

Глава 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРНО-ГРУППОВОГО СОСТАВА ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ

При определении структурно-группового состава гумусовых кислот в качестве основной задачи рассматривали установление набора структурных фрагментов, полностью описывающих распределение скелетообразующих элементов – углерода и водорода – в структуре гумусовых кислот, содержание которых поддавалось бы количественному определению. Оптимальным методом для решения указанной проблемы является одномерная спектроскопия ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C .

Учитывая, что спектроскопия ЯМР является самым мощным методом структурного анализа, то наряду с определением интегральных дескрипторов состава, полученную спектроскопическую информацию использовали и для углубленного анализа особенностей строения гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава. Тем самым добивались наполнения абстрактной формы – набора интегральных дескрипторов структурно-группового состава – реальным химическим содержанием в виде информации о парциальных структурах, наличие или отсутствие которых определяет принадлежность гумусовых кислот к тому или иному классу. В области идентификации парциальных структур не имеет себе равных метод двумерной спектроскопии ЯМР, который и был широко использован для этой цели в нашей работе. Для дальнейшей детализации информации о строении гумусовых кислот проводили их гидролитическое расщепление с последующей идентификацией продуктов гидролиза методами одномерной и двумерной спектроскопии ЯМР и ВЭЖХ. Тем самым отвечали на вопрос о специфике строения каркасной и периферической частей макромолекул гумусовых кислот. Конечным выходом такого рода исследований может стать расшифровка структуры гумусовых кислот (с нашей точки зрения, это уже вопрос недалекого будущего), тогда как в рамках представленной работы основной приоритет отдавался проблемам извлечения количественной (численной) информации о строении гумусовых кислот из спектральных данных, что позволило бы использовать ее для решения задач классификации и прогностического моделирования свойств гумусовых кислот.

4.1 Одномерная спектроскопия ЯМР ^{13}C и ПМР

4.1.1 Качественная характеристика ^{13}C ЯМР- и ПМР-спектров гумусовых кислот

Типичные ^{13}C ЯМР- и ПМР-спектры гумусовых кислот (на примере ФК торфа) приведены на рис. 4.1 (а, б), на рис. 4.2 показаны также ^{13}C ЯМР спектры гумусовых кислот различного происхождения и фракционного

состава. Как ^{13}C ЯМР, так и ПМР спектры характеризуются широкими полосами поглощения, обусловленными перекрыванием большого количества сигналов. Максимумы интенсивности достигаются в области незамещенных алифатических фрагментов (НС), в “карбогидратной” (НСО – фрагменты) и ароматической (Ar) области спектра. Особенно интенсивные, сильно перекрывающиеся пики наблюдаются в “карбогидратной” области. Такое распределение спектральной плотности согласуется с априорной информацией о наличии в структуре гумусовых кислот высокозамещенного ароматического каркаса и углеводно-пептидной периферии. Ввиду сильного перекрывания, отнесение сигналов в подобных спектрах возможно только “поинтервально” – согласно положению резонансов атомов со сходным химическим окружением, как это показано в табл. 4.1.

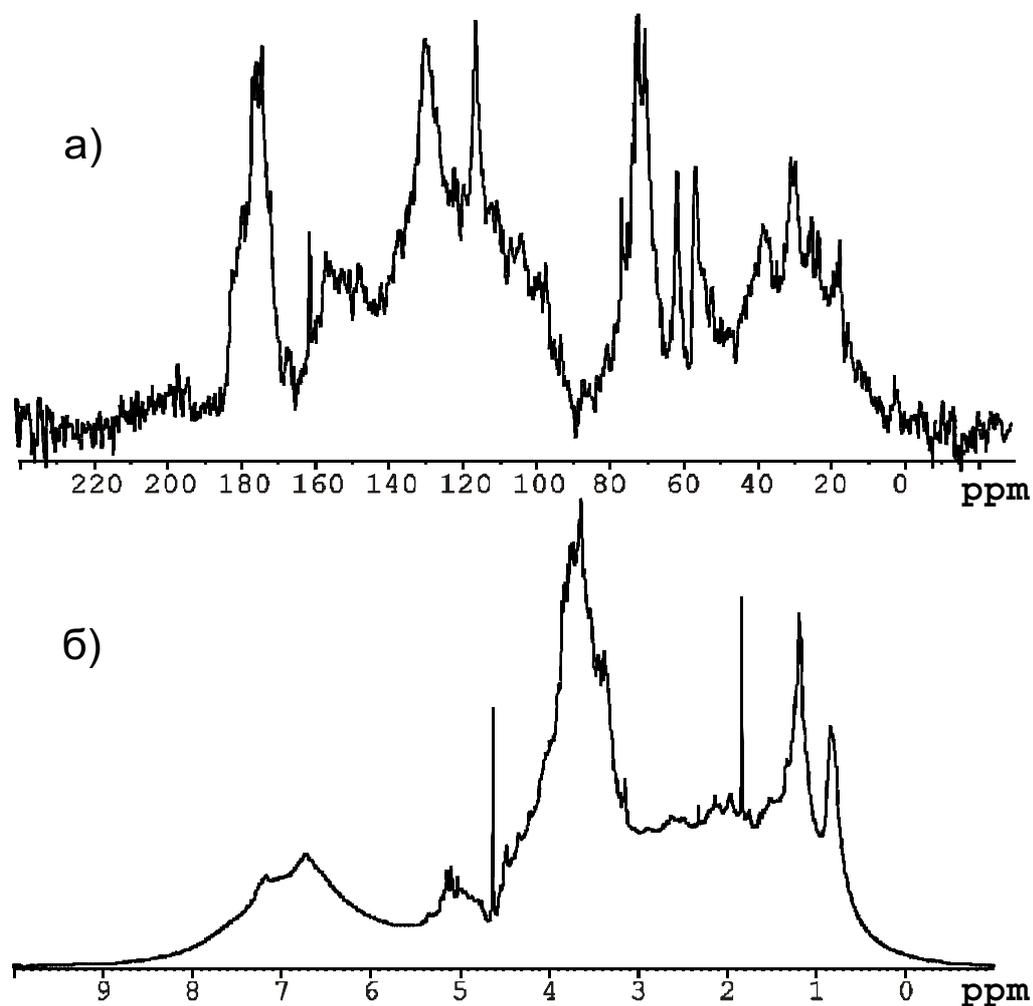


Рис. 4.1. Спектры ^{13}C ЯМР(а) и ПМР (б) ФК верхового торфа в 0.1 М NaOD.

Отнесения в ПМР- и ^{13}C ЯМР-спектрах гумусовых кислот
(0.1 M NaOD)

Фрагмент	Интервал, м.д.		Описание
	ПМР	^{13}C ЯМР	
CH-H,C	0.5-1.95	5-48	C, H-замещенные алифатические фрагменты алифатические фрагменты в α -положении к электроотр. группе или ароматическому кольцу
α -CH	1.95-3.1		
CH ₃ -O	3.1-4.7	48-58	метоксильные и O-, N-замещенные алифатические фрагменты (“карбогидратные”)
CH ₂ -O,N		58-64	
CH-O,N		64-90	
O-CH-O,N	4.7-6.0	90-108	алифатические фрагменты, дважды замещенные гетероатомами (“аномерные”)
Ar-H,C	6.0-10.0	108-145	H-, C-замещенные ароматические фрагменты
Ar-O,N	–	145-165	O, N-замещенные ароматические фрагменты
COO-H,C	–	165-187	карбоксильные группы и их производные
C=O	–	187-220	кетонные и хинонные группы

Максимальный уровень детализации позволяет выделить в ^{13}C ЯМР спектре 9 интервалов, интегрирование которых может быть осуществлено с необходимой точностью. Величины указанных парциальных интегралов, сумма которых описывает полный интеграл спектра, могут быть использованы как интегральные дескрипторы структурно-группового состава, если они пропорциональны содержанию атомов C в соответствующих фрагментах. Из-за различия времен релаксации ядер C разного типа, пропорциональность величины интеграла количеству атомов C в ^{13}C ЯМР спектре достигается только в количественных условиях его регистрации. Они включают в себя (1) использование времени задержки между импульсами (T_d), достаточного для полной релаксации третичных и четвертичных ядер углерода, и (2) устранение ядерного эффекта Оверхаузера. Поэтому выбору таких условий регистрации ^{13}C ЯМР спектра будет уделено особое внимание, как и получению информации о 100 % распределении водорода с помощью спектроскопии ПМР.

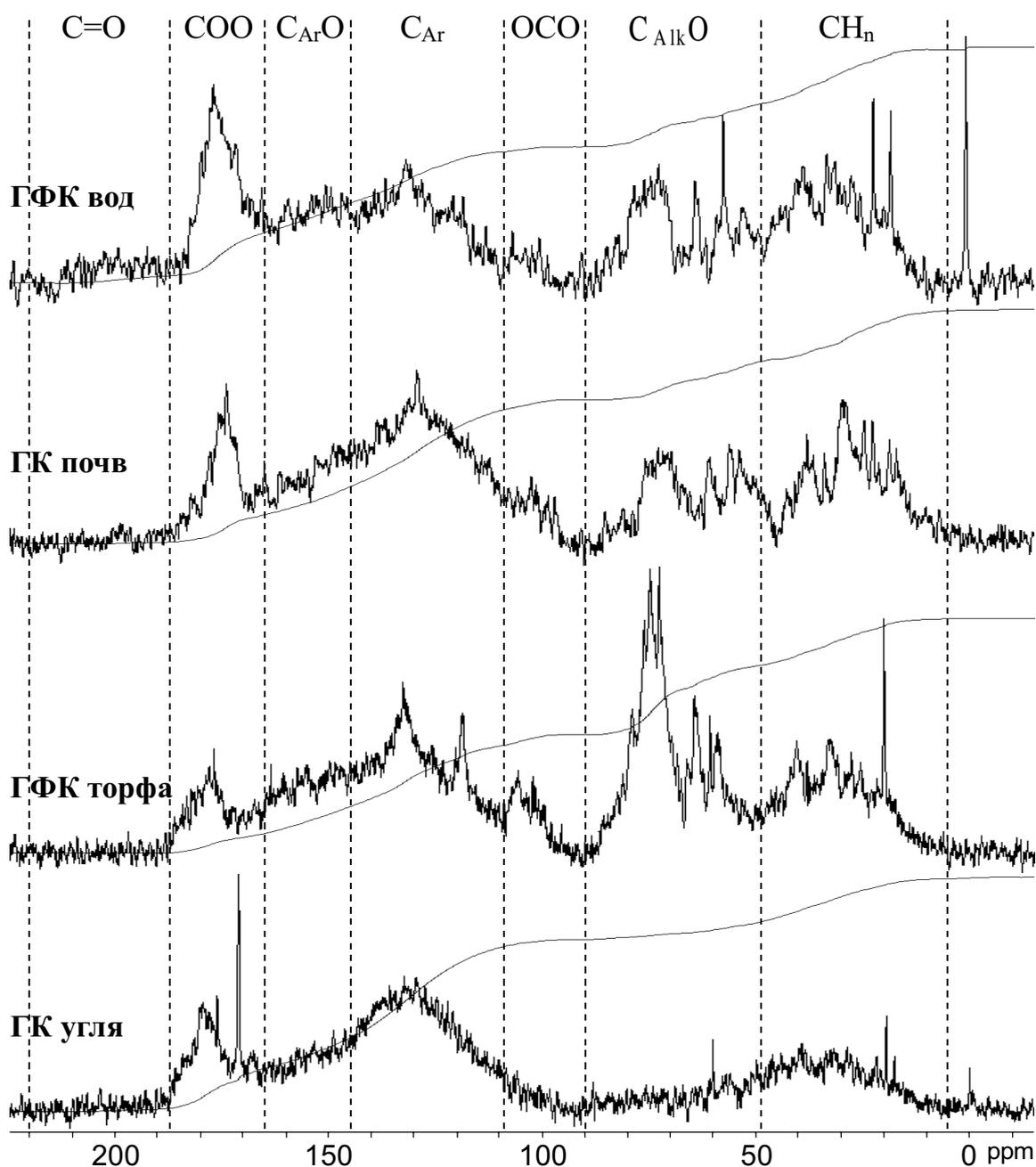


Рис. 4.2. Типичные спектры ^{13}C ЯМР гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава.

4.1.2 Выбор условий регистрации количественных ^{13}C ЯМР-спектров гумусовых кислот

Для обеспечения условий регистрации количественных ^{13}C ЯМР-спектров гумусовых кислот необходимо было исключить насыщение и ядерный эффект Оверхаузера (ЯЭО). Теоретические аспекты данной проблемы были обсуждены в обзоре литературы. В нашей работе влияние ЯЭО на количество получаемой информации оценивали путем регистрации спектра при полном отсутствии ЯЭО (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). Сопоставление этих спектров для ряда препаратов не выявило различий в интенсивностях всех спектральных областей. Это свидетельствует о том, что использование последовательности INVGATE позволяет полностью устранить влияние ЯЭО.

Для решения второй проблемы необходимо было определить время задержки (T_d) между импульсами, достаточное для релаксации всех ядер углерода (включая третичные и четвертичные). Систематические исследования по определению времен релаксации гумусовых кислот отсутствуют, а приводимые в литературе величины T_d , для регистрации спектров гумусовых кислот варьируют от 0.5 до 10 с. В связи с этим были проведены эксперименты по оценке времени релаксационной задержки, использование которого позволило бы достичь пропорциональности интегральной интенсивности сигналов числу атомов углерода. Для этого были получены спектры 12 препаратов гумусовых кислот различного происхождения с задержкой между импульсами 1, 2, 3, 4 и 8 с. Спектры интегрировали в пределах семи диапазонов химсдвигов (“карбогидратную” область интегрировали целиком, без разбиения на более узкие диапазоны). Для каждой спектральной области рассчитывали отношение интенсивности в спектре при $T_d = 1, 2, 3, 4$ и 8 (I_T) к интенсивности этой же области спектра при $T_d = 1$ с (I_1). Такое представление данных позволяет проследить изменения, происходящие в спектрах различных препаратов гумусовых кислот при увеличении T_d . На рис. 4.3 показаны зависимости относительной интенсивности спектральных областей от времени задержки. Результаты интегрирования спектров приведены в Приложении 4.1.

Как видно из рис. 4.3, все зависимости I_T/I_1 от T_d выходят на плато при $T_d = 4$ с. Это дает основание предполагать, что при таких временах релаксационной задержки спектры гумусовых кислот близки к количественным. Использование меньших времен задержки может привести к переопределению доли алифатических и карбогидратных фрагментов и недоопределению четвертичных ароматических и карбоксильных атомов углерода. В связи с этим в нашей работе все спектры гумусовых кислот регистрировали при $T_d = 4$ с.

Следует отметить еще одну методическую проблему – фазирование спектра гумусовых кислот. Она связана с отсутствием узких пиков и нулевой линии практически во всем спектральном диапазоне. С целью уменьшения субъективной ошибки при фазовой коррекции нулевой линии спектра, фазирование каждого преобразованного сигнала спада свободной индукции

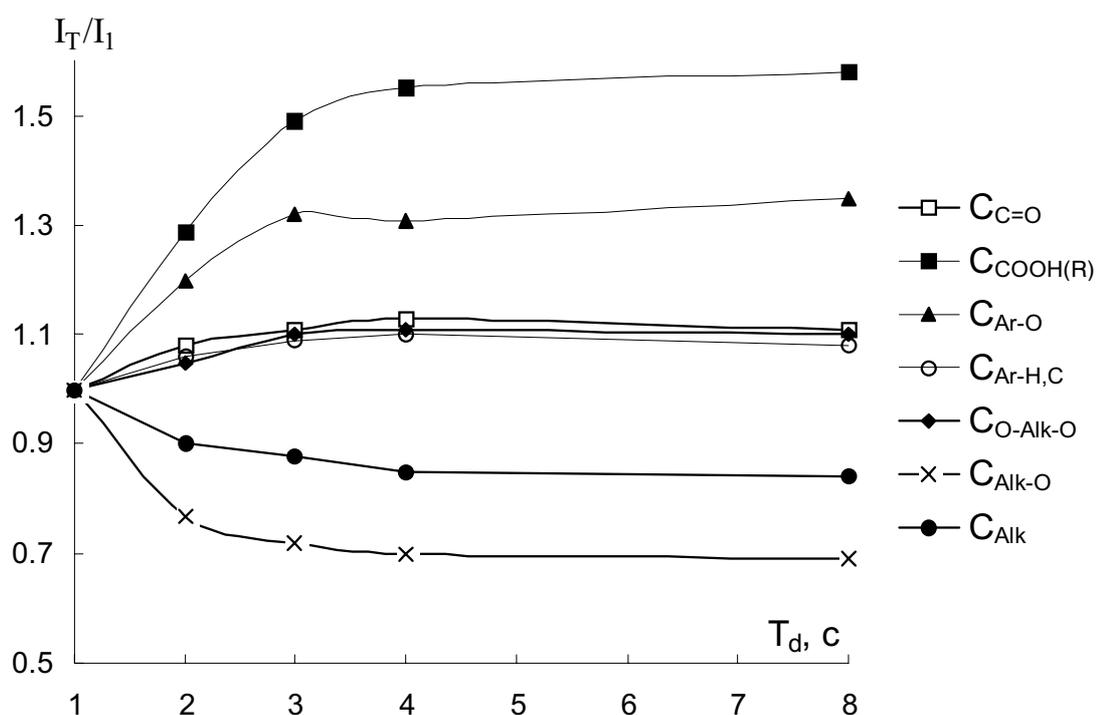


Рис. 4.3. Зависимость относительной интегральной интенсивности сигнала различных спектральных областей от времени задержки (приведены величины, усредненные для 12 препаратов различного происхождения).

(ССИ) проводили семикратно вручную по стандартной процедуре. Каждое фазирование начинали с нулевых значений множителей фазовой коррекции. Полученные результаты интегрирования усредняли. Максимальная ошибка интегрирования наблюдалась для интервалов 90-108 м.д. и 185-220 м.д. в связи с низкой интенсивностью сигналов в этих областях. Обработка спектров 67 препаратов гумусовых кислот показала, что при 7-кратном фазировании для этих интервалов в среднем ошибка составляет около 20 отн.%, а для остальных не превышает 5%.

Оценку воспроизводимости полученных величин проводили путем регистрации нескольких спектров для 5-ти препаратов ГК торфа, спектры которых характеризовались наличием достаточно интенсивных сигналов во всех спектральных областях. Эксперимент включал повторное растворение пробы, регистрацию спектров в идентичных условиях и интегрирование по вышеуказанным диапазонам с усреднением по 7 фазированиям. Интегралы спектральной интенсивности для большинства диапазонов характеризовались хорошей воспроизводимостью ($s_T = 6\%$ отн.), тогда как для диапазонов карбонильных и ацетальных фрагментов она была существенно хуже ($s_T = 23\%$ отн) в связи с низкой интенсивностью сигналов.

4.1.3 Структурно-групповой состав исследованных препаратов гумусовых кислот по данным ^{13}C ЯМР

В описанных выше условиях были зарегистрированы ^{13}C ЯМР спектры 67 препаратов гумусовых кислот. Все ^{13}C ЯМР спектры регистрировали на ЯМР спектрометре VXR-400 (Varian) на рабочей частоте 400 МГц. Навеска препарата – 100 мг, растворитель – 0.1 М NaOD (3 мл), 8 мм датчик. Результаты количественной обработки спектров всех исследованных препаратов приведены в таблице 4.1. На рис. 4.4 показано распределение углерода по девяти основным структурным фрагментам для восьми классов гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава: торфяные ФК, ГК и ГФК, почвенные ГК и ФК, ГК угля, ГК чернозема и ГФК природных вод, – в виде редуцированных спектров. Такое представление данных позволяет выделить характерные черты той или иной группы препаратов, создать их зрительный образ. В Приложении 4.2 приведены основные статистические характеристики полученных данных по распределению углерода в структуре гумусовых кислот для выборок препаратов, сгруппированных по сходному источнику происхождения и фракционному составу.

