



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 ^1H И ^{13}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

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. 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 фрагментного состава ограничен в связи с единством принципа строения ГФК различного происхождения, которое 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 структурой и свойствами последних. 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 ^1H и ^{13}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}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.

Цель работы: исследовать структуру гумусовых кислот при помощи расчета детального фрагментного состава из данных спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}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 ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии:
- Провести комплексный анализ данных ^1H и ^{13}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.

Научная новизна.

Разработана схема расчета детального фрагментного состава ГФК на основании комплексного анализа данных ^{13}C и ^1H ЯМР спектроскопии. При этом содержание сложноэфирных и ароксильных фрагментов ГФК было определено при помощи спектроскопии ЯМР впервые.

Разработан способ количественного анализа распределения водорода в структуре ГФК методом ПМР спектроскопии. При этом впервые предложен метод определения функциональных групп при помощи спектроскопии ПМР.

Установлены достоверные структурные различия ГФК важнейших природных источников на основании статистического анализа данных по детальному фрагментному составу. 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.

На основании анализа одномерных и ^1H - ^1H COSY ПМР спектров установлено, что для структуры ГФК нехарактерно наличие длинноцепочечных алкильных фрагментов.

Предложен способ использования данных по фрагментному составу для корректировки результатов гель-хроматографического определения молекулярных масс, позволяющий учитывать структурные различия ГФК.

Установлена взаимосвязь между фрагментным составом ГФК и их детоксицирующей способностью по отношению к Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} .

Практическая значимость работы.

Полученные данные по детальному фрагментному составу представительной выборки препаратов ГФК различного происхождения могут быть использованы для создания атласов и баз данных по структуре ГФК, а также для построения и верификации их структурных формул.

Разработанные методические подходы к количественному исследованию ГФК методами ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии могут быть использованы для серийных анализов гуминовых веществ в практике исследовательских лабораторий.

Установленные взаимосвязи между структурой ГФК и их детоксицирующими свойствами по отношению к Cu^{2+} , Cd^{2+} и Pb^{2+} могут быть использованы для создания прогностических моделей, учитывающих влияние ГФК различного происхождения на развитие токсикологической ситуации в природных средах, загрязненных тяжелыми металлами.

Апробация работы. Отдельные части работы были представлены на Международном конгрессе "Вода: Экология и токсикология" (Москва, 1994), VII, VIII и IX Конференциях Международного общества по изучению гумусовых веществ (Санкт-Августин, 1994; Вроцлав, 1996; Аделаида, 1998), Международном симпозиуме "Тяжелые металлы в окружающей среде" (Пушино, 1996), Ломоносовских чтениях (Москва, 1996), Симпозиуме "Refractory organic substances in the environment" (Карлсруэ, 1997), XVI Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Санкт-Петербург, 1998), X Международной конференции "Магнитный резонанс в химии и биологии" (Суздаль, 1998).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 4 статьи и 14 тезисов докладов.

Структура диссертационной работы. Диссертация состоит из литературного обзора, результатов и их обсуждения, экспериментальной части, выводов, списка цитируемой литературы и приложений.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Краткая характеристика объекта исследования

Гумусовые кислоты, представляющие собой сумму гуминовых (ГК) и фульвокислот (ФК) образуются в природных средах в результате химического и биологического разложения растительных и животных остатков. В основе данного процесса лежит отбор кинетически устойчивых структур и объединение их в макромолекулы случайным образом.

Для структуры ГФК характерно наличие ароматического каркаса, замещенного алкильными цепочками и функциональными группами (главным образом, карбоксильными и гидроксильными), и полисахаридно-пептидной периферии. Данный принцип строения хорошо иллюстрируется структурной формулой, приведенной на рис. 1. Однако характерные для ГФК нерегулярное строение и переменный состав обуславливают низкую количественную достоверность этого традиционного способа представления структуры. Несмотря на то, что в последние годы появились единичные работы по использованию ЯМР ^{13}C спектроскопии для моделирования строения углеродного скелета ГФК, о составе функциональных групп по-прежнему судят из результатов функционального анализа. В связи с изложенным представляет несомненный интерес комплексное исследование структуры ГФК при помощи ^{13}C и ^1H ЯМР-спектроскопии, которое позволит охарактеризовать полное распределение углерода и водорода в молекулах ГФК. При этом типичный для ЯМР-спектроскопии способ представления структурных данных в виде фрагментного состава может оказаться весьма перспективным с точки зрения генерации численных структурных дескрипторов ГФК.

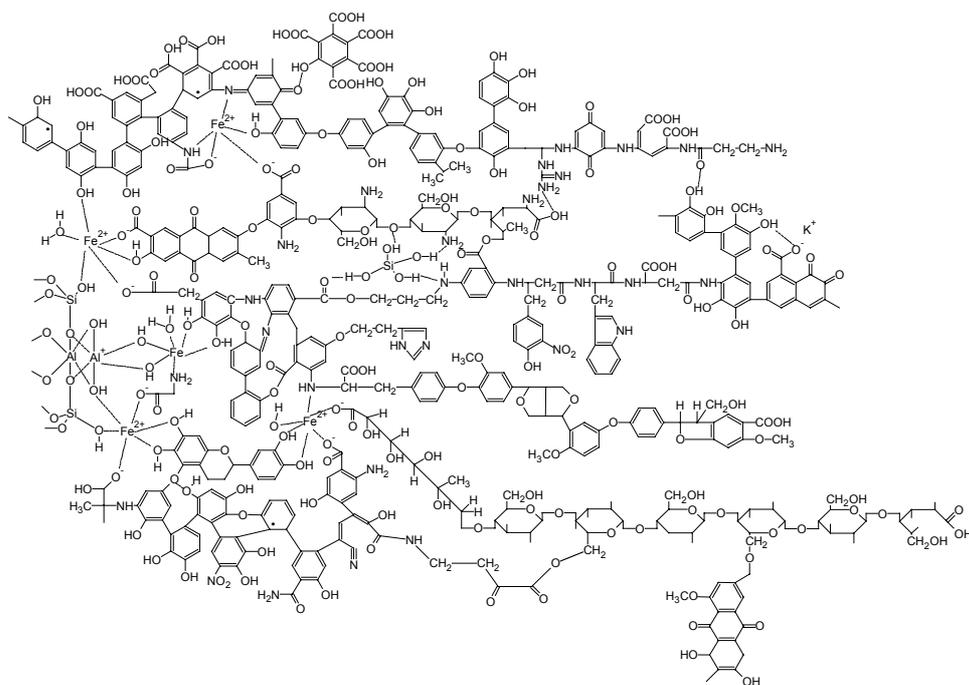


Рис. 1. Гипотетическая модель структурного фрагмента ГФК (*Kleinhempel, 1970).

Выделение и характеристика препаратов ГФК

Для проведения исследований был использован 31 препарат ГФК, выделенных по стандартным методикам из различных природных источников (табл. 1). Препараты FMX-8 и FIX-8 были выделены в рамках данной работы.

Выделенные твердые препараты ГФК представляли собой аморфные порошки коричневого цвета, не имеющие точки плавления и разлагающиеся при нагревании выше 150°C. Проведенные исследования показали, что они практически нерастворимы в большинстве органических растворителей, ограниченно растворимы в полярных апротонных растворителях (ДМСО и ДМФА) и воде (до 15 г/л), но хорошо растворимы в щелочах (до 30 г/л).

Все препараты ГФК были охарактеризованы методом элементного анализа (табл. 1). Результаты были пересчитаны на органическое вещество при помощи корректировки на несгораемый остаток (зольность), составлявший 1-15%, и равновесную влажность препаратов, составляющую 6-10%.

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 азот- и серосодержащие фрагменты отдельно не рассматривали, а включали их при расчете в число аналогичных кислородсодержащих.

Качественная характеристика фрагментного состава ГФК.

