



МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М. В. Ломоносова

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра медицинской химии и тонкого органического синтеза

На правах рукописи

Жеребкер Александр Яковлевич

**ИЗУЧЕНИЕ СТРОЕНИЯ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ МЕТОДАМИ
ИЗОТОПНОГО ОБМЕНА И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

Диссертация

на соискание учёной степени кандидата химических наук

02.00.03 – органическая химия

Научный руководитель:

д.х.н., профессор Перминова И.В.

Москва – 2017

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1. Общая характеристика состава и структуры гуминовых веществ	8
1.1.1. Гипотезы гумификации и основные предшественники гуминовых веществ	11
1.2. Исследование гуминовых веществ методом масс-спектрометрии ионного циклотронного резонанса с преобразованиями Фурье.	15
1.3. Определение структурно-группового состава гуминовых веществ методом спектроскопии ЯМР.....	25
1.4. Методы введения изотопных меток в состав органических молекул и масс-спектрометрия изотопного обмена.	30
1.4.1. Методы введения изотопных меток.....	30
1.4.2. Введение изотопных меток в состав гуминовых веществ.	33
1.4.3. Масс-спектрометрия изотопного обмена для исследования строения гуминовых веществ.....	36
1.5. Получение модельных гуминовых веществ.	39
2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	44
2.1. Исследование гуминовых веществ различного происхождения и фракционного состава методом МС ИЦР ПФ.....	44
2.1.1. Выбор образцов гуминовых веществ и их первичная характеристика	44
2.1.2. Изучение молекулярного состава гуминовых кислот углей в оптимальных условиях электрораспыления	47
2.1.3. Определение влияния процедуры выделения на молекулярный состав гуминовых веществ.....	51
2.1.4. Сравнение молекулярного состава гуминовых веществ различного происхождения методом МС ИЦР ПФ.....	54
2.2. Синтез структурных аналогов гуминовых веществ	60
2.2.1. Синтез этил 3-(4-(этоксикарбонилокси)-3-метоксифенил)-3-оксопропионата	60
2.2.2. Проведение окислительной сополимеризации для получения модельных гуминовых веществ.....	63
2.2.3. Изучение молекулярного состава модельных гуминовых веществ методом МС ИЦРПФ.....	65
2.2.4. Извлечение структур индивидуальных компонентов модельных гуминовых веществ методом селективного Н/D обмена, контролируемого МС ИЦР ПФ	71

2.3. Применение дейтериевого обмена для извлечения структурной информации из масс-спектров ИЦР ПФ гуминовых веществ.....	77
2.3.1. Исследование устойчивости меченных дейтерием соединений при ионизации электрораспылением.....	77
2.3.2. H/D обмен скелетных протонов гуминовых веществ в кислой и основной средах.....	87
2.3.3. Распределение обмениваемых протонов в кислой и основной средах по диаграмме Ван Кревелена гуминовых веществ.....	93
2.4. Определение количества карбоксильных групп в составе индивидуальных компонентов гуминовых веществ.....	97
2.4.1. Дейтерометилирование гуминовых веществ.....	97
2.4.2. Фракционирование гуминовых веществ.....	105
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	110
3.1. Реактивы и оборудование.....	110
3.1.1. Реактивы.....	110
3.1.2. Методы.....	110
3.2. Выбор оптимальных условий электрораспыления ГВ.....	112
3.3. Обработка масс-спектров ИЦР ПФ.....	115
3.2.1. Идентификация молекулярных формул.....	115
3.2.2. Определение серий H/D обмена и дейтерометилирования.....	116
3.3. Выделение образцов гуминовых веществ.....	117
3.3.1. Методика выделения гуминовых веществ на смоле Amberlite XAD-8.....	117
3.3.2. Методика выделения РОВ на SPE картридже Bond Elut PPL.....	118
3.3.3. Методика выделения ГМК на SPE картридже Bond Elut PPL.....	118
3.3.4. Фракционирование гуминовых веществ на картриджах PPL.....	118
3.4. Селективное введение дейтериевых меток в состав гуминовых веществ.....	119
3.4.1. Проведение реакции H/D обмена в источнике ионизации масс-спектрометра.....	119
3.4.2. Проведение реакции H/D обмена скелетных протонов гуминовых веществ.....	119
3.4.3. Получение меченных дейтерием модельных соединений.....	119
3.4.4. Проведение реакции дейтерометилирования гуминовых веществ.....	120
3.5. Синтез структурных аналогов гуминовых веществ.....	120
ВЫВОДЫ.....	123
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	124
ВЫРАЖЕНИЕ ПРИЗНАТЕЛЬНОСТИ.....	125
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	126

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Гуминовые вещества (ГВ) образуются в результате стохастического синтеза из продуктов трансформации биомакромолекул, входящих в состав отмирающей биомассы. Как следствие, они представляют собой супрамолекулярные системы природных органических соединений с высокой степенью структурной гетерогенности, определяющей их устойчивость к биоразложению. Гумификация является вторым по масштабности процессом после фотосинтеза. ГВ составляют от 30 до 80% органического вещества вод, почв и горючих ископаемых, Одной из важных функций ГВ в биосфере является защитная, обусловленная их мощными стресс-протекторными и противовирусными свойствами. В то же время применение данных свойств ГВ на практике весьма ограничено, так как отсутствуют подходы к установлению структуры наиболее активных компонентов ГВ. Для идентификации отдельных молекул в системах такой сложности необходимо применение метода, обладающего сверхвысоким разрешением. Поэтому масс-спектрометрия ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (МС ИЦР ПФ) стала незаменимым методом исследования молекулярной организации гуминовых веществ [1]. Общепринятым подходом к извлечению структурной информации из данных МС ИЦР ПФ гуминовых веществ является построение диаграмм Ван Кревелена [2], представляющих собой двумерную проекцию композиционного состава вещества в координатах атомных соотношений Н/С и О/С, и их последующего разбиения на области, которые соответствуют химическим классам основных прекурсоров ГВ: лигнинам, танинам, терпеноидам, пептидам, углеводам и т.п. [3, 4]. Это позволяет сравнивать молекулярный состав ГВ из различных природных источников. Однако существенным недостатком такого подхода является косвенный характер получаемой информации о структуре молекулярных компонентов, входящих в состав ГВ. Для надежной идентификации индивидуальных молекул широко применяется метод тандемной масс-спектрометрии (МС/МС). Однако из-за экстремальной структурной гетерогенности гуминовых веществ задача выделения целевого пика для последующей фрагментации и регистрации осколков требует колоссальных затрат приборного времени и была реализована только в единичном исследовании низкомолекулярного образца растворенного органического вещества [5].

Альтернативным способом извлечения структурной информации из данных МС ИЦР ПФ может служить введение изотопных меток в состав индивидуальных компонентов ГВ. Например, в литературе описан способ газофазного дейтериеводородного обмена подвижных протонов в источнике ионизации масс-спектрометра [6], который позволяет по длине серий Н/D обмена определить количество подвижных протонов в каждой молекуле ГВ. Однако описанный подход

не несет информации об углеродном скелете молекул. Для получения такой информации необходимо применение методов селективного H/D обмена скелетных протонов и направленной модификации функциональных групп.

Целью данной работы является определение структурных фрагментов индивидуальных компонентов в составе гуминовых веществ методами селективного изотопного обмена и масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье.

Для достижения цели необходимо было решить следующие задачи:

- 1) Исследовать широкую выборку ГВ, выделенных из различных источников, методом МС ИЦР ПФ для установления закономерностей изменения молекулярного состава;
- 2) Синтезировать структурные аналоги ароматического каркаса ГВ путем окислительной поликонденсации лигнинных и фенольных прекурсоров;
- 3) Разработать методическое обеспечение для селективного введения дейтериевых меток в углеродный скелет ГВ и способы интерпретации данных МС ИЦР ПФ изотопного обмена;
- 4) Изучить влияние реакций обратного обмена в источнике ионизации масс-спектрометра и процедуры пробоподготовки на результаты анализа меченых образцов ГВ методом МС ИЦР ПФ;
- 5) Применить метод селективного изотопного обмена и МС ИЦР ПФ для определения структурных фрагментов индивидуальных компонентов ГВ;
- 6) Выполнить полную идентификацию структуры индивидуальных компонентов синтезированных аналогов ГВ методом изотопной МС ИЦР ПФ.

Научная новизна

- Впервые показана возможность извлечения информации о структурной изомерии индивидуальных ароматических компонентов гуминовых веществ методами селективного изотопного обмена в сочетании с масс-спектрометрией сверхвысокого разрешения.
- Впервые продемонстрировано сходство молекулярного состава структурных аналогов ГВ, полученных методом окислительного сочетания фенолов, и ароматических компонентов природных ГВ.
- На примере структурных аналогов ГВ впервые показано, что в источнике ионизации электрораспылением в реакции H/D обмена вступают скелетные протоны, участвующие в кето-енольной таутомерии.
- Впервые показано, что молекулярные компоненты ГВ с одинаковым количеством кислотных групп характеризуются близким элементным составом вне зависимости от источника происхождения ГВ.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные по строению и молекулярному составу широкой выборки ГВ будут использованы для разработки теоретических основ молекулярной систематики природного органического вещества, основанной на идентификации общих и уникальных индивидуальных компонентов в составе образцов различного генезиса. Создание такой систематики будет способствовать пониманию эволюции органического углерода на Земле. Найденные взаимосвязи между молекулярным составом продуктов окислительной поликонденсации и структурой исходных фенольных мономеров могут лечь в основу направленного синтеза гуминоподобных систем, наиболее близких по структуре к природным ГВ. Информация о структурных фрагментах индивидуальных компонентов ГВ является необходимой для получения прогностических моделей «структура – биологическая активность ГВ» и понимания механизма их биологической активности. Указанные модели могут стать теоретической основой для разработки политаргетных лекарств на основе ГВ.

Практическая значимость работы определяется тем, что полученные данные войдут в открытую базу данных IUPAC по компонентному составу гуминовых веществ и природного органического вещества (https://iupac.org/projects/project-details/?project_nr=2016-015-2-600). Создание «химической библиотеки» компонентов природного органического вещества станет важным инструментом для верификации данных о молекулярном составе сложных матриц, например, по частоте встречаемости молекулярных составов. Разработанный в данной работе комплекс методик введения изотопных меток и определения карбоксильных групп в индивидуальных компонентах методом МС ИЦР ПФ может быть использован для углубленного анализа биотоплив, моторных топлив и нефтей. Полученные результаты могут быть использованы в образовательных курсах по химии природного органического вещества и химии растительного сырья.