Как видно из приведенных в табл. 4.2 и на рис. 4.4 данных, наиболее сильно исследованные препараты гумусовых кислот различаются по соотношению ароматических и углеводных фрагментов, входящих в состав углеродного скелета. Наиболее уникальный структурно-групповой состав характерен для ГК угля – максимальное содержание ароматического углерода (до 70 %) при практически полном отсутствии углеводных фрагментов. Это позволяет предположить наличие поликонденсированных структур в составе данных соединений и их высокую гидрофобность. Высокое содержание ароматического углерода (иногда сопоставимое с ГК угля) характерно для ГК черноземов. Однако, в отличие от угля, в них присутствуют углеводные фрагменты, в состав которых входит от 8 до 13% углерода. ГК дерново-подзолистых ($\text{П}^{\text{д}}$) и серых лесных (Л) почв существенно отличаются от черноземов. Содержание ароматического углерода в них не превышает 45%, тогда как содержание углерода углеводных фрагментов достигает 15-20%. Почвенным ГК весьма близки по распределению углерода ГК и ГФК торфа. ФК почв весьма отличны от ГК и характеризуются самым высоким содержанием углерода карбоксильных (сложноэфирных) групп – до 22%, содержание ароматического углерода не превышает 40%, а в состав углеводных фрагментов входит 20-25% углерода. ФК торфа содержат еще больше углеводных фрагментов, чем ФК почв: для верховых торфов величина $S_{\text{АККО}}$ достигает максимума – 40%. В тоже время для низинных торфов

Распределение углерода по структурным фрагментам (в % от общего содержания углерода) в препаратах гумусовых кислот

Препарат	Распределение углерода, % от общего С										
	C=O	COO	C _{Ar} O	C _{Ar}	OCO	CNO	CH ₂ O	CH ₃ O	CH _n	ΣC _{Ar}	ΣC _{Carb}
ГФК торфа											
PHF-T10L94	2.4	17.3	15.3	32.0	1.2	9.0	2.1	4.2	16.6	47.3	12.3
PHF-T10L98	2.6	17.0	6.9	27.5	3.7	13.0	3.9	4.4	20.9	34.3	20.7
PHF-T1H94	2.1	15.1	12.1	33.2	4.3	12.5	2.5	2.1	16.1	45.4	19.3
PHF-T3L98	4.8	14.2	8.0	38.3	1.6	7.5	2.3	3.7	19.8	46.2	11.4
PHF-T4H94	0.5	13.4	17.2	29.4	2.9	16.1	2.8	2.6	15.9	46.6	21.8
PHF-T4H98	5.1	12.3	8.2	25.9	6.0	17.1	3.3	2.4	19.7	34.1	26.4
PHF-T5H94	2.0	15.7	17.3	28.9	4.6	8.6	2.3	2.4	18.2	46.2	15.4
PHF-T6H94	1.9	15.3	13.3	34.8	2.9	10.5	2.0	3.1	16.2	48.1	15.4
PHF-T6H98	4.7	10.8	8.6	24.8	6.9	19.1	5.5	1.7	17.9	33.4	31.5
PHF-T7H94	2.5	15.0	14.3	35.3	3.4	9.8	1.3	2.7	16.0	49.5	14.5
PHF-T7H98	3.6	12.0	9.2	26.3	0.5	22.7	4.3	3.2	18.1	35.5	27.5
PHF-TH94	1.3	15.5	13.8	33.0	3.5	10.7	1.8	3.6	16.8	46.9	16.0
PHF-TMu4H	2.0	16.6	12.7	25.8	6.8	16.2	3.0	3.0	13.8	38.5	26.1
PHF-TTL94	2.4	17.0	16.1	29.5	3.0	8.4	2.6	4.5	17.4	45.5	14.0
PHF-TTL98	7.3	15.4	10.5	24.9	5.6	11.0	2.7	3.5	19.1	35.4	19.3
ГК торфа											
PHA-T10L98	4.0	16.1	8.1	25.0	2.3	14.1	3.3	4.4	22.7	33.1	19.6
PHA-T5H98	2.3	12.8	6.7	32.2	4.3	12.4	3.4	3.9	22.0	38.8	20.1
PHA-T6H98	1.7	8.6	7.2	35.4	2.6	12.3	2.7	4.0	25.7	42.5	17.6
PHA-T7H98	4.1	11.0	9.4	31.7	3.7	14.2	2.7	3.4	19.8	41.1	20.7
PHA-TH8	1.6	17.5	20.6	37.9	1.7	3.7	1.0	2.6	13.3	58.6	6.4
PHA-THTO	2.6	15.0	16.5	32.1	1.1	11.6	2.2	4.1	14.8	48.6	15.0
PHA-TTL98	4.5	14.1	9.2	32.7	1.7	8.2	2.5	6.5	20.5	42.0	12.4
ФК торфа											
PFA-T10L98	3.5	9.8	8.8	30.2	3.7	12.7	2.3	4.1	24.9	38.9	18.8
PFA-T4H98	1.1	12.1	4.9	21.6	5.8	24.7	5.6	2.6	21.6	26.5	36.1
PFA-T5H98	3.0	15.2	8.1	24.3	6.2	26.6	2.2	1.2	13.2	32.3	35.1
PFA-T6H98	1.6	10.9	6.9	24.4	6.9	26.1	3.1	1.8	18.3	31.3	36.1
PFA-T7H98	2.2	11.8	10.9	24.0	9.6	24.1	3.5	2.0	11.9	34.9	37.2
PFA-TTL98	3.9	18.9	7.0	25.1	5.4	12.3	2.8	3.2	21.4	32.1	20.5
ГФК почв											
SHF-Co94	0.8	18.4	13.1	31.9	4.0	11.0	3.0	4.0	14.2	45.0	18.0
SHF-CtV98	2.2	15.4	7.4	41.7	7.4	10.5	2.6	0.7	12.1	49.1	20.5
SHF-PMu9	3.8	16.8	14.0	26.2	3.0	11.0	2.7	3.6	18.7	40.3	16.7
SHF-Pw98	1.5	12.9	8.2	35.8	3.0	4.8	1.7	3.2	28.9	44.0	9.5
SHF-TMu12	1.7	9.0	4.4	32.6	3.0	12.0	3.7	7.4	26.1	36.9	18.7

Препарат	Распределение углерода, % от общего С										
	C=O	COO	C _{Ar} O	C _{Ar}	OCO	CHO	CH ₂ O	CH ₃ O	CH _n	ΣC _{Ar}	ΣC _{Carb}
ГК почв											
SHA-Cm94	1.5	14.3	8.7	48.1	2.0	6.0	0.8	4.6	14.2	56.8	8.8
SHA-Cmg	2.2	15.3	9.8	45.8	2.0	4.0	1.6	4.6	15.0	55.7	7.6
SHA-CtV94	3.0	15.0	11.0	43.0	3.0	7.0	2.0	3.0	13.0	54.0	12.0
SHA-CtV98	3.2	15.6	11.4	40.8	2.0	8.0	2.8	3.6	12.6	52.3	12.7
SHA-Gp94	2.0	15.0	12.0	34.0	3.0	10.0	1.0	4.0	19.0	46.0	14.0
SHA-Gw94	1.0	19.0	13.0	35.0	2.0	8.0	2.0	4.0	16.0	48.0	12.0
SHA-Gw98	2.1	17.9	7.1	30.0	2.1	10.3	2.3	6.6	21.4	37.1	14.8
SHA-Pg94	1.1	15.2	12.8	32.8	3.0	10.0	2.1	5.8	17.5	45.6	15.1
SHA-Pg96	2.0	17.0	11.0	31.0	2.0	10.0	2.0	4.0	22.0	42.0	14.0
SHA-Pg98	2.5	14.4	9.7	28.6	2.8	12.2	3.1	4.9	21.8	38.3	18.0
SHA-Pp94	1.9	15.6	11.7	32.1	4.0	9.3	2.5	5.6	17.3	43.8	15.8
SHA-Pp96	3.0	17.0	10.0	21.0	4.0	12.0	3.0	5.0	25.0	31.0	19.0
SHA-Pw94	1.0	17.0	13.0	33.0	2.0	8.0	2.5	5.5	17.0	46.0	12.5
SHA-Pw96	4.0	19.0	9.0	25.0	2.0	8.0	2.0	4.0	26.0	34.0	12.0
SHA-Pw98	2.5	17.7	7.0	26.7	4.1	10.2	3.5	5.3	23.1	33.7	17.8
SHA-PwN	2.0	15.0	13.0	30.0	3.0	11.0	2.0	5.0	19.0	43.0	16.0
ФК почв											
SFA-Pg96	3.1	18.0	13.1	28.2	2.0	11.0	2.4	4.2	17.6	41.3	15.4
SFA-Pp96	2.0	23.0	7.0	19.0	3.0	15.0	3.0	4.0	22.0	26.0	21.0
SFA-Pw96	4.0	19.5	9.8	23.5	2.0	10.0	2.5	3.5	25.1	33.3	14.5
SFA-Pw98	3.4	19.8	7.6	25.5	2.3	9.9	2.0	4.5	25.1	33.1	14.2
ГФК почвенного раствора											
SDFA-BS1	3.0	16.0	11.0	38.0	2.0	8.0	2.0	4.0	16.0	49.0	12.0
ГК углей											
CHA-AGK	0.5	16.9	10.0	47.8	0.0	0.0	1.0	3.0	20.8	57.8	1.0
CHA-ALD	1.0	15.0	13.0	43.0	0.0	0.0	1.0	6.0	21.0	56.0	1.0
CHA-RO	2.9	17.7	17.9	48.0	0.0	1.1	0.1	1.6	10.8	65.9	1.2
CHA-K1	3.1	15.2	19.3	38.0	4.8	6.9	1.0	2.7	8.9	57.3	12.7
CHA-K3	2.7	16.6	19.0	52.8	2.1	1.1	0.1	0.2	5.2	71.9	3.3
ГФК природных вод											
AHF-RI	2.0	18.3	11.8	26.2	3.0	11.0	2.1	3.9	22.0	38.1	16.1
AHF-RM	3.3	18.9	10.0	24.7	3.0	7.0	2.7	6.1	24.0	34.7	12.7
ФК природных вод											
AFA-HO10	1.0	18.0	13.0	30.0	4.0	12.0	1.0	3.5	17.5	43.0	17.0
AFA-FG1	0.8	15.9	8.5	24.6	4.0	9.4	3.4	7.2	26.1	33.1	16.8
РОВ природных вод											
ADOM-SMu4	1.9	16.9	10.7	18.9	6.0	9.0	15.0	4.1	17.7	29.6	30.0
ГФК донных отложений											
BHF-SMu4	2.0	16.5	12.5	26.0	5.0	20.0	3.0	2.0	13.0	38.5	28.0

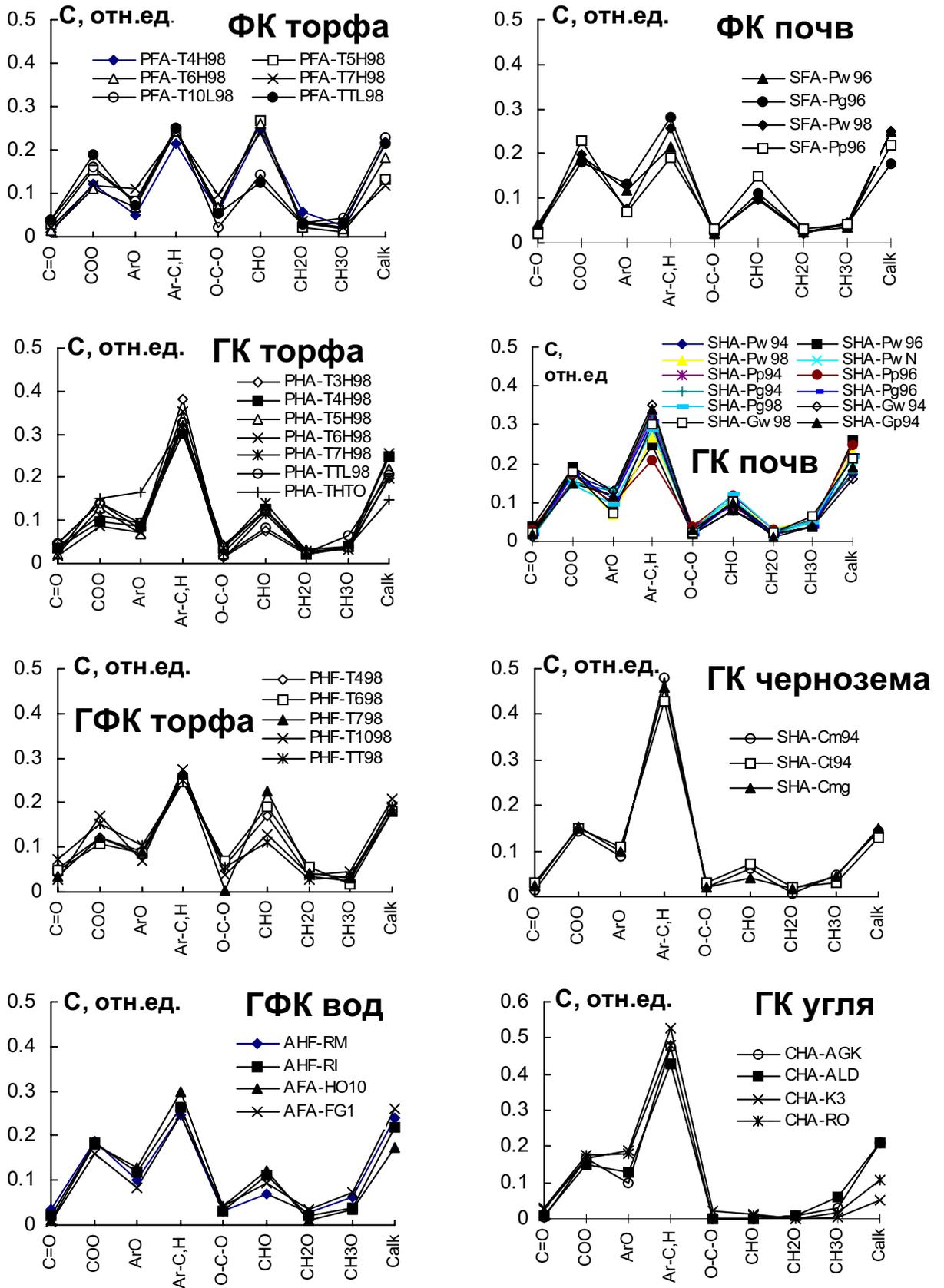


Рис. 4.4. Распределение углерода в гумусовых кислотах различного происхождения и фракционного состава.

(PFA-T10L98 и PFA-TTL98) этот показатель составляет 24-25%, будучи на уровне почвенных ФК. Тем самым ФК верхового торфа образуют второй экстремум – по содержанию углеводного углерода, и должны характеризоваться высокой гидрофильностью. Следовательно, можно сделать вывод о том, что ГК угля и ФК торфа представляют собой два граничных класса гумусовых кислот с максимальным содержанием ароматических и углеводных фрагментов, соответственно. Все остальные классы гумусовых кислот занимают по этим показателям промежуточное положение. Для ГК вод наблюдается самое высокое содержание алкильного углерода (до 25%), довольно высокие значения этой величины (до 22%) характерны и для двух других низкомолекулярных, гидрофильных классов гумусовых кислот – для ФК почв и торфа.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что в структуре ГК угля, почв и торфа преобладают каркасные (ароматические) фрагменты с относительно небольшим вкладом углеводной периферии (в ГК угля она отсутствует полностью). При этом наличие аномального углерода свидетельствует о том, что, по крайней мере, часть углеводной периферии представлена олигосахаридными фрагментами. В тоже время вклад углеводной компоненты в структуру ФК почв и, особенно, верхового торфа, значительно выше. По-видимому, именно с этим связана гораздо более высокая растворимость данных соединений, в частности, тот факт, что они остаются в растворе даже при протонировании ионогенных групп. Можно предположить, что аналогичным образом меняется и гидрофобность гумусовых кислот, достигая максимума для ГК угля и минимума – для ФК торфа.

Таким образом, в результате выполненного исследования установлены условия регистрации количественных ^{13}C ЯМР спектров гумусовых кислот. Получен обширный массив (67 препаратов) интегральных дескрипторов структурно-группового состава гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава. Выявлены закономерности строения гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава.

4.1.4 ПМР-определение водорода в составе скелетных фрагментов и функциональных групп гумусовых кислот

Водород является следующим по значимости структурообразующим элементом гумусовых кислот после углерода. Поэтому определение интегральных характеристик его распределения между фрагментами структуры гумусовых кислот могло бы существенно дополнить набор ^{13}C ЯМР дескрипторов структурно-группового состава. Для спектроскопии ПМР не существует проблемы регистрации количественных спектров. Основными препятствием для получения информации о содержании атомов Н

с данным химическим окружением в процентах от общего их содержания в препарате из ПМР спектра гумусовых кислот является, во-первых, трудность регистрации разделенных сигналов подвижных ОН-протонов функциональных групп (COOH, ArOH, AlkOH); во-вторых, определение вклада остаточных протонов дейтерорастворителя в величину общего интеграла спектра ПМР. Это связано с трудностью регистрации в ПМР-спектре сигналов протонов функциональных групп (подвижных ОН-протонов) из-за процессов быстрого (в шкале времени ЯМР) обмена между протонами функциональных групп, гигроскопической воды и остаточными протонами растворителя. Поэтому на момент постановки данных исследований использование спектроскопии ПМР для анализа гумусовых кислот ограничивалось, в основном, определением распределения водорода углеродного скелета. Соответствующие публикации подробно обсуждены в обзоре литературы. Для преодоления указанных проблем нами был проведен ПМР-эксперимент, результаты которого легли в основу ПМР-методики определения функциональных групп немодифицированных препаратов гумусовых кислот, разработанной нами впервые. Данная часть работы подробно изложена в соответствующей публикации [Ковалевский и др., 2000].

Разработку ПМР методики определения Н в составе скелетных фрагментов (С-Н протоны) и функциональных групп (ОН-протоны) основывали на трех основных предпосылках: (1) о возможности регистрации разделенных сигналов подвижных протонов в ПМР спектре гумусовых кислот в условиях медленного (в шкале времени ЯМР) обмена, (2) о возможности полного сдвига сигналов ОН-протонов в область слабого поля путем создания условий ускоренного обмена (кислотный катализ), и (3) об отсутствии Н-D обмена скелетных протонов в условиях ускоренного обмена.

В случае справедливости этих предпосылок можно предложить следующую схему совместного определения подвижных и скелетных протонов:

(1) создать условия медленного обмена (путем использования безводного апротонного растворителя), получить спектр гумусовых кислот, где сигналы COOH, ArOH и AlkOH протонов разделены;

(2) создавать условия ускоренного обмена (путем добавления сильной кислоты), получить спектр, в котором сигналы ОН-протонов сдвинуты в область слабого поля, и не перекрываются с сигналами скелетных протонов;

(3) с помощью сопоставления полученных спектров оценить соотношение ОН и СН протонов в областях перекрывания первого спектра;

(4) определить величину общего интеграла протонов гумусовых кислот путем регистрации третьего спектра этого же препарата в

дейтерорастворителе, остаточные протоны которого имеют существенно различный химсдвиг (например, NaOD/D₂O), и определить соотношение интеграла области протонов гумусовых кислот, включающей сигнал остаточных протонов растворителя, к интегралу этой области, обусловленной только протонами гумусовых кислот.

Предложенную схему реализовывали следующим образом. Замедления обмена протонов в растворе гумусовых кислот добивались за счет (1) использования апротонного растворителя, (2) удаления гигроскопической влаги из образца и растворителя, (3) изолирования безводного образца и растворителя от контакта с атмосферной влагой.

При этом в качестве апротонного растворителя использовали ДМСО-d₆. Его выбор был обусловлен двумя причинами. Во первых, максимальной растворимостью гумусовых кислот в ДМСО-d₆ по сравнению с другими органическими растворителями, что позволяет уменьшить вклад сигнала остаточных протонов растворителя в общий интеграл спектра и повысить точность интегрирования. Во-вторых, единственный сигнал остаточных протонов ДМСО, в отличие от ДМФА, в котором также растворяются гумусовые кислоты, находится в области высокого поля (2.49 м.д.), не перекрываясь с сигналами подвижных протонов. Удаление гигроскопической влаги из ДМСО-d₆ (99% D, “Изотоп”, Санкт Петербург) проводили путем кипячения с СаН₂. ДМСО-d₆ производства фирмы “Merck” изотопной чистоты 99.95% с содержанием воды не более 0.02% использовали без предварительной очистки.

Гигроскопическую влагу из образца гумусовых кислот удаляли, откачивая твердый образец в глубоком вакууме (10⁻² мм Hg) при 40 °С в течение 6 часов. Данные условия были выбраны на основании нашего опыта работы по определению влажности гумусовых кислот методом обратного набора веса (глава 3), их соблюдение позволяет практически полностью удалить гигроскопически связанную воду из образца. Во избежание контакта с атмосферной влагой растворы гумусовых кислот в ДМСО-d₆ готовили в сосудах Шленка с применением стандартной вакуумной техники. Приготовленные растворы запаивали в ЯМР ампулы и регистрировали ПМР-спектры в условиях медленного обмена (рис. 4.5а).

