (рис. 2.13в). При этом рассчитанная по приведенной выше схеме доля фенольных протонов в области 11.5 - 6 м.д. составила 40%, что точно соответствует теоретическому значению.

В спектре полидекстрана присутствовало несколько пиков спиртовых OH-протонов в области 4.2 - 5.2 м.д., которые при добавлении CF<sub>3</sub>COOD аналогичным образом смещались в область слабого поля (рис. 2.14). Расчет по схеме, предложенной для количественного анализа ПМР-спектров ГФК показал, что доля спиртовых протонов в суммарном интеграле полидекстрана составляет 32.5%, что хорошо согласуется с расчетным значением для идеальной структуры полидекстрана (30%).

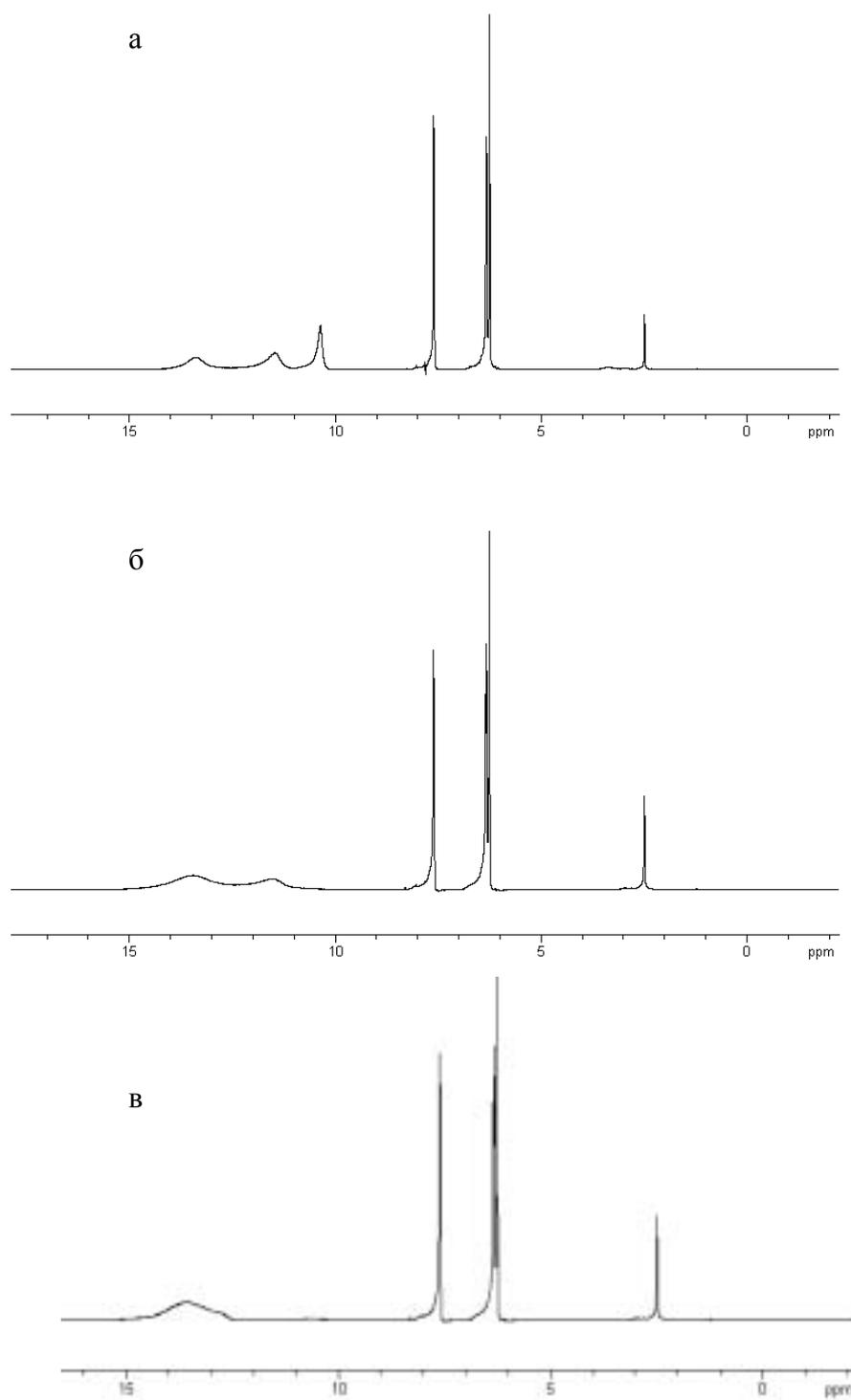


Рис. 2.13. ПМР спектры 2,4-дигидроксибензойной кислоты:

- а) в ДМСО-d<sub>6</sub>, б) в ДМСО-d<sub>6</sub> + 20 мкл CF<sub>3</sub>COOD,
- с) в ДМСО-d<sub>6</sub> + 40 мкл CF<sub>3</sub>COOD.

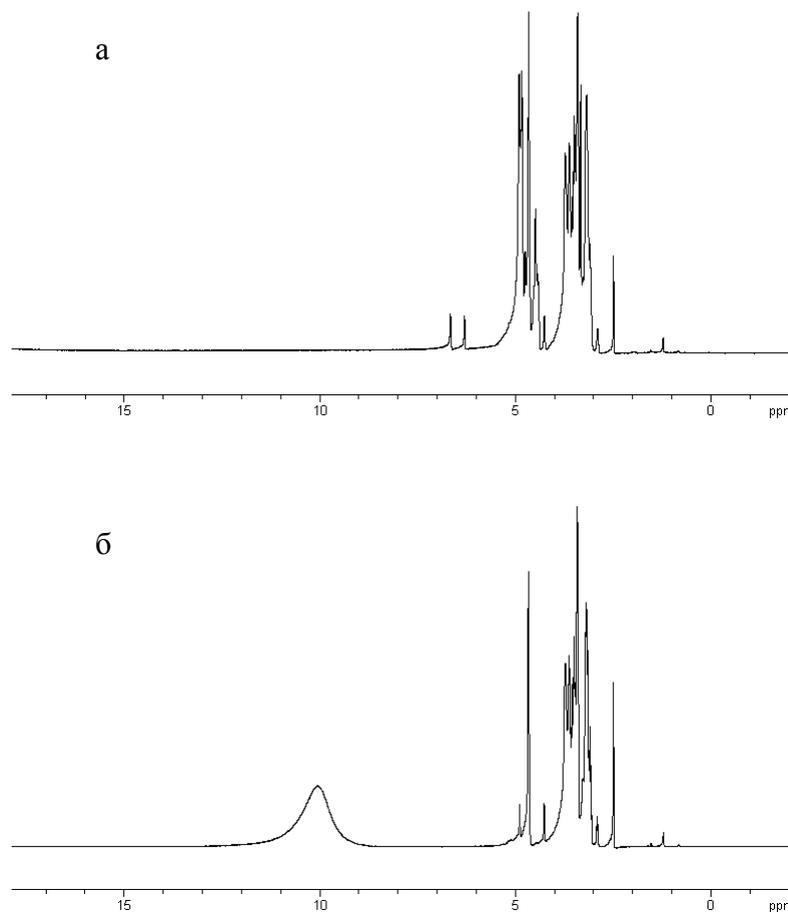


Рис. 2.14. ПМР спектры полидекстрана: а) в ДМСО- $d_6$ ,  
 б) в ДМСО- $d_6$  + 20 мкл  $CF_3COOD$

Таким образом, эксперименты на модельных соединениях подтвердили, что

- 1) в спектрах в ДМСО- $d_6$  протоны  $COOH$ ,  $C_{Al}-OH$  и  $C_{Alk}-OH$  находятся в медленном (в шкале времени ЯМР) обмене, что позволяет проводить раздельное интегрирование их сигналов;
- 2) При добавлении избытка  $CF_3COOD$  ускорение протонного обмена вызывает количественный переход сигналов подвижных протонов в слабое поле и позволяет провести определение перекрывающихся с ними сигналов скелетных протонов.

Корректность предложенного метода разделения этих сигналов была также проверена для одного из препаратов ГФК - НМГ. Для этой цели были сопоставлены количество протонов, обменивающихся на дейтерий при взаимодействии с  $D_2O$ , и количество протонов, сигналы которых сдвигаются в слабое поле при добавлении  $CF_3COOD$ . Был получен спектр в ДМСО- $d_6$  препарата ГФК, предварительно подвергнутого дейтерообмену с  $D_2O$  (рис. 2.15). Из сопоставления такого спектра со спектром препарата НМГ без дейтерообмена (рис. 2.10а) были рассчитаны соотношения

$C_{Ar-OH}/C_{Ar-H}$  и  $C_{Alk-OH}/C_{H_n-O}$ , которые составили 0.48 и 0.38, соответственно. (Нормирование проводилось на интегральную интенсивность области  $C_{H_n}$  - протонов.) Рассчитанные соотношения были сопоставлены с полученными при расчете по уравнениям (2.6, 2.7), которые для этого препарата составили 0.45 и 0.37, соответственно. Такое хорошее совпадение свидетельствует о том, что при добавлении  $CF_3COOD$  к раствору ГФК в  $DMCO-d_6$  сдвиг претерпевают только сигналы подвижных протонов, а положение и интенсивность сигналов скелетных протонов ГФК не изменяются.

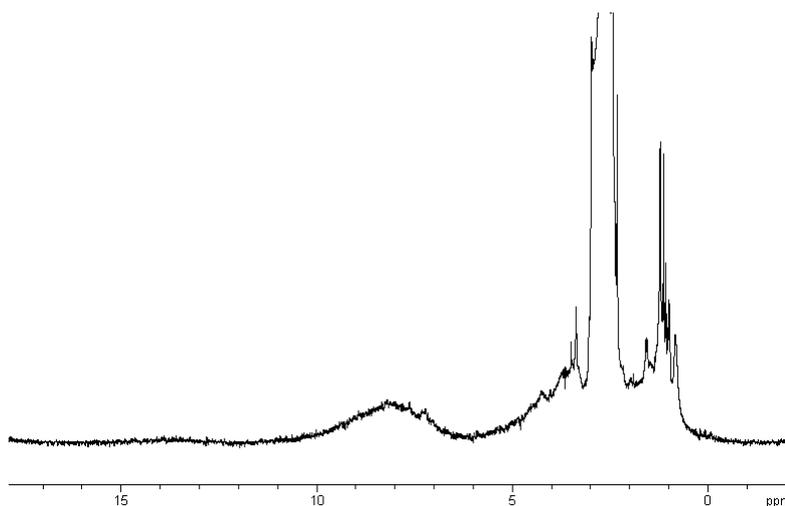


Рис. 2.15. Спектр препарата НМГ после дейтерирования в  $DMCO-d_6$ .

Количество добавляемой кислоты, обеспечивающее полный сдвиг подвижных протонов в область слабого поля, было определено при последовательном добавлении аликвотных частей (10 мкл)  $CF_3COOD$  к раствору препарата ГФК в  $DMCO-d_6$ . Установлено, что при массе ГФК 15 мг для большинства препаратов полнота сдвига достигается при внесении 20 мкл кислоты. При дальнейшем добавлении кислоты в области спектра

10.5–0.5 м.д. изменений не происходит. Однако для препаратов **НВWN** и **Т7**, характеризовавшихся наибольшей зольностью (7-12%), внесение 20 мкл  $CF_3COOD$  оказалось недостаточно. По-видимому, это связано с образованием солей с зольными компонентами ГФК. В данном случае происходит неполный сдвиг подвижных протонов в слабое поле и их общий широкий сигнал наблюдается при 8-11 м.д. (Рис. 2.16) Для достижения полноты сдвига дополнительно вносили 20 мкл  $CF_3COOD$ .

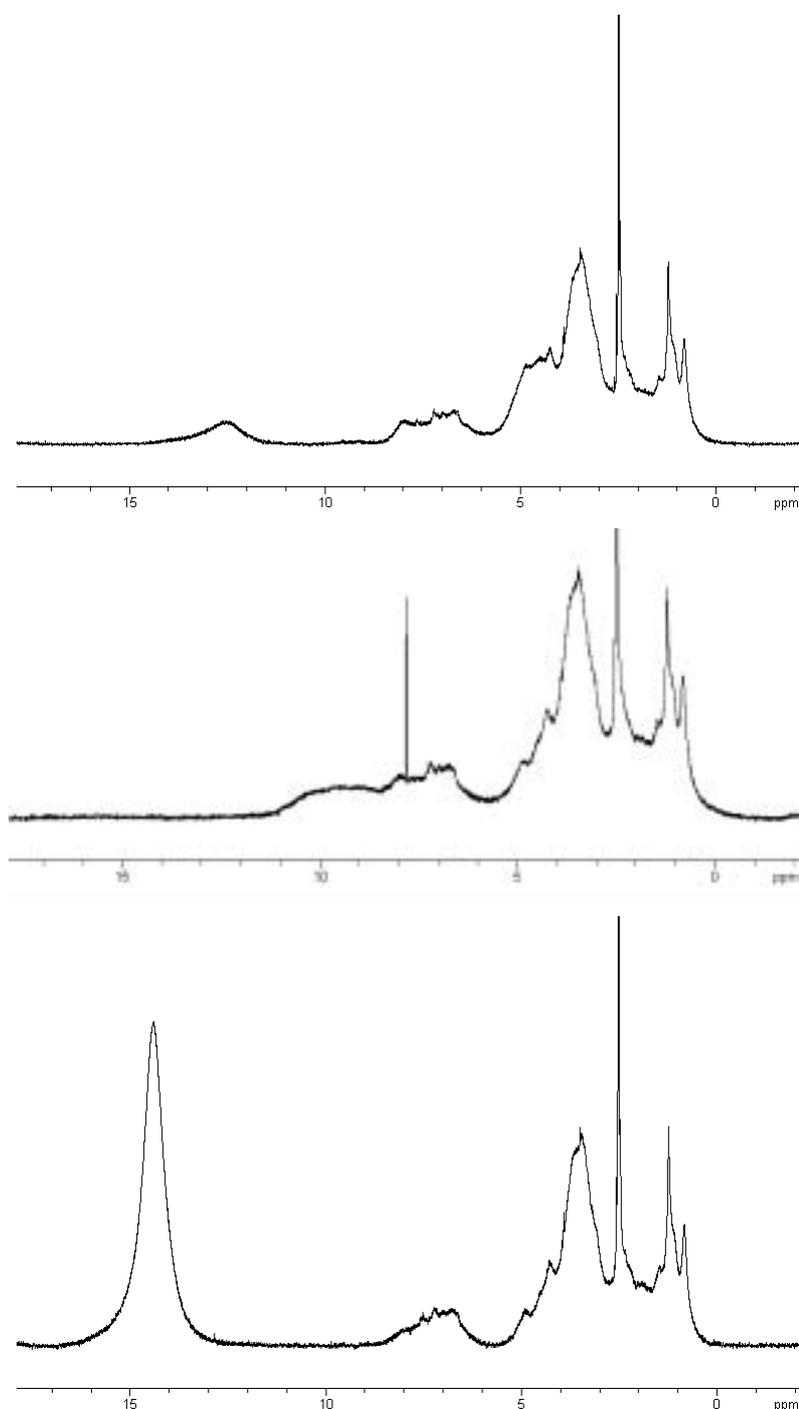


Рис. 2.16. Спектры ПМР препарата **SWM4** при последовательном добавлении аликвотных порций  $\text{CF}_3\text{COOD}$ . а) в  $\text{DMSO-d}_6$ , б) в  $\text{DMSO-d}_6 + 20$  мкл  $\text{CF}_3\text{COOD}$ , в) в  $\text{DMSO-d}_6 + 40$  мкл  $\text{CF}_3\text{COOD}$ .

Следует отметить возможные источники систематических ошибок при определении содержания основных типов протонов ГФК вышеописанным методом. Во-первых, определяемое содержание протонов спиртовых гидроксидов может быть завышено в связи с присутствием в растворителе следовых количеств воды, поскольку при регистрации спектров ГФК в  $\text{DMSO-d}_6$  слабый сигнал таких количеств  $\text{H}_2\text{O}$  неотличим от сигналов спиртовых  $\text{OH}$

протонов. Для предотвращения возникновения значительных погрешностей необходимо проводить оценку содержания влаги в чистом растворителе, регистрируя его спектр ПМР. Сигнал HDO в спектре использовавшегося в данной работе DMSO-d<sub>6</sub> составлял около 2 % от сигнала остаточных протонов растворителя. Поскольку сигнал спиртовых ОН протонов ГФК составлял от 50 до 100% от сигнала остаточных протонов растворителя, в результате ошибка в определении спиртовых ОН групп могла достигать 2 - 4% (отн).

Во-вторых, присутствие в препарате ГФК ионов металлов, обусловленное неполным обессоливанием, влечет за собой недоопределение карбоксильных групп, находящихся в солевой форме. Анализ состава зольности использовавшихся препаратов ГФК показал, что содержание металлов не превышало 0.0005 моль на моль водорода, что могло вызывать недоопределение до 6% карбоксильных групп.

Следует отметить, что высокозольные препараты ГФК плохо растворяются в ДМСО-d<sub>6</sub>, что ограничивает возможность применения разработанного метода.

### 2.3.2. Распределение водорода в структуре ГФК

В соответствии с изложенной выше схемой было охарактеризовано распределение водорода в структуре 21 препарата ГФК различного происхождения. Результаты интегрирования соответствующих спектров приведены в Приложении 4. Результаты расчетов содержания протонов различных типов в образцах ГФК приведены в табл. 2.8. В этой же таблице приведены значения параметров  $C_{Ar-H}/C_{Alk-H}$  (где  $C_{Alk-H} = CH_n-O + CH_n + \alpha-CH_n$ ) и  $C_{Ar-OH}/C_{Ar-H}$ . Первое из этих соотношений обычно используется [70] как показатель обогащенности ГФК ароматическими структурами. Второй параметр был предложен нами как одна из характеристик окисленности ароматических колец.

Таблица 2.8.

Распределение водорода в препаратах ГФК различного происхождения по данным спектроскопии ПМР.

