

На правах рукописи

Гречищева Наталья Юрьевна

Взаимодействие гумусовых кислот с полиядерными ароматическими углеводородами: химические и токсикологические аспекты

02.00.03 –Органическая химия

11.00.11 –Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва-2000

Работа выполнена в лаборатории физической органической химии кафедры органической химии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова и в Аналитическом Центре по Охране Окружающей среды при ВНИИ Природы.

Научные руководители: кандидат химических наук, с.н.с.
И.В. Перминова
доктор химических наук, профессор В.С. Петросян

Научный консультант: доктор биологических наук, в.н.с. Д.Н. Маторин

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
В.И. Келарев
доктор химических наук, чл.- корр. РАН
Н.П. Тарасова

Ведущая организация: Российский Университет Дружбы Народов
им. Патриса Лумумбы

Защита состоится “ ____ ” _____ 2000 года в ____ час. ____ мин на заседании диссертационного Совета Д 053.27.11 при Российском Государственном Университете нефти и газа им. И.М. Губкина по адресу: 117917, Москва, ГСП-1, Ленинский проспект, д. 65.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке РГУ нефти и газа им. И.М. Губкина.

Автореферат разослан “ ____ ” _____ 2000 года.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета
кандидат технических наук

Иванова Л.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Гумусовые кислоты представляют собой наиболее обширный класс природных соединений, входящих в состав органического вещества почв, природных вод и твердых горючих ископаемых. Наличие в молекулах гумусовых кислот ароматического каркаса, замещенного карбоксильными, гидроксильными и карбонильными группами, обеспечивает их высокое сродство к полиядерным ароматическим углеводородам (ПАУ). В связи с этим взаимодействие с гумусовыми кислотами является важнейшим фактором, контролирующим концентрацию свободной формы ПАУ в водных экосистемах. Учитывая, что именно свободная форма обладает максимальной токсичностью, гумусовые кислоты можно рассматривать как детоксиканты по отношению к ПАУ. Необходимость создания адекватных моделей биогеохимических циклов и прогноза развития токсикологической ситуации в загрязненных экосистемах определяет важность и актуальность изучения связывающей способности гумусовых кислот по отношению к ПАУ и установления количественных соотношений между строением, связывающей способностью и детоксицирующими свойствами гумусовых кислот.

Цель работы: изучить связывающую способность и детоксицирующие свойства гумусовых кислот по отношению к ПАУ и установить их взаимосвязь со строением гумусовых кислот.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- определить константы связывания ПАУ гумусовыми кислотами различного происхождения и фракционного состава ;
- установить корреляционные соотношения между константами связывания и структурными параметрами гумусовых кислот;
- количественно охарактеризовать детоксицирующие свойства гумусовых кислот по отношению к ПАУ;
- установить взаимосвязь детоксицирующих свойств со структурными параметрами и связывающей способностью гумусовых кислот по отношению к ПАУ.

Научная новизна. Впервые использована обширная выборка препаратов гумусовых кислот различного происхождения для установления корреляционных соотношений между структурой и связывающей способностью гумусовых кислот по отношению к ПАУ. Это позволило рассчитывать статистически значимые зависимости структура-свойство и проверять их устойчивость к изменениям в составе выборки, использованной для проведения корреляционного анализа.

Предложено использование комбинированных дескрипторов, рассчитываемых из данных спектроскопии ЯМР ^{13}C , для установления корреляционных соотношений между структурой гумусовых кислот и константами связывания ПАУ.

Установлено, что самой высокой предсказательной силой по отношению к константам связывания ПАУ и устойчивостью соответствующих корреляционных соотношений обладают дескрипторы ароматичности, рассчитываемые из данных спектроскопии ЯМР ^{13}C . Показано, что значимость корреляций с другим широко используемым дескриптором -

молекулярной массой - существенно зависит от состава выборки препаратов. Корреляционные взаимосвязи между ароматичностью гумусовых кислот и их сродством к ПАУ подтверждены экспериментально.

Разработан подход для количественной оценки детоксицирующей способности гумусовых кислот с помощью константы связывания, рассчитываемой из токсикологических данных. Установлено, что данные константы хорошо согласуются с определенными по методу тушения флуоресценции.

Показано, что максимальной прогностической силой в отношении детоксицирующей способности гумусовых кислот обладают дескрипторы ароматичности. Сделан вывод о том, что основным механизмом детоксикации ПАУ гумусовыми кислотами является образование нетоксичных аддуктов ПАУ-ГФК.

Практическая значимость работы. Полученные значения констант связывания пирена, флуорантена и антрацена гумусовыми кислотами могут быть использованы для создания моделей биогеохимических циклов ПАУ, учитывающих взаимодействия с органическим веществом природных сред. Знание констант позволяет рассчитывать концентрацию свободной, то есть биологически активной формы ПАУ в природных средах, что может быть использовано для получения адекватных оценок опасности загрязнения.

Установленные количественные зависимости "структура гумусовых кислот - константы связывания ПАУ" могут быть использованы для разработки системы структурного скрининга в целях выявления гуминовых препаратов, производимых промышленным способом, обладающих максимальной связывающей и детоксицирующей способностью по отношению к ПАУ. Данные препараты могут быть использованы в качестве детоксицирующих агентов (сорбентов) для рекультивации загрязненных ПАУ сред.

Полученные данные по влиянию гумусовых кислот на токсичность ПАУ могут быть использованы для прогноза токсикологической ситуации в экосистемах, загрязненных ПАУ.

Материалы диссертации могут быть использованы при чтении спецкурсов по химии и охране окружающей среды.

Апробация работы. Отдельные части работы доложены на I Всемирном конгрессе и XVIII Конференции Общества по токсикологии и химии окружающей среды (SETAC) (Лиссабон, 1993, Сан Франциско, 1997), Международном конгрессе "Вода: экология и технология" (Москва, 1994), VII, VIII и IX Конференциях Международного общества по изучению гумусовых веществ (IHSS) (Тринидад и Тобаго, 1994; Вроцлав, Польша, 1996, Аделаида, Австралия, 1998), VII Европейской конференции по спектроскопии биологических молекул (Мадрид, 1997), Международном симпозиуме IHSS "Гумусовые вещества в транспортных процессах" (Анахайм, США, 1997), XVI Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Санкт-Петербург, 1998), на IX Конференции Европейского общества по токсикологии и химии окружающей среды (SETAC-Europe) (Лейпциг, 1999), на XVII Международном симпозиуме по полиядерным ароматическим углеводородам (ISPAC) (Бордо, 1999).

Публикации. По материалам работы опубликовано 6 статей и 10 тезисов докладов.

Структура диссертационной работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений с данными некоторых экспериментов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Краткая характеристика объекта исследования

Гумусовые кислоты (для обозначения гумусовых кислот в дальнейшем будет использована аббревиатура ГФК) образуются в природных средах в результате химического и биологического разложения растительных и животных остатков. В основе данного процесса лежит стохастический отбор наиболее устойчивых к биodeградации структур и соединение их в макромолекулы. Для строения ГФК характерно наличие структурных блоков, принципиально различающихся по своей химической природе, и традиционно определяемых в терминах “ароматический каркас” и “углеводная периферия” (Рис.1). Указанная дифференциация основывается на результатах гидролитического расщепления ГФК, свидетельствующих о вхождении в состав гумусовых макромолекул негидролизуемой (каркас) и гидролизуемой (периферия) частей.

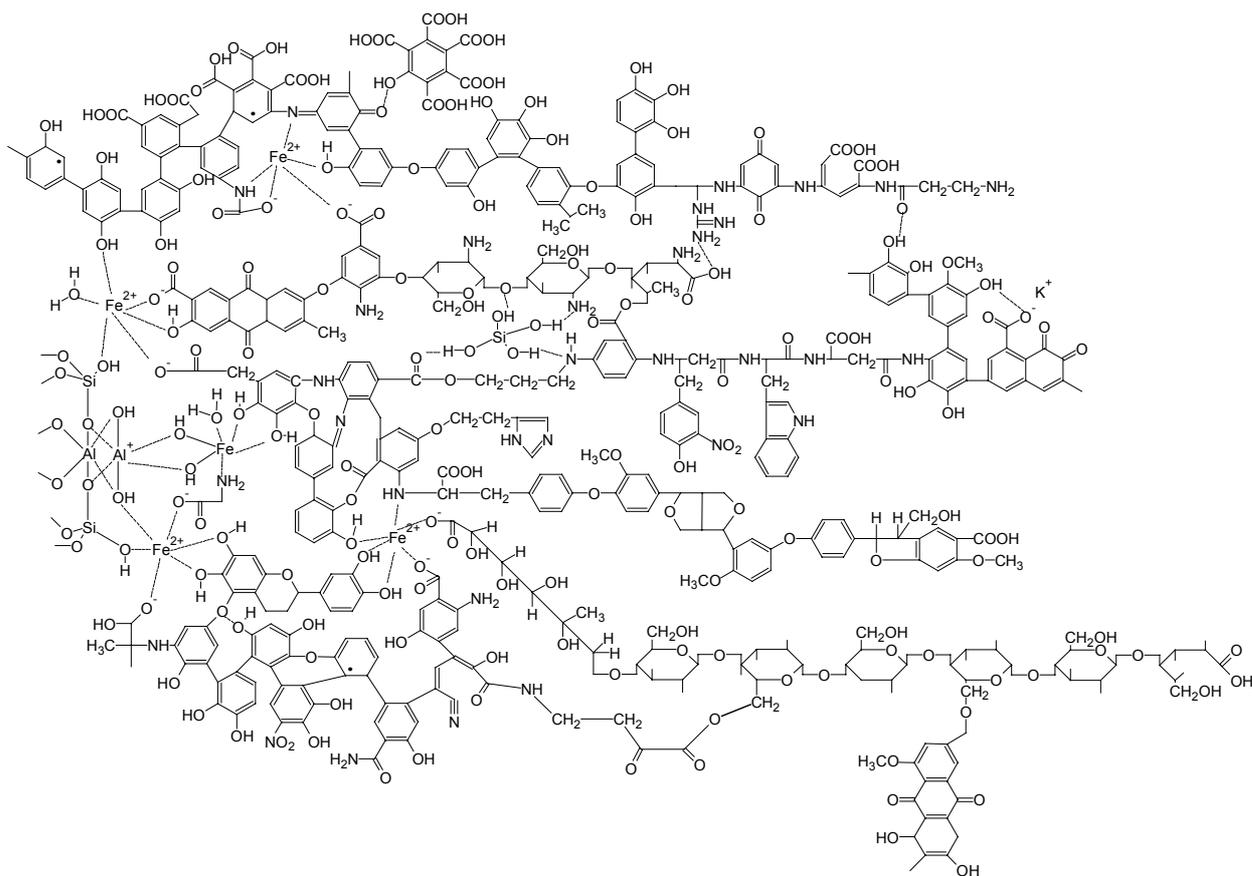


Рис. 1. Гипотетический средний структурный фрагмент ГФК почв (Kleinhempel, 1970)¹.