Качественная характеристика фрагментного состава была проведена на основании анализа ^{13}C ЯМР спектров ГФК (рис.2), двумерных ^1H - ^{13}C НМРС и

* Kleinhempel D. // Albrecht-Thaer-Archiv. 1970. Bd. 14. H. 1. S. 3-14

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
НСТ	ГК чернозема типичного	54.8	3.5	4.0	37.8	0.77	0.52
НMG	ГК лугового-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
ГФК 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
FG1FA	ФК грунтовых вод	54.6	5.2	1.0	39.2	1.14	0.54
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
НТW	ОВ водного экстракта верхового торфа	50.6	6.3	1.7	41.4	1.49	0.61
SEL	ГФК чернозема	51.4	4.4	4.1	40	1.03	0.58
SWM4	ГФК донных отложений торфяных болот	50.1	4.5	1.9	43.5	1.08	0.65

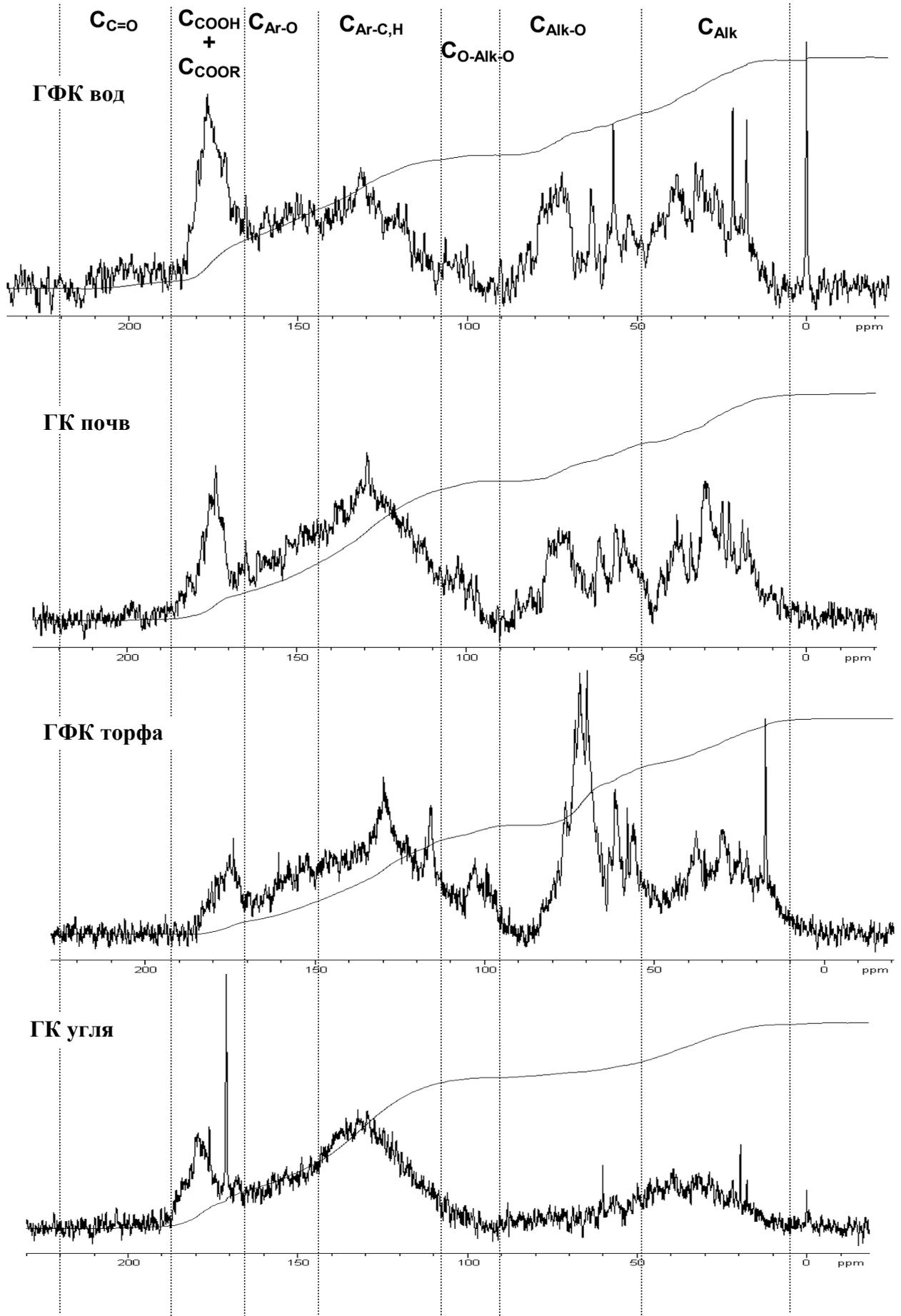


Рис. 2. Типичные спектры ^{13}C ЯМР ГФК различного происхождения.

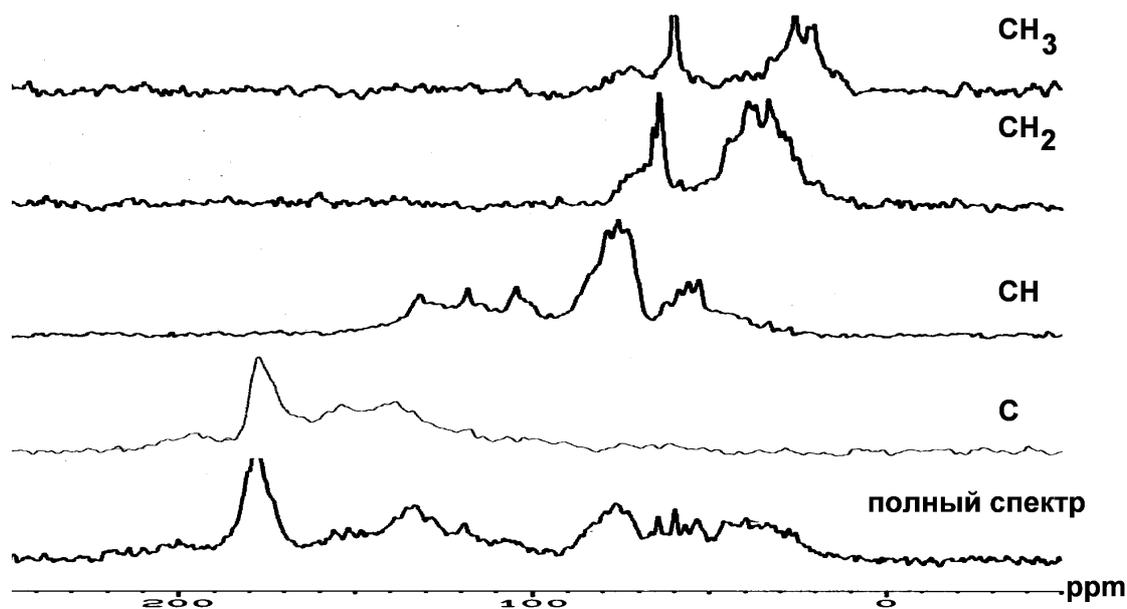


Рис. 3. Подспектры CH_3 , CH_2 , CH , C и полный ^{13}C ЯМР спектр препарата FA3

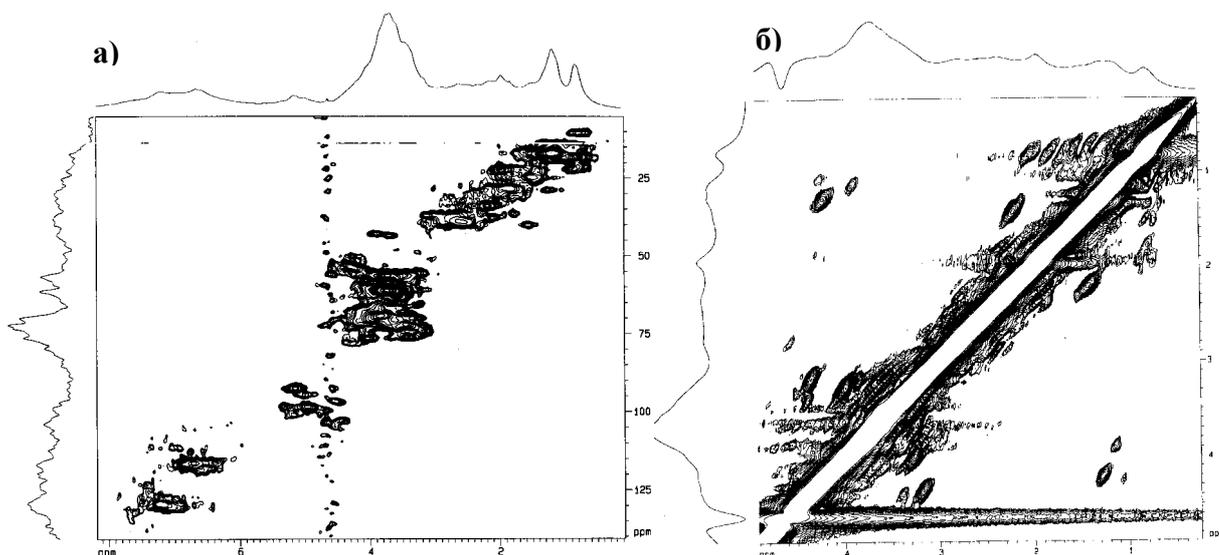


Рис. 4. Спектры ^1H - ^{13}C HMQC (а) и ^1H - ^1H COSY(б) препарата FA3.