Положения, выносимые на защиту

- Результаты исследования молекулярного состава ГВ из различных источников методом МС ИЦР ПФ.
- Синтез структурных аналогов ГВ и результаты сопоставления их сходства с природными ГВ.
- Методические подходы к селективному введению изотопных меток в углеродный скелет ГВ с помощью каталитического H/D обмена и способ интерпретации данных изотопной МС ИЦР ПФ.
- Результаты исследования структурной изомерии ароматических компонентов угольных ГВ методами селективного изотопного обмена и МС ИЦР ПФ.

- Положение о ведущей роли кето-енольной таутомерии в реакциях H/D обмена скелетных протонов в источнике ионизации электрораспылением масс-спектрометра.
- Способ определения количества карбоксильных групп в индивидуальных компонентах ГВ и их распределения по молекулярному ансамблю ГВ.

Личный вклад автора состоит в написании критического обзора литературных данных; постановке экспериментов по введению дейтериевых меток в состав ГВ; подборе оптимальной процедуры пробоподготовки образцов для анализа методом МС ИЦР ПФ; интерпретации результатов масс-спектрометрии изотопного обмена. Все исследования, описанные в диссертации, выполнены лично автором. Во многих случаях эти работы проводились в рамках сотрудничества с другими российскими и зарубежными учеными.

Апробация результатов. Результаты работы были представлены в виде стендовых и устных докладов на следующих конференциях: Вторая и Третья международные конференции отделения СНГ международного гуминового общества (МГО) НИТ 2012 и 2014, Москва, Россия; Кластер конференций по органической химии "ОргХим-2013", Санкт-Петербург, Россия; 17-ая и 18-ая международные конференции МГО: 2014, Иоаннина, Греция, и 2016, Канадзава, Япония; Зимняя конференция молодых учёных по органической химии «WSOC2015», 2015, Красновидово, Россия; 64-ая Международная конференция Американского масс-спектрометрического сообщества АСМС-2016, Сан-Антонио, США; 2-ая Международная конференция "Инновации в масс-спектрометрии", 2016, Москва.

Всего по материалам диссертации опубликовано 18 печатных работ, из них 11 статей в рецензируемых научных журналах, отвечающих требованиям высшей аттестационной комиссии, и 7 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

Исследования выполнялись при поддержке проектов РФФИ (13-04-01853, 16-04-01753, 16-03-01057, 16-33-00914), РНФ (16-14-00167, 14-24-00114) и ИЮПАК (2016-015-2-600).

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика состава и структуры гуминовых веществ

Гуминовые вещества (ГВ) представляют собой природные супрамолекулярные ансамбли, которые образуются при окислительном разложении и вторичном синтезе биомакромолекул, входящих в состав растительных остатков и других живых организмов: лигнина, таннинов, белков и др. [7, 8]. ГВ являются важным компонентом почвенных, угольных, торфяных и водных экосистем [9, 10]. Общепринятая классификация ГВ [11] основана на различии в растворимости в кислотах и щелочах. Согласно этой классификации ГВ подразделяют на три составляющие: гумин – неизвлекаемый остаток, нерастворимый ни в щелочах, ни в кислотах; гуминовые кислоты (ГК) – фракция ГВ, растворимая в щелочах и нерастворимая в кислотах (при $\text{pH} < 2$); фульвокислоты (ФК) – фракция ГВ, растворимая и в щелочах, и в кислотах. В силу специфики образования в состав ГВ входят как органические, так и неорганические компоненты. Однако под элементарным составом ГВ понимают состав именно их органической части, образованной сравнимыми количествами атомов углерода, водорода и кислорода [12]. Обязательным минорным элементом является азот, почти во всех препаратах определяется и сера [13, 14]. При этом ГВ различного происхождения существенно отличаются по элементному составу [12]. Также различен элементный состав и фракций ГВ. Содержание углерода в ГК различного происхождения варьирует от 45 до 65 %. Для ГК характерны более низкое содержание водорода или, иными словами, низкие значения атомного соотношения Н/С, чем для ФК, что указывает на их большую ненасыщенность. Данный показатель (Н/С) убывает в ряду: морские донные отложения > пресные воды > торфа \approx почвы > уголь [12]. ФК характеризуются более низким содержанием углерода и более высоким – кислорода. Это предполагает большую степень замещения ароматического каркаса ФК кислородсодержащими функциональными группами. Максимальное содержание кислорода характерно для ФК пресных вод.

Отсутствие генетического кода формирования ГВ приводит к тому, что они характеризуются полидисперсностью масс и экстремальной гетерогенностью молекулярного состава. Поэтому ГВ не могут быть описаны едиными химическими структурами. Они описываются моделями, составленными из найденных элементарных, функциональных и структурных составляющих, а также данных о поведении в окружающей среде и толерантности к химическим превращениям [15].

Одной из наиболее известных моделей является блок-схема строения структурной ячейки, предложенная Орловым [11] (Рис.1.1). Данная структурная ячейка представляет собой минимальную по размеру часть молекулы, которая содержит все важнейшие структурные

фрагменты. В данной модели выделен ароматический каркас (негидролизуемые части молекулы и типичные способы их соединения), и гидролизуемая периферия, представленная в виде набора структурных компонентов, количество и характер сочленения которых варьируется.

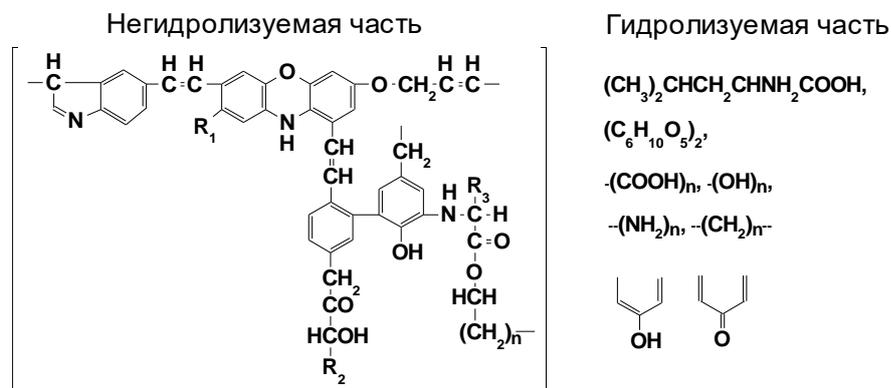


Рис.1.1. Структура структурной ячейки ГК почв (по Орлову) [11].

Схема удовлетворительно объясняет окислительно-восстановительные, кислотные и оптические свойства ГВ. Однако отсутствие молекулярного вида не позволяет делать выводы о механизмах процессов, в которые вовлечены ГВ. Поэтому во многих работах были представлены модельные среднестатистические молекулы [16, 17]. Например, Кляйнхемпель предложил модель, которая отвечала элементному составу ГВ, содержала наиболее вероятные структурные фрагменты, а также показывала экстремально гетерогенный характер ГВ [18] (Рис. 1.2.):

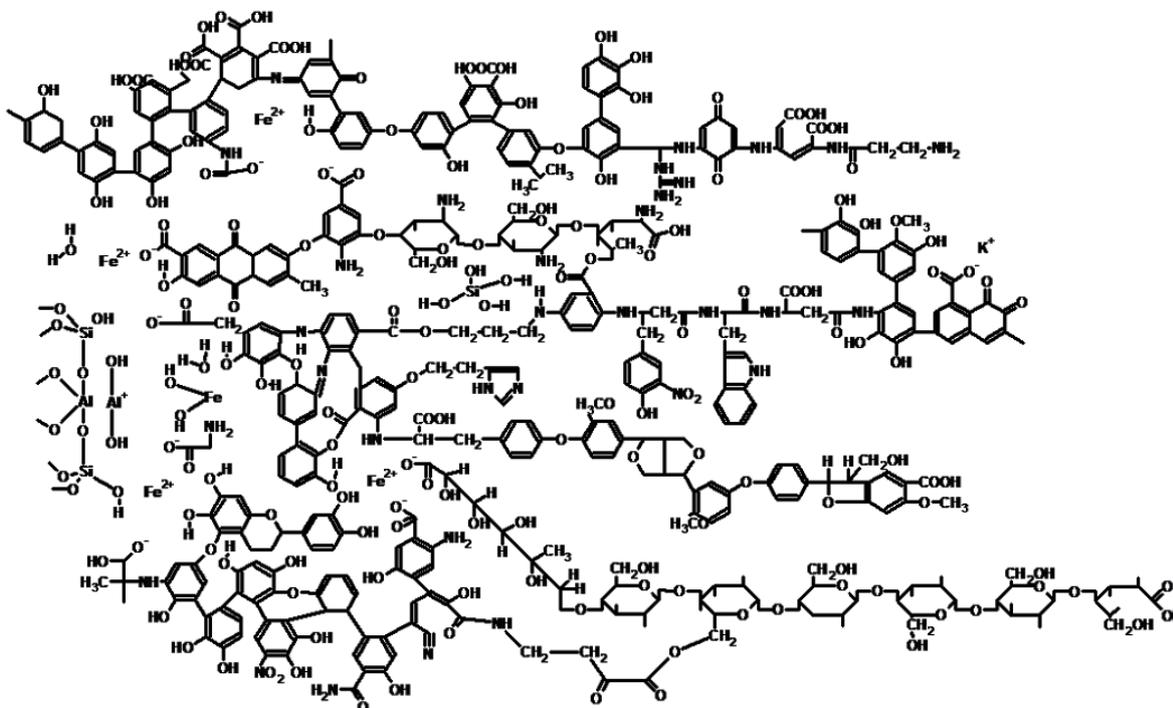


Рис. 1.2. Структурная модель ГВ почв по Кляйнхемпелю, 1970 [18].

На рубеже 21 века для описания молекулярной организации ГВ стали применяться вычислительные методы. Одной из первых 3D моделей, основанной на применении молекулярной механики, стала модель супрамолекулярного комплекса окисленного лигнина и

целлюлозы (Рис. 1.3.), предложенная Шевченко и Бэйли [19]. Эта модель позволила довольно четко описать взаимодействие ГВ с минеральными поверхностями.