Препарат ГФК	Доля протонов, %							Соотношения	
	COOH	C <sub>Ar</sub> -H	C <sub>Ar</sub> -OH	CH <sub>n</sub> -O	C <sub>Alk</sub> -OH	α-CH <sub>n</sub>	CH <sub>n</sub>	C <sub>Ar</sub> -H/C <sub>Alk</sub> -H	C <sub>Ar</sub> -OH/C <sub>Ar</sub> -H
ГК дерново-подзолистых почв									
HBW	9	13.5	7	27.5	9	15.5	18.5	0.52	0.22
HBWNd	8	12	7	29	6	17	21	0.58	0.18
ГК чернозема									
HMG	11	20	8.5	22	6.5	17	15	0.43	0.37
ФК дерново-подзолистых почв									
FA1N	13	8.5	7.5	24	8	19	20	0.88	0.13
FA3N	13.5	9.5	8	27	8	17	17	0.84	0.16
ГФК торфа									
T5	8	10	5	30	9	18	20	0.50	0.15
T6	9.5	15.5	10	29	9	14	13	0.65	0.28
T7	10	16	9	30	9	13	13	0.56	0.29
T10	9	13.5	10.5	30	8	14	15	0.78	0.23
HTL	8	13	8	32	9	14	16	0.62	0.21
TTL	9	13	9	29.5	8.5	16	15	0.69	0.21
HTO	7	12	8	34	9	15	15	0.67	0.19
ГФК природных вод									
FMX-8	12	7	5	28	8	19	21	0.71	0.10
FIX-8	12.5	7.5	8	29	7	18	18	1.07	0.12
FG1FA	11	6.5	4	28	9	21	20.5	0.62	0.09
HO10FA	11	11	9	29	9	15	16	0.82	0.18
ГФК бурого угля									
AGK	14	23	6.5	13	0	20.5	23	0.28	0.41
ANA	12	19.5	8.5	19.5	1	19	20.5	0.44	0.33
Прочее									
SEL	10.5	12.5	7	32.5	11.5	14	12	0.56	0.21
BS1FA	14.5	12	8.5	29	6	16	14	0.71	0.20
SWM4	10	9	8	36	14	12	11	0.89	0.15

Как следует из таблицы, содержание карбоксильных групп в исследованных препаратах ГФК составляло от 7 до 14.5%. При этом ФК почв, ГФК поверхностных вод и угля характеризовались более высоким содержанием этих групп по сравнению с ГФК торфа и ГК почв. Результаты ПМР-определения карбоксильных групп были сопоставлены с имеющимися для ряда препаратов величинами, полученными при помощи кальций-ацетатного метода и рК-спектроскопии [16] (Табл. 2.9). Для проведения сопоставления содержание карбоксильных групп было пересчитано в мэкв/г с использованием данных элементного анализа согласно следующей формуле:

$$\text{COOH(мэкв/г)} = \text{COOH(ПМР, \%)} \times \text{H(эл.ан., мэкв/г)} \quad (2.10)$$

Таблица 2.9.

Сопоставление результатов определения карбоксильных групп методами титриметрии и спектроскопии ПМР.

Препарат ГФК	Содержание COOH-групп, мэкв/г		
	ПМР	Ca-Ac	рК-спектр
<b>T5</b>	3.0	3.1	3.0
<b>T6</b>	3.3	3.1	2.7
<b>T7</b>	3.0	2.9	2.5
<b>T10</b>	3.8	3.1	6.0
<b>HTL</b>	3.5	4.0	3.9
<b>SEL</b>	4.0	3.9	4.3

Как видно из таблицы, большинство результатов удовлетворительно согласуются между собой.

Содержание ароматических протонов было максимально для обоих препаратов ГФК угля и чернозема (HMG). Минимальное содержание незамещенных ароматических структур наблюдалось в случае ГФК природных вод и ФК почв. Соотношение скелетных протонов  $C_{Ar}H/C_{Alk}H$  также было максимально в случае препаратов угля и HMG (0.33-0.41), минимально для ГФК природных вод и ФК почв (0.09-0.19), а для остальных препаратов находилось в диапазоне 0.15–0.28 (Табл. 2.8).

Соотношение  $C_{Ar}OH/C_{Ar}H$ , также различалось для этих групп препаратов. Оно изменялось антибатно соотношению  $C_{Ar}H/C_{Alk}H$  со значимой при  $p=0.99$  обратной корреляцией ( $r=-0.71$ ). Этот факт может свидетельствовать об увеличении окисленности ароматического ядра при уменьшении доли ароматического углерода в структуре ГФК.

Содержание карбогидратных  $\text{C}_n\text{H}_n\text{O}$  протонов было максимальным для препаратов торфяных ГФК. При этом их содержание коррелирует с содержанием спиртовых гидроксильных ( $r=0.75$ ). Соотношение количеств этих протонов в структуре ГФК составляет от 3:1 до 4:1. На этом основании можно предположить, что основная часть спиртовых групп входит в состав полисахаридных фрагментов ГФК. Препараты ГФК угля практически не содержат спиртовых  $\text{OH}$ -групп. По-видимому, все  $\text{C}_n\text{H}_n\text{O}$  протоны в них относятся к метоксильным группам.

При рассмотрении алифатической части ГФК обнаружено, что для всех исследованных препаратов вне зависимости от источника происхождения и величины соотношения  $\text{C}_{\text{Alk}}\text{H}/\text{C}_{\text{Alk}}\text{H}$  около 50% алифатических протонов находится в составе  $\alpha\text{-C}_n\text{H}_n$  групп. Это указывает на общий принцип строения алифатической части ГФК, для которой, по-видимому, нехарактерно наличие незамещенных длинноцепочечных алифатических фрагментов.

Таким образом, разработанный метод позволил охарактеризовать количество основных протонсодержащих функциональных групп и распределение скелетных протонов в структуре ГФК. Сопоставление этих данных с полученными при помощи  $^{13}\text{C}$  спектроскопии ЯМР открывает возможности для расчета ряда непосредственно не определяемых характеристик структуры ГФК.

## 2.5. Расчет фрагментного состава ГФК

### 2.5.1. Схема расчета фрагментного состава ГФК из данных спектроскопии ЯМР $^1\text{H}$ и $^{13}\text{C}$

Как было показано в 2.1-2.4, все исследованные препараты ГФК обладают единым набором основных структурных фрагментов. В связи с этим расчет относительного содержания таких фрагментов позволяет количественно охарактеризовать структуру ГФК различного происхождения. В качестве основных структурных фрагментов использовали карбонильные ( $\text{C}_{\text{C=O}}$ ), карбоксильные ( $\text{C}_{\text{COOH}}$ ) и сложноэфирные ( $\text{C}_{\text{COOR}}$ ) группы; атомы углерода ароматических колец с соответствующими заместителями: незамещенные ( $\text{C}_{\text{Ar-H}}$ ), C-замещенные ( $\text{C}_{\text{Ar-C}}$ ), связанные с гидроксильной ( $\text{C}_{\text{Ar-OH}}$ ) и алкоксильной ( $\text{C}_{\text{Ar-OR}}$ ) группами; вторичные ( $\text{C}_{\text{CH-OH}}$ ) и первичные ( $\text{C}_{\text{CH}_2\text{-OH}}$ ) спиртовые фрагменты, метоксильные группы ( $\text{C}_{\text{OCH}_3}$ ), ацетальные фрагменты ( $\text{C}_{\text{O-Alk-O}}$ ) и несвязанные с гетероатомами алифатические фрагменты ( $\text{C}_{\text{Alk}}$ ).

Содержание  $\text{C}_{\text{C=O}}$ ,  $\text{C}_{\text{O-Alk-O}}$ , и  $\text{C}_{\text{Alk}}$  рассчитывали непосредственно из данных  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектроскопии. Содержание остальных фрагментов было рассчитано из сопоставления данных спектроскопии  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  ЯМР при использовании соотношения Н/С из результатов элементного анализа согласно уравнениям (2.11-2.14). Как было указано выше, использованные нами методы не позволяют достоверно различить кислород- и азотсодержащие функциональные группы, поэтому все гетероатомы в структуре ГФК принимались за кислород, т.е. амиды рассматривались совместно со сложноэфирными группами, алифатические амины - со спиртами, и т.д.

Поскольку разработанный ПМР метод позволяет определить количество свободных  $\text{COOH}$  групп, а спектроскопия  $^{13}\text{C}$  ЯМР предоставляет данные о суммарном содержании  $\text{COOH}+\text{COOR}$ , то количество сложноэфирных групп рассчитывается как:

$$\begin{aligned} \text{C}_{\text{COOH}} &= \text{H}_{\text{COOH}}(\text{ПМР}) / \text{H/C}_{(\text{эл.ан.})} \\ \text{C}_{\text{COOR}} &= (\text{C}_{\text{COOR}+\text{COOH}})_{(\text{C-13})} - \text{H}_{\text{COOH}}(\text{ПМР}) / \text{H/C}_{(\text{эл.ан.})} \end{aligned} \quad (2.11)$$

Аналогичный расчет может быть выполнен для определения содержания  $\text{OH-}$  и  $\text{OR-}$  замещенных ароматических атомов углерода:

$$\begin{aligned} \text{C}_{\text{ArOH}} &= \text{H}_{\text{ArOH}}(\text{ПМР}) / \text{H/C}_{(\text{эл.ан.})} \\ \text{C}_{\text{ArOR}} &= \text{C}_{\text{Ar-O}}(\text{C-13}) - \text{H}_{\text{ArOH}}(\text{ПМР}) / \text{H/C}_{(\text{эл.ан.})} \end{aligned} \quad (2.12)$$

Также из сопоставления результатов спектроскопии ЯМР  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  можно рассчитать содержание незамещенных и C-замещенных ароматических атомов углерода:

$$C_{ArH} = N_{ArH}(\text{ПМР}) / H/C_{(\text{эл.ан.})}$$

$$C_{ArC} = C_{Ar(C-13)} - N_{ArH}(\text{ПМР}) / H/C_{(\text{эл.ан.})} \quad (2.13)$$

Для расчета содержания фрагментов, входящих в состав гетерозамещенных алифатических структур -  $C_{СНОН}$ ,  $C_{СН2ОН}$ ,  $C_{ОСН3}$  - решали следующую систему уравнений:

$$\begin{cases} C_{СНОН} + C_{СН2ОН} + C_{ОСН3} = C_{Alk-O(C-13)} \\ 2/5 C_{СНОН} + C_{СН2ОН} = C_{Alk-OH}(\text{ПМР}) / H/C_{(\text{эл.ан.})} \\ C_{СНОН} + 2C_{СН2ОН} + 3C_{ОСН3} = C_{H_n-O}(\text{ПМР}) / H/C_{(\text{эл.ан.})} - C_{O-Alk-O(C-13)} \end{cases} \quad (2.14)$$

Результаты расчета по уравнениям (2.14) в целом удовлетворительно согласуются с результатами интегрирования диапазонов 55-60, 60-67 и 67-108 м.д.  $^{13}C$  ЯМР спектров, где находятся сигналы соответствующих фрагментов однако, с нашей точки зрения, использованный расчет предпочтительнее в связи с высокой погрешностью интегрирования перекрывающихся уширенных пиков в  $^{13}C$  спектре.

Также были рассчитаны атомные соотношения  $H/C$  в ароматических, алифатических и карбогидратных фрагментах, позволяющие определить среднюю степень замещения ароматических колец и разветвленности алифатической части молекул.

$$(H/C)_{Ar} = N_{Ar}(\text{ПМР}) / (C_{Ar(C-13)} + C_{Ar-O(C-13)}) / H/C_{(\text{эл.ан.})}$$

$$(H/C)_{Alk} = (C_{H_n} + \alpha-C_{H_n})(\text{ПМР}) / C_{Alk(C-13)} / H/C_{(\text{эл.ан.})} \quad (2.15)$$

$$(H/C)_{Alk-O} = C_{H_n-O}(\text{ПМР}) / C_{Alk-O(C-13)} / H/C_{(\text{эл.ан.})}$$

Рассчитанный фрагментный состав препаратов ГФК приведен в табл. 2.10.

Косвенная проверка корректности проведенных расчетов была выполнена при помощи вычисления атомных соотношений  $O/C$  из полученных структурных данных и сопоставления с рассчитанными из результатов элементного анализа (рис. 2.17). Атомные соотношения вычисляли из структурных данных по уравнению

$$O/C = 2C_{COOH} + 3/2C_{COOR} + C_{ArOH} + 1/2C_{ArOR} + 4/5(C_{СНОН} + C_{O-Alk-O}) + 1/2C_{СН3O} + C_{СН2ОН} \quad (2.16)$$

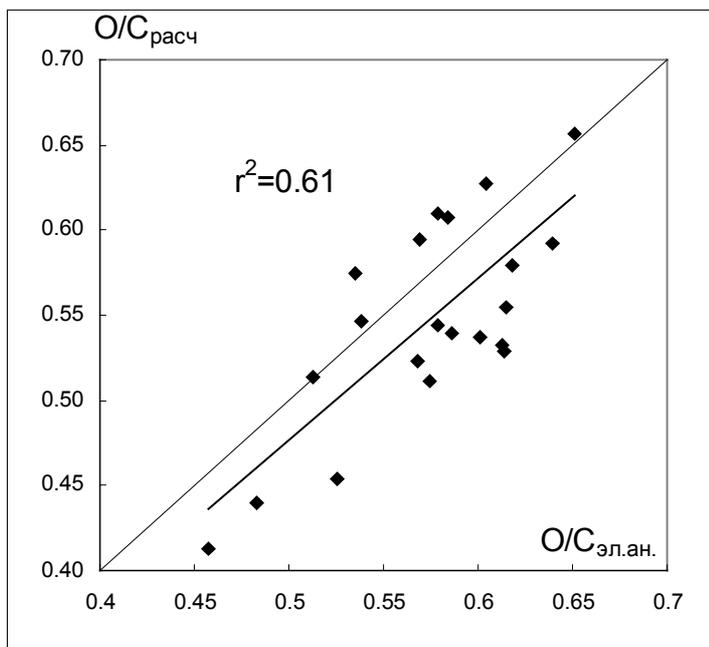


Рис. 2.17. Сопоставление рассчитанных из фрагментного состава соотношений O/C с данными элементного анализа.

Дробные коэффициенты в уравнении (2.16) возникают в связи с тем, что кислород эфирных структур относится сразу к двум различным фрагментам. Коэффициент 5/6 соответствует соотношению O/C в полисахаридных циклах, в которые входит основная часть  $C_{снон}$  и  $C_{O-alk-O}$  фрагментов.

Вычисленные значения дают значимую при  $p=0.99$  корреляцию с данными элементного анализа ( $r^2=0.61$ ). В то же время из рисунка можно видеть, что вычисленные значения несколько ниже экспериментально определенного содержания кислорода. Доля недоопределенного кислорода составляет около 4%. Это может быть вызвано обсуждавшимся в п 2.3.1. возможным недоопределением карбоксильных групп методом ПМР при анализе зольных образцов. Величина погрешности определения  $COOH$ -групп приблизительно соответствует доле недоопределенного кислорода.

### 2.5.2. Характеристика закономерностей строения ГФК различного происхождения на основании фрагментного состава

Как следует из таблицы 2.10, рассчитанные содержания структурных фрагментов для разных препаратов ГФК изменяются в достаточно широком диапазоне. Однако можно отметить ряд закономерностей, проявляющихся при анализе характеристик структуры препаратов, сгруппированных в зависимости от источника происхождения.

Максимальное содержание карбоксильных групп характерно для препаратов ФК почв, ГФК природных вод и ГК угля. Эти же препараты

Таблица 2.10.

Фрагментный состав препаратов ГФК различного происхождения														
Шифр	CO	COOH	COOR	C <sub>Ar</sub> -OH	C <sub>Ar</sub> -OR	C <sub>Ar</sub> -H	C <sub>Ar</sub> -C	CH <sub>3</sub> O	CH-OH	CH <sub>2</sub> OH	C <sub>Alk</sub>	H/C <sub>Alk</sub>	H/C <sub>Ar</sub>	H/C <sub>Alk-O</sub>
ГК дерново-подзолистых почв														
HBW	1.0	9.0	8.0	7.0	5.0	13.4	18.6	3.0	14.3	2.7	18.0	1.88	0.30	1.37
HBWNd	2.0	8.2	6.8	7.1	5.9	12.3	17.7	4.5	12.9	2.6	20.0	1.94	0.29	1.48
ГК чернозема														
HMG	2.0	9.6	5.4	7.4	3.1	17.5	28.0	3.0	7.5	1.5	15.0	1.87	0.27	1.60
ФК дерново-подзолистых почв														
FA1N	3.0	13.0	7.0	7.5	4.5	8.5	13.5	3.0	13.5	2.5	24.0	1.62	0.25	1.26
FA3N	3.0	14.2	3.8	8.4	3.6	10.0	19.0	3.5	13.0	2.5	19.0	1.88	0.26	1.49
ГФК торфа														
T5	1.0	8.4	7.6	5.3	4.7	10.5	17.5	3.0	16.0	3.0	23.0	1.74	0.29	1.44
T6	2.0	8.9	5.1	9.4	4.6	14.6	23.4	3.0	12.5	2.5	14.0	1.82	0.26	1.52
T7	2.0	9.6	7.4	8.7	6.3	15.4	18.6	4.0	11.0	2.0	15.0	1.67	0.30	1.70
T10	2.0	8.9	7.1	10.4	4.6	13.4	19.6	4.0	11.5	2.5	16.0	1.79	0.28	1.65
HTL	2.0	7.9	7.1	7.9	6.1	12.9	18.1	4.0	14.0	3.0	17.0	1.74	0.28	1.51
TTL	3.0	8.6	6.4	8.6	4.4	12.4	19.6	3.5	13.5	3.0	17.0	1.75	0.26	1.41
HTO	3.0	7.3	5.7	8.4	4.6	12.6	18.4	5.0	15.8	3.2	16.0	1.96	0.30	1.48
ГФК природных вод														
FMX-8	2.0	13.5	5.5	5.6	5.4	7.9	17.1	5.0	10.0	4.0	24.0	1.87	0.25	1.65
FIX-8	3.0	14.2	3.8	9.1	2.9	8.5	17.5	5.5	8.5	4.0	23.0	1.78	0.26	1.83
FG1FA	1.0	12.6	3.4	4.6	4.4	7.4	17.6	3.0	15.5	4.5	26.0	1.82	0.25	1.39
HO10FA	1.0	11.0	7.0	9.0	4.0	11.0	19.0	3.0	13.5	4.0	17.5	1.78	0.26	1.42
ГК угля														
AGK	1.0	13.1	2.9	6.1	3.9	21.5	26.5	4.0	0.0	0.0	21.0	1.94	0.35	3.04
ANA	1.0	12.0	3.5	8.5	4.0	19.5	23.5	6.0	0.0	1.0	21.0	1.88	0.35	2.79
Другое														
SEL	1.0	10.8	7.2	7.2	5.8	12.9	19.1	4.0	15.0	3.0	14.0	1.92	0.30	1.53
BS1FA	3.0	14.7	2.3	8.6	2.4	12.2	25.8	5.5	8.5	2.0	15.0	2.03	0.25	1.84
SWM4	2.0	10.8	6.2	8.6	3.4	9.7	16.3	2.0	22.0	6.0	13.0	1.91	0.28	1.29

характеризуются более низким содержанием  $C_{COOR}$ -фрагментов. При этом наблюдается значимая при  $p=0.99$  обратная корреляция между содержанием карбоксильных и сложноэфирных групп ( $r=-0.68$ ).

В случае фенольных гидроксидов и их эфиров не удается установить такой закономерности, все препараты характеризуются довольно близкими содержаниями данных функциональных групп. Однако, отношения  $C_{COOH}/C_{COOR}$  и  $C_{ArOH}/C_{ArOR}$  характеризуются значимой при  $p=0.95$  корреляцией ( $r=0.53$ ). По-видимому, данные отношения изменяются однонаправленно и могут служить характеристикой глубины протекания гидролитических процессов.