После съемки спектра ампулы вскрывали и на воздухе вносили CF₃COOD для создания условий ускоренного обмена. При этом количество кислоты, необходимое для полного сдвига подвижных протонов в область слабого поля, зависело от зольности проб и составляло для низкозольных проб 20 мкл, а для высокозольных – 40 мкл. Соответствующий спектр приведен на рис. 4.5б.

Для определения вклада остаточных протонов ДМСО-d₆ в общий интеграл спектра гумусовых кислот проводили регистрацию того же образца в 0.1 М NaOD/D₂O. Сигнал остаточных протонов данного растворителя (пик HDO) располагается при 4.2 м.д., не перекрываясь с сигналом CD₂H-групп ДМСО, и не маскирует α-СН протоны гумусовых кислот (рис. 4.5в).

Все ПМР-спектры гумусовых кислот различного фракционного состава и происхождения регистрировали в 0.1 М NaOD в 5 мм ампулах на ЯМР спектрометре VXR-400 (Varian), с рабочей частотой 400 МГц для ядра ¹H.

Типичный набор полученных согласно вышеизложенной схеме ПМР-спектров гумусовых кислот в ДМСО-d₆; ДМСО-d₆ с добавкой CF₃COOD и в 0.1 М NaOD/D₂O для препарата PFA T5 приведен на рис. 4.5. Отнесение сигналов дано в табл. 4.3.

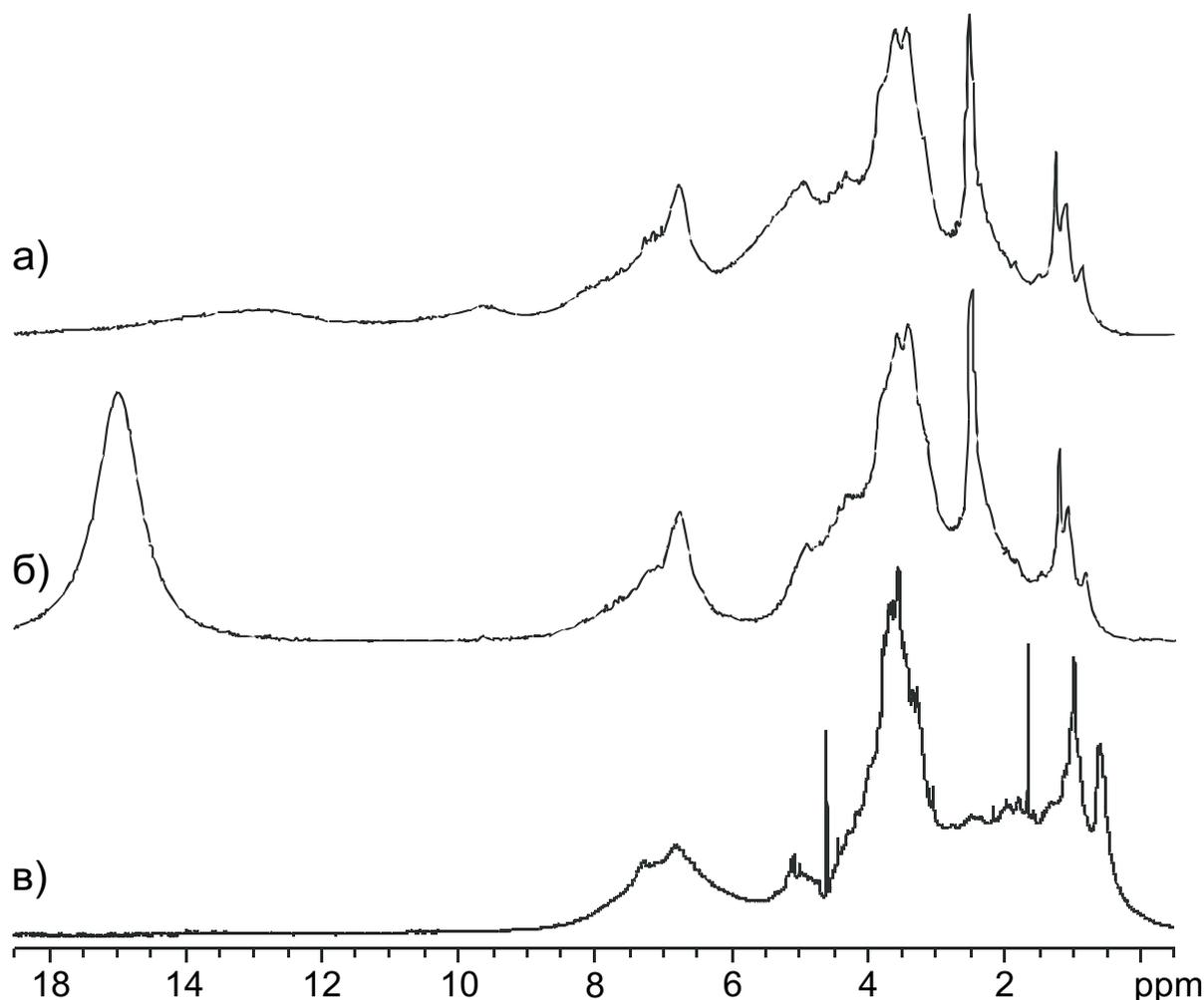


Рис. 4.5. Набор спектров ПМР для препарата PFA T5.

- а) ДМСО-d₆,
- б) ДМСО-d₆ + CF₃COOD,
- в) D₂O/NaOD.

Отнесение сигналов в спектрах ПМР гумусовых кислот 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 ₆	COOH	ArOH +ArH	AlkOH+ CHO		α-CH+DMCO	AlkH
DMCO-d ₆ + CF ₃ COOD	COOH	ArH	CHO		α-CH+DMCO	AlkH
0.1M NaOD/D ₂ O	–	ArH	HDO*	CHO*	α-CH	AlkH

* пики частично перекрываются.

В первом спектре (рис. 4.5a) отчетливо виден сигнал COOH в области 10-12 м.д., что говорит о достижении в растворе условий медленного обмена. При этом сигналы протонов фенольных гидроксидов ArOH перекрываются со скелетными ArH протонами, сигналы AlkOH протонов – со скелетными HCO протонами карбогидратных фрагментов, а пик остаточных протонов DMCO частично закрывает область α-CH-протонов. Соответствующие отнесения даны табл. 4.3.

Непосредственное наблюдение сигналов подвижных протонов возможно при помощи H, H EXSY двумерной спектроскопии. Данная методика позволяет регистрировать корреляционные сигналы связанных спиновых систем благодаря ЯЭО или химическому обмену. В спектре H, H EXSY ФК в DMCO-d₆ (рис. 4.6) благодаря замедленному обмену можно наблюдать корреляционные пики COOH и спиртовых OH в области 12.5/4.5 м.д., спиртовых и фенольных OH в области 4.5/8 м.д., а также COOH и фенольных OH при 12.5/8 м.д. Помимо этого, в приведенном спектре можно отметить выраженные узкие сигналы иона аммония при 7 м.д., также дающие корреляционные пики с подвижными протонами. Следует отметить низкую интенсивность корреляционных сигналов протонов фенольных гидроксидов, которая может свидетельствовать об отличающейся для этих групп скорости протонного обмена. Таким образом, отнесение протонов функциональных групп, приведенное в табл. 4.3 было доказано непосредственным их наблюдением в двумерном спектре. Однако такие двумерные спектры априори не количественны, поэтому для количественного определения функциональных групп требуется обработка одномерных ПМР спектров по изложенной ниже схеме.

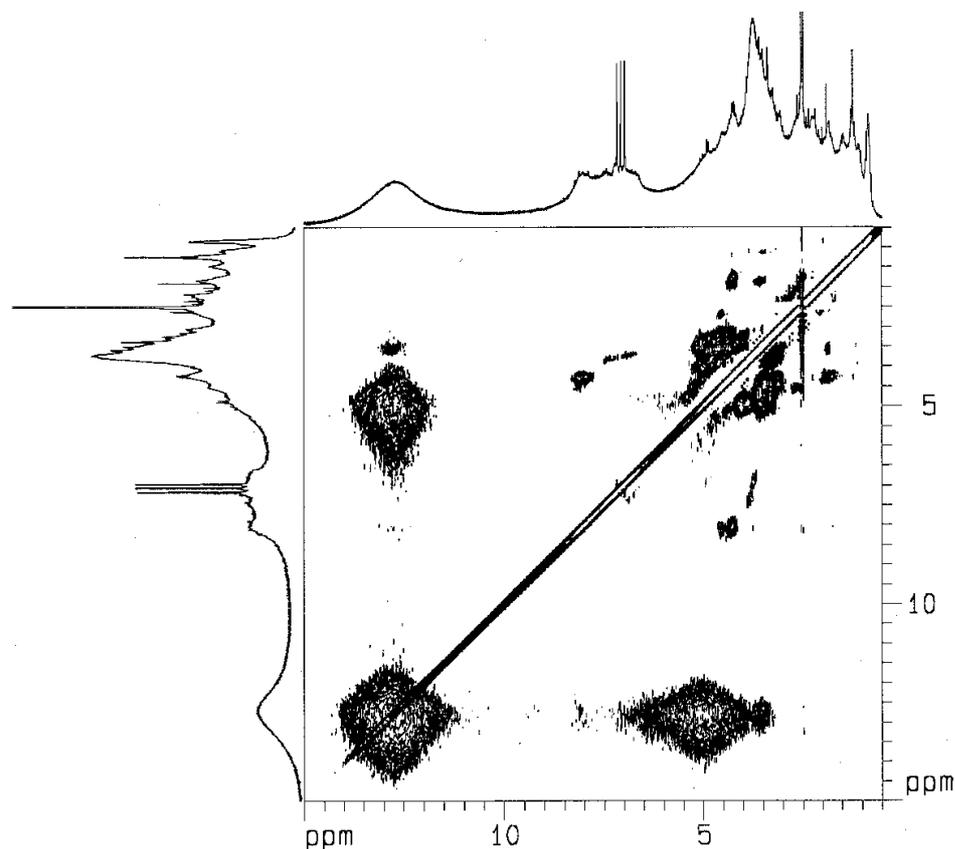


Рис. 4.6. Двумерный спектр ^1H , ^1H EXSY препарата SFA-Pw96 в DMSO-d_6 .

Характер изменения спектра при добавлении CF_3COOD (рис. 4.5б) указывает на условия ускоренного обмена: наблюдается возрастание интенсивности области 16.5-14 м.д. за счет областей 11.5-6 м.д. и 6-3.2 м.д., а также добавления остаточных протонов CF_3COOD . Пик в области 16.5-14 м.д. обусловлен протонами ArOH и AlkOH , которые в условиях ускоренного обмена дают с остаточными протонами кислоты общий пик, смещенный в слабое поле из-за наличия избытка кислоты. При условии полноты сдвига в областях 11.5-6 и 6-4.48 м.д. остаются только скелетные протоны ArH и HCO , соответственно. Интенсивность сигналов алифатических протонов (часть которых закрыта пиком остаточных протонов DMSO) остается неизменной.

В спектре гумусовых кислот в 0.1M $\text{NaOD/D}_2\text{O}$ (рис. 4.5в) максимум пика остаточных протонов растворителя (HDO) располагается при 4.8 м.д. Это позволяет наблюдать $\alpha\text{-CH}$ -протоны гумусовых кислот в области 3.2-2.05 м.д., закрытые остаточными протонами DMSO-d_6 . При этом интегральная интенсивность пика HDO (6-4.48 м.д.) включает в себя все подвижные протоны и частично закрывает область HCO -протонов.

Обработка ПМР спектров для расчета распределения водорода в структуре гумусовых кислот. Сопоставление спектров в ДМСО-d₆ и ДМСО-d₆ с добавкой CF₃COOD открывает возможность отдельного определения вклада скелетных и подвижных протонов в интегральные интенсивности интервалов 11.5-6 и 6-3.2 в спектре гумусовых кислот в ДМСО-d₆ (рис. 4.5а). 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 CF₃COOD. В качестве реперных областей можно использовать AlkH, α-CH или всю алифатическую область. С нашей точки зрения, использование для этой цели области 2.05-3.2 м.д. (α-CH) более обосновано, так как в ней находится интенсивный пик остаточных протонов ДМСО. В связи с этим результаты интегрирования указанной области меньше зависят от качества фазирования и установки нулевой линии. Формулы расчета относительных содержаний подвижных и скелетных протонов в данных областях приведены ниже.

$$\frac{\text{ArOH}}{\text{ArH}} = \frac{I_{11.5-6}^{\text{DMSO}} \cdot I_{3.2-2.05}^{\text{DMSO}+\text{CF}_3\text{COOD}}}{I_{11.5-6}^{\text{DMSO}+\text{CF}_3\text{COOD}} \cdot I_{3.2-2.05}^{\text{DMSO}}} - 1 \quad (4.1)$$

$$\frac{\text{AlkOH}}{\text{HCO}} = \frac{I_{6-3.2}^{\text{DMSO}} \cdot I_{3.2-2.05}^{\text{DMSO}+\text{CF}_3\text{COOD}}}{I_{6-3.2}^{\text{DMSO}+\text{CF}_3\text{COOD}} \cdot I_{3.2-2.05}^{\text{DMSO}}} - 1 \quad (4.2)$$

где I_{Δ}^{DMSO} и $I_{\Delta}^{\text{DMSO}+\text{CF}_3\text{COOD}}$ – относительные интенсивности диапазонов в спектрах в ДМСО-d₆ и ДМСО-d₆ + CF₃COOD, соответственно.

Применение описанной выше процедуры нормирования позволяет рассчитать соотношения ArOH/ArH и AlkOH/HCO. Однако из-за присутствия остаточных протонов ДМСО-d₆ в обоих спектрах невозможно вычислить абсолютные количества соответствующих протонов в структуре гумусовых кислот. Данную проблему можно решить путем сопоставления спектров в ДМСО-d₆ и NaOD/D₂O, вычисляя отношение интенсивностей сигналов α-CH-протонов и остаточных протонов ДМСО, перекрывающихся в первом спектре. При этом нормирование проводится на область CH-протонов, которая не изменяется при переходе от одного растворителя к другому:

$$\frac{H_{\text{DMSO}}}{\alpha\text{-CH}_n} = \frac{I_{3.2-2.05}^{\text{DMSO}} \cdot I_{2.05-0.5}^{\text{NaOD}/\text{D}_2\text{O}}}{I_{3.2-2.05}^{\text{NaOD}/\text{D}_2\text{O}} \cdot I_{2.05-0.5}^{\text{DMSO}}} - 1 \quad (4.3)$$

Описанная процедура дает возможность вычесть из спектра в ДМСО-d₆ сигнал остаточных протонов растворителя и рассчитать абсолютные величины содержаний каждого из рассмотренных типов протонов в структуре гумусовых кислот.

При использовании ДМСО-d₆ высокой изотопной чистоты, характеризующегося постоянством изотопного состава (например, использовавшегося нами ДМСО-d₆ производства фирмы Merck, 99.95 ат.%D) можно избежать необходимости регистрации спектров в NaOD/D₂O. В этом случае долю сигналов α остаточных протонов ДМСО в интегральной интенсивности спектра можно рассчитать как

$$\alpha_{\text{ДМСО}} = (m_{\text{ДМСО}} \times N_{\text{ДМСО}}) / (m_{\text{ДМСО}} \times N_{\text{ДМСО}} + m_{\text{ГФК}} \times N_{\text{ГФК}}) \quad (4.4)$$

где $m_{\text{ДМСО}}$ и $m_{\text{ГФК}}$ – масса ДМСО-d₆ и навески препарата гумусовых кислот, соответственно;

$N_{\text{ДМСО}}$ и $N_{\text{ГФК}}$ – массовое содержание протонов в ДМСО-d₆ и препарате гумусовых кислот, соответственно.

В условиях нашего эксперимента – навеска гумусовых кислот 10-15 мг с содержанием водорода 3.5-5% и количество ДМСО-d₆ 0.7 мл 99.95 ат.%D – сигнал остаточных протонов ДМСО составлял от 2 до 5% общей интенсивности спектра.

Основные этапы предложенной схемы ПМР-определения протонов в составе скелетных фрагментов и функциональных обобщены на рис. 4.7.

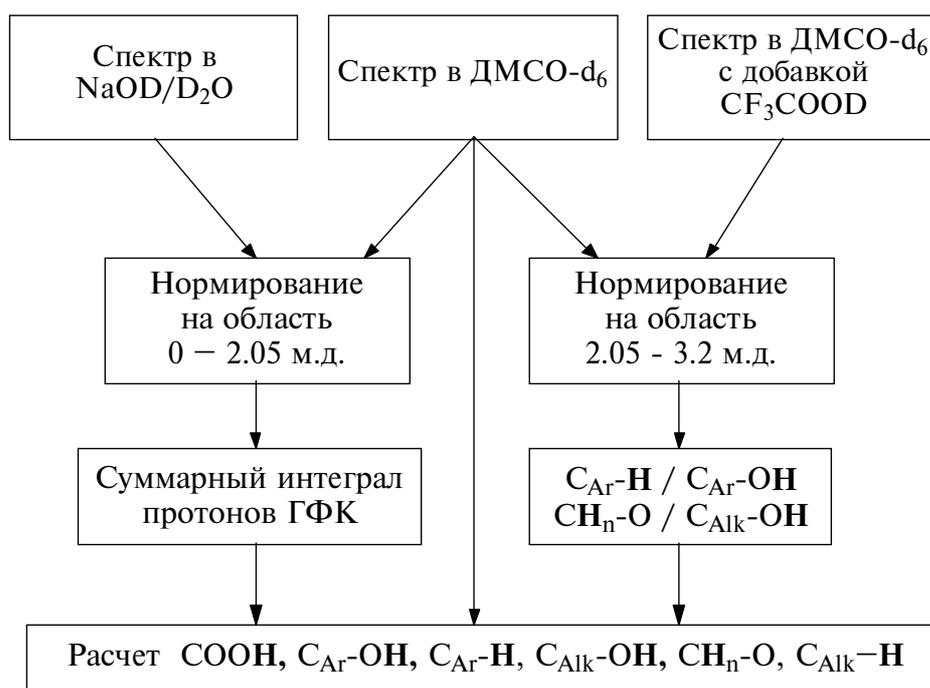


Рис. 4.7. Схема ПМР-определения протонов в составе скелетных фрагментов и функциональных групп гумусовых кислот.

До применения описанной схемы на практике для определения распределения водорода в структуре гумусовых кислот необходимо было проверить справедливость основных предпосылок, на которых базируется предложенная схема, а именно, о возможности полного разделения сигналов скелетных и подвижных протонов путем добавления избытка сильной кислоты и отсутствии H/D обмена для скелетных протонов в условиях

ускоренного обмена. Для этой цели проводили эксперименты, описанные ниже.

Проверка полноты разделения сигналов подвижных и скелетных протонов при добавлении CF_3COOD и отсутствия Н-Д обмена для скелетных протонов. Для доказательства полноты сдвига подвижных протонов при добавлении CF_3COOD были проведены эксперименты на модельных соединениях, в качестве которых были выбраны 2,4-дигидроксibenзойная кислота (содержащая COOH , ArOH и ArH протоны) и полидекстран (AlkOH и HCO).

В спектре 2,4-дигидроксibenзойной кислоты в отсутствие CF_3COOD наблюдались три сигнала подвижных протонов: при 12.2 м.д. (COOH), 11.3 м.д. (орто-ОН) и 10.3 м.д. (пара-ОН). При последовательном добавлении аликвотных частей (10 мкл) кислоты эти сигналы смещались в слабое поле, и в итоге сливались в один пик при 13.4 м.д.. 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 ОН-протонов в области 4.2-5.2 м.д., которые при добавлении CF_3COOD аналогичным образом смещались в область слабого поля. Рассчитанная доля спиртовых протонов составила 32.5%, что хорошо согласуется с расчетным значением для идеальной структуры полидекстрана (30%).

Таким образом, эксперименты на модельных соединениях подтвердили, что:

- в DMCO-d_6 протоны COOH , ArOH и AlkOH находятся в условиях медленного (в шкале времени ЯМР) обмена, что позволяет наблюдать их разделенные сигналы;
- добавление избытка CF_3COOD вызывает количественный переход сигналов подвижных протонов в слабое поле, что позволяет провести определение перекрывающихся с ними сигналов скелетных протонов.