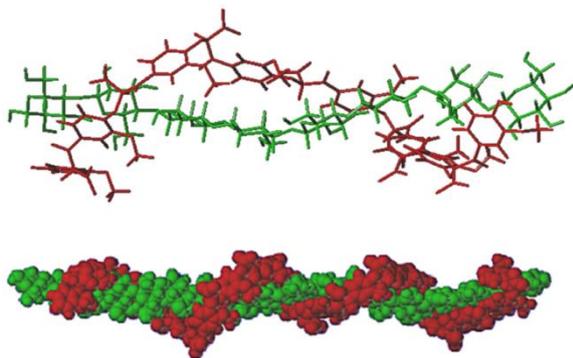


Рис. 1.3. Структура ГВ почвы по Шевченко и Бэйли.

Существенное изменение представления о молекулярной организации гуминовых веществ претерпели в результате исследований Алессандро Пикколо [20, 21]. В критическом обзоре работ, посвященных спектральному и химическому анализу ГВ [20], автор указывает на отсутствие однозначных доказательств полимерного строения гуминовых веществ. В развитие гипотезы Вершау о мицеллярном строении ГВ, основанной на данных малоуглового рентгеновского рассеяния [22], Пикколо предположил, что молекулярный ансамбль ГВ в растворе имеет мицеллярную структуру, образованную за счет слабых взаимодействий: Ван-дер-Ваальсовых, π - π , CН - π и водородных связей [23]. Для доказательства отсутствия полимеров в составе ГВ, Пикколо использовал гель-хроматографическое разделение растворов ГВ при разных рН [24]. Для понижения рН использовались органические кислоты, которые по задумке автора должны были изменить гидрофильно-липофильный баланс и разрушить мицеллярные структуры. Действительно, во всех своих экспериментах при понижении рН авторы наблюдали сдвиг сигнала в область низких значений молекулярных масс [25]. На основании полученных данных, Пикколо выдвинул теорию о доминирующем вкладе низкомолекулярных компонентов в составе ГВ, которые существуют в растворе в виде мицелл [20]. Однако, гипотеза мицеллярного строения ГВ подверглась резкой критике ввиду того, что автор не учитывал влияние неэсклюзивных эффектов на результаты фракционирования, а именно, водородное связывание ГВ с гелем при низких рН и электростатические взаимодействия при высоких рН и ионной силе [26]. В результате проведения последующего ряда экспериментов автор предложил рассматривать ГВ как супрамолекулярную систему, в составе которой доминируют низкомолекулярные компоненты [27]. Гипотеза о супрамолекулярном строении ГВ является общепринятой в настоящее время [28]. Авторы данного подхода явились и создателями так называемой “Гумиомики” - пошаговом разделении гуминового молекулярного ансамбля за счет разрушения межмолекулярных связей и “слабых” ковалентных связей с последующим

разносторонним исследованием получаемых фракций методами высокого разрешения [28]. Недостаток данного подхода заключается в значительном вмешательстве в структуру исходных соединений, действием BF_3 , KOH и HI для разрыва эфирных и сложноэфирных связей [29].

Проведенный обзор литературы показывает, что гуминовая система состоит из широкого набора молекулярных компонентов различного строения и молекулярных масс, которые в водных растворах образуют устойчивые амфифильные агрегаты, удерживаемые гидрофобными и другими слабыми взаимодействиями. Данные агрегаты могут рассматриваться как псевдомолекулы, для которых можно определить средние физико-химические свойства: структурный и функциональный состав, молекулярную массу и реакционную способность [30].

Обобщение различных моделей молекулярной организации ГВ позволяет заключить, что они характеризуются наличием компонентов с различной реакционной способностью [31]: ароматических молекул с алифатическими цепочками и функциональными группами (главным образом карбоксильными и гидроксильными) в качестве заместителей, полифенольными соединениями, содержащими как $\text{C}-\text{C}$, так и эфирные связи [32], а так же полисахаридно-пептидных компонентов [10, 33]. Различный вклад данных компонентов в состав ГВ обуславливает зависимость свойств выделяемого вещества от источника его происхождения. Причем в литературе было показано, что ароматическая, наиболее гидрофобная, часть вносит основной вклад в детоксицирующую способность [34, 35] и биологическую активность [36–38] ГВ. Например, гуминовые кислоты угля проявляют максимальный ингибирующий эффект по отношению к ВИЧ-инфекции [39], в то время как гидрофильные фракции не обладают таким свойством. Для детального объяснения наблюдаемой зависимости свойств ГВ от источника их происхождения необходимо перейти на молекулярный уровень описания. Для выполнения данной задачи необходимо подробно изучить процесс формирования гуминовых веществ в природных системах.

1.1.1. Гипотезы гумификации и основные предшественники гуминовых веществ

Наиболее распространенные гипотезы гумификации включают в себя биодеградиационную и абиотической конденсации [11]. Первая гипотеза предполагает образование ГВ в результате постепенной деградации биополимеров при попадании в окружающую среду [11]. Растительная биомасса состоит из лигнина, целлюлозы, гемицеллюлозы, танинов, протеинов, липидов и терпеноидов. Окислительная деградация биомассы обуславливает гетерогенный состав ГВ. Вторая гипотеза гумификации предполагает вторичный синтез ГВ из низкомолекулярных продуктов разложения биополимеров путем конденсации с образованием высокомолекулярных соединений. Следует отметить, что оба указанных пути образования ГВ не являются взаимоисключающими [40]. В обоих случаях

предполагают, что образование специфических гуминовых макромолекул происходит в результате рекомбинации радикалов, образующихся при окислении замещенных фенолов и гидрохинонов, в процессе распада ароматических компонентов биомассы [41, 42]. Однако в настоящее время данная концепция гумификации уступает супрамолекулярной теории Пикколо, исключающей формирование в природных условиях вторичных полимерных соединений [20]. Согласно данной гипотезе процесс гумификации заключается в накоплении небольших гидрофобных молекул (до 1000 Да), которые образуют оболочку для защиты гидрофильных компонентов от биоразложения [43]. Обобщая гипотезы гумификации можно заключить, что ароматические компоненты гуминовых веществ представлены, в основном, производными лигнина и танинов.

Таннины содержатся в коре, древесине и листьях. Различают гидролизуемые и конденсированные (негидролизуемые) таннины [44]. Основу гидролизуемых таннинов составляют сложные эфиры галловой кислоты. Такие соединения подвергаются гидролизу при взаимодействии с кислотами, основаниями и ферментами танинацилгидролазами с образованием углеводов и фенолкарбоновых кислот (Рис. 1.4).

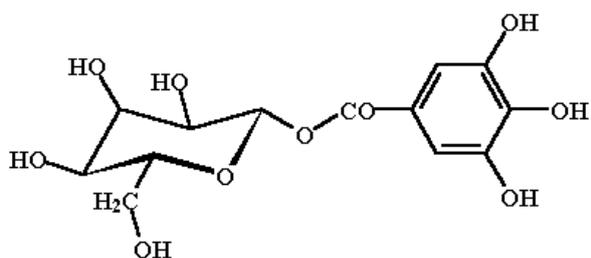


Рис. 1.4. Фрагмент гидролизуемых таннинов.

Конденсированные таннины представляют собой производные флаванолов, главным образом, димеры 3,4-флавандиола или 3-флаванола (Рис. 1.5). В подобных соединениях отсутствуют лабильные связи, поэтому они устойчивы к процессам гидролиза.

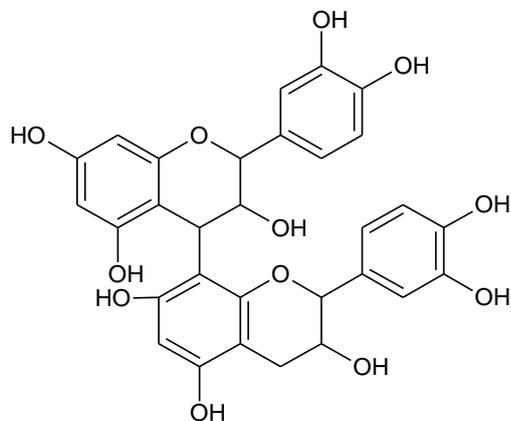


Рис. 1.5. Фрагмент конденсированных таннинов.

Лигнин – это нерегулярный разветвленный полимер, который построен из остатков замещенных фенолпропановых спиртов: кониферилового, паракумарилового и синапилового (Рис. 1.6). Он содержится в древесине хвойных и лиственных породах, составляя 23-38% её массы [45].

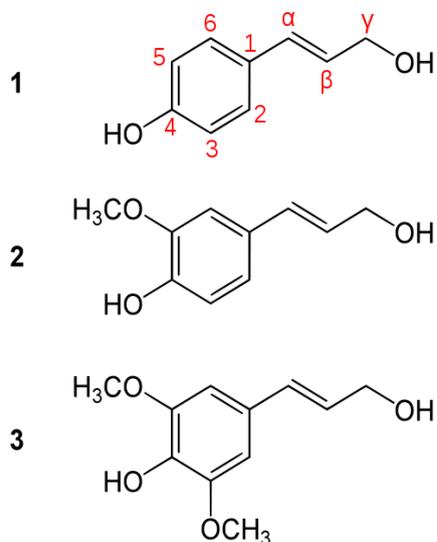


Рис. 1.6. Фенилпропановые спирты: 1) паракумарилловый, 2) конифериловый 3) синапиловый. На примере паракумарилового спирта дана стандартная нумерация атомом в фенилпропановых единицах [45].

Структура лигнина образована последовательным связыванием фенилпропановых фрагментов через атом кислорода в 4-м положении ароматического кольца одной молекулы и углерода в β -положении пропановой цепочки, образуя в номенклатуре лигнинов β -O-4 связь [46], как это показано на Рис. 1.7.