Все исследованные препараты содержат от 2 до 6% метоксильных групп. Наиболее вероятным источником таких групп являются продукты деградации лигнинов. Однако при сопоставлении  $C_{OCH_3}$  и  $C_{ArOR}$  характеризуются значимой при  $p=0.95$  корреляцией ( $r=0.53$ ). По-видимому, это объясняется присутствием в структуре ГФК значительных количеств эфиров карбоксильных групп, как ариловых, так и метиловых.

Для определения количества полисахаридных структур было проанализировано распределение  $C_{Alk-O}$  - углерода в молекулах ГФК. Для ГФК П<sup>Д</sup> почв и торфа содержание карбогидратных  $C_{СНОН}$ , ацетальных  $C_{O-Alk-O}$  и первичных спиртовых  $C_{СН_2ОН}$  фрагментов соотносятся в среднем как 4:1:1 и в ряду препаратов изменяются симбатно. В связи с этим был сделан вывод о принадлежности всех  $C_{СНОН}$  и  $C_{СН_2ОН}$  фрагментов в этих препаратах к полисахаридным циклам. Напротив, для препаратов ГФК природных вод до 50% спиртовых групп не относятся к полисахаридам.

Содержание полисахаридов в структуре ГФК близко для ГФК торфа и речных вод, ГК и ФК дерново-подзолистых почв. Содержание полисахаридов в препарате ГК чернозема НМГ существенно ниже. В структуре ГК угля практически весь углерод  $C_{Alk-O}$ -фрагментов относится к метоксильным группам. Аномально высоким содержанием полисахаридов характеризуется препарат SWM-4 (ГФК донных отложений торфяных болот). Высокая обратная корреляция между содержанием полисахаридов и ароматических структур свидетельствует о том, что повышение содержания ароматических фрагментов в структуре ГФК в значительной степени обуславливается отщеплением периферийных полисахаридных фрагментов.

Атомные соотношения  $(H/C)_{Ar}$ , характеризующие замещенность ароматического скелета ГФК, изменяются в довольно узких пределах от 0.25-0.28 для препаратов природных вод и фульвокислот почв до 0.35 в случае ГК угля. От 30 до 44% атомов углерода ароматических колец представлено С-замещенными, а 17-35% - О-замещенными (табл. 2.11). Таким образом, характер

замещения «среднего» ароматического кольца для исследовавшихся препаратов ГФК описывается следующим образом: 2.6 С-замещенных, 1.7 О-замещенных и 1.7 незамещенных атомов углерода.

Содержание алифатических фрагментов выше для ГФК природных вод и ГК угля, в то время как их наименьшее количество обнаружено в ГФК торфа.

Таблица 2.11.

Параметры, характеризующие замещение ароматических колец

Препарат	$C_{Ar-C}/C_{Ar}$	$C_{Ar-H}/C_{Ar}$	$C_{Ar-O}/C_{Ar}$	Препарат	$C_{Ar-C}/C_{Ar}$	$C_{Ar-H}/C_{Ar}$	$C_{Ar-O}/C_{Ar}$
HBW	2.5	1.8	1.6	HTL	2.4	1.7	1.9
HBWNd	2.5	1.7	1.8	TTL	2.6	1.7	1.7
SEL	2.5	1.7	1.7	HTO	2.5	1.7	1.8
HMG	3.0	1.9	1.1	FMX-8	2.9	1.3	1.8
BS1FA	3.2	1.5	1.3	FIX-8	2.8	1.3	1.9
FA1N	2.4	1.5	2.1	FG1FA	3.1	1.3	1.6
FA3N	2.8	1.5	1.8	HO10FA	2.6	1.5	1.8
T5	2.8	1.7	1.6	SWM4	2.6	1.5	1.9
T6	2.7	1.7	1.6	AGK	2.7	2.2	1.0
T7	2.3	1.9	1.8	АНА	2.5	2.1	1.4
T10	2.5	1.7	1.9	Среднее	2.6±0.1	1.7±0.1	1.7±0.1

Для выявления закономерностей строения ГФК различного происхождения на основании данных по фрагментному составу были предложены характеристические параметры, описывающих наиболее существенные различия структуры ГФК. Их выбор осуществляли таким образом, чтобы учесть основные процессы трансформации структуры ГФК в процессе гумусообразования.

Согласно литературным данным [8, 12] основными процессами трансформации структуры ГФК являются гидролиз, в результате которого происходит отщепление полисахаридной периферии и распад сложных эфиров, и окисление ароматического скелета. С нашей точки зрения, согласующейся с изложенной в [12], структуру ГФК целесообразно рассматривать, выделяя две основные части: ароматический скелет ГФК, наименее затрагиваемый процессами трансформации, и полисахаридную периферию, подверженную гидролизу. Соотношение этих частей в структуре ГФК в значительной степени определяет свойства этих соединений.

В связи с этим в качестве характеристических параметров нами предложено использовать отношение содержания полисахаридных  $C_S$  и ароматических фрагментов ГФК  $C_S/(C_{Ar-H}+C_{Ar-C}+C_{Ar-O})$ , уменьшение которого свидетельствует об увеличении степени гумификации, отношение  $C_{COOH}/C_{COOR}$  как характеристику глубины протекания гидролитических процессов, а также отношение  $C_{Ar-O}/(C_{Ar-H}+C_{Ar-C}+C_{Ar-O})$ , позволяющее судить о степени окисленности ароматических колец.

Средние характеристические параметры для групп препаратов в зависимости от их источника происхождения приведены на рис. 2.18.

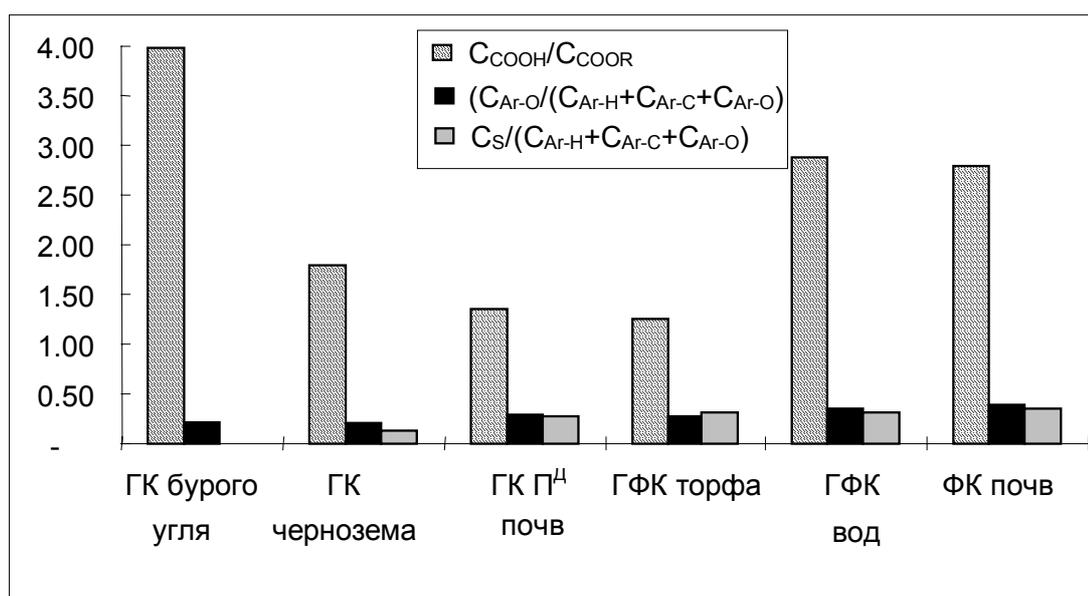


Рис. 2.18. Характеристические параметры структуры ГФК различного происхождения.

Наивысшими значениями показателя  $C_{Ar-O}/(C_{Ar-H}+C_{Ar-C}+C_{Ar-O})$  характеризуются препараты ГФК природных вод и ФК почв, меньшая окисленность ароматического каркаса характерна для ГФК торфа и ГК почв, а препараты ГК бурого угля и черноземов характеризуются наименьшими значениями этого параметра. В этом же ряду снижается соотношение  $C_S/(C_{Ar-H}+C_{Ar-C}+C_{Ar-O})$ . Между этими показателями наблюдается значимая при  $p=0.99$  корреляции ( $r^2=0.68$ ).

Соотношение  $C_{COOH}/C_{COOR}$  резко отличается для разных групп препаратов, составляя 1.1-1.8 для ГК почв и ГФК торфа, 1.7-3.8 для ФК почв и ГФК природных вод и 3.5-4.5 для ГК угля. Аномально высокое (6.4) значение этого соотношения для препарата BS1FA, выделенного из почвенного раствора, указывает на то, что эти вещества обогащены отщепленными при гидролизе низкомолекулярными фрагменты полисахаридной периферии ГК почв.

Для установления значимости структурных различий между препаратами ГФК основных природных источников данные по их структуре были подвергнуты кластерному

анализу. Для расширения выборки в нее были включены препараты ГК дерново-подзолистых, серых лесных почв и черноземов, ФК дерново-подзолистых почв, ГФК торфа и природных вод и ГК бурых углей. В качестве структурных характеристик при этом использовали распределение углерода по данным  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектроскопии. Результаты кластерного анализа приведены на рис. 2.19.

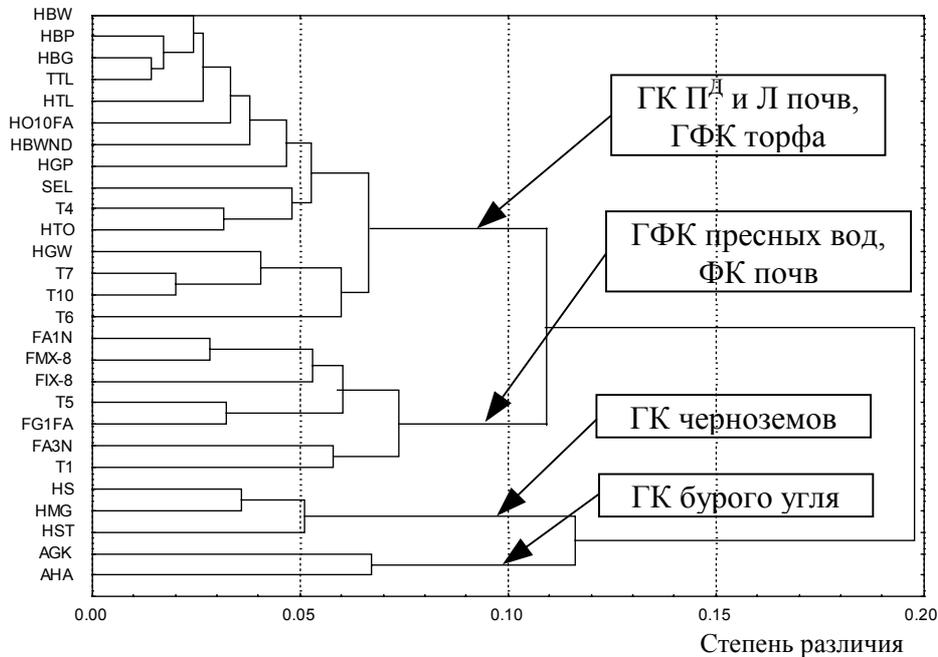


Рис. 2.19. Классификация препаратов ГФК при помощи кластерного анализа.

Как видно из рисунка, можно выделить 4 группы препаратов с достоверными различиями структуры. При этом полученное распределение по кластерам в основном соответствует распределению препаратов по источникам происхождения. Обращает на себя внимание сходство структуры ФК почв и ГФК природных вод. Это может служить указанием на высокий вклад ФК почв в формирование ГФК природных вод за счет их вымывания из почв и поступления в водоемы с грунтовыми водами. Сходную структуру также имеют ГК П<sup>Д</sup> и Л почв и ГФК торфа. Структура препаратов ГК черноземов и бурых углей существенно отличается от остальных препаратов. Таким образом, кластерный анализ продемонстрировал, что структура ГФК различных природных источников статистически различна.

Исходя из полученных данных по фрагментному составу можно указать на некоторые общие закономерности образования ГФК из растительных остатков и их генезиса в различных природных средах.

ГФК торфа по своей структуре наиболее близки к растительным остаткам. На это указывает как высокое содержание полисахаридных включений, так и низкое значение

показателей гидролизованности  $C_{COOH}/C_{COOR}$  и  $C_{ArOH}/C_{ArOR}$ . Довольно сходны с ними ГК дерново-подзолистых и серых лесных почв.

При переходе к ГК черноземов наблюдается увеличение доли ароматических фрагментов, происходящее преимущественно за счет отщепления полисахаридов, и возрастание как окисленности ароматических колец, так и доли свободных функциональных групп (за счет гидролиза сложных эфиров). Параллельное протекание процессов отщепления полисахаридов и увеличения соотношения  $C_{COOH}/C_{COOR}$  подтверждает высказанное в работе [12] предположение, что полисахаридные фрагменты связаны с ароматической частью ГФК сложноэфирными связями.

ГФК природных вод и близкие им по структуре ФК почв представляют собой наиболее высокоокисленные вещества. Для этих препаратов наблюдается минимальное содержание незамещенного водорода ароматических структур. Доля свободных карбоксильных и фенольных групп в них значительно превышает аналогичные параметры для ГК почв. Окисление затрагивает и алифатическую часть молекул, результатом чего является присутствие значительного количества спиртовых гидроксидов, не относящихся к полисахаридным фрагментам. Характеристики структуры этих классов ГФК (довольно высокое содержание полисахаридов и алифатических фрагментов и низкое - ароматических) не позволяют предполагать, что они представляют собой гумусовые кислоты этого ряда, подвергшиеся более глубокому гидролизу. По нашему мнению, более корректно рассматривать эти вещества как находящийся в динамическом равновесии сложный композит, включающий в себя помимо сильно гидролизованных остатков ароматических скелетных фрагментов ГК также и отщепляемые при их гидролизе периферийные единицы. С этой точки зрения данные препараты должны быть наиболее неоднородны по фрагментному составу.

В то же время при рассмотрении структуры ФК почв и ГФК природных вод следует учитывать особенности метода их выделения, включающего сорбцию на амберлите XAD-8. При этом более высокой степенью извлечения обладает гидрофобная часть ГФК, а для наиболее гидрофильной части сорбция может быть неполной. Подтверждением данного тезиса является более высокое содержание алифатических структур в таких препаратах.

ГК угля представляют собой отдельный класс ГФК в связи с особенностями их образования в условиях недостатка кислорода. Отличительной особенностью этих соединений является низкая окисленность и высокая гидролизованность структуры. Эти препараты характеризуются практически полным отсутствием карбогидратной периферии и самым высоким среди исследованных препаратов соотношением  $COOH/COOR$ .

*Сопоставление полученных данных по фрагментному составу  
с гипотетическими структурными формулами ГФК.*

Полученные характеристики структуры ГФК различного происхождения были сопоставлены с приводимыми в литературе гипотетическими структурными формулами (глава 1.1).

Структура, приводимая в работе [66] для ФК речных вод (рис. 1.11), хорошо описывает полученное нами распределение углерода между ароматической и алифатической частями молекул и характеристики окисленности ароматического ядра, однако, содержание карбогидратных фрагментов по нашим данным вдвое выше. Кроме того, рассмотренная структура представляет собой один из предельных случаев, в связи с тем, что в ней отсутствует водород ароматических колец. Кроме того, существенно переоценена роль кетонных групп в структуре ФК.

Структурная формула ФК почв (Schnitzer) [50] (рис. 1.8) близка к рассмотренной выше, но отличается от нее более низким содержанием алифатических фрагментов, что вызывает несколько худшее согласование с полученными результатами.

Структурная формула ГК почв (Stevenson) [32] (рис. 1.7) в связи с высоким содержанием в ней ароматических структур была сопоставлена с данными, полученными для ГК черноземов, имеющих сходные параметры строения углеродного скелета. Степень замещения водорода ароматических колец и соотношения  $C_{\text{Алк}}/C_{\text{Аг}}$  для этой структуры в целом близки к полученным в нашей работе. Следует отметить крайне низкую окисленность предлагаемой структуры, что, по-видимому, обусловлено недоучетом роли карбоксильных групп. С другой стороны, предлагаемая структура характеризуется исключительно высоким содержанием  $C_{\text{Аг-О}}$  фрагментов, превышающим наблюдавшиеся нами как минимум в 1.5 раза. Крайне высокое содержание хинонных групп также плохо согласуется с полученными нами экспериментальными данными.

Структурная формула ГК почв Драгунова [64] (рис. 1.6), будучи на основании близости элементного состава и содержания ароматических структур сопоставлена с данными, полученными для ГК дерново-подзолистых почв, неудовлетворительно согласуется с ними. В первую очередь, это связано с практически полным отсутствием в этой структурной формуле карбоксильных групп. Приводимое автором содержание хинонных групп превышает максимально определенное нами для ГК почв в 5 раз. Данная структура характеризуется также не наблюдавшимся среди исследованных нами препаратов крайне высоким содержанием незамещенных ароматических атомов углерода. Содержание алифатических фрагментов в предлагаемой формуле занижено по сравнению с данными  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектроскопии.

Гипотетическая структурная формула негидролизуемого скелета ГК почв, приводимая в [60] (рис. 1.10), хорошо согласуется с полученными данными об окисленности структуры и характере замещения ароматических колец. В то же время в данной формуле приводится чрезмерно высокое содержание алифатических структур. Высокое отношение  $\text{COOH}/\text{COOR}$ , нехарактерное для ГК почв, в данном случае оправдано, т.к. автор приводит данные о веществе, подвергшемся глубокому гидролизу.

Структурная формула ГК почв, приводимая в работе [65] (рис. 1.9), описывает полученные нами данные наилучшим образом. Данные о распределении углерода, характере замещения различных фрагментов, окисленности и степени гидролизованности структуры хорошо совпадают с полученными в настоящей работе. Однако следует отметить некоторое завышение содержания полисахаридных фрагментов за счет алифатической части структуры. Кроме того высокое содержание азота в приводимой формуле в целом нехарактерно для ГК почв [18].

\* \* \*

Таким образом, рассчитанный фрагментный состав позволил охарактеризовать основные закономерности строения ГФК. На заключительном этапе работы была исследована применимость данных по фрагментному составу для генерации структурных дескрипторов с целью их использования при установлении количественных соотношений структура-свойство. Для этой цели данные по фрагментному составу были использованы для установления взаимосвязи между структурой ГФК, с одной стороны, и гель-хроматографическими характеристиками и детоксицирующими свойствами ГФК по отношению к тяжелым металлам, с другой стороны.

## 2.6. Применение данных по фрагментному составу ГФК для установления зависимостей структура - свойство

### 2.6.1. Установление взаимосвязи между структурой и гель-хроматографическими характеристиками ГФК.

Гель-хроматография является традиционным методом определения молекулярных масс (ММ) ГФК. Экспериментально определяемой величиной при этом служит хроматографический коэффициент распределения  $K_d$ , характеризующий объем пор геля, доступный для молекул данного размера. Расчет ММ из  $K_d$  осуществляется из калибровочной зависимости, получаемой для стандартных веществ. Необходимым условием правильного определения молекулярных масс при использовании этого метода является структурная идентичность анализируемого вещества и калибровочного стандарта. Однако, в связи со сложностью и нерегулярностью строения ГФК выбор структурного аналога затруднителен и на сегодняшний день для этих веществ не существует подходящих калибровочных стандартов. В качестве таковых используют полидекстраны (полисахариды) и различные полиэлектролиты (полиакриловые, полиметакриловые и полистиролсульфоновые кислоты).

