

УДК 543.422.25:547.992.2

ВЫБОР УСЛОВИЙ РЕГИСТРАЦИИ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ^{13}C ЯМР-СПЕКТРОВ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ

Д. В. Ковалевский, А. Б. Пермин, И. В. Перминова, В. С. Петросян

(кафедра органической химии)

Методом ^{13}C ЯМР-спектроскопии исследовано строение 12 препаратов гумусовых кислот (ГФК). Оптимизированы условия регистрации количественных ^{13}C спектров ЯМР ГФК. Сопоставлены средние времена релаксации различных типов ядер ^{13}C в структуре ГФК. Установлено, что для получения спектров ^{13}C ГФК, близких к количественным, необходимо использовать задержку не менее 4 с.

Гумусовые кислоты (гуминовые и фульвокислоты, ГФК) представляют собой природные высокомолекулярные соединения нерегулярного строения и переменного состава. В последнее время эти вещества стали объектом интенсивного исследования в связи с важностью их роли в процессах детоксикации антропогенных загрязняющих веществ. Структура ГФК характеризуется сочетанием ароматических фрагментов, замещенных алифатическими цепочками и функциональными группами (главным образом, карбоксильными и гидроксильными), и обширной полисахаридно-пептидной периферией [1, 2]. ГФК из различных источников существенно различаются как по молекулярной массе, так и по содержанию основных структурных фрагментов. Следствием различий в структуре ГФК являются их различные химические и физико-химические свойства, в частности, реакционная способность и связывание экотоксикантов. Из-за нерегулярности строения ГФК, можно говорить лишь об усредненной их структуре, понимая под этим относительные количества различных структурных фрагментов, и способы их объединения в молекулу, вследствие чего вопросы количественного анализа структурных фрагментов ГФК получают первостепенное значение.

Применение спектроскопии ЯМР ^{13}C позволяет описать распределение углерода в молекулах ГФК по различным структурным фрагментам, отличающимся по сдвигам составляющих их ядер углерода. Общепринято, что интегральные интенсивности в спектрах низкомолекулярных веществ, полученных в обычных условиях, лишь качественно отражают содержание ядер различных типов в молекуле. Это связано со значительными различиями в скоростях релаксации ядер ^{13}C , имеющих различное химическое окружение. Времена спин-решеточной релаксации (T_1) ядер ^{13}C для большинства обычных органических молекул измеряются десятками секунд, достигая для четвертичных атомов, удаленных от протонированной периферии, > 120 с. Корректное определение времени релаксации различных типов ядер в препаратах ГФК с использованием стандартных методик практически неосуществимо вследствие значительного перекрытия сигналов ядер различных типов, а также из-за огромных затрат дорого-

стоящего приборного времени. В то же время, регистрация спектров с использованием больших времен задержки между импульсами (T_d) для осуществления заведомо полной релаксации, практически неосуществима вследствие низкой интенсивности сигналов в спектре ГФК [1]. В связи с этим, как правило, можно говорить лишь об оценке относительных скоростей релаксации ядер и о выработке приемлемых экспериментальных условий для регистрации количественных спектров ^{13}C .

Величину T_1 можно искусственно уменьшить добавлением в образец парамагнитного вещества (релаксанта), в качестве которого обычно используют ацетилацетонаты хрома или железа. Такой метод широко применяют для анализа нефтей и нефтепродуктов, что позволяет на несколько порядков снизить T_1 для наиболее медленно релаксирующих ядер четвертичных атомов углерода [3]. Однако в водных растворах применение ацетилацетонатов невозможно, а использование вместо них свободных солей переходных металлов вызывает образование нерастворимых гуматов вследствие специфического комплексообразования ГФК с ионами металлов. В то же время особенности спектров ГФК (большое количество слабо-выраженных сигналов наряду с ненулевой интенсивностью сигнала во всех областях ^{13}C спектра) накладывают ограничения на применение углеродсодержащих парамагнитных добавок. Поиск подходящего релаксанта для ^{13}C ЯМР спектроскопии ГФК представляет собой отдельную сложную задачу, которая в настоящее время остается нерешенной.