^1H - ^1H COSY спектров (рис.3), и полученных при помощи импульсных последовательностей DEPT и QUAT подспектров CH_3 , CH_2 , CH и C фрагментов (рис.4). Регистрацию одномерных ПМР и ^{13}C ЯМР спектров проводили на спектрометре VXR-400. Регистрация спектров DEPT и QUAT, а также двумерных спектров была выполнена автором на спектрометрах Bruker 400 и 500 МГц в институте экологической химии (IOEC GSF), Мюнхен, Германия. Обработку спектров проводили на ПК с использованием программ NUTS и WINNMR.

Как видно из рис.2, вне зависимости от источника происхождения ГФК, их ^{13}C ЯМР спектры не содержат индивидуальных пиков, представляя собой суперпозицию большого числа сигналов. Поэтому общепринятым подходом к их обработке является разбиение на диапазоны химических сдвигов, которое для спектра ^{13}C показано на рис. 2. Группам сигналов в выделенных диапазонах можно дать следующее отнесение:

187-220 м.д. - кетонные и хинонные группы;

165-187 м.д. - карбоксильные и сложноэфирные группы;

108-165 м.д. - ароматические фрагменты. Из подспектров DEPT и QUAT видно, что в этой области невозможно разделить сигналы незамещенных и С-замещенных атомов углерода, однако можно с достаточной точностью выделить сигналы О-замещенных атомов углерода (145-165 м.д.).

90-108 м.д. - ацетальные атомы углерода. Указанное отнесение было дано в нашей работе на основании анализа двумерных ^1H - ^{13}C HMQC ЯМР спектров (рис. 3а). Оно подтверждается и наличием корреляционных пиков в ^1H - ^1H COSY спектре (рис. 3б) между сигналами протонов указанных фрагментов и СН-ОН фрагментов. В литературе есть другие мнения по этому вопросу, в частности, эти сигналы относят к незамещенным атомам углерода ароматического кольца в орто-положении к которым находятся два ОН-заместителя.

90-48 м.д. - другие гетерозамещенные алифатические фрагменты, включая сигналы вторичных спиртовых и эфирных СН-О фрагментов (90-65 м.д.), первичных спиртовых и эфирных CH_2 -О фрагментов (62-67 м.д.), а также CH_3 -О групп (58 м.д.) Данные отнесения подтверждаются при рассмотрении двумерных ^1H - ^{13}C HMQC спектров (рис. 3а). Раздельное определение перечисленных фрагментов не представляется возможным, поскольку группы сигналов в области 90-48 м.д. сильно перекрываются (рис. 4).

5-48 м.д. - алифатические фрагменты, не связанные с гетероатомами. Можно наблюдать сильно перекрывающиеся группы сигналов CH_3 и CH_2 фрагментов. Количество сигналов третичных атомов углерода существенно ниже. Сигналы четвертичных атомов углерода практически не наблюдаются как в области гетерозамещенного, так и незамещенного алифатического углерода. В Н-Н COSY двумерном спектре следует отметить интенсивный корреляционный пик в области 1.4–2.2 м.д., характерный для взаимодействия алифатических $\text{CH}_{(1-2)}$ фрагментов в α - и β -положениях к ароматическому кольцу или карбоксильной группе.

Приведенное рассмотрение показывает, что основными структурными фрагментами ГФК являются карбонильные ($\text{C}_{\text{C=O}}$), карбоксильные (C_{COOH}) и сложноэфирные (C_{COOR}) группы; атомы углерода ароматических колец с соответствующими заместителями: незамещенные ($\text{C}_{\text{Ar-H}}$), С-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 (C_{OCH_3}) и несвязанные с гетероатомами алифатические фрагменты (C_{Alk}).

В ходе дальнейших исследований было установлено, что указанный фрагментный состав характерен для ГФК всех использованных источников.

Исследование структуры ГФК методом спектроскопии ЯМР ^{13}C

Получение методом ЯМР ^{13}C количественных спектральных данных имеет особую важность для определения фрагментного состава. Основная проблема регистрации количественных спектров ^{13}C ЯМР связана со значительными различиями в скоростях релаксации ядер ^{13}C различного типа. Использование водорастворимых релаксантов, таких

как соли переходных металлов, невозможно из-за образования малорастворимых гуматов. С другой стороны, малая подвижность молекул ГФК и присутствие в них парамагнитных центров приводят к существенному снижению и выравниванию T_1 , хотя точные их значения неизвестны. В настоящий момент не существует единого мнения о приемлемых экспериментальных условиях, позволяющих получать количественные спектры ^{13}C ГФК с высоким соотношением сигнал/шум при разумных затратах времени на регистрацию спектра. Используемые в литературе времена релаксационной задержки T_d составляют от 0.5 до 10 сек.

В связи с этим нами был проведен эксперимент по выбору оптимального T_d на 12 препаратах ГФК различного происхождения. Для каждого из них регистрировали 5 спектров со временем задержки от 1 до 8 сек, и определяли изменение относительной интенсивности каждой спектральной области при увеличении T_d . Результаты показаны на рис. 5. (I_T/I_1 - отношение интенсивности спектральной области к таковой при $T_d = 1$ с.)

Все зависимости $I_T/I_1(T_d)$ выходят на плато при $T_d=4$ с, что позволяет говорить о количественности спектров, получаемых в таких условиях. В связи с этим для проведения последующих экспериментов использовали время задержки 4 с. Для устранения ядерного эффекта Оверхаузера все спектры регистрировали при выключении развязки от протонов на период T_d .

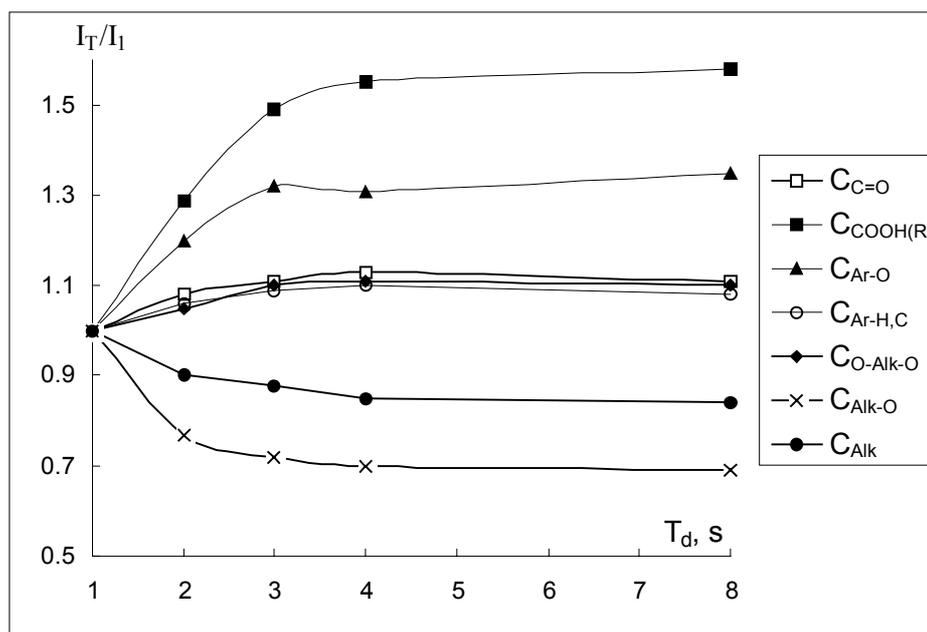


Рис. 5. Зависимость относительной интегральной интенсивности сигнала различных спектральных областей от времени задержки.

В описанных условиях были получены количественные спектры 31 препарата ГФК, использованные в дальнейшем при расчете фрагментного состава (табл. 2).

Для оценки согласования получаемых спектральных данных с результатами элементного анализа нами был предложен способ расчета соотношения Н/С из данных спектроскопии ЯМР по уравнению:

$$H/C = (2/3(C_{Ar-H,C} + C_{Ar-O}) + 5/3C_{Alk-O} + 2C_{Alk}) / \Sigma C \quad (1)$$

Формула (1) основана на предположении, что структурные фрагменты соединены в незамкнутую последовательность, при этом все атомы $C_{\text{Алк-О}}$ рассматриваются как углерод циклических полисахаридных фрагментов $C_6H_{10}O_5$. В связи с высокой молекулярной массой ГФК мы пренебрегали концевыми атомами водорода. Завышение результатов такого расчета по сравнению с данными элементного анализа будет указывать на неколичественные условия регистрации ^{13}C ЯМР спектров за счет переопределения обогащенных водородом фрагментов с минимальными T_1 . Сопоставление результатов расчета с данными элементного анализа продемонстрировало хорошее совпадение значений (рис.6).