Различия в структуре ГФК и калибровочного стандарта могут существенно изменять поведение вещества в условиях гель-хроматографического эксперимента и приводить в результате к значительным погрешностям в определении молекулярных масс. Данные погрешности обуславливаются двумя противоположенными факторами, возникающими за счет взаимодействия с гелем: электростатическим отталкиванием, вызывающим завышение определяемых молекулярных масс, и динамической сорбцией, занижающей получаемые значения.

Для минимизации возникающих погрешностей нами был предложен способ количественного учета структурных различий, основанный на представлении экспериментально определяемого  $K_d$  в виде:

$$K_d = K_{d0} + \Delta K_d \quad (2.17),$$

где  $K_{d0}$  - "идеальный" коэффициент распределения, которым характеризовалось бы вещество со структурой, идентичной калибровочному стандарту, и  $\Delta K_d$  - поправка на структурные различия, являющаяся функцией структурных параметров.

В качестве калибровочных стандартов нами были использованы полидекстраны. Такой выбор был обусловлен тем, что для данного класса соединений взаимодействие с гелем минимально.

Величина  $K_d$  была определена экспериментально для ряда низкомолекулярных веществ, моделирующих основные структурные фрагменты ГФК. Сопоставляя ее с рассчитанной из калибровочного уравнения по полидекстранам величиной  $K_{d0}$ , по разности определяли соответствующую поправку  $\Delta K_d$ . Экспериментально определенные  $K_d$  и рассчитанные  $K_{d0}$  использовавшихся соединений приведены в приложении.

На основании регрессионного анализа данных по  $\Delta K_d$  и фрагментному составу выбранных низкомолекулярных соединений было получено уравнение связи между  $\Delta K_d$  и структурой анализируемого вещества. Для этого структура использованных низкомолекулярных соединений была описана фрагментным и элементным составом в терминах, аналогичных используемым при описании структуры ГФК (глава 2.5).

Полученная зависимость  $\Delta K_d$  от параметров структуры анализируемого вещества имела следующий вид:

$$\Delta K_d = 0.21 - 1.24C_{\text{АгОН}} + 0.35C_{\text{СООН}} - 0.18C/\text{О} + 0.07C/\text{Н} \quad (2.18)$$

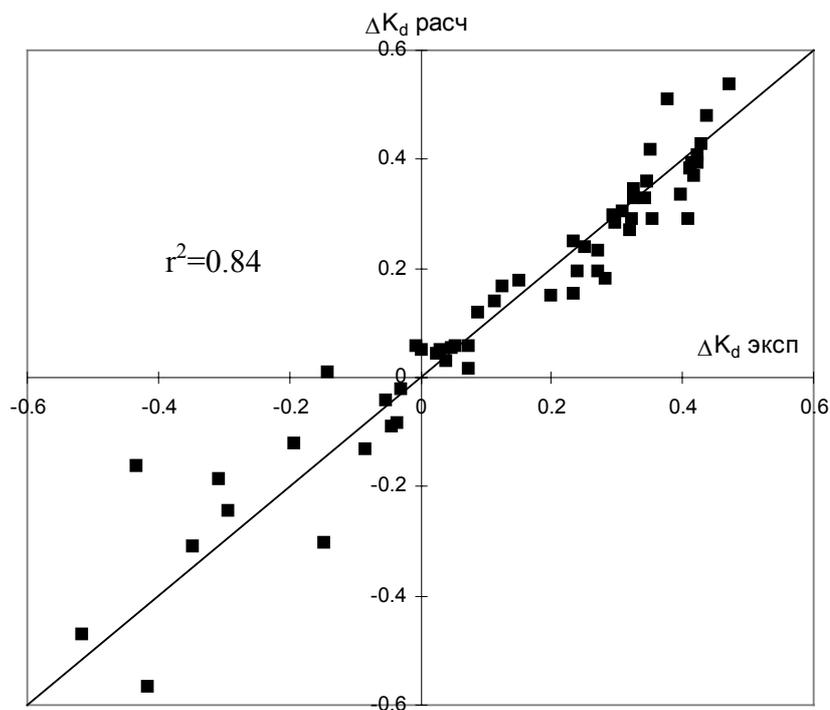


Рис. 2.20. Сопоставление экспериментально полученных и рассчитанных согласно (2.18) величин  $\Delta K_d$  для низкомолекулярных модельных соединений.

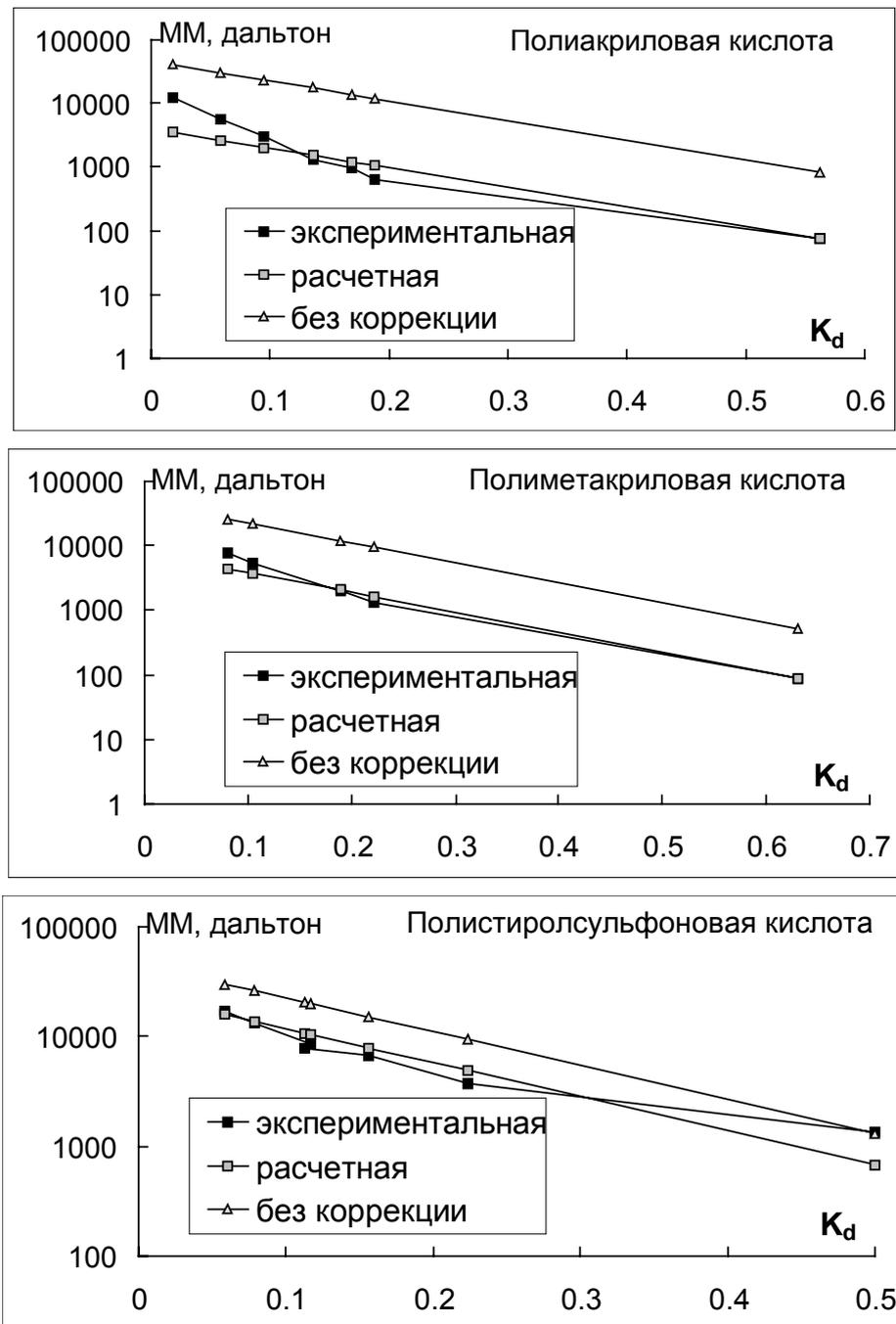


Рис. 2.21. Применение метода расчета для определения молекулярных масс полиэлектролитов.

Соответствие рассчитанных согласно уравнению (2.18) и экспериментально определенных  $\Delta K_d$  проиллюстрировано на рис. 2.20.

Наибольшие отклонения от калибровочного графика наблюдались в случае карбоновых кислот (снижение доступного объема за счет электростатического отталкивания от геля) и соединений, содержащих фенольную группу (увеличение коэффициента распределения за счет динамической сорбции). Данные отклонения весьма значительны, что не позволяет пренебрегать такими взаимодействиями при исследовании

молекулярно-массового распределения ГФК, в структуре которых присутствуют как те, так и другие фрагменты.

Полученные данные показали возможность удовлетворительной применимости полученного уравнения связи для области калибровочного графика, соответствующей низким значениям молекулярных масс. Однако в случае ГФК для расчета ММ более важной представляется область высоких молекулярных масс ( $K_d = 0-0.2$ ). В связи с этим применимость полученного уравнения в высокомолекулярной области была исследована на модельных полимерах полиакриловых (РА), полиметакриловых (РМА) и полистиролсульфоновых (PSS) кислотах. Проведенные эксперименты показали хорошую применимость полинома для описания  $K_d$  высокомолекулярных соединений (рис. 2.21). Как видно из рисунка, молекулярные массы поликислот, определяемые из калибровочного уравнения по полидекстранам, примерно на порядок выше истинных. Введение поправки на структурные различия значительно улучшает результаты определения при определении молекулярных масс полиэлектролитов, свидетельствуя об адекватности способа корректировки, при этом получаемые значения наиболее близки к реальным величинам в области больших молекулярных масс.

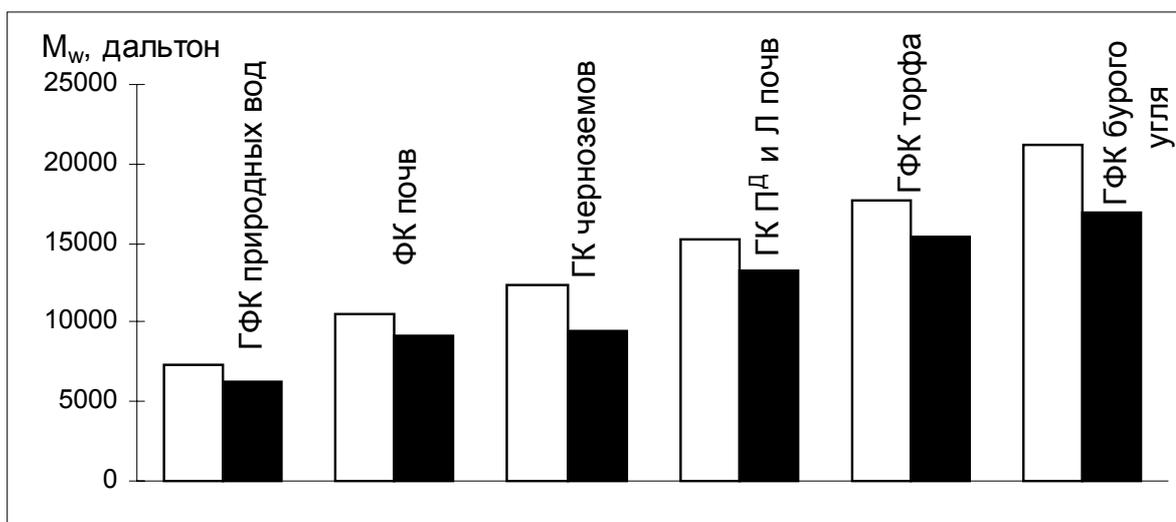


Рис. 2.22. Средние молекулярные массы ГФК различного происхождения.

□ - без корректировки, ■ - скорректированные на структурные различия.

При помощи данного метода были рассчитаны средние молекулярные массы препаратов ГФК. Влияние корректировки на определяемые молекулярные массы препаратов ГФК различного происхождения показано на рис. 2.22. Как видно из рисунка, молекулярные массы препаратов ГФК возрастают в ряду от ГФК природных вод до ГК бурых углей. Скорректированные молекулярные массы оказались на 1-4 тысячи дальтон ниже непосредственно определенных из калибровки по полидекстранам.

### 2.6.2. Исследование взаимосвязи между структурой ГФК и их детоксицирующими свойствами по отношению к тяжелым металлам.

Полученные данные по фрагментному составу ГФК различного происхождения были использованы для установления взаимосвязи с детоксицирующими свойствами ГФК по отношению к тяжелым металлам. Для этой цели были проведено исследование детоксицирующих свойств ГФК различного происхождения. Характеристики детоксицирующего действия были сопоставлены со структурными дескрипторами, рассчитанными на основании данных по фрагментному составу ГФК.

Детоксицирующие свойства ГФК были исследованы по отношению к трем опасным для природных экосистем тяжелым металлам - меди, кадмию и свинцу. Для проведения исследования были выбраны представители 4-х основных классов гумусовых кислот - ГК почв (NBW), ГФК торфа (HTL), ГФК речных вод (FMX8) и ФК морских вод (FSW). Препарат ФК морских вод и данные о его структуре были предоставлены NAOML (Miami, USA).

В работе был использован метод альгологического биотестирования в водной среде с использованием в качестве биотеста культуры одноклеточных водорослей *Chlorella vulgaris*, в качестве тест-функции использовалась фотосинтетическая активность, измеряемая при помощи регистрации быстрой флуоресценции.

Для оценки детоксицирующего действия ГФК была введена величина «коэффициент детоксикации» (D), соответствующая относительному изменению токсичности данной концентрации металла в присутствии ГФК, и рассчитываемая как

$$D = \left( 1 - \frac{R_0(R_d - R_{d+t})}{R_d(R_0 - R_t)} \right) \cdot 100\%, \quad (2.19)$$

где R - фотосинтетическая активность

$R_0$  - в контрольных экспериментах - тестируемая среда как без токсиканта, так и без детоксиканта;

$R_d$  - в присутствии детоксиканта;

$R_t$  - в присутствии токсиканта;

$R_{d+t}$  - при совместном присутствии токсиканта и детоксиканта.

Данная формула позволяет вычленить собственно детоксицирующий эффект, поскольку эффект изменения фотосинтетической активности водорослей под воздействием самих гумусовых кислот при таком способе расчета исключается.

Для выбранных тяжелых металлов были определены концентрационные диапазоны токсического действия, от полного отсутствия токсичности по отношению к тест-объекту до полного подавления фотосинтеза водоросли в условиях эксперимента (рис 2.19). Для проведения экспериментов по исследованию детоксицирующей способности гумусовых кислот были выбраны концентрации, вызывающие полное подавление фотосинтетической активности водорослей (50 мкг/л  $\text{Cu}^{2+}$ , 800 мкг/л  $\text{Cd}^{2+}$ , 2 мг/л  $\text{Pb}^{2+}$ ).

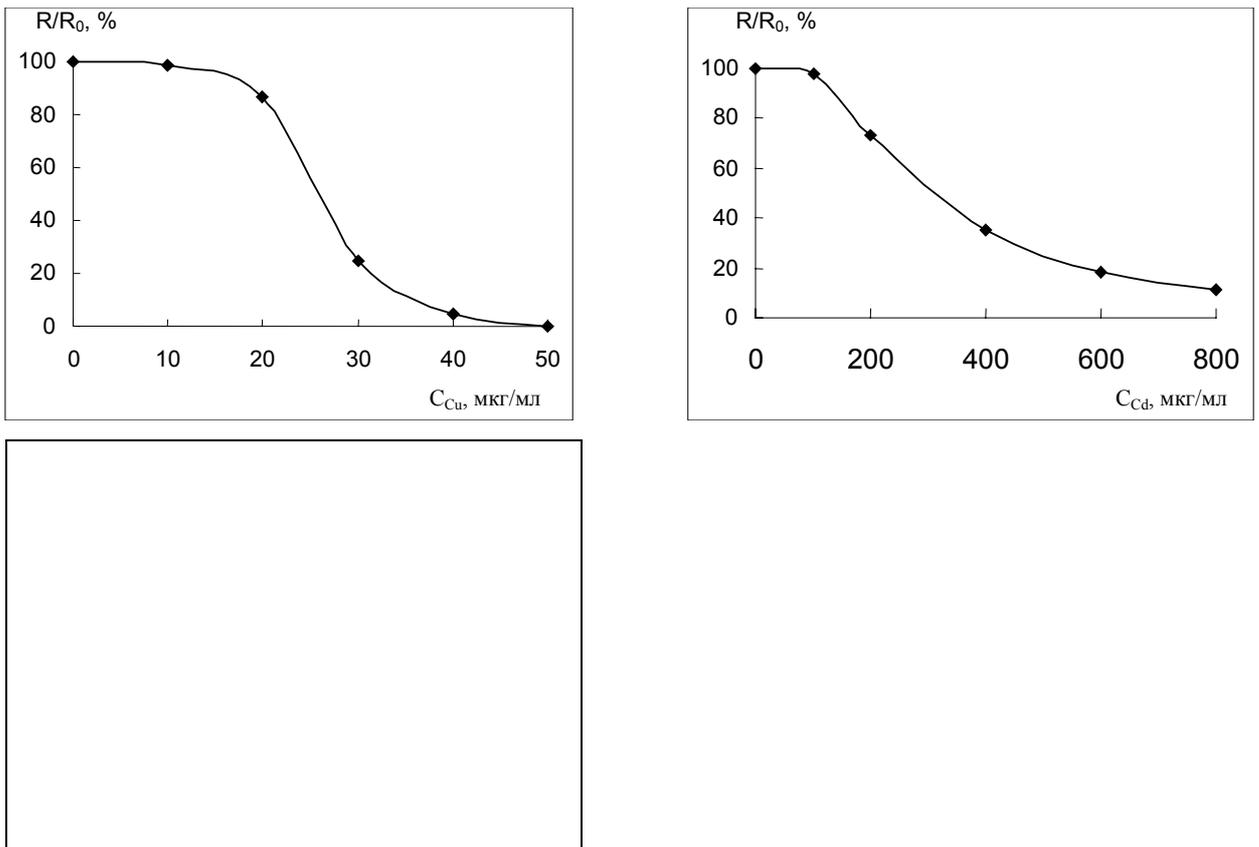


Рис 2.23. Диапазоны токсического действия  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$ .

В присутствии ГФК токсическое воздействие всех исследованных металлов на водоросли значительно снижается. Для исследованных препаратов ГФК были получены концентрационные зависимости детоксицирующего действия (рис. 2.20.).