Специфика ГФК заключается в наличии в самих молекулах этих веществ парамагнитных центров, преимущественно семихионов, а также ионов железа [2, 4]. В работе [5] отмечалось, что локализация этих центров вблизи наиболее медленно релаксирующих ядер ^{13}C оказывает нивелирующее воздействие на релаксационные характеристики различных типов ядер ^{13}C в ГФК. Помимо этого величина T_1 всех типов ядер в структуре ГФК снижается благодаря низкой подвижности макромолекул этих соединений. Эти факторы делают возможным получение количественных спектров ^{13}C ЯМР ГФК без добавок релаксанта. При этом определяющим фактором, влияющим на ко-

личественность получаемых данных остается время задержки между импульсами.

В настоящий момент не существует единого мнения относительно величины оптимального времени задержки между импульсами, позволяющего получать количественные спектры ^{13}C ГФК с высоким соотношением сигнал/шум при разумных затратах времени на регистрацию спектра. Так, согласно работе [6], для получения количественного спектра ^{13}C достаточно использование $T_d = 1$ с. В то же время существует мнение, что для получения корректного спектра времена задержки должны составлять 4–8 с и более [4]. На рис. 1 приведена статистика использования различных времен задержки (56 работ за 1978–1996 гг.) Как видно из данного рисунка, подавляющее большинство исследователей используют времена задержки 2 с и менее, в то время как весь интервал применяемых времен задержки крайне широк. Это существенно затрудняет сопоставление данных, полученных различными авторами.

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы являлось исследование влияния выбора времени задержки на количественность получаемой структурной информации для установления оптимальных условий регистрации спектров ГФК.

Экспериментальная часть

Образцы для регистрации спектров ЯМР ^{13}C готовили растворением навески 100 мг твердого препарата ГФК в 3.5 мл 0.1М NaOH в D_2O . Регистрацию спектров проводили в десятимиллиметровой ЯМР-ампуле на спектрометре «VXR-400» фирмы *Varian* при рабочей частоте 100 МГц. Ширина развертки спектра составила около 26000 Гц, время регистрации сигнала спада свободной индукции (ССИ) 0.6 с, интервал между импульсами (T_d) от 1 до 4 с, при ширине импульса 45° , длительность накопления спектра 8–12 ч. В качестве внутреннего стандарта использовали DSS (натриевую соль 3-триметилсилил-1-пропансульфо-кислоты).

Фурье-преобразование выполняли с предварительным экспоненциальным взвешиванием сигнала ССИ с констан-

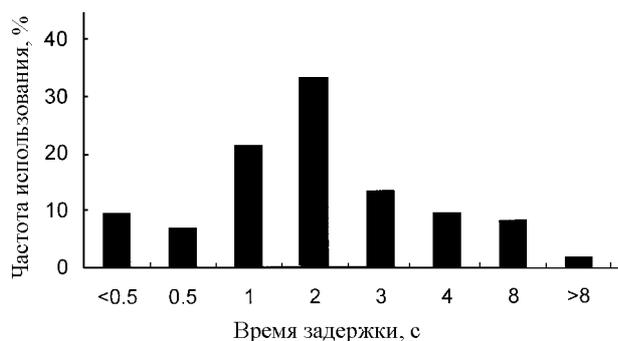


Рис. 1. Статистика использования различных времен в ^{13}C ЯМР ГФК задержки (56 работ за 1978–1996 годы) [1,3,4,5,6 и цитируемая литература]

Таблица 1

Влияние фазирования на результаты интегрирования различных областей спектра ГФК (среднее для 17 спектров, 7-кратное независимое фазирование)

Интервал	Спектральная область	Доверительный интервал*
I	0–48	3
II	48–90	3
III	90–108	14
IV	108–145	4
V	145–167	2
VI	167–185	2
VII	185–220	20

* $\alpha = 0.1$, $n = 7$, в % от величины.