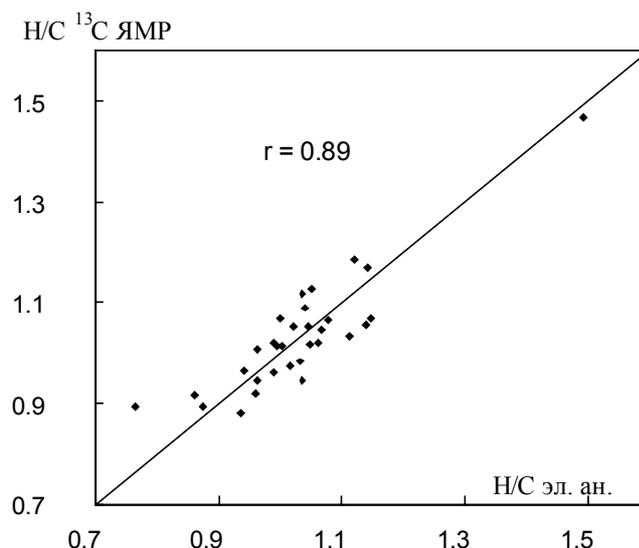


Рис.6 Сопоставление атомных соотношений Н/С, рассчитанных из данных ^{13}C ЯМР спектроскопии и элементного анализа.

Исследование структуры ГФК методом спектроскопии ПМР

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. Проблема определения подвижных протонов, возникает в результате:

- перехода всех сигналов протонов функциональных групп ГФК в пик остаточных протонов растворителя H_2O при регистрации спектров в $0.1\text{M NaOD/D}_2\text{O}$ из-за быстрого (в шкале времени ЯМР) обмена;

Распределение углерода (% от общего) в структуре ГФК по данным спектроскопии ЯМР ^{13}C .

Препарат ГФК	Спектральная область						
	220 - 187	187-165	165-145	145-108	108-90	90-48	48-5
	$\text{C}_{\text{C=O}}$	$\text{C}_{\text{COOH(R)}}$	$\text{C}_{\text{Ar-O}}$	$\text{C}_{\text{Ar-H,C}}$	$\text{C}_{\text{O-Alk-O}}$	$\text{C}_{\text{Alk-O}}$	C_{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

- перекрывания пиков протонов функциональных групп с сигналами скелетных С-Н протонов ГФК при регистрации ПМР спектров в ДМСО-d₆;

- изменения химических сдвигов сигналов протонов функциональных групп ГФК в органическом растворителе в присутствии следовых количеств воды.

Помимо этого в ПМР спектрах ГФК присутствует сигнал протонов растворителя, перекрывающийся с сигналами протонов ГФК и препятствующий определению их полной интегральной интенсивности.

Для решения перечисленных проблем нами было предложена схема комплексного ПМР эксперимента, основанная на:

- регистрации ПМР спектров ГФК в условиях медленного (в шкале времени ЯМР) обмена в ДМСО-d₆ (рис. 7а), позволяющих наблюдать разделенные сигналы протонов карбоксильных, фенольных и спиртовых групп.
- регистрации спектров в ДМСО-d₆ в условиях быстрого обмена в присутствии избытка сильной кислоты CF₃COOD (рис. 7б), позволяющих определить количество С-Н протонов, сигналы которых перекрываются с сигналами протонов функциональных групп в спектре в ДМСО-d₆.
- регистрации ПМР-спектров ГФК в 0.1 М NaOD/D₂O (рис. 7в) и их сопоставления со спектрами в ДМСО-d₆, позволяющего определить в последних долю сигналов алифатических протонов ГФК, закрытую пиком ДМСО, и рассчитать суммарную интенсивность сигналов протонов ГФК.

Сопоставление спектров в ДМСО-d₆ до и после добавки CF₃COOD позволяет определить доли сигналов скелетных и подвижных протонов в интервалах (11.5-6 м.д.) и (6-3.2 м.д.) в спектре ГФК в ДМСО-d₆. Для проведения такого сопоставления интенсивности этих областей нормировали на не изменяющуюся в этих условиях интенсивность области 3.2-2.05 м.д.

$$C_{\text{Ar-OH}} / C_{\text{Ar-H}} = \frac{I_{11.5-6}^{\text{DMSO}} \cdot I_{3.2-2.05}^{\text{DMSO+CF}_3\text{COOD}}}{I_{11.5-6}^{\text{DMSO+CF}_3\text{COOD}} \cdot I_{3.2-2.05}^{\text{DMSO}}} - 1 \quad (2)$$

$$C_{\text{Alk-OH}} / C_{\text{CH}_n\text{-O}} = \frac{I_{6-3.2}^{\text{DMSO}} \cdot I_{3.2-2.05}^{\text{DMSO+CF}_3\text{COOD}}}{I_{6-3.2}^{\text{DMSO+CF}_3\text{COOD}} \cdot I_{3.2-2.05}^{\text{DMSO}}} - 1 \quad (3)$$

где I_d(DMSO) и I_d(DMSO+CF₃COOD) - относительные интенсивности данных спектральных диапазонов в спектрах в ДМСО-d₆ и ДМСО-d₆+CF₃COOD.

Для исследования полноты разделения подвижных и скелетных протонов при добавлении CF₃COOD были проведены эксперименты на модельных соединениях - 2,4-дигидроксibenзойной кислоте и полидекстране. Результаты расчета хорошо совпали с теоретическими значениями.

Корректность предложенного метода разделения подвижных и скелетных протонов была также проверена при помощи проведения дейтерообмена ГФК. Соотношения C_{Ar-OH}/C_{Ar-H} и C_{Alk-OH}/C_{CH_n-O}, рассчитанные из сопоставления спектра препарата ГФК,

подвергнутого исчерпывающему обмену с D_2O , со спектром без дейтерообмена, хорошо совпали с рассчитанными согласно (2, 3).

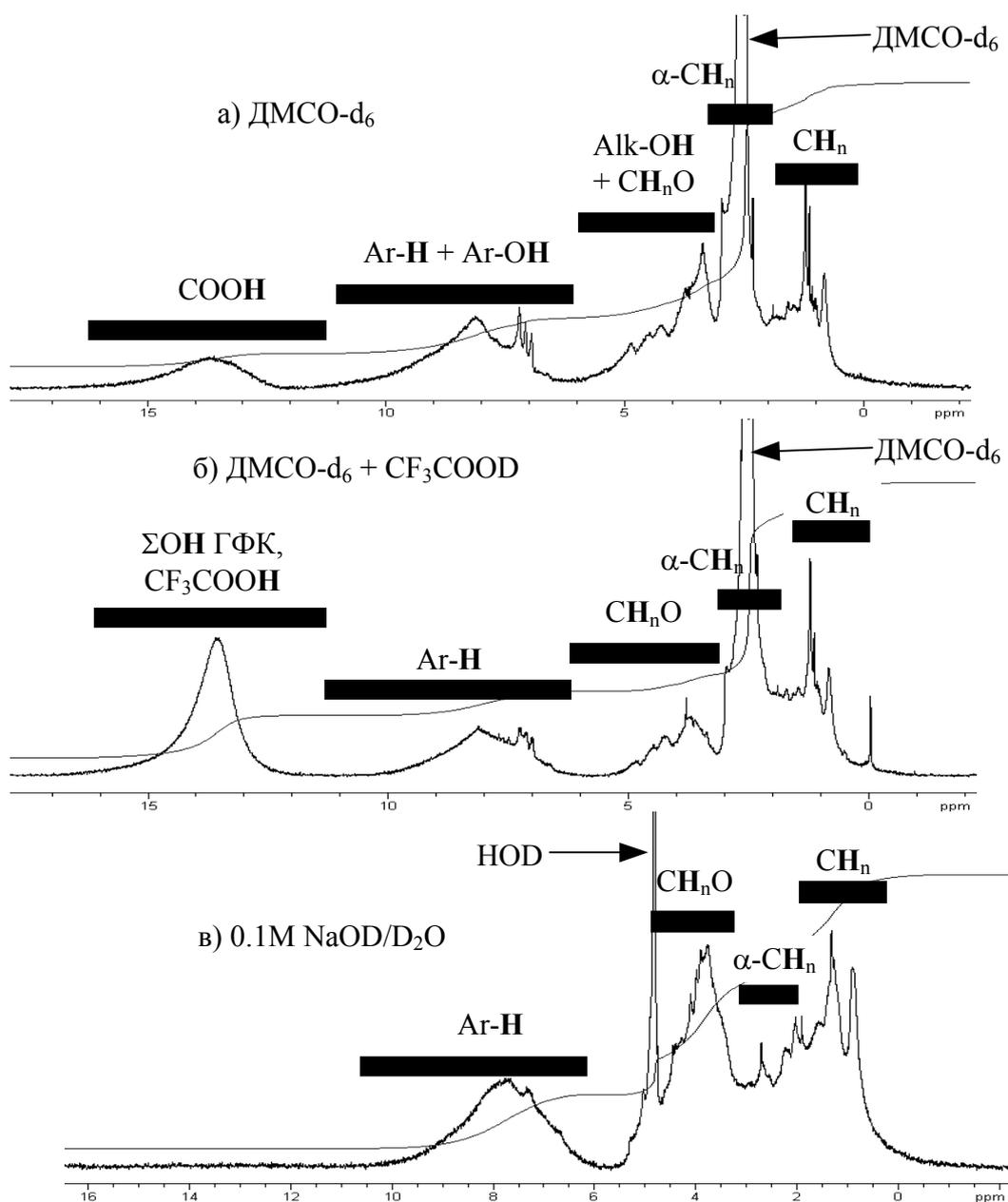


Рис.7. Спектры ПМР препарата НМГ в ДМСО-d₆ (а), ДМСО-d₆ с добавкой CF₃COOD (б) и в 0.1M NaOD/D₂O (в).