Наличие гидрофобного ароматического каркаса, замещенного карбоксильными, гидроксильными и карбонильными группами, определяет способность ГФК связывать ПАУ - один из наиболее опасных классов экотоксикантов. В то же время гидрофильные периферические фрагменты могут ослаблять взаимодействие ГФК с ПАУ за счет

¹ Kleinhempel F.//Albrecht-Thaer-Archiv., 1970, Bd.14, H.1, S. 3-14.

экранирования реакционных центров каркасной части. Поэтому сродство ГФК к ПАУ, по-видимому, будет зависеть от соотношения каркасной и периферической частей в составе гумусовых макромолекул.

Важнейшим экологическим последствием связывания ПАУ гумусовыми кислотами является снижение токсичности ПАУ в результате уменьшения концентрации их свободно растворенной формы. При этом величина детоксицирующего эффекта будет зависеть как от содержания ГФК в природной среде, так и от степени их сродства к ПАУ, определяемого особенностями строения ГФК.

Данный факт обуславливает необходимость комплексного исследования строения, связывающей способности и детоксицирующих свойств ГФК по отношению к ПАУ и изучения их взаимосвязи.

Характеристика использованных в работе препаратов гумусовых кислот

В работе использовано 28 препаратов гумусовых кислот, находящихся в распоряжении нашей рабочей группы. Источники происхождения препаратов: природные воды (река Москва, Северная Двина и болотная вода), почвы различной зональности и сельскохозяйственного использования (дерново-подзолистые (П^д), серые лесные (Л) и черноземные (Ч)), верховые и низинные торфа различного геоботанического состава. Кроме того, в работе использованы два коммерческих гуминовых препарата угля. По фракционному составу препараты представляли собой сумму гуминовых и фульвокислот (ГФК), гуминовые кислоты (ГК) и фульвокислоты (ФК) (Табл.1).

Препараты гумусовых кислот представляли собой аморфные порошки от светло-желтого (ФК почв, ГФК природных вод) до черного (ГК угля) цвета. Они практически нерастворимы в большинстве органических растворителей, ограниченно растворимы в полярных апротонных растворителях (ДМСО, ДМФА) и воде, хорошо растворимы в водной щелочи (до 30 г/л). Все препараты охарактеризованы методами элементного анализа, гель-хроматографии, УФ-спектрофотометрии и спектроскопии ЯМР ¹³С.

Элементный состав исследуемых препаратов характеризовали с помощью органического микроанализа. Данные элементного анализа (С, Н, N, O) корректировали на содержание зольных элементов и влажность исходных препаратов. Зольность исследуемых образцов ГФК составляла 1-15%, влажность - 6-10% (Табл.1). Содержание кислорода рассчитывали по разности. Как видно из Табл. 1, элементный состав ГФК варьирует в зависимости от источника их происхождения. Содержание углерода возрастает в ряду: ФК почв < ГФК вод < ГК почв < ГФК торфов << ГК углей. Содержание кислорода в вышеприведенном ряду снижалось. Из данных элементного анализа рассчитывали соотношения Н/С и О/С, которые являются косвенными характеристиками, соответственно, ненасыщенности и окисленности молекул ГФК. При этом самые низкие атомные соотношения Н/С (0.5) наблюдались для ГК черноземов и углей, что свидетельствует о максимальном вкладе ненасыщенных фрагментов в их структуру. Наиболее высокие значения соотношения О/С, характерные для водных ГФК и ФК почв, указывают на повышенное содержание в этих препаратах кислородсодержащих функциональных групп.

Таблица 1

Источники происхождения и характеристики использованных в работе препаратов гумусовых кислот

Препарат ГФК	Источник происхождения	Содержание элементов (% масс)				H ₂ O %	Зольность %	Атомные соотношения		ε [*] ₂₈₀ л/мгС ×см	ММ КДа
		С	Н	N	O			H/C	O/C		
ГК почв											
HBW	П ^Д лес, Москва	50.2	3.9	4.7	41.2	12.4	8.9	0.93	0.57	0.08	12.2
HBWN	П ^Д лес, Новгород	57.2	4.5	4.1	34.3	7.2	8.7	0.95	0.45	0.09	14.3
НВР	П ^Д пашня, Москва	58.9	4.2	3.9	33.0	11.9	6.3	0.86	0.39	0.07	16.2
HBG	П ^Д огород, Москва	52.6	4.4	4.4	38.6	12.1	22.0	1.1	0.53	0.11	17.3
HGW	Л лес, Тула	43.8	3.6	4.2	48.4	9.8	1.0	0.97	0.78	0.07	16.4
HGP	Л пашня, Тула	49.5	3.6	4.5	42.3	12.4	6.8	0.88	0.62	0.08	14.5
HS	Ч луг., Воронеж	58.3	3.1	4.8	33.8	12.3	9.7	0.62	0.39	0.07	12.0
HST	Ч тип., Воронеж	56.2	2.3	3.8	37.7	11.6	4.1	0.51	0.48	0.12	12.6
ФК почв											
FBW	П ^Д лес, Москва	42.9	3.2	1.8	52.0	8.6	13.9	0.90	0.91	0.04	7.9
FBP	П ^Д пашня, Москва	45.9	4.1	4.4	45.6	8.2	7.0	1.06	0.74	0.04	7.9
FBG	П ^Д огород, Москва	46.8	3.6	3.1	46.5	9.2	8.0	0.92	0.75	0.03	10.6
FGW	Л лес, Тула	50.1	4.1	3.8	42.1	10.1	4.5	0.98	0.63	0.04	11.0
FST	Ч тип., Воронеж	50.2	3.4	3.7	42.6	8.6	4.2	0.81	0.64	0.05	9.6
ГФК почв											
SEL	Ч тип., Ставрополь	50.2	4.3	3.8	41.0	7.5	8.7	1.15	0.57	0.03	13.6
ГФК торфа											
T1	Верховой, фускум	54.6	4.6	2.1	38.7	8.1	2.4	1.01	0.48	0.07	18.5
T4	Верховой, сфагнум	52.6	4.3	2.6	40.1	7.3	1.5	1.07	0.55	0.06	18.5
T5	Верховой, сфагнум-	53.6	4.4	2.5	39.4	8.2	3.0	0.98	0.54	0.06	16.4
T6	Верховой, пушица	54.3	4.2	1.3	40.3	7.6	3.3	0.93	0.53	0.03	18.2
T7	Верховой, древесный	53.8	4.2	2.1	39.9	9.1	4.0	0.93	0.52	0.07	18.2
HTL	Верховой, древесно-травяной	55.3	4.1	2.4	38.1	9.3	1.4	0.89	0.49	0.05	17.3
TTL	Низинный, древесный	55.4	4.1	2.7	37.8	8.5	2.1	0.89	0.48	0.06	19.8
HTW	Водный экстракт верхового торфа	49.7	5.0	1.1	44.1	11.2	1.2	1.21	0.62	0.02	6.3
ГФК природных вод											
FMX	р.Москва	50.5	4.4	2.6	42.5	7.1	2.4	1.14	0.54	0.03	6.1
FMC	р.Москва	47.4	4.7	2.6	45.2	6.6	4.8	1.21	0.62	0.02	6.4
WM3X	р.Сев. Двина	40.2	4.7	1.4	53.3	6.3	23.0	1.41	1.00	0.04	6.6
SWA	Болотная вода	43.2	3.1	-	-	7.8	19.6	0.86	0.93	0.03	-
Коммерческие ГК угля											
ANA	ГК Aldrich	68.6	4.3	1.2	26.1	13.7	27.0	0.74	0.28	0.12	13.0
AGK	ГК АО Спецбиотех	64.0	3.9	0.6	30.4	11.7	14.6	0.73	0.34	-	18.5

Оптические свойства исследуемых препаратов характеризовали методом УФ-спектрофотометрии. Эффективный коэффициент поглощения (ϵ^*_{280}) рассчитывали, относя оптическую плотность при длине волны 280 нм (длина оптического пути 1 см), к концентрации ГФК, выраженной в кг органического углерода (С) на литр. Данные коэффициенты могут служить характеристиками ненасыщенности молекул ГФК. Значения

полученных коэффициентов приведены в Табл.1. Более высокие значения ε_{280}^* характерны для ГК почв (~ 0.10) и торфяных ГФК (~ 0.07), что указывает на большую ненасыщенность их каркасной части. Для ГФК вод и ФК почв ε_{280}^* значительно меньше и составляют ~ 0.04 - ~ 0.05 .

Молекулярные массы (ММ) исследуемых препаратов ГФК определяли с помощью гель хроматографии. В качестве калибровочных веществ использовали полидекстраны. Полученные значения пиковых ММ (определяемых по времени удерживания, соответствующего положению максимума на гель-хроматограмме) приведены в Табл. 1. Как видно из таблицы, препараты ГФК значительно различаются по ММ. Так, для торфяных препаратов она составляет:(в килодальтонах, КДа) - 16.4 - 19.8, для почвенных ГК - 12.0-17.3, для почвенных ФК - 7.9-11.0 и для водных ГФК - около 6.5. Особо следует отметить, что ГК черноземов характеризовались меньшей ММ, чем ГК П^Д и Л почв. Это может быть связано с высокой степенью деградации углеводного комплекса в черноземных почвах и наличием менее трансформированных полисахаридных цепочек в П^Д и Л почвах.

Распределение углерода между основными структурными фрагментами в исследуемых препаратах ГФК характеризовали методом спектроскопии ЯМР ¹³C. Данное исследование выполнено для 19 из 28 препаратов ГФК. Результаты приведены в Табл. 2. Содержание углерода различных типов определяли интегрированием соответствующих спектральных областей (м.д.): 185-220 - карбонильный углерод (C_{C=O}), 165-185 - углерод карбоксильных групп и их производных (C_{COOH(R)}), 145-165 - ароматический О-замещенный углерод (C_{Ar-O}), 108-145 - ароматический С- и Н-замещенный углерод (C_{Ar-H(R)}), 90-108 - ацетальный углерод (C_{O-Alk-O}), 48-90 - О-замещенный алифатический углерод, в основном углеводного типа (C_{Alk-O}), 5-48 - алифатический С- и Н-замещенный углерод алкильных групп (C_{Alk-H(R)}). Весь ацетальный углерод относили к углеводным фрагментам.

Согласно данным Табл. 2, содержание ароматического углерода в исследуемых препаратах ГФК уменьшается в ряду: ГК угля > ГК почв > ГФК торфа > ГФК природных вод. При этом максимальное содержание ароматического углерода среди ГК почв (54-55%) наблюдается для ГК черноземов, тогда как для ГК П^Д и Л почв оно не превышает 45-47%. Минимальным содержанием углеводных фрагментов характеризуются ГК черноземов (13%) и коммерческие препараты угля (6%). Содержание углерода алкильных групп выше для ГФК природных вод и ГК угля, в то время как наименьшее их количество обнаружено в ГК почв.

