

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ

Савченко И.А.¹, Корнеева И.Н.¹, Гончаров Д.С.¹, Лукша Е.А.¹

¹ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Минздрава России, Омск, Россия (644043, Омск, ул. Ленина, 12), e-mail: irina0458@yandex.ru

Структурные особенности гуминовых веществ (ГВ) и активированных гуминовых веществ (ГВА) устанавливали с помощью элементного анализа, спектроскопии в УФ и видимой области и ¹³C ЯМР в твердой фазе (CPMAS ¹³C ЯМР). Для исследованных объектов характерны низкая степень ароматичности и высокое содержание алифатических цепей. Показано, что фотохимическое воздействие на гуминовые вещества в процессе получения (активация) приводит к изменению их структуры. Методом элементного анализа установлено увеличение степени окисленности ГВА и снижение их ненасыщенности. Спектроскопическое исследование в УФ и видимой области свидетельствует об уменьшении коэффициента цветности ГВА. Результаты, полученные методом CPMAS ¹³C ЯМР, указывают на увеличение в ГВА содержания фенольных, карбоксильных и карбонильных групп и снижение количества полисахаридных фрагментов.

Ключевые слова: гуминовые вещества, активированные гуминовые вещества, элементный анализ, электронная спектроскопия, CPMAS ¹³C ЯМР, фрагментный состав.

THE STUDY OF THE STRUCTURAL FEATURES OF HUMIC SUBSTANCES

Savchenko I.A.¹, Korneeva I.N.¹, Goncharov D.S.¹, Luksha E.A.¹

¹ Omsk State Medical Academy Russian Ministry of Health, Omsk, Russia (644043, Omsk, Lenin str., 12). e-mail: irina0458@yandex.ru

The structural features of humic substances (HS) and activated humic substances (AHS) were established by elemental analysis and spectroscopy in UV-visible region, and ¹³C -NMR in the solid phase (CPMAS ¹³C NMR). The studied objects are characterized by low degree of aromaticity and high content of aliphatic chains. It was demonstrated that photochemical effects on humic substances at stage of obtaining (activating) results in a change in their structure. By method of elemental analysis was revealed an increase in the degree of oxidation and decrease in their unsaturation. Spectroscopic study in the UV and visible region indicates a decrease in color index AHS. Results obtained by ¹³C NMR CPMAS indicate on increase in AHS of phenolic, carboxyl and carbonyl groups and a decrease in the amount of polysaccharide fragments.

Keywords: humic substances, activated humic substances, elemental analysis, electron spectroscopy, CPMAS ¹³C NMR, fragment composition

Введение

Гуминовые вещества (ГВ) представляют собой полидисперсные биополимеры сложного строения с высокой молекулярной массой. В структуре ГВ выделяют центральную и периферическую части, первая из которых образована конденсированными и связанными углеводородными мостиками ароматическими и гетероароматическими кольцами с различными функциональными группами, вторая представлена алифатическими, полисахаридными и полипептидными цепями [2]. Перечисленные особенности строения гуминовых веществ определяют их химические, физико-химические и биологические свойства. Однако химическая структура и фракционный состав гуминовых веществ зависят от способа выделения, модификации и источника их получения [2, 8].

Учитывая особенности строения гуминовых веществ, определение их фрагментного состава для установления связи структуры ГВ с фармакологическим действием возможно только при использовании комплекса физико-химических методов анализа.

Элементный состав является одной из важнейших характеристик ГВ, с помощью которых проводится их идентификация. Сведения об элементном составе вещества позволяют получить значительную информацию об общих принципах построения молекул и некоторых их свойствах. С помощью этого метода можно судить не только о процентном содержании различных элементов, но и рассчитать такие параметры как атомные отношения и ненасыщенность [2, 6].