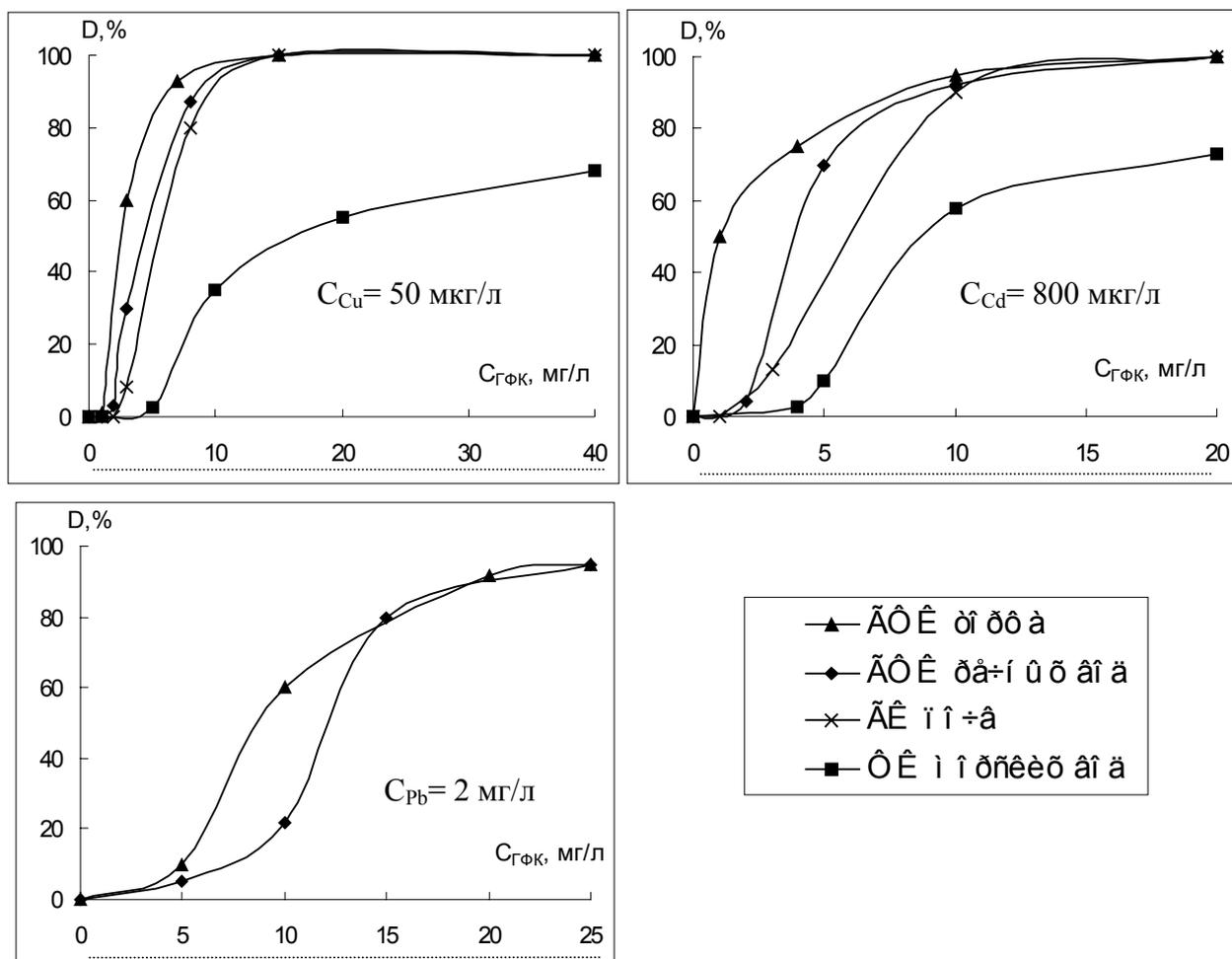


Рис. 2.24. Детоксикация тяжелых металлов препаратами ГФК различного происхождения.

Для сопоставления детоксицирующего действия препаратов ГФК была использована величина ДК<sup>50</sup> - концентрация ГФК, вызывающая 50% снижение токсичности металла. Как следует из полученных данных, исследованные препараты можно расположить в следующий ряд по величине их детоксицирующего потенциала:

ГФК торфа > ГФК речных вод ≥ ГФК почв >> ГФК морских вод.

ГФК торфа и ГФК почв, а также ГФК речных вод оказались довольно близки по детоксицирующей способности, вызывая полное снятие токсического эффекта уже при концентрациях 10-20 мг/л. В то же время ГФК морских вод обладают менее выраженными детоксицирующими свойствами, не вызывая полного снятия токсичности металлов во всем диапазоне исследованных концентраций.

Для выявления взаимосвязи между детоксицирующими свойствами и структурными характеристиками ГФК полученные величины ДК<sup>50</sup> были подвергнуты корреляционному анализу совместно с фрагментным составом ГФК. Максимальные значения коэффициентов корреляции были получены для параметров, отражающих обогащенность ГФК ароматическими структурами с СООН и ОН заместителями. Это подтверждает предположение о высоком вкладе салицильных фрагментов в комплексообразование ГФК

с металлами. По-видимому, повышение количества салицилатных фрагментов в молекулах ГФК вызывает прочное связывание в комплекс и снижает концентрацию токсичной для водоросли свободнорастворенной формы металлов.

Таблица 2.12.

Коэффициенты корреляции между  $DK^{50}$  и параметрами структуры ГФК.

	$(COOH+ArOH)*C_{Ar}$	$(COOH+ArOH)*C_{Ar}$	$C_S$
		$C_{Alk-O}$	$C_{Ar}$
$DK^{50}(Cu)$	0.99	0.93	0.65
$DK^{50}(Cd)$	0.98	0.70	0.94
$DK^{50}(Pb)$	0.99	0.95	0.89

## 2.6.2. Исследование взаимосвязи между структурой ГФК и их детоксицирующими свойствами по отношению к тяжелым металлам.

Полученные данные по фрагментному составу ГФК различного происхождения были использованы для установления взаимосвязи с детоксицирующими свойствами ГФК по отношению к тяжелым металлам. Для этой цели были проведено исследование исследование детоксицирующих свойств ГФК различного происхождения. Характеристики детоксицирующего действия были сопоставлены со структурными дескрипторами, рассчитанными на основании данных по фрагментному составу ГФК.

Детоксицирующие свойства ГФК были исследованы по отношению к трем опасным для природных экосистем тяжелым металлам - меди, кадмию и свинцу. Для проведения исследования были выбраны представители 4-х основных классов гумусовых кислот - ГК почв (НВW), ГФК торфа (НТL), ГФК речных вод (FMX8) и ФК морских вод (FSW). Препарат ФК морских вод и данные о его структуре были предоставлены NAOML (Miami, USA).

В работе был использован метод альгологического биотестирования в водной среде с использованием в качестве биотеста культуры одноклеточных водорослей *Chlorella vulgaris*, в качестве тест-функции использовалась фотосинтетическая активность, измеряемая при помощи регистрации быстрой флуоресценции.

Для оценки детоксицирующего действия ГФК была введена величина «коэффициент детоксикации» (D), соответствующая относительному изменению токсичности данной концентрации металла в присутствии ГФК, и рассчитываемая как

$$D = \left( 1 - \frac{R_0(R_d - R_{d+t})}{R_d(R_0 - R_t)} \right) \cdot 100\%, \quad (2.18)$$

где R - фотосинтетическая активность

$R_0$  - в контрольных экспериментах - тестируемая среда как без токсиканта, так и без детоксиканта;

$R_d$  - в присутствии детоксиканта;

$R_t$  - в присутствии токсиканта;

$R_{d+t}$  - при совместном присутствии токсиканта и детоксиканта.

Данная формула позволяет вычлнить собственно детоксицирующий эффект, поскольку эффект изменения фотосинтетической активности водорослей под воздействием самих гумусовых кислот при таком способе расчета исключается.

Для выбранных тяжелых металлов были определены концентрационные диапазоны токсического действия, от полного отсутствия токсичности по отношению к тест-объекту

до полного подавления фотосинтеза водоросли в условиях эксперимента (рис 2.19). Для проведения экспериментов по исследованию детоксицирующей способности гумусовых кислот были выбраны концентрации, вызывающие полное подавление фотосинтетической активности водорослей ( $50 \text{ мкг/л Cu}^{2+}$ ,  $800 \text{ мкг/л Cd}^{2+}$ ,  $2 \text{ мг/л Pb}^{2+}$ ).

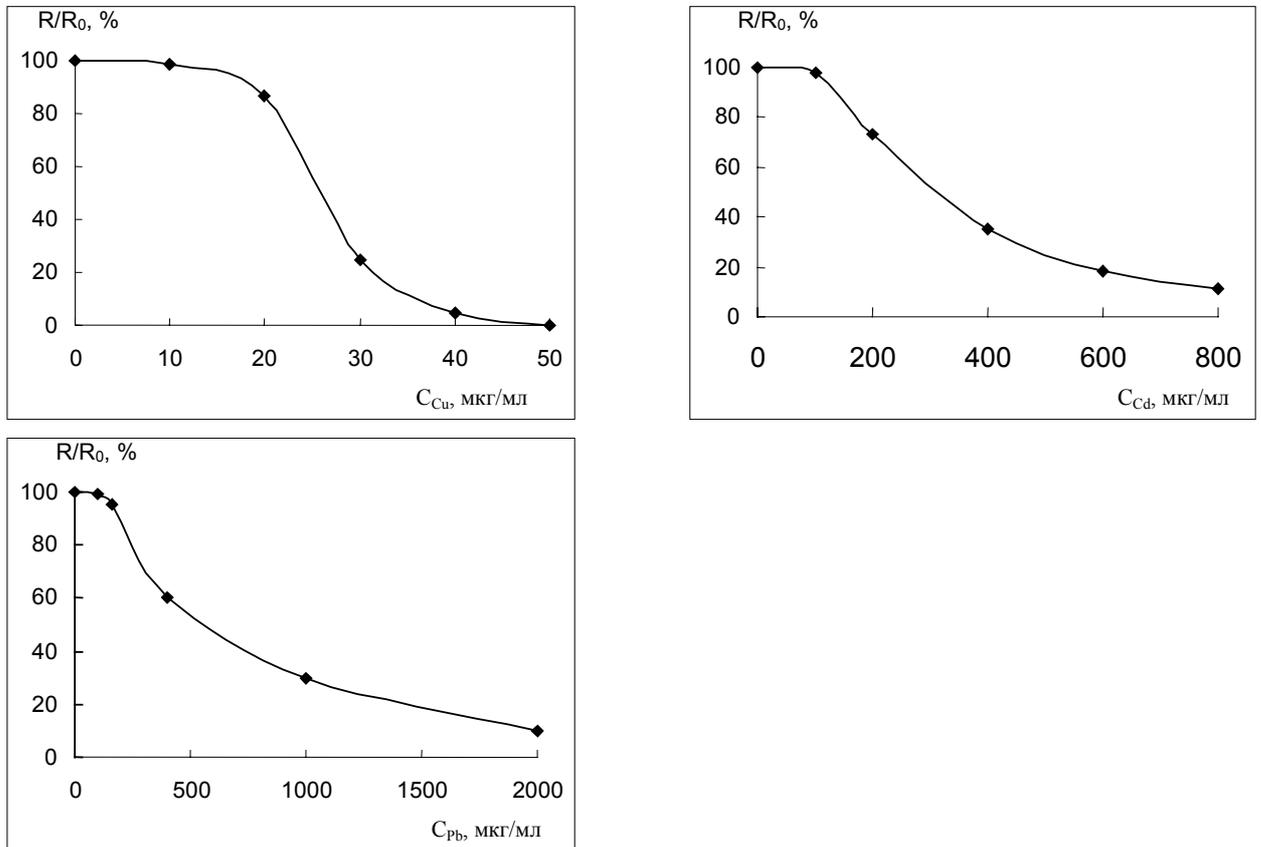


Рис 2.19. Диапазоны токсического действия  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$ .

В присутствии ГФК токсическое воздействие всех исследованных металлов на водоросли значительно снижается. Для исследованных препаратов ГФК были получены концентрационные зависимости детоксицирующего действия (рис. 2.20.).

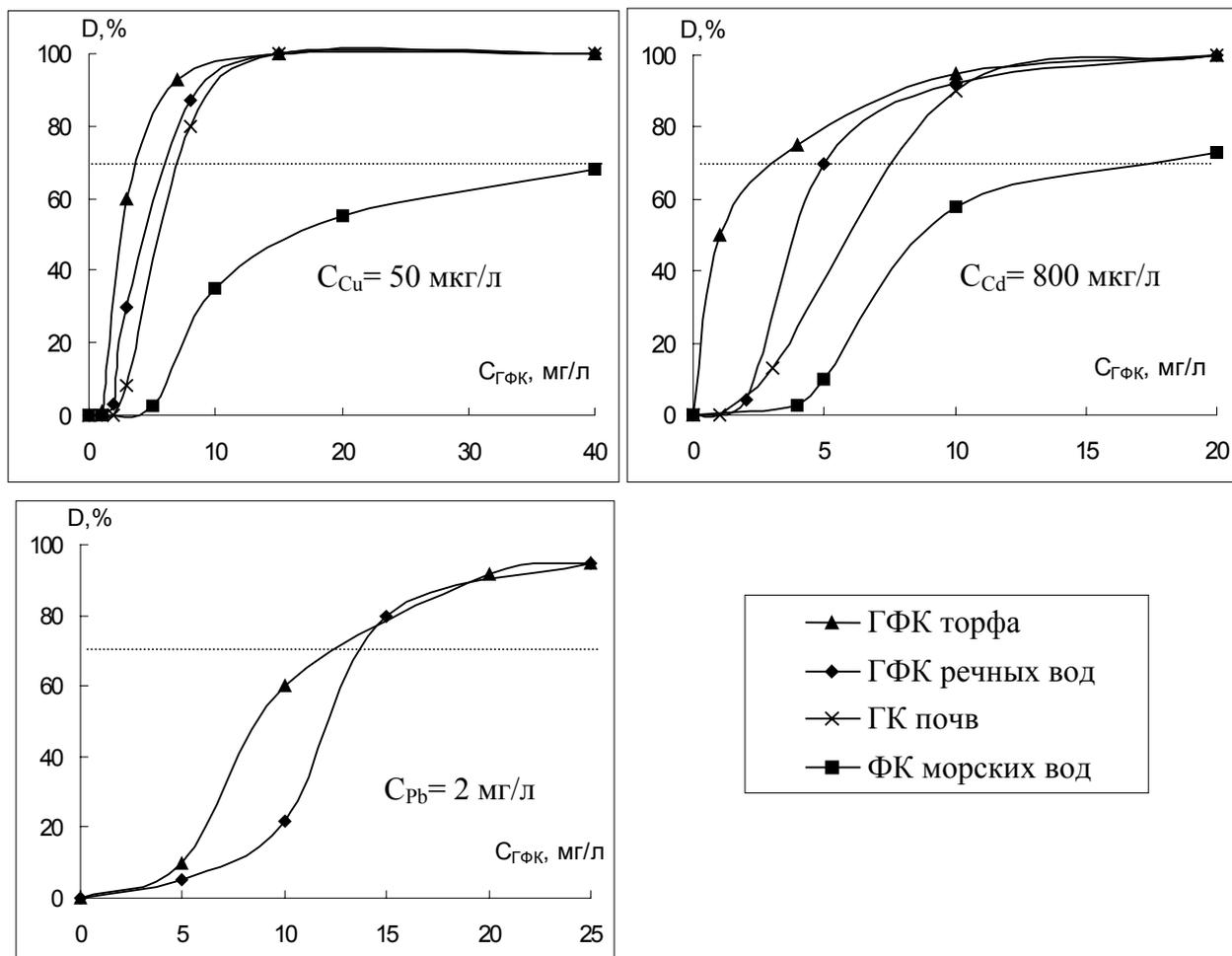


Рис. 2.20. Детоксикация тяжелых металлов препаратами ГФК различного происхождения.

Для сопоставления детоксицирующего действия препаратов ГФК была использована величина  $DK^{50}$  - концентрация ГФК, вызывающая 50% снижение токсичности металла. Как следует из полученных данных, исследованные препараты можно расположить в следующий ряд по величине их детоксицирующего потенциала:

$$\text{ГФК торфа} > \text{ГФК речных вод} \geq \text{ГК почв} \gg \text{ФК морских вод.}$$

ГФК торфа и ГК почв, а также ГФК речных вод оказались довольно близки по детоксицирующей способности, вызывая полное снятие токсического эффекта уже при концентрациях 10-20 мг/л. В то же время ФК морских вод обладают менее выраженными детоксицирующими свойствами, не вызывая полного снятия токсичности металлов во всем диапазоне исследованных концентраций.

Для выявления взаимосвязи между детоксицирующими свойствами и структурными характеристиками ГФК полученные величины  $DK^{50}$  были подвергнуты корреляционному анализу совместно с фрагментным составом ГФК. Максимальные значения коэффициентов корреляции были получены для параметров, отражающих обогащенность ГФК ароматическими структурами с COOH и OH заместителями. Это подтверждает

предположение о высоком вкладе салицильных фрагментов в комплексообразование ГФК с металлами. По-видимому, повышение количества салицилатных фрагментов в молекулах ГФК вызывает прочное связывание в комплекс и снижает концентрацию токсичной для водоросли свободнорастворенной формы металлов.

Таблица 2.13.

Коэффициенты корреляции между  $DK^{50}$  и параметрами структуры ГФК.

	$(COOH+ArOH)*C_{Ar}$	$(COOH+ArOH)*C_{Ar}$	$C_S$
		$C_{Alk-O}$	$C_{Ar}$
$DK^{50}(Cu)$	0.99	0.93	0.65
$DK^{50}(Cd)$	0.98	0.70	0.94
$DK^{50}(Pb)$	0.99	0.95	0.89

### 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.

#### 3.1. Материалы и оборудование.

##### *Растворители для спектроскопии $^{13}\text{C}$ ЯМР*

В качестве растворителя для спектроскопии  $^{13}\text{C}$  ЯМР приготавливали 0.1 М раствор NaOH квалификации ч.д.а. в  $\text{D}_2\text{O}$  производства ТОО "Изотоп" изотопной чистоты 99.5% D.

В качестве внутреннего стандарта для спектроскопии  $^{13}\text{C}$  ЯМР использовали DSS (натриевая соль 3-триметилсилил-1-пропан-сульфоукислоты).

##### *Растворители для спектроскопии ПМР*

**Диметилсульфоксид- $\text{d}_6$**  производства фирмы "Изотоп" сушили над  $\text{CaH}_2$  в течение 24 ч. при перемешивании с последующим вакуумным переносом. Затем ДМСО- $\text{d}_6$  разливали по разбиваемым ампулам в атмосфере азота в количестве, необходимом для приготовления одного образца для снятия спектра (0.7 мл). Содержание воды проверяли по спектру ПМР, интегральная интенсивность пика воды составлял не более 8 % от интеграла пика ДМСО. Изотопная чистота ДМСО- $\text{d}_6$  составляла 99.5% атомных.

**Диметилсульфоксид- $\text{d}_6$**  производства фирмы Merck, в ампулах по 0.7 мл, изотопной чистоты 99.95 % атомных, содержал не более 0.02% воды и его осушка не производилась.

##### **Дейтероксид, $\text{D}_2\text{O}$**

а) Для проведения дейтерообмена препаратов ГФК использовали  $\text{D}_2\text{O}$  производства ТОО "Изотоп" изотопной чистоты 99.5% атомных.