¹³C ЯМР - данные по содержанию ароматического углерода являются прямой количественной оценкой ароматичности ГФК. Их сопоставление с описанными выше косвенными индикаторами ненасыщенности структуры гумусовых макромолекул - Н/С и ε_{280}^* показало, что Н/С лучше согласуется с прямыми оценками ароматичности ГФК, чем ε_{280}^* ($r = -0.70$ и 0.62 , соответственно, $n = 20$). Следовательно, при отсутствии данных спектроскопии ЯМР ¹³C, использование соотношения Н/С для характеристики содержания ароматических фрагментов в структуре ГФК более предпочтительно, чем эффективного коэффициента поглощения ε_{280}^* .

Распределение углерода в молекулах ГФК по данным спектроскопии ЯМР ^{13}C .

Препарат ГФК	Доля углерода в составе фрагментов, %						ΣC_{Ar}^*	$\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}^{**}$
	$C_{C=O}$	$C_{COOH(R)}$	C_{Ar-O}	$C_{Ar-H(R)}$	C_{Alk-O}	$C_{Alk-H(R)}$		
ГК почв								
HBW	1	17	13	32	20	18	45	1.19
HBWN	2	15	13	30	20	20	43	1.07
HBP	2	16	12	32	21	17	44	1.16
HBG	1	15	13	33	21	17	46	1.21
HGW	1	19	13	34	16	17	47	1.42
HGP	3	15	12	34	18	19	46	1.24
HS	2	14	9	48	14	14	57	2.04
HST	3	16	11	43	15	13	54	1.93
ГФК почв								
SEL	1	18	13	32	22	14	45	1.25
ГФК торфа								
T1	1	15	10	29	25	20	39	0.87
T4	1	16	12	31	24	16	43	1.08
T5	1	16	10	27	22	24	37	0.81
T6	2	15	10	38	22	14	48	1.31
T7	2	17	15	34	18	15	49	1.52
HTL	2	15	14	31	20	17	45	1.22
TTL	3	15	13	32	20	17	45	1.21
HTW	4	11	3	13	58	15	16	0.22
ГФК природных вод								
FMX	2	19	11	25	19	24	36	0.84
Коммерческие ГК угля								
ANA	1	15	13	43	7	21	56	2.0
AGK	1	17	17	48	4	21	48	2.32

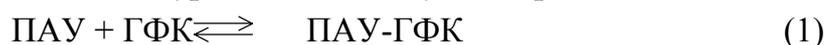
* $\Sigma C_{Ar} = C_{Ar-O} + C_{Ar-H(R)}$ - суммарное содержание ароматического углерода;

** $\Sigma C_{Alk} = C_{Alk-O} + C_{Alk-H,R}$ - общее содержание алифатического углерода в молекулах ГФК.

Помимо общего содержания ароматического углерода (ΣC_{Ar}), в качестве ^{13}C ЯМР-дескрипторов ароматичности использовали содержание С- и Н-замещенного ароматического углерода ($C_{Ar-H(R)}$) и соотношение суммарного содержания ароматического и алифатического углерода ($\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$). Соотношение $\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$ использовали как показатель вклада ароматического каркаса ГФК по сравнению с алифатической периферией в структуру их макромолекул. Данное соотношение также может служить косвенной характеристикой гидрофильно-гидрофобного баланса макромолекул ГФК.

Изучение связывающей способности ГФК по отношению к ПАУ

Изучение связывающей способности ГФК по отношению к ПАУ проводили на примере пирена (Py), флуорантена (Flt) и антрацена (An). Связывание ПАУ гумусовыми кислотами в упрощенном виде можно описать уравнением следующей реакции:



Основной количественной характеристикой данного процесса является константа равновесия K :

$$K = \frac{[\text{ПАУ} - \text{ГФК}]}{[\text{ПАУ}][\text{ГФК}]} \quad (2)$$

где $[\text{ПАУ} - \text{ГФК}]$, $[\text{ГФК}]$ и $[\text{ПАУ}]$ - равновесные концентрации аддукта ПАУ-ГФК и свободно растворенных форм ГФК и ПАУ, соответственно.

Из-за низкой водной растворимости ПАУ общая концентрация ГФК ($C_{\text{ГФК}}$) в исследуемой системе, как правило, существенно превышает таковую для ПАУ ($C_{\text{ПАУ}}$), что позволяет записать: $[\text{ГФК}] \cong C_{\text{ГФК}}$. При этом в связи с неизвестной стехиометрией взаимодействия ГФК и ПАУ и невозможностью определения истинной молекулярной массы ГФК, для расчета константы обычно используют не молярную, а массовую концентрацию ГФК. В результате выражение (2) можно преобразовать к виду типичной константы сорбции:

$$K_{oc} = \frac{1 - \alpha}{\alpha} \times \frac{1}{C_{\text{ГФК}}} \quad (3)$$

где K_{oc} - константа связывания ПАУ гумусовыми кислотами в расчете на массовую концентрацию ГФК (кг органического углерода (кг С) на л), $\alpha = \frac{[\text{ПАУ}]}{C_{\text{ПАУ}}}$ - доля свободно-растворенного ПАУ

Для определения K_{oc} использовали метод тушения флуоресценции, основанный на уменьшении интенсивности флуоресценции ПАУ в присутствии ГФК. Использование данного метода позволяет определять K_{oc} путем измерения концентрации свободной и связанной форм ПАУ без их предварительного разделения. Предполагая, что интенсивность флуоресценции ПАУ в присутствии ГФК пропорциональна концентрации его свободной формы $[\text{ПАУ}]$, уравнение (3) можно преобразовать к выражению (4), известному как уравнение Штерна-Фольмера:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{oc} \times C_{\text{ГФК}} \quad (4)$$

где F_0 и F - интенсивность флуоресценции ПАУ в отсутствие и в присутствии ГФК, соответственно.

Для определения K_{oc} готовили концентрационные серии ГФК при постоянной концентрации ПАУ, которая составляла 5×10^{-7} , 6.4×10^{-7} и 1.7×10^{-7} М для Ру, Flt и An, соответственно. Концентрации ГФК варьировали от 0.5 до 7×10^{-6} кг С/л. Рассчитанные значения констант и их доверительные интервалы приведены в Табл. 3.

Полученные значения K_{oc} лежат в диапазоне $(0.13-2.5) \times 10^5$, $(0.2-1.7) \times 10^5$ и $(0.12-1.0) \times 10^5$ л/кг С для Ру, Flt и An, соответственно. Наиболее высокие значения K_{oc} наблюдаются для более гидрофобных Ру и Flt ($\lg K_{ow} \sim 5$). Существенно ниже K_{oc} для An ($\lg K_{ow} \sim 4.4$). При этом для ГФК природных вод и ФК почв не зафиксировано какого-либо тушения флуоресценции An. Соответствующие константы были ниже минимально определяемой величины K_{oc} (0.1×10^5 л/кг С), определенной по 3S-критерию. В целом, по величине K_{oc} исследуемые препараты ГФК можно расположить в следующий ряд: ГК Aldrich \cong ГК

чернозема > ГК Л и П^Д почв > ГФК торфов > > ГФК природных вод > ФК чернозема > ФК Л и П^Д почв.

Таблица 3

Константы связывания ПАУ гумусовыми кислотами различного происхождения

Препарат ГФК	$K_{oc} \times 10^{-5}$, л/кг С		
	Пирен	Флуорантен	Антрацен
ГК почв			
HBW	1.0±0.1*	0.8±0.1*	<0.1**
HBWN	1.3±0.1	0.8±0.1	0.5±0.1*
HBP	1.2±0.2	0.8±0.1	0.5±0.1
HBG	0.7±0.1	0.5±0.1	<0.1
HGW	1.4±0.5	0.9±0.2	0.5±0.2
HGP	1.8±0.2	1.2±0.1	0.7±0.1
HS	2.2±0.2	1.3±0.2	1.0±0.1
HST	2.4±0.3	1.6±0.3	1.0±0.4
ФК почв			
FBW	0.13±0.08	<0.1	<0.1
FBP	<0.1	<0.1	<0.1
FBG	<0.1	<0.1	<0.1
FGW	0.5±0.1	0.3±0.1	<0.1
FST	1.1±0.2	0.7±0.1	<0.1
ГФК почв			
SEL	1.0±0.1	0.6±0.1	0.5±0.1
ГФК торфа			
T1	1.2±0.2	0.9±0.2	0.12±0.05
T4	1.4±0.1	0.9±0.1	0.22±0.05
T5	0.8±0.2	0.6±0.2	0.16±0.03
T6	0.7±0.1	0.7±0.1	0.25±0.07
T7	1.7±0.1	1.1±0.2	0.6±0.2
HTL	1.4±0.2	0.9±0.2	0.5±0.1
TTL	1.0±0.2	0.8±0.1	<0.1
HTW	<0.1	<0.1	<0.1
ГФК природных вод			
FMC	<0.1	<0.1	<0.1
FMX	0.7±0.1	0.5±0.1	<0.1
WM3X	0.4±0.1	0.2±0.1	<0.1
SWA	1.2±0.2	0.9±0.2	<0.1
Коммерческие ГК угля			
АНА	2.3±0.3	1.8±0.2	1.0±0.2

*± доверительный интервал для n = 7, P = 0.95; ** минимально определяемое значение K_{oc}

Таким образом, величина K_{oc} определяется как свойствами ПАУ, так и ГФК. Полученные значения K_{oc} использовали для выявления взаимосвязи между структурой ГФК и их связывающей способностью по отношению к ПАУ.

Установление взаимосвязи между структурой и связывающей способностью ГФК по отношению к ПАУ

Для установления взаимосвязи между структурой и связывающей способностью ГФК по отношению к ПАУ использовали метод количественных соотношений. Данный метод основан на проведении корреляционно-регрессионного анализа между параметрами структуры (так называемые молекулярные дескрипторы) и свойствами соединений. В связи с нерегулярностью строения и нестехиометричностью состава, для численного описания структуры ГФК использовали только дескрипторы состава, в качестве которых рассматривали данные по содержанию элементов и распределению углерода между основными структурными фрагментами, молекулярные массы и эффективные коэффициенты поглощения. Данные спектроскопии ЯМР ^{13}C использовали также для расчета комбинированных дескрипторов, представляющих собой суммы, произведения или отношения индивидуальных дескрипторов (содержание углерода в структурном фрагменте). Примерами таких дескрипторов могут служить уже упоминавшиеся ранее параметры ароматичности ГФК - $\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$ и ΣC_{Ar} . В качестве параметра, характеризующего связывающую способность ГФК по отношению к ПАУ, использовали K_{oc} .