При сопоставлении спектров в ДМСО-d₆ и NaOD/D₂O вычисляли отношение интенсивностей сигналов α-СН_n-протонов ГФК и остаточных протонов ДМСО в области 2.05-3.2 м.д. (Нормирование выполняли на область 0.5-2.05 м.д., которая в данных условиях не изменяется.)

$$N_{\text{DMSO}} / \alpha\text{-CH}_n = 1 - \frac{I_{2.05-0.5}^{\text{DMSO}} \cdot I_{3.2-2.05}^{\text{D}_2\text{O}}}{I_{2.05-0.5}^{\text{D}_2\text{O}} \cdot I_{3.2-2.05}^{\text{DMSO}}} \quad (4)$$

Это позволило вычесть из спектра в ДМСО-d₆ сигнал остаточных протонов растворителя и рассчитать абсолютные величины содержаний каждого из рассмотренных типов протонов в структуре ГФК. Общая схема эксперимента и обработки результатов представлена на рис. 8.

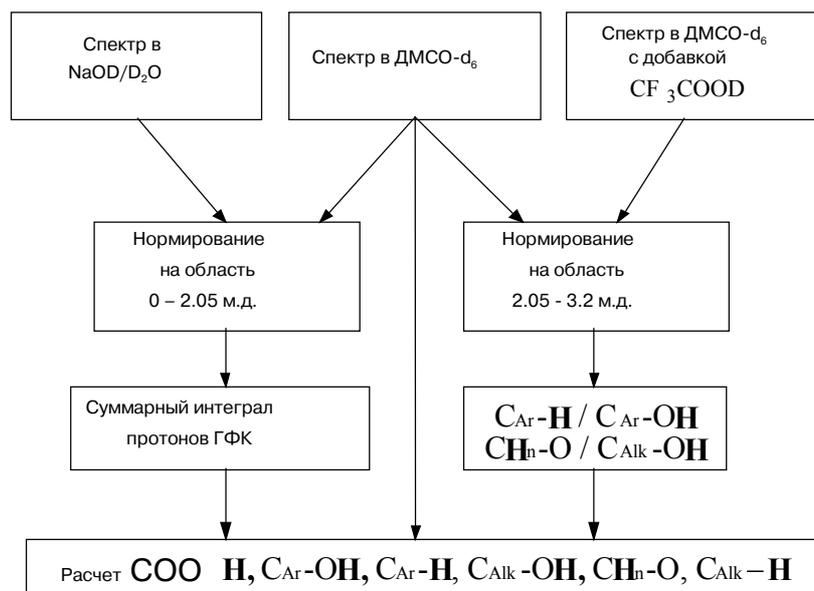


Рис. 8. Схема расчета распределения водорода в структуре ГФК.

При использовании ДМСО- d_6 высокой изотопной чистоты (99.95 ат.%D) с высоким постоянством изотопного состава, можно избежать регистрации спектров в NaOD/D₂O. В этом случае доля сигналов остаточных протонов ДМСО в интегральной интенсивности спектра α рассчитывается как

$$\alpha_{\text{ДМСО}} = (m_{\text{ДМСО}} * H_{\text{ДМСО}}) / (m_{\text{ДМСО}} * H_{\text{ДМСО}} + m_{\text{ГФК}} * H_{\text{ГФК}}) \quad (5)$$

где $m_{\text{ДМСО}}$ и $m_{\text{ГФК}}$ – масса внесенного ДМСО- d_6 и навеска препарата ГФК;
 $H_{\text{ДМСО}}$ и $H_{\text{ГФК}}$ – массовое содержание протонов в ДМСО- d_6 и ГФК.

В условиях нашего эксперимента (навеска ГФК 15 мг с содержанием водорода 3.5–5%, количество ДМСО- d_6 0.7 мл 99.95 ат.%) сигнал остаточных протонов ДМСО составлял 2–3.5% от общей интенсивности спектра.

Справедливость расчета при помощи формулы (5) была подтверждена сопоставлением его результатов с полученными из спектров в ДМСО- d_6 и NaOD/D₂O. Результаты определения совпадали в пределах 5% от величины.

Согласно разработанной схеме ПМР эксперимента было охарактеризовано распределение водорода в структуре 21 препарата ГФК (табл. 3).

Описание структуры ГФК при помощи фрагментного состава

Описание структуры ГФК проводили, рассчитывая содержание основных структурных фрагментов. При этом комплексный анализ данных ¹³C ЯМР и ПМР спектроскопии позволил расширить набор определяемых фрагментов (по сравнению с каждым методом) до двенадцати, которые приведены ниже:

$C_{C=O}$, C_{COOH} , C_{COOR} , C_{ArOH} , C_{ArOR} , C_{ArH} , C_{ArC} , $C_{O-Alk-O}$, C_{CHON} , C_{CH_2OH} , C_{OCH_3} , C_{Alk}

Содержание фрагментов C_{Alk} , $C_{O-Alk-O}$ и $C_{C=O}$ было получено непосредственно из данных ¹³C ЯМР спектроскопии. Содержание остальных фрагментов было рассчитано согласно следующим уравнениям:

Таблица 3

Распределение водорода в структуре ГФК по данным спектроскопии ПМР.

Препарат ГФК	Доля протонов, %					
	COOH	C _{Ar} -H	C _{Ar} -OH	CH _n -O	C _{Alk} -OH	α-CH _n
ГК дерново-подзолистых почв						
HBW	9	13.5	7	27.5	9	15.5
HBWNd	8	12	7	29	6	17
ГК чернозема						
HMG	11	20	8.5	22	6.5	17
ФК дерново-подзолистых почв						
FA1N	13	8.5	7.5	24	8	19
FA3N	13.5	9.5	8	27	8	17
ГФК торфа						
T5	8	10	5	30	9	18
T6	9.5	15.5	10	29	9	14
T7	10	16	9	30	9	13
T10	9	13.5	10.5	30	8	14
HTL	8	13	8	32	9	14
TTL	9	13	9	29.5	8.5	16
HTO	7	12	8	34	9	15
ГФК природных вод						
FMX-8	12	7	5	28	8	19
FIX-8	12.5	7.5	8	29	7	18
FG1FA	11	6.5	4	28	9	21
HO10FA	11	11	9	29	9	15
ГФК бурого угля						
AGK	14	23	6.5	13	0	20.5
ANA	12	19.5	8.5	19.5	1	19
Прочее						
SEL	10.5	12.5	7	32.5	11.5	14
BS1FA	14.5	12	8.5	29	6	16
SWM4	10	9	8	36	14	12

$$\begin{aligned}
 C_{\text{COOH}} &= N_{\text{COOH}}(\text{ПМР}) / H/C_{(\text{эл.ан.})} \\
 C_{\text{COOR}} &= (C_{\text{COOR}+\text{COOH}})_{(\text{C-13})} - N_{\text{COOH}}(\text{ПМР}) / H/C_{(\text{эл.ан.})} \\
 C_{\text{ArOH}} &= N_{\text{ArOH}}(\text{ПМР}) / H/C_{(\text{эл.ан.})} \\
 C_{\text{ArOR}} &= C_{\text{Ar-O}}(\text{C-13}) - N_{\text{ArOH}}(\text{ПМР}) / H/C_{(\text{эл.ан.})} \quad (6) \\
 C_{\text{ArH}} &= N_{\text{ArH}}(\text{ПМР}) / H/C_{(\text{эл.ан.})} \\
 C_{\text{ArC}} &= C_{\text{Ar}}(\text{C-13}) - N_{\text{ArH}}(\text{ПМР}) / H/C_{(\text{эл.ан.})} \\
 \left\{ \begin{aligned}
 C_{\text{СНОН}} + C_{\text{СН2ОН}} + C_{\text{СОСН3}} &= C_{\text{Alk-O}}(\text{C-13}) \\
 2/5 C_{\text{СНОН}} + C_{\text{СН2ОН}} &= C_{\text{Alk-OH}}(\text{ПМР}) / H/C_{(\text{эл.ан.})} \\
 C_{\text{СНОН}} + 2C_{\text{СН2ОН}} + 3C_{\text{СОСН3}} &= \text{СН}_n\text{-O}(\text{ПМР}) / H/C_{(\text{эл.ан.})} - C_{\text{O-Alk-O}}(\text{C-13})
 \end{aligned} \right.
 \end{aligned}$$