Спектроскопия в УФ и видимой области является ценным методом идентификации хромофорных функциональных групп для индивидуальных органических соединений. В случае сложных многокомпонентных объектов, к которым относятся гуминовые вещества, возможности данного метода ограничены, т.к. их спектры являются результатом перекрывания максимумов различных хромофоров и не позволяют получать информацию о групповом составе. Для характеристики ГВ принято использовать [2] величину коэффициента экстинкции $E_{465}^{0,001\%}$ и отношение оптических плотностей при 465 и 650 нм, так называемый коэффициент цветности (E_4/E_6).

Поскольку углерод является основным элементом гуминовых веществ, то для получения данных о типе углерода и его относительном содержании в различных структурных фрагментах широко используется ^{13}C ЯМР спектроскопия. Основным преимуществом данного метода является получение количественной структурной информации без какой-либо предварительной пробоподготовки и химической модификации ГВ. Спектроскопия твердофазных образцов с кросс-поляризацией и вращением под магическим углом (CPMAS ^{13}C ЯМР) является наиболее часто используемой техникой регистрации ЯМР спектров [5].

Целью данного исследования является комплексное изучение структурных особенностей ГВ, выделенных различными методами из озерного сапропеля.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали гуминовые вещества, выделенные из сапропеля озера Горчаково Тюкалинского района Омской области методом щелочного гидролиза с последующим осаждением при pH 1-2. Активированные гуминовые вещества (ГВА) получали по описанной ранее методике [4].

Элементный анализ ГВ и ГВА проводили методом пиролизной хроматографии на автоматическом CHNS/O элементном анализаторе «Vario Micro cube» Elementar GmbH, (Германия). Результаты элементного анализа были скорректированы исходя из зольности и

влажности объектов. Вещества предварительно сушили в вакуум-эксикаторе над пентоксидом фосфора в течение суток. Влажность определяли по приросту массы образца после высушивания в результате выдерживания его на воздухе в течение 12 часов.

Спектры в УФ-видимой области регистрировали на спектрометре UNICO-2800 (США) в кварцевых кюветах с толщиной слоя 1 см в диапазоне от 190 до 900 нм. Отношения оптических плотностей при 465 и 650 нм (E_4/E_6) рассчитывали для 0,001% растворов гуминовых веществ, в качестве растворителя использовали 0,1М раствор натрия гидроксида.

Фрагментный состав ГВ и ГВА определяли методом спектроскопии ЯМР на спектрометре AVANCE III™ 400 (Bruker Analytic GmbH, Germany) с рабочей частотой на ядрах ^{13}C 100,63 МГц. Спектры ЯМР ^{13}C регистрировали в твердой фазе в эксперименте с кросс-поляризацией и вращением под магическим углом (CPMAS ^{13}C ЯМР). Навески соединений (100-200 мг) помещали в ротор из оксида циркония с внешним диаметром 4 мм и вращали со скоростью 10 кГц. Использовали импульсную последовательность RAMP CP (линейное увеличение амплитуды радиочастотного поля при переносе поляризации), время аквизиции (At) – 34 мс, задержку между импульсами (RD) – 5 с, число накоплений – 2000. Спад свободной индукции (ССИ) дополняли нулями до 4096 точек и проводили экспоненциальное умножение (70Гц). При фазовой коррекции фиксировали фактор первого порядка равным -45° . Шкалу выставляли по сигналу углерода карбоксильной группы глицина (176.1 м.д.).

Результаты и их обсуждение

Результаты элементного анализа и основные показатели для ГВ и ГВА представлены в таблице 1.