Наиболее тесная взаимосвязь наблюдалась между K_{oc} и параметрами ароматичности ГФК. При этом самые высокие r^2 (0.86, 0.78, 0.71 и 0.84, 0.73, 0.62 для Py, Flt и An, соответственно) были характерны для $\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$ и $C_{Ar-H,R}$. Графики соответствующих корреляционных зависимостей приведены на Рис. 2. Корреляционные зависимости между K_{oc} и ΣC_{Ar} характеризовались более низкими значениями r^2 (0.81, 0.73 и 0.53 для Py, Flt и An, соответственно).

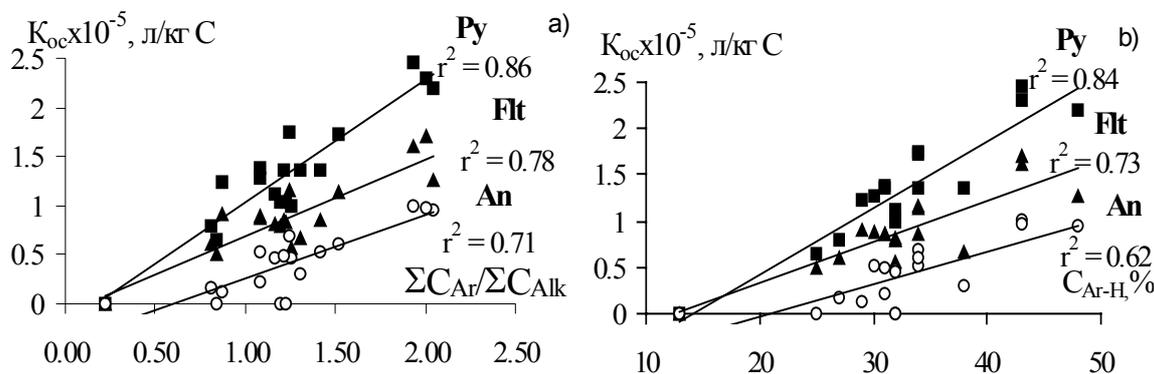


Рис. 2. Корреляционная взаимосвязь между K_{oc} пирена, флуорантена и антрацена и структурными дескрипторами ГФК (соотношение ароматических и алифатических фрагментов, а) и содержание Н- и С-замещенного ароматического углерода, б)).

Полученные результаты свидетельствуют об определяющей роли ароматического каркаса в процессах связывания ПАУ гумусовыми кислотами. При этом наиболее тесная

взаимосвязь между K_{oc} и параметром $\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$ указывает на то, что большим сродством к ПАУ обладают ГФК с меньшим содержанием углеводных фрагментов. По-видимому, это является следствием того, что отношение $\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$ характеризует также гидрофобно-гидрофильный баланс молекул ГФК. Чем больше содержание ароматических фрагментов, тем выше гидрофобность макромолекул ГФК и выше их сродство к гидрофобным молекулам ПАУ.

Корреляционная взаимосвязь двух косвенных показателей ароматичности ГФК - Н/С и ϵ^*_{280} - с константами связывания R_u , Flt и An была существенно слабее, чем для ^{13}C ЯМР-дескрипторов. Соответствующие коэффициенты корреляции составили 0.73, 0.71, 0.58 и 0.43, 0.55, 0.30 для Н/С и ϵ^*_{280} , соответственно. Несмотря на это, полученные зависимости являются значимыми при $P=0.99$ ($n=20$). Для молекулярных масс не наблюдалось значимой взаимосвязи с величинами K_{oc} при $P=0.99$ ($n=23$).

Для оценки устойчивости полученных корреляционных соотношений исходная выборка из 26 препаратов была разбита на несколько непересекающихся подмножеств по принципу сходного происхождения и/или фракционного состава ГФК, и осуществлен соответствующий корреляционный анализ. Полученные коэффициенты корреляции между K_{oc} , R_u и молекулярными дескрипторами ($\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$, ΣC_{Ar} , $C_{Ar-H,R}$, Н/С, ϵ^*_{280} и ММ) для различных выборок ГФК приведены на Рис. 3. Аналогичные результаты были получены для Flt и An.

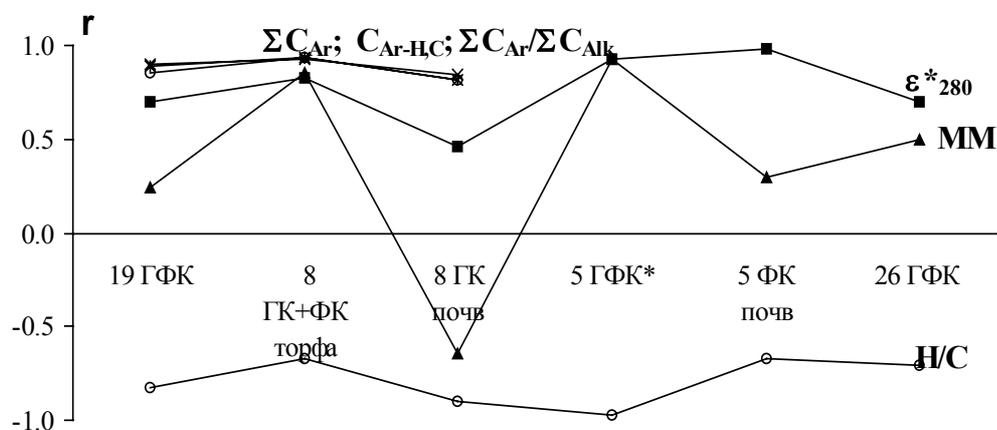


Рис. 3. Коэффициенты корреляции между K_{oc} пирена и исследуемыми молекулярными дескрипторами для выборок препаратов ГФК различного состава.

Как видно из представленных данных, вне зависимости от состава выборки наиболее высокие значения r наблюдаются для ^{13}C ЯМР-дескрипторов ($C_{Ar-H,R}$, ΣC_{Ar} , $\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$), характеризующих ароматичность ГФК. Для соотношения Н/С наблюдалась более слабая корреляционная взаимосвязь. В то же время, как и в случае с ^{13}C ЯМР-дескрипторами, она характеризовалась высокой устойчивостью, несущественно изменяясь для выборок разного состава ($-0.67 \leq r \leq -0.98$). Диапазон изменения r для ϵ^*_{280} был более широким (от 0.46 для 8 ГФК почв до 0.98 для 5 ГФК различного происхождения). Наиболее чувствительным дескриптором к изменению состава выборки оказалась молекулярная масса. Как видно из Рис. 3, корреляция между K_{oc} и ММ является значимой только для 8 торфяных ГФК, 5 ГФК*

и 8 ГК почв. Причем в двух первых случаях корреляция прямая, а для ГК почв - обратная. Это свидетельствует о непригодности данного молекулярного дескриптора для прогноза сродства к ПАУ.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что наилучшими дескрипторами для предсказания констант связывания ПАУ гумусовыми кислотами являются параметры ароматичности. Для экспериментального подтверждения найденных корреляционных взаимосвязей следующий этап работ был посвящен количественной оценке связывающей способности каркасной (ароматической) и периферической (углеводно-обогащенной) частей ГФК по отношению к Ру.

Изучение связывающей способности гидролизованных препаратов ГФК по отношению к пирену

Для изучения связывающей способности каркасной и периферической частей ГФК по отношению к ПАУ использовали препараты, подвергнутые кислотному гидролизу (0.2 М HCl, $t = 110^{\circ}\text{C}$, 15 часов). Согласно многочисленным исследованиям, в данных условиях происходит расщепление макромолекул ГФК на ароматический каркас (нерастворимые продукты гидролиза) и углеводную периферию (растворимые продукты гидролиза). В работе использовали гидролизованные препараты 4 торфяных ГК (Т3, Т4, Т5, Т6), ФК торфа (Т4) и почвенные ГК (НСК). Сравнительные характеристики (элементный состав и распределение углерода по данным ЯМР ^{13}C) исходных препаратов ГФК и продуктов их гидролиза приведены в Табл. 4 и 5, соответственно. Для обозначения нерастворимых и растворимых продуктов гидролиза к шифру исходного препарата добавляли одну и две звездочки, соответственно.

Таблица 4

Элементный состав исходных и нерастворимых продуктов гидролиза препаратов ГФК в расчете на беззольное органическое вещество

Препарат ГФК	Источник происхождения	Содержание элементов (% масс)				Зольность %	Атомные соотношения	
		С	Н	N	О		H/C	O/C
ГК и ГК* торфа								
Т3	Низинный осоковый торф	52.6	4.7	2.4	41.0	1.2	1.07	0.60
Т4	Верховой сфагнум торф	50.7	4.9	2.1	42.3	5.7	1.16	0.63
Т5	Верховой сфагнум торф	51.4	4.9	2.2	41.5	5.8	1.14	0.61
Т6	Верховой пушицевый торф	49.4	4.6	1.5	44.4	0.0	1.12	0.67
Т3*	--"--	54.9	4.2	1.1	39.8	0.0	0.92	0.54
Т4*	--"--	58.1	4.3	1.2	36.4	1.0	0.90	0.47
Т5*	--"--	57.7	4.3	1.0	37.1	0.6	0.89	0.48
Т6*	--"--	57.2	4.1	0.8	38.0	0.4	0.86	0.50
ФК торфа								
Т4	--"--	49.3	4.4	0.0	46.2	0.0	1.07	0.70

ГК и ГК* почв								
HSK	Ч типичный	57.7	3.9	2.8	35.7	27.4	0.80	0.46
HSK*	---"	57.1	2.7	1.9	38.3	0.0	0.57	0.51

Таблица 5

Распределение углерода между основными структурными фрагментами в исходных препаратах ГК и продуктах их гидролиза по данным спектроскопии ЯМР ^{13}C

Препарат ГК	Доля углерода в составе фрагментов, %						$\Sigma\text{C}_{\text{Ar}}$	$\Sigma\text{C}_{\text{Ar}}/\Sigma\text{C}_{\text{Alk}}$
	$\text{C}_{\text{C=O}}$	$\text{C}_{\text{COOH(R)}}$	$\text{C}_{\text{Ar-O}}$	$\text{C}_{\text{Ar-H(R)}}$	$\text{C}_{\text{Alk-O}}$	$\text{C}_{\text{Alk-H(R)}}$		
ГК, ГК*, ГК** торфа								
T3	6	13	23	37	8	13	60	2.8
T3*	3	15	23	36	8	12	59	2.9
T4	7	17	21	38	9	9	58	3.2
T4*	5	13	18	45	9	9	64	3.6
T4**	4	16	17	30	20	13	47	1.4
T6	6	12	18	41	13	10	58	1.9
ФК и ФК* торфа								
T4	2	16	13	32	26	10	45	1.2
T4*	4	14	22	44	7	12	61	3.2
T4**	4	13	17	36	20	11	53	1.7

Для оценки связывающей способности продуктов гидролиза препаратов ГК по отношению к ПАУ определяли константы связывания с помощью метода тушения флуоресценции. Эксперименты проводили в условиях, аналогичных для исходных препаратов ГК. Полученные K_{oc} и их доверительные интервалы приведены в Табл. 6.