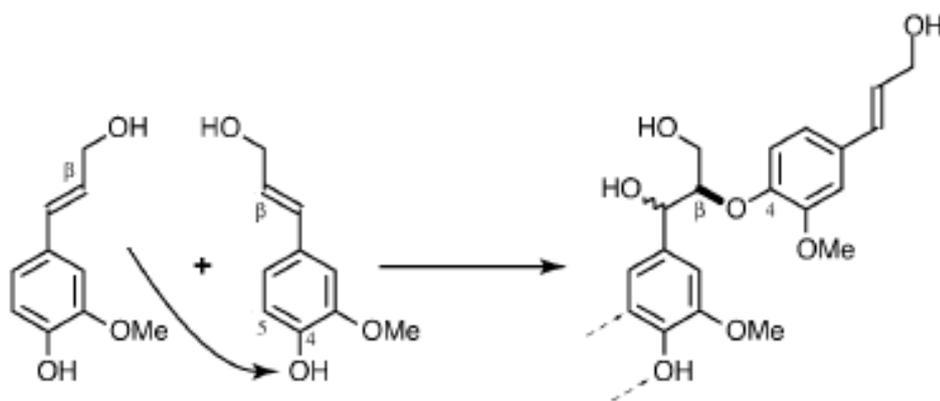


Рис. 1.7. Образование β -O-4 связи в лигнине двумя молекулами кониферилового спирта [46].

Для изучения структуры лигнина широко используют получение модельных синтетических структурных аналогов, причем наибольшее количество работ по моделированию структуры лигнина основаны на превращениях кониферилового спирта [45]. Так как положения 3 и 5 (Рис.1.6) могут быть вакантными или замещены на OCH_3 -группу [46], в качестве среднего

модельного фрагмента лигнина можно рассматривать димер - гваяциловый эфир гваяцилглицерина, содержащий в β -положении боковой цепи эфирную связь. В связи с этим авторы [47] предложили модель лигнина, основанную на полимеризации гваяцилового эфира гваяцилглицерина. Представленная авторами модель лигнина с выделенными фрагментами, образующими β -O-4 связь, представлена на Рис. 1.8.

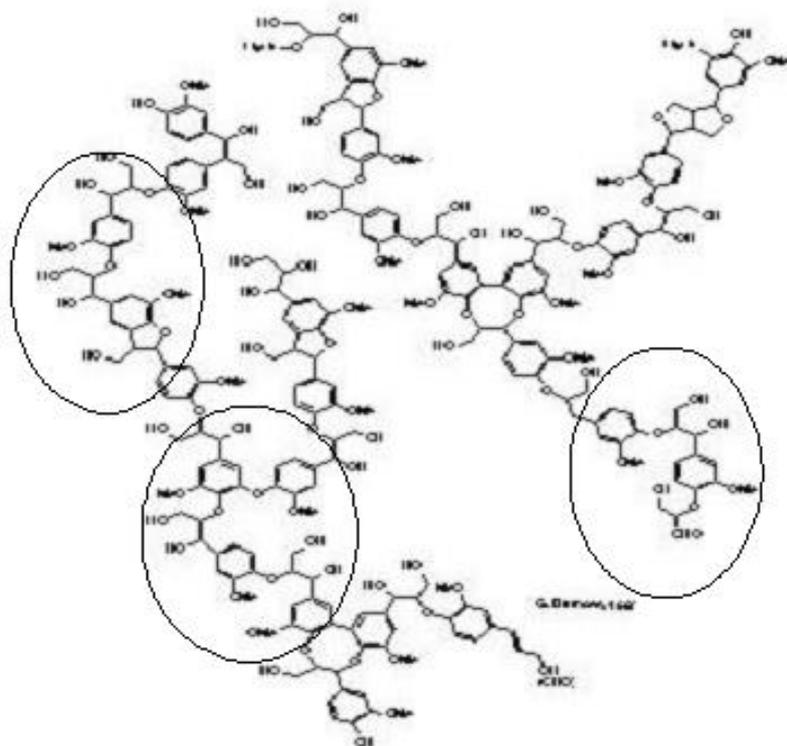


Рис. 1.8. Фрагмент структуры лигнина с выделенными фрагментами, образующими β -O-4 связь [47].

Изучая сходные элементы строения лигнина и ГВ, авторы [48] проводили окисление фракций лигнина, выделенных из почв, торфов и вод, катализируемое оксидом меди, и сопоставляли продукты окисления лигнина с фракциями гуминовых и фульвокислот из тех же источников. Было обнаружено, что продукты окисления и значительная часть фракций гуминовых кислот почвы и торфа состояли из окисленных полифенолов и фенилпропановых единиц, окисленных до кислот и альдегидов. Авторы заключили, что наименьший вклад фенилпропановые единицы вносят в формирование фульвокислот из указанных источников и водных ГВ, которые образованы преимущественно производными танинов [48].

В силу экстремальной молекулярной гетерогенности гуминовых веществ и отсутствия возможности их хроматографического разделения на индивидуальные соединения [49, 50], рассмотрение узкого набора компонентов недостаточно для полноценного описания формирования ГВ из их основных предшественников на молекулярном уровне. Поэтому особую важность для изучения строения ГВ приобрел метод масс-спектрометрии ионного

циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (МС ИЦР ПФ) в комбинации с ионизацией электрораспылением (ЭР), который позволил выйти на новый уровень изучения сложных природных систем [51, 52].

1.2. Исследование гуминовых веществ методом масс-спектрометрии ионного циклотронного резонанса с преобразованиями Фурье.

Масс-спектрометрия с электрораспылением (ЭР) в качестве источника ионов является одним из важнейших методов анализа органических молекул и их смесей [53]. Наиболее мощным анализатором является масс-спектрометр ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (МС ИЦР ПФ) [54]. Принципиальная схема таких приборов представлена на Рис. 1.9 [55]. После ввода пробы, ионы проходят систему трансфера и фильтрации, составляющие части которой зависят от типа прибора. Высокая чувствительность прибора поддерживается благодаря многоступенчатой вакуумной откачке. Измерительная ячейка находится в мощном однородном магнитном поле, создаваемом сверхпроводящим соленоидом.

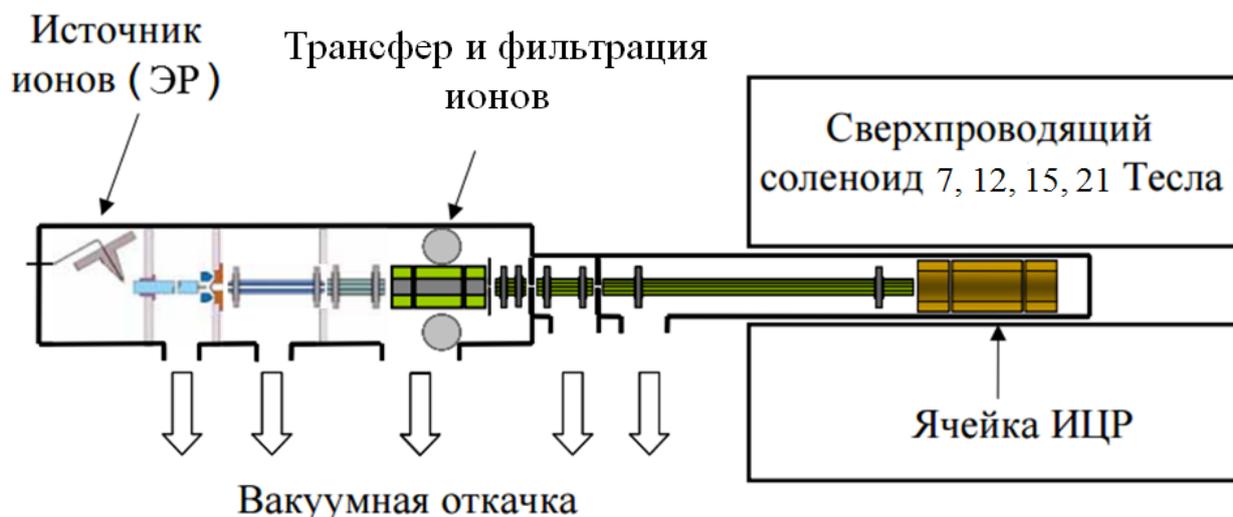


Рис. 1.9. Принципиальная схема МС ИЦР ПФ, состоящая из источника ионизации, система трансфера ионов, многоступенчатой вакуумной откачки и измерительной ячейки ИЦР [55].

Принцип работы МС ИЦР ПФ заключается в детектировании циклотронных частот всех заряженных частиц, попадающих в измерительную ячейку [56]. Под действием магнитного поля ионы двигаются по круговым траекториям. Угловая частота циклотронного движения ионов зависит от отношения массы к заряду частицы согласно уравнению (1):

$$\omega = \frac{ZeB}{m} \quad (1)$$

где Z – заряд иона, e – элементарный заряд, m – масса иона [57].

Действуя радиоволновым излучением, можно перевести ионы в возбужденное состояние с увеличенным радиусом вращения, достигающим максимума при резонансе. Такое движение ионов генерирует наведенный ток на пластинах детектора. Применение преобразования Фурье к временному сигналу спада свободной индукции (ССИ) приводит к классическому виду масс-спектра. Так как частота вращения может быть измерена очень точно, данный метод обладает максимальной разрешающей способностью [58].

Благодаря сверхвысокой разрешающей способности МС ИЦР ПФ, достигающей при рутинном анализе 400 тысяч при $m/z = 400$ Да [54], этим методом удалось различить сигналы индивидуальных молекулярных ионов гуминовых веществ. Даже с применением мягких методов ионизации при атмосферном давлении, таких как ЭР или фотоионизация (ФИАД) [59], которое исключает фрагментацию молекулярных ионов, типичный спектр ГВ состоит из десятков тысяч пиков (Рис. 1.10), каждый из которых соответствует индивидуальному элементному составу. Благодаря высокой точности определения масс метода – менее 0.5 м.д., было показано, что каждая номинальная масса состоит из множества пиков [60, 61]. Таким образом, метод МС ИЦР ПФ дает огромные возможности для описания молекулярного состава ГВ