Корректность предложенного метода разделения сигналов подвижных и скелетных протонов путем добавления избытка CF_3COOD была также проверена с помощью регистрации спектра препарата гумусовых кислот, предварительно обмененного с D_2O . При этом сопоставляли количество протонов, обменивающихся на дейтерий при взаимодействии с D_2O , и количество протонов, сигналы которых сдвигаются в слабое поле при добавлении CF_3COOD . Путем сопоставления спектров исходного и дейторообмененного препарата рассчитывали соотношения ArOH/ArH и AlkOH/HCO , которые составили 0.48 и 0.38, соответственно. Рассчитанные соотношения были сопоставлены с полученными при расчете по уравнениям (4.1, 4.2), которые для этого препарата составили 0.45 и 0.37, соответственно.

Это показывает, что при добавлении CF_3COOD к раствору гумусовых кислот в DMCO-d_6 слабый сдвиг претерпевают только сигналы подвижных протонов, а положение и интенсивность сигналов скелетных протонов гумусовых кислот не изменяются.

Количество кислоты, обеспечивающее полный сдвиг подвижных протонов в область слабого поля, определяли последовательным добавлением аликвотных частей (10 мкл) CF_3COOD к раствору препарата гумусовых кислот в DMCO-d_6 . Установлено, что для навески 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 наиболее зольных препаратов (7-12%) внесение 20 мкл CF_3COOD оказалось недостаточным. По-видимому, это связано с образованием солей с зольными компонентами гумусовых кислот. В данном случае происходит неполный сдвиг подвижных протонов в слабое поле и их общий широкий сигнал наблюдается при 8-11 м.д. Для достижения полноты сдвига дополнительно вносили 20 мкл CF_3COOD .

Таким образом, проведенные эксперименты показали справедливость исходных предпосылок о возможности полного разделения сигналов скелетных и подвижных протонов путем добавления избытка сильной кислоты, а также об отсутствии Н-Д обмена для скелетных протонов в условиях ускоренного обмена. Это позволяет использовать указанную методику для определения водорода в составе скелетных фрагментов и функциональных групп гумусовых кислот.

В качестве возможных источников ошибок при определении содержания основных типов протонов гумусовых кислот вышеописанным методом можно отметить следующие. Во-первых, определяемое содержание протонов спиртовых гидроксильных групп может быть завышено в связи с присутствием в растворителе следовых количеств воды, поскольку при регистрации спектров гумусовых кислот в DMCO-d_6 слабый сигнал таких количеств H_2O неотличим от сигналов спиртовых ОН протонов. Для предотвращения возникновения значительных погрешностей необходимо проводить оценку содержания влаги в чистом растворителе, регистрируя его спектр ПМР. Сигнал H_2O в спектре использованного в данной работе DMCO-d_6 составлял около 2% от сигнала остаточных протонов растворителя. Поскольку сигнал спиртовых ОН протонов гумусовых кислот составлял от 50 до 100% от сигнала остаточных протонов растворителя, в результате завышение содержания спиртовых ОН групп могла составлять не более 2-4% (отн). Во-вторых, присутствие в препарате гумусовых кислот ионов металлов, обусловленное неполным обессоливанием, влечет за собой недоопределение карбоксильных групп, находящихся в солевой форме. Анализ состава

зольности использовавшихся препаратов гумусовых кислот показал, что содержание металлов не превышало 0.0005 моль на моль водорода, что могло вызывать недоопределение до 6% (отн) карбоксильных групп. Следует отметить, что высокзольные препараты гумусовых кислот плохо растворяются в ДМСО-d₆, что ограничивает возможность применения разработанного метода.

С учетом указанных ограничений предложенная методика была использована для анализа 40 препаратов гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава

4.1.5 Структурно-групповой состав исследованных препаратов гумусовых кислот по данным ПМР

Результаты определения содержания протонов различных типов в 40 исследованных препаратах гумусовых кислот приведены в табл. 4.4. В этой же таблице приведено распределение скелетных протонов. Такой расчет был выполнен, чтобы получить возможность сопоставления наших данных с приводящимися в литературе для спектров в NaOD, где сигналы подвижных протонов не регистрируются. Описательные статистики данных по распределению водорода в препаратах гумусовых кислот, сгруппированных по сходному источнику происхождения и фракционному составу, приведены в Приложении 4.3.

Как следует из полученных результатов, содержание протонов карбоксильных групп в исследованных препаратах гумусовых кислот составляло от 4 до 14 % от суммарного содержания водорода. При этом ФК почв, ГФК поверхностных вод и ГК угля характеризовались более высоким содержанием карбоксилатов по сравнению с ГФК и ГК торфа и ГК почв. Содержание скелетных ароматических протонов было максимальным для ГК угля и чернозема. В расчете на общее содержание скелетных протонов (протонная ароматичность, H_{Ar}) она составляла 33-35%. Для ГФК торфа этот показатель лежал в диапазоне 13-22% и достигал минимальных величин – 9-10% для ГФК вод. Полученные результаты находятся в хорошем соответствии с приводимыми в литературе данными [Ruggiero et al., 1979; Wilson et al., 1983]. В целом можно отметить, что даже для гумусовых кислот с наибольшим содержанием ароматических структур (угли и черноземы) в составе скелетных протонов алифатические преобладают над ароматическими. Это свидетельствует о высокой замещенности углеродного скелета гумусовых кислот. Наибольшее содержание фенольных гидроксилатов (10-17%) было характерно для ГК и ГФК торфа, ненамного меньшие величины наблюдались для ГК почв, ГК угля и ГФК вод. Содержание скелетных НСО протонов было максимальным для препаратов ФК и ГФК верхового торфа. Для этих же препаратов соотношение НСО/AlkОН

составляло от 3 до 4, что указывает на доминирование полисахаридных цепей в их алифатической части. Гораздо более высокие значения НСО/AlkОН наблюдалось для ГФК, ГК и ФК низинных торфов и ГК почв, достигая максимума для ГК угля. Это свидетельствует о высоком вкладе алкоксильных (преимущественно метоксильных) групп в состав алифатической части данных препаратов гумусовых кислот. В ГК угля, все НСО протоны относятся к метоксильным группам.

Полученные данные позволяют сделать вывод о существенном различии в строении гумусовых кислот верховых и низинных торфов. В структуре гумусовых кислот верховых торфов до 60% скелетных протонов находятся в составе нетрансформированных олиго- или полисахаридных цепочек, тогда как для низинных торфов характерен высокий вклад ароматических протонов. Это указывает на большую степень трансформации углеводно-пептидного комплекса гумусовых кислот низинных торфов и, следовательно, на их более глубокую гумификацию. Особенно наглядно различие в строении углеводно-пептидного комплекса гумусовых кислот верховых и низинных торфов проявилось при изучении продуктов их гидролиза методом спектроскопии ЯМР, как будет показано ниже. Помимо различия между торфами, можно отметить весьма специфическую структуру ГК угля и черноземов, углеводный комплекс которых претерпел наибольшую деградацию – в углях он практически полностью отсутствует. В тоже время для ГФК вод характерна наибольшая степень замещения ароматических структур. Наряду с максимальной окисленностью, это указывает на наибольшую степень деградации ароматического каркаса в водных гумусовых кислотах.

Таким образом, в результате проведенных исследований разработана впервые ПМР-методика определения водорода в составе скелетных фрагментов и функциональных групп. Применение данной методики позволило существенно дополнить набор интегральных дескрипторов структурно-группового состава гумусовых кислот за счет данных по содержанию водорода в составе основных структурных фрагментов гумусовых кислот. Получен обширный массив данных (для 40 препаратов) по распределению водорода в структуре гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава.

Таблица 4.4.

Распределение водорода по скелетным фрагментам и функциональным группам гумусовых кислот и распределение водорода по структурным фрагментам углеродного скелета (N_{Ar} , N_{Carb} , N_{Alk}) ($s_r = 0.05-0.1$).

Препарат	Содержание Н, % от общего Н скелетных фрагментов и функциональных групп							Содержание Н, % от общего Н скелетных фрагментов		
	COOH	ArOH	ArH	AlkOH	HCO	AlkH	H _{Ar}	H _{Carb}	H _{Alk}	
	ГФК торфа									
PHF-T398	10	3	20	3	35	29	31	42	27	
PHF-T498	10	13	9	15	31	22	17	50	33	
PHF-T598	6	8	9	9	38	31	12	49	39	
PHF-T698	9	9	9	9	36	28	15	49	36	
PHF-T798	8	4	13	10	35	31	20	45	36	
PHF-T1098	7	8	13	9	35	28	21	46	33	
PHF-TT98	10	9	16	2	34	29	26	43	31	
PHF-T10L94	9	10	14	8	30	29	19	41	40	
PHF-T5H94	8	5	10	9	30	38	13	38	49	
PHF-T6H94	10	10	16	9	29	27	22	40	38	
PHF-T7H94	10	9	16	9	30	26	22	42	36	
PHF-TH94	8	8	13	9	32	30	17	43	40	
PHF-TTL94	9	9	13	9	29	31	18	40	42	
ГК торфа										
PHA-T398	11	17	16	3	24	29	30	34	36	
PHA-T498	7	14	14	2	31	31	23	41	36	
PHA-T598	7	11	14	5	31	31	22	41	37	

Препарат	Содержание Н, % от общего Н скелетных фрагментов и функциональных групп							Содержание Н, % от общего Н скелетных фрагментов		
	СООН	ArOH	ArH	AlkOH	HCO	AlkH	H _{Ar}	H _{Carb}	H _{Alk}	
РНА-Т698	6	6	15	4	38	31	22	45	33	
РНА-Т798	6	10	12	8	28	35	19	38	43	
РНА-Т1094	6	11	17	3	35	29	27	43	30	
РНА-ТТ98	8	10	18	4	36	32	26	41	32	
РНА-ТНТО	7	8	12	9	34	30	19	45	37	
ФК торфа										
РФА-Т398	10	4	11	3	29	38	17	37	46	
РФА-Т498	10	9	8	8	37	27	13	51	36	
РФА-Т598	9	7	12	11	38	23	20	52	28	
РФА-Т698	7	6	13	16	41	16	24	58	18	
РФА-Т798	6	5	12	11	43	23	19	55	26	
РФА-Т1098	9	2	16	5	35	34	23	41	36	
РФА-ТТ98	11	7	12	6	33	31	19	44	38	
ГК почв										
SHA-Pw94	9	7	14	9	27	34	23	36	41	
SHA-Pw96	4	9	10	21	24	31	19	37	45	
SHA-Pw98	7	9	12	5	27	39	19	35	46	
SHA-PwN	8	7	12	6	29	38	18	37	45	
SHA-Pg98	8	5	14	4	32	37	20	38	42	
SHA-Cmg	11	9	20	7	22	32	37	30	33	

Препарат	Содержание Н, % от общего Н скелетных фрагментов и функциональных групп						Содержание Н, % от общего Н скелетных фрагментов		
	COOH	ArOH	ArH	AlkOH	HCO	AlkH	H _{Ar}	H _{Carb}	H _{Alk}
	ФК почв								
SFA-Pw96	13	7	9	8	24	39	14	33	52
SFA-Pw98	10	2	11	6	29	42	16	35	49
SFA-Pg96	13	8	10	8	27	34	16	38	46
SFA-Gp98	5	4	4	11	36	40	05	45	50
SFA-Cm98	9	3	13	8	33	34	20	41	39
ГФК почв									
SHF-Co94	10	7	13	11	33	26	22	46	32
ГФК почвенного раствора									
SDFA-BS1	14	9	12	6	29	30	20	41	39
ГФК природных вод									
AHF-RM	12	5	7	8	28	40	10	37	52
AHF-RI	13	8	8	7	29	36	12	40	48
ФК природных вод									
AFA-HO10	11	9	11	9	29	31	18	41	41
AFA-FG1	11	4	7	9	28	30	12	43	45
ГК углей									
CHA-AGK	14	7	23	1	13	43	41	16	42
CHA-ALD	12	8	20	1	20	40	33	25	42

Сопоставление полученных данных ПМР и спектроскопии ЯМР ^{13}C открывает возможности для расчета содержания ряда структурных фрагментов, непосредственно не определяемых при помощи каждого из упомянутых методов в отдельности. Однако прежде чем перейти к такому расчету, нами была проверена правильность определения кислотных групп по предложенной методике путем сопоставления полученных результатов с данными независимого титриметрического метода.

4.1.6 Определение кислотных групп гумусовых кислот титриметрическими методами

Обратное и заместительное титрование. В обзоре литературы указывалось, что общепринятой методикой определения карбоксильной кислотности гумусовых кислот является Са-ацетатная, а общей кислотности – баритовая. Основными факторами, влияющими на правильность результатов, получаемых с помощью данных методик, являются (1) точность определения точки эквивалентности при титровании избытка $\text{Ba}(\text{OH})_2$ или вытесненной уксусной кислоты; (2) оптимальность соотношения реагент/субстрат; (3) полнота протекания реакции образования гуматов бария и кальция.

Выбор условий анализа, обеспечивающих правильность данных по карбоксильной и общей кислотности гумусовых кислот, полученных с использованием Са-ацетатной и баритовой методики, подробно описан в наших публикациях [Данченко и др., 1998; Данченко и др., 1995], соответственно. Поэтому укажем лишь, что такими условиями являются: (1) определение точки эквивалентности по экспериментальной кривой титрования уксусной кислоты, вытесненной из ацетата кальция, (2) использование соотношений реагент/субстрат, подавляющих протекание обратной реакции: 35-40 ммоль/г ГФК – $\text{Ba}(\text{OH})_2$; 250-400 ммоль/г ГФК – $\text{Ca}(\text{OAc})_2$. Установлено, что при использовании оптимальных соотношений реагент/субстрат по реакции с гидроксидом бария могут быть определены все карбоксильные и не менее 90% фенольных групп гумусовых кислот. Образование растворимых солей с Са не приводит к завышению величин карбоксильной кислотности, если точку эквивалентности определять по экспериментальной кривой титрования.

В указанных условиях определения по Са-ацетатной методике было проанализировано 30 препаратов гумусовых кислот, а по баритовой методике – 12 препаратов. Полученные результаты приведены в табл. 4.5 и табл. 4.6 совместно с данными потенциметрического титрования (рК-спектроскопии) и ПМР-спектроскопии.

Прямое потенциметрическое **титрование.** Для препаратов ФК и ГФК торфа и природных вод были получены кривые прямого потенциметрического титрования в бессолевых растворах.

Поддерживающий электролит не использовали из-за низкой воспроизводимости рК-спектров ГФК в растворах с высокой ионной силой. Концентрация ГФК составляла 1 г/л, что обеспечивало хорошую воспроизводимость кривых титрования и рассчитанных по ним рК-спектров. Типичные кривые прямого потенциометрического титрования ГФК приведены на рис. 4.8.

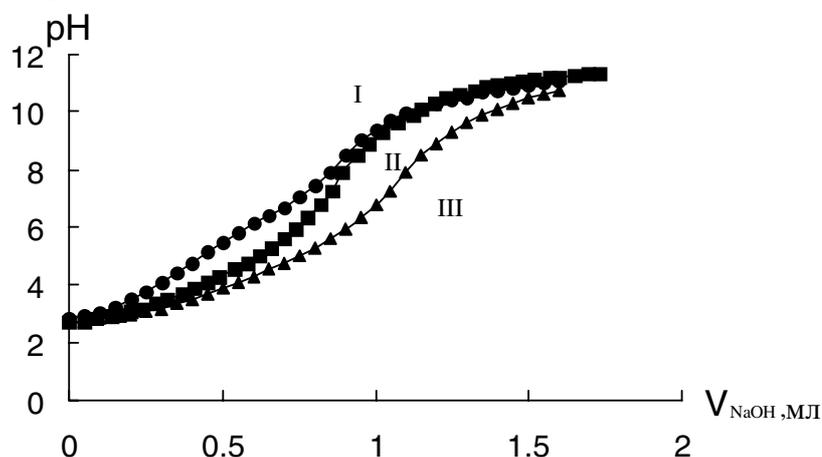


Рис. 4.8. Типичные кривые прямого потенциометрического титрования ГФК: I – торфяные, II – водные, III – почвенные.

Как видно из рис. 4.8, на кривой титрования торфяных ГФК наблюдается два слабо выраженных перегиба, соответствующих, вероятно, последовательной нейтрализации карбоксильных и фенольных групп. В то же время на кривых титрования почвенных и водных ГФК различим лишь один перегиб.

Для обработки кривых титрования использовали метод рК-спектроскопии, теоретические основы которого изложены в соответствующем разделе обзора литературы (1.2.1). Согласно указанному методу полученные титриметрические данные преобразовывали в функции распределения групп по рК (рис. 4.9) с помощью оригинальной компьютерной программы (авторы – А.В. Гармаш и А.В. Кудрявцев), основанной на решении интегрального уравнения кривой титрования с помощью линейного МНК с ограничениями на неотрицательность решений. Алгоритм расчета основан на численном решении относительно q_i (молярная доля групп с константой диссоциации K_i) системы уравнений вида (4.5), записанных для каждой точки кривой титрования.:

$$\alpha = \frac{[H^+] - [OH^-]}{c_0 V_0} (V_0 + V_T) + \frac{c_T V_T}{c_0 V_0} = \sum_{i=1}^N q_i \frac{K_i}{K_i + [H^+]}, \quad (4.5)$$

где α – степень диссоциации поликислоты,

c_0 и V_0 – концентрация и начальный объем титруемого раствора,

c_T и V_T – концентрация и добавленный объем титранта.

Как следует из приведенного уравнения, в качестве исходных данных использовали значения объема титранта и соответствующие значения pH во всех точках кривой титрования, а также начальный объем титруемого раствора V_0 и концентрацию титранта C_T . Набор значений pK от 1 до 12 с шагом 1 был задан априори. Ранее было показано, что использование для полиэлектролитов более высокого разрешения (шаг pK 0.5 и меньше) приводит к неустойчивости решения. В целом наблюдалась хорошая воспроизводимость pK-спектров, рассчитанных из данных параллельных титрований (рис. 4.9).

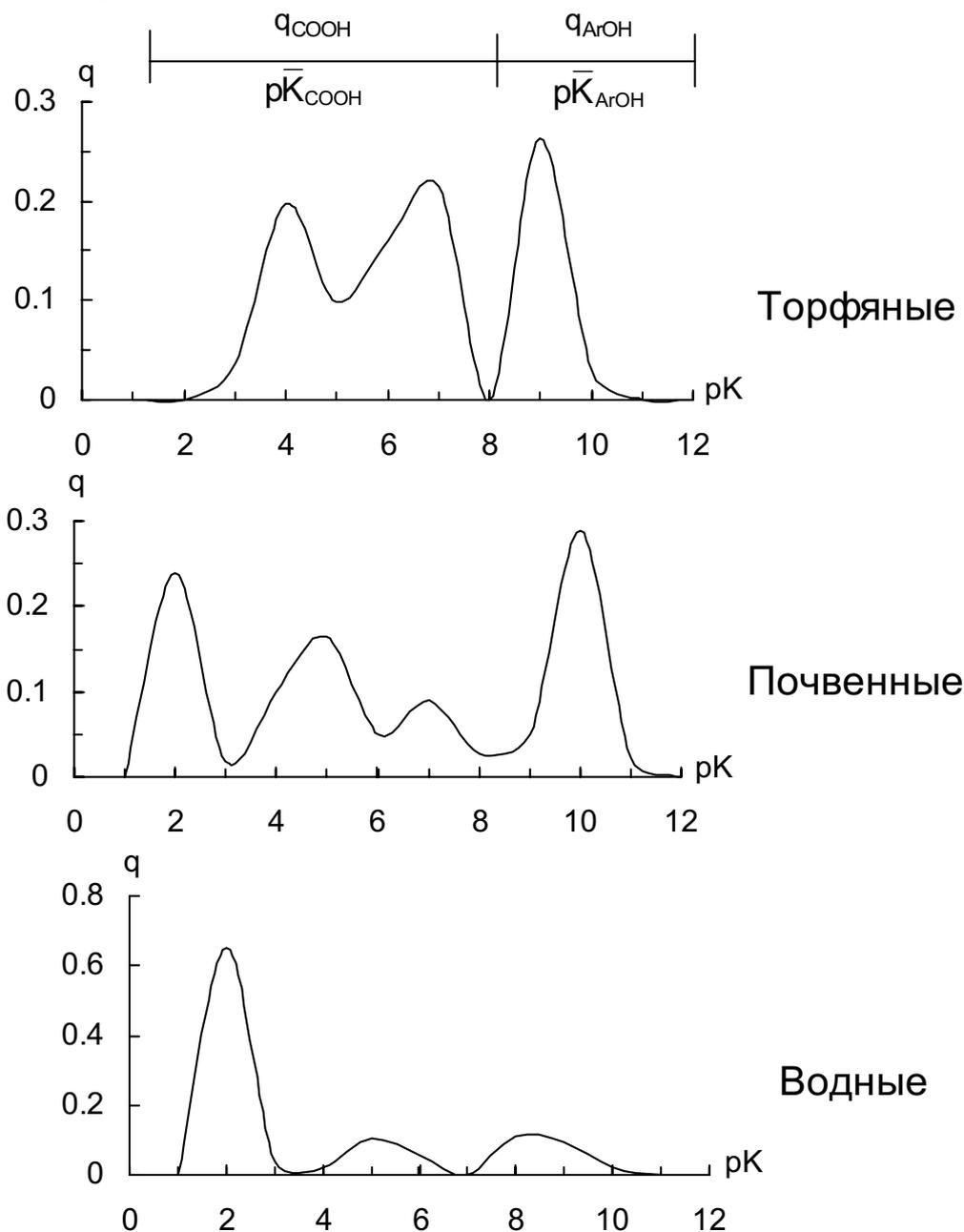


Рис. 4.9. Типичные pK-спектры препаратов ГФК различного происхождения (q – мольная доля групп с данным pK).

pK-спектры торфяных ГФК характеризовались наличием 3-4 максимумов, тогда как для всех водных образцов наблюдалось три максимума с преобладающим вкладом сильнокислотных групп (рис. 4.10). Положение первого пика для большинства образцов при pK = 2 объясняется, скорее всего, падением точности метода в определении величины pK в области значений, близких к граничным (1-2 и 11-12).