Таблица 6

Константы связывания R_u исходными препаратами ГК и продуктами их гидролиза

Препарат ГК	$K_{oc} \times 10^{-5}$ л/кг С	Препарат ГК*	$K_{oc} \times 10^{-5}$ л/кг С	Препарат ГК**	$K_{oc} \times 10^{-5}$ л/кг С
ГК, ГК*, ГК** торфа					
T3	$1.2 \pm 0.3^*$	T3*	$1.3 \pm 0.2^*$	T3**	$< 0.1^{**}$
T4	1.2 ± 0.3	T4*	1.7 ± 0.3	T4**	< 0.1
T5	1.2 ± 0.2	T5*	1.4 ± 0.2	T5**	< 0.1
T6	1.4 ± 0.2	T6*	1.8 ± 0.4	T6**	< 0.1
ГК, ГК*, ГК** почв					
HSK	2.8 ± 0.3	HSK*	3.4 ± 0.4	HSK**	< 0.1

* \pm доверительный интервал для $n = 7$, $P = 0.95$; ** минимально определяемое значение K_{oc}

Для всех нерастворимых продуктов гидролиза гуминовых кислот (ГК*) наблюдалось возрастание K_{oc} по сравнению с исходными. Увеличение K_{oc} может быть связано с тем, что отщепление периферической части облегчает доступ R_u к ароматическому каркасу молекул ГК и сопровождается возрастанием гидрофобности нерастворимых продуктов гидролиза. При этом значения K_{oc} R_u для всех растворимых продуктов гидролиза (ГК**) были ниже минимально определяемой величины 0.1×10^{-5} л/кг С

Полученные данные являются экспериментальным подтверждением ведущей роли ароматического каркаса в связывании ПАУ гумусовыми кислотами. Учитывая гидрофобный характер ароматического каркаса и наличие в его составе акцепторных фрагментов - карбоксил- и карбонилзамещенных ароматических колец можно предположить, что в связывание ПАУ гумусовыми кислотами вносят вклад как гидрофобные, так и донорно-акцепторные взаимодействия. При этом характер зависимости констант связывания от гидрофобности ПАУ (возрастание по мере увеличения $\lg K_{ow}$) и потенциала их ионизации (уменьшение по мере снижения потенциала ионизации) позволяет судить о преимущественном вкладе гидрофобных взаимодействий. Для подтверждения данного предположения нами было определены константы связывания R_u , F_{lt} и A_n низкомолекулярными карбоновыми кислотами, моделирующими потенциальные реакционные центры ГФК. При этом ожидалось, что в случае преобладания донорно-акцепторного механизма взаимодействия между модельными кислотами и ПАУ, соответствующие константы будут определяться величиной потенциала ионизации ПАУ, которые составляют 7.55, 7.81 и 7.41 эВ для R_u , F_{lt} и A_n , а также возрастать по мере увеличения основности ароматических кислот.

Исходя из характера замещения ароматических колец в ГФК, в качестве модельных соединений были выбраны ароматические карбоновые кислоты, имеющие OH- и COOH-заместители. Константы связывания R_u , F_{lt} и A_n данными кислотами были определены с помощью метода тушения флуоресценции в условиях аналогичным определению K_{oc} для ГФК. В случае модельных кислот для заметного тушения ПАУ требовались концентрации, на порядок превышающие концентрации ГФК. Полученные значения K_{oc} и их стандартные отклонения приведены в Табл. 7.

Таблица 7

Константы связывания ПАУ модельными кислотами

Модельные кислоты	$K_{oc} \times 10^{-5}$ л/кг С		
	Пирен	Флуорантен	Антрацен
Бензойная	0.123±0.008*	0.068±0.008	<0.003**
4-ОН-бензойная	0.920±0.004	0.05±0.01	<0.003
2,4-ди-ОН-бензойная	<0.003	<0.003	<0.003
Фталевая	0.160±0.003	0.110±0.003	<0.003
Терефталевая	<0.003	<0.003	<0.003
Меллитовая	<0.003	<0.003	<0.003
Пиромеллитовая	<0.003	<0.003	<0.003
Коричная	0.120±0.003	0.095±0.008	<0.003

* ± доверительный интервал для $n = 7$, $P = 0.95$; ** минимально определяемое значение K_{oc}

Как видно из Табл. 7, тушение флуоресценции ПАУ наблюдалось только для четырех из восьми модельных кислот. При этом в число соединений, не вызывающих тушения флуоресценции ПАУ, вошли все наиболее сильные акцепторы из использованных модельных

соединений, в качестве которых предполагались многоосновные ароматические кислоты. Для кислот, обладающих сродством к ПАУ, связывание наблюдалось только для Ру и Flt. В тоже время константы связывания наиболее донорного из использованных ПАУ - An - всеми модельными кислотами были ниже минимально определяемых значений. Кроме того, обращает на себя внимание гораздо более низкие значения констант связывания ПАУ модельными индивидуальными кислотами, чем ГФК. Полученные закономерности показывают незначительную роль донорно-акцепторных взаимодействий в связывании ПАУ гумусовыми кислотами. Дополнительным подтверждением этому могут служить результаты экспериментов по регистрации комплексов с переносом заряда между Ру, Flt и An и различными препаратами ГФК, проведенные с использованием методов спектрофотометрии и спектроскопии ЯМР C^{13} . Эксперименты проводили как в водной среде, так и в органических растворителях (ДМСО и первичные спирты). Однако искомого результата - появления длинноволновой полосы в УФ-спектрах исследованных ПАУ, а также изменения их химических сдвигов в присутствии ГФК зарегистрировано не было.

На основании приведенных выше результатов можно сделать вывод о преимущественном вкладе гидрофобных взаимодействий в процессы связывания ПАУ гумусовыми кислотами.

Влияние pH и ионной силы на связывание ПАУ гумусовыми кислотами

Для изучения влияния pH и ионной силы среды на связывающую способность ГФК по отношению к Ру, Flt и An были выбраны препараты различного происхождения, существенно различающиеся по величине K_{oc} : ГК Aldrich - АНА; ГК почв - HS, HBWN, HGP; ГФК торфа - НТЛ, Т4, Т6; ГФК природных вод - FMX, WM3X и SWA. pH растворов устанавливали с помощью HCl и NaOH, ионную силу (I) создавали с помощью 1 M NaCl. Диапазон изменения pH составлял 2.1 - 8.4, ионной силы - 1×10^{-4} - 2.5×10^{-1} M. Полученные зависимости K_{oc} от pH и логарифма ионной силы приведены на Рис. 4 и 5, соответственно.

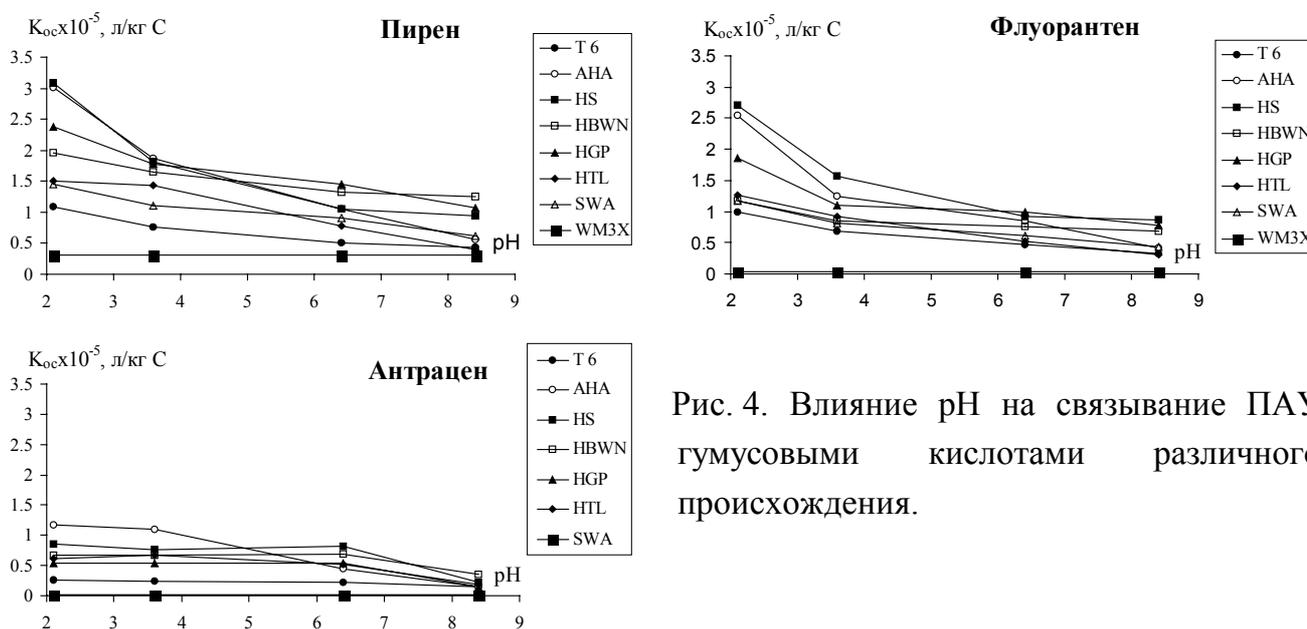


Рис. 4. Влияние pH на связывание ПАУ гумусовыми кислотами различного происхождения.

Как видно из представленных зависимостей, увеличение рН и ионной силы приводило к уменьшению K_{oc} всех трех ПАУ для всех использованных препаратов ГФК, за исключением водных. Для водных препаратов ГФК, обладающих самым низким сродством к ПАУ, K_{oc} либо не изменялись вообще, либо весьма незначительно. Наиболее существенное изменение K_{oc} (20-30%) наблюдалось для Ру и Flt в интервале рН 2.1- 3.8 и ионной силы 1×10^{-2} - 1×10^{-3} М. Дальнейшее увеличение рН до 8.3 и ионной силы до 0.25 М практически не влияло на степень связывания этих ПАУ гумусовыми кислотами.