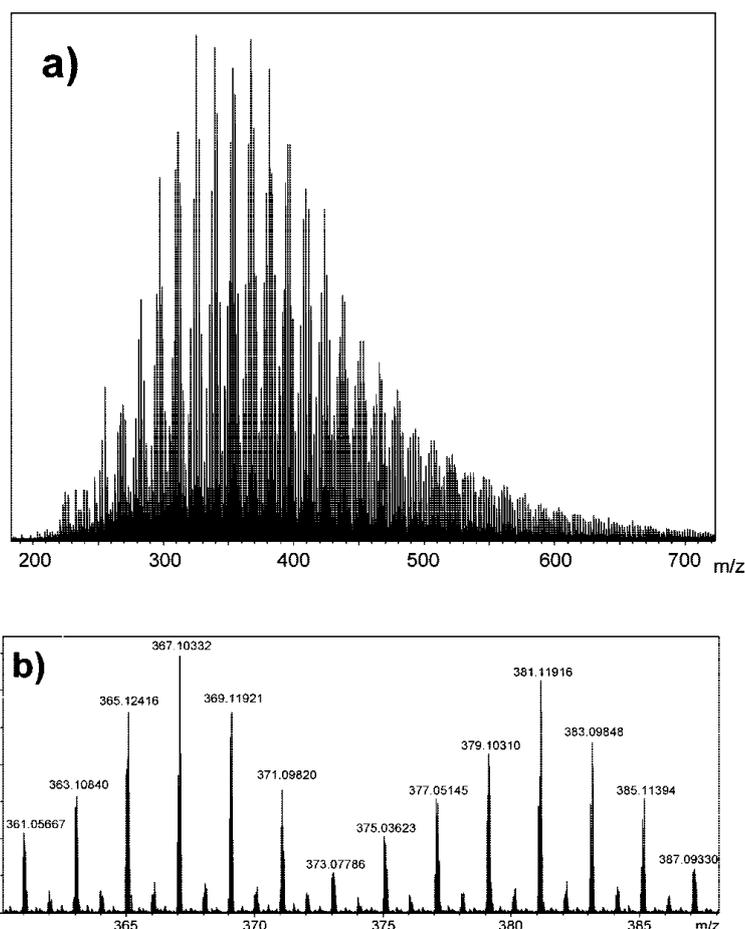


Рис. 1.10. (а) полный масс-спектр образца SRFA, зарегистрированный в режиме отрицательных ионов (в) секция масс-спектра интервалом в 30 Да [60].

Высокая точность определения масс позволяет с маленькой ошибкой определять брутто-формулу молекулярных пиков, решая линейное Диофантово уравнение, используя точные значения масс атомов: C, H, O, N, S [62]:

$$M = c \cdot 12,0000 + h \cdot 1,00782 + o \cdot 15,99491 + n \cdot 14,00307 + s \cdot 31,97207,$$

где коэффициенты c, h, o, n, s являются целыми числами, равными количеству атомов C, H, O, N и S, соответственно. Ограничения на значения, которые могут принимать данные коэффициенты, определяются, исходя из результатов элементного анализа и общих правил о составе органических молекул. Сложность подсчета брутто-формул заключается в том, что в масс-спектрах мы наблюдаем не массы M, а отношения массы к заряду m/z. Поэтому первостепенная задача - определение зарядового состояния иона. Надежным методом является идентификация ¹³C изотопных пиков. Так как масса m двух изотопов углерода отличается на известное значение 1.00335, то разница отношений m/z между основным и ¹³C изотопным пиками указывает на зарядовое состояние иона [63]. Многочисленные исследования показывают, что подавляющая часть ионов в масс-спектрах ГВ представляет собой однозарядные ионы [51, 64].

Решение Диофантова уравнения возможно для большинства пиков в масс-спектре ИЦР ПФ. При рутинном анализе ГВ определяются тысячи формул, большая часть из которых состоит из СНО-атомов. Это указывает на значительный вклад природных веществ, не содержащих азота и серы, таких как лигнин и танины. Для полноценного анализа такого пласта информации необходимы методы свертки и визуализации данных. Для этих целей широко применяются методы графического представления данных - диаграммы Кендрика и Ван Кревелена.

Диаграмма Кендрика представляет собой двумерное представление одномерного списка точных масс, в котором по оси абсцисс откладывается номинальная масса (ближайшее целое число) по шкале Кендрика, а по оси ординат – дефект массы, т.е. разность между точной и номинальной массами [65]. Для удобства интерпретации шкала измеренных масс переводится в шкалу масс Кендика (КМ), например СН₂, согласно уравнению (2). Дефект масс Кендрика (КМД) определяется по разности между массой Кендрика и номинальной массой (НМ) согласно уравнению (3).

$$\text{Масса Кендика (КМ)} = \text{измеренная } m/z \times (14/14.01565) \quad (2)$$

$$\text{Дефект масс Кендрика (КМД)} = (\text{номинальная масса (НМ)} - \text{КМ}) \quad (3)$$

При таком представлении молекулы, массы которых отличаются на СН₂-группу, будут обладать одинаковым КМД. Например, жирные кислоты состава С₂₀Н₄₀О₂ и С₂₁Н₄₂О₂ будут лежать на одной прямой на диаграмме Кендрика при таком представлении данных.

Описанный подход был впервые применен в лаборатории проф. Маршалла (Университет Флориды, США) для визуализации результатов масс-спектров ИЦР ПФ нефтей, для которых

характерно наличие гомологических CH_2 серий [66, 67]. Затем диаграмма Кендрика нашла широкое применение для анализа данных МС ИЦР ПФ гуминовых веществ [60, 68]. Определение различных гомологических серий делает возможным сортировку молекул по различным классам, указывает на степень алкилирования или степень ненасыщенности, повышает надежность присваивания брутто-формул (Рис. 1.11А) [69]. Одновременное определение всех гомологических серий для исследуемого образца, названное статистикой разности масс (например, CH_2 , COOH , CH_2O и др.) [70], легло в основу разработанного ранее в нашей лаборатории программного обеспечения для подсчета брутто-формул, используемого в данной работе. В настоящее время применяют многомерную статистику Кендрика, функциональную сеть, которая может указать на химические процессы, происходящие при формировании различных ГВ (Рис. 1.11Б) [71–73]. Однако статистика масс Кендрика представляет информацию лишь о модели распределения элементных составов, и молекулы с одинаковым КМД необязательно обладают одинаковыми функциональными группами. Например, стеркуловая кислота $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_2$ отличается от её метилового сложного эфира $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_2$ на CH_2 группу, но они не являются гомологами, как например мальвовая кислота с той же формулой $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_2$. Таким образом, получаемых данных недостаточно для описания структур молекул, входящих в состав ГВ.

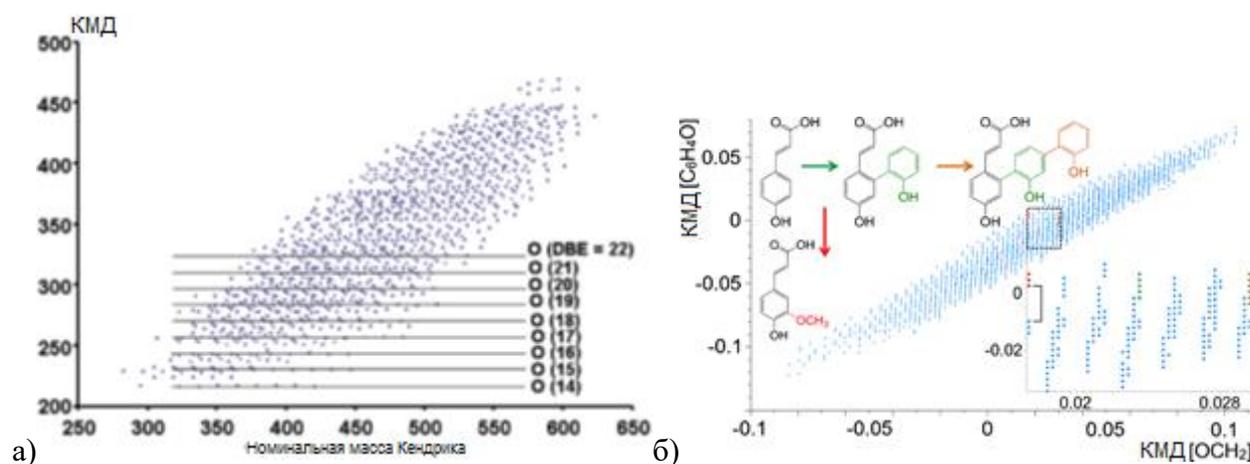


Рис. 1.11. Примеры диаграммы Кендрика с основанием а) CH_2 и б) двумерная диаграмма [71, 72].

Методом визуализации данных МС ИЦР ПФ для сложных органических матриц, получившим самое широкое распространение, является двумерная диаграмма, по оси абсцисс которой откладывается атомное соотношение элементов O/C , по оси ординат – H/C для каждой молекулы. Тем самым элементный состав всех компонентов проецируется на диаграмму в виде точки с координатами $(x,y) = (\text{O}/\text{C}, \text{H}/\text{C})$. Впервые данная диаграмма была предложена Д. ван Кревеленом для интерпретации данных по элементному составу углей разного генезиса [74]. В 2003 году Ким с соавторами [2] предложили использовать диаграмму Ван Кревелена для

визуализации данных МС ИЦР ПФ, - и с тех пор она является общепринятым способом графического представления данных. Особенность данного подхода заключается в том, что атомные соотношения О/С и Н/С рассчитываются не из результатов элементного анализа для одного образца, а по элементному составу всех молекул в одном образце, которые формируют химическое пространство, занимаемое соединениями, входящими в состав одного препарата гуминовых веществ (Рис. 1.12) Особенностью диаграмм Ван Кревелена является то, что линии трендов, на которых лежат точки, указывают на процессы трансформации, происходящие в системе во время ее генезиса: дегидратация, дезалкилирование, декарбоксилирование, восстановление и окисление [2]. Так, на Рис. 1.12. прямая А соответствует метилированию или деметилированию; прямая В – гидрированию или дегидрированию; прямая С – гидратированию или конденсации; D – окислению или восстановлению.