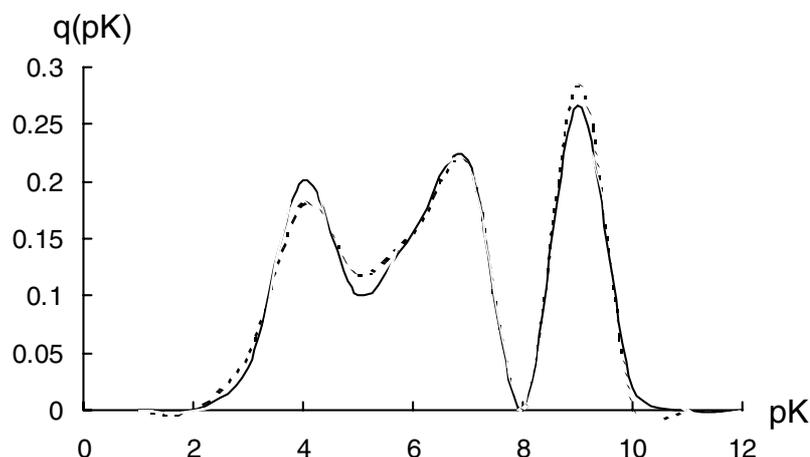


Рис.4.10. pK-спектры ГФК торфа (РНФ-Т7Н94), рассчитанные для трех повторных титрований.

В pK-спектрах практически всех исследованных препаратов гумусовых кислот наблюдалась четкая граница между диапазонами pK, характерными для карбоксильных и фенольных групп (минимум при pK = 8). На основании такого отнесения пиков из pK-спектров рассчитывали содержание карбоксильных и фенольных групп, суммируя доли всех кислотных групп, входящих в указанные интервалы. Полученные результаты приведены в табл. 4.5 и 4.6.

4.1.7 Сопоставление результатов определения кислотных групп методами ПМР-спектроскопии и титриметрии

Полученные титриметрические определения карбоксильной и общей кислотности гумусовых кислот сопоставляли с данными ПМР спектроскопии. Для этой цели на основании результатов по процентному содержанию водорода карбоксилов и фенольных гидроксидов и элементного анализа (содержание водорода в безводной пробе, ммоль/г) рассчитывали карбоксильную и общую кислотность (ммоль/г) гумусовых кислот по следующим формулам:

$$\text{COOH(ммоль/г)} = \text{COOH(ПМР, \%)} \times \text{H(эл. ан., ммоль/г)} \quad (4.6)$$

$$\text{COOH+ArOH(ммоль/г)} = [\text{COOH+ArOH(ПМР, \%)}] \times \text{H(эл. ан., ммоль/г)} \quad (4.7)$$

В таблицах 4.5 и 4.6 приведены результаты определения общего содержания кислотных групп и карбоксильных групп, соответственно, титриметрическими методами и с помощью ПМР-спектроскопии.

Таблица 4.5.

Общая кислотность препаратов гумусовых кислот по данным различных титриметрических методов и ПМР спектроскопии (n = 3, P = 0.95)

Препарат	Общая кислотность (ммоль/г)		
	Ва	pK	ПМР
PHF-T5H94	10±1	5.1±0.3	5.9±0.9
PHF-T6H94	7.0±0.6	3.6±0.1	8.7±1.3
PHF-T7H94	8.2±0.6	5.0±0.3	8.4±1.2
PHF-T10L94	9±1	8.7±0.4	7.8±1.1
PHF-TНН94	7.9±0.4	6.0±0.1	6.6±1.0
PHF-TTL94	9.4±0.3	5.0±0.3	7.1±1.0
SHF-Co94	7.2±0.4	5.8±0.3	7.3±1.3
AHF-RMX2	10.9±0.6	9.95±0.4	7.0±1.1

Таблица 4.6.

Карбоксильная кислотность препаратов гумусовых кислот по данным различных титриметрических методов и ПМР спектроскопии (n = 3, P = 0.95)

Препарат	Содержание COOH, ммоль/г			Препарат	Содержание COOH, ммоль/г	
	Ca(AcO) ₂	pK-спектр	ПМР		Ca(AcO) ₂	ПМР
PHF-T5H94	3.1±0.3	3.0±0.2	3.6±0.5	PHF-T3L98	4±0.3	4.4±0.7
PHF-T6H94	3.1±0.1	2.7±0.2	4.4±0.7	PHF-T4H98	3.5±0.3	4.3±0.6
PHF-T7H94	2.9±0.1	3.0±0.3	4.4±0.7	PHF-T5H98	4.6±0.4	2.7±0.4
PHF-T10L94	3.1±0.2	7.0±0.5	3.5±0.5	PHF-T6H98	3.9±0.3	3.7±0.6
PHF-TНН94	4.0±0.2	4.0±0.2	3.2±0.5	PHA-T3L98	4.2±0.3	4.7±0.7
PHF-TTL94	4.0±0.4	4.1±0.2	3.4±0.5	PHA-T4H98	2.8±0.2	3.0±0.5
SHF-Co94	3.9±0.3	3.9±0.2	4.9±0.7	PHA-T5H98	2.8±0.2	3.1±0.5
AHF-RMX2	7.62±0.6	7.71±0.8	5.3±0.8	PHA-T6H98	3.2±0.3	2.6±0.4

Как видно из таблицы 4.6, общее содержание кислотных групп в исследованных образцах ГФК торфа, вод и почв лежит в пределах 6-11 ммоль/г, содержание карбоксильных групп составляет 3-7 ммоль/г, что

соответствует диапазонам величин, обычно приводимым в литературе (табл. 1.3). Сопоставление данных различных методов показывает, что общая кислотность, рассчитанная из рК-спектров, существенно ниже определяемой по баритовой методике. Между ними наблюдается значимое статистическое различие. Вероятно, это связано с присущим рК-спектроскопии ограничением – невозможностью определения кислотных групп с $pK \geq 11$. В тоже время между ПМР-определениями общей и карбоксильной кислотности и данными соответствующих определений по баритовой и кальциево-ацетатной методике статистических различий обнаружено не было. Проверка проводилась попарно, по t-критерию при $P = 0.95$.

Полученные данные позволяют сделать вывод о правильности определения кислотных групп гумусовых кислот с помощью предложенной ПМР-методики.

4.1.8 Расчет фрагментного состава и его применение для характеристики закономерностей строения гумусовых кислот

Сопоставление ^{13}C ЯМР и ПМР данных по распределению углерода и водорода в структуре гумусовых кислот позволяет проверить расчет содержания фрагментов, непосредственно не определяемых из соответствующих спектров. Набор фрагментов можно расширить за счет идентификации заместителя в углеродсодержащем фрагменте. В результате можно рассчитать содержание следующих фрагментов: карбонильные ($\text{C}_{\text{C=O}}$), карбоксильные (C_{COOH}) и сложноэфирные (C_{COOR}) группы; атомы углерода ароматических колец с соответствующими заместителями: незамещенные ($\text{C}_{\text{Ar-H}}$), 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 (C_{OCH_3}), ацетальные фрагменты (C_{OCO}) и несвязанные с гетероатомами алифатические фрагменты (C_{CH_n}).

Содержание $\text{C}_{\text{C=O}}$, C_{OCO} , и C_{CH_n} рассчитывали непосредственно из данных ^{13}C ЯМР спектроскопии. Содержание остальных фрагментов было рассчитано из сопоставления данных спектроскопии ^{13}C и ^1H ЯМР при использовании соотношения Н/С из результатов элементного анализа согласно уравнениям (4.10-4.13). В связи с тем, что одномерная ЯМР ^{13}C и ПМР спектроскопия не позволяет достоверно различить кислород- и азотсодержащие функциональные группы, поэтому все гетероатомы в структуре гумусовых кислот принимали за кислород, т.е. амиды рассматривали совместно со сложноэфирными группами, алифатические амины – со спиртами, и т.д.

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

$$C_{\text{COOH}} = N_{\text{COOH (ПМР)}} / H/C_{(\text{эл.ан.})} \quad (4.8)$$

$$C_{\text{COOR}} = (C_{\text{COOR+COOH}})_{(\text{C-13})} - N_{\text{COOH (ПМР)}} / H/C_{(\text{эл.ан.})} \quad (4.9)$$

Аналогичный расчет может быть выполнен для определения содержания ОН- и OR-замещенных ароматических атомов углерода:

$$C_{\text{ArOH}} = N_{\text{ArOH (ПМР)}} / H/C_{(\text{эл.ан.})} \quad (4.10)$$

$$C_{\text{ArOR}} = C_{\text{ArO (C-13)}} - N_{\text{ArOH (ПМР)}} / H/C_{(\text{эл.ан.})} \quad (4.11)$$

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

$$C_{\text{ArH}} = N_{\text{ArH (ПМР)}} / H/C_{(\text{эл.ан.})} \quad (4.12)$$

$$C_{\text{ArC}} = C_{\text{Ar(C-13)}} - N_{\text{ArH (ПМР)}} / H/C_{(\text{эл.ан.})} \quad (4.13)$$

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

$$\begin{aligned} C_{\text{СНОН}} + C_{\text{СН2ОН}} + C_{\text{ОСН3}} &= C_{\text{СНО(C-13)}} \\ 2/5 C_{\text{СНОН}} + C_{\text{СН2ОН}} &= \text{AlkOH}_{(\text{ПМР})} / H/C_{(\text{эл.ан.})} \end{aligned} \quad (4.14)$$

$$C_{\text{СНОН}} + 2C_{\text{СН2ОН}} + 3C_{\text{ОСН3}} = \text{СНО}_{(\text{ПМР})} / H/C_{(\text{эл.ан.})} - C_{\text{СОСО(C-13)}}$$

Результаты расчета по уравнениям (4.14) в целом удовлетворительно согласуются с результатами интегрирования диапазонов 50-58, 58-64 и 64-90 м.д. ^{13}C ЯМР спектров, где находятся сигналы соответствующих фрагментов.

Также были рассчитаны атомные соотношения Н/С в ароматических, алифатических и карбогидратных фрагментах, позволяющие определить среднюю степень замещения ароматических колец и разветвленности алифатической части молекул. Результаты расчета приведены в Приложении 4.4.

$$\begin{aligned} (H/C)_{\text{Ar}} &= \text{ArH}_{(\text{ПМР})} / (C_{\text{Ar(C-13)}} + C_{\text{ArO(C-13)}}) / H/C_{(\text{эл.ан.})} \\ (H/C)_{\text{Alk}} &= (\text{AlkH} + \alpha\text{-СН})_{(\text{ПМР})} / C_{\text{СН(C-13)}} / H/C_{(\text{эл.ан.})} \\ (H/C)_{\text{Alk-O}} &= \text{СНО}_{(\text{ПМР})} / C_{\text{СНО(C-13)}} / H/C_{(\text{эл.ан.})} \end{aligned} \quad (4.15)$$

Рассчитанные содержания структурных фрагментов для разных препаратов гумусовых кислот изменяются в достаточно широком диапазоне. Однако можно отметить ряд закономерностей, проявляющихся при анализе фрагментного состава препаратов, сгруппированных по сходному источнику происхождения и фракционному составу. Максимальное содержание карбоксильных групп характерно для препаратов ФК почв, ГФК природных вод и ГК угля. Эти же препараты характеризуются более низким содержанием C_{COOR} -фрагментов. При этом наблюдается значимая при $r = 0.99$ 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.

Все исследованные препараты содержат от 2 до 6% метоксильных групп. Наиболее вероятным источником таких групп являются остатки лигнинов. Однако при сопоставлении C_{OCH_3} и C_{ArOR} не удалось получить значимой корреляции между этими параметрами. 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_{CHO} – углерода в гумусовых кислотах. Для препаратов дерново-подзолистых почв и торфа содержание карбогидратных C_{CHOH} , ацетальных C_{OCO} и первичных спиртовых C_{CH_2OH} 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_{CHOH} и C_{CH_2OH} фрагментов в этих препаратах к полисахаридным циклам. Напротив, для препаратов ГФК природных вод до 50% спиртовых групп не относятся к полисахаридам.

В структуре ГК угля практически весь углерод C_{CHO} -фрагментов относится к метоксильным группам. 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 периферических 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 ГК почв до 0.35 в случае ГК угля. От 30 до 44% атомов углерода ароматических колец являются С-замещенными, а 17-35% – О-замещенными. Таким образом, характер замещения “среднего” ароматического кольца для исследованных препаратов можно описать как: 2.6 С-замещенных, 1.7 О-замещенных и 1.7 незамещенных атомов углерода.

Самыми высокими значениями показателя окисленности ароматического ядра $C_{ArO}/(C_{ArH}+C_{ArC}+C_{ArO})$ характеризуются препараты ГФК природных вод и ГК почв, меньшая окисленность ароматического каркаса наблюдается для ГФК торфа и ГК почв, а наименьшие значения этого параметра достигаются для препаратов ГК бурого угля и черноземов. В этом же ряду снижается отношение содержания полисахаридных C_S и ароматических фрагментов. Между указанными показателями наблюдается значимая при $p = 0.99$ корреляция ($r^2 = 0.68$). Соотношение C_{COOH}/C_{COOR} , характеризующее глубину протекания гидролитических процессов резко различается для 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.

Характер изменения приведенных параметров указывает на то, что в ГК черноземов происходит увеличение содержания ароматических фрагментов в результате интенсивной деградации полисахаридно-пептидного комплекса, которое сопровождается возрастанием окисленности ароматических колец и доли свободных функциональных групп (за счет гидролиза сложных эфиров). Параллельное протекание процессов отщепления полисахаридов и увеличения соотношения $C_{\text{COOH}}/C_{\text{COOR}}$ подтверждает высказанное в работе [Орлов, 1990] предположение, что полисахаридные фрагменты связаны с ароматической частью ГФК сложноэфирными связями. ГК угля, по-видимому, представляют собой предельный случай конденсированности ароматического скелета гумусовых кислот. Они характеризуются практически полным отсутствием углеводной периферии и самым высоким среди исследованных препаратов соотношением COOH/COOR .

ГФК природных вод и близкие им по структуре ФК почв представляют собой наиболее окисленные соединения. Для них наблюдается минимальное содержание незамещенного водорода ароматических структур, а доля свободных карбоксильных и фенольных групп значительно превышает аналогичные параметры для ГК почв. Окисление затрагивает и алифатическую часть молекул, результатом чего является присутствие значительного количества спиртовых гидроксильных, не относящихся к полисахаридным фрагментам. По-видимому, эти вещества представляют собой отщепившиеся при гидролизе окисленные ароматические фрагменты ГК с остатками глубоко трансформированных углеводных фрагментов.

4.2 Двумерная корреляционная спектроскопия ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C

Применение одномерной спектроскопии ЯМР для исследования структуры гумусовых кислот основано на выделении групп сигналов атомов со сходным химическим окружением. Это не позволяет охарактеризовать различия между атомами, входящими в такие группы, и дать однозначное отнесение их сигналов из-за сильного перекрывания. Двумерная спектроскопия ЯМР, основанная на регистрации попарных взаимодействий (спин-спиновых и диполь-дипольных) между магнитными ядрами, открывает возможности для проведения такого анализа. Основой двумерной ЯМР-спектроскопии является введение второй частотной переменной и получение набора спектров при изменении последней. Информация о спин-спиновом взаимодействии электронов 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. Тем самым двумерная спектроскопия существенно расширяет представление о молекулярной структуре исследуемого органического соединения.

Двумерная спектроскопия ЯМР широко применяется для анализа биологических объектов, однако использованию этого метода для исследования гумусовых кислот посвящены лишь единичные публикации [Buddrus et al., 1998; Schmitt-Kopplin et al., 1998; Fan et al., 2000]. В нашей работе для исследования строения гумусовых кислот и получения детальной характеристики их структурно-группового состава использовали корреляционную спектроскопию химических сдвигов в гетероядерном (^1H , ^{13}C) и гомоядерном (^1H , ^1H) вариантах. Приводимые в работе результаты получены в процессе многолетней совместной работы с Др. Херткорном из Института Экологической Химии Национального Научно-Исследовательского Центра GSF, Германия и подробно изложены в соответствующих совместных публикациях [Hertkorn et al., 2000a, Hertkorn et al., 2000b].

4.2.1 Общая характеристика использованных в работе двумерных гомо- и гетероядерных ЯМР-экспериментов

Двумерные гомоядерные протонные ЯМР последовательности очень чувствительны, но характеризуются длительным временем переноса поляризации (TOCSY: $1/2J$; COSY: $1/J$) из-за малых величин геминальных и вицинальных Н,Н констант спин-спинового взаимодействия ($J < 10$ Гц). Это приводит к потере (исчезновению) сигналов в случае быстрой релаксации ядер. Поэтому для регистрации ^1H , ^1H COSY спектров существенно, чтобы КССВ коррелирующих ядер была не меньше спектральной ширины линии их сигналов. Вследствие замедленного молекулярного движения молекул гумусовых кислот ширина спектральных линий протонов, как правило, велика, что ограничивает применение данного метода для исследования структуры гумусовых кислот.

Импульсная последовательность ^1H , ^1H TOCSY основана на изотропном переносе синхронизированной по фазе намагниченности ядер в течение периода смешивания. При соответствующем подборе времени смешивания можно получать корреляционные сигналы ядер, удаленных на 3-5 химических связей. Типичные спектры TOCSY гумусовых кислот, как правило, имеют гораздо больше пиков в недиагональной области, чем соответствующие COSY спектры. Тем не менее, стандартные COSY-спектры, в которых проявляются только геминально или вицинально спин-связанные пары, позволяют достичь лучшего разрешения кросс-пиков в области очень

интенсивного перекрытия – в т.н. “карбогидратном регионе”. Кроме того, на COSY спектрах отчетливо видны вицинальные взаимодействия ароматических протонов.

Двумерные Н-С корреляционные импульсные последовательности ($^1J(\text{CH}) = 150$ Гц) позволяют достичь оптимальной амплитуды переноса намагниченности за более короткое время – 5-20 мс (HSQC: 10.9 мс), что более предпочтительно с точки зрения средних времен релаксации T_1 и T_2 гумусовых кислот. В корреляционных ^1H , ^{13}C ЯМР спектрах (например, HSQC, HMQC) наличие кросс-пиков является однозначным индикатором непосредственно связанных протон-углеродных пар. При этом разнесение сигналов по частотам ^1H и ^{13}C позволяет идентифицировать отдельные структурные группы в области их интенсивного перекрытия в одномерных спектрах. Примером такого диапазона может служить так называемая “карбогидратная” область в ПМР спектре гумусовых кислот, где находятся сигналы углеводов, боковых цепей лигнинов, пептидов, сложных и простых эфиров. Этой области в ^{13}C спектре соответствует гораздо более широкий диапазон частот, что позволяет “разнести” различные структурные группы по характеристическим наборам $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ частот, регистрируя ^1H , ^{13}C HSQC ЯМР спектры. Так, в указанном диапазоне отчетливо выделяются резонансы α -СН пептидов, для которых характерно значительное дезэкранирование протонов при экранированности ядер углерода. Между СН- α пептидов и резонансами СНО углеводов довольно часто появляются сигналы лигнинных боковых цепей (фенилпропаноидные фрагменты). Резонансы лигнинных метоксилов характеризуются средним сдвигом по протонам, но сдвинуты в область сильного поля по углероду. Отчетливо проявляются α -СН группы аминокислот, которые сильно экранированы как по ^1H , так и по ^{13}C . Гетероциклические азотсодержащие фрагменты дают весьма характерный кластер сигналов в области низких частот по ^1H и ^{13}C . Алкилированные и конденсированные терпеноидные структуры характеризуются дезэкранированием по ^{13}C , но сохраняют сильнополюсные протонные химсдвиги. Весьма специфические кластеры сигналов образуют таннины (С-С связь с кольцом при 4.8/37 и С5 в кольце – 5.9/96 м.д.), метиловые эфиры (3.8/55 м.д.), аномерные фрагменты углеводов (105-96/5-4), суберин (2.55/45), и т.д.