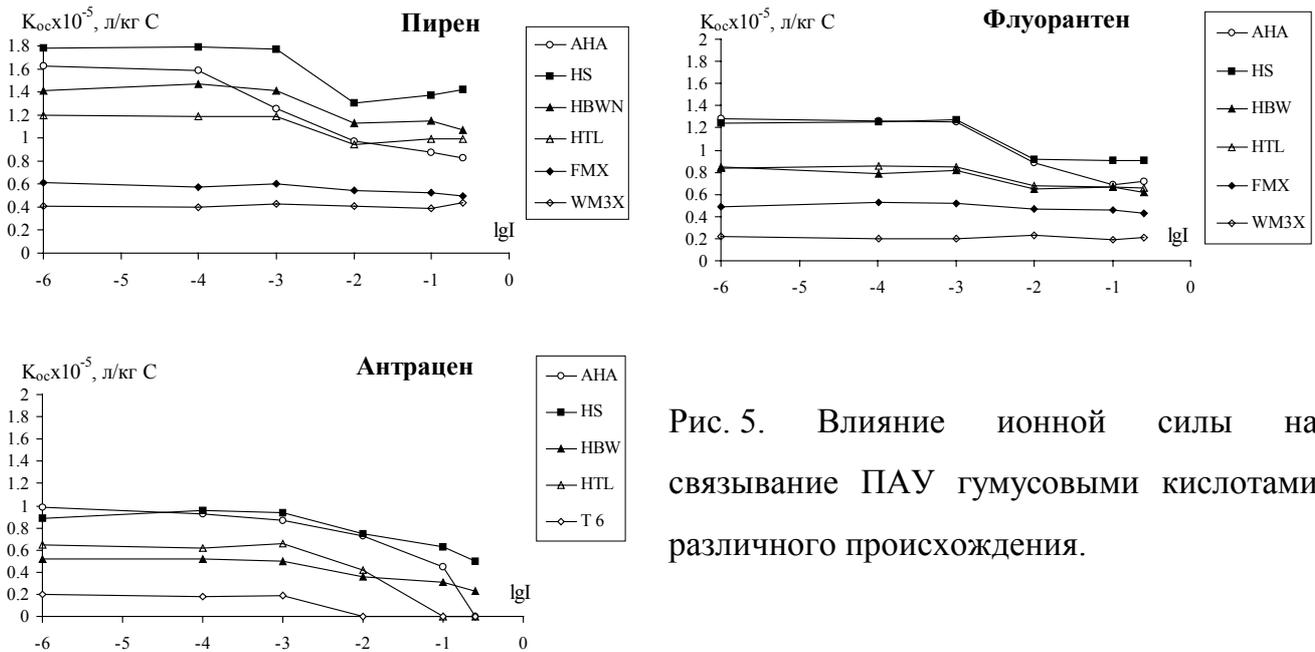


Рис. 5. Влияние ионной силы на связывание ПАУ гумусовыми кислотами различного происхождения.

В случае An снижение K_{oc} наблюдалось по мере увеличения рН и ионной силы во всем исследованном диапазоне значений.

Описанный характер зависимости K_{oc} от рН и ионной силы хорошо согласуется с предположением о преобладающем вкладе гидрофобных взаимодействий в связывание ПАУ гумусовыми кислотами. Так, уменьшение рН, в результате которого происходит протонирование ионогенных групп в молекулах ГФК, приводит к увеличению их гидрофобности, что сопровождается увеличением сродства ГФК к ПАУ. Возрастание ионной силы, вызывающее экранирование заряда гумусового полианиона, способствует принятию более компактной конформации макромолекул ГФК. Как следствие, уменьшается эффективная площадь контакта ПАУ-ГФК, что приводит к уменьшению констант связывания.

Полученные экспериментальные зависимости K_{oc} от рН и ионной силы среды удовлетворительно описывалась следующими двухпараметрическими функциями:

$$K_{oc}^{pH} = K_{oc}^0 ((1 - b) \cdot (pH^0/pH)^c + b) \quad (5)$$

где K_{oc}^0 - константа связывания ПАУ гумусовыми кислотами при рН 2; K_{oc}^{pH} - константа связывания при заданном рН; b , c - эмпирические коэффициенты: для Ру: $b = -0.30$; $c = 0.50$; для Flt: $b = 0.20$; $c = 1.30$; для An: $b = -450$; $c = 0.001$.

$$K_{oc}^I = (1 - b)K_{oc}^{I=0} \cdot \text{EXP}(-c \cdot I + b), \quad (6)$$

где $K_{oc}^{I=0}$ - константа связывания ПАУ гумусовыми кислотами при $I = 0$; K_{oc}^I - константа связывания при заданной ионной силе I ; b , c - эмпирические коэффициенты: для Ру: $b = 0.75$; $c = 184$; для Flt: $b = 0.70$; $c = 102$; для An: $b = 0.32$; $c = 38$.

Уравнения (5 и 6) позволяют аппроксимировать экспериментальные кривые с высоким уровнем статистической достоверности. Так, рассчитанные r^2 для рН зависимостей составили, в среднем, 0.92 0.95 и 0.80 для Ру, Flt и An, соответственно; для зависимостей от ионной силы - 0.83, 0.88 и 0.92 для Ру, Flt и An, соответственно. Следовательно, полученные двухпараметрические зависимости K_{oc} от рН и ионной силы могут быть использованы для корректировки значений констант связывания при изменении параметров водной среды.

Исследование детоксицирующей способности гумусовых кислот по отношению к ПАУ

Для исследования детоксицирующей способности ГФК по отношению к ПАУ был использован метод биотестирования. В качестве тест-объекта использовали *Daphnia magna*. Тест-откликом (R) служила активность питания дафний. Активность питания регистрировали по изменению интенсивности флуоресценции хлорофилла, входящего в состав водоросли *Chlorella pyrenoidosa*, которая служила пищей для дафний. Концентрация ПАУ в тестируемых растворах составляла $(5, 7 \text{ и } 1.7) \times 10^{-7}$ М для Ру, Flt и An, соответственно. Данные концентрации были максимально достигнутыми при приготовлении водных растворов ПАУ и вызывали уменьшение R дафний на $54 \pm 8\%$, $52 \pm 7\%$ и $50 \pm 9\%$ ($P=0.95$, $n=3$) для Ру, Flt и An, соответственно. Концентрация ГФК в тестируемых растворах составляла 1 - 25 мг С/л.

Токсический эффект ПАУ ($T_{ПАУ}$) оценивали как относительное уменьшение тест-отклика в присутствии ПАУ ($R_{ПАУ}$) по сравнению с тест-откликом в контрольном растворе (R_0):

$$T_{ПАУ} = \frac{R_0 - R_{ПАУ}}{R_0} \quad (7)$$

Экспериментальные зависимости «концентрация - токсический эффект» в указанном диапазоне концентраций были линейными для всех модельных ПАУ и аппроксимировались уравнением прямой:

$$T_{ПАУ} = k \times C_{ПАУ} \quad (8)$$

с коэффициентами корреляции (r^2) 0.96, 0.98 и 0.97 для Ру, Flt и An, соответственно.

Изменение уровня токсичности ПАУ в присутствии ГФК может быть обусловлено как изменением концентрации свободной формы ПАУ в результате химического связывания между ПАУ и ГФК, так и собственным воздействием ГФК на тест-объект. Поэтому составляющую токсического эффекта, обусловленную только воздействием свободно-растворенного ПАУ на фоне собственного воздействия ГФК ($T_{ГФК+ПАУ}$) рассчитывали, используя в качестве контроля тест-отклик в присутствии ГФК ($R_{ГФК}$):

$$T_{ГФК+ПАУ} = \frac{R_{ГФК} - R_{ГФК+ПАУ}}{R_{ГФК}} \quad (9)$$

Детоксицирующую способность (D) препаратов ГФК оценивали как относительное уменьшение токсического эффекта ПАУ в присутствии ГФК по сравнению с исходным токсическим эффектом ПАУ:

$$D = \frac{T_{\text{ПАУ}} - T_{\text{ГФК+ПАУ}}}{T_{\text{ПАУ}}} = \frac{\frac{R_0 - R_{\text{ПАУ}}}{R_0} - \frac{R_{\text{ГФК}} - R_{\text{ГФК+ПАУ}}}{R_{\text{ГФК}}}}{\frac{R_0 - R_{\text{ПАУ}}}{R_0}} \quad (10)$$

При условии, что (1) токсический эффект ПАУ как в присутствии, так и в отсутствие ГФК линейно зависит от концентрации его свободно растворенной формы, то есть соблюдается уравнение (8); (2) собственное действие ГФК на тест-объект не изменяется при добавлении ПАУ, то выражение (10) можно преобразовать к следующему виду:

$$D = \frac{(k C_{\text{ПАУ}} - k[\text{ПАУ}])}{k C_{\text{ПАУ}}} = 1 - \alpha \quad (11)$$

где $C_{\text{ПАУ}}$ и $[\text{ПАУ}]$ - общая и равновесная концентрация ПАУ, α - доля свободнорастворенного ПАУ в присутствии ГФК.

Как видно из вышеприведенного уравнения, при справедливости принятых предпосылок коэффициент D численно равен доле ПАУ, связанного в нетоксичные аддукты с ГФК. В этом случае экспериментальные зависимости коэффициента D от концентрации ГФК можно использовать для расчета константы связывания ПАУ гумусовыми кислотами, аппроксимируя их с помощью преобразованного уравнения (3):

$$D = \frac{K_{oc}^{tox} \times C_{\text{ГФК}}}{1 + K_{oc}^{tox} \times C_{\text{ГФК}}} \quad (12)$$

где K_{oc}^{tox} - константа связывания ПАУ гумусовыми кислотами, рассчитанная из данных токсикологического эксперимента.

При справедливости исходного предположения о том, что механизмом детоксикации ПАУ гумусовыми кислотами является образование нетоксичных аддуктов ПАУ-ГФК, можно ожидать равенства значений констант связывания, определенных по методу тушения флуоресценции и рассчитанных из токсикологических данных, т.е. $K_{oc}^{tox} = K_{oc}$. В связи с этим нами были рассчитаны значения K_{oc}^{tox} и проведено сравнение полученных значений с K_{oc} .

Предложенный способ обработки токсикологических данных применяли для количественной оценки детоксицирующих свойств всех использованных в работе препаратов ГФК по отношению к трем модельным ПАУ - Ру, Flt и An. Для этой цели измеряли R дафний в контроле, в присутствии ПАУ, ГФК и при совместном присутствии ПАУ и ГФК. Из полученных данных согласно (10) рассчитывали коэффициент D и строили соответствующие кривые детоксикации - зависимость коэффициента D от концентрации ГФК. Типичные кривые детоксикации модельных ПАУ гумусовыми кислотами различного происхождения приведены на Рис. 6.