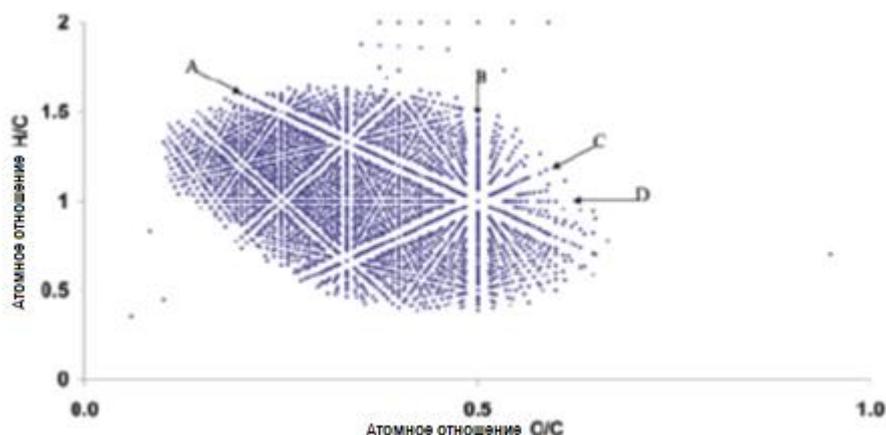


Рис. 1.12. Диаграмма ван Кревелена, построенная по данным МС ИЦР ПФ [2]

Взаимосвязи молекулярных компонентов ГВ посредством перечисленных химических реакций не являются однозначными в силу отсутствия информации о структуре индивидуальных соединений и отсутствии контроля за предполагаемыми процессами трансформации в ходе гумификации. Однако визуализация данных МС ИЦР ПФ с помощью диаграммы Ван Кревелена является весьма эффективным инструментом для мониторинга селективных химических превращений, которым можно искусственно подвергнуть уже сформировавшиеся ГВ, по аналогии с подходом Ван Кревелена, использованного для исследования направленной трансформации углей [74]. Авторы [75] обрабатывали лигнино-подобные ГВ реактивом Фентона. В результате анализа МС ИЦР ПФ продуктов реакции с последующей визуализацией на диаграмме Ван Кревелена были обнаружены молекулы, отсутствующие в исходном образце – конденсированные ароматические и окисленные циклические соединения, что также было подтверждено спектроскопией ПМР. Новые молекулы ложились на прямые, соответствующие

процессам гидроксирования, дегидратации, декарбоксилирования, дезалкилирования и их комбинаций. Основываясь на анализе образующихся гомологических серий, авторы предложили механизм и возможные структуры образующихся алифатических и ароматических молекул, последние из которых в случае почвы ранее относили исключительно к продуктам горения органического вещества (Рис. 1.13).

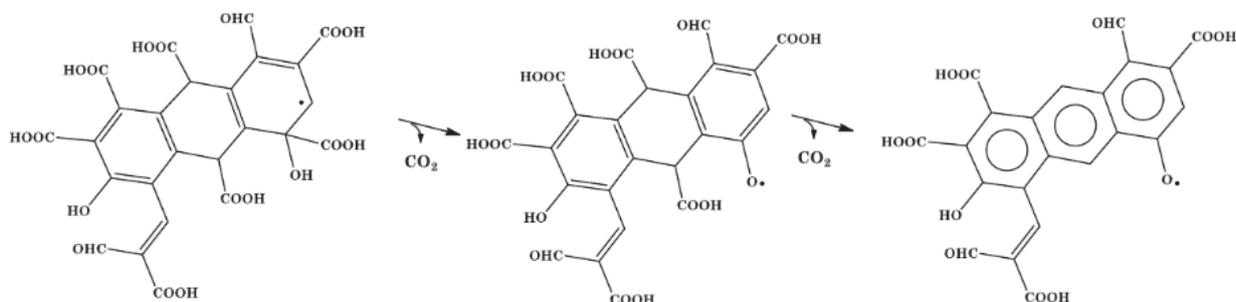


Рис. 1.13. Предположительный механизм формирования конденсированных ароматических молекул из лигниноподобных ГВ [75].

После ряда работ, посвященных концепции супрамолекулярной организации гуминовых веществ [20], произошел скачок в интерпретации данных МС ИЦР ПФ. В 2006 году в работе Куявински [3] было предложено рассматривать молекулярное пространство ГВ, нанесенное на диаграмму Ван Кревелена, как совокупность точек, соответствующих возможным предшественникам гуминовых веществ: лигнина, танинов, липидов, пептидов, углеводов, аминокислот, полиаминов и др. С тех пор разбиение диаграммы Ван Кревелена на различные классы [76], как это показано на Рис. 1.14, и сравнение образцов ГВ с точки зрения относительного вклада основных прекурсоров ГВ в химическое пространство, стали неотъемлемой частью исследований, посвященных МС ИЦР ПФ гуминовых веществ [4]. Разбиение поля диаграммы по классам химических соединений дает возможность рассуждать о структурах молекул, составляющих ансамбль ГВ. Однако очевидно, что даже низкомолекулярные ионы могут соответствовать множеству изомеров. Только для молекул с предельным, с химической точки зрения, соотношением атомов количество возможных структурных фрагментов уменьшается [77, 78]. Например, низкие значения Н/С указывают на наличие ароматических систем, двойных связей. Поэтому для анализа данных масс-спектрометрии применяется расчет эквивалентов двойных связей DBE, который представляет собой сумму всех непредельных связей и колец в молекуле без учета двухвалентных элементов – O, S:

$$DBE = 1 + \frac{1}{2} (2C - H + N + P) \quad (4)$$

Уменьшение количества водорода приводит к увеличению количества DBE. Так как большие молекулы содержат большее количество углерода и других атомов, для адекватного

сравнения всех молекул проводят нормирование на количество углерода, получая показатель DBE/C, который также возрастает с уменьшением H/C, но изменяется в пределах от 0 до 2 [79].

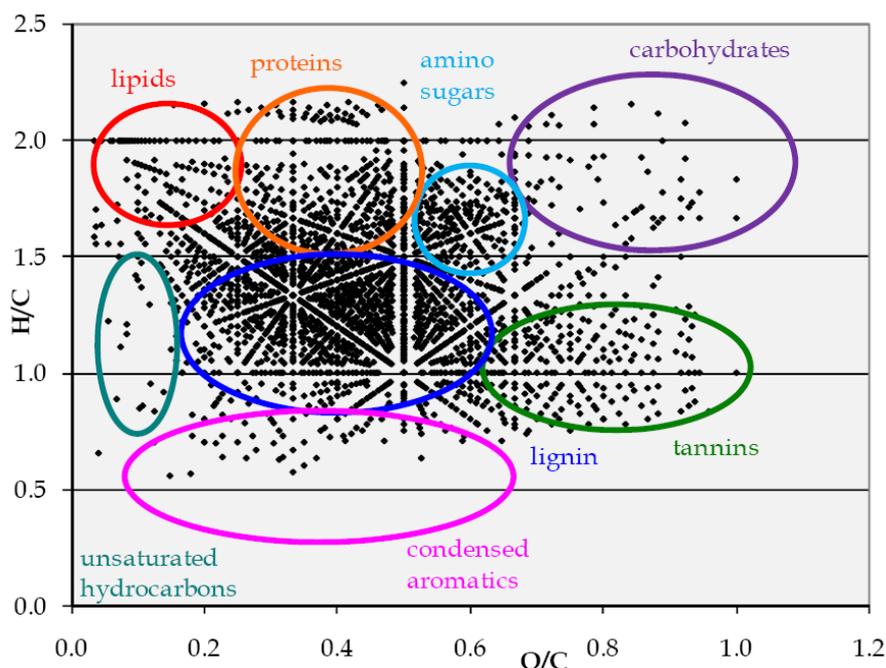


Рис. 1.14. Модельная диаграмма Ван Кревелена для природных ГВ с указанием положения структурных предшественников [76].

Связь между двумя показателями отлично характеризует углеводороды, однако DBE не учитывает наличие карбонильных групп, что искажает представление о структуре молекул. Добавление гетероатомов с нечетной валентностью, которые могут образовывать кратные связи с углеродом, так же приводит к неправильной интерпретации результатов. Так, азот в молекуле может образовывать связь N=C. Если добавить эту группу к молекуле C_3H_6 ($H/C=2$, $DBE/C = 1/3$), то для получения нейтральной молекулы необходимо добавить протон C_3H_7N ($H/C=2.33$, $DBE/C=1/3$) – увеличение H/C не привело к уменьшению эквивалента двойных связей. Для того, чтобы повысить надежность определения C=C связей, авторы [80] предложили использовать индекс ароматичности (AI), который учитывает возможные π - π связи углерода с гетероатомами. Для подсчета индекса ароматичности из количества атомов C в уравнении (4) вычитаются все гетероатомы и кислород, из атомов H вычитаются количества трехвалентных N и P, так как фосфиновый и иминовый заместители добавляют атом водорода к молекуле. Таким же образом подсчитывается углерод, не связанный с гетероатомами. Таким образом получаем индекс ароматичности, выражаемый уравнением (5)

$$AI = \frac{DBE_{ar}}{C_{ar}} = \frac{1 + \frac{1}{2}(2(C-O-S-N-P) - (H-N-P)) + N + P}{C-O-S-N-P} = \frac{1 + C - O - S - 0.5H}{C - O - S - N - P} \quad (5)$$

Индекс ароматичности меняется в диапазоне от 0 до 1. Если количество гетероатомов превышает количество π -связей в молекуле, то вычисленный AI может стать отрицательным. Например,

вещество с формулой $C_{23}H_{36}O_{12}$ должно иметь $AI = -0,54$ из-за большого количества атомов кислорода. Однако так как AI характеризует плотность двойных $C=C$ связей, то значение AI принимается за 0 [80]. В получающейся величине не учитываются кратные связи с гетероатомами или кислородом, реальная ароматичность может быть выше подсчитанной, поэтому AI стоит рассматривать как несколько заниженную величину. Основываясь на этом, авторы предложили рассматривать $AI = 0.67$ как пороговое значение для наличия конденсированных ароматических структур в молекулах, определенных МС ИЦР ПФ. Так же, учитывая, что аллены и тройные связи в ГВ не встречаются, значения $AI > 0.5$ подразумевают наличие ароматического звена [80]. Нанесение на диаграмму Ван Кревелена прямых, ограничивающие пороговые значения AI (Рис. 1.15), позволяет с высокой надежностью определять молекулы, содержащие конденсированные и ароматические структурные фрагменты.

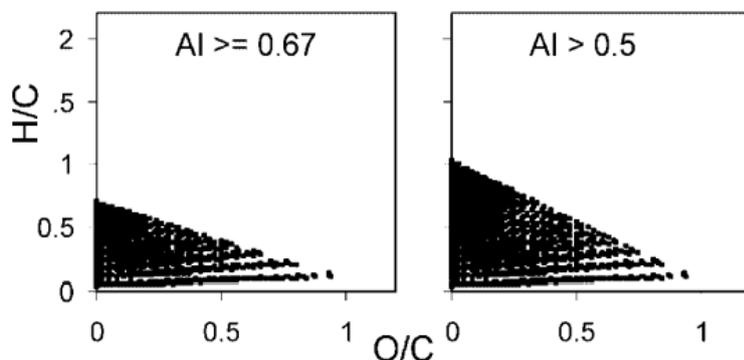


Рис. 1.15. Прямые индекса ароматичности AI , ограничивающие области ароматических структур на диаграмме Ван Кревелена [80].