Регистрация двумерных спектров ЯМР проводилась в 5 мм ампулах на спектрометре фирмы “Bruker” с рабочей частотой 500 МГц для ядер ^1H в Институте Экологической Химии GSF, Мюнхен, ФРГ. Двумерные эксперименты включали в себя стандартные импульсные последовательности cosygsmf, mlevgstp19, noesygstp, invietgs и invigstp, входящие в состав пакета программного обеспечения фирмы “Bruker”. Обработку двумерных спектров

ЯМР проводили на рабочей станции “Silicon Graphics” с использованием программы XWINNMR.

Гомоядерные (H,H COSY – COrrelation SpectroscopY, H-H TOCSY – TOtal Correlation SpectroscopY) и гетероядерные (^1H , ^{13}C HSQC – Heteronuclear Single Quantum Correlation spectroscopy) корреляционные спектры гумусовых кислот приведены на рис. 4.10-4.12 на примере ФК и ГК верхового торфа (PFA-T5H98 и PNA-T5H98).

4.2.2 ^1H , ^1H COSY-спектры

^1H , ^1H COSY-спектры ФК и ГК верхового торфа приведены на рис 4.11. Для спектра ФК характерно наличие большего количества кросс-пиков, чем для ГК. За небольшим исключением все кросс-пики, которые наблюдаются в спектрах ГК, встречаются и в ФК. Основная доля спектральной интенсивности сосредоточена в области химсдвигов, указанных в табл. 4.7.

Таблица 4.7

Отнесения в COSY спектрах гумусовых кислот

Диапазон	F2 (м.д.)	F1 (м.д.)	Структурная группа	Отнесение
A _C	4.2-3.0	1.4-0.9	-C-CH-CH-O-	дезоксисахара, сложные и простые эфиры
B _C	3.0-1.7	3.0-1.7	-C _f -CH-C _f H-C-	протоны в α положении к функциональной группе
C _{C1}	5.0-4.3	4.3-3.0	-(C=O)NH-CH-CH-C _f	Hα-Hβ пептидов (β положение к функциональной группе -O-CH-CH-C _f ,O или γ к гетероатому)
C _{C2}	5.0-4.3	3.0-1.7	-(C=O)NH-CH-CH-C	Hα-Hβ пептидов (-O-CH-CH-C _f ,O)
D1	4.2-3.0	4.2-3.0	-O-CH-C(O)H-O-	циклические углеводы без аномеров
D2	5.7-3.0	5.7-3.0	-O-CH-C(O)H-O-	циклические углеводы с аномерами
E	8.0-6.5	8.0-6.5	-C _{ar} H-C _{ar} H-	орто-протоны в ароматическом кольце

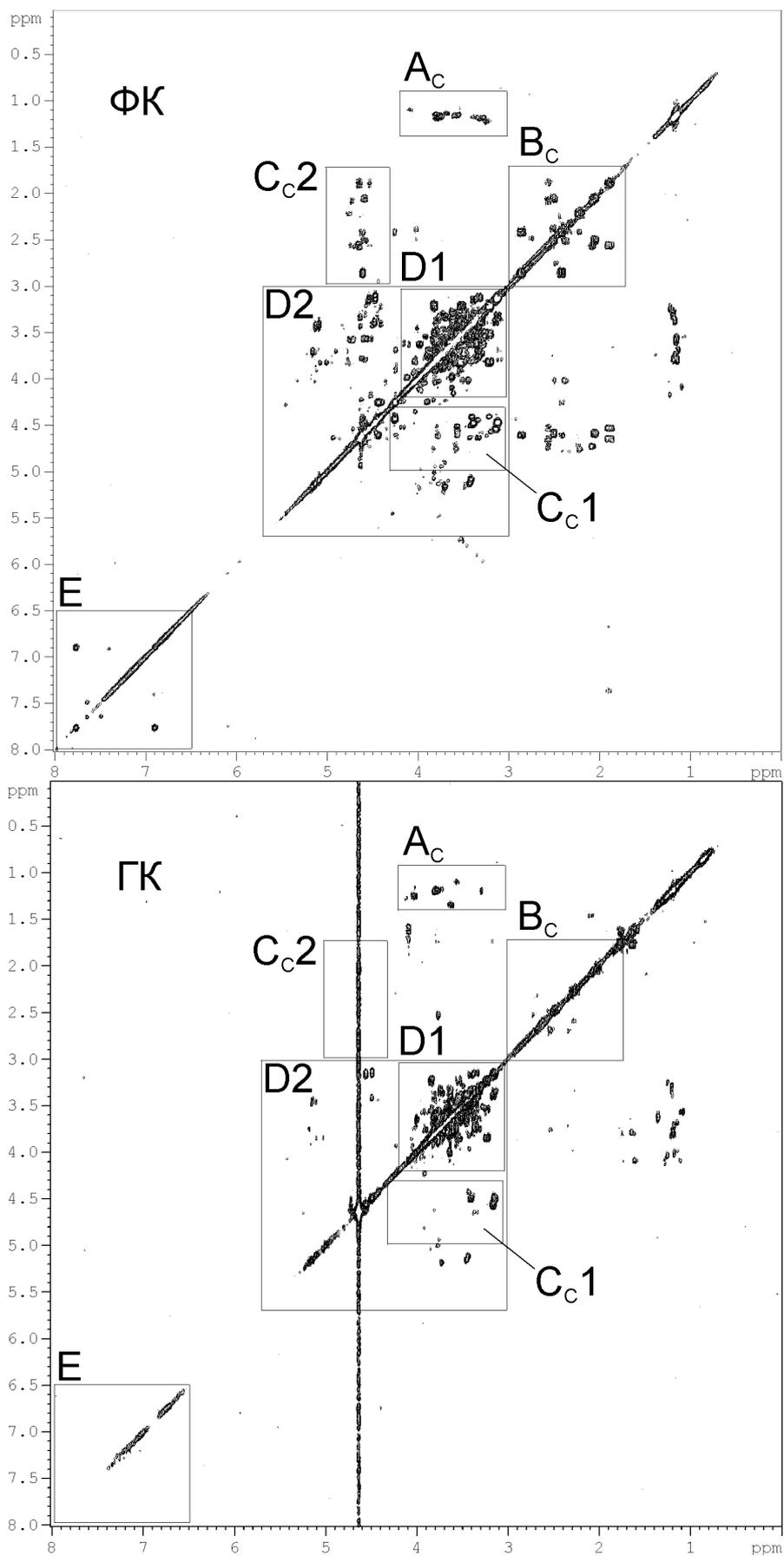


Рис. 4.11. Двумерные $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY спектры ФК и ГК верхового торфа (РНА-Т5Н98 и РФА-Т5Н98).

Для ФК характерно наличие интенсивных кросс-пиков в секторе C_C (рис. 4.11), которые почти не наблюдаются в спектрах ГК. Эти кросс-пики появляются в том же регионе, что и резонансы $N\alpha$ - $N\beta$ пептидов, но принципиально от них отличаются по характеру образуемого рисунка: область C_{C2} смещена в более сильное поле по оси F_2 по сравнению с C_{C1} , тогда как для кросс-пиков пептидов характерна противоположная тенденция: кросс-пики в области C_{C1} смещены в более сильное поле на 0.4 м.д., а кросс пики в области C_{C2} – в более слабое поле на 0.25 м.д. Как следствие, указанные кросс-пики в спектре гумусовых кислот можно отнести к сильно окисленным боковым цепям сложных или простых эфиров. Корреляции в области C_{C1} обусловлены протонами в α -положении к карбонильной или другим электроотрицательным группам, в C_{C2} области – протонами в α -положении к гетероатому. Интенсивные кросс-пики в области D_{C1} и D_{C2} , относящиеся к циклическим сахарам, характерны как для ФК, так и ГК.

Несмотря на то, что для типичных гумусовых кислот характерна высокая степень замещения ароматического кольца (в среднем 4-5 заместителей на кольцо), в области E_C спектра COSY наблюдается меньше кросс-пиков от протонов заместителей в вицинальном положении к ароматическим протонам (1;1,2;1,3;1,4;1,2,3;1,2,4;1,2,5 и 1,2,3,4), чем в фенолах растительного происхождения [Simpson et al., 1997]. В целом для ФК наблюдаются лучшие релаксационные характеристики по сравнению с ГК, что, вероятно, связано с их меньшими размерами.

В области A_C группа кросс-пиков наблюдается только для ГК, а для ФК – нет. Их можно отнести к алкилированным сахарам, которые присутствуют в структуре ГК и не встречаются в ФК.

4.2.3 $^1H, ^1H$ TOCSY спектры

TOCSY спектры исследуемых ГК и ФК торфа приведены на рис. 4.12. Для спектров характерно большее количество кросс-пиков, чем для соответствующих COSY спектров. В пределах области A_T появляются кросс-пики, невидимые в COSY-спектрах, которые указывают на наличие порядка десяти корреляций между резонансами терминальных метилов ($\delta = 0.81$ м.д.) и алифатическими протонами. Дополнительные кросс-пики появляются также в области B_T (табл. 4.8). Наличие этих кросс-пиков обусловлено алифатическими цепями промежуточной длины (C3-C5), несущими функциональную группу.

Дополнительные (по сравнению с COSY) области химсдвигов,
проявляющиеся в TOCSY спектрах гумусовых кислот

Диапазон	F2 (м.д.)	F1 (м.д.)	Структурная группа	Отнесение
A _T	2.4-0.7	2.4-0.7	-C-CH-CH-C _{al} C-CH-CH-C _f	интактные алифатические цепи
B _{T1}	4.3-3.3	2.6-1.4	-N,O-CH-CH-C _{al}	алифатические заместители у гетероатома
B _{T2}	4.3-3.3	2.0-1.4	-N,O-CH-CH-C _f	алифатические заместители у гетероатома, несущие функциональную группу
C _{T1}	4.4-4.0	2.6-1.4	-(C=O)NH-CH-CH-C _{al}	Ha-Hb пептидов
C _{T2}	4.8-4.2	2.4-3.8	-(C=O)NH-CH-CH-C _f	Ha-Hb пептидов

В противоположность COSY спектрам, в TOCSY спектрах наблюдается образование “хребтов” из кросс-пиков с одинаковыми частотами по осям F1 и F2, что указывает на наличие протяженных спиновых систем в исследуемых соединениях. В среднем каждый хребет образуется слиянием 3-4 кросс-пиков, что позволяет отнести их к алифатическим цепям, замещенным функциональными группами, имеющими также в качестве заместителя гетероатом с терминальной алифатической (B_{T1}) или функционализованной алифатической (B_{T2}) группой.

В области C_T различимы серии кросс-пиков пептидного происхождения. Область C_{T2} вырождена по оси F2 невозбужденным резонансом NaOD (с узкой спектральной шириной), который ясно виден по оси F1 при $\delta = 4.4$ м.д. Положение пептидных кросс-пиков весьма отличается от находящихся в области C_{C1} и C_{C2} в COSY спектрах ФК.

По сравнению с COSY, в TOCSY спектрах ГК наблюдается гораздо больше C1-C2 корреляций (> 30 вместо < 10) аномерных положений углеводов. Для ФК наблюдается аналогичная картина. Интенсивность этих кросс-пиков возрастает при увеличении времени смешивания от 35 до 75 и далее до 100 мс. Это указывает на то, что многие из данных корреляций характеризуются малыми вицинальными КССВ.

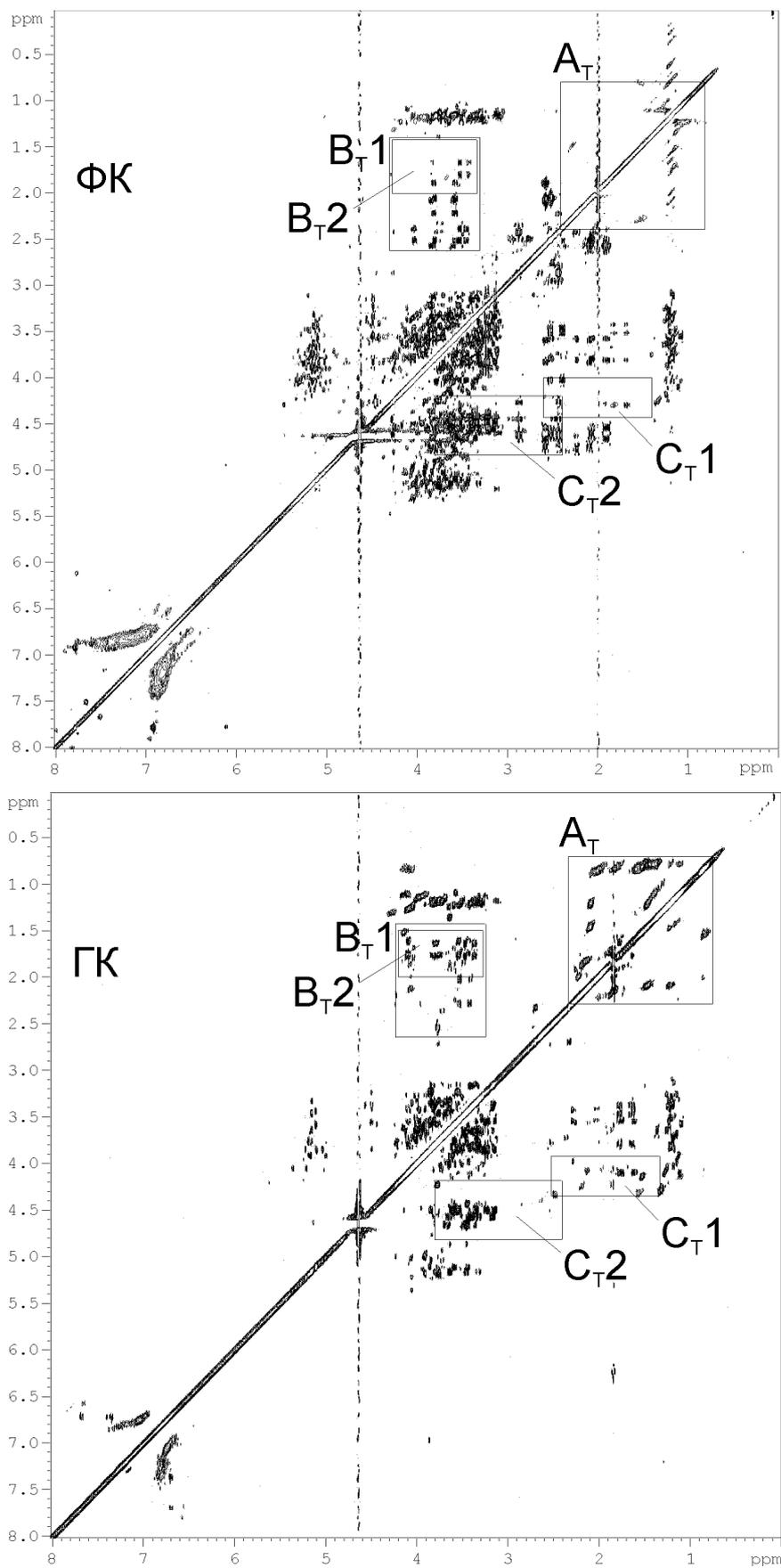


Рис. 4.12. Двумерные ^1H , ^1H TOCSY спектры ГК (а) и ФК (б) верхового торфа (РНА-Т5Н98 и РФА-Т5Н98).

В ароматической области как для ФК, так и для ГК наблюдаются кросс-пики, характерные для дигидрокси- или диметокси-замещенных ароматических колец, которые могут также иметь другие заместители (от алкильных радикалов до дезэкранирующих карбонильной или карбоксильной групп). Индивидуальные кросс-пики различаются для ГК и ФК, но их положение ясно свидетельствует о множественном кислородном замещении в сочетании с орто-дезэкранирующими заместителями, такими как карбонильные группы. В целом, на ароматическую область приходится весьма низкая спектральная интенсивность. Это указывает на то, что для гумусовых кислот характерно наличие высокозамещенных ароматических систем, из которых только небольшая доля представлена ароматическими фрагментами с протонами в орто-положении.

4.2.4 ^1H , ^{13}C HSQC спектры

HSQC спектры исследуемых ГК и ФК торфа приведены на рис. 4.12(а, б). Для спектров ГК и ФК характерно наличие существенного количества кросс-пигов, которые могут быть подразделены на следующие четыре основные области химических сдвигов (табл. 4.9).

Таблица 4.9

Основные отнесения в HSQC спектрах гумусовых кислот

Диапазон	F2 (м.д.)	F1 (м.д.)	Структурная группа	Отнесение
A _H	3.4-0.4	45-5	C-CH, C _r -CH	алифатические фрагменты
A _{H1}	1.1-0.4	26-5	C _r -CH	пептидные боковые цепи
B _H	5.0-2.6	84-40	X-CH	алифатические фрагменты, замещенные одним гетероатомом
B _{H1}	3.8-2.6	58-40	N-CH	аминосахара
C _H	5.6-4.2	106-90	O-CH-X	алифатические фрагменты, замещенные двумя гетероатомами
D _H	9.0-6.0	150-105	C _{ar} -H	ароматические или гетероциклические системы

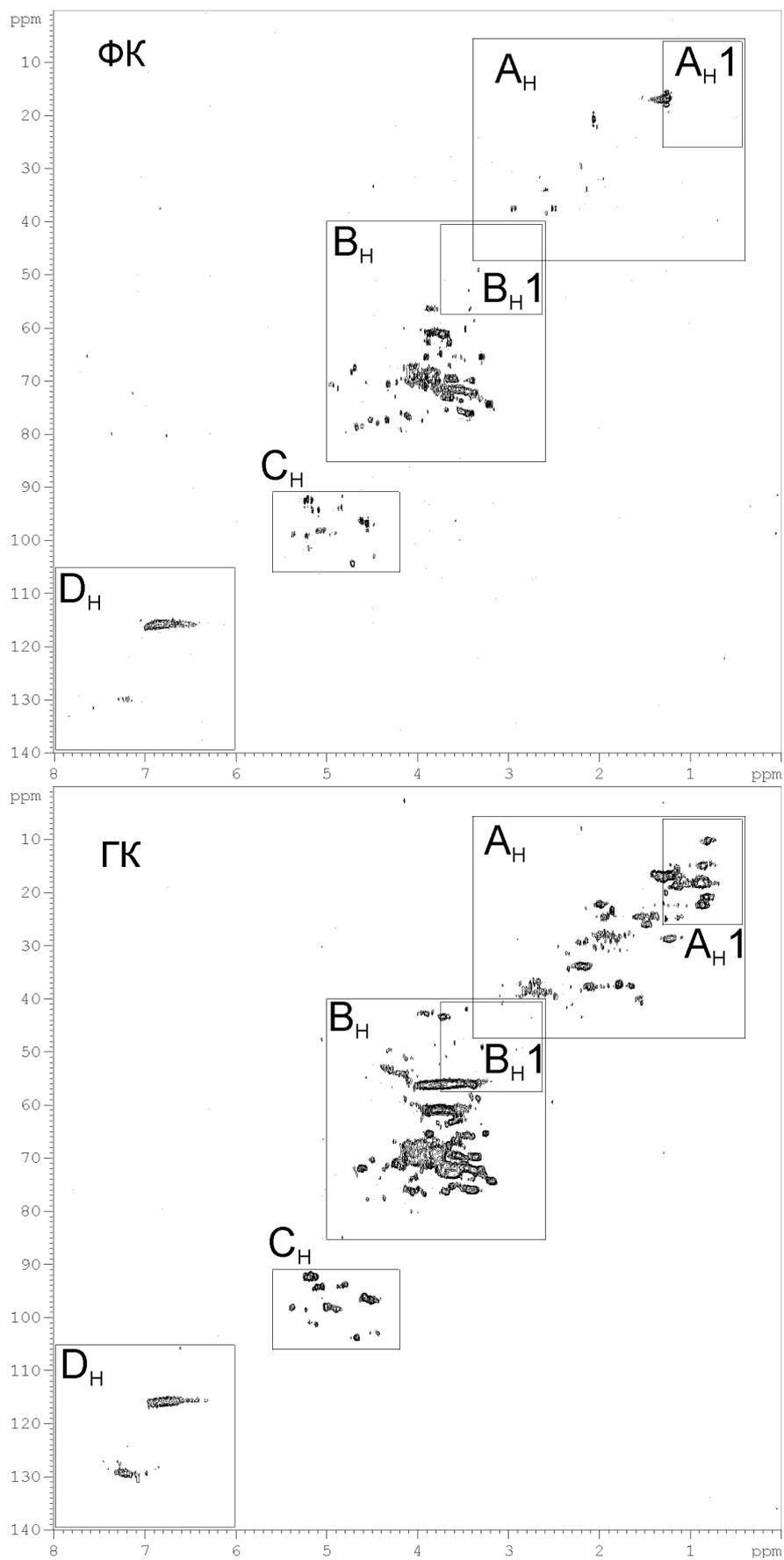


Рис. 4.13. Двумерные ^1H , ^{13}C HSQC спектры ФК и ГК верхового торфа (РНА-Т5Н98 и РФА-Т5Н98).