той времени, эквивалентной уширению линий 20 Гц.

Препараты гумусовых кислот. В работе использовали 12 препаратов гумусовых кислот, выделенных из почвы и торфов по нижеперечисленным стандартным методикам.

Препараты гуминовых кислот (ГК) образцов НВW и НВWН были выделены из дерново-подзолистых почв экстракцией 0.1М NaOH; затем подкислением HCl до pH 2 были выделены гуминовые кислоты [7].

Препараты фульвокислот (ФК) дерново-подзолистых почв FA1N и FA3N были выделены согласно [7] путем сорбции на амберлитовой смоле XAD-2 после осаждения гуминовых кислот из щелочного экстракта.

Препараты ГФК торфа T5, T6, T7, T10, НТL, ТТL были выделены экстракцией 0.1М NaOH из торфов, предварительно проэкстрагированных смесью этанол/бензол 1:1 [8].

Препарат FIX-8 был получен в районе р. Истры с использованием амберлитовой смолы XAD-8 в соответствии с методикой [8].

В работе также был использован коммерческий препарат ГК производства фирмы *Aldrich* (АНА).

Все препараты были обессолены пропусканием через катионообменные смолы КУ-2-8 в H^+ -форме и выделены в твердом виде упариванием на роторном испарителе.

Результаты и их обсуждение

В силу химической гетерогенности ГФК окружение атомов углерода, входящих в их структуру, крайне разнообразно. Вследствие этого, сигналы, соответствующие каждому типу ядер, характеризуются широким диапазоном химических сдвигов и плохо разрешены между собой. Типичный спектр ^{13}C ЯМР ГФК приведен на рис. 2.

Для количественной интерпретации спектр ^{13}C ЯМР разбивали на интервалы интегрирования, отвечающие следующим типам ядер углерода в структурных фрагментах ГФК:

0 – 48 м.д. (сигналы алифатических атомов углерода);

48 – 90 м.д. (сигналы алифатических атомов углерода, связанных простой связью с гетероатомом (кислородом или азотом), в основном, принадлежащие фрагментам

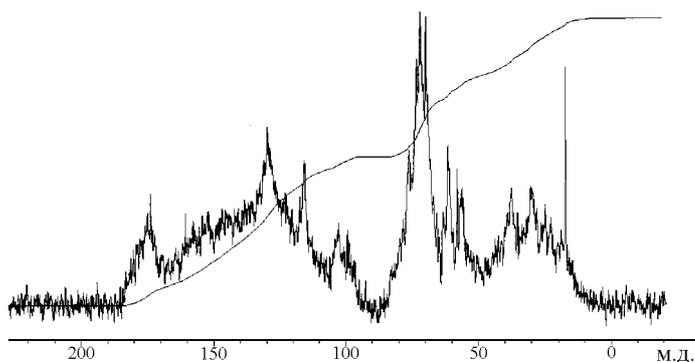


Рис. 2. Типичный спектр ЯМР ¹³С ГФК торфа

карбогидратов);

90–108 м.д. (сигналы ацетальных атомов углерода, связанных простыми связями с двумя атомами кислорода, представленные в структуре ГФК, в основном, в циклических полисахаридах);

108–145 м.д. (сигналы С- и Н-замещенных ароматических атомов углерода);

145–167 м.д. (сигналы О-замещенных ароматических атомов углерода);

167–185 м.д. (сигналы атомов углерода карбоксильных, сложноэфирных и амидных групп);

185–220 м.д. (сигналы атомов углерода кетонных и хинонных групп).

В связи с отсутствием в спектре ГФК выраженных пиков, однозначное его фазирование провести сложно. В то же время влияние искажений нулевой линии, связанных с фазированием, сильно влияет на величину получаемых интегралов. Нами использовалось 7-кратное независимое фазирование измеренных спектров с последующим усреднением полученных значений интегралов. Влияние процедуры фазирования на результаты интегрирования различных спектральных диапазонов продемонстрировано в табл. 1.