б) В качестве растворителя для регистрации ПМР спектров использовали  $\text{D}_2\text{O}$  фирмы Aldrich изотопной чистоты 99.996 атомных %, предварительно расфасованный в разбиваемые ампулы по 0.7 мл на вакуумной установке.

**Дейтерированный гидроксид натрия, NaOD** представлял собой 40% раствор NaOD в  $\text{D}_2\text{O}$  производства фирмы Aldrich изотопной чистоты 99+ атомных %.

**Дейтерированная трифторуксусная кислота  $\text{CF}_3\text{COOD}$**  производства фирмы "Изотоп" изотопной чистотой 98.5 атомных %.

В качестве модельных соединений для спектроскопии ПМР использовали 2,4-дигидроксибензойную кислоту квалификации "хч" и полидекстран производства фирмы "Polymerservice", ММ=4300 без дополнительной очистки.

Для культивирования культуры водоросли *Chlorella vulgaris* использовали среду Тамия, состав которой приведен в табл. 3.1. рН среды Тамия доводили 0.1М КОН (чда) до величины 6.6 - 6.8.

Для проведения токсикологических экспериментов в качестве токсикантов использовали  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{CdSO}_4$  и  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  марки "чда".

Таблица 3.1.

## Приготовление культивационной среды Тамия

Компонент	Концентрация, г/л
KNO <sub>3</sub>	5
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	2.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.25
ЭДТА	0.037
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	3*10 <sup>-3</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.76*10 <sup>-3</sup>
MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	1.81*10 <sup>-4</sup>
ZnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O	2.24*10 <sup>-5</sup>
MoO <sub>3</sub>	1.75*10 <sup>-5</sup>
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	2.3*10 <sup>-5</sup>

**3.2. Выделение препаратов ГФК.**

Препараты ГФК речных вод FMX-8 и FIX-8 были выделены сорбцией на смоле Амберлит ХАД-8 из вод р. Москва (район г.Звенигород), и р. Истра (выше Истринского водохранилища), соответственно по методике [Данченко,18]. Отфильтрованную и подкисленную концентрированной HCl до pH 2 речную воду пропускали через колонку со смолой до насыщенно-желтого окрашивания смолы (около 500 л.). Скорость пропускания составляла около 5 л/час. Затем колонку промывали дистиллированной водой до отрицательной реакции на Cl<sup>-</sup>-ион по 0.1 М AgNO<sub>3</sub> и десорбировали ГФК 0.1 М NaOH. Щелочной экстракт обессоливали пропусканием через катионит КУ-2-8 в Н-форме (pH полученных таким образом растворов составил 2.95-3.4). Катионит КУ-2-8 переводили в Н-форму пропусканием через колонку 30-кратного по объему количества 1М HCl. Препараты ГФК в твердой форме получали при упаривании обессоленных растворов на ротационном испарителе.

Использованные в работе препараты ГК и ФК почв, а также препарат NTW были предоставлены кафедрой общего земледелия и охраны почв факультета Почвоведения МГУ. Препараты ГФК торфа, а также FWME-4, SWM-4 и SEL, были предоставлены лабораторией физической органической химии Химического факультета МГУ. Препараты BS1FA, FG1FA и HO10FA были предоставлены кафедрой водной химии Института им. Энглера и Бунте Технического университета Карлсруэ (Германия). В работе также были использованы коммерческие препараты ГФК торфа (НПО "Биолар") и ГК бурых углей производства фирмы Aldrich и АО "Спецбиотех". Препарат ФК морских вод был предоставлен NAOML (Miami, USA).

Полный перечень препаратов ГФК приведен в таблице 2.1.

Для элементного анализа и ЯМР-спектроскопии использовали твердые препараты ГФК, для гель-хроматографии и токсикологических экспериментов - обессоленные растворы, точный титр которых определяли упариванием аликвотной части раствора и высушиванием над  $P_2O_5$  до постоянного веса.

**Элементный состав препаратов ГФК** определяли на двух элементных анализаторах: модель-1106 фирмы Carlo Erba Strumentazione (Италия) и модели CHN-O-Rapid-Geрт фирмы Heraeus (ФРГ).

**Определение молекулярной массы ГФК.** Для определения молярной массы ГФК использовали гель TOYOPEARL-50HW(S) (Япония). Для элюирования ГФК использовали 0.028 М фосфатный буфер (рН 6.8). В качестве калибровочных веществ использовали полидекстраны (молекулярная масса 830, 4400, 9900, 21400, 43500, 2000000 дальтон).

### 3.3. Регистрация спектров ЯМР

**Спектры  $^{13}C$  ЯМР** ГФК регистрировали в 10-мм ЯМР-ампуле на приборе VXR-400 фирмы Varian 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 ( $T_d$ ) от 1 до 8 с, при ширине импульса  $45^\circ$ , длительность накопления спектра 8 - 16 часов. В качестве внутреннего стандарта использовали DSS (натриевую соль 3-триметилсилил-1-пропансульфоокислоты).

Фурье-преобразование выполнялось с предварительным экспоненциальным взвешиванием сигнала ССИ с константой времени, эквивалентной уширению линий 20 Гц.

**Спектры ПМР** регистрировали на спектрометре VXR-400 фирмы Varian на рабочей частоте 400 МГц. Ширина развертки спектра составляла около 8000 Гц (от -3 до 17 м.д.), время регистрации сигнала ССИ - 2 с, ширина импульса  $17^\circ$ , число импульсов для накопления спектра - 512.

В качестве внутреннего стандарта использовали сигнал остаточных протонов дейтерорастворителя (ДМСО). При регистрации спектров в  $D_2O$  в качестве внутреннего стандарта использовали DSS (натриевая соль 3-триметилсилил-1-пропансульфоокислоты).

Фурье-преобразование выполняли с предварительным экспоненциальным взвешиванием сигнала ССИ с константой времени, эквивалентной уширению линий 1 Гц.

**Спектры DEPT и QUAT  $^{13}C$  ЯМР** растворов ГФК в 0.1М NaOH/ $D_2O$  регистрировали в 5-мм ампулах на приборе фирмы "Bruker" при рабочей частоте 75 МГц в Институте Экологической Химии (ИОС) Центра по Охране Окружающей Среды и Здоровья Человека (GSF), Мюнхен, ФРГ. При регистрации спектров использовались

импульсные последовательности DEPT и QUAT, входящие в комплект программного обеспечения фирмы "Bruker". Ширина развертки спектров составляла около 35000 Гц. Отнесение сигналов проводили по химическому сдвигу внутреннего стандарта DSS.

Обработку одномерных спектров проводили на персональном компьютере с использованием программ NUTS и WINNMR.

**Двумерные спектры ЯМР** регистрировали в 5 мм ампулах на спектрометре фирмы "Bruker" с рабочей частотой 500 МГц для ядер  $^1\text{H}$  в Институте Экологической Химии (ИОС) Центра по Охране Окружающей Среды и Здоровья Человека (GSF), Мюнхен, ФРГ. Регистрация двумерных спектров ЯМР проводилась с использованием стандартных импульсных последовательностей COSY, TOCSY, EXSY, и CPMG, входящих в состав пакета программного обеспечения фирмы "Bruker". Обработку двумерных спектров ЯМР проводили на рабочей станции "Silicon Graphics" с использованием программы XWINNMR.

#### Приготовление образцов для регистрации спектров $^{13}\text{C}$ ЯМР

Образцы для регистрации спектров ЯМР  $^{13}\text{C}$  готовили растворением навески 100 мг твердого препарата ГФК в 3.5 мл 0.1М NaOH в  $\text{D}_2\text{O}$ .

#### Приготовление образцов ГФК для регистрации спектров ПМР.

Все работы по подготовке образцов для анализа во избежание попадания следов воды в образец проводились в отсутствие доступа воздуха на вакуумной установке. Осушение препаратов ГФК проводилось в высоком вакууме ( $<5 \cdot 10^{-2}$ ) при  $45^\circ\text{C}$  в течение 6 часов. Для приготовления образцов использовались 5 мм пирексовые ЯМР-ампулы с подпаянным шлифом. Приборы для осушения и растворения препаратов ГФК показаны на рис. 3.1.

#### Приготовление образцов ГФК для регистрации спектров ПМР в ДМСО- $d_6$

Навеску 15 мг ГФК помещали в 5 мм ЯМР-ампулу **5**, припаянную к широкой трубке **4** с перетяжкой и шлифом, предварительно откачанную на вакуумной установке и прогретую. Затем в трубку помещали разбиваемую ампулу **3** с 0.7 мл ДМСО- $d_6$ , после чего трубку через кран подсоединяли к вакуумной установке.

Сушку образца проводили в течение 6 часов при  $45^\circ\text{C}$ , после чего кран перекрывали, трубку снимали и встряхивали, разбивая ампулу с ДМСО. Растворитель перетекал в ампулу для ЯМР, которую после этого отпаивали.

Время растворения различных препаратов ГФК в зависимости от зольности препарата составляло от 1 до 48 часов.

Приготовление образцов ГФК для регистрации спектров ПМР  
в ДМСО-d<sub>6</sub> с предварительным дейтерообменом

Образец ГК массой 15 мг помещали в прибор для дейтерообмена **2**, предварительно высушенный под вакуумом, туда же помещали разбиваемую ампулу **1** с 0.7 мл ДМСО-d<sub>6</sub>. Сушку образцов проводили в течение 6 часов при 45°C на вакуумной установке. Затем быстро добавляли 1 мл D<sub>2</sub>O в прибор для обмена и снова подсоединяли его к вакуумной установке для удаления воздуха. В связи с неполным растворением препарата дейтерообмен проводили в течение трех дней в отсутствие доступа воздуха при перемешивании на магнитной мешалке. Затем воду отгоняли на вакуумной установке, сушили образец в течение 6 часов, после чего разбивали ампулу с ДМСО-d<sub>6</sub>, и происходило растворение образца. Раствор переливали в ампулу **3**, которую отпаивали и помещали в трубку **4** с припаянной 5 мм ЯМР-ампулой **5** и шлифом, трубку подсоединяли через кран к вакуумной установке и откачивали. Затем кран перекрывали, ампулу **4** с раствором ГК разбивали встряхиванием и раствор перетекал в ампулу для ЯМР, которую потом отпаивали по перетяжке.

Приготовление образцов ГК для регистрации спектров ЯМР в ДМСО-d<sub>6</sub>  
в присутствии CF<sub>3</sub>COOD

Для регистрации ПМР спектров ГФК в ДМСО-d<sub>6</sub> в присутствии CF<sub>3</sub>COOD ампулу с раствором ГФК в ДМСО вскрывали и микропипеткой добавляли 20 мкл CF<sub>3</sub>COOD, после чего регистрировали спектр.

Приготовление образцов ГК для регистрации спектров ЯМР в 0.1M NaOD/D<sub>2</sub>O

При регистрации спектров ПМР в NaOD/D<sub>2</sub>O для уменьшения интенсивности сигнала HDO препараты ГФК подвергали предварительному дейтерообмену. Для этого навеску ГФК массой 15 мг помещали в прибор для дейтерообмена **2**, предварительно высушенный под вакуумом, туда же помещали разбиваемую ампулу **1** с D<sub>2</sub>O высокой чистоты. Сушка образцов проводили в течение 6 часов при 45°C на вакуумной установке. Затем быстро добавляли 1 мл D<sub>2</sub>O и 5 мкл 40% NaOD в прибор для обмена, и снова подсоединяли его к вакуумной установке для удаления воздуха. Дейтерообмен проводили в течение 12 часов в отсутствие доступа воздуха. Потом воду отгоняли на вакуумной установке и образец сушили в течение 6 часов, после чего разбивали встряхиванием ампулу с D<sub>2</sub>O высокой чистоты. Раствор сливали в ампулу **3** и ее отпаивали. Ампулу с раствором помещали в трубку **4** с припаянной ЯМР-ампулой **5** и шлифом, трубку подсоединяли через кран к вакуумной установке и откачивали. Затем кран перекрывали, ампулу с раствором ГК разбивали встряхиванием, и раствор перетекал в ЯМР-ампулу, которую потом отпаивали.

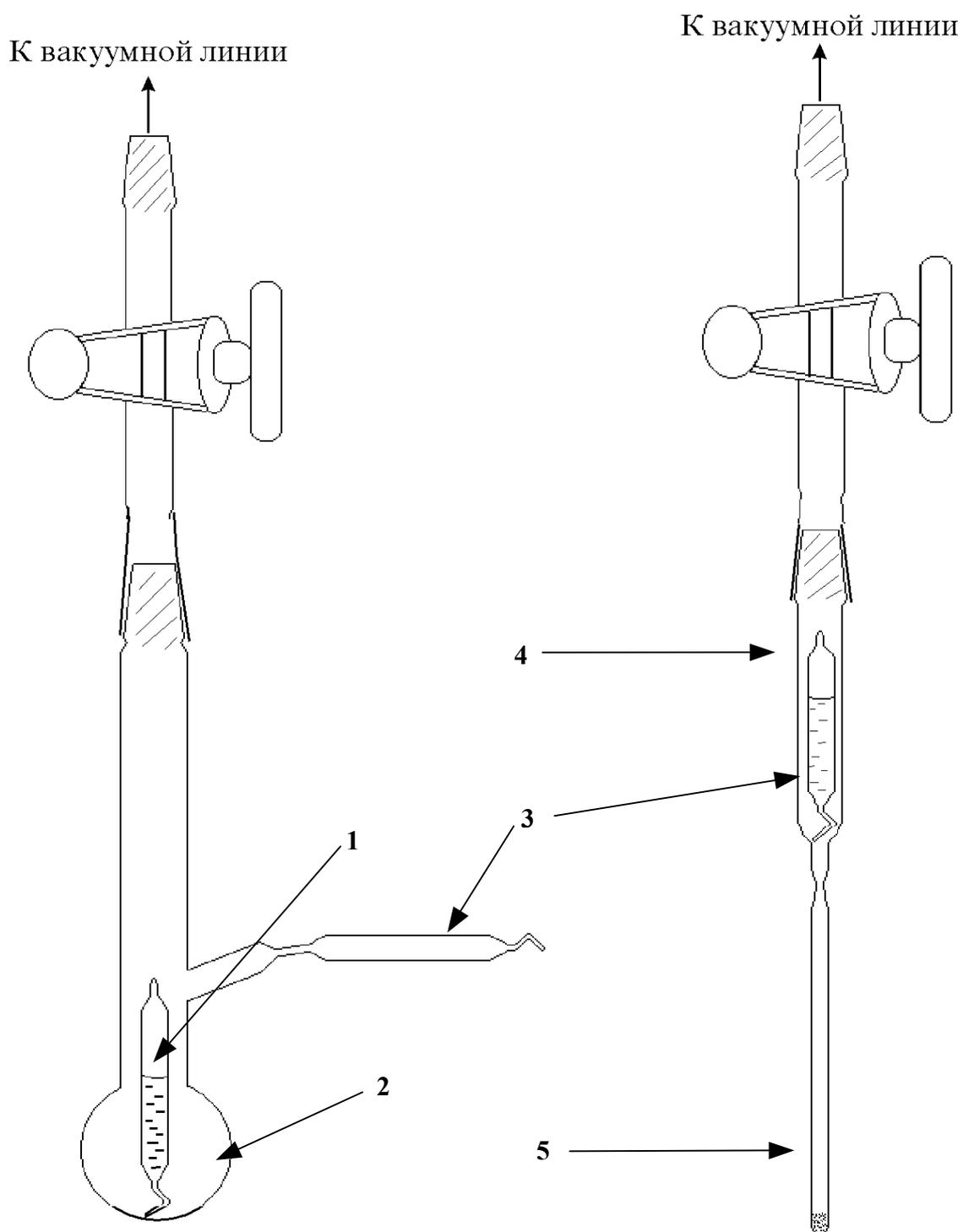


Рис. 3.1. Приборы для приготовления образцов.

1. Разбиваемая ампула с растворителем.
2. Объем для проведения реакции.
3. Разбиваемые ампулы.
4. Стекло́нная трубка для разбивания ампулы 3.
5. Ампула для ЯМР.

### 3.3. Методика токсикологических экспериментов.

#### *Культивирование тест-объекта*

В качестве объекта токсикологических исследований служила культура зеленой водоросли *Chlorella vulgaris*.

Культивирование интенсивной культуры хлореллы (термофильный штамм) осуществляли на 20% -ной среде Тамия в термостатируемых культиваторах емкостью 200 мл, при температуре 35°C, с продувкой увлажненным воздухом, при освещенности 30 Вт/кв.м (люминесцентные лампы типа ЛДЦ-40) и рН 6.6-6.8. Перед тестированием водоросли разращивали в течение суток. Начальная плотность посадки - 500 тыс. кл./мл. К концу суток плотность клеток была не менее 10 млн. кл./мл.

#### *Методика токсикологического эксперимента*

Интенсивную культуру хлореллы после суточного выращивания освобождали от культуральной среды и концентрировали центрифугированием в течение 3-х минут при скорости 5000 об./мин. Полученную суспензию водорослей пересеивали на 10% -ную среду Тамия, не содержащую фосфатов, ЭДТА и микроэлементов, добавляли токсиканты и гумусовые вещества в требуемых концентрациях. Объем исследуемых проб составлял 100 мл, начальная плотность культуры - 500 тыс. кл./мл. Остальные условия проведения опытов (освещенность, температура, рН, продувка увлажненным воздухом) были теми же, что и при выращивании культуры.

#### *Регистрация тестовых параметров*

Для оценки состояния водорослей использовали параметры быстрой флуоресценции. Выход быстрой флуоресценции измеряли при помощи 2-х лучевого импульсного флуориметра. Измерения проводили в момент начала эксперимента, через 2 и через 4 часа. Интенсивность постоянной флуоресценции ( $F_0$ ), которая отражает излучательные потери энергии возбуждения при миграции ее к открытым реакционным центрам, измеряли при освещении адаптированных к темноте образцов слабыми импульсами света. Интенсивность максимальной флуоресценции ( $F_m$ ) при восстановленном первичном хинонном акцепторе измеряли аналогичным образом, но при дополнительном облучении образцов действующим светом в присутствии  $10^{-5}$  М диурона. Относительный выход переменной флуоресценции, характеризующий квантовую эффективность первичной фотосинтетической реакции, рассчитывали как  $F_v/F_m$ , где

$$F_v = F_m - F_0.$$

У лабораторной культуры хлореллы в оптимальных условиях отношение  $F_v/F_m$  обычно составляет 0.75 - 0.80, и снижается при нарушениях фотосинтеза. У мертвых клеток  $F_v/F_m = 0$ .