На первый взгляд, расположение кросс-пиков в секторах C_H и D_H весьма сходно для ФК и ГК. Однако оно существенно различается в области сильного поля по оси $F1$, для кросс-пиков из секторов A_H и B_H , где в спектре ФК отсутствует целый класс кросс-пиков. Весь набор сильнополюсных кросс-пиков в секторе A_H1 спектра ГК можно отнести к пептидным боковым цепям, отсутствующим в структуре ФК. Аналогично, кросс-пик $F2/F1$: 1.6/40 м.д., который наблюдается только в ГК, можно отнести к изопропильным метиленовым группам лейцина и валина и в других сходных положениях [Hertkorn et al., 2000]. Кросс-пики метиленовых групп длинноцепочечных алифатических фрагментов (2.3/29 м.д.) весьма заметны в ГК, но практически полностью отсутствуют в ФК. Алифатические метоксигруппы (3.8/56) гораздо более выражены в ГК, чем в ФК. В секторе B_H спектров ГК присутствует целый класс кросс-пиков в области сильного поля по ^{13}C , которые не наблюдаются в спектрах ФК. Среди них можно выделить интенсивные кросс-пики $C\alpha$ пептидов, но есть также и более слабые сигналы в области B_H1 . За исключением интенсивного кросс-пика $CN-\alpha$ глицина (3.8/42 м.д., Hertkorn et al, 2000), эти сигналы можно отнести к фрагментам аминокислот типа гексоз с одной аминогруппой.

В секторе B_H как в спектрах ГК, так и ФК находится группа относительно широких неразрешенных корреляционных пиков, обычно относимых к $CНОН$ фрагментам сахаров ($\delta(^{13}C)$: 85-67 м.д.). Этой группой представлена наиболее существенная доля всех резонансов, видимых в спектре ФК. Она сопровождается появлением интенсивных отчетливых корреляций в секторе C_H1 , соответствующем аномерному углероду (C_1) сахаров. В одномерном ПМР спектре эти сигналы частично перекрываются с $CНОН$, пептидами и остаточными протонами растворителя (HOD). Присутствие аномерного углерода указывает на то, что сахара в ГК и ФК имеют преимущественно циклическую конформацию. Положение и интенсивность кросс-пиков в аномерной области C_H , равно как и $CНОН$ фрагментов в секторе B_H , весьма сходно для исследованных ГК и ФК торфа. Отнесения, приведенные в табл. 4.10, сделаны для узких и разрешенных сигналов в аномерной области C_H спектра HSQC.

Положения кросс-пиков в аномерной области спектра HSQC гумусовых кислот слегка отличаются от величин химсдвигов, приводимых в литературе для свободных сахаров. По-видимому, это связано с тем, что в гумусовых кислотах сахара присоединены к каркасу макромолекулы, и входят в состав олигосахаридной цепи. Интенсивные и узкие сигналы $C1$ атомов рамнозы и фукозы хорошо согласуются с наличием в COSY спектрах ГК и ФК корреляций, относимых к $CН_3CНО-$ фрагментам.

Отнесения кросс-пиков в аномерной области C_H спектра HSQC
(если не отмечено особо, отнесения сделаны на основании 2D
HSQC спектров из базы данных Bruker SBASE)

PFA-T598		PHA-T598		Отнесение
$\delta(^{13}C)$	$\delta(^1H)$	$\delta(^{13}C)$	$\delta(^1H)$	
91.7	4.83			Рибопираноза
92.4	5.19	92.2	5.17	Глюкуроновая к-та, ксилоза
93.8	4.85	93.7	4.81	Олигомеры α -глюкозы
93.9	5.09	94.1	5.1	Фукоза, глюкоза, рибопираноза, галактоза
96.6	4.56	96.1	4.58	Глюкуроновая к-та, ксилоза, фукоза, манноза
		96.5	4.51	Рамноза, манноза
98.0	5.06	97.8	4.99	Олигомеры α -глюкозы
98.7	5.36	97.9	5.38	Рибопираноза
102.0	4.48	102.7	4.44	Целлюлозные фрагменты [Nehls, 1994]
104.3	4.71	103.5	4.67	Целлюлозные фрагменты [Nehls, 1994]

Для ароматической области характерно два основных кросс-пика: в области высокого поля (6.8/116 м.д.) – обусловлен наличием орто- или пара-кислородного замещения и при 7.15/130 м.д. – обусловлен наличием алкильных заместителей в орто-положении. Последний кросс-пик разделен на множество мелких резонансов, имеющих различные химсдвиги для ФК и ГК. В спектрах ФК наблюдаются протонные резонансы в области слабого поля ($\delta(^1H) > 7.5$ м.д.), что указывает на наличие по крайней мере одной дезэкранирующей группы (карбонил или карбоксил) в орто-положении кольца. В ГК присутствует класс высокополевых (по частоте ^{13}C) резонансов, которые не проявляются в спектре ФК.

4.2.5 Сравнительный анализ результатов двумерных ЯМР-экспериментов

Анализ данных проведенного комплекса ЯМР-экспериментов однозначно свидетельствует о колоссальных преимуществах двумерной спектроскопии для идентификации парциальных структур гумусовых кислот и выявления характеристических особенностей, присущих гумусовым кислотам различного фракционного состава и происхождения.

Так, для двух исследованных препаратов ГК и ФК торфа наблюдалась весьма сходная картина в карбогидратной области ПМР спектра. Использование как гомо-, так и гетероядерных импульсных последовательностей показало близость углеводных структур ФК и ГК и возможность детальной идентификации соответствующих аномерных фрагментов. В то же время, сопоставление спектров TOCSY и HSQC на предмет анализа азотсодержащих структурных групп показывает существенное различие между ГК и ФК, несмотря на близкие значения атомного соотношения C/N этих соединений (ФК: 28, ГК: 27). Так, кросс-пики аминокислот, присутствующие в TOCSY и HSQC спектрах ГК, отсутствуют в ФК. Это позволило отнести существенную долю метильных резонансов в высокопольной области одномерного ПМР спектра ГК к боковым цепям пептидов. Также впервые сделано отнесение кросс-пигов низкой интенсивности, наблюдающихся в области 3.3/50 только в HSQC спектрах ГК, к аминсахарам. Наличие терпеноидных углеводов, характеризующихся высоким содержанием изолированных метильных групп, установлено только в ГК при полном их отсутствии в ФК. В ГК, в отличие от ФК, присутствует и существенная доля метоксилов, не взаимодействующих с другими протонами.

Состав алифатической части ФК и ГК различается принципиальным образом. Различия в форме линий заметны уже при сопоставлении одномерных спектров. Расположение кросс-пигов в HSQC спектрах различается кардинально. Можно сделать вывод, что сигнал в ПМР спектре ФК при 1.17 м.д. не относится к метиленовым группам длинноцепочечных фрагментов (эти сигналы присутствуют только в спектрах ГК при 1.22/29.6 м.д.), так как он имеет корреляцию по углероду при $\delta = 22.4$ м.д. Химическая природа данной парциальной структуры неясна.

В ароматической области наблюдаются существенные вариации расположения кросс-пигов во всех двумерных спектрах ГК и ФК. Тем не менее, можно говорить о близости характера замещения основных ароматических структур, а именно: доминируют окисленные ароматические кольца многократно замещенные (через кислород) различными заместителями, наличие которых в орто или пара положении вызывает высокопольный сдвиг по ^1H и ^{13}C ; присутствие алкилированных колец

обуславливает появление интенсивного кросс-пика при 7.2/129 м.д., в то время как наличие протонных ароматических сигналов в слабopольной области спектра ($\delta(^1\text{H}) > 7.5$ м.д.) связано с дезэкранирующим влиянием карбонильных заместителей в кольце.

По всей видимости, кросс-пики, которые видны только в TOCSY спектрах, в большинстве своем также обусловлены взаимодействием протонов в вицинальном и геминальном положении. Их исчезновение в COSY спектрах вызвано самоуничтожением антифазной намагниченности для спектральных линий с полушириной $\Delta\nu_{1/2} > 10-15$ Гц. Существенным исключением является пик при 4.1/0.8 м.д., который, вероятнее всего, представляет собой корреляцию через четыре связи (4J) между положением, замещенным гетероатомом, и метильной группой. TOCSY спектр ФК отличается от COSY спектра существенным уменьшением пептидных $\text{H}\alpha\beta$ корреляций. По сравнению со спектрами COSY, в карбогидратной области TOCSY спектров наблюдается перераспределение интенсивности кросс-пиков в сторону более выраженных C1-C2 корреляций.

Таким образом, проведенный комплекс двумерных ЯМР экспериментов позволил провести отнесения в соответствующих спектрах для следующих парциальных структур: лигнины, танины, ароматические окси кислоты и их эфиры, хиноны, сахара, дезоксисахара, алкилированные сахара, сахарные кислоты, аминсахара, пептиды, азотсодержащие гетероциклы, липиды, суберин, жирные кислоты и их эфиры, терпеноиды.

Идентификация парциальных структур в составе гумусовых кислот различного генезиса и фракционного состава, выполненная на примере ФК и ГК верхового и низинного торфов, позволила продемонстрировать перспективность применения такого подхода при разработке классификации гумусовых кислот по химическому строению, так как метод позволяет установить характер различия строения препаратов различного фракционного состава и происхождения. Наличие или отсутствие в двумерных спектрах ЯМР сигналов найденных специфических парциальных структур гумусовых кислот (сахара, аминокислоты, аминсахара, терпены, и т.д.) может быть использовано для получения “отпечатков пальцев” гумусовых кислот различного фракционного состава и происхождения. Создание базы данных из таких “отпечатков пальцев” позволит в дальнейшем проводить идентификацию гумусовых кислот с помощью методов распознавания образов.

4.3 Определение структурно-группового состава негидролизующей и гидролизующей части гумусовых кислот

Для гумусовых кислот предметом особого интереса является взаиморасположение ароматических и углеводных фрагментов, которые определяют растворимость и гидрофильно-гидрофобный баланс молекул. При этом термины “ароматический каркас” и “углеводно-пептидная периферия” – дань широко применявшимся для исследования гумусовых кислот деструктивным методам – прочно вошли в лексикон, используемый для описания строения гумусовых кислот [Орлов, 1990; Stevenson, 1982]. Ввиду простой ассоциации: каркас – устойчивая несущая конструкция, периферия – “шаткая” надстройка, удаленная от центра масс, возникла некая механистичность в их трактовке, сводящая строение гумусовых кислот к наличию двух блоков, принципиально различных по структуре: ароматическое ядро (каркас) и полисахаридные цепочки (периферия).

Для выяснения, насколько такая концепция соотносится с реальностью, нами было предпринято исследование состава продуктов гидролиза гумусовых кислот 0.2 М HCl методом спектроскопии ЯМР и эксклюзионной хроматографии. Выбор относительно мягких условий гидролиза должен был обеспечить избирательность воздействия, – отщепление углеводной периферии без изменения каркасной ароматической части. В качестве основного объекта исследования были выбраны ГК, малая растворимость которых в кислой среде облегчала разделение негидролизующих и гидролизующих фрагментов: в осадке оставался негидролизующий остаток, а в раствор переходили отщепившиеся продукты гидролиза. Это позволило провести отдельное исследование структурно-группового состава так называемой “каркасной” и “периферической” частей молекул гумусовых кислот, результаты которого приводятся ниже.

В процессе гидролиза нерастворимых в воде ГК небольшая часть вещества переходила в раствор, который при этом окрашивался в желтый цвет. Выделенные в твердом виде, растворимые продукты гидролиза представляли собой аморфные порошки желтого цвета. Нерастворимые продукты гидролиза, легко отделяющиеся центрифугированием, были окрашены в черный цвет. При гидролизе растворимых в воде ГК прозрачный желтый раствор заметно темнел, после чего из него выпадало некоторое количество черного осадка. Полученный осадок обладал весьма ограниченной растворимостью в NaOH и DMSO-d₆. Растворимые продукты гидролиза ГК после выпаривания на роторном испарителе образовывали аморфную массу оранжевого цвета. Соотношение растворимых и нерастворимых продуктов гидролиза составляло для ГК около 1:10, а для ГК – около 7:1. Следует

отметить, что выпадение осадка при гидролизе наблюдалось для всех четырех исследованных препаратов ФК торфа. Аналогичный эффект ранее в литературе описан не был.

4.3.1 Одномерная спектроскопия ЯМР ^{13}C

Для определения структурно-группового состава продуктов гидролиза гумусовых кислот для ряда препаратов ГК и ФК торфа было проведено ^{13}C ЯМР исследование в описанных выше условиях, обеспечивающих количественность получаемых спектров, на спектрометре Bruker-400. Интегрирование спектров проводили согласно ранее сделанному отнесению, предусматривающему разбиение всего спектрального диапазона на семь интервалов (п. 4.1.1). Результаты интегрирования спектров исходных ГК и ФК и продуктов их гидролиза приведены в табл. 4.11. Для характеристики изменений, произошедших в структуре гумусовых кислот в результате гидролиза рассчитывали отношения содержания углерода всех указанных групп в продуктах гидролиза и в соответствующих исходных ГК и ФК. Полученные отношения, усредненные для всех исследованных препаратов ГК (а) и ФК (б), показаны на рис. 4.14.

Для всех препаратов ГК гидролиз в указанных условиях вызывает сходные изменения в структурно-групповом составе продуктов гидролиза. При этом в нерастворимых остатках (РННР) содержание углерода, входящего в состав углеводных фрагментов (C_{AlkO}), уменьшается на 30% и составляет в среднем 10-14%; незначительно (на 5-8%) увеличивается содержание ароматического углерода. Полученные данные в целом согласуются с приводимыми в литературе результатами по ^{13}C ЯМР-спектроскопическому исследованию нерастворимых гидролизатов гумусовых кислот [Schnitzer and Preston, 1983]. В то же время в растворимых продуктах гидролиза (РННД) содержание ароматического углерода (как в виде C_{ArO} , так и C_{Ar}) не превышает 30% от исходного и составляет 10-20% от общего С, на 50-70% выше содержание углерода углеводных фрагментов, достигая величин 35-40%, и более чем в два раза выше содержание карбоксильных групп. Незамещенные алифатические фрагменты равномерно распределяются между нерастворимыми и растворимыми продуктами гидролиза. Таким образом, в результате гидролиза наряду с отщеплением углеводных уходит в раствор часть ароматических и половина незамещенных алифатических фрагментов. При этом довольно существенная доля углеводных фрагментов (70 % от их исходного содержания) остается в составе гидролизованных нерастворимых остатков.

Распределение углерода по структурным фрагментам
в препаратах ГК и ФК низинных и верховых торфов
и продуктах их гидролиза 0.1 М HCl

Препарат	Содержание C, % от общего C						
	C=O	COO	C _{Ar} O	C _{Ar}	OCO	*C _{Alk} O	CH _n
РНА-Т6Н98	2.93	8.88	7.00	32.06	5.88	17.67	25.58
РННР-Т6Н98	4.51	13.03	8.14	40.30	4.72	8.32	20.97
РННД--Т6Н98	9.08	22.78	-0.44	10.27	-1.23	26.56	32.99
РНА-Т7Н98	3.99	10.28	8.90	28.25	8.00	22.28	18.29
РННР-Т7Н98	1.75	11.44	9.32	33.06	8.90	16.33	19.21
РННД-Т7Н98	3.67	12.59	5.95	13.98	10.08	40.32	13.41
РФА-Т10Л98	4.85	15.86	9.63	25.43	7.71	22.16	14.36
РФНР-Т10Л98	7.43	13.80	8.94	39.47	2.36	7.04	20.97
РФНД-Т10Л98	6.22	17.60	8.63	23.20	1.43	22.77	20.15
РНА-Т10Л98	3.81	11.47	8.94	30.34	5.41	21.72	18.31
РННР-Т10Л98	3.21	9.86	8.76	36.13	6.29	14.40	21.35
РННД-Т10Л98	1.47	31.46	2.02	8.48	3.65	34.47	18.46
РФА-ТТЛ98	3.60	17.16	8.30	24.39	6.57	20.30	19.67
РФНР-ТТЛ98	7.18	17.30	7.94	32.42	3.06	11.00	21.10
РФНД-ТТЛ98	5.65	17.94	6.17	24.05	2.94	20.94	22.30
РНА-ТТЛ98	3.42	12.54	7.50	28.96	7.63	15.35	24.59
РННР-ТТЛ98	3.88	13.04	10.36	35.02	1.57	13.75	22.37
РННД-ТТЛ98	5.56	22.95	1.44	10.93	4.76	31.64	22.72

$$*C_{Alk}O = \Sigma(CHO, CH_2O, CH_3O)$$

Другими словами, расщепления молекулы ГК на две части различной химической природы – чисто ароматическую и чисто углеводную, не происходит. Это позволяет предположить, что в выбранных условиях гидролизуется только гликозидная связь. При этом расщепляются олигосахаридные включения, которые уходят в раствор в виде моносахаридов и в составе низкомолекулярных углеводно-ароматических фрагментов, присоединенных к ароматическому каркасу исходной макромолекулы через полисахаридные мостики. В тоже время углеводные фрагменты, образующие сложноэфирную связь с ароматическим каркасом макромолекулы, остаются в составе нерастворимых гидролизованных остатков. Гидролизуемые алифатические фрагменты, которые дают сигнал углерода в районе 0-47 м.д., по-видимому, представляют собой дезоксисахара рамнозу и фукозу (пик 6-

СН₃ группы при 16 м.д.) и аминокислоты, которые были связаны с исходным каркасом через гликозидную связь.

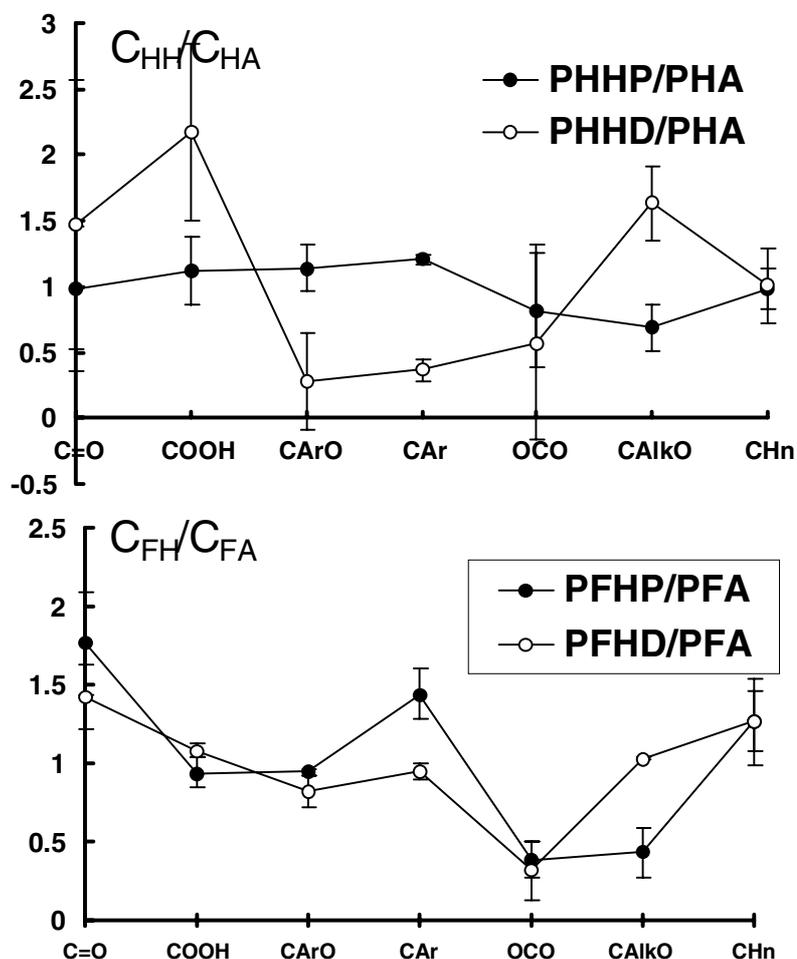


Рис. 4.14. Отношение содержания углерода в составе структурных фрагментов растворимых (PHND/PFHD) и нерастворимых (PHNP/PFNP) продуктов гидролиза к таковому в составе исходных ГК (а) и ФК (б), соответственно. Приведены средние значения для четырех ГК и двух ФК. Планками показано \pm одно стандартное отклонение.