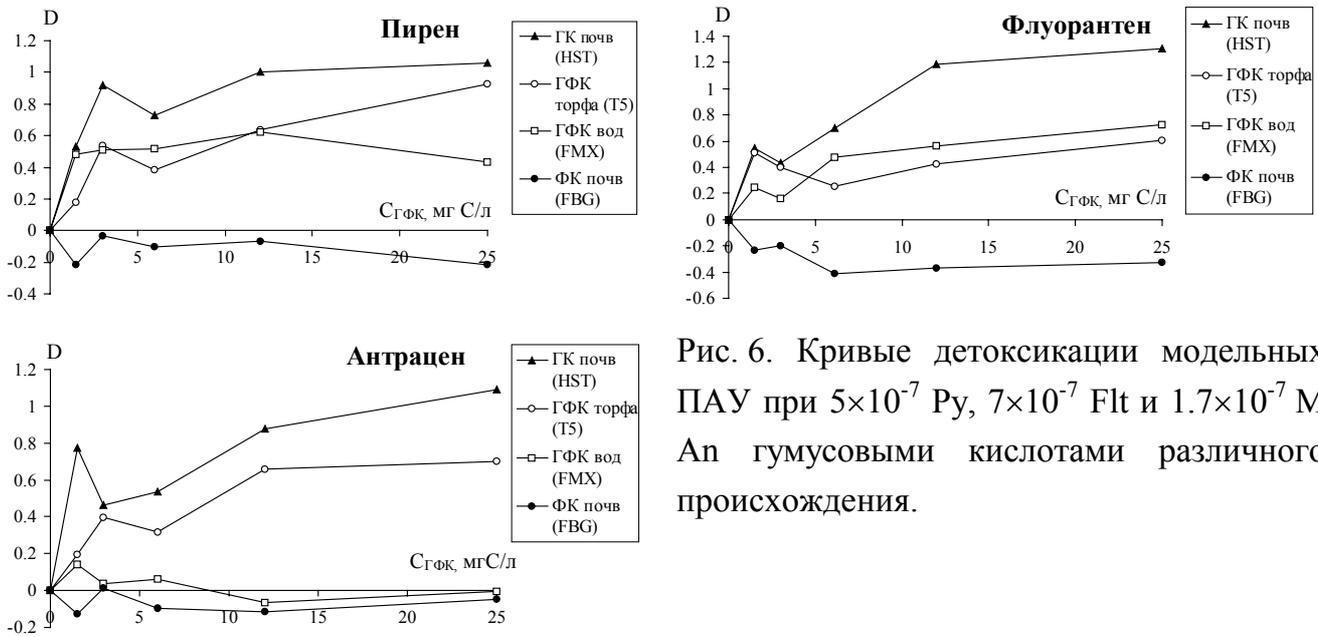


Рис. 6. Кривые детоксикации модельных ПАУ при 5×10^{-7} Ру, 7×10^{-7} Flt и 1.7×10^{-7} М Ан гумусовыми кислотами различного происхождения.

Как видно из приведенных зависимостей, для всех трех ПАУ увеличение концентрации ГФК в тест-системе сопровождалось повышением детоксицирующего эффекта. При этом максимальный эффект наблюдался для ГК почв, тогда как ФК почв не проявляли детоксицирующего действия. Наибольшая детоксикация была характерна для Ру, несколько ниже - для Flt. В случае Ан детоксицирующий эффект ГФК был минимален.

Полученные кривые детоксикации аппроксимировали уравнением (12) с целью расчета K_{oc}^{tox} . Типичные аппроксимационные кривые показаны на Рис. 7.

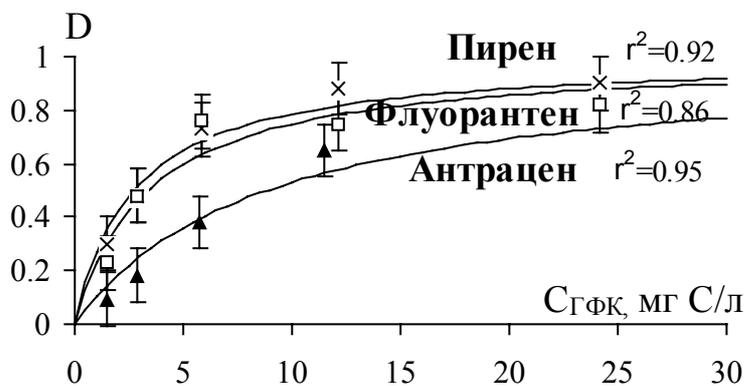


Рис. 7. Аппроксимационные кривые экспериментальных детоксицирующих зависимостей на примере ГК почв (НВУ). Точками обозначены экспериментальные данные, сплошными линиями - аппроксимирующие расчетные кривые.

Рассчитанные значения K_{oc}^{tox} и соответствующие стандартные отклонения приведены в Табл. 8. Как следует из полученных данных, препараты ГФК по величине детоксицирующей способности по отношению к ПАУ располагаются в ряд, полностью аналогичный их связывающей способности, а именно: ГК угля, ГК чернозема \gg ГК П^Д и СЛ почв $>$ ГФК торфа $>$ ГФК вод \cong ФК чернозема \gg ФК П^Д и СЛ почв.

Константы связывания (л/кг С) ПАУ гумусовыми кислотами, рассчитанные из токсикологических данных

Препарат ГФК	Пирен		Флуорантен		Антрацен	
	$K_{oc}^{tox} \times 10^{-5}$	r^2	$K_{oc}^{tox} \times 10^{-5}$	r^2	$K_{oc}^{tox} \times 10^{-5}$	r^2
ГК почв						
HBW	4±1.4*	0.95	5±1.3*	0.95	6±2.4*	0.91
HBWN	4±1.2	0.82	7±3.4	0.97	6±1.9	0.88
HBP	3±0.8	0.92	4±1.5	0.86	4±1.3	0.95
HBG	2.1±0.5	0.90	2.1±0.2	0.93	2±0.6	0.86
HGW	4±1.3	0.91	4±2.2	0.88	4±1.1	0.88
HGP	4±0.8	0.96	5±0.8	0.90	4±1.2	0.93
HS	6±3.1	0.96	8±4.8	0.95	6±2.4	0.88
HST	5±1.6	0.86	6±3.5	0.91	6±2.5	0.88
ФК почв						
FBW	<0.3		<0.3		<0.3	
FBP	<0.3		<0.3		<0.3	
FBG	<0.3		<0.3		<0.3	
FGW	<0.3		<0.3		<0.3	
FST	3.0±0.8	0.89	2.2±0.6	0.94	<0.3	
ГФК почв						
SEL	3.6±0.6	0.91	3.4±0.4	0.93	2±0.5	0.98
ГФК торфа						
T1	4±1.1	0.86	3±1.2	0.89	<i>n.d.</i>	
T4	3.7±0.6	0.81	5±1	0.88	1±0.5	0.88
T5	2±0.8	0.91	4.4±2.5	0.98	1.2±0.2	0.91
T6	3.6±0.6	0.96	3±0.8	0.91	2±0.6	0.86
T7	4±2.6	0.96	6.0±0.3	0.96	<i>n.d.</i>	
HTL	4±1.7	0.98	4±0.8	0.92	1.8±0.5	0.87
TTL	4±2.7	0.97	4±1	0.96	0.3±0.1	0.96
HTW	0.8±0.2	0.95	0.3±0.1	0.97	<0.3	0.91
ГФК природных вод						
FMX	3±1.1	0.91	2±0.5	0.96	<0.3	
WM3X	1.1±0.3	0.93	0.4±0.1	0.88	<0.3	
FMC	1.9±0.5	0.91	2.5±0.5	0.96	<0.3	
SWA	1.9±0.7	0.98	2±0.6	0.91	<0.3	
Коммерческие ГК угля						
ANA	6±3.4	0.84	6±2.8	0.94	5±1.3	0.91
AGK	6±0.6	0.97	5±0.8	0.87	<i>n.d.</i>	

* ±стандартное отклонение при n=5

Обращает на себя внимание тот факт, что все константы связывания, рассчитанные из токсикологических данных, превосходят соответствующие K_{oc} , определенные по методу тушения флуоресценции. Принимая во внимание, что K_{oc}^{tox} были рассчитаны из предположения, что коэффициент D определяется только химическим связыванием ГФК с ПАУ, нами было проведено сравнение значений K_{oc}^{tox} и K_{oc} с использованием t -критерия

Стьюдента. Возможность применения данного критерия для сравнения двух средних обеспечивалась существенным различием стандартных отклонений K_{oc}^{tox} и K_{oc} . Так, согласно Табл. 8 стандартное отклонение K_{oc}^{tox} в среднем в 20 раз превышает таковое для K_{oc} . Данный факт позволил нам применить формулы параметрической статистики для расчета угловых коэффициентов зависимости K_{oc}^{tox} от K_{oc} . Графики соответствующих корреляционных зависимостей приведены на Рис. 8.

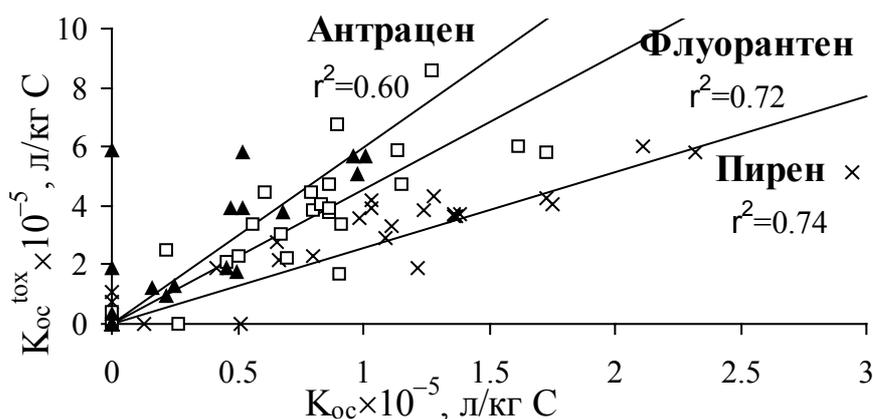


Рис. 8. Корреляционные зависимости между константами связывания, определенными методом тушения флуоресценции, и рассчитанными из токсикологических данных.

Рассчитанные угловые коэффициенты (\pm доверительный интервал, $P = 0.95$, $n = 26$) для Ру, Flt и An составили: 2.6 ± 0.3 , 4.6 ± 0.6 и 6 ± 1.4 , соответственно. Это указывает на то, что K_{oc}^{tox} и K_{oc} статистически значимо различаются по абсолютной величине. Принимая во внимание, что K_{oc} и K_{oc}^{tox} являются условными константами, величины которых зависят от условий среды (рН, ионная сила, и т.д.), полученные различия в их абсолютных значениях могут быть обусловлены тем, что для измерения K_{oc} использовали бидистиллированную воду, тогда как токсикологические эксперименты проводили в отстоянной водопроводной воде.

Высокие значения r^2 соответствующих зависимостей (Рис. 8) позволяют судить о хорошей сопоставимости данных констант. Так, 74, 72 и 60 % дисперсии K_{oc}^{tox} Ру, Flt и An объясняются изменением соответствующих величин K_{oc} . Это обстоятельство позволяет использовать линейную модель взаимосвязи между данными константами:

$$K_{oc}^{tox} = a \times K_{oc} \quad (13)$$

где a - угловой коэффициент графиков соответствующих зависимостей.

Полученные данные подтверждают предположение о том, что образование нетоксичных аддуктов ПАУ-ГФК является основным механизмом детоксикации ПАУ гумусовыми кислотами.