Как видно из табл. 1, ошибка, вызываемая фазированием, может составлять около 5% от получаемой величины

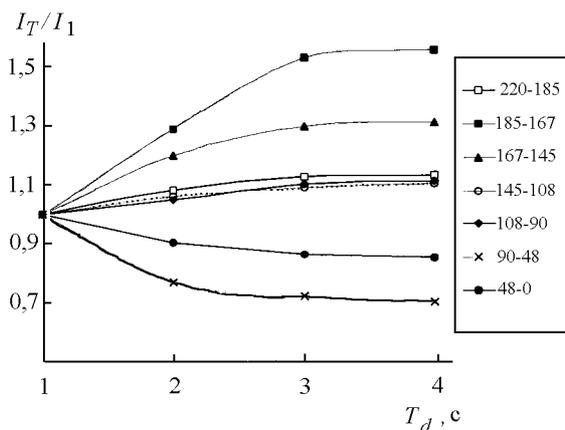


Рис. 3. Зависимость относительной интегральной интенсивности сигнала различных спектральных областей от времени задержки

в случае интервалов I, II, IV, V и VI, и более 20% для интервалов III и VII в связи с низкой интенсивностью сигналов в этих областях.

Влияние ядерного эффекта Оверхаузера на количество получаемой информации было оценено при помощи регистрации спектра препарата НВВ при полном отсутствии ядерного эффекта Оверхаузера (без развязки от протонов) и сопоставления его со спектром, полученным в рекомендуемых в литературе условиях (генератор развязки включен при считывании сигнала и выключен на период релаксационной задержки, импульсная последовательность INVGATE). При сопоставлении этих спектров не было выявлено различий в интенсивностях всех спектральных областей. Полученные данные свидетельствуют, что использование импульсной последовательности INVGATE позволяет полностью устранить влияние ядерного эффекта Оверхаузера.

Для выбора времени задержки T_d , позволяющего получать количественную информацию о структуре ГФК, нами были зарегистрированы спектры препаратов ГФК с задержкой между импульсами 1, 3 и 4 с. При этом для каждой спектральной области рассчитывали изменения относительной интегральной интенсивности (I_T) по отношению к спектру с $T_d = 1$ с. Такой подход дает возможность обобщить для всех препаратов ГФК изменения, происходящие в спектрах при увеличении времени задержки. Результаты интегрирования спектров при $T_d = 4$ с и расчетов I_4/I_1 приведены в табл. 2 и проиллюстрированы на рис. 3.

Как видно из табл. 2, при увеличении времени задержки относительная интегральная интенсивность сигналов в областях V и VI, соответствующих сигналам четвертичных (ароматических О-замещенных и карбоксильных) атомов углерода, значительно возрастает. В то же время относительная интегральная интенсивность сигналов в областях I и II (алифатические и карбогидратные атомы С), существенно снижается. Этот эффект обусловлен тем, что средние времена релаксации четвертичных атомов углерода в ГФК превышают таковые для обогащенных водородом атомов С алифатических и карбогидратных фрагментов. Промежуточное положение занимают ароматические С- и Н-замещенные (IV) и ацетальные (III) атомы С, для которых количество связей С–Н составляет в среднем величину < 1.

Относительно высокая скорость релаксации ядер кетонных и хинонных четвертичных атомов С (область VII), по-видимому, объясняется тем, что на этих фрагментах локализуется парамагнитность ГФК. В связи с этим ускорение релаксационных процессов за счет взаимодействия с неспаренными электронами в наибольшей степени выражено для таких ядер.