В отличие от ГК, единственное существенное изменение в структурно-групповом составе при переходе от ФК к растворимым продуктам их гидролиза – резкое уменьшение содержания аномерного углерода. В тоже время нерастворимый гидролизованный остаток ФК (FННР) резко отличается от исходного препарата и весьма близок по составу к гидролизованному остатку соответствующих ГК. По-видимому, его выпадение обусловлено наличием примеси ГК в составе ФК

4.3.2 Двумерная спектроскопия ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C

Для получения дополнительной информации о характере взаиморасположения структурных фрагментов в составе макромолекул гумусовых кислот были получены двумерные гомоядерные ($^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY) и гетероядерные ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC) спектры ЯМР для растворимых продуктов гидролиза. Для нерастворимых продуктов гидролиза (РННР и РФНР) получить двумерные спектры не удалось, по-видимому, из-за отсутствия в их структуре медленно релаксирующих фрагментов полисахаридных и алифатических цепочек и олигопептидов. Типичные спектры растворимых продуктов гидролиза (РННД) и соответствующих исходных препаратов ГК (РНА) верхового и низинного торфа даны в Приложении 4.5.

Типы корреляций, проявляющиеся в COSY и HSQC спектрах растворимых продуктов гидролиза гумусовых кислот, существенно различны для ГК верхового и низинного торфа. Так, для РННД-Т10Л98 и РННД-ТТЛ98 наблюдалась довольно сходная картина корреляций в $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY спектре. Одной из их наиболее характерных черт являлось отсутствие пиков в аномерной области углеводов (4.3-5.3/3.1-4.0). Принимая во внимание, что и исходные ГК не дают сигналов в этой области COSY и HSQC спектров, то можно сделать вывод об отсутствии в данных гумусовых соединениях нетрансформированных полисахаридных цепочек, – все они подверглись биоразложению в процессе гумификации. Отсутствие “углеводных” корреляций в COSY-спектре исходного препарата РНА-ТТЛ98 согласуется с видом HSQC-спектра, в котором в “карбогидратной” области химсдвигов наблюдаются только корреляции метиловых спиртов. Следовательно, большая часть спектральной интенсивности, наблюдаемой в 1D ^{13}C ЯМР спектрах РНА- и РННД-ТТЛ98 в диапазоне, относимом к HCO и HCN группам, на самом деле обусловлена присутствием большого количества метиловых эфиров.

В противоположность указанной картине, для препарата верхового торфа РНД-Т7Н98 наблюдались интенсивные пики как в области HСХ, так и в аномерном диапазоне спектров COSY и HSQC. Это может быть связано с меньшей степенью трансформированности углеводно-пептидного комплекса, присущей верховым торфам.

Другой характерной чертой COSY спектров гидролизованных остатков ГК низинных торфов является присутствие серии пиков, коррелирующих с сигналами терминальных CH_3 -групп при 0.9 м.д. Указанные пики простираются вплоть до 2.0 м.д. и могут быть отнесены к протонам алифатических цепочек, несущих электроотрицательную группу (COOH) или фенильное кольцо. Интересно, что в спектре COSY верхового торфа (РННД-

T7H98) эта серия пиков практически полностью отсутствует. При этом почти вся спектральная интенсивность незамещенного алифатического диапазона (0-1.8 м.д.) обусловлена С6-метильными группами рамнозы и фукозы, коррелирующих с HCO областью углеводов. В HSQC спектре эти метильные группы сигнализируют при 18 м.д. по оси ^{13}C .

Ароматическая область также существенно различна для гидролизованных остатков ГК низинных (PHND-T10L98 и PHND-TTL98) и верховых (PHND-T6H98 и PHND-T7H98) торфов. Для низинных торфов в COSY-спектре наблюдаются серии из четырех и пяти кросс-пиков при 6.5/6.8-7.7 м.д., которые можно отнести за счет пара-дизамещенных бензольных колец. В тоже время эти сигналы практически полностью отсутствуют в PHND-T7H98, что указывает на более высокую степень замещения бензольных колец в ГК верховых торфов.

Таким образом, привлечение методов одномерной и двумерной спектроскопии ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C для анализа продуктов гидролиза ГК и ФК показало условность понятий “ароматический каркас” и “углеводная периферия”. Так, было установлено, что в структурно-групповой состав гидролизованных нерастворимых остатков ГК (“ароматический каркас”) входят углеводные фрагменты, в которых содержится до 15% С, тогда как до 15% углерода растворимых продуктов гидролиза (“углеводная периферия”) находится в составе ароматических фрагментов. При этом весьма значительные различия были найдены в структурно-групповом составе периферических фрагментов, отщепившихся от ГК низинных и верховых торфов. Оказалось, что в ГК низинных торфов существенная часть углерода, традиционно относимого к сахарам, на самом деле присутствует в составе метокси-групп, тогда как для верхового торфа термин “углеводная периферия” гораздо более адекватен: в составе отщепившихся фрагментов доминируют сахара, в том числе дезоксисахара – рамноза и фукоза.

4.3.3 Определение углеводного состава гидролизуемой части гумусовых кислот методом ВЭЖХ

Для идентификации моносахаридов, отщепляющихся в процессе кислотного гидролиза, и, следовательно, входящих в состав углеводной периферии гумусовых кислот, был предпринят анализ растворимых продуктов гидролиза препаратов различного происхождения и фракционного состава методом анионообменной ВЭЖХ с импульсной амперометрической детекцией (HPAE-AED). Данная работа была выполнена в тесном сотрудничестве с Др. Ю. Янель (кафедра водной химии, Технический университет Карлсруэ, ФРГ). Соответствующая совместная публикация готовится к печати.

Гидролизу подвергали набор препаратов гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава, который включал в себя: водные ФК и ГФК (АFA-IHSS, АНF-RMX2, АНF-RMC, АНF-RND3), торфяные ГФК и водный экстракт торфа (РНF-T194, РНF-T494, РНF-TНН94, РДОМ-TНН94), почвенные ФК и ГФК (SFA-Pg94, SFA-CtV94, SFA-Am, SHF-Co94) и ГФК озерных донных отложений (ВНF-SMu2). Кислотный гидролиз гумусовых кислот проводили в условиях, аналогичных описанным ранее. 2 мл 0.2 М HCl и 2 мл образца смешивали и нагревали при 110°C в течение 15 часов. Получившийся раствор фильтровали через нитратцеллюлозный фильтр (0.45 мкм) и вводили в хроматограф без дополнительной очистки. Концентрация растворов гумусовых кислот, использованных для гидролиза, составляла 300-500 мг С/л.

Определение сахаров проводили на хроматографической системе Dionex, включающей в себя градиентный насос GP-40 и электрохимический детектор ED40. Моносахариды детектировали путем измерения электрического тока при их окислении на поверхности золотого электрода. Принцип метода изложен в [Sawert, 1992; Solbrig-Lebuhn, 1992; Mopper, 1992]. Разделение проводили на колонке CarboPac PA1 (4x250 мм). В качестве элюента использовали 12 мМ NaOH. Скорость элюирования составляла 1.0 мл/мин. Набор детектируемых моносахаридов включал в себя гексозы, пентозы, дезоксисахара и аminosахара, а именно: галактозу, глюкозу, ксилозу, маннозу, арабинозу, рибозу, фруктозу, фукозу, рамнозу, глюкозамин и галактозамин. Следует отметить, что описанные выше условия разделения моносахаридов не обеспечивали разрешение пиков арабиноза/галактозамин, манноза/ксилоза и глюкоза/галактоза.

На основании данных по содержанию каждого из детектируемых моносахаридов в кислотном гидролизате гумусовых кислот рассчитывали их общее содержание ($C_{сах}$, мг С/л) и относили его к исходной концентрации препарата гумусовых кислот ($C_{орг}$, мг С/л). Полученные результаты приведены на рис. 4.15 и отражают процентное содержание углерода, отщепляющегося от макромолекул гумусовых кислот в виде моносахаридов в условиях кислотного гидролиза. Как видно из представленных данных, максимальное содержание гидролизуемых сахаров в пределах каждой подвыборки препаратов – водных ГФК, торфяных ГФК и почвенных ФК – наблюдалось для препаратов АНF-RMC, РДОМ-TН94 и SFA-Am, соответственно. Анализ процедур выделения данных образцов показал, что препараты АНF-RMC и SFA-Am были выделены с использованием в качестве сорбента ДЭАЭ-целлюлозы, а препарат РДОМ-TН94 представляет собой не экстракт гумусовых кислот, а водную вытяжку верхового торфа. Следовательно, все три величины не отражают содержание гидролизуемых

сахаров в гумусовых кислотах соответствующих источников, а обусловлены спецификой процедуры выделения, использование которой привело к появлению в растворе гумусовых кислот фракции негумусового происхождения: в одном случае – продуктов гидролиза ДЭАЭ-целлюлозы, в другом – фракции свободных олиго- и полисахаридов, не входящих в состав углеводно-пептидного комплекса гумусовых кислот. Содержание гидролизуемых сахаров в составе торфяных и почвенных ГФК (до 8-11% от исходного углерода гумусовых кислот) также может быть частично завышено из-за примесей олигосахаридов, извлекаемых из торфа и почвы в процессе щелочной экстракции. Следует отметить, что для препаратов ГФК вод и ФК почв, извлекаемых с помощью гидрофобной смолы Амберлит ХАД-2, и тем самым полностью свободным от примесей сопутствующих олигосахаридов, общее содержание гидролизуемых сахаров не превышало 3.5%. Однако для фракции ФК верховых торфов, которые, согласно данным ЯМР, характеризуются максимальным содержанием нетрансформированных сахаров, можно ожидать, что данная величина будет существенно больше.

В целом, полученные данные хорошо согласуются с приводимыми в литературе оценками содержания гидролизуемых сахаров в гумусовых кислотах различного происхождения: 1.5-11%, [Moers, 1989], а также с приведенными выше результатами ^{13}C ЯМР исследования (табл. 4.11). В соответствии с ЯМР-данными убыль “карбогидратного углерода” в нерастворимых гидролизованных остатках ГК торфа по сравнению с исходными препаратами составляет 6-10% (абс.). Учитывая, что в процессе гидролиза олигосахариды могут не только распадаться на моносахариды, но окисляться до сахарных кислот, трансформироваться с образованием фурфурола и формиата [Cheshire, 1970; Потапов и Татаринчик, 1976], то можно констатировать довольно хорошее соответствие результатов обоих методов.

Помимо оценки общего содержания гидролизуемых сахаров в препаратах гумусовых кислот с помощью независимого метода – ВЭЖХ, особый интерес представляла идентификация смеси моносахаридов, образующихся в результате гидролиза 0.1 М HCl. Эти данные позволили бы уточнить отнесения сигналов в двумерных ЯМР-спектрах гумусовых кислот, в частности, оценить вклад дезокси- и аминсахаров в состав углеводно-пептидной периферии гумусовых кислот. Для наглядной демонстрации вклада того или иного моносахарида в состав гидролизуемых углеводных фрагментов гумусовых кислот, содержание индивидуальных моносахаридов в продуктах кислотного гидролиза выражали в процентах от суммарного содержания всех моносахаридов, идентифицированных методом ВЭЖХ (рис. 4.15).

Как видно из приведенных результатов (рис. 4.16), вне зависимости от происхождения и фракционного состава гумусовых кислот, доминирующий вклад в состав гидролизуемых сахаров вносят гексозы: прежде всего, галактоза и глюкоза (40-60%), а также манноза и ксилоза (15-25%). Обращает на себя внимание довольно высокое и постоянное содержание рамнозы во всех исследованных препаратах на уровне 8-10%, тогда как содержание фукозы не превышало 5% и характеризовалось высокой изменчивостью. Весьма отчетливый тренд прослеживается для аминсахаров – их вклад минимален для препаратов ГФК торфа (не превышает 5%), тогда как в гидролизатах почвенных ГФК и ФК содержание аминсахаров существенно выше и составляет от 15 до 20%. При этом содержание галактозамина существенно выше (12-18%), чем глюкозамина (1-5%).

Полученные результаты хорошо согласуются с отнесениями, сделанными нами в двумерных ЯМР-спектрах гумусовых кислот верховых торфов и почв, которые указывают на существенный вклад дезоксисахаров в алифатическую часть ГК верховых торфов и аминсахаров – ГК и ФК почв.

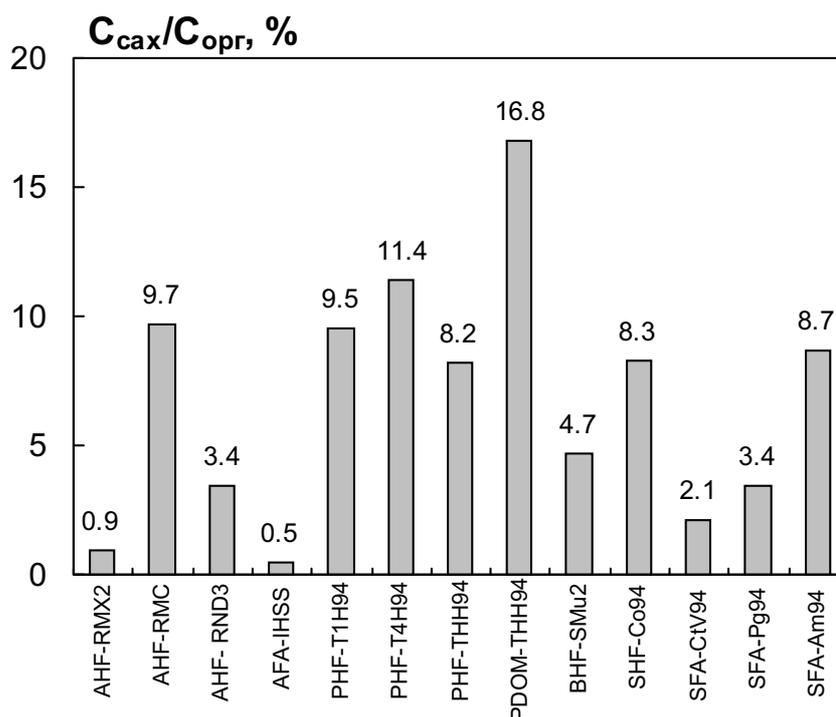


Рис. 4.15. Содержание моносахаридов в кислотном гидролизате (0.1 М HCl) в процентах от суммарного органического углерода исходного раствора гумусовых кислот.

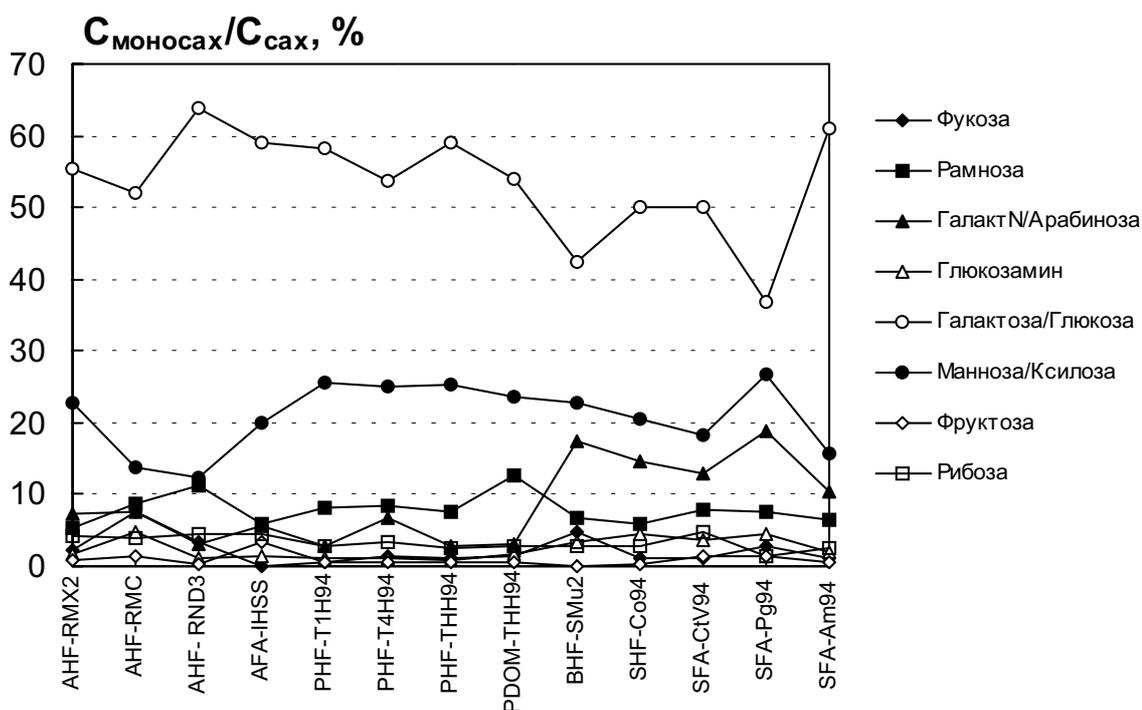


Рис. 4.16. Содержание индивидуальных моносахаридов в кислотном гидролизате гумусовых кислот в процентах от их суммарного содержания.

Таким образом, выполнен блок систематических исследований по определению структурно-группового состава гумусовых кислот методами одномерной и двумерной спектроскопии ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C . Решены методические проблемы, связанные с выбором условий для регистрации количественных спектров ^{13}C ЯМР. Разработана методика ПМР-определения водорода в составе скелетных фрагментов и функциональных групп гумусовых кислот. Реализация разработанных методик позволила характеризовать препараты гумусовых кислот набором интегральных дескрипторов структурно-группового состава, представляющих собой данные по содержанию углерода и водорода в составе структурных фрагментов в процентах от общего содержания Н и С в препарате. Получена база данных по структурно-групповому составу гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава, включающая ^{13}C ЯМР и ПМР данные по распределению углерода и водорода в составе 67 и 40 препаратов, соответственно. Проведена свертка полученного обширного массива данных с помощью расчета описательных статистик для выборок препаратов, группированных по сходному источнику происхождения и фракционному составу. Осуществлена детальная идентификация парциальных структур гумусовых кислот. Установлены парциальные структуры, характеристичные для гумусовых кислот различного фракционного состава и происхождения. Продемонстрирована перспективность применения двумерной спектроскопии

для решения задач идентификации препаратов гумусовых кислот. Исследованы особенности строения каркасной и периферической частей гумусовых кислот.

Вместе с тем, проведенное исследование позволило сформулировать целый ряд нерешенных аналитических проблем, связанных с определением структурно-группового состава гумусовых кислот, которые могли бы составить предмет будущих исследований. К их числу относится определение кислотных групп в образцах с высокой зольностью – случай, который весьма часто встречается на практике, но его адекватное аналитическое решение до сих пор отсутствует. Предложенная в нашей работе ПМР-методика определения функциональных групп является весьма существенным шагом вперед в плане идентификации определяемых кислотных групп, но она также неприменима для высокозольных образцов. Другой использованный метод – рК-спектроскопия – также весьма перспективен с точки зрения идентификации титруемых групп, однако он неприменим для анализа слабокислотных групп. Весьма широк круг нерешенных задач по идентификации структурных фрагментов гумусовых кислот и установлению их взаиморасположения в молекуле. В своей работе мы смогли только продемонстрировать масштабность задачи идентификации парциальных структур гумусовых кислот и показать, что наиболее перспективным методом для этой цели является двумерная спектроскопия ЯМР. Возможности данного мощного метода структурного анализа органических соединений постоянно возрастают в связи с совершенствованием ЯМР-спектрометров. С нашей точки зрения, именно здесь в самом скором будущем следует ожидать прорыва – расшифровки молекулярной структуры гумусовых кислот. Весьма целесообразной представляется также постановка широкомасштабных исследований по количественной спектроскопии ЯМР ^{13}C гумусовых кислот, направленных на прямое определение времен релаксации, а также установление зависимости получаемых данных от способа приготовления образца (концентрация, рН, ионная сила). Отдельной задачей является разработка новых алгоритмов извлечения количественной информации из сложных ЯМР-спектров гумусовых кислот, которые бы учитывали стохастический характер данных соединений.