Таблица 1

Элементный состав и основные показатели для ГВ и ГВА

Образец	Элементный состав*, масс. %				Зола, %	Атомные отношения			U**
	С	Н	Н	О		Н/С	С/Н	О/С	
ГВ	54,56	5,73	4,87	34,84	2,90	1,25	13,08	0,48	2,53
ГВА	51,95	5,53	4,43	38,09	1,03	1,27	13,68	0,55	2,42

*В пересчете на беззольную сухую навеску (влажность 7%)

**Ненасыщенность $U = C - H/2 + N/2$ [6]

Для характеристики изменений в строении ГВА, происходящих в процессе воздействия УФ света, особый интерес представляет степень окисленности, рассчитываемая как атомное соотношение О/С. Среднее соотношение О/С для ГВА составляет 0,55, для ГВ – 0,48, что косвенно указывает на увеличение количества кислородсодержащих групп в процессе щелочного фотоллиза.

Также важным показателем является отношение Н/С, характеризующее степень ароматичности или ненасыщенности (при низких значениях) или алифатичности (при высоких значениях). ГВ и ГВА имеют близкие значения данного отношения: 1,25 и 1,27 соответственно, что указывает на преобладание в их составе алифатических фрагментов ($H/C > 1$) [2]. Более надежным показателем, коррелирующим с ароматичностью, является U – ненасыщенность, т.к. отношение Н/С учитывает и присутствие кратных связей углерод – гетероатом в составе функциональных групп [6]. Рассчитанное значение U для ГВА указывает на снижение их ненасыщенности в процессе выделения под действием УФ света.

Анализируя содержание азота в исследуемых ГВ (4,87 масс. %) и ГВА (4,43 масс. %), можно отметить, что в целом они удовлетворяют требованиям диагностических признаков ГК по Д.С. Орлову [2], согласно которым содержание азота должно быть от 3 до 6 масс. %. Незначительное увеличение атомного отношения С/Н в ГВА объясняется уменьшением количества углерода.

На рис. 1 представлены электронные спектры ГВ и ГВА в УФ и видимой областях. Спектры имеют характерный для гуминовых веществ вид. Спектр ГВА отличается от спектра ГВ максимумом при 265 нм и более сильным поглощением в диапазоне от 220 до 300 нм, что может свидетельствовать о присутствии большего количества полисопряженных фрагментов и/или об уменьшении доли периферической части в структуре ГВА. Полосы поглощения в данном диапазоне, вероятнее всего, соответствуют $\pi \rightarrow \pi^*$ переходам полиенов, полиароматических фрагментов и их кислородсодержащих производных (К-полосы) [2].