Также были рассчитаны атомные соотношения Н/С в ароматических, алифатических и карбогидратных фрагментах.

$$\begin{aligned}
 (H/C)_{\text{Ar}} &= N_{\text{Ar}}(\text{ПМР}) / (C_{\text{Ar}}(\text{C-13}) + C_{\text{Ar-O}}(\text{C-13})) / H/C_{(\text{эл.ан.})} \\
 (H/C)_{\text{Alk}} &= (CH_n + \alpha\text{-CH}_n)_{(\text{ПМР})} / C_{\text{Alk}}(\text{C-13}) / H/C_{(\text{эл.ан.})} \quad (7) \\
 (H/C)_{\text{Alk-O}} &= \text{СН}_n\text{-O}(\text{ПМР}) / C_{\text{Alk-O}}(\text{C-13}) / H/C_{(\text{эл.ан.})}
 \end{aligned}$$

Рассчитанный фрагментный состав препаратов ГФК приведен в табл. 4.

Максимальное содержание COOH групп характерно для препаратов ФК почв, ГФК природных вод и ГК угля. 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 ГФК угля. Коэффициент корреляции между содержанием C_{COOH} и C_{COOR} в исследованных препаратах ГФК составляет -0.68.

Содержание ароматических фрагментов в исследованных препаратах ГФК снижалось в ряду:

ГК бурого угля > ГК черноземов > ГК П^Д и Л почв > ГФК торфа > ГФК природных вод > ФК почв.

В то же время соотношение $C_{ArO}/(C_{ArH}+C_{ArC}+C_{ArO})$ возрастало при уменьшении содержания ароматических структур. Коэффициент корреляции между этими параметрами составляет -0.68.

Соотношение $(H/C)_{Ar}$ было минимально для ГФК природных вод и ФК почв и максимально в случае ГК угля. Как видно из табл. 4, более трети атомов углерода ароматических колец имеют С-заместители. 17-35% ароматических атомов углерода приходится на долю О-замещенных. Характер замещения «среднего» ароматического кольца для исследовавшихся препаратов ГФК описывается следующим образом: 2.6 C_{ArC} , 1.7 C_{ArO} и 1.7 C_{ArH} .

Для ГФК П^Д почв и торфа содержание карбогидратных $C_{СНОН}$, ацетальных $C_{O-Alk-O}$ и первичных спиртовых $C_{СН2ОН}$ фрагментов соотносятся в среднем как 4:1:1 и в ряду препаратов изменяются симбатно. В связи с этим был сделан вывод о принадлежности всех СНОН и СН₂ОН фрагментов в этих препаратах к полисахаридным циклам. Напротив, для препаратов ГФК природных вод до 50% спиртовых групп не относятся к полисахаридам. Практически не содержат полисахаридов ГК угля, а ГК черноземов характеризуются низким их содержанием. Высокая обратная корреляция между содержанием полисахаридных и ароматических структур свидетельствует о том, что увеличение доли ароматических фрагментов в структуре ГФК в значительной степени обуславливается отщеплением полисахаридов.

Содержание алифатических фрагментов выше для ГФК природных вод и ГК угля, в то время как их наименьшие количества обнаружены в ГФК торфа. Для всех исследованных препаратов около 50% алифатических протонов принадлежит α -СН_n группам. Это свидетельствует о том, что для алифатической части ГФК нехарактерно наличие длинноцепочечных алифатических фрагментов. Данное предположение подтверждается анализом 1H-1H COSY спектров, в которых пик полиметиленовых цепей не имеет высокой интенсивности.

На основании приведенного фрагментного состава могут быть рассчитаны характеристические параметры, описывающие наиболее существенные различия структуры ГФК различного происхождения (рис. 9). Отношение содержания полисахаридов и ароматической части $C_S/(C_{ArH}+C_{ArC}+C_{ArO})$ характеризует степень гумификации ГФК. Отношение C_{COOH}/C_{COOR} отражает гидролизованность структуры. Отношение $C_{ArO}/(C_{ArH}+C_{ArC}+C_{ArO})$, позволяет судить об окисленности ароматических колец.

Соотношения $C_{Ar-O}/(C_{ArH}+C_{ArC}+C_{Ar-O})$ и $C_S/(C_{ArH}+C_{ArC}+C_{Ar-O})$ возрастают симбатно в ряду от ГК бурого угля до ФК почв. Соотношение C_{COOH}/C_{COOR} снижается в ряду от ГК бурого угля до ГФК торфа. Однако для ГФК природных вод и ФК почв это соотношение довольно высоко.

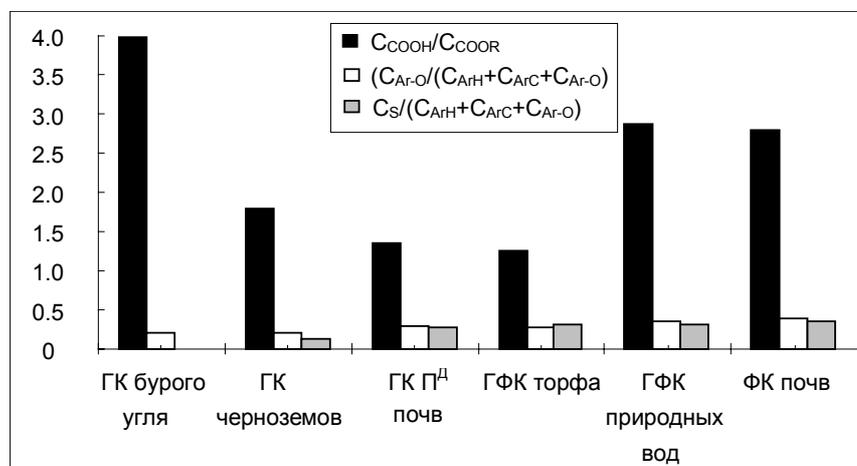


Рис. 9. Характеристические параметры структуры ГФК различного происхождения.

Для установления значимости различий фрагментного состава ГФК различного происхождения полученные результаты были подвергнуты кластерному анализу (рис. 10). Как видно из рисунка, можно выделить 4 группы препаратов с достоверными различиями структуры. При этом полученное распределение по кластерам соответствует распределению препаратов по источникам происхождения.

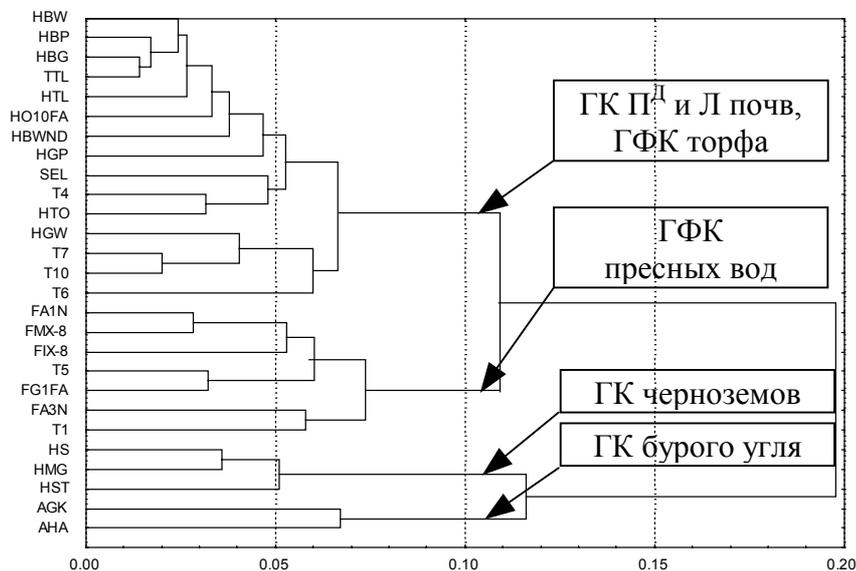


Рис.10. Классификация препаратов ГФК при помощи кластерного анализа.