Установление взаимосвязи между структурой и детоксицирующими свойствами ГФК

Для установления взаимосвязи между детоксицирующей способностью ГФК и их структурой использовали метод количественных соотношений. Корреляционный анализ проводили для величин K_{oc}^{tox} и молекулярными дескрипторами состава ГФК, аналогично описанным для K_{oc} .

Как и в случае K_{oc} , максимальные значения коэффициентов корреляции были получены для ^{13}C ЯМР-дескрипторов, характеризующих ароматичность ГФК. Для $\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$ (Рис. 9) соответствующие r^2 составили 0.63, 0.74 и 0.45 для Пирен, Флуорантен и Антрацен. Практически такими же значениями r^2 характеризовались зависимости между K_{oc}^{tox} и ΣC_{Ar} и $C_{Ar-H,C}$: 0.74, 0.61, 0.38 и 0.76, 0.64, 0.41 для Пирен, Флт и Ан, соответственно.

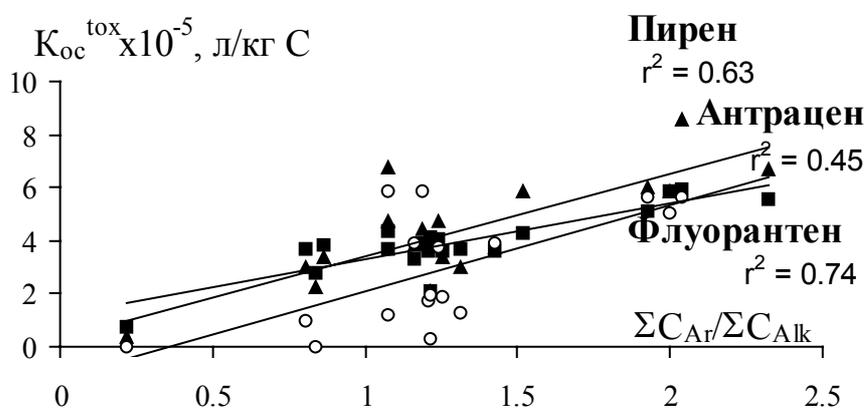


Рис. 9. Корреляционная взаимосвязь K_{oc}^{tox} пирена, флуорантена и антрацена и соотношения ароматических и алифатических фрагментов в молекулах ГФК.

Наличие тесной взаимосвязи между дескрипторами ароматичности ГФК и K_{oc}^{tox} позволяет судить о важной роли ароматических фрагментов в процессах детоксикации ПАУ. Это также свидетельствует о том, что связывание ПАУ гумусовыми кислотами с образованием нетоксичных аддуктов является как основного механизма детоксикации ПАУ гумусовыми кислотами.

ВЫВОДЫ

1. Количественно охарактеризована связывающая способность обширной выборки гумусовых кислот различного происхождения (28 препаратов) по отношению к трем ПАУ. Значения констант связывания уменьшались по мере пирена, флуорантена и антрацена составили $(0.13-2.4) \times 10^5$, $(0.3-1.8) \times 10^5$ и $(0.5-1.0) \times 10^5$ л/кг С, соответственно. Константы связывания ПАУ убывали в ряду: ГК угля > ГК почв > ГФК торфов >> ГФК природных вод > ФК почв.
2. Установлены корреляционные зависимости между структурой ГФК и константами связывания ПАУ и проверена их устойчивость на выборках препаратов различного происхождения. Найдено, что максимальной предсказательной силой обладают дескрипторы ароматичности. Взаимосвязь между ароматичностью гумусовых кислот и их сродством к ПАУ впервые подтверждена экспериментально.
3. Исследовано влияние рН и ионной силы на константы связывания пирена, флуорантена и антрацена. Установлено, что наибольшее увеличение констант (на 20-30 %) наблюдалось при рН < 4 и ионной силе > 0.001 М. Получены двухпараметрические зависимости констант связывания от рН и ионной силы, которые могут быть использованы для расчета констант при различных условиях водной среды.
4. На основании характера зависимости констант связывания от гидрофобности ПАУ, ароматичности ГФК, рН и ионной силы среды сделан вывод о доминирующей роли гидрофобных взаимодействий в процессах связывания ПАУ гумусовыми кислотами.
5. Разработан подход к количественной оценке детоксицирующей способности гумусовых кислот по отношению к ПАУ с помощью константы связывания, рассчитываемой из токсикологических данных. Установлено, что по величине детоксицирующей способности препараты гумусовых кислот располагаются в ряд, аналогичный их связывающей способности по отношению к ПАУ.
6. Установлены корреляционные соотношения между структурой гумусовых кислот и константами их связывания с ПАУ, рассчитанными из токсикологических данных. Показано, что как и в случае связывающей способности, максимальной прогностической силой обладают дескрипторы ароматичности ГФК.
7. На основании установленного соответствия констант связывания, рассчитанных из данных химических и токсикологических экспериментов, и тесной корреляционной взаимосвязи между ароматичностью и детоксицирующей способностью гумусовых кислот сделан вывод о том, что основным механизмом детоксикации ПАУ гумусовыми кислотами является образование нетоксичных аддуктов ПАУ-ГФК.

СПИСОК РАБОТ

1. Perminova I.V., Yashchenko* N.Yu., Petrosyan V.S. et al. The Influence of Humic Acids on the Toxicities of polyaromatic hydrocarbons and heavy metals in natural waters. First SETAC World Congress, Lisbon, Portugal, 1993, p. 299.
2. Petrosyan V.S., Perminova I.V., Yashchenko N.Yu. et al. Detoxification of heavy metals, polyaromatic hydrocarbons and pesticides by humic substances in waters and soils. In "*International Congress: Water: Ecology and Technology*", Moscow, 1994, pp.1136-1142.
3. Яценко Н.Ю., Перминова И.В., Полюнов В.А. и др. Влияние фульвокислот на токсичность флуорантена и фенантрена в водной среде. *Экологическая химия*, 1995, 4(3), с. 234-238.
4. Perminova I.V., Yashchenko N.Yu, et al. Humic substances as natural detoxicants. In: "*Humic Substances and Organic Matter in Soil and Water Environments: Characterization, Transformations and Interactions*", Ed. by C.E. Clapp, M.B. Hayes. St Paul, MN USA, 1996, pp.398-406.
5. Petrosyan V.S., Yashchenko N.Yu. Impact of humic acids on toxicity of polyaromatic hydrocarbons, Transactions of the 7th International Meeting of the International Humic Substances Society, Ed. by S.M. Griffiths, M.B. Hayes. July 3-8, 1994, St. Augustine, Trinidad & Tobago, pp.F9-F10.
6. Yashchenko N.Yu, Perminova I.V., Petrosyan V.S. Detoxifying properties of humic substances to fluoranthene and pyrene in relationship with hydrophobicity and molecular weight of the humics. In "*The Role of Humic Substances in the Ecosystem and in Environmental Protection*", Ed. by J Drozd and J Weber. Meeting of the International Humic Substances Society, September 9-14, 1996, Wroclaw, Poland, pp. 27.
7. Yashchenko N.Yu, Perminova I.V. Impact of humic substances on the toxicity of xenobiotic organic compounds. Abstract book of the 1997 ASA, SSSA Annual Meeting, Oct 26-31, 1997, Anaheim, California.
8. Yashchenko N.Yu, Perminova I.V., Petrosyan V.S. Detoxifying properties of humic substances to PAH: Structure-Activity Relationships. Abstract book of the SETAC 18th Annual Meeting, Nov. 16-20, 1997, San Francisco. P 254.
9. Яценко Н.Ю., Перминова И.В., Филиппова Е.М., Петросян В.С. Взаимодействие гумусовых кислот различного происхождения с ПАУ: влияние pH и ионной силы среды. XVI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Реф. докл. и сообщ. Т.3, М., 1998, с. 278.
10. Yashchenko N.Yu., Perminova I.V., Matorin D.N., Philippova E.M., Fadeev V.V. and Petrosyan V.S. Chemical-Toxicological Studies of Interaction between Humic Substances and Polyaromatic Hydrocarbons. Abstract book of the SETAC-Europe 8th Annual Meeting, Apr. 14-18, 1998, Bordeaux. P 266.
11. Яценко Н.Ю., Перминова И.В., Филиппова Е.М., Петросян В.С., Фадеев В.В. Взаимодействие гумусовых кислот различного происхождения с ПАУ: влияние pH и ионной силы среды. Вестник Моск. Университета, Серия Химия, Т 40, 1999, с. 188-193.
12. Perminova I.V., Yashchenko N.Yu., Kudryavtsev A.V., Kulikova N.A., Petrosyan V.S. Development of quantitative relationships between structure, reactivity and detoxifying ability of humic substances to organic xenobiotics. Abstracts of 9th Annual Meeting of SETAC-Europe, 25-29 May 1999. Leipzig, Germany, p. 111.
13. Perminova I.V., Yashchenko N.Yu., Petrosyan V.S., Anisimova M.A., Kulikova N.A., Lebedeva G.F., Matorin D.N., Venediktov P.S. Impact of humic substances on toxicity of polyaromatic hydrocarbons and herbicides. In: *Humic Transport Processes*, Eds. C.E. Clapp and N. Senesi. St Paul, USA, 1999 (In Press).
14. Steinberg C.E.W., Haitzer M., Perminova I.V., Yashchenko N.Yu., Petrosyan V.S. Quantitative Structure Activity Relationships (QSAR) of Dissolved Humic Substances as Detoxifying Agents in Freshwaters. *International Reviews in Hydrobiology*, 1999 (In Press).
15. Perminova I.V., Grechichsheva N.Yu., Petrosyan V.S. Relationships between structure and binding affinity of humic substances for polyaromatic hydrocarbons: relevance of molecular descriptors. *Environ. Sci. Technol.*, 1999, 33, pp. 3781-3787.
16. Yashchenko-Grechichsheva N.Yu., Perminova I.V., Petrosyan V.S. Detoxification of polycyclic aromatic compounds by means of naturally occurring substances. Abstracts of 17th International Symposium on Polycyclic Aromatic Compounds, 25-29 October 1999. Bodeaux, France, p. 114.

* В настоящее время автор поменяла фамилию Яценко на Гречищева

Автор выражает глубокую признательность сотрудникам кафедры квантовой радиофизики Физического факультета МГУ профессору, д.ф.-м.н. Фадееву В.В., к.ф.-м.н., н.с. Филипповой Е. М., к.ф.-м.н., с.н.с. Чубарову В.В. за оказанную помощь в организации флуориметрических экспериментов; сотрудникам кафедры органической химии Химического факультета МГУ к.х.н., с.н.с. Ильиной И.Г.; к.х.н., в.н.с. Демьянову П.И.; к.х.н., н.с. Пермину А.Б. за помощь в экспериментальной работе и участие в обсуждении результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке: Российского Фонда фундаментальных исследований (гранты №96-04-49838 и №98-03-33186а); Фонда INTAS (грант INTAS-1997 №1129); Международного научного фонда (фонд Сороса) (гранты № NBN000 и NBN300).