Изложенные подходы к представлению информации о сложных смесях природных органических соединений, полученной с помощью метода МС ИЦР ПФ, позволяют визуально описать химическое пространство веществ, входящих в ее состав. Однако выводы о структурных фрагментах индивидуальных компонентов ГВ могут быть сделаны только для предельных случаев молекулярного состава, например, для очень низких значений H/C [80]. Таким образом разные варианты визуализации данных не позволяют преодолеть главный недостаток МС ИЦР ПФ – неразличимость структурных изомеров, что делает невозможным построение прогностических моделей структура-свойство.

Эту проблему можно решить двумя способами. Во-первых, МС ИЦР ПФ позволяет искусственно выделить одиночный пик, соответствующий определенной номинальной массе, и провести его столкновительную фрагментацию [5, 81, 82]. Так, в работе [5] впервые был проведен МС/МС анализ некоторых молекулярных пиков водных фульвокислот (ФК) непосредственно в ячейке ИЦР. Результаты эксперимента показали, что, в основном, фрагментация происходила за счет отрыва CO_2 и воды, что указывает на меньшее структурное разнообразие ФК, чем считалось.

Нахождение полной структуры пока остается невозможным, так как отсутствуют библиотеки фрагментаций различных веществ. Дополнительная сложность состоит в большом количестве различных молекулярных ионов на каждой целочисленной массе, что резко усложняет процедуру фильтрации ионов для выделения одного пика. Поэтому в последующих работах был предложен метод многократного хроматографического изобарного (ВЭЖХ) и изомерного (металл-афинная хроматография) разделения, позволяющего выделять и фрагментировать ионы при низком разрешении и определять их точные молекулярные составы после трансфера ионов в ячейку ИЦР [83, 84]. Для проведения МС/МС экспериментов авторы использовали масс-спектрометр ИЦР ПФ, оснащенный линейной ионной ловушкой для фильтрации и выделения ионов. Авторы показали, что изобарное разделение в большой степени упрощает спектры ГВ, в то время как изомерное разделение – не столь существенно. Авторам [83] удалось показать структурные различия фракций ГВ: фрагментация обнаружила сильно окисленные и алифатические молекулы. Несмотря на существенное упрощение спектров, процедура сравнения образцов является очень трудоемкой и длительной в силу необходимости не только выделить ион, но и анализировать путь его фрагментации.

Вторым способом извлечения структурной информации из спектров МС ИЦР ПФ является проведение селективных реакций с масс-спектрометрическим контролем за изменением каждой молекулы в составе ГВ. На основе результатов таких экспериментов можно было бы судить о наличии и количестве определенных структурных фрагментов. Примером такого подхода может служить работа Диттмара [85] по определению типа серы, входящей в состав органических молекул растворенного органического вещества (РОВ). Действительно, изучение серосодержащих молекул в силу низкого содержания этого элемента затруднено. В то же время СНОС молекулы могут участвовать в разнообразных химических процессах в водной среде: тиолы ответственны за связывание с тяжелыми металлами [86], сульфиды ответственны за образование сульфатных аэрозолей в стратосфере, другие летучие соединения серы участвуют в биологических и климатических циклах в окружающей среде и океане [87]. Авторы проводили селективные реакции для определения состояния серы, как это показано на Рис. 1.16.

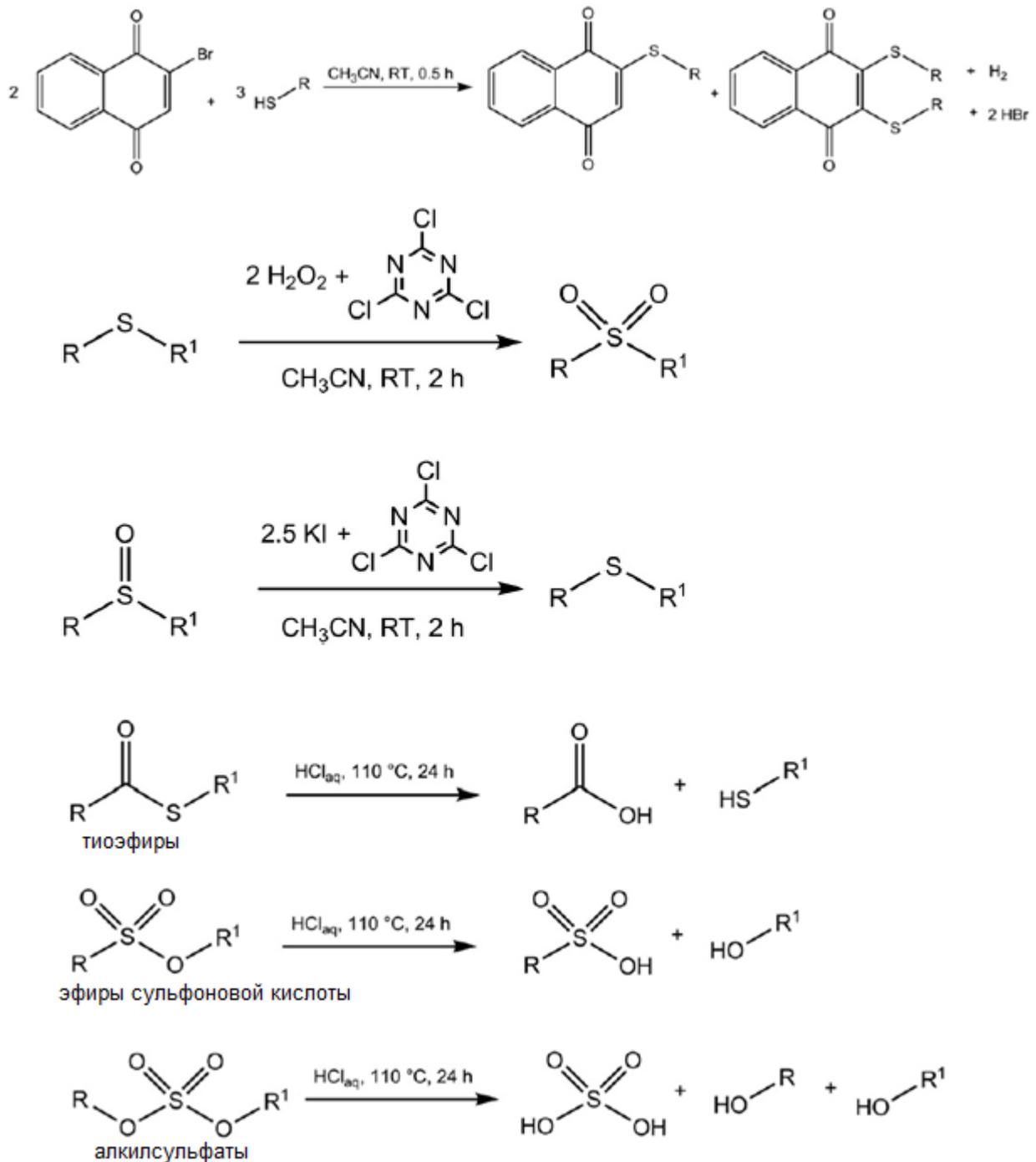


Рис. 1.16. Примеры качественных реакций, примененные Диттмаром для определения разного типа серы в составе индивидуальных CHOS-композиций морского POW [85].

Для определения тиольных групп проводили дериватизацию 2-бром-1,4-нафтахиноном, реакция с которым приводит к образованию тиоэфиров за счет замещения брома [88]. Для определения уже существующих тиоэфиров проводили окисление или восстановление - для сульфоксидов [89]. Для определения сложных тиоэфиров и сульфатов применялся гидролиз в кислой среде. Согласно экспериментам на модельных соединениях, эффективность всех реакций превышала 90%. Однако качественные реакции на восстановленные формы серы в компонентах

ГВ не приводили к изменениям масс-спектров ИЦР ПФ (Рис. 1.17). Отсутствие изменений в положении и интенсивности пиков на масс-спектрах указывало на наличие только сульфоновых кислот и, возможно, тиофенов в составе РОВ.

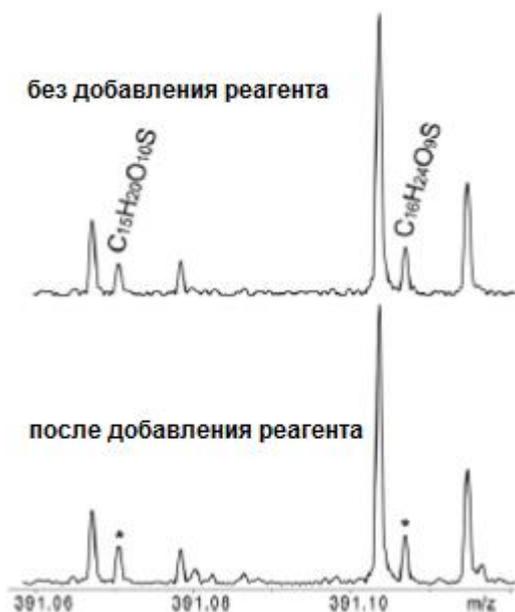


Рис. 1.17. Масс-спектры ИЦР ПФ РОВ до и после проведения реакций дериватизации [85] для определения CHOS-композиций с восстановленными формами серы.

Таким образом, была продемонстрирована возможность использования МС ИЦР ПФ для селективной идентификации функциональных групп в многокомпонентной смеси. Применяя разнообразные селективные реакции можно пошагово извлекать структурную информацию об отдельных фрагментах молекул в составе ГВ. Для адекватного выбора серий таких реакций необходимо иметь представление о структурно-функциональном составе ГВ, информацию о котором можно получить, применяя спектроскопию ЯМР.

1.3. Определение структурно-группового состава гуминовых веществ методом спектроскопии ЯМР

Спектроскопия ЯМР является вторым по разрешающей способности методом после масс-спектрометрии и самым мощным методом структурного анализа органических соединений. Интерпретация спектров ЯМР основана на анализе индивидуальных химических сдвигов различных атомов. Однако экстремальная гетерогенность ГВ приводит к невозможности получить ПМР или ^{13}C ЯМР спектры с единичными пиками из-за перекрывания близких по химическому сдвигу сигналов [90, 91]. Поэтому общепринятым считается подход, основанный на разделении спектров на диапазоны, соответствующие сходному химическому окружению атомов углерода или водорода.