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. Сходную структуру также имеют ГК ПД и Л почв и ГФК торфа. Структура препаратов ГК черноземов и бурых углей резко отличается от остальных препаратов. Полученные закономерности согласуются с представлениями о специфике образования ГФК в различных природных средах.

Таким образом, рассчитанный фрагментный состав позволил охарактеризовать основные закономерности строения ГФК. На заключительном этапе работы была исследована его применимость для установления количественных соотношений структурно-свойство. Для этой цели данные по фрагментному составу были использованы для коррекции результатов гель-хроматографического анализа и описания детоксицирующих свойств ГФК.

Применение данных по фрагментному составу ГФК для коррекции результатов гель-хроматографического определения молекулярных масс

Традиционным методом определения молекулярных масс (ММ) ГФК является гель-хроматография. Экспериментально определяемой величиной 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. Условием правильного определения ММ является сходство структуры анализируемого вещества и стандарта. В связи с тем, что для ГФК подходящих стандартов не существует (обычно используют полидекстраны), нами был предложен способ учета структурных различий, основанный на представлении экспериментально определяемого K_d в виде:

$$K_d = K_{d0} + \Delta K_d \quad (7),$$

где K_{d0} - "идеальный" коэффициент распределения, определяемый из калибровки по полидекстранам, ΔK_d - поправка на структурные различия.

Уравнение связи между ΔK_d и структурой анализируемого вещества было получено на основании регрессионного анализа соответствующих данных (K_d и фрагментный состав) для низкомолекулярных соединений, моделирующих основные структурные фрагменты ГФК, и имело следующий вид:

$$\Delta K_d = 0.21 - 1.24C_{ArOH} + 0.35C_{COOH} - 0.18C/O + 0.07C/H \quad (8)$$

Соответствие рассчитанных согласно уравнению (8) и экспериментально определенных ΔK_d проиллюстрировано на рис. 11.

Применимость данного подхода для полиэлектролитов была проверена на модельных полимерах. Как видно из рис. 12, молекулярные массы, определяемые из калибровки по полидекстранам, на порядок выше истинных. Введение поправки на структурные различия существенно улучшает результаты определения, свидетельствуя об адекватности способа корректировки.

Разработанный способ корректировки был использован при определении средних молекулярных масс препаратов ГФК (рис. 13). ΔK_d рассчитывали по уравнению (8) из данных по фрагментному составу (табл. 4). Было показано, что введение поправки снижает определяемые ММ на 1-4 тысячи дальтон.

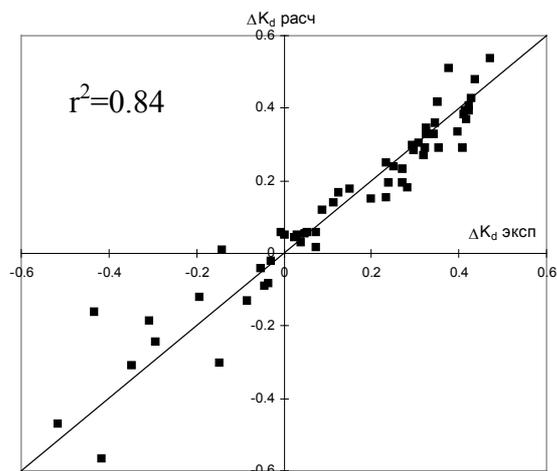


Рис. 11. Сопоставление экспериментально полученных и рассчитанных согласно (8) величин ΔK_d для низкомолекулярных модельных соединений.

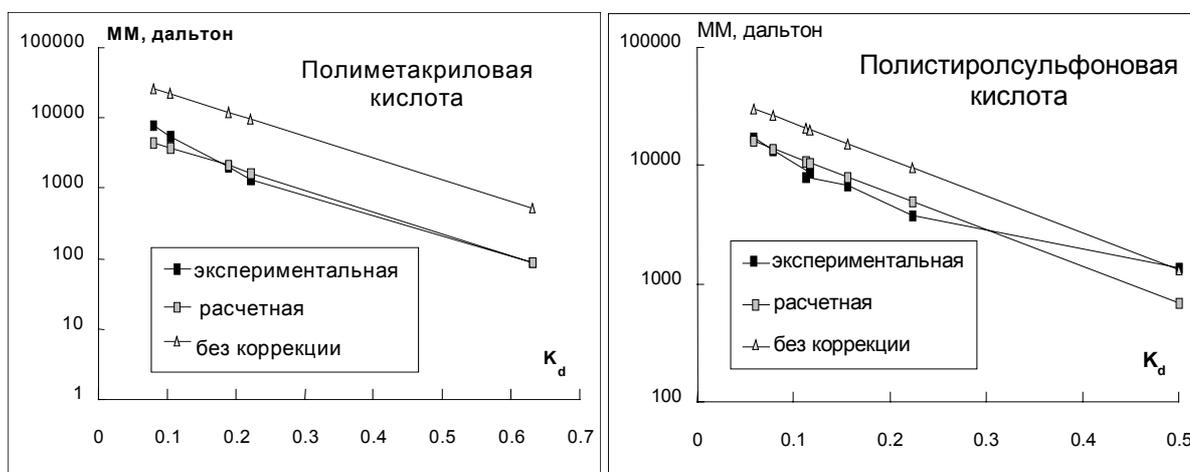


Рис. 12. Применение метода расчета для полиэлектролитов.

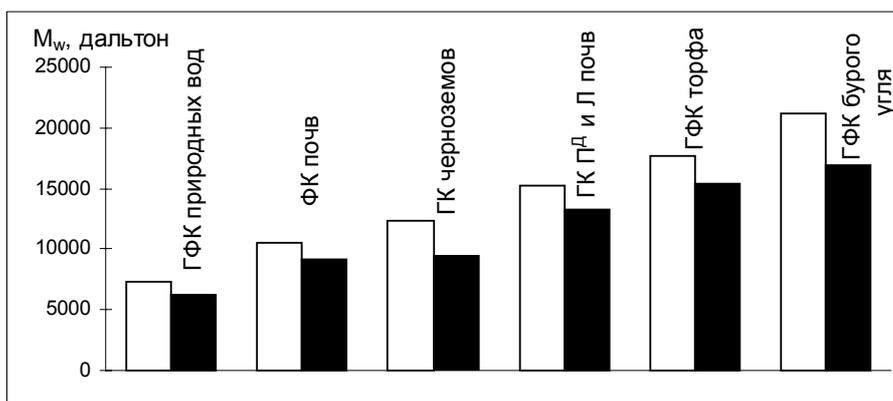


Рис. 13 Средние молекулярные массы ГФК различного происхождения.
□ - исходные, ■ - скорректированные на структурные различия.

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

Влияние ГФК на токсичность тяжелых металлов (ТМ) было исследовано по отношению к Cu^{2+} , Cd^{2+} и Pb^{2+} . Токсичность ТМ определяли методом альгологического биотестирования, в качестве биотеста использовали зеленую микроводоросль *Chlorella vulgaris*. Тест-откликом служил относительный выход переменной флуоресценции,

характеризующий фотосинтетическую активность водоросли. Для исследования детоксицирующих свойств ГФК использовали концентрации металлов, вызывающие 100% подавление фотосинтеза.

Для оценки детоксицирующего действия ГФК был введен коэффициент детоксикации (D), рассчитываемый как

$$D = \left(1 - \frac{R_0(R_d - R_{d+t})}{R_d(R_0 - R_t)} \right) \cdot 100\%, \quad (10)$$

где R - тест-отклик: R_0 - в контрольных экспериментах, R_d - в присутствии ГФК, R_t - в присутствии токсиканта, R_{d+t} - в присутствии токсиканта и ГФК.

Зависимости D от концентрации ГФК различного происхождения для Cu^{2+} и Cd^{2+} приведены на рис. 14. Препарат ФК морских вод и данные о его структуре были предоставлены NAOML (Miami, USA). ГФК торфа (НТЛ), ГК почв (НВW) и ФК речных вод (FMX8) оказались довольно близки по детоксицирующей способности, вызывая полное снятие токсического эффекта в концентрациях 10-20 мг/л. В то же время ФК морских вод не обеспечивают полной детоксикации металлов во всем диапазоне исследованных концентраций.