Следует отметить, что согласно полученным данным, карбогидратные атомы углерода в структуре ГФК характеризуются меньшими временами T_1 по сравнению с алифатическими, несмотря на большую, в среднем, степень гидрогенизированности последних. Это противоре-

Т а б л и ц а 2

Интегральные интенсивности сигнала различных областей спектров ГФК при $T_d = 4$ с (I_4) и их изменение по сравнению с $T_d = 1$ с

Препарат	I_4 для спектрального интервала, м.д.						
	220–185	185–167	167–145	145–108	108–90	90–48	48–5
НВW	0.9	17.1	12.5	32.4	2.1	16.5	18.6
НВWН	1.0	14.2	14.0	33.9	3.3	13.3	20.3
T5	1.3	12.1	16	24.6	1.2	22.1	22.7
T6	2.3	13.4	14.2	37.5	0.9	17.5	14.2
T7	4.7	15.1	15.8	33.1	2.4	14.2	14.8
T10	2.1	16.1	15.4	33.1	1.3	15.7	16.4
TTL	1.5	13.7	15.4	30.1	5.0	16.1	18.1
НТL	0.7	15.3	14.5	28.9	2.7	17.7	20.2
FA1N	2.7	19.6	12.1	23.2	2.1	16.6	23.7
FA3N	2.9	18.2	11.8	29.1	2.0	17.0	19.0
FIX-8	2.1	18.1	11.9	25.8	3.0	19.1	20.0
АНА	0.9	15.0	13.1	43.1	0	6.7	21.2
I_4/I_1							
Среднее	1.13 ±0.15	0.75 ±0.14	1.33 ±0.22	1.1 ±0.08	1.11 ±0.21	0.7 ±0.1	0.85 ±0.08

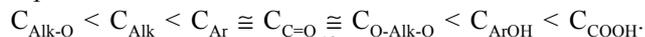
чит общим соображениям об относительных скоростях релаксации ядер ^{13}C в органических соединениях, протекающих преимущественно по диполь-дипольному механизму. С нашей точки зрения, в случае ГФК такой эффект может быть обусловлен меньшей подвижностью карбогидратных фрагментов в связи с образованием внутримолекулярных водородных связей, в то время как концевые, чисто алифатические группы испытывают свободное вращение вокруг $\sigma\text{-C-C-}$ связей. Для обычных температур и вязкостей раствора снижение подвижности, как правило, приводит к уменьшению времен релаксации ядер.

На рис. 3 проиллюстрированы изменения интегральных интенсивностей различных областей спектра при увеличении времени задержки. Как видно из рис. 3, все кривые $I_T/I_1(t)$ практически выходят на плато при $T_d = 4$ с. Это дает основание предполагать, что в таких условиях

спектры ГФК близки к количественным. Использование меньших времен задержки, по всей видимости, вызывает переопределение доли алифатических и карбогидратных фрагментов и недоопределение четвертичных O-замещенных ароматических и карбоксильных атомов углерода.

Выводы

Средние времена релаксации для различных типов ядер ^{13}C в структуре ГФК можно расположить в следующий ряд:



Для получения спектров ^{13}C ГФК, близких к количественным, необходимо использование времени задержки не менее 4 с. Для повышения достоверности результатов интегрирования рекомендуется проведение многократного независимого фазирования спектров ГФК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 98-03-33186а), Миннауки РФ и ФРГ (ВМВФ, Germany) (двусторонний проект RUS-143/97)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Steelink C., Wershaw R. L., Thorn K. A., Wilson M. A. / Humic Substances II. 1989. P. 281.
2. Орлов Д. С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. М., 1990.
3. Wilson M. A. / NMR techniques and applications in geochemistry and soil chemistry. Oxford, 1987. P. 182.
4. Humic substances in the Suwannee river, Georgia: interactions, properties and proposed structures. Oxford, 1994.
5. Schnitzer M. and Preston C.M. // Soil Sci. Soc. Amer. J. 1986. **50**. P. 326.
6. Preston C. M., Blackwell B. A. // Soil Sci. 1985. **139**. P. 88.
7. Орлов Д. С. Химия почв. М., 1992.
8. Данченко Н. Н. Дис. ... канд. хим. наук. М., 1997.