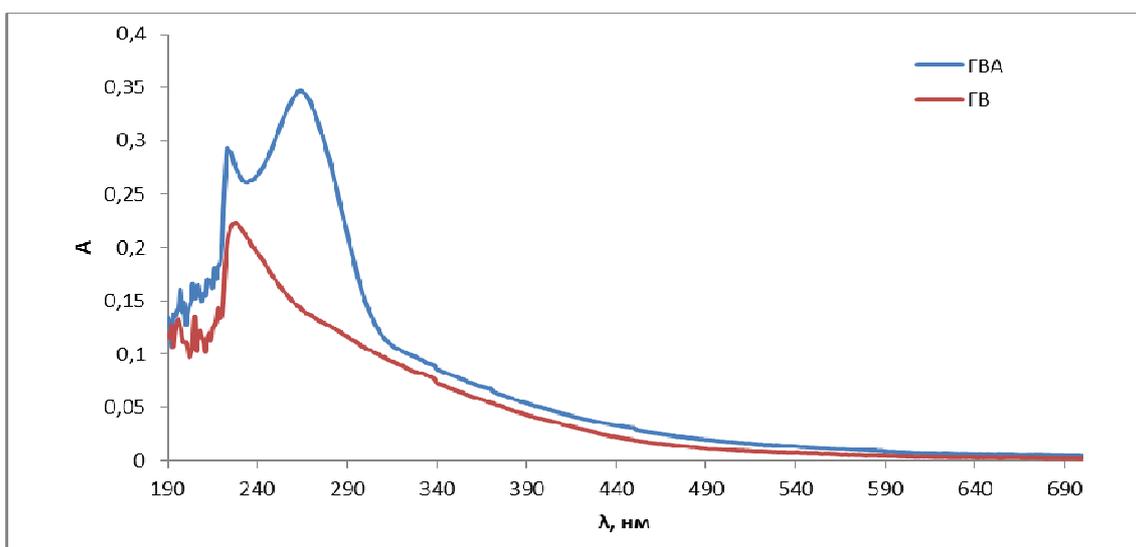


Рис. 1. Электронные спектры поглощения ГВ и ГВА в УФ и видимой области

Представленные в таблице 2 значения $E_{465}^{0,001\%}$ и E_4/E_6 находятся в пределах, характерных для гуминовых кислот [2]. Ввиду того, что основной вклад в окраску данных соединений вносят сопряженные системы каркасной части с кислородсодержащими

группами, а периферическая часть практически не окрашена, тогда данные характеристики позволяют оценить вклад негидролизуемой части в структуру молекулы ГВ и содержание в ней кислорода. Наблюдаемое снижение коэффициента цветности для ГВА может свидетельствовать об увеличении содержания полисопряженных фрагментов и увеличении степени их окисленности по сравнению с ГВ. Сравнение коэффициентов экстинкции также подтверждает данное заключение.

Таблица 2

Спектроскопические коэффициенты для ГВ и ГВА

Образец	E_4/E_6	$E_{465}^{0,001\%}$
ГВ	4,92	0,02
ГВА	4,18	0,03

Таким образом, вид спектральных линий и, как следствие, коэффициенты позволяют оценивать изменения в структуре гуминовых веществ, происходящие при облучении их УФ светом и согласуются с данными элементного анализа.

Вследствие низкого содержания природного изотопа углерода ^{13}C получение количественных спектров с хорошим соотношением сигнал-шум в растворе требует значительно большего приборного времени, чем в случае твердой фазы. По этой причине нами был выбран метод твердофазной спектроскопии с кросс-поляризацией и вращением под магическим углом (CPMAS ^{13}C ЯМР). Для регистрации количественных спектров использовали рекомендации, предложенные в работе [5].

Полученные спектры были проинтегрированы по девяти примерным интервалам (м.д.): 48–5 (алкильные фрагменты); 58–48 (метоксильные ($-\text{OCH}_3$) группы); 64–58 (О- и N-метилзамещенные ($\text{CH}_2\text{-O,N}$) фрагменты); 90–64 (О- и N-метинзамещенные (CH-O,N) фрагменты, преимущественно в полисахаридах); 108–90 (аномерный углерод в полисахаридах); 145–108 (углерод незамещенных и алкилзамещенных ароматических фрагментов); 165–145 (углерод фенолов, ароматических эфиров или аминов); 187–165 (углерод карбоксильных групп и их производных); 220–187 (карбонильный углерод в альдегидах и кетонах) [1]. CPMAS ^{13}C ЯМР спектры ГВ и ГВА представлены на рис. 2.

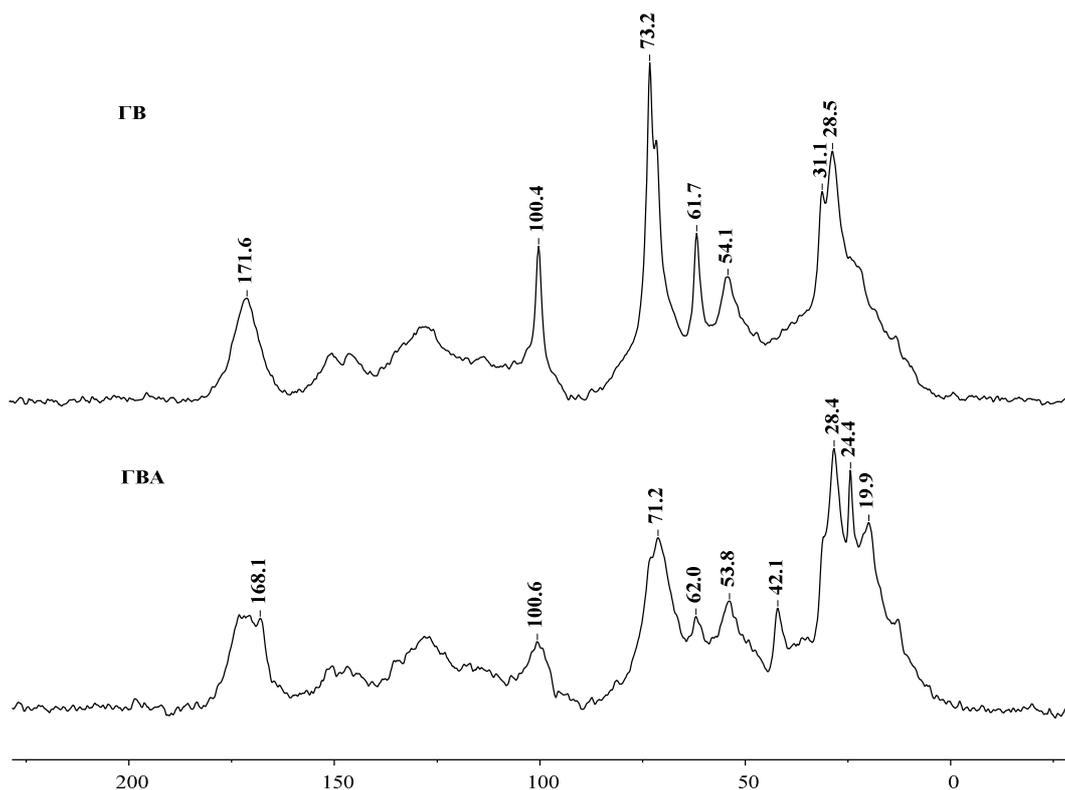


Рис. 2. СPMAS ^{13}C ЯМР спектры ГВ и ГВА

В целом спектры ГВ и ГВА имеют схожий вид. Основные различия проявляются в алкильном регионе (48-5 м.д.): в процессе активации увеличилось относительное содержание метильных ($\text{CH}_3\text{-C(O)-O-}$, $\text{CH}_3\text{-CH=CH-}$) и метиленовых групп в α - и β -положении к амино- или карбоксигруппе (42.1 м.д.) [8]. Также снизилась интенсивность сигналов углерода полисахаридных фрагментов в области 60, 70 и 100 м.д. Данные по количественному содержанию углерода в структурных фрагментах представлены в таблице 3.

Таблица 3

Распределение углерода по структурным фрагментам в ГВ и ГВА по данным СPMAS ^{13}C ЯМР спектроскопии

Объект	Интегральная интенсивность для интервалов (м.д.), %.									$\frac{C_{Ar}}{C_{Al}}$ *	C_{Carb}^{**} , %
	48-5	58-48	64-58	90-64	108-90	145-108	165-145	187-165	220-187		
	CH_n	CH_3O	CH_2O	OCH	OCO	C_{Ar}	C_{ArO}	COO	C=O		
ГВ	35,5	8,0	5,3	18,7	6,2	14,7	4,3	7,2	0,1	0,26	30,1
ГВА	40,2	7,3	4,1	15,3	5,2	14,4	4,6	8,6	0,4	0,26	24,6

*Степень ароматичности $C_{Ar}/C_{Alk}=(C_{Ar}+C_{ArO})/(C_{Hn}+C_{Carb})$ [1]

**Содержание полисахаридных фрагментов $C_{Carb}=\text{CH}_2\text{O}+\text{OCH}+\text{OCO}$ [1]

Анализ фрагментного состава показывает, что ГВ и ГВА отличаются низким содержанием ароматического углерода и высоким содержанием углерода алифатических цепей и, как следствие, низкой степенью ароматичности (0,26%), которая характеризует соотношение ароматических и алифатических фрагментов. Необходимо отметить, что под действием УФ света, в ГВА происходит снижение доли углерода в составе полисахаридов (на 19 %) по сравнению с ГВ. Полученные результаты согласуются с данными ИК-спектроскопии [3]. Также в результате активации происходит увеличение количества кислородсодержащих фенольных (на 7 %), карбоксильных (на 17 %) и карбонильных групп (в 4 раза), что согласуется с данными элементного анализа.