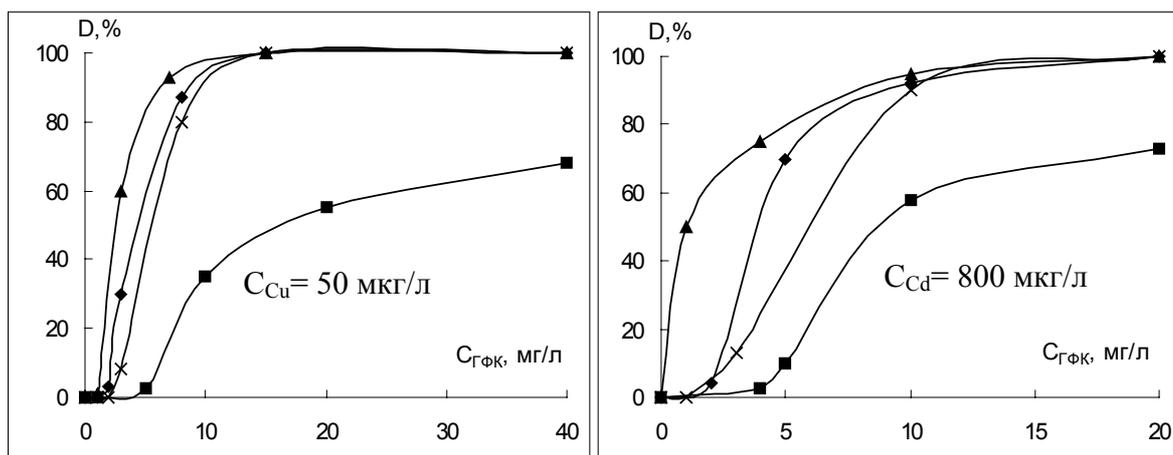


Рис. 14. Детоксикация тяжелых металлов препаратами ГФК.

—▲— ГФК торфа —◆— ГФК речных вод —×— ГК П^д почвы —■— ФК морских вод

Для сопоставления детоксицирующих свойств препаратов использовали параметр ДК^{50} - концентрацию ГФК, вызывающую 50% снижение токсичности. Для установления взаимосвязи со структурой проводили корреляционный анализ ДК^{50} с данными по фрагментному составу (табл.5).

Таблица 5

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

	$(C_{\text{COOH}} + C_{\text{ArOH}}) \cdot C_{\text{Ar}}$	$\frac{(C_{\text{COOH}} + C_{\text{ArOH}}) \cdot C_{\text{Ar}}}{C_{\text{Alk-O}}}$	$\frac{C_{\text{S}}}{C_{\text{Ar}}}$
$\text{ДК}^{50}(\text{Cu})$	-0.99	-0.93	-0.65
$\text{ДК}^{50}(\text{Cd})$	-0.98	-0.70	-0.94

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.

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 ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии. Предложен набор из 12 структурных фрагментов, позволяющих детально описать структуру ГФК различного происхождения:
 $\text{C}_{\text{C=O}}$, C_{COOH} , C_{COOR} , C_{ArOH} , C_{ArOR} , C_{ArH} , C_{ArC} , $\text{C}_{\text{O-Alk-O}}$, C_{CHOH} , $\text{C}_{\text{CH}_2\text{OH}}$, C_{OCH_3} , C_{Alk}
3. Разработан метод количественной характеристики распределения водорода функциональных групп и углеродного скелета ГФК при помощи спектроскопии ^1H .
4. Экспериментально обоснованы оптимальные условия регистрации количественных ^{13}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 Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} .

Список работ

1. Perminova I.V., D.V. Kovalevskii et al. Humic substances as natural detoxicants. In : Humic substances and organic matter in soil and water environments: characterization, transformations and interactions. Eds. C.E.Clapp., M.H.B. Hayes et al. 1996, p. 399-406.
2. Perminova I.V., Frimmel F., Kovalevsky D.V., et al. Development of a predictive model for calculation of molecular weight of humic substances. Water Research, 1997, v. 31, p. 314.
3. Д.В. Ковалевский, А.Б. Пермин, И.В. Перминова, В.С. Петросян. Выбор времени задержки импульса для количественной ^{13}C ЯМР спектроскопии гумусовых кислот. Вестник МГУ, сер. хим. (в печати)
4. Д.В. Ковалевский, А.Б. Пермин, И.В. Перминова, Д.В. Коннов, В.С. Петросян, Количественное определение обменных и скелетных протонов гумусовых кислот с помощью спектроскопии ПМР. Вестник МГУ, сер. хим. (в печати)
5. Ковалевский Д.В., Перминова И.В., Пермин А.Б., Петросян В.С. Исследование структуры гумусовых кислот различного происхождения при помощи спектроскопии ^{13}C ЯМР. XVI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Реф., докл. и сообщ, Т.3, М., 1998, с. 122.
6. Ковалевский Д.В., Пермин А.Б., Перминова И.В., Коннов Д.В., Петросян В.С. Определение подвижных и скелетных протонов в структуре гумусовых кислот при помощи спектроскопии ПМР. XVI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Реф., докл. и сообщ, Т.3, М., 1998, с. 123.
7. Ковалевский Д.В., Пермин А.Б., Перминова И.В., Коннов Д.В., Петросян В.С. Применение спектроскопии ПМР для исследования функционального состава гумусовых кислот. X Международная конференция "Магнитный резонанс в химии и биологии". Суздаль'98, 1-7 июня 1998. с.189-190.
8. Ковалевский Д.В., Перминова И.В., Пермин А.Б., Петросян В.С. Выбор условий для получения количественных ^{13}C ЯМР спектров гумусовых кислот. X Международная конференция "Магнитный резонанс в химии и биологии". Суздаль'98, 1-7 июня 1998. с.190-191.
9. D.V. Kovalevskii, I.V. Perminova, A.B. Permin, and V.S. Petrosyan, ^{13}C -NMR characterisation of structural features of humic substances of different origin. Abstract Book, 9th Meeting of IHSS, 21-25 Sept. 1998, Adelaide, Australia.
10. D.V. Kovalevskii, I.V. Perminova, A.B. Permin, and V.S. Petrosyan. ^1H -NMR spectroscopic determination of exchangeable and skeleton protons in the structure of humic substances. Abstract Book, 9th Meeting of IHSS, 21-25 Sept. 1998, Adelaide, Australia.
11. Ковалевский Д.В. Описание структуры гумусовых кислот в виде набора структурных параметров. - 30-я международная конф. молодых ученых "Ломоносов-96", 03-06 Апр. 1996, Москва, с 46.
12. Kovalevski D. V., Perminova I. V., Kudryavtsev A. V., A new approach to description of structure of humic substances and its application to estimating a quantitative structure - property relationship. Abstr. of 8th meeting of IHSS, Wroclaw, 1996, P. 99.
13. Perminova I.V., Kovalevski D.V., Kudryavtsev A.V., Petrosyan V.S. Structural parameters for correction of SEC-data of HS? Report at the 8th meeting of IHSS, Wroclaw, 1996
14. I.V. Perminova, F.N. Frimmel, D.V. Kovalevskii, et al, Predictive model for the molar mass of humic substances. Abstr. of Symposium on Refractory organic substances in the environment (ROSE) Karlsruhe, Germany, Oct. 6-8, 1997, p. 11.
15. Ковалевский Д.В., Перминова И.В., Петросян В.С. Влияние структуры гумусовых кислот на их детоксицирующую способность по отношению к тяжелым металлам. Тез. докл. междунар. конф. "Тяжелые металлы в окружающей среде". Пущино, 1996, С. 164.
16. Perminova I.V., D.V. Kovalevski, et al., Humic acids as natural detoxicants. - Transactions of the 7th International Meeting of the IHSS, July 3-8, 1994, St. Augustine, Trinidad&Tobago. Teil 2. P.F7-F8.
17. Perminova I.V., D.V. Kovalevskiy, et al., Toxicological behaviour of heavy metals in the presence of humic acids of different origin. - Abstracts of the Fourth SETAC - Europe Congress. Brussels, Belgium, Apr. 11-14, 1994. P.763.
18. Петросян В.С., Перминова И.В., Ковалевский Д.В., и др. Детоксикация тяжелых металлов, ПАУ и пестицидов гумусовыми веществами в водах и почвах. Материалы международного конгресса "Вода: Экология и токсикология". Москва, 6-9 сентября 1994, том 4, 1136-1143.

Работа была выполнена при поддержке Российского Фонда фундаментальных исследований (гранты №96-04-49838 и №98-03-33186а), Госкомитета Российской Федерации по высшему образованию (грант в области фундаментальных проблем охраны окружающей среды и экологии №4-26) и Robert Havemann Scholarship.

Таблица 4

Распределение структурных фрагментов в исследованных препаратах ГФК.

Шифр	C _{CO}	C _{COOH}	C _{COOR}	C _{Ar-OH}	C _{Ar-OR}	C _{Ar-H}	C _{Ar-C}	C _{O-Alk-O}	C _{CH3O}	C _{CH-OH}	C _{CH2OH}	C _{Alk}	H/C _{Alk}	H/C _{Ar}	H/C _{Alk-O}
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
ГФК бурого 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
Прочее															
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
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
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