Спектроскопия ЯМР на ядрах ^{13}C позволяет получить информацию о всех типах углерода, присутствующих в образце ГВ. Типичные отнесения для ^{13}C ЯМР спектров представлены в Таблице 1.1.

Таблица 1.1. Определяемые диапазоны химических сдвигов ГВ в спектроскопии ЯМР на ядрах ^{13}C [90].

Типы атомов углерода	Обозначение	Диапазон сигналов, м.д.
С и Н замещенные алифатические атомы углерода	C_{Alk}	0 – 50
О-замещенные алифатические атомы углерода	$\text{C}_{\text{Alk-O}}$	50 – 110
Ароматические атомы углерода	C_{Ar}	110 – 165
Атомы углерода карбоксильных групп и их производных	C_{COOH}	165 – 180
Атомы углерода карбонильных групп	$\text{C}_{\text{C=O}}$	180-220

Для анализа ГВ используют твердотельный и жидкофазный ЯМР [92]. В качестве растворителя выбирают NaOD или D_2O . Подбор оптимальных условий регистрации ^{13}C ЯМР спектров с большим временем релаксационной задержки, в том числе в нашей научной группе, позволил проводить количественный анализ структурно-группового состава ГВ [93, 94] с получением более корректных данных. Например, было показано, что увеличение релаксационной задержки до 4с ведет к более высоким интегральным интенсивностям, соответствующим четвертичным ароматическим атомам углерода (фенолы и простые эфиры), а также углероду карбонильной группы [94].

Результаты спектроскопии ПМР зависят от выбора растворителя. Как правило, при использовании спектроскопии ПМР для анализа ГВ определяют содержание скелетных протонов: ароматических и алифатических [95, 96]. Это важный параметр, который может быть рассчитан из спектров ГВ в D_2O или NaOD/ D_2O . Однако при использовании воды в качестве растворителя невозможно получить количественную информацию о протонах в функциональных группах в силу химического обмена между группами и растворителем даже во временном масштабе ЯМР [90]. Более того, подобный обмен ведет к размыванию сигналов с преобладанием одного резонансного пика HDO (4.6 м.д.) [97], что ухудшает аналитические характеристики подобного анализа. Поэтому остаточная вода и лабильные водороды должны быть обменены на дейтерий многократным повторением циклов растворения ГВ в D_2O с последующим упариванием растворителя [97–99]. Такой подход должен обеспечивать количественное определение скелетных протонов ГВ.

Наиболее информативными являются спектры ПМР при использовании безводного дейтерированного ДМСО в качестве растворителя, что приводит к замедлению процессов обмена в шкале времени ЯМР и позволяет зарегистрировать сигналы различных протонов, связанных с гетероатомами [100]. Типичные отнесения для спектров ПМР гуминовых веществ в ДМСО- d_6 представлены в Таблице 1.2.

Таблица 1.2. Определяемые диапазоны химических сдвигов ГВ в спектроскопии ПМР (растворитель ДМСО- d_6) [100].

Типы протонов	Обозначение	Диапазон сигналов, м.д.
Алифатические	CH_n	0.5 - 1.9
CH_3 , CH_2 и CH -группы в α -положении к ароматическому кольцу или COOH группе	$\alpha\text{-CH}_n$	1.9-2.8
Карбогидратов	$\text{CH}_n\text{-O}$	2.8-5.5
Протоны ароматических колец и фенольных групп	$\text{Ar-H}+\text{ArOH}$	6.0-10.5
Протоны карбоксильных групп	COOH	10.5-13.5

Однако гигроскопичность ГВ приводит к значительному уширению сигналов. Для подавления этого процесса ранее нашей группой был разработан подход, позволяющий получить максимально сухой продукт для дальнейшего анализа: твердый препарат помещают в ЯМР-ампулу и сушат под высоким вакуумом при 50 °С в течение 6 часов, затем без доступа воздуха добавляют безводный ДМСО- d_6 , после чего ампулу запаивают [100]. Такой подход позволяет избежать нежелательных реакций и получить количественное описание отдельных протонов гидроксильных, карбоксильных и других групп.

Особенно важным является определение карбоксильных групп, которые определяют кислотные свойства ГВ и, следовательно, отвечают за взаимодействие с минеральной поверхностью, биомембранами и за комплексообразование с тяжелыми металлами [101, 102]. Основными методами определения кислотности ГВ являются прямое и обратное титрование [103], потенциометрическое титрование [104]. Определяемые величины pK_a гуминовых веществ широко используются для предсказания их свойств [105]. Однако эти методы не позволяют определить структуры фрагментов, которые несут карбоксильные группы. Для получения соответствующей структурной информации необходимо применение двумерной спектроскопии ЯМР, в частности НМВС, позволяющей определить корреляцию между атомами углерода и протона, разделенными двумя и тремя связями [90]. Этот метод обладает меньшей чувствительностью в сравнении с гомоядерной 2D спектроскопией (TOCSY, COSY и др.) или гетероядерной последовательности HSQC связанных ^{13}C - ^1H ядер, однако он позволяет определить, какому структурному типу принадлежит, например, карбоксильная группа [106].

Так, в работе [107] было показано наличие в спектрах ГВ кросс-пиков, соответствующих алициклическим и линейным фрагментам, содержащим карбоксильные группы (Рис. 1.18), прекурсорами которых могли быть циклические и линейные терпеноиды.

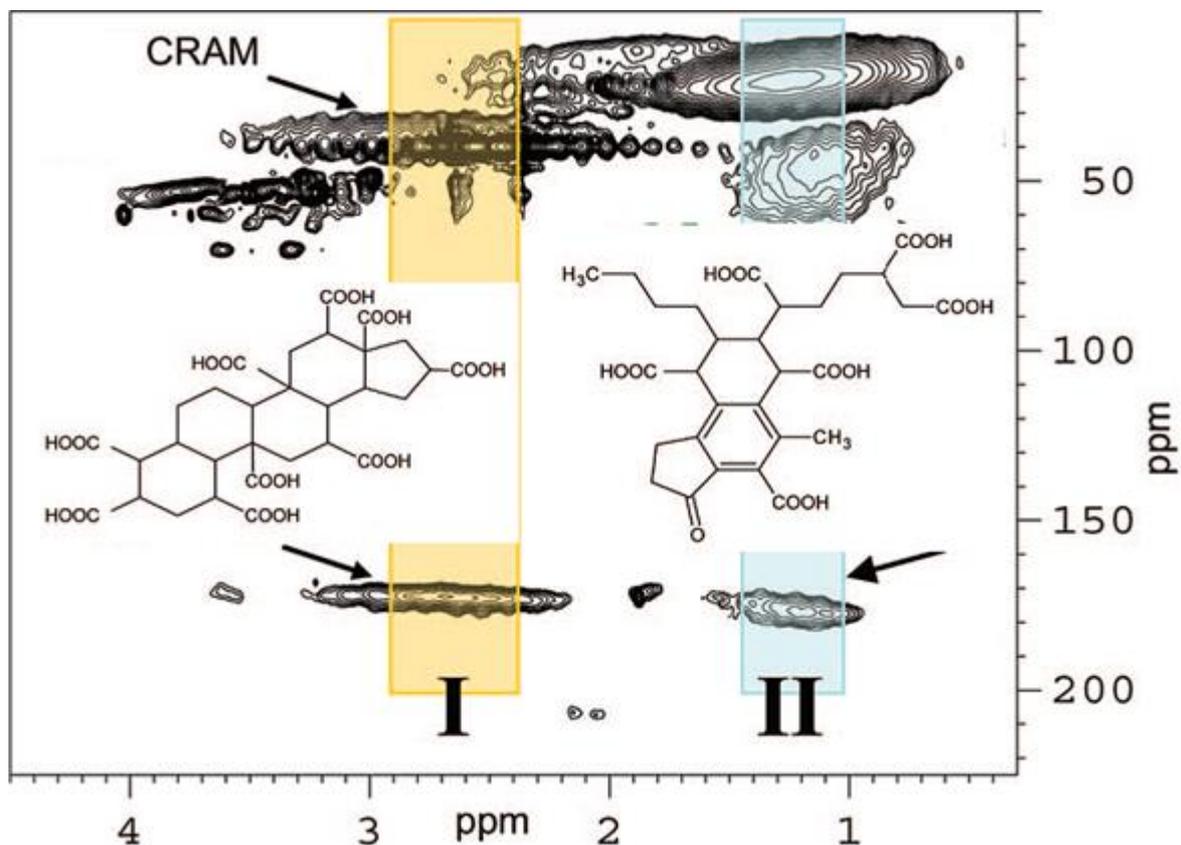


Рис. 1.18. ^{13}C - ^1H НМВС спектр РОВ с отмеченными кросс-пиками и гипотетическими структурами молекул, несущих карбоксильные группы [107].

Расширение возможностей спектроскопии ЯМР осуществляется за счет применения химической модификации ГВ, например, получившим широкое применение, метилирование реагентами, обогащенными изотопом ^{13}C [108]. Комбинация метилирования и многомерной спектроскопии ЯМР позволяет получить информацию о типах связей для очень узкого набора молекул. В работе Бель и Юрина [109], посвященной этой теме, были показаны преимущества одновременного использования 3D-спектроскопии ЯМР и ^{13}C метилирования карбоксильных и фенольных групп, что позволило авторам ввести понятие о четвертом измерении данного метода - о псевдо 4D спектроскопии ЯМР [109]. Авторы разработали подход, который позволяет показать характер замещения в ароматических кольцах фенолов и с высокой степенью достоверности предположить конкретные заместители и таким образом получить структуры некоторых молекул, а так же множество фрагментов [110]. Уникальная последовательность импульсов $^{13}\text{CH}_3\text{O}$ -фильтрации позволила проследить корреляцию четырех ядер: СН атомов в орто-положении к метоксильной группе и $^{13}\text{CH}_3\text{O}$. Поляризационная цепочка таких структур начинается с ароматического протона F1 и заканчивается водородом метокси-группы – F4,

определяя спин-спиновые взаимодействия $^1J_{\text{CHar}}$, $^3J_{\text{CC}}$ и $^1J_{\text{CH}_3}$. Участок 4D НССН₃ спектра ^{13}C -меченных ФК торфа (Рис. 1.19) с химическим сдвигом 55.36 м.д., соответствующим сигналам ^{13}C метоксигрупп, иллюстