



Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова

Химический факультет

кафедра радиохимии

# Получение меченных тритием гуминовых веществ и исследование их свойств

Позднякова В.Ю.

Научный руководитель: к.х.н., доцент Бадун Г.А.

Лаборатория радионуклидов и меченых соединений

Москва-2006

## Объекты исследования - ГУМИНОВЫЕ ВЕЩЕСТВА

Гуминовые вещества (ГВ) - это сложные смеси высокомолекулярных темноокрашенных органических соединений природного происхождения, образующихся при разложении растительных и животных остатков.

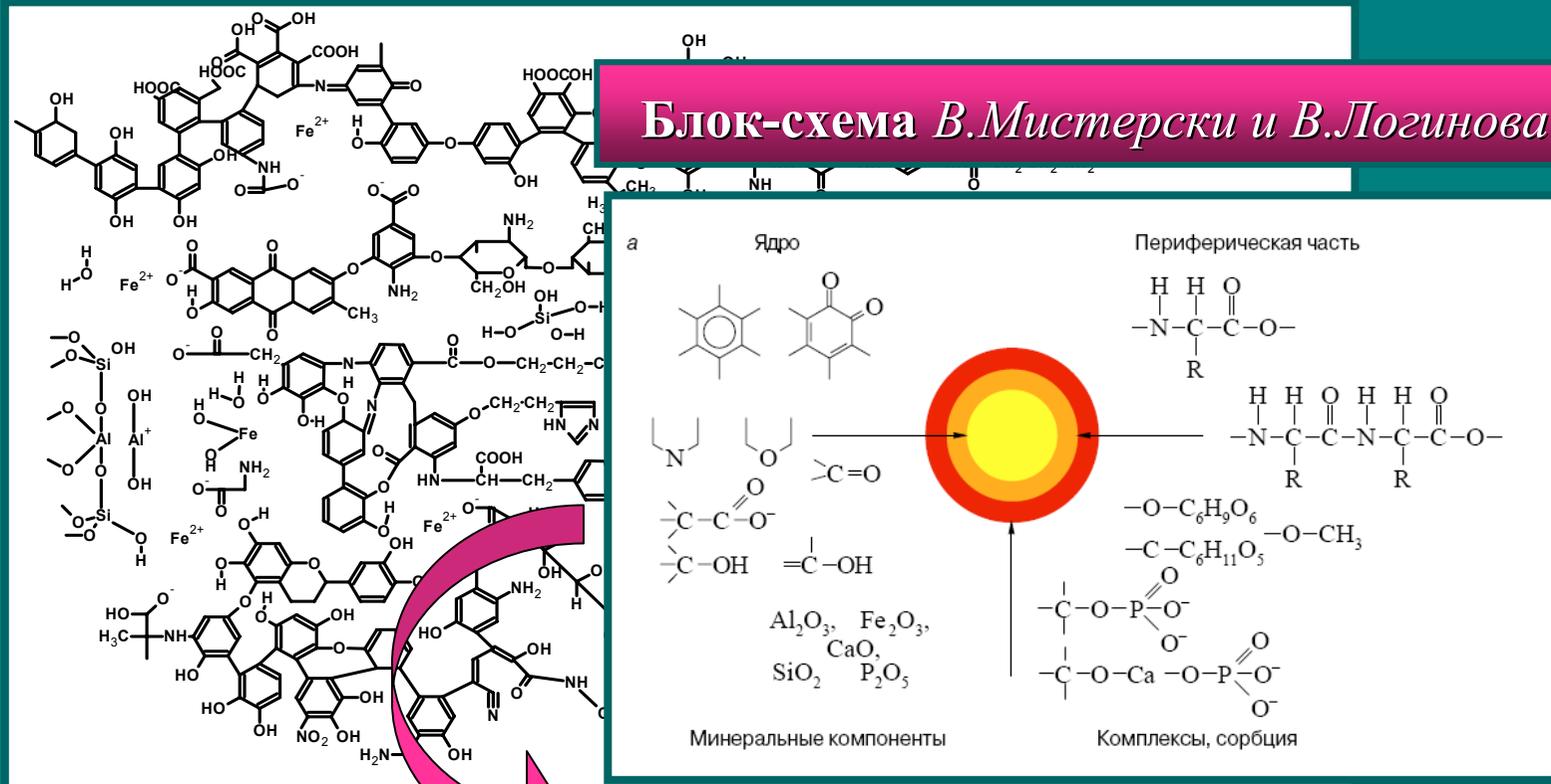
Источники ГВ – почвы, природные воды, твёрдые горючие ископаемые.

Свойства ГВ – нестехиометричность состава, нерегулярность строения, гетерогенность структурных элементов, полидисперсность.

Классификация, основанная на растворимости отдельных компонентов ГВ:

- *Гуминовые кислоты (ГК)* - растворимы только в щелочных растворах
- *Гиматомелановые кислоты (ГМК)* - извлекаемые из ГК ЭТИЛОВЫМ СПИРТОМ
- *Фульвокислоты (ФК)* - растворимы во всём диапазоне рН
- *Гумин* – практически нерастворим

# Структура гумусовых кислот почв (Kleinhempel. Albrecht-Thaer-Archiv., 1970, № 14, P.3-10)



Гидрофобность

Поверхностная  
активность

Поведение в окружающей среде

Биологическая активность

# Использование различных радионуклидов в изучении ГВ

$^{14}\text{C}$

"Characterization of carbon-14 labelled humic substances"  
Jussi V.K. Kukkonen (2002).

Введение  $^{14}\text{C}$   $\text{NaHCO}_3$ ,  $^{14}\text{C}$  фенилэтанол,  $^{14}\text{C}$  глюкоза

$^{131}\text{I}$

"Use of radioactive tracers for the characterization of humic acids in high performance size exclusion chromatography"  
K.F. O'Connell, H.K. Kwon, L. (2000)

$^{111}\text{In}$

"Aluminium ions at polyelectrolyte interfaces. Role in the surface-area-exclusion chromatography of humic acid."  
E. Pefferkorn, J. Widmaier, F. Elfarissi (2001)

Введение трития в  $-\text{CHO}$  группы ГК с помощью  $\text{KB}^3\text{H}_4$   
 $A_{\text{уд}}$  (ГВ)=4 кБк/мг

"The evidence for the incorporation of fulvic acid into the bone and cartilage of rats." Wang C, Wang Z., Yang C (1996).

Получение  $^3\text{H}$ -ФА с помощью каталитического гетерогенного изотопного обмена.  $A_{\text{уд}}$  (ГВ)=2-37 МБк/мл

$^3\text{H}$

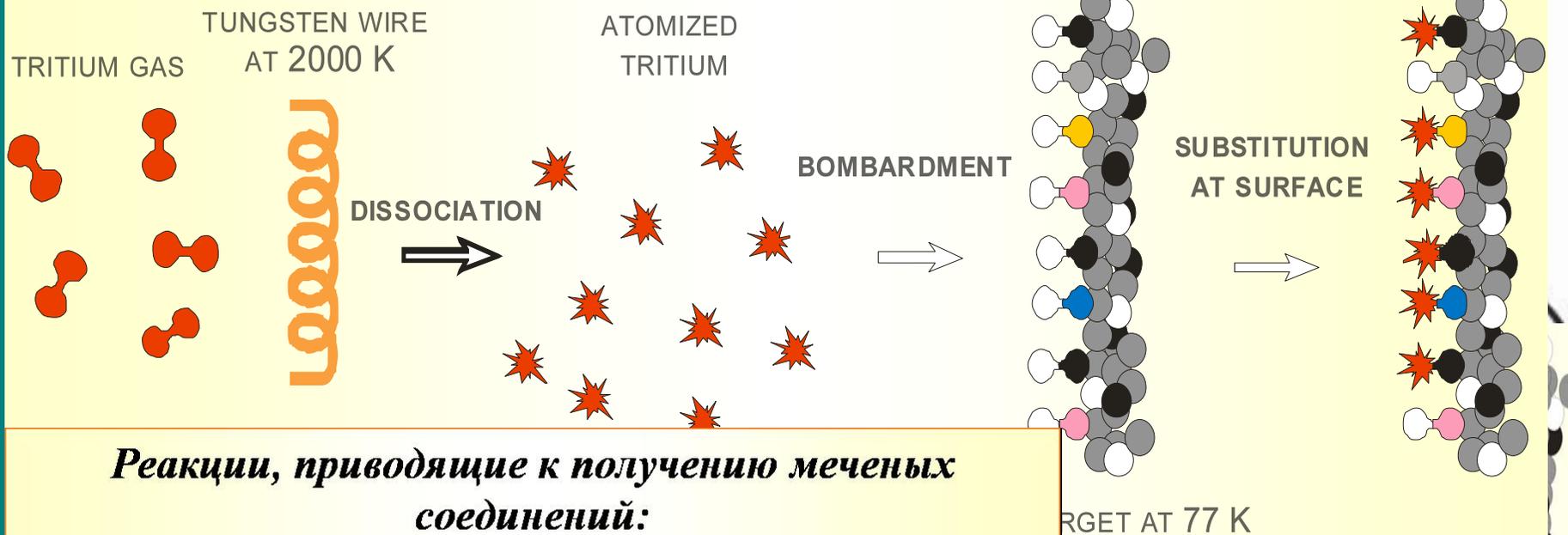
65-80%.

$^{18}\text{F}$

## Цель работы

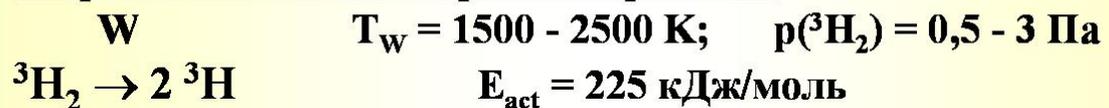
- *разработка способа получения меченных тритием ГВ с равномерным распределением метки по компонентам препаратов и изучение их гидрофобных и поверхностно-активных свойств методом сцинтиллирующей фазы (СФ)*

# Принцип метода термической а

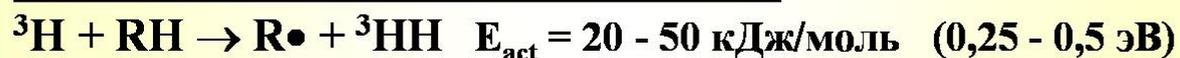


*Реакции, приводящие к получению меченых соединений:*

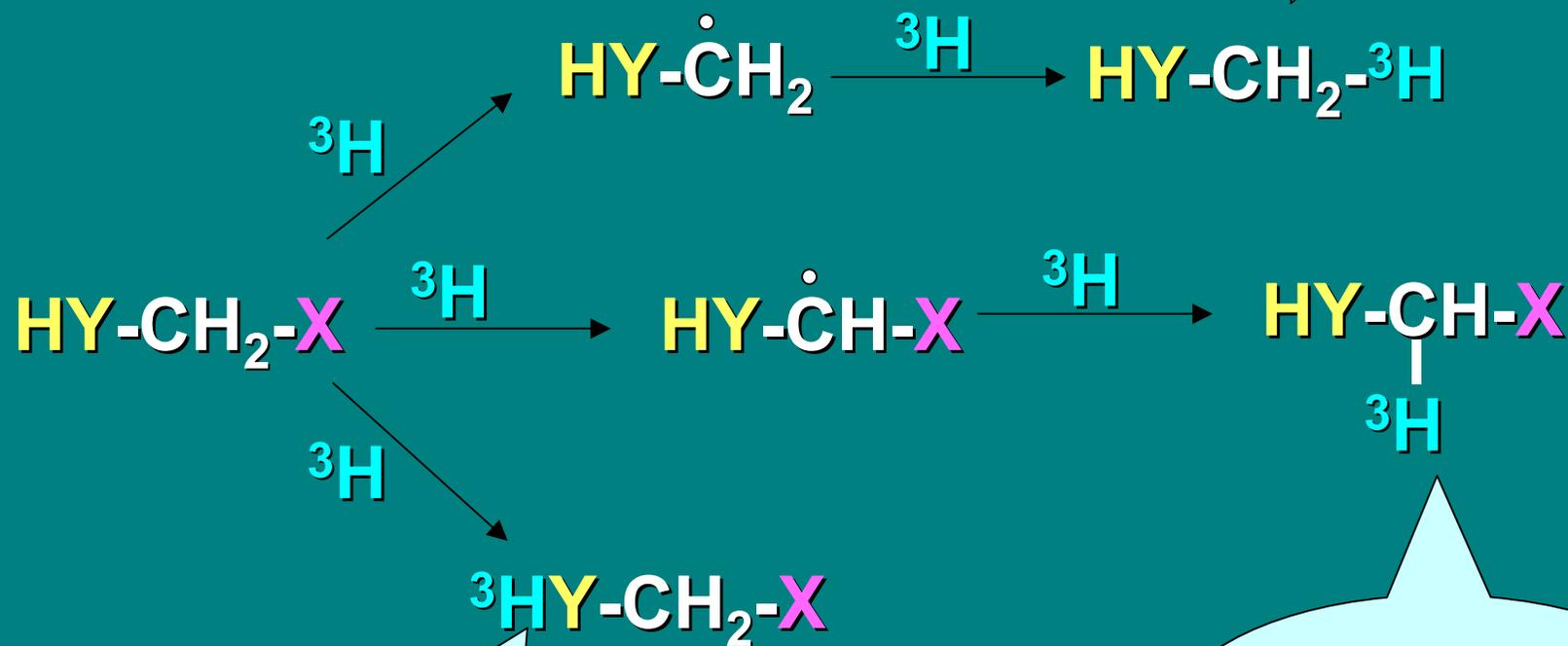
## Образование атомарного трития:



## Изотопный обмен по С-Н связям:



# Схема реакций, протекающих в мишенях при попадании атома трития в молекулу

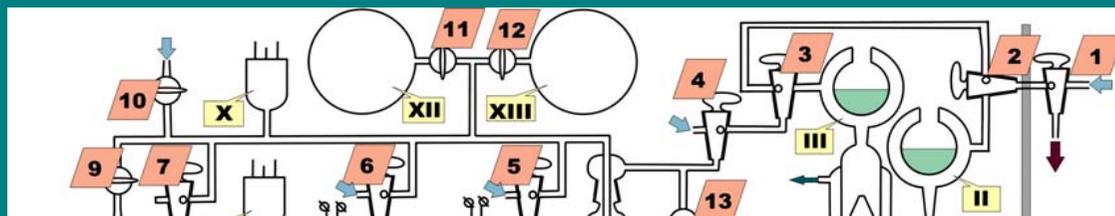


Меченый  
побочный  
продукт

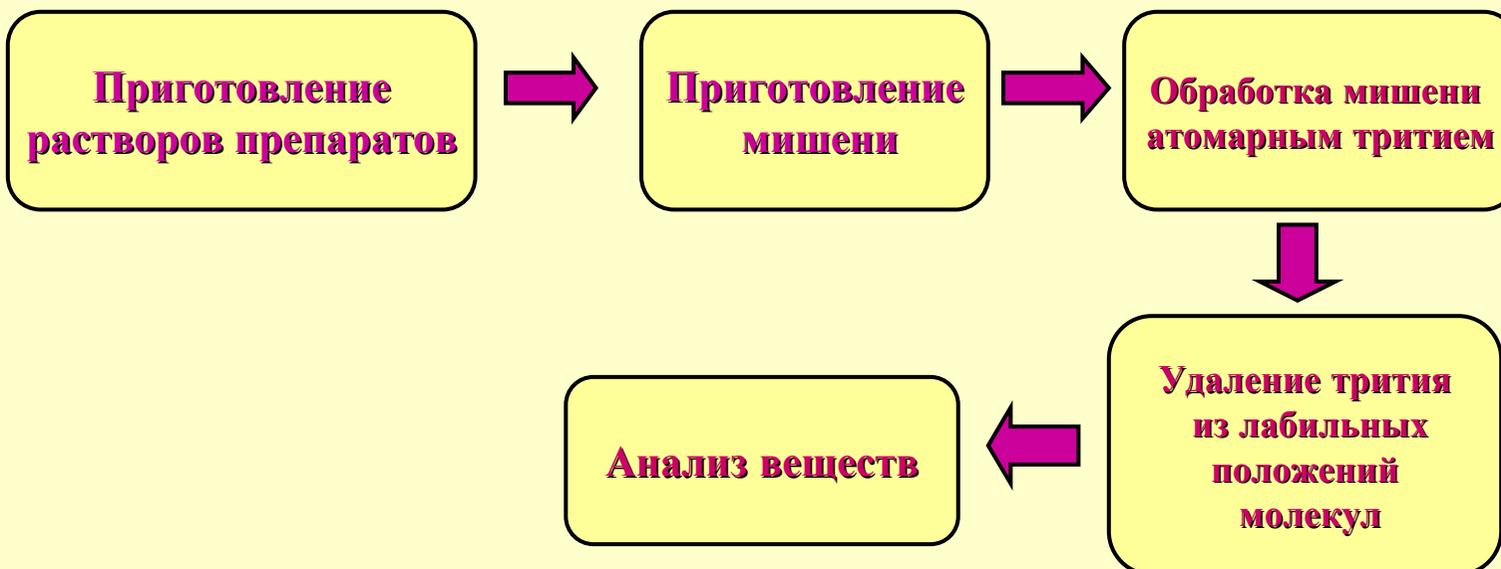
Лабильная  
метка

Меченое  
материнское  
соединение

# Схема установки для работы с газообразным тритием



## Схема эксперимента



# Определение условий введения тритиевой метки в ГВ

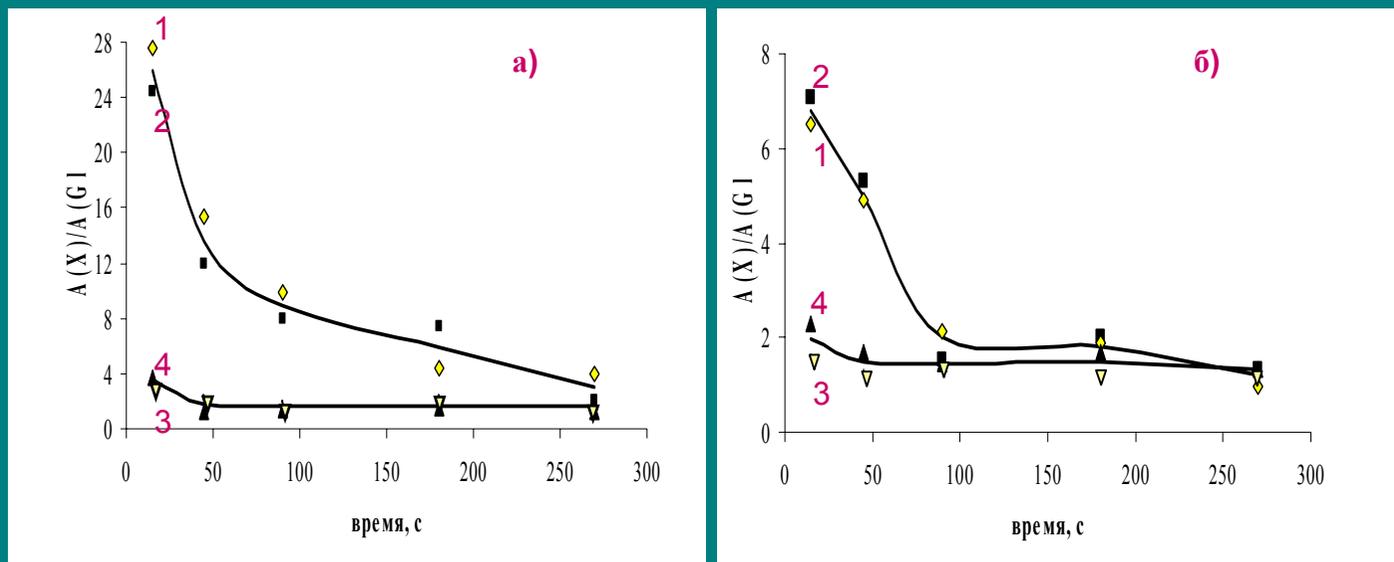
## Индивидуальные вещества:

- аминокислоты - гомологический ряд альфа-аминокислот от глицина до норлейцина, п-аминобензойная кислота, аспарагиновая кислота и лизин;
- поверхностно-активные вещества (ПАВ) - бромиды алкилтриметил-аммония с алкильными группами  $C_{12}H_{25}$ ,  $C_{14}H_{29}$ ,  $C_{16}H_{33}$  (DTAB, TTAB, STAB) и тритон TX-100;
- аминосахар - глюкозамин

## Задачи

- влияние времени реакции на соотношение выходов меченых аминокислот и сахаров
- влияние температуры атомизатора на соотношение основной и побочных реакций для ряда аминокислот
- влияние температуры вольфрамовой проволоки на выход бромидов алкилтриметиламмония

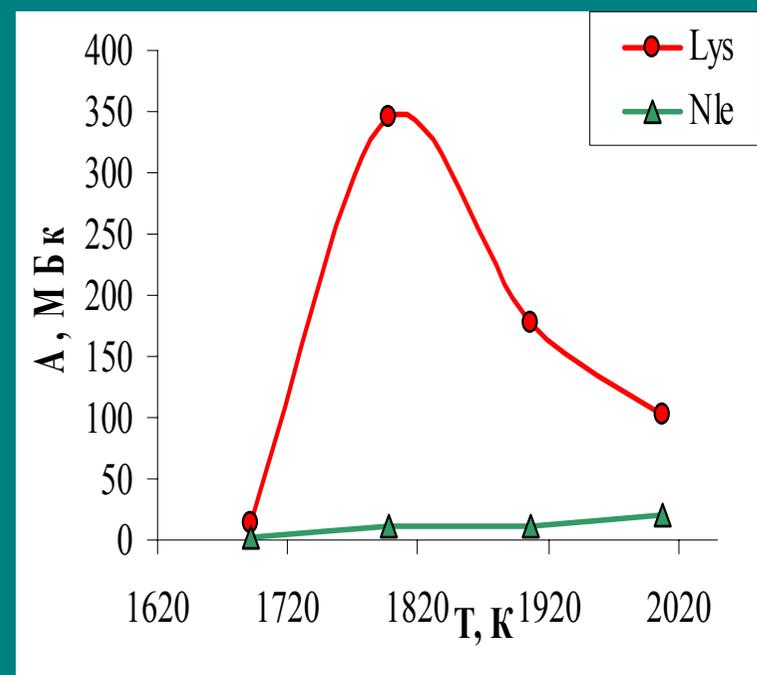
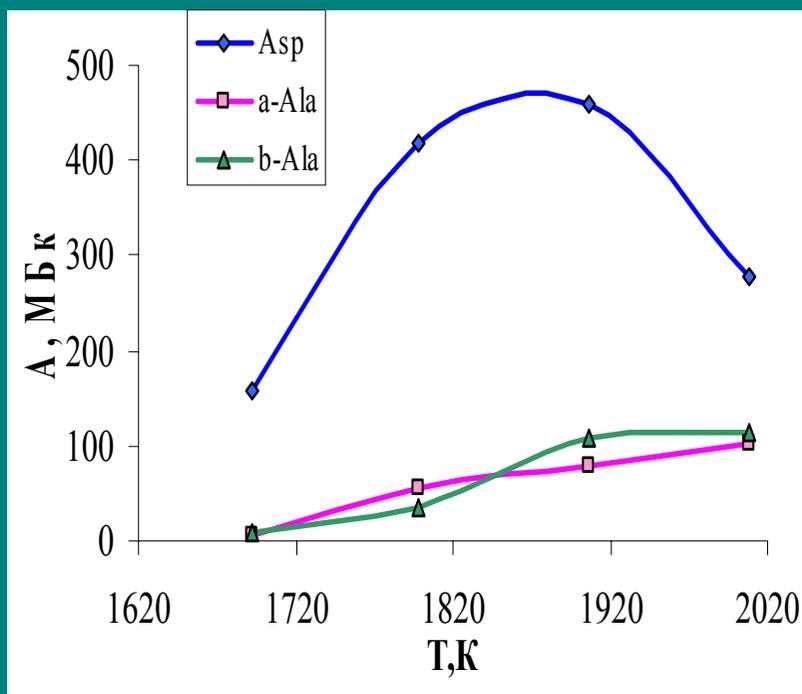
## ➤ влияние времени реакции на соотношение выходов меченых аминокислот и сахаров



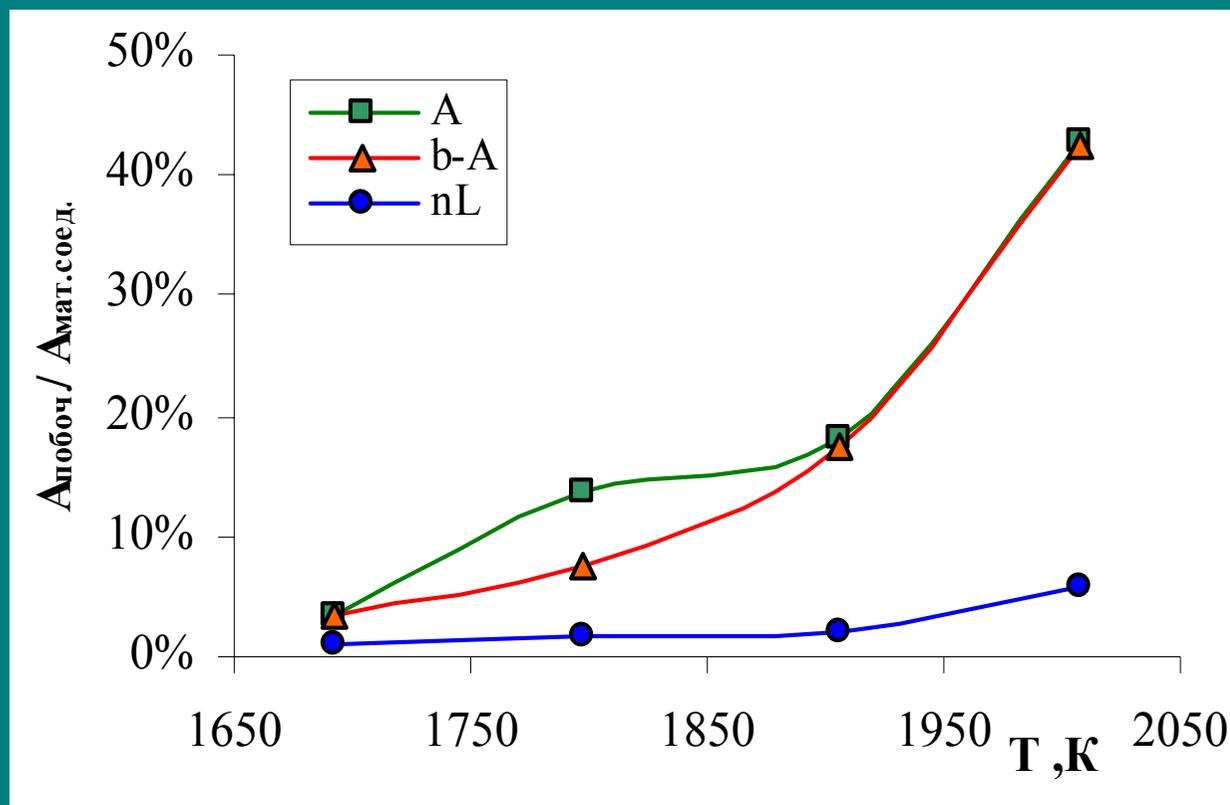
**Рисунок 1.** Зависимость отношений радиоактивностей от времени реакции для замороженных водных растворов (а) и лиофилизированных смесей (б):  
1,2 - глюкозамин/глицин;  
3,4 – серин/глицин при давлении трития 0,5 Па (1,3) и 2 Па (2,4).

➤ влияние температуры атомизатора на соотношение основной и побочных реакций для ряда аминокислот

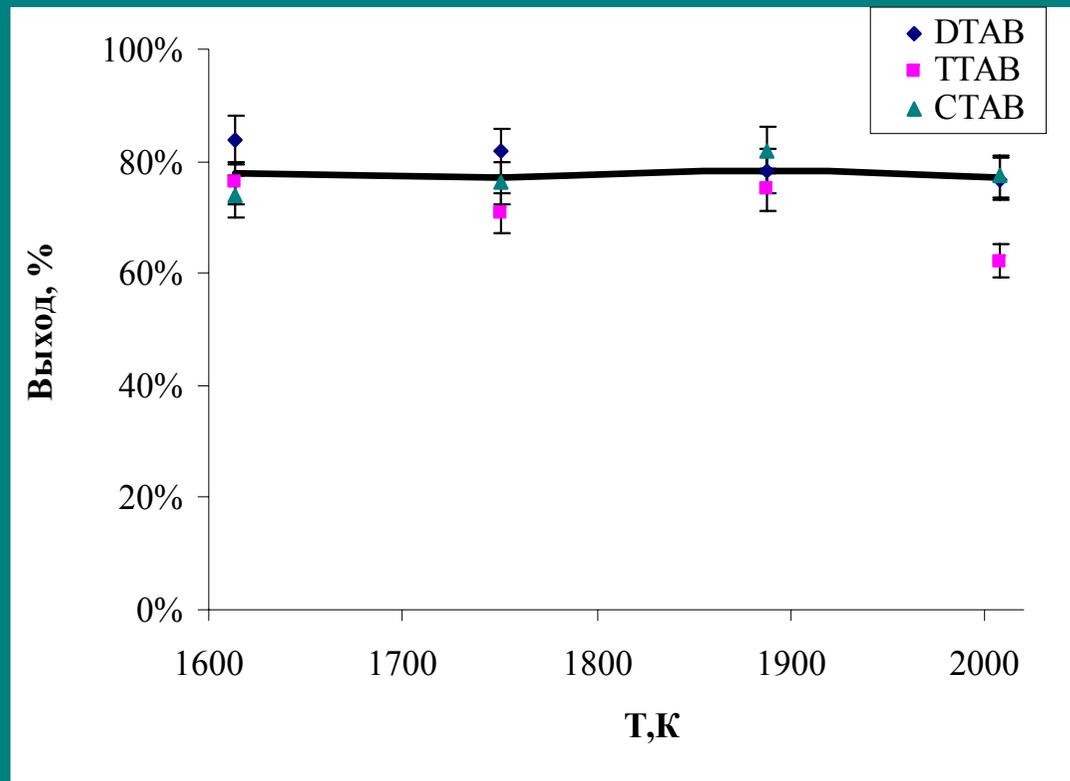
Радиоактивность материнского соединения и побочных продуктов при разных значениях температуры атомизатора



Соотношения выходов меченых побочного продукта и материнского соединения для аспарагиновой кислоты (реакция декарбоксилирования) и лизина (реакция дезаминирования)



## Зависимость выхода ПАВ от температуры атомизатора



- ❖ Наиболее высокий выход меченых сахаров и аминокислот достигается при времени реакции 10 с
- ❖ Скорости побочных реакций декарбоксилирования и дезаминирования резко возрастают с увеличением температуры вольфрамовой проволоки
- ❖ Наибольший выход меченых аминокислот достигается при температуре атомизатора 1800–1900 К
- ❖ Глубина реакционной зоны ограничена 1 нм, то есть тритиевая метка должна включаться в основном в периферическую часть молекул ГВ

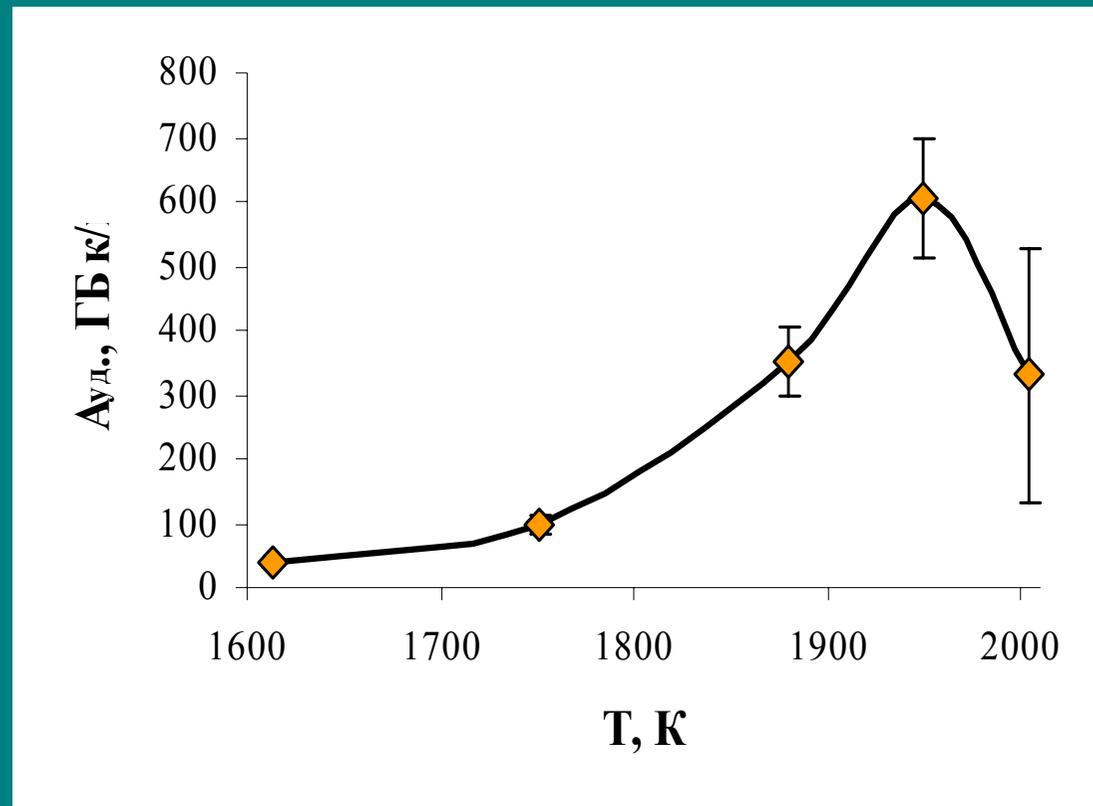
## Анализ влияния условий проведения эксперимента по введению трития на характеристики меченого коммерческого препарата ГК леонардита

*Таблица 1. Условия экспериментов и основные результаты*

СЕРИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА	УСЛОВИЯ ВВЕДЕНИЯ МЕТКИ				Уд.р/акт. Ки/г (100% тритий)	Выход %
	давление трития Па	масса мишен и мг	время реакции* с	температура атомизатора К		
1-АЯ СЕРИЯ	0,5	2	20	1950	14,0	23,4**
2-АЯ СЕРИЯ	0,5	0,26	10	1950	726	94,9
	0,5	0,26	20	1950	197	86,8
	0,5	0,26	40	1950	571	83,1

**ПРИМЕЧАНИЕ:** (\*) - РЕАКЦИЯ ПРОВОДИЛАСЬ ИМПУЛЬСАМИ ПО 10 СЕКУНД С ПОЛНЫМ ОБНОВЛЕНИЕМ СОСТАВА ГАЗОВОЙ ФАЗЫ, (\*\*) - ОЧИСТКА ПРЕПАРАТОВ ПЕРВОЙ СЕРИИ ПРОВОДИЛАСЬ С ПОМОЩЬЮ ДИАЛИЗНОЙ МЕМБРАНЫ MWCO 12 кДА, ДЛЯ ОСТАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ИСПОЛЬЗОВАЛИ МЕМБРАНЫ MWCO 2 кДА.

*Рисунок* Зависимость удельной радиоактивности препаратов ГК угля от температуры атомизатора



## Оптимальные условия для введения тритиевой метки в ГВ методом термической активации трития

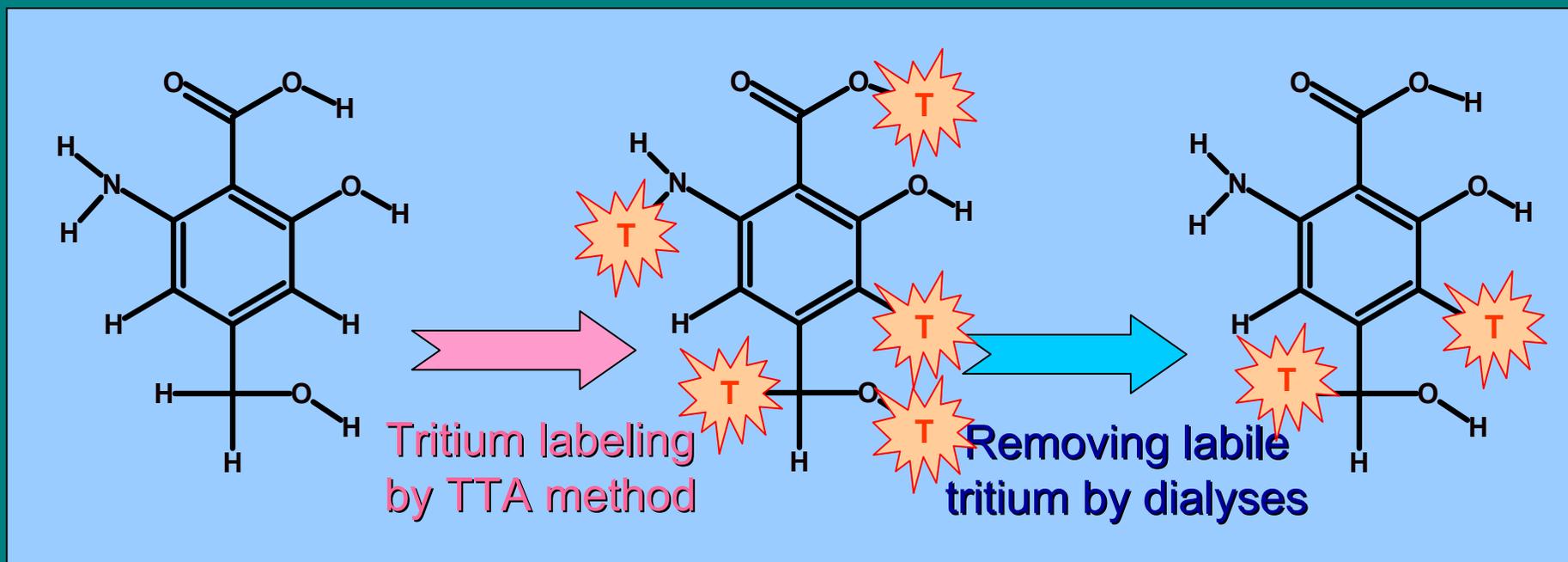
Температура атомизатора: 1900-1950 К

Давление трития: 0,5 Ра

Масса мишени: 0,2-0,3 мг

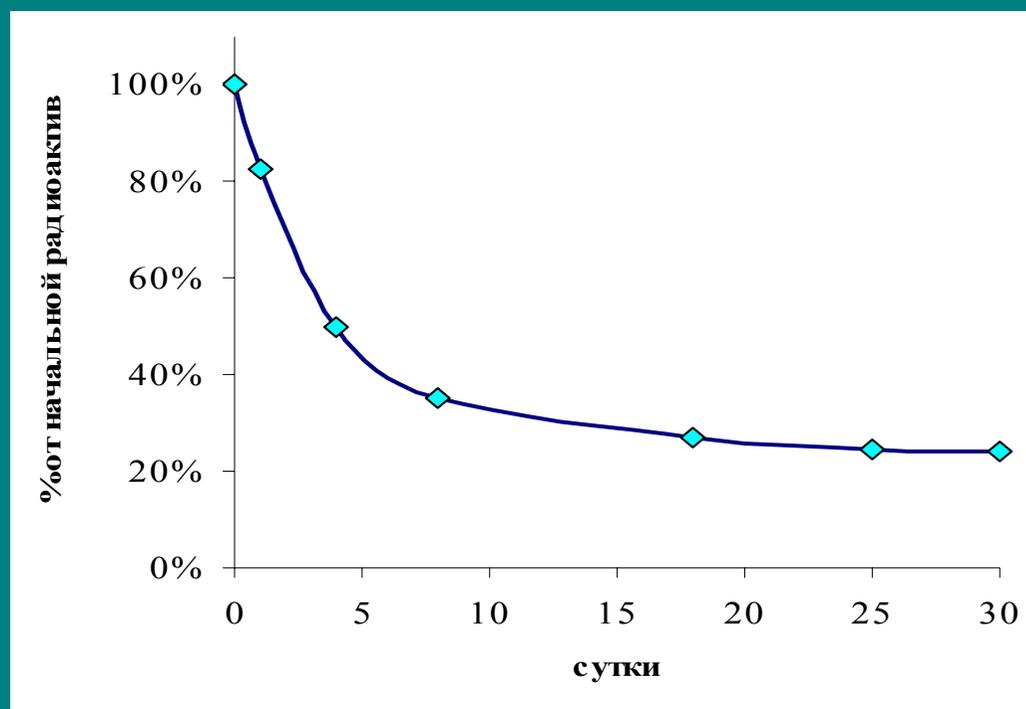
Время реакции: 10 секунд

# Схема введения трития и удаления лабильной метки



# Очистка меченных тритием ГВ от лабильного трития

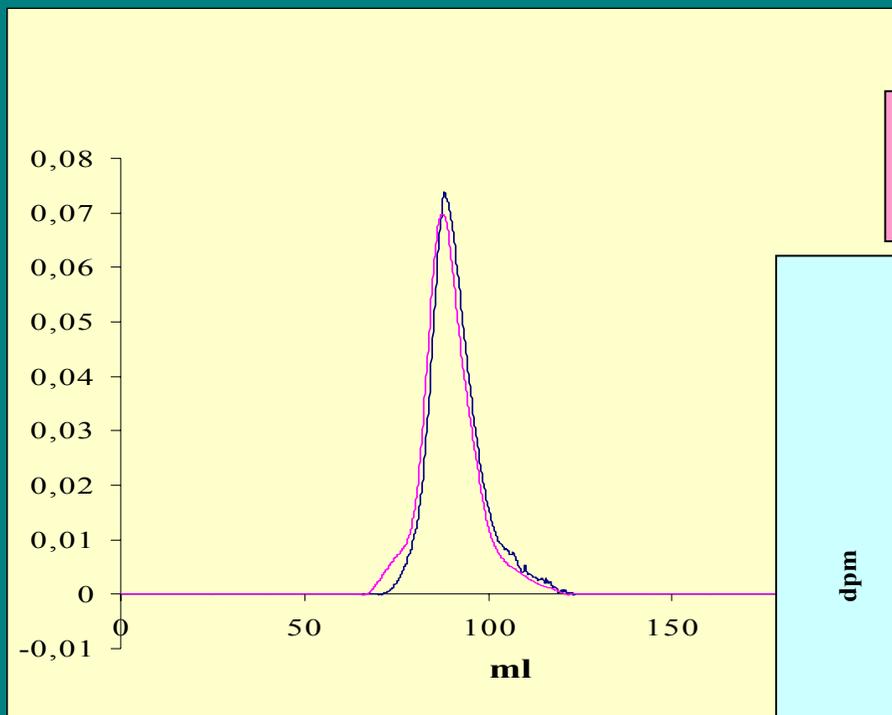
*Диализ  $^3\text{H}$ -ГВ в фосфатном буфере 0.028М при рН 6.8  
через мембраны 2кДа*



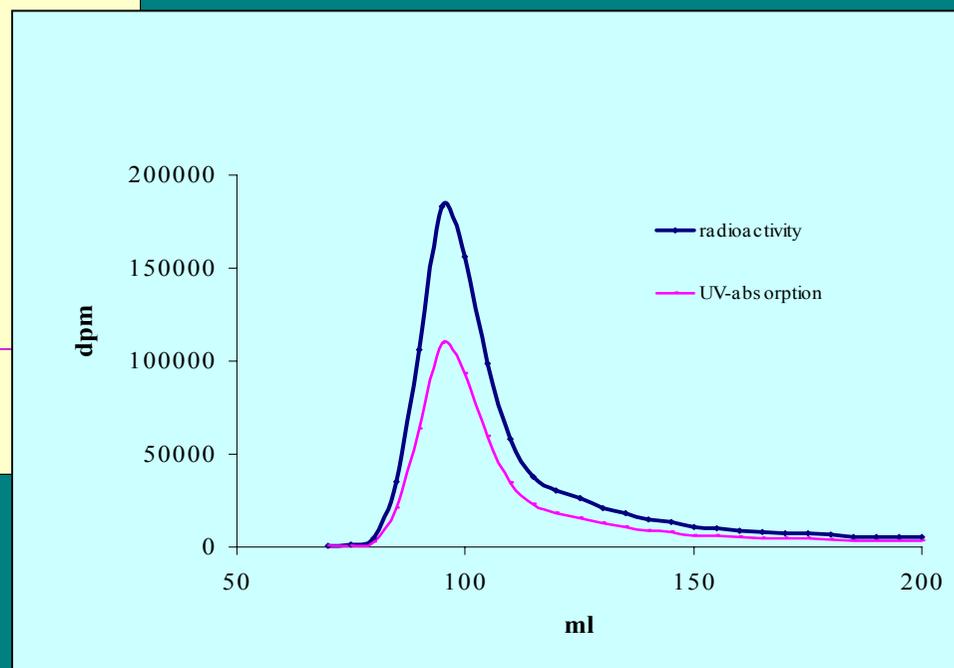
*Рисунок . Изменение радиоактивности препарата ГВ угля при диализной очистке через мембрану 2 кДа*

# Подтверждение равномерности введения метки в ГВ

УФ-профили ГК и  $^3\text{H}$ -ГК угля

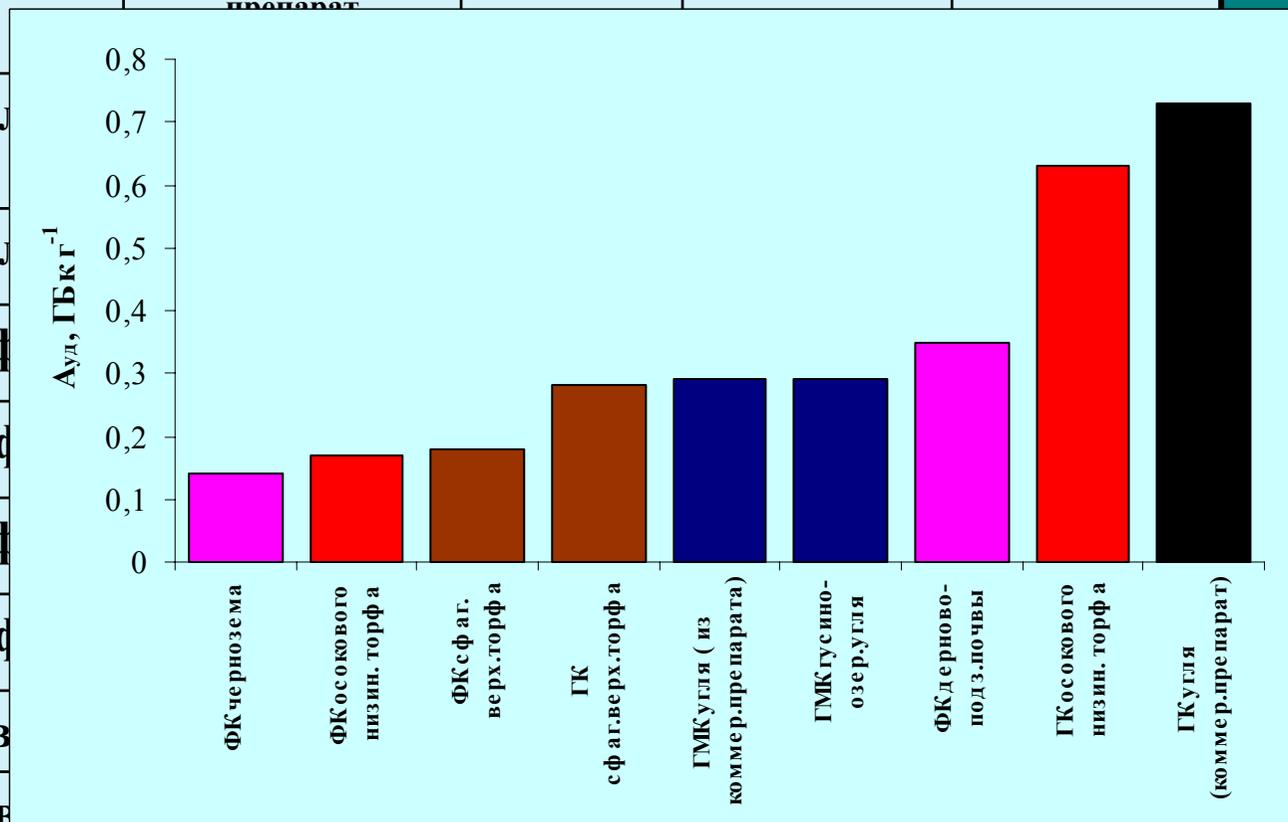


Профили радиоактивности и  
УФ-поглощения  $^3\text{H}$ -ГК угля



## Характеристика меченных тритием ГВ

Препарат ГВ	Источник	Мр, кДа	Удельная р/акт-ть, ТБк/г	Выход, %
ГК угля	Коммерческий препарат	20.0	0,73	96
ГМК угля				
ГМК угля				
ГК торфа				
ФК торфа				
ГК торфа				
ФК торфа				
ГК почвы				
ФК почвы				
ФК почвы	Дерново-подзолистые почвы	11.1	0,35	82



# **Изучение гидрофобных и поверхностно-активных свойств ГВ**

## Коэффициент распределения -количественная мера определения гидрофобности

(Leo, A., Hansch, C. and Elkins, D. 1971. Partition coefficients and their uses. Chem. Rev. 71:525-616.).

Общая форма:

$$K_p = [X]_{\text{org}} / [X]_{\text{water}}$$

Октанольно-водный  
коэффициент распределения

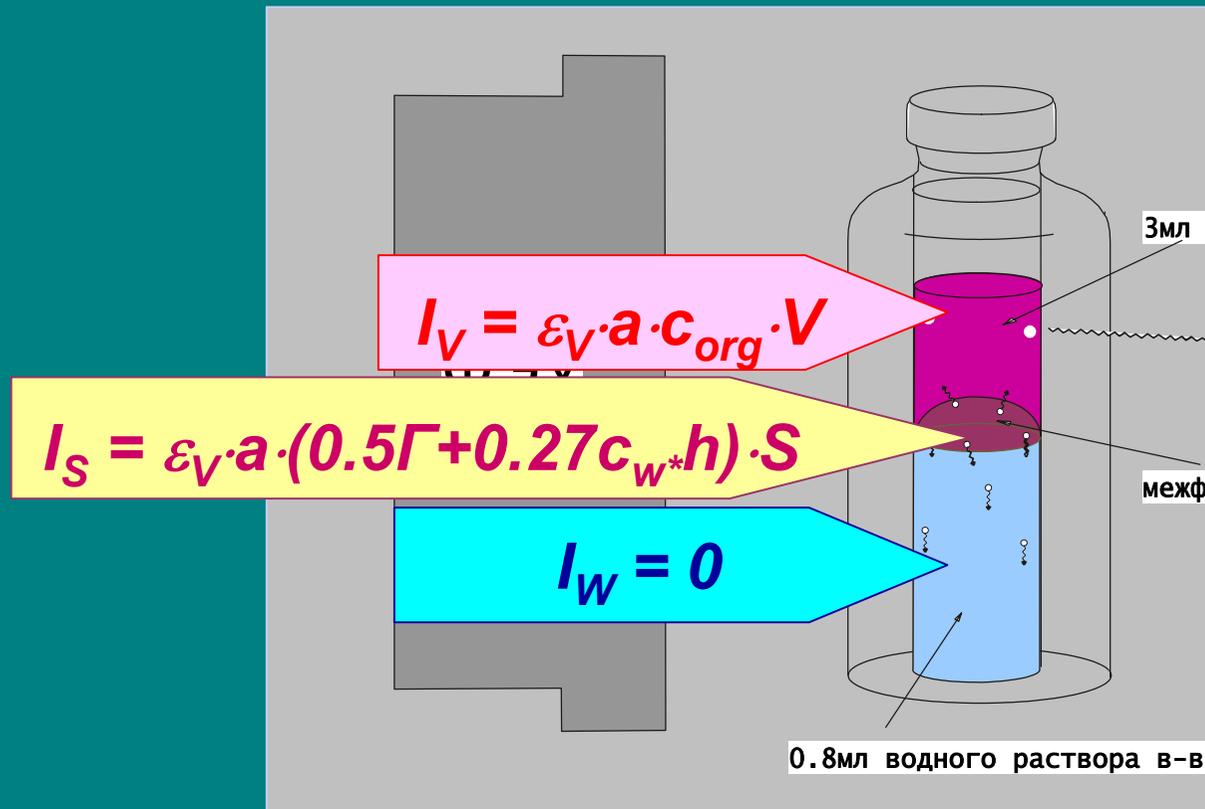
$$K_{ow} = [X]_{\text{oct}} / [X]_{\text{water}}$$

### Методы определения $K_{ow}$

“ Shake flask” метод – метод медленного перемешивания или встряски  
QSAR-метод – основан на количественной взаимосвязи между структурой  
и свойством вещества

RP-HPLC метод – основан на корреляции коэффициента распределения  
с временем удержания

# Метод сцинтилирующей фазы



где  $C_{org}$  и  $C_w$  – концентрации меченого соединения в органической и водной фазах,  $\Gamma$  – величина удельной адсорбции поверхностно-активного вещества на границе раздела фаз,

$\varepsilon$  – эффективность регистрации излучения в органической фазе,  $V$  – объем органической фазы,  $S$  – площадь границы раздела,  $h$  – толщина зоны водной фазы, из которой возможна регистрация излучения трития,  $a$  – удельная радиоактивность меченого соединения.

# Определение $I_v$ и $I_s$

$I$  – скорость счета  
двухфазной  
системы ( $V$ )

$$D_{\text{тв}} = C_{\text{толуол}} / C_{\text{вода}}$$

$I_2$  – скорость  
счета  
остатка ( $V_2$ )

$I_1$  – скорость  
счета  
орг. фазы ( $V_1$ )

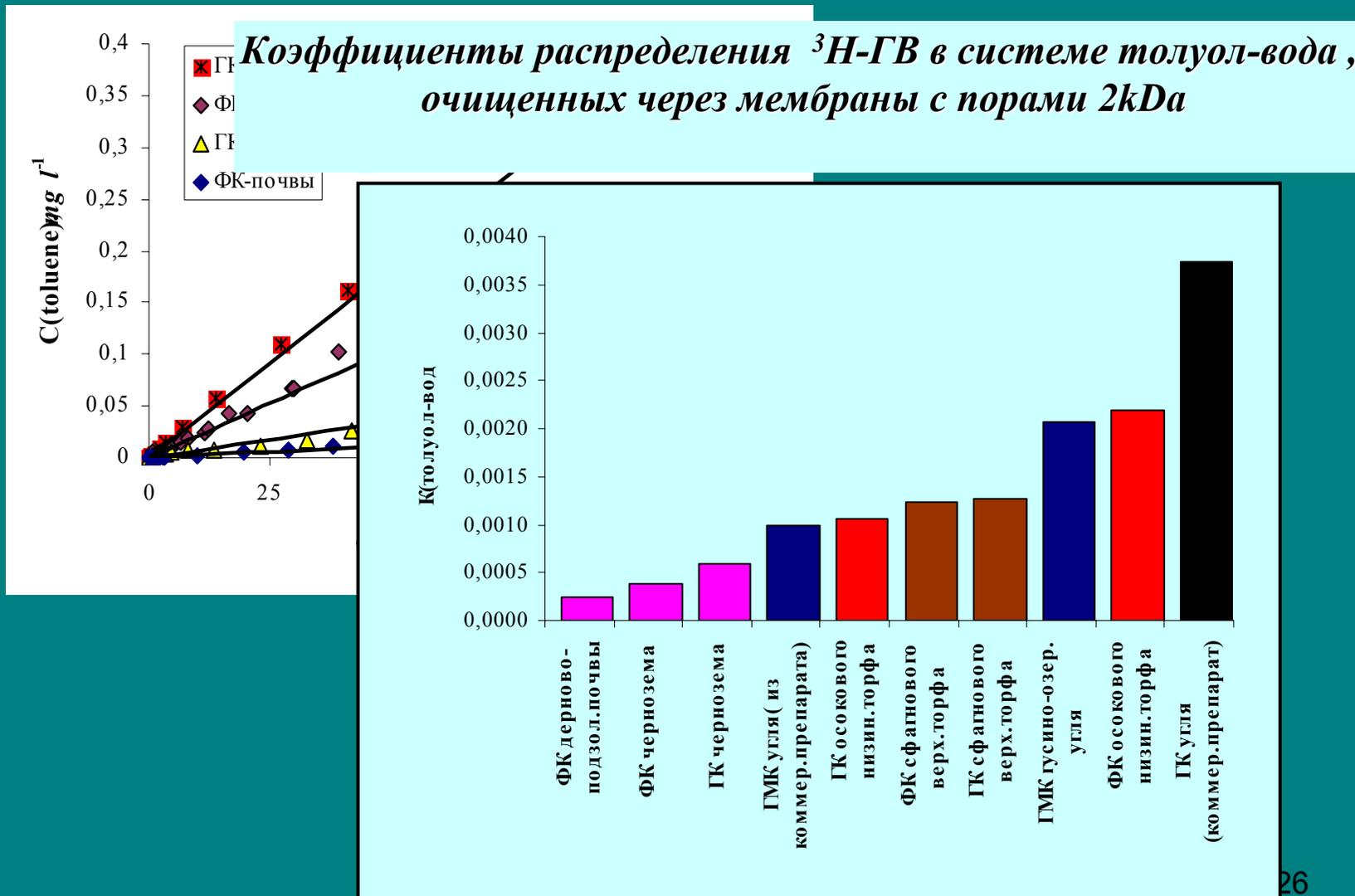
Liquid  
scintillation  
spectrometer

0.8 ml of  $^3\text{HHS}$  solution

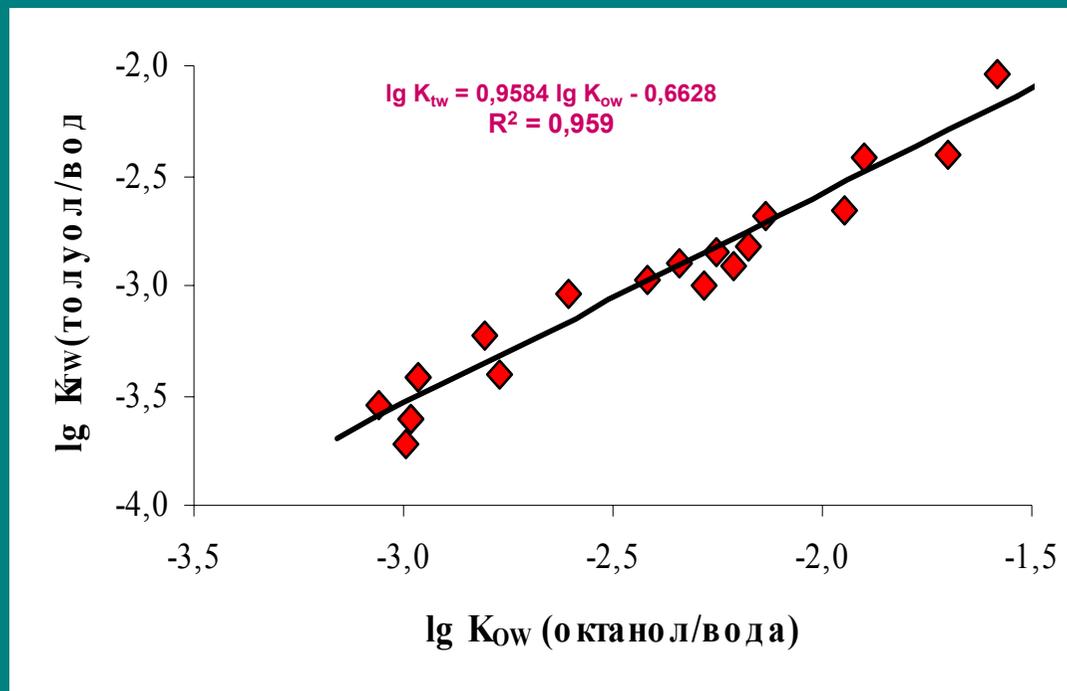
$$I_v = (V/V_1) \cdot I_1$$

$$I_s = I - (V/V_1) \cdot I_1$$
$$I_s = I_2 - (V/V_1 - 1) \cdot I_1$$

**Рисунок . Зависимость равновесной концентрации ГВ в орг.фазе от их концентрации в водной фазе**



*Рисунок . Корреляция между коэффициентами распределения ГВ в системах толуол-вода ( $K_{tw}$ ) и октанол-вода ( $K_{ow}$ )*



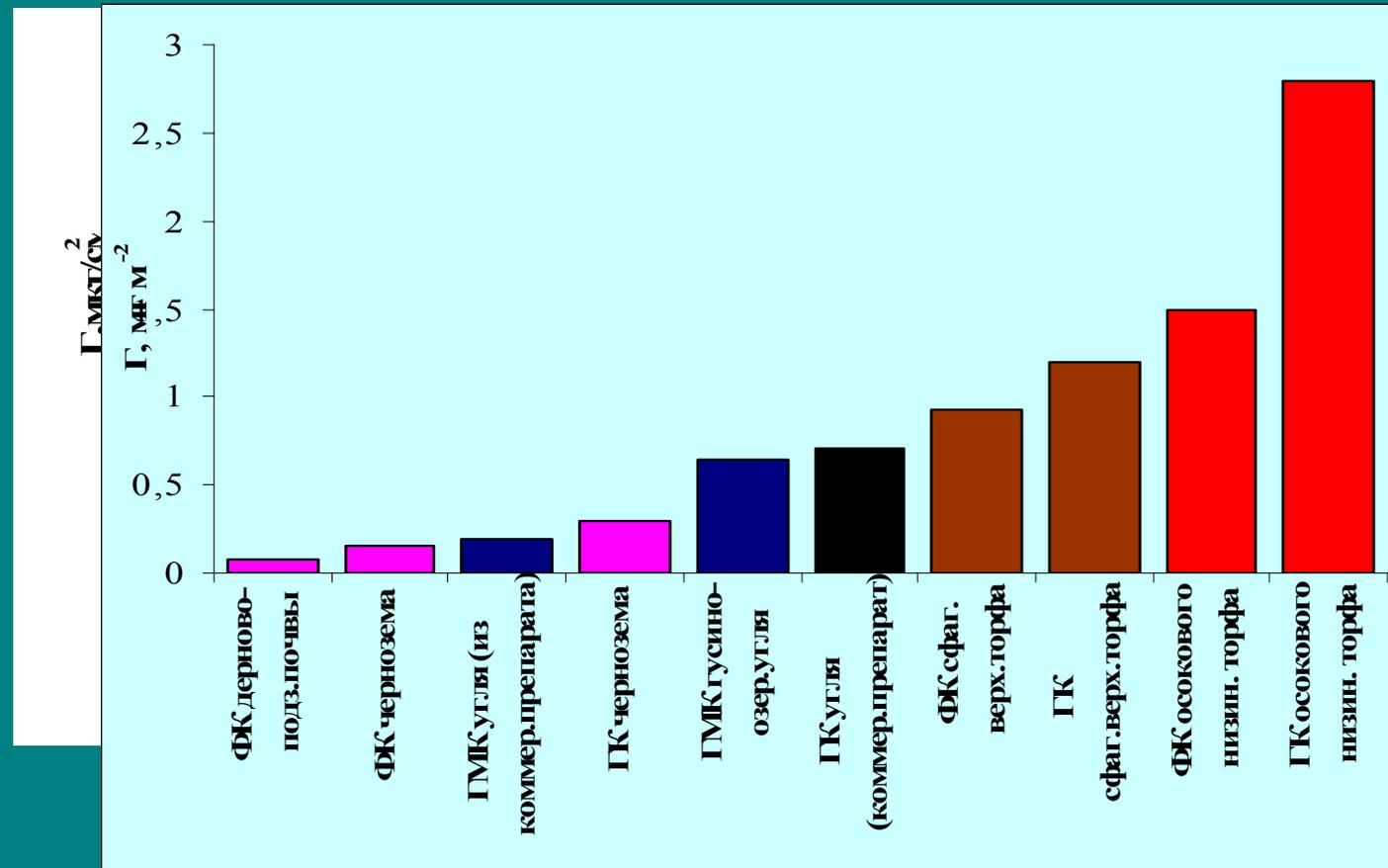
## Шкала гидрофобности ГВ

гидрофобность ГВ увеличивается в следующем порядке:

ФК почв < ГК почв < ГК торфа ≈ ФК торфа < ГК угля

Рисунок . Изоте  
на гра

Максимальное значение адсорбции ГВ  
на границе раздела толуол-вода



Ряд изменения адсорбции препаратов ГВ на границе толуол-вода :  
ФК почв < ГК почв < ГК угля < ФК торфа < ГК торфа

погл  
още  
ние  
при  
254  
нм

А) Б)

254  
нм

**Таблица Влияние размера пор диализных мембран на потери препаратов в процессе очистки.**

Препарат	MWCO мембраны для диализа, кДа	% от исходного количества	Удельная радиоактивность, ГБк/г**
ГК угля	12	23	14***
ГК угля	2	96	197
ГК торфа	12	69	255
ГК торфа	2	81	280
ФК торфа	12	24	179
ФК торфа	2	53*	177

Рис  
ди

сле

Примечания: (\*) – произошли неконтролируемые потери препарата в процессе очистки; (\*\*\*) – условия введения метки в препараты существенно различались; (\*\*\*) – в пересчете на 100 %-ное содержание трития в газе при введении метки;

**Таблица Коэффициенты распределения  $K_{tw}$  и величины адсорбции в интервале 50-100 мг/л очищенных диализом мембранами с разными размерами пор.**

<b>Препарат</b>	<b>MWCO мембраны для диализа, кДа</b>	<b>Коэффициенты распределения, <math>K_{tw} \times 10^3</math></b>	<b>Адсорбция на интерфейсе толуол-вода, мг*м<sup>-2</sup></b>
<b>СНА-Pow</b>	<b>12</b>	<b>5.6±0.6</b>	<b>2.9±0.4</b>
<b>СНА-Pow</b>	<b>2</b>	<b>3.7±0.2</b>	<b>0.7±0.07</b>
<b>РНА-T5H-98</b>	<b>12</b>	<b>1.5±0.2</b>	<b>1.3±0.1</b>
<b>РНА-T5H-98</b>	<b>2</b>	<b>1.2±0.1</b>	<b>1.2±0.1</b>
<b>РФА-T5H-98</b>	<b>12</b>	<b>1.5±0.2</b>	<b>1.3±0.2</b>
<b>РФА-T5H-98</b>	<b>2</b>	<b>1.3±0.1</b>	<b>0.9±0.2</b>

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗРАБОТАННЫХ МЕТОДОВ  
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ  
СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО  
ПРЕПАРАТА – ЛИГФОЛА**

## Лигфол (гуминоподобное вещество)-продукт переработки целлюлозы

**Таблица . Характеристика меченых препаратов лигфола.**

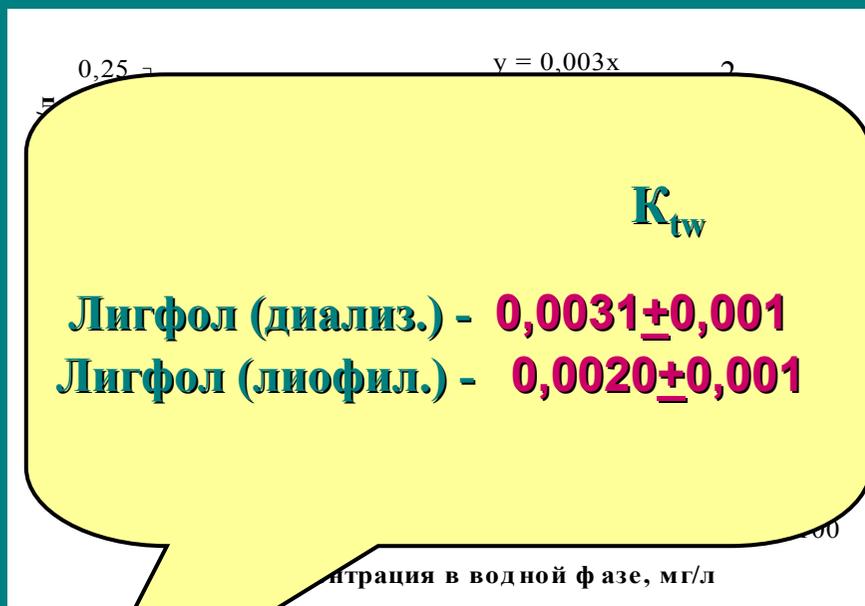
П р е п а р а т	Способ очистки от лабильной метки	Исходная р/акт-ть, МБк	Р/акт-ть после очистки, МБк	Удельная радиоактивность очищенного препарата, ГБк/г		Выход (остаток после очистки)
				реальная (25%-ный третий)	пересчет на 100%-ный третий	
1	диализ	165	49,7	115	460	67%
2	лиофилизация	149	58,3	93	370	98%

При  
пр  
1 -

2 – меченый препарат, подвергнутый  
при очистке лиофилизации;  
3 – меченый препарат, очищенный  
с помощью диализа.

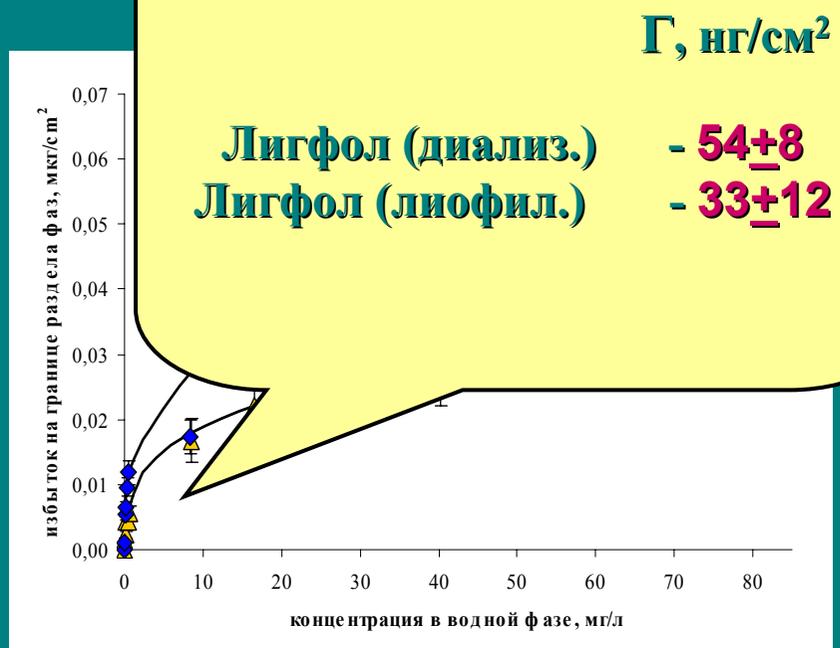
1 – меченый препарат, подвергнутый  
при очистке лиофилизации;  
2 – меченый препарат,  
очищенный с помощью диализа.

Зависимость концентрации лигфола в толуоле от его концентрации в водной фазе



- 1 – меченый препарат, подвергнутый лиофилизации при очистке;
- 2 – меченый препарат, очищенный с помощью диализа.

Изотерма адсорбции лигфола на границе раздела



- 1 – меченый препарат, подвергнутый лиофилизации при очистке;
- 2 – меченый препарат, очищенный с помощью диализа.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ ГВ  
В ЭКСПЕРИМЕНТАХ ПО ИССЛЕДОВАНИЮ  
ИХ СВЯЗЫВАНИЯ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ  
МЕМБРАНАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ И  
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИХ ПОСТУПЛЕНИЯ  
В РАСТЕНИЯ ЧЕРЕЗ КОРНЕВУЮ СИСТЕМУ**

## Выводы

- Разработан способ получения меченных тритием гуминовых веществ с равномерным распределением метки по компонентам препарата. Для выбора оптимальных условий введения тритиевой метки в гуминовые вещества были проведены модельные эксперименты с индивидуальными веществами. Было установлено, что наилучшие условия для получения меченых гуминовых веществ с минимальным количеством побочных продуктов и равномерным распределением трития по компонентам препаратов создаются при давлении газа не выше 0.5 Па, времени реакции 10 секунд и температуре атомизатора от 1900 до 2000 К. Равномерность распределения трития по компонентам меченых препаратов гуминовых веществ подтверждена с помощью эксклюзионной хроматографии.
- Для очистки меченых препаратов гуминовых веществ от лабильной метки предложено использовать диализ через мембраны с размером пор MWCO 2000-12000 Да в фосфатном буфере при pH 6.8 в течение 30 суток при 40 С. Показано, что при использовании мембран с большим диаметром пор возможно обеднение препаратов низкомолекулярными фракциями, однако удельная радиоактивность препаратов оставалась при этом постоянной, что подтверждало равномерность распределения трития по компонентам препарата.
- Разработан новый вариант метода сцинтиллирующей фазы с целью его использования для определения гидрофобности и поверхностной активности гуминовых и гуминоподобных веществ. Достоверность получаемых результатов была подтверждена при исследовании меченных тритием аминокислот и поверхностно-активных веществ.

- С помощью метода сцинтиллирующей фазы определены коэффициенты распределения гуминовых веществ различного происхождения в системе толуол-вода, а также получены изотермы адсорбции гуминовых веществ на границе раздела вода-толуол. Найдена хорошая корреляция между коэффициентами распределения гуминовых веществ в системах вода-толуол и вода-октанол, что позволило построить шкалу гидрофобности, согласно которой гидрофобность гуминовых веществ увеличивается в следующем порядке:  $\text{ФК почв} < \text{ГК почв} < \text{ГК торфа} \approx \text{ФК торфа} < \text{ГК угля}$ . Получен ряд адсорбционной способности гуминовых веществ на границе вода-толуол, который выглядит следующим образом:  $\text{ФК почв} < \text{ГК почв} < \text{ГК угля} < \text{ФК торфа} < \text{ГК торфа}$ .
- Разработанные методики были использованы для получения меченного тритием биологически активного препарата лигфол (гуминоподобное вещество). Равномерность распределения трития по компонентам лигфола подтверждена с помощью эксклюзионной хроматографии. С помощью меченного тритием лигфола и метода сцинтиллирующей фазы были определены коэффициенты распределения лигфола между водой и толуолом, а также найдена величина адсорбции на границе раздела вода-толуол.
- С помощью жидкостного сцинтилляционного счета и автордиографии на примере бактерий *Escherichia coli* и растений мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L была показана возможность использования меченных тритием препаратов ГВ в биологических исследованиях, направленных на изучение поглощения и распределения сложных смесей органических веществ природного происхождения в живых организмах.

## Автор выражает благодарность

- своему научному руководителю к.х.н. Бадуну Г.А. и его научной группе
- профессору д.х.н. Федосееву В.М.
- д.х.н. Перминовой И.В. и ее научной группе
- к.х.н. Куликовой Н.А.
- к.х.н. Коробкову В.И.

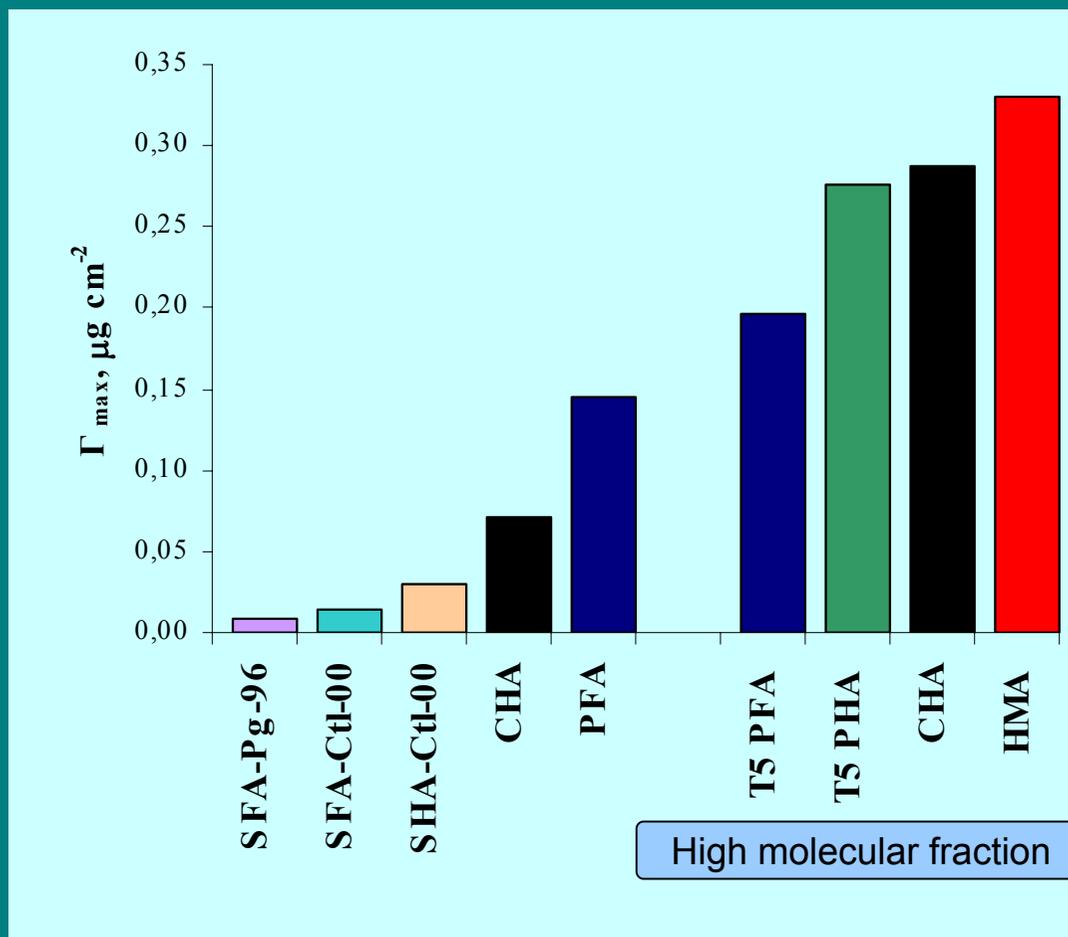
**СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!**



# Характеристика ГВ

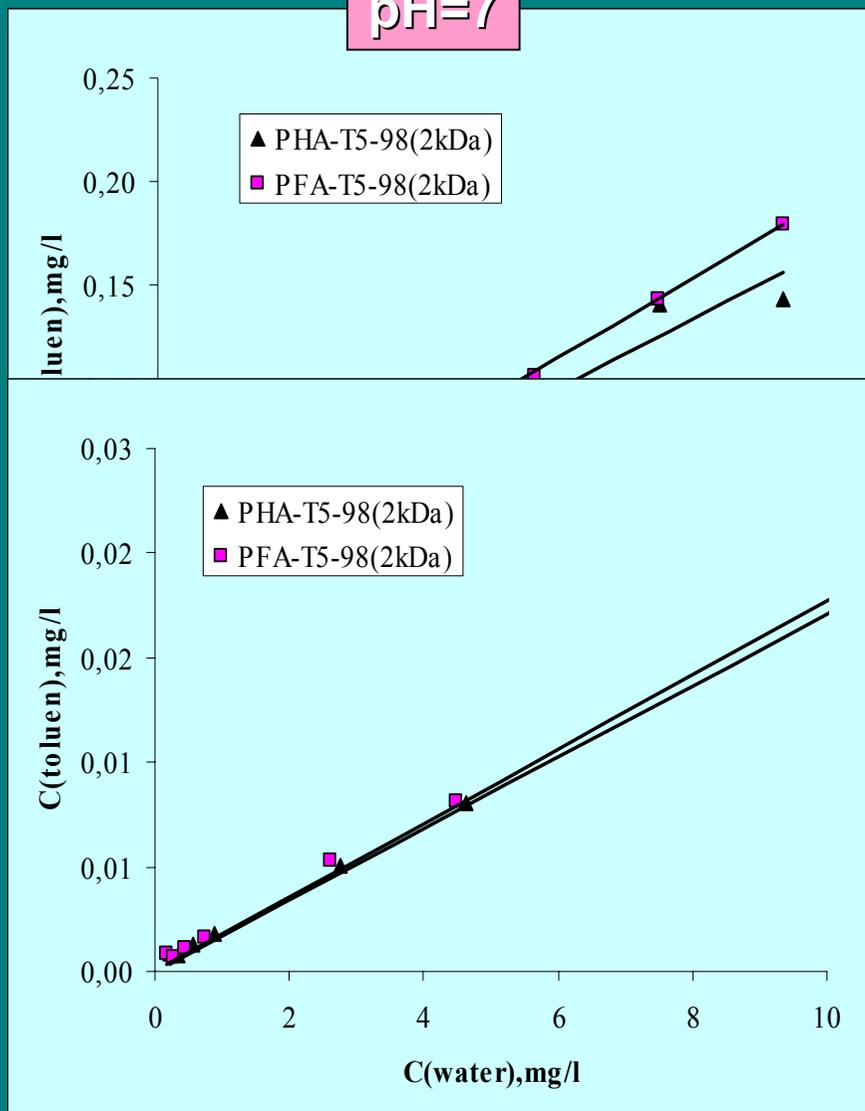
ГВ	Источник	Atomic ratio			KDa	13C-ЯМР
		H/C	O/C	N/C	M <sub>p</sub>	CArC,H
CHA-Pow	Коммерческий препарат(леонардит)	0,87	0,50	0,02	20,0	49,9
CHM-Pow	Получен из коммер. препарата(леонардита)	0.82	0.49	0.07	18.0	42,6
CHM-G102	Торф(Арюна)	1,22	0,50	15	43,8	43,7
SHA-Ctl-00	Гор. А чернозема типичного (Липец. обл.)	0,79	0,35	0.07	15,1	40,8
SFA-Ctl-00	гор. А чернозема типичного (Липец. обл.)	0,81	0,52	0.06	11,3	
SFA-Pg-96	гор. А дерново подзолистой почвы (Московская обл.)	0,88	0,61	0.05	11,1	28,2
PHA-Sk3-00	торф (оз. Сахтыш, Ивановская обл.)	1,15	0,66	0.06	14,2	29,2
PFA-Sk3-00	торф (оз. Сахтыш, Ивановская обл.)	1,18	0,89	0.04	8,2	
PHA-T5H-98	сфагновый торф (Тверская обл.)	0,93	0,50	0,02	32,2	32,2
PFA-T5H-98	сфагновый торф (Тверская обл.)	1,02	0,67	0,04	15,4	24,3