## ВЫВОДЫ

1. Количественно охарактеризован детальный фрагментный состав ГФК вод, почв, торфа и угля. Определены общие закономерности строения и установлены достоверные структурные различия ГФК указанных основных природных источников. Показано, что в структуре ГФК торфа и почв спиртовые гидроксилы в основном принадлежат полисахаридным фрагментам, а в ГФК пресных вод до 50% этих групп не входит в состав полисахаридов. Показано, что содержание сложноэфирных групп в ГК выше, чем в ФК.
2. Разработана схема расчета детального фрагментного состава ГФК, основанная на комплексном анализе данных  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектроскопии. Предложен набор из 12 структурных фрагментов, позволяющих детально описать структуру ГФК различного происхождения:  
 $\text{C}_{\text{C}=\text{O}}$ ,  $\text{C}_{\text{COOH}}$ ,  $\text{C}_{\text{COOR}}$ ,  $\text{C}_{\text{ArOH}}$ ,  $\text{C}_{\text{ArOR}}$ ,  $\text{C}_{\text{ArH}}$ ,  $\text{C}_{\text{ArC}}$ ,  $\text{C}_{\text{O-Alk-O}}$ ,  $\text{C}_{\text{CHOH}}$ ,  $\text{C}_{\text{CH}_2\text{OH}}$ ,  $\text{C}_{\text{OCH}_3}$ ,  $\text{C}_{\text{Alk}}$
3. Разработан метод количественной характеристики распределения водорода функциональных групп и углеродного скелета ГФК  $^1\text{H}$ .
4. Экспериментально обоснованы оптимальные условия регистрации количественных  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектров ГФК.
5. Предложен способ использования данных по фрагментному составу для корректировки результатов гель-хроматографического определения молекулярных масс ГФК.
6. Установлена взаимосвязь структуры и детоксицирующих свойств ГФК по отношению к  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ .

**ВЫРАЖЕНИЕ ПРИЗНАТЕЛЬНОСТИ**

Автор выражает глубокую признательность:

- Сотрудникам кафедры биофизики Биологического факультета МГУ д.б.н. Маторину Д.Н., д.б.н. Венедиктову П.С. и к.б.н. Вавилину Д.В. за оказанную помощь в организации токсикологических экспериментов.
- Сотруднику Института Экологической Химии (ИОС), Мюнхен, Германия, Dr. N. Hertkorn за оказанную помощь в постановке двумерных ЯМР экспериментов и обсуждению полученных результатов.
- Сотруднику кафедры общего земледелия и охраны почв факультета почвоведения МГУ к.б.н. Лебедевой Г.Ф. за предоставленные препараты гумусовых кислот почв.

А также организациям, оказавшим финансовую поддержку при выполнении данной работы:

- Robert Havemann Scholarship
- Российскому Фонду фундаментальных исследований (гранты №96-04-49838 и №98-03-33186а),
- Госкомитету Российской Федерации по высшему образованию (грант в области фундаментальных проблем охраны окружающей среды и экологии №4-26).

## 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, 259 с.
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. Линник П.Н., Набиванец Б.И. Формы миграции металлов в пресных поверхностных водах. Гидрометеоиздат. Л., 1986, 268 с.
6. Schnitzer M., Khan S.U. Humic substances in the environment. N.Y., Marcel Decker, 1972, p. 12-17.
7. Орлов Д. С. Гумусовые кислоты почв. М., Изд-во МГУ, 1974, 287 с.
8. 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.
9. Humic substances and their role in the environment. Rep. of Dahlem workshop, Berlin, 1987. John Wiley & Sons Limited. S. Bernhard. Dahlem Konferenzen. 1988, p. 133-148.
10. Bollag J.-M., Mayers K.//Sci. Total Environ., 1992, v. 117/118, p. 357-366.
11. Ziechman W.//Huminstoffen. Problemen, Methoden, Ergebniss. Weicheim: Chemie, 1980, 480 p.
12. Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. Изд-во МГУ, М., 1990, 325 с.
13. Нефтепродукты: методы испытаний. Ч.1.-М., изд. стандартов, 1977, 379 с.
14. Coal Science. Corbaty M.L., Larsen J.W., Wender I., Academic Press, N.Y.,
15. Кушнарев Д.Ф. Количественная спектроскопия ядерного магнитного резонанса природного органического сырья и продуктов его переработки. Дисс. докт. хим. наук. Иркутск, 1997, 267 с.
16. Данченко Н.Н. Функциональный состав гумусовых кислот: определение и взаимосвязь с реакционной способностью. Дисс. канд. хим. наук., Москва, 1997, 138 с.
17. Huffman E.W.D., Stuber Jr. and H. A. Analytical Methodology for Elemental Analysis of Humic Substances. In: Humic substances in soil, sediment and water Aiken G.R., McKnight D.M., Wershaw R.L., MacCarthy P. (Eds.), John Wiley & Sons. N.Y., 1985, p. 433-455.

18. Rice J.A., MacCarthy P. // *Org. Geochem.*, 1991, v. 17, N. 5, p. 635-648.
19. Perdue E.M. // *Geochim. Cosmochim. Acta.* 1984, v. 48, p. 1435-1442.
20. Harvey G.R., Boran D. A., Tokar J.M. // *Mar. Chem.*, 1983, N. 12, p. 119-132.
21. Buffle J., Altmann R.S. // *Geochem. Cosmochim. Acta*, 1988, v. 52, p. 1505-1508.
22. Stuermer D. H., Payne J. R. // *Geochem. Cosmochim. Acta*, 1976, v. 40, p. 1109-1114.
23. Wilson M.A., Philip R.P., Gillam A.H., Tate R.R. // *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1983, v. 47, p. 497-502.
24. Wilson M. A., Gillam A. H., Collin P. J. // *Chem. Geol.*, 1983, v. 60, N. 3-4, p. 181-201.
25. Stuermer D. H., Peters K.E., Kaplan I.R. // *Geochim. Cosmochim. Acta.* 1978, v. 42, p. 989-997.
26. Piotrowicz S.R., Harvey G.R., Boran D.A. et al. // *Marine Chem.*, 1984, v. 14, p. 333-346.
27. Van Krevelen D.W. // *Fuel*, 1950, v. 29, p. 269-284.
28. Visser S.A. // *Environ. Sci. Technol.*, 1983, v. 17, N. 7, p. 412-417.
29. Abbt-Braun G., Schmiedel U., Frimmel F.H. // *Vom Wasser*, 1990, B. 75, S. 59-73.
30. Beyer L. // *Z. Pflanzenernahr. Bodenk.*, 1996, v. 159, p. 527-539.
31. Stevenson F.J., Goh K. M. // *Soil Sci.*, 1972, v. 113, N. 5, p. 334-345.
32. Stevenson F.J. *Humus chemistry. Genesis, composition, reactions.* N.Y., Wiley Interscience, 1982, p. 221-237.
33. Драгунов, С.С. Методы исследования гумусовых веществ. Труды почв. инст. им. Докучаева, 1951, т. 38, с. 86-98.
34. Brunelot J., Adrian P., Rouiller J., Guillet B., Andreux F. // *Chemosphere*, 1989, v. 19, N. 8/9, p.1413-1419.
35. Piccolo A., Camici L. // *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 1990, v. 41, p. 65-69.
36. Right J.R., Schnitzer M. // *Trans. 7th Intern. Congr. Soil Sci.*, 1960, v. 2, p. 120-123.
37. Stevenson F. J., Butler I. H. A., In: *Organic Geochemistry*, New York: 1969, p. 534-535.
38. Schnitzer M., Desjardins J.G. // *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1970, v. 34, p. 77-79.

39. Herbert B.E., Bortsch M., Novak, J.M. // *Environ. Sci. Technol.*, 1993., v. 27, p. 398-403.
40. Ruffaldi R., Schnitzer M. // *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1972, v. 36, N. 1, p. 301-305.
41. Wright, J.R., Schnitzer M. // *Nature*, 1959, v. 184, No. 4697, p. 1462-1463.
42. Кухаренко Т.А. // *Хим. Тверд. Топл.*, 1937, т. 8, N 9, с. 803-813.
43. Кухаренко Т.А. // *Хим. Тверд. Топл.*, 1937, т. 8, N 12, с. 1064-1072.
44. Сысков К.И. // *Хим. Тверд. Топл.*, 1936, т. 7, N 6, с. 566-574.
45. Gillam A.H., Riley J.P. // *Anal. Chim. Acta*, 1982, v. 141, p. 287-299.
46. Schnitzer M., Gupta U.C. // *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1965, v. 29, p. 274-278.
47. Arsenie I., Boren H., Allard B. // *Sci. Total Environ.*, 1992, v. 116, p. 213-220.
48. Noyes T.I., Leenheer J.A. Proton Nuclear Magnetic Resonance Studies of Fulvic Acid from the Suwannee River. In: *Humic substances in the Suwannee river, Georgia: Interactions, properties, and proposed structures*. Eds: Averett R.C., Leenheer J.A., McKnight D.M., and Thorn K.A. U.S. Geological survey water-supply paper 2373, 1994, p. 129-139.
49. Herzog, H.; Burba, P.; Buddrus, J. // *Fresenius J. Anal.Chem.*, 1996, v. 354, N. 3, p. 375-377.
50. Ephraim J.H., Boren H., Arsenie I., Pettersson C., Allard B. // *Sci. Total Environ.*, 1989, v. 81/82, p. 615-624.
51. Schnitzer M., Desjardins J.G. // *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1962, v. 26, p. 362-368.
52. Perdue E.M. // *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1984, v. 48, p. 1435-1442.
53. Norwood, D.L. Critical comparison of structural implications from degradative and nondegradative approaches. In: *Humic substances and their role in the environment*, Eds: Frimmel, F.H. and Christman, R.F., John Wiley & Sons Limited, 1988, p. 133-148.
54. Ogner G. // *Soil Sci.*, 1970, v. 110, N 2, p. 86.
55. Hayashi T., Nagai T. // *Soil Sci. Plant Nutr.*, 1962, v. 8, N. 4, p. 22.
56. Clark F.E., Tan K.H. // *Soil Biol. Biochem.*, 1969, v. 1, p. 75.
57. Зырин Н.Г., Овчинникова М.Ф., Орлов Д.С. // *Агрохимия*, 1964, N. 4, с. 168.
58. Григорьева Е.А., Кухаренко Т.А. // *Методы анализа и контроля производства в химической промышленности*. 1968, т. 13, с. 10.
59. Kumada K. *Chemistry in soil organic matter*. Tokyo, 1988.

60. Schulten H.-R. A chemical structure for Humic Acid. Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry and pyrolysis-soft ionization mass spectrometry evidence. In: Humic Substances in the Global Environment and Implications on the Human Health. Eds: Senesi N., Miano T.M., Elsevier Science B.V., 1994, p. 43-56.
61. Pauli F.W. Soil fertility. L., 1967.
62. Felbeck G.T. // Soil Sci., 1971, v. 111, N. 1, p. 42.
63. Комиссаров И.Д., Логинов Л.Ф. // Труды Тюменского СХИ, 1970, т. XIV, с. 131.
64. Ziechmann, W. Evolution of structural models from consideration of physical and chemical properties. In: Humic substances and their role in the environment, edited by Frimmel, F.H. and Christman, R.F. John Wiley & Sons Limited, 1988, p. 113-132.
65. Kleinhempel D. // Albrecht-Thaer-Archiv., 1970, Bd. 14, H. 1, S. 3-14.
66. Humic substances in the Suwannee river, Georgiaa: 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.
67. Shin H.S., Moon H. // Soil Sci., 1996, v. 161, N. 4, p. 250-256.
68. Stuermer D.H., Paine J.R. // Geochim. Cosmochim. Acta, 1976, v.40, p. 1109-1114.
69. Ricca G. and Severini F. // Geoderma, 1993, v. 58, p. 233-244.
70. Skjemstad J.O., Frost R.L., Barron P.F. // Austr. J. Soil Res., 1983, v. 21, p. 539.
71. Wershaw R.L. In: Humic Substances in Soil, Sediment and Water. Eds. G.R. Aiken, D.M. McKnight, R.L. Wershaw and P. MacCarthy. Wiley, N.Y., 1985, p. 561-582.
72. Wilson, M.A. NMR techniques and applications in geochemistry and soil chemistry, Ch.8. Humic substances. Oxford, Pergamon Press, 1987, p. 182-216.
73. Wilson M.A. In: Humic Substances in Soil and Crop Sciences: Selected Readings. Ed P. MacCarthy, Madison, USA, 1990, p. 221-260.
74. Sotak C.H., Dumoulin C.L., Levy G.C. // Anal. Chem., 1983, V 55, p. 782-787.
75. Михайленко В.И., Михальчук В.В. // Ж. Прикл. Спектр., 1987, т. 46, N. 4, с.535-543.
76. Preston C.M., Schnitzer M. // J.Soil Sci., 1987, v. 38, p. 667-678.
77. Wilson M.A., Pugmire R.J. and Grant D.M. // Org.Geochem., 1983, v. 5, N. 3, p. 121-129.

78. Swift R.S., Leonard, R.L., Newman R.H. and Theng B.K.G. // *Sci.Total Environ.*, 1992, v. 117/118, p. 53-61.
79. Malcolm R.L., Kennedy K., Ping C.L., Michaelson G.J. In: *Soils and global change*. Eds: Lal R., Kimble J., Levine E., Stewart B.A., Fractionation, characterization and comparison of bulk soil organic substances and water-soluble soil interstitial organic constituents in selected of Alaska. 1995, p 315-327.
80. Wilson M.A., Heng S., Goh K.M., Pugmire R.J. and Grant D.M. // *J. Soil Sci.*, 1983, v. 34, p. 83-97.
81. Newman R.H., Tate K.R., Barron P.F. and Wilson M.A. // *J. Soil Sci.*, 1980, v. 31, p. 623-631.
82. Cook R.L., Langford C.H. // *Environ. Sci. Technol.*, 1998, v. 32, p. 719-725.
83. Frund R. and Ludemann H.-D. // *Sci.Total Environ.*, 1989, v. 81/82, p. 157-168.
84. Lobartini J.C. and Tan K.H. // *Soil Sci.Soc.Amer.J.*, 1988, v. 52, p. 125-130.
85. Schnitzer M. and Preston C.M. // *Soil Sci.Soc.Amer.J.*, 1986, v. 50, p. 326-331.
86. Lobartini J.C., Tan K.H., Rema J.A., Gingle A.R., Pape C. and Himmelsbach D.S. // *Sci.Total Environ.*, 1992, v. 113, p. 1-15.
87. Malcolm R.L. Variations between humic substances isolated from soils, stream waters and groundwaters as revealed by  $^{13}\text{C}$  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.
88. Hatcher P.G., Rowan R. and Mattingly M. // *Org.Geochem.*, 1980, v. 2, p. 77-85.
89. Krosshavn M., Bjorgum J.O., Krane J. and Steinnes E. J. // *Soil Sci.*, 1990, v. 41, p. 371-377.
90. Preston C.M. and Schnitzer M. J. // *Soil Sci.*, 1987, v. 38, p. 667-678.
91. Preston C.M. and Blackwell B.A. // *Soil Sci.*, 1985, v. 139, N. 1, p. 88-96.
92. Stearman G.K., Lewis R.J., Tortorelli L.J. and Tyler D.D. // *Soil Sci. Soc. Amer. J.*, 1989, v. 53, p. 744-748.
93. Zech W. et al. // *Z.Pflanzenernahr.Bodenk.* 1997, v. 160, p. 563-571.
94. Piccolo A., Campanella L. and Petronio B.M. // *Soil Sci. Soc. Amer. J.*, 1990, v. 54, p. 750-756.
95. Ricca G. and Severini F. // *Geoderma*, 1993, v. 58, p. 233-244.

96. Conte P., Piccolo A., Van Lagen B., Buurman P. and De Jager P.A. // *Geoderma*, 1997, v. 80, p. 339-352.
97. Wilson M.A., Vassallo A.M., Perdue E.M. and Reuter J.H. // *Anal. Chem.*, 1987, v. 59, p. 551-558.
98. Preston C.M. and Schnitzer M. // *Soil Sci. Soc. Amer. J.*, 1984, v. 48, p. 305-311.
99. Watanabe A., Tsutsuki K. and Kuwatsuka S. // *Sci. Total Environ.*, 1989, v. 81/81, p. 195-200.
100. Choudhry G.G. and Webster, G.R.B. // *Toxicol. Environ. Chem.*, 1989, v. 23, p. 227-242.
101. Frund R, Haider K. and Ludemann, H.-D. // *Z. Pflanzenernahr. Bodenk.*, 1994, p. 29-35.
102. Zech W., Ziegler F., Kogel-Knabner I. and Haumaier L. // *Sci. Total Environ.*, 1992, v. 117/118, p. 155-174.
103. Wilson M.A. and Goh K.M., // *J. Soil Sci.*, 1983, v. 34, p. 305-313.
104. Knulst J.C., Boershe R.C., Loemo S. // *Environ. Sci. Tech.*, 1998, v. 32, N 1, p. 8-12.
105. Wilson M.A., Gillam A.H. and Collin P.J. // *Chem.Geology*, 1983, v. 40, p. 187-201.
106. Sohn M.L. // *Org.Geochem.*, 1985, v. 8, N. 3, p. 203-206.
107. Wilson M.A., Heng S., Goh K.M., Pugmire R.J. and Grant D.M. // *J. Soil Sci.*, 1983, v. 34, p. 83-97.
108. Malcolm R.L., MacCarthy P. // *Environ Sci. Technol.*, 1986, v. 20, p. 904-911.
109. Wershaw R.L., Mikita M.A. and Steelink C. // *Environ.Sci.Technol.*, 1981, v.15, N. 12, p. 1461-1463.
110. Steelink, C., Wershaw, R.L., Thorn, K.A. and Wilson, M.A. Application of liquid-state NMR spectroscopy to humic substances. In: *Humic Substances II. In Search of Structure*, edited by Hayes, M.H.B., MacCarthy, P., Malcolm, R.L. and Swift, R.S. Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley & Sons, 1989, p. 281-309.
111. Ernst R.R. // *Adv. Magn. Res.*, 1966, v. 2, p. 1-35.
112. Sotak C.H., Dumoulin C.L., Levy G.C. // *Anal. Chem.*, 1983, v. 55, N 4, p. 782-787.
113. Hoult D.I., Chen C.N., Eden H., Eden M. // *J. Magn. Res.*, 1983, v. 51, N 1, p. 110-117.
114. Pearson G.A. // *J. Magn. Res.*, 1977, v. 27, N 2, p. 265-272.