Ввиду известной проблемы, связанной с регистрацией количественных спектров [7], нами была выполнена проверка полученных результатов в сравнении с данными элементного анализа. Проверку выполняли по методике, предложенной в работе [1]. Вычисленные по результатам ЯМР спектроскопии атомные отношения Н/С по формуле

$$\frac{H}{C} = \frac{2/3 \cdot (C_{Ar} + C_{ArO}) + 5/3 \cdot C_{Alk-O} + 2 \cdot C_{Alk}}{\sum C}$$

составили для ГВ и ГВА 1,37, что на 8% выше результатов элементного анализа (таблица 1).

Таким образом, выполненные расчеты показали, что выбранные условия регистрации CPMAS ¹³C ЯМР спектров позволяют получать количественную информацию о структуре ГВ.

Заключение

Методами элементного анализа, спектроскопии в УФ и видимой области и CPMAS ¹³C ЯМР показано, что в процессе щелочного фотолиза гуминовые вещества претерпевают структурные изменения.

В активированных гуминовых веществах увеличивается степень окисленности, растет содержание кислородсодержащих групп (карбоксильных, карбонильных и фенольных), уменьшается количество полисахаридных фрагментов, а также снижается коэффициент цветности и ненасыщенность ГВА.

В целом, гуминовые вещества сапропеля, согласно полученным данным, характеризуются низкой степенью ароматичности и высоким содержанием алифатических цепей.

Список литературы

1. Ковалевский Д.В. Исследование структуры гуминовых методами спектроскопии ЯМР ¹H и ¹³C: дис.... канд. хим. наук. – М. 1998. – 140 с.

2. Орлов Д. С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. — М: Изд-во МГУ, 1990. — 325 с.
3. Савченко И.А., Корнеева И.Н., Плаксин Г.В. и др. Изменение свойств гуминовых веществ под воздействием УФ-света // *Фундаментальные исследования*. – 2013. - №10. – Ч. 12. – С. 2705-2709.
4. Савченко И.А., Корнеева И.Н., Плаксин Г.В. и др. Новый подход к решению проблемы стандартизации гуминовых кислот // *Современные проблемы науки и образования*. – 2013. - № 3. – URL: <http://www.science-education.ru/pdf/2013/3/199.pdf> (дата обращения 14.03.14).
5. Conte, P., Spaccini, R., Piccolo, A., 2004. State of the art of CPMAS ¹³C NMR spectroscopy applied to natural organic matter // *Progr. Nucl. Magn. Res. Spect.* – 44 (2004). – P. 215–223.
6. Perdue E. M. (1984) Analytical constraints on the structural features of humic substances // *Geochim. Cosmochim. Acta* 48. – P. 1435-1443.
7. Peuravuori J., Ingman P., Pihlaja K. Critical comments on accuracy of quantitative determination of natural humic matter by solid state ¹³C NMR spectroscopy // *Talanta*. – 59 (2003). – P.177-189.
8. Piccolo A., Campanella L., Petronio L. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of soil humic substances extracted by different mechanisms // *Soil Sci. Soc. Am. J.* – 54 (1990) – P. 750-756.

Рецензенты:

Гришин А.В., д.фарм.н., профессор, заведующий кафедрой фармации ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Омск.

Огай М.А., д.фарм.н., доцент кафедры фармацевтической технологии с курсом биотехнологии ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Омск.