# Максимальное значение адсорбции ГВ на границе раздела толуол-вода.

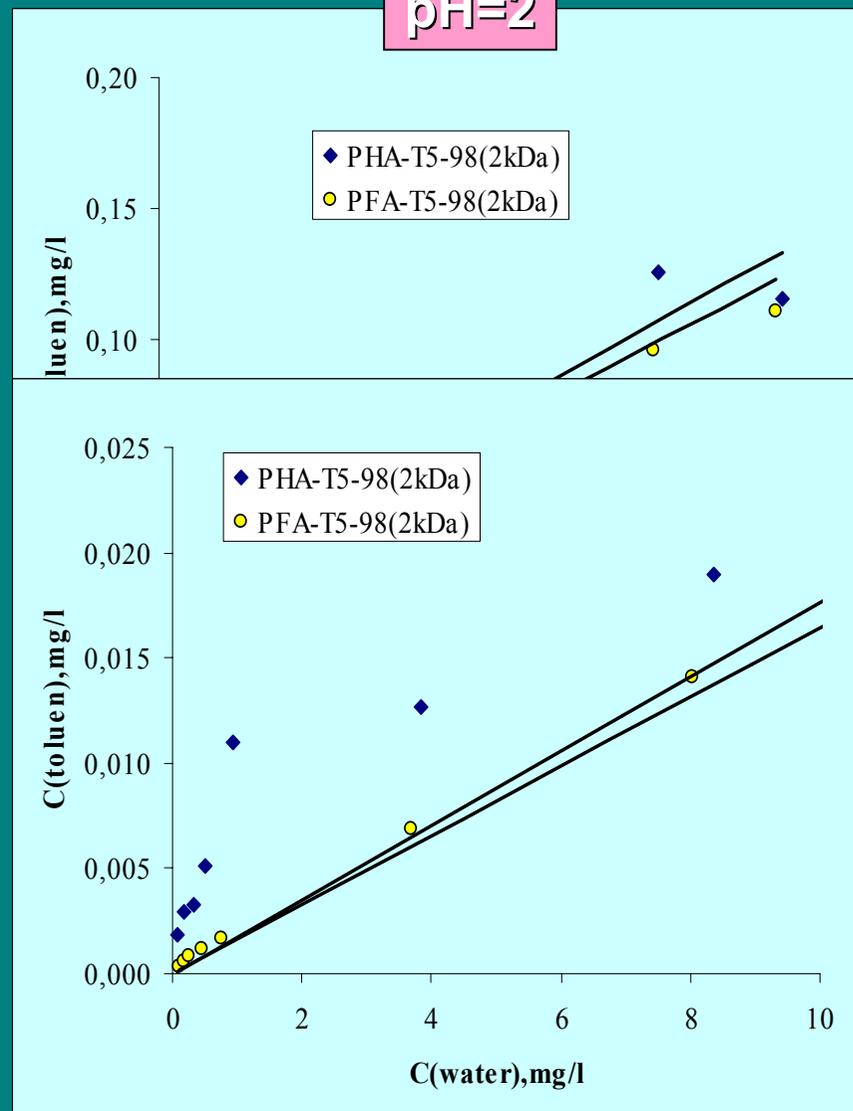


## Зависимость равновесной концентрации ГВ торфа в орг.фазе от их концентрации в водной фазе (рН=7и рН=2).

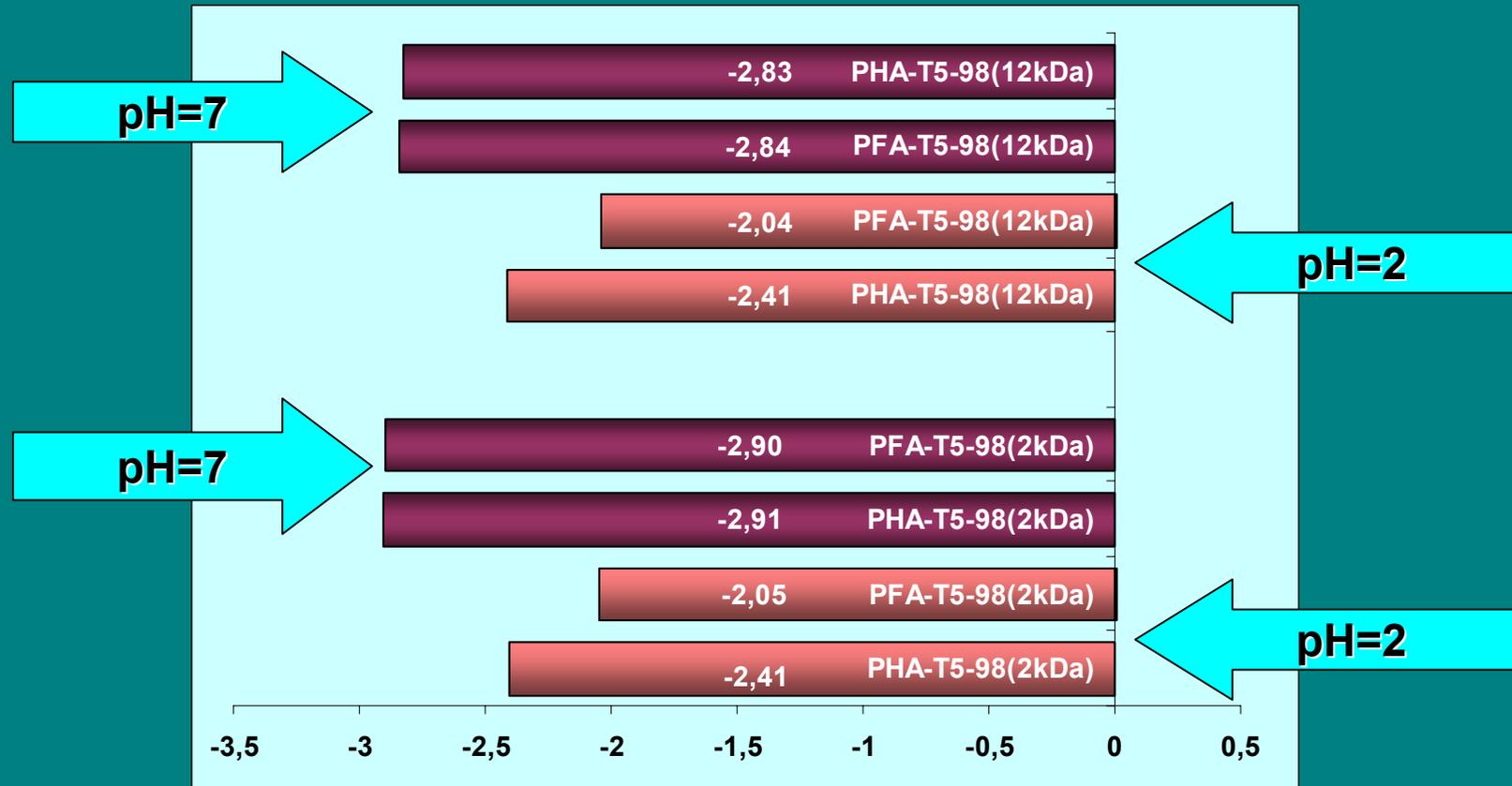
рН=7



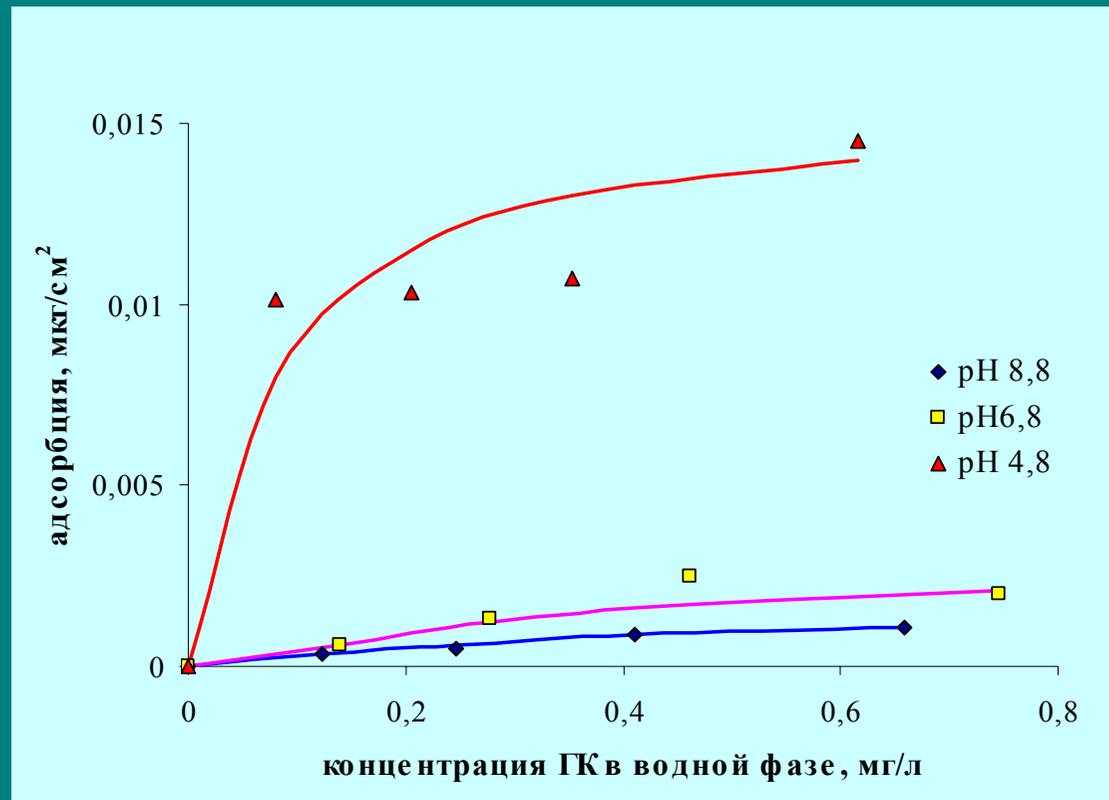
рН=2



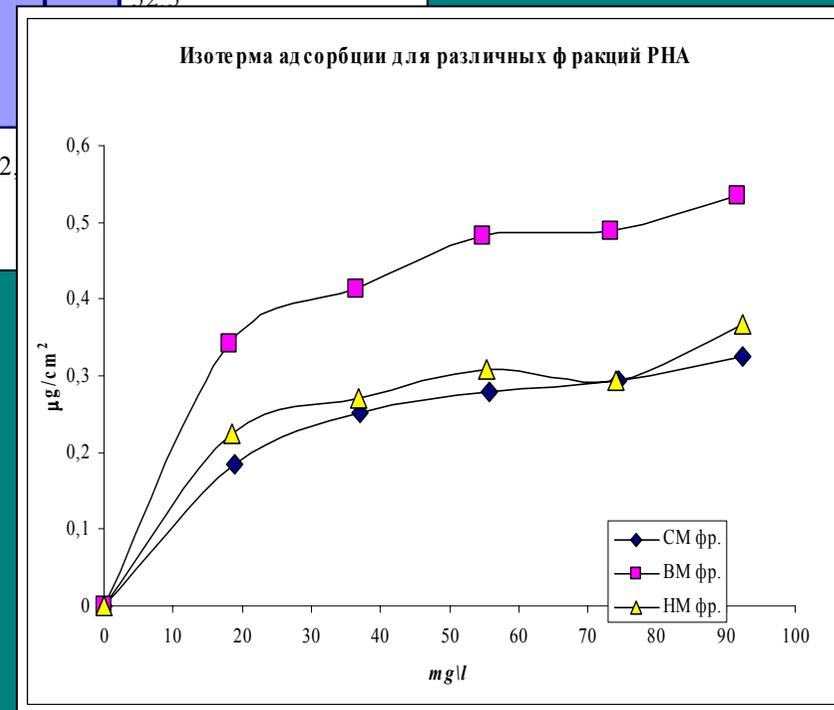
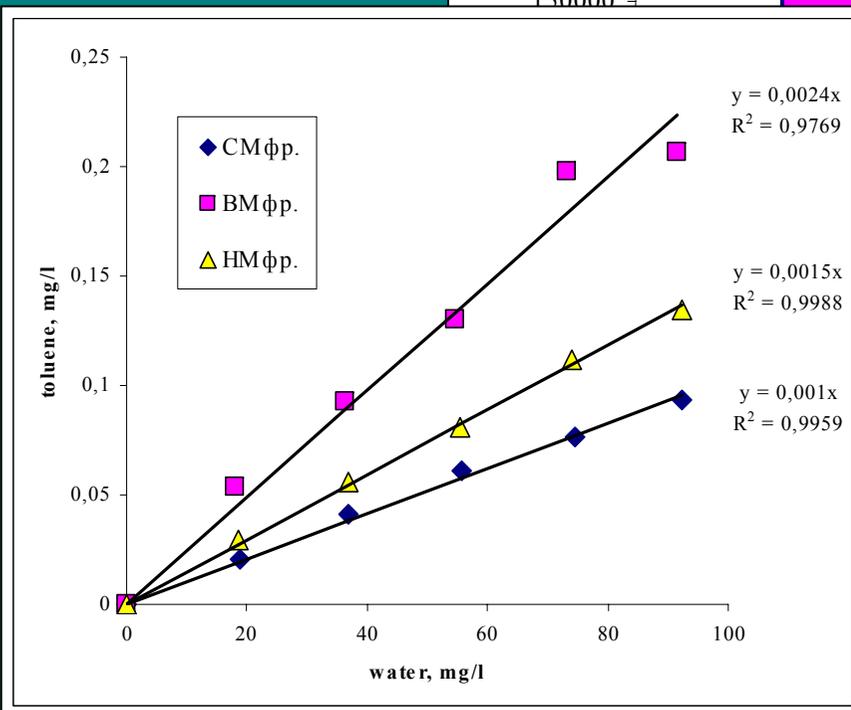
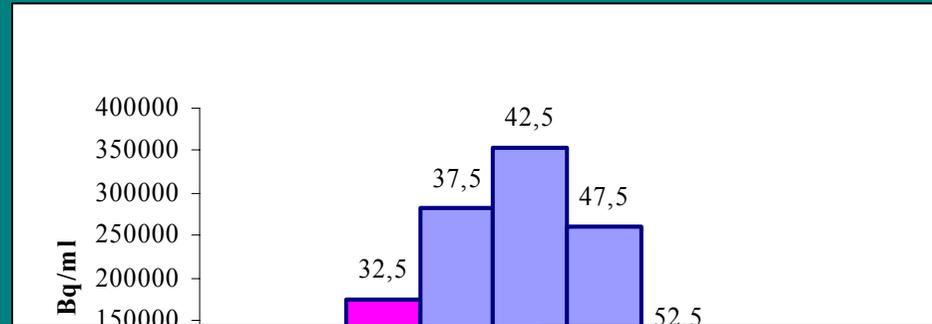
Коэффициенты распределения PFA-T5-98 и PHA-T5-98, очищенных через мембраны с порами 2kDa и 12kDa при pH=2 и 7.



## Изотерма адсорбции SFA-Pg-96 на границе вода-толуол при pH=4,8-8,8 водного буфера.



# Двухфазный эксперимент с разными фракциями препарата РНА Sk03



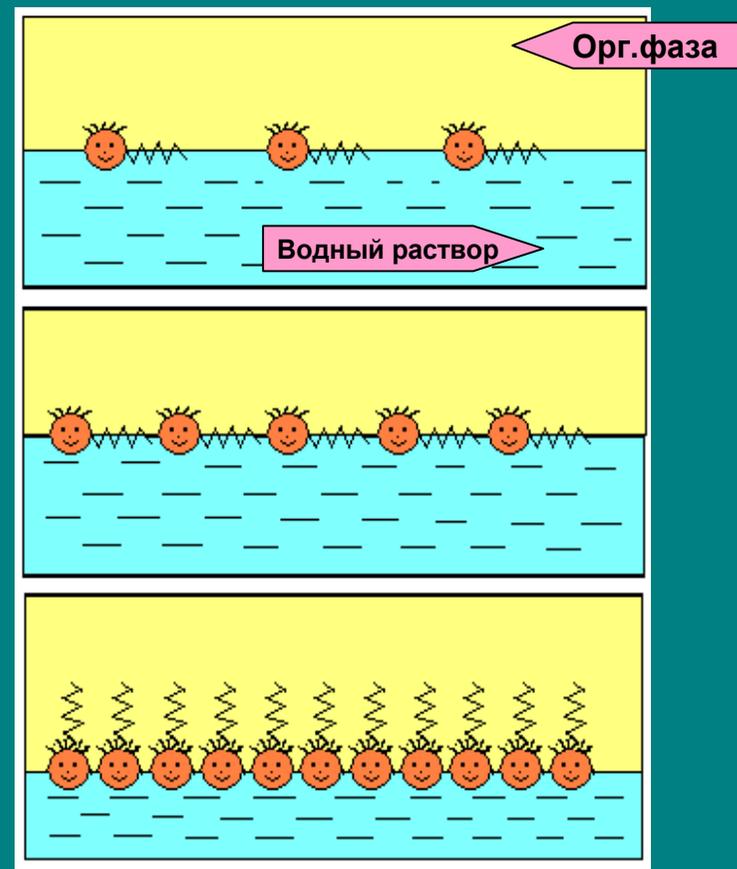
## ➤СТАВ

*Коэффициент распределения  