115. Shoolery J.N. // *Progress in NMR spectroscopy*. 1977, v. 11, p. 79-83.
116. Thiault B., Messerman M. // *Org. Magn. Reson.*, 1976, v. 8, N 1, p. 28-33.
117. Ernst RR, Morgan R.E., // *Mol. Phys.*, 1971, v. 26, N 1, p. 49-74.
118. Noggle J.H., Schirmer R.E. *The nuclear Overhauser effect*. NY, Academ. Press, 1971, 259 p.
119. Knight S.A. // *Chem. Ind.*, 1967, N 45, p. 1920-1923.
120. Conte P., Piccolo A., Van Lagen B., Buurman P. and De Jager P.A. // *Geoderma*, 1997, v. 80, p. 327-338.
121. Freeman R., Pachler K.G.R., La Mar G.N. // *J. Chem Phys.*, 1971, v. 55, N 9, p. 4586-4593.
122. Levy G.C., Komorovsky R.A. // *J. Am. Chem. Soc.*, 1974, v. 96, N 3, p. 678-681.
123. Смирнов М.Б., Крапивин А.М. *Методика анализа углеводородных фрагментов высших фракций нефти с помощью спектроскопии ЯМР*.  
В: *Методы исследования состава органических соединений нефти и битумоидов*. 1985, с. 138-181.
124. Kinchesh P, Powlson D.S., Randall E.W. // *European J. Soil Sci.*, 1995, v.46, pp. 125-138.
125. Frund R., Guggenberger G., Haider K., et al. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd.* // 1994, v. 157, p. 175-186.
126. Alemany L.B., Grant D.M., Pigmure R.J., Alger T.D. and Zilm K.W. // *J. Am.Chem.Soc.*, v. 105, p. 2133-2141.
127. Alemany L.B., Grant D.M., Pigmure R.J., Alger T.D. and Zilm K.W. // *J. Am.Chem.Soc.*, v. 105, p. 2142-2147.
128. Wilson M.A., Pugmire R.J, Grant D.M. // *Org. Geochem.*, 1983, v. 5, p. 121-129.
129. Hatcher P.G. // *Org. Geochem.*, 1987, v. 11, p. 31-39.
130. Frund R., Ludemann H.-D. // *Sci. Total Environ.*, 1989, v. 81/82, p.157-168.
131. Earl W.L., Wershaw R.L., Thorn K.A. // *J. Magn. Res.*, 1987, v. 74, p. 264-274.
132. *NMR of Humic Substances and Coal - Techniques, Problems and Solutions*. Eds. Wershaw R.L., Mikita M.A., Lewis Publishers, Chelsea, 236 p.
133. Ruggiero P., Interesse F.S., Sciacovelli O. // *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1979. v. 43., p. 1771-1775.
134. Ishiwatari R. // *Chem. Geol.*, 1973., v. 12, p. 113-126.
135. Wilson M.A., Gillam A.H., Collin P.J. // *Chem. Geol.* 1983., v. 40, p. 187-201.

136. Wilson M.A., Collin P.J., Tate K.R. // *J. of Soil Sci.*, 1983, v. 34, p. 297-304.
137. Yonebayashi K., Hattori T. // *Soil Sci. Plant Nutr.*, 1989, v. 35, p. 383-392.
138. Kawahigashi M. Fujitake N. Takahashi T. // *Soil Sci. Plant Nutr.*, 1996, v. 42, p. 355-360.
139. Ruggiero P., Interesse F.S., Sciacovelli O. // *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1979, v. 43, p. 1771-1775.
140. Ruggiero P., Sciacovelli O., Testini C., Interesse F.S. // *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1978, v. 42, p. 411-416.
141. Wershaw R.L. In: *Humic Substances in Soil, Sediments, and Water*. N.Y.: Wiley Interscience., 1985, p. 561-578.
142. Luedemann H.-D., Lentz H., Ziechmann W. // *Erdoel und Kohle*, 1973, v. 26, p. 506-509.
143. Ruggiero P., Interesse F.S., Cassidei L., Sciacovelli O. // *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1980, v. 44, p. 603-609.
144. Leenheer J.A., Noves T.I. In: *Humic Substances II*. John Wiley & Sons Ltd., 1989, p. 257-279.
145. Lambert J., Buddrus J. // *Magn. Reson. Chem.*, 1996, v. 34, №. 4, p. 276-282.
146. Kanitskaya L.V., Rokhin A.V., Gogotov A.F., Kushnarev D.F., Kalabin G.A. // *Chem. Sustainable Develop.*, 1996, N. 4, p. 281-288.
147. Kanitskaya L.V., Ivanova N.V., Gorokhova V.G., Babkin V.A. // *Chem. Sustainable Develop.*, 1996, N. 4, p. 275-280.
148. *Two-Dimensional NMR Spectroscopy* Eds. Croasmun W. R., and Carlson R. M. K., WILEY-VCH, Weinheim, 1996.
149. Buddrus J., Burba P., Herzog H., Lambert J. // *Anal. Chem.*, 1989, p. 628-631.
150. Schmitt-Kopplin, P., Hertkorn, N., Schulten, H.-R., Kettrup, A. // *Environ. Sci. Technol.*, 1998, v. 32, p. 2531-2541.
151. Buffle J., Altmann R.S. // *Geochem. Cosmochim. Acta*, 1988, v. 52, p. 1505-1508.

## Приложение 1.

Фрагментный состав ГФК различного происхождения по литературным данным  
(спектроскопия  $^{13}\text{C}$  ЯМР в растворе).

$\text{C}_{\text{C=O}}$	$\text{C}_{\text{COOH}}$	$\text{C}_{\text{Ar-O}}$	$\text{C}_{\text{Ar}}$	$\text{C}_{\text{Alk-O}}$	$\text{C}_{\text{Alk}}$	Источник
ГК дерново-подзолистых и серых лесных почв						
			35			88
			22			-"
			27			-"
			35			-"
	16		40	18	26	89
	20		47	12	21	-"
	16		37	20	28	-"
	28		32	18	23	-"
	16		35	20	30	-"
3	17	7	27	22	24	90
	22	29		24	25	91
	9	6	26	16	43	92
	11	7	31	17	34	-"
	12	7	27	22	32	-"
	11	4	30	17	39	-"
	11	5	24	21	39	-"
	10	4	27	20	40	-"
	10	5	22	19	43	-"
	11	4	22	18	46	-"
	12	8	32	17	32	-"
	10	3	22	18	47	-"
	12	7	27	19	36	-"
	11		22	15	53	84
	8		32	32	28	-"
	9		34	24	33	-"
	12		33	26	29	-"
	13		55	16	16	-"
	15		36	27	23	-"
	15		38	25	22	-"
	22		57	12	10	93
	6	7	26	28	31	94
	8	8	29	32	21	-"
	8	8	33	21	28	-"
	11	8	27	24	24	-"
	22	23		32	22	95
	17	36		30	17	96
	14	5	22	27	32	67
	14	9	32	20	26	-"
	13	7	29	20	31	-"
	10		22	15	53	84
	8		32	32	28	-"
	9		34	24	33	-"
	13		55	16	16	-"
	12		33	26	29	-"

134						
14		36		27	23	-"
15		38		25	22	-"
ГК черноземов						
12		37		19	32	84
13		41		20	26	-"
ФК почв						
0	22	5	24	22	27	67
			33			98
	22		25	35	18	89
	14		11	48	27	-"
	15		15	49	22	-"
	24		17	36	23	-"
	27		17	39	18	99
	29		18	30	24	-"
	24		17	42	17	-"
4	21	8	25	22	15	90
	15		8	57	19	91
	12		37	19	32	84
	13		41	20	26	-"
1	12		33	16	38	100
1	4		7	70	18	-"
	20	6	24	24	26	67
ГФК почв						
	21		33		46	103
	7		16	36	41	83
ГК природных вод						
7	16		42	18	17	66
15			21	21	43	105
ФК природных вод						
6	18	9	24	21	21	67
6	19		28	20	27	66
7	22	7	20	13	31	90
11		11	25	16	28	106
8		13	27	15	21	-"
ГФК торфа						
			33			88
	6		30	51	13	77
ГК углей						
	15	12	47	9	17	67
	12	10	44	9	25	-"
3	1		32	16	48	100
1	9		42	6	44	-"
1	9		39	4	48	-"

Фрагментный состав ГФК различного происхождения по данным спектроскопии  $^{13}\text{C}$  ЯМР  
в твердом теле.

$\text{C}_{\text{C=O}}$	$\text{C}_{\text{COOH}}$	$\text{C}_{\text{Ar-O}}$	$\text{C}_{\text{Ar}}$	$\text{C}_{\text{Alk-O}}$	$\text{C}_{\text{Alk}}$	Источник
ГК дерново-подзолистых и серых лесных почв						
	10		26	64		77
	20		25	22	33	78
4	18	7	24	27	21	79
	9	19		43	29	80
	10	15		44	30	80
			27			81
7	16	3	19	22	34	82
	14		14	47	24	83
	15		11	49	25	-"
	13		16	50	22	-"
	16		41	31	12	-"
	15		27	49	10	-"
	18		16	51	15	-"
	16		62	12	11	-"
	31		33	22	14	-"
	11		22	15	53	84
	8		32	32	28	-"
	9		34	24	33	-"
	12		33	26	29	-"
	13		55	16	16	-"
	15		36	27	23	-"
	15		38	25	22	-"
	12		37	19	32	-"
	13		41	20	26	-"
	9		39		38	85
	7		39		42	-"
	10		37		38	-"
	11		33		39	-"
	10		34		43	-"
	10		34		41	-"
	8		41		39	-"
	6		37		47	-"
	9		36		43	-"
	9		37		42	-"
	10		38		36	-"
	12		32		36	-"
	8		38		39	-"
	11		33		39	-"
	8		37		41	-"
	6		33		51	-"
	9		35		42	-"
	8		35		39	-"
	19		34		48	86
	18		45		37	-"
	7		48		45	-"
	3		46		51	-"

	19		51		30	-"
	18		55		27	-"
	10		20		71	-"
5	13		30	23	30	87
6	16		34	19	27	-"
6	18		27	24	26	-"
7	15		33	20	25	-"
ГК черноземов						
2	15	42		19	23	97
1	13	11	24	31	18	-"
4	14	25		27	30	87
6	13	27		27	27	-"
3	18	42		20	17	-"
ФК почв						
	21		31		32	16
	32		14		34	20
4	23	7	20	29	18	79
9	34	2	12	21	22	82
	19		29	35	16	-"
	18	4	8	55	18	-"
5	10		6	61	18	87
6	12		10	58	13	-"
5	14		13	45	22	-"
8	16		13	41	22	-"
8	21		19	29	23	-"
7	22		26	25	20	-"
4	24		26	25	22	-"
ГФК почв						
	11	4	11	29	21	101
	15	7	16	46	35	-"
	7		21	56	16	102
	10		22	49	19	-"
	5		23	54	18	-"
	9		23	45	23	-"
	10		18	42	30	-"
	5		23	54	18	-"
	11		22	39	28	-"
	11		21	44	24	-"
	11		25	39	25	-"
	6		16	56	22	-"
	6		17	56	24	-"
	7		16	48	29	-"
	7		15	42	36	-"
	8		14	58	20	-"
	5		15	55	25	-"
	8		13	45	34	-"
	9		9	40	42	-"
	6		18	57	19	-"
	7		20	54	19	-"
	9		20	49	22	-"
	9		22	49	20	-"
	10		18	49	23	-"

10		17		49	24	-"	
5		21		60	14	-"	
5		19		58	18	-"	
7		20		55	18	-"	
13		19		49	19	-"	
14		16		48	22	-"	
ГК природных вод							
4	10	3		11	38	34	104
3	15	8		24	29	21	79
			14				88
			9				-"
			9				-"
			10				-"
7	16		32		22	23	87
7	17		29		17	30	-"
8	14		30		26	23	-"
7	16		36		14	26	-"
ФК природных вод							
4	14	4		12	35	32	104
5	19	6		18	30	22	79
11	17		16		19	37	87
5	17		14		23	41	-"
9	18		18		23	31	-"
9	19		17		17	39	-"
ГФК торфа							
	6		30		51	13	107
ГК углей							
5	9		28		13	43	108
5	8		32		12	39	-"
5	8		23		11	51	-"
6	10		26		14	41	-"
6	9		29		12	41	-"
3	7		49		6	32	-"
5	8		28		11	45	-"
6	10		26		10	45	-"
6	10		37		15	30	-"
9	16		45		8	21	-"
6	9		26		12	44	-"
7	10		24		12	44	-"

## Приложение 2

Интегральная интенсивность сигналов (%) в спектрах ПМР препаратов ГФК в ДМСО-d<sub>6</sub>

Препарат ГФК	Спектральная область, м.д.				
	16.5-11.5	11.5-6	6-3.2	3.2-2.05	2.05-0.5
HBW	8.6	19.5	34.7	19.7	17.6
HBWN	6.4	16.0	28.6	13.0	35.9
<b>SEL</b>	5.0	9.9	28.8	43.4	12.9
<b>HMG</b>	5.0	13.1	13.1	58.0	10.8
<b>BS1FA</b>	13.4	14.8	32.4	14.7	24.7
<b>FA1N</b>	12.4	15.2	30.4	23.1	19.0
<b>FA3N</b>	12.8	16.6	33.3	21.2	16.2
<b>T5</b>	4.4	9.0	23.4	43.8	19.3
<b>T6</b>	5.3	13.4	23.2	44.3	14.9
<b>T7</b>	6.3	20.4	48.1	11.0	14.2
<b>T10</b>	8.4	23.0	40.4	10.6	17.5
<b>HTL</b>	7.3	17.7	42.5	12.5	20.1
<b>TTL</b>	7.0	20.2	40.8	12.6	19.4
<b>HTO</b>	5.5	21.2	40.3	11.1	22.1
<b>SWM4</b>	9.5	16.2	47.5	16.4	10.5
<b>FMX-8</b>	11.4	11.4	34.2	23.1	20.0
<b>FIX-8</b>	8.4	17.9	38.7	13.0	22.0
<b>FG1FA</b>	9.3	7.2	21.2	15.7	46.5
<b>HO10FA</b>	10.5	19.0	36.1	19.3	15.2
<b>AGK</b>	13.3	28.0	12.4	24.5	21.9
<b>AHA</b>	11.4	26.6	19.5	23.1	19.5

Интегральная интенсивность сигналов (%) в спектрах ПМР препаратов ГФК в ДМСО-  
d<sub>6</sub> с добавкой CF<sub>3</sub>COOD.

Препарат ГФК	Спектральная область, м.д.			
	11.5-6	6-3.2	3.2-2.05	2.05-0.5
<b>HBW</b>	16.9	34.4	25.6	23.1
<b>HBWN</b>	13.9	26.7	15.7	43.7
<b>SEL*</b>	9.6	26.2	48.9	15.3
<b>HMG</b>	10.0	11.0	66.8	12.2
<b>BS1FA</b>	13.3	39.1	17.6	30.0
<b>FA1N</b>	11.1	31.4	31.4	26.1
<b>FA3N</b>	12.6	35.8	29.1	22.5
<b>T5</b>	7.2	20.7	51.6	20.5
<b>T6</b>	9.1	20.7	53.6	16.5
<b>T7*</b>	16.6	46.0	15.6	21.9
<b>T10</b>	17.7	45.3	14.7	22.3
<b>HTL</b>	13.6	43.5	17.1	25.8
<b>TTL</b>	15.6	42.0	19.2	23.2
<b>HTO</b>	13.9	36.6	18.4	31.1
<b>SWM4</b>	12.3	49.3	23.3	15.1
<b>FMX-8</b>	8.8	35.0	30.0	26.3
<b>FIX-8</b>	13.1	38.8	17.5	30.6
<b>FG1FA</b>	5.6	20.0	18.6	55.8
<b>HO10FA</b>	14.5	38.2	26.3	21.1
<b>AGK</b>	27.2	15.4	30.2	27.2
<b>AHA</b>	23.4	23.4	28.7	24.6

\* добавлено 40 мкл CF<sub>3</sub>COOD

Интегральная интенсивность сигналов (%) в спектрах ПМР препаратов ГФК  
в NaOD/D<sub>2</sub>O после H-D обмена.

Препарат ГФК	Спектральная область, м.д.			
	9.5-6	6-4.48	4.48-3.2	3.2-0.5
<b>T7</b>	12	30	27	31
<b>TTL</b>	14	27	32	27
<b>HMG</b>	21	15	26	38
<b>FIX-8</b>	9	32	27	32

## Приложение 3.

Список низкомолекулярных соединений, использованных при аппроксимации  $\Delta K_d$  от параметров структуры

No	Брутто-формула	Наименование	No	Брутто-формула	Наименование
1	$C_7H_6O_4$	3,4-дигидрокибензойная кислота	29	$C_7H_{12}O_6$	хинная кислота
		3,5-дигидрокибензойная кислота	30	$C_4H_6O_2$	кротоновая кислота
2	$C_9H_{10}O_5$	сиреневая кислота			метакриловая кислота
3	$C_7H_6O_5$	3,4,5-тригидрокибензойная к-та	31	$C_6H_{10}O_7$	глюкуроновая кислота
4	$C_7H_6O_3$	3-гидрокибензойная кислота	32	$C_4H_8O_2$	бутановая кислота
		4-гидрокибензойная кислота	33	$C_9H_8O_4$	карбоксифенилуксусная к-та
5	$C_9H_{10}O_2$	гидрокоричная кислота	34	$C_{10}H_8O_4$	2-карбоксикоричная кислота
6	$C_9H_{11}O_2N$	фенилаланин	35	$C_{10}H_{10}O_4$	бензилмалоновая кислота
7	$C_4H_8O_2$	1,4-диоксан			1,2-фенилендиуксусная к-та
8	$C_3H_6O$	ацетон	36	$C_3H_6O_3$	Lactic acid
9	$C_7H_6O_2$	бензойная кислота	37	$C_5H_9O_4N$	глутаминовая кислота
10	$C_2H_6O$	этанол	38	$C_4H_7O_4N$	аспаргиновая кислота
11	$C_5H_{11}O_2NS$	метионин	39	$C_4H_4O_4$	малеиновая кислота
12	$C_8H_8O_2$	фенилуксусная кислота	40	$C_8H_6O_4$	фталевая кислота
13	$C_{18}H_{16}O_5$	4-[4-(2-карбоксибензоил)-фенил]бутановая кислота	41	$C_3H_4O_2$	акриловая кислота
14	$C_6H_{13}O_2N$	лейцин	42	$C_2H_2O_3$	глиоксалева кислота
15	$C_6H_{12}O_6$	глюкоза	43	$C_3H_6O_2$	пропионовая кислота
16	$C_3H_8O_3$	глицерин	44	$C_2H_4O_3$	гликолевая кислота
17	$CH_4O$	метанол	45	$C_2H_4O_2$	уксусная кислота
18	$C_9H_8O_4$	ацетилсалициловая кислота	46	$C_6H_{10}O_8$	глукарная кислота
19	$C_8H_8O_3$	2-метоксибензойная кислота	47	$CH_2O_2$	муравьиная кислота
20	$C_5H_{11}ONS$	валин	48	$C_6H_{10}O_4$	адипиновая кислота
21	$C_6H_{12}O_2$	гексановая кислота	49	$C_7H_{12}O_4$	пимелиновая кислота
22	$C_6H_{12}O_4N_2S$	цистин	50	$C_5H_8O_4$	глутаровая кислота
23	$C_5H_9O_2N$	пролин	51	$C_5H_6O_4$	глутаконовая кислота
24	$C_4H_9NO_3$	треонин	52	$C_4H_6O_6$	винная кислота
25	$C_3H_7O_3N$	серин	53	$C_6H_8O_7$	лимонная кислота
26	$C_3H_7O_2N$	аланин	54	$C_4H_6O_5$	малеиновая кислота
27	$C_2H_5O_2N$	глицин	55	$C_4H_6O_4$	янтарная кислота
28	$C_5H_{10}O_2$	изовалериановая кислота	56	$C_3H_4O_4$	малоновая кислота
		валериановая кислота	57	$C_2H_2O_4$	щавелевая кислота