СТАВ в системе толуол-вода  
при концентрации ПАВ  
в воде  $2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$   
 $D=0,019 \pm 0,002$*

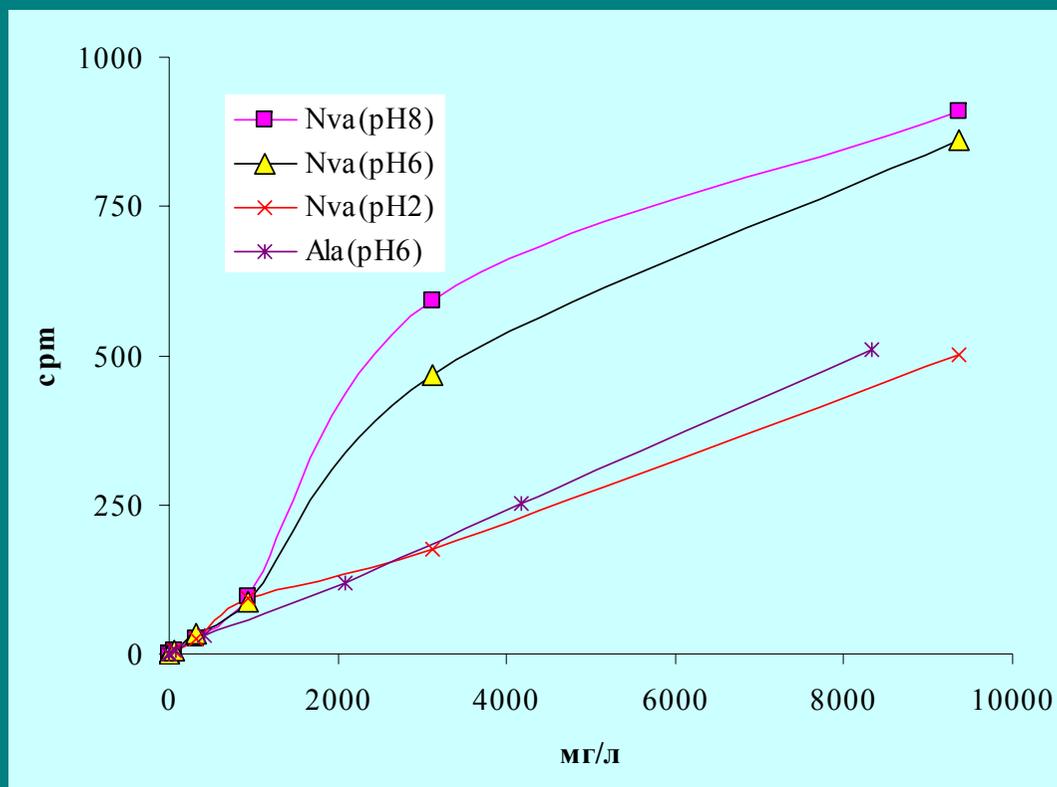
При  $C(\text{СТАВ})=0,17 \text{ мкМ}$   
Толщина слоя  $0,26 \text{ \AA}$

При  $C(\text{СТАВ})=0,03 \text{ мМ}$   
Толщина слоя  $2 \text{ \AA}$   
 $0,9$  молекулярных слоя

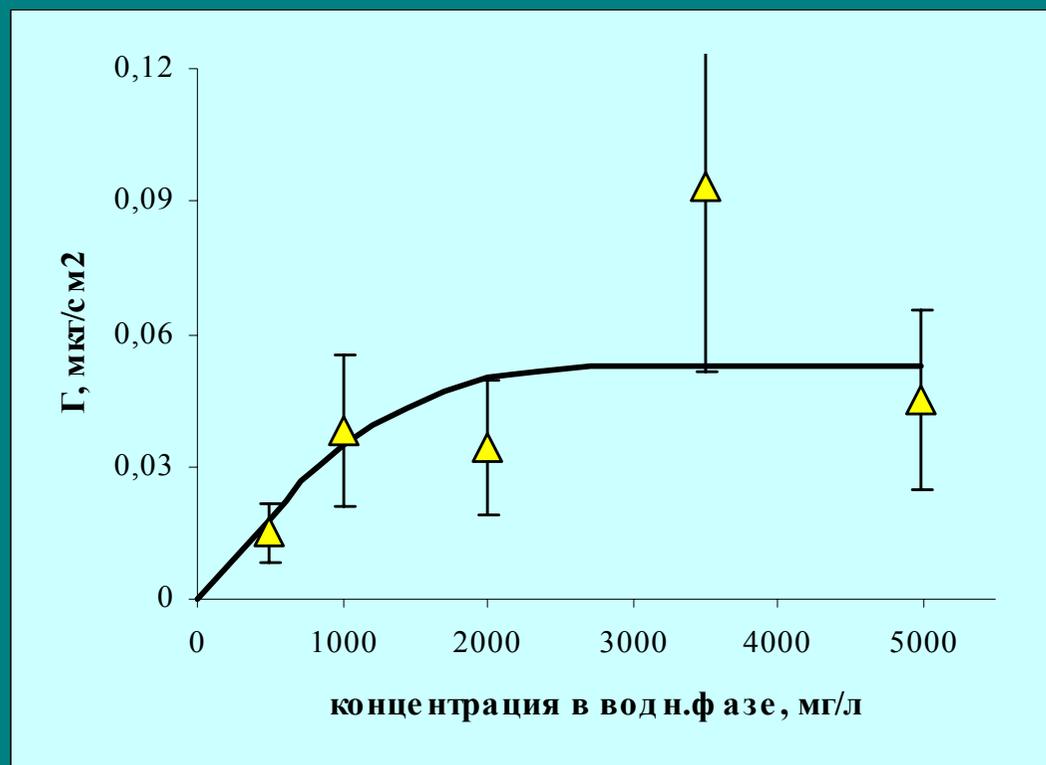
При  $C(\text{СТАВ})=0,43 \text{ мМ}$   
Толщина слоя  $14,3 \text{ \AA}$   
 $0,96$  молекулярных слоя



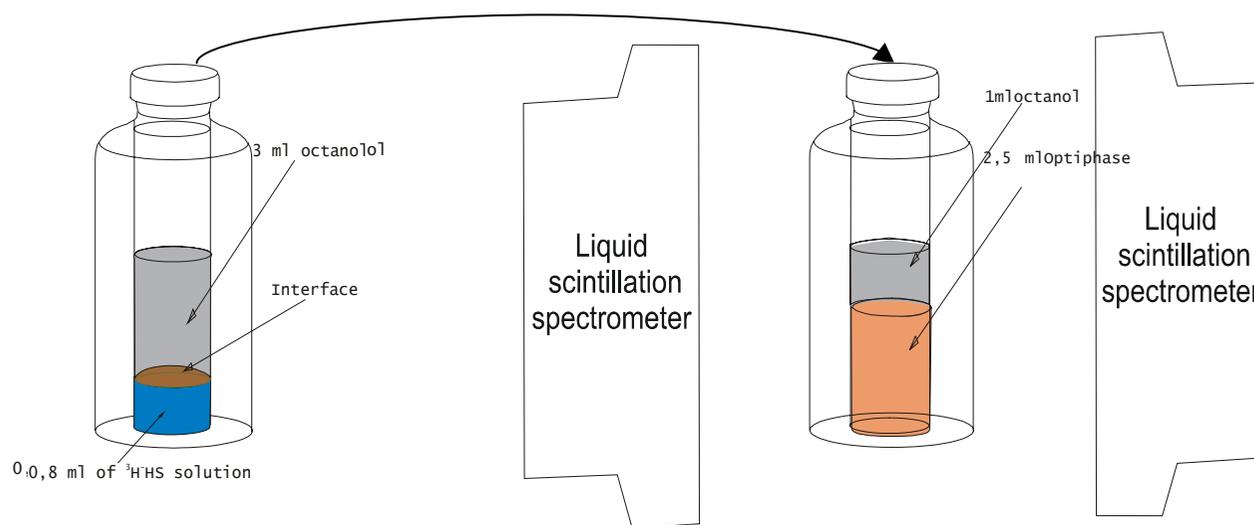
## Зависимость скорости счета с границы раздела фаз от концентрации аминокислоты в водной фазе.



## Изотерма адсорбции норлейцина (pH=6).



# Определение октанольно-водного коэффициента



# Зависимость концентрации ГВ в октаноле от времени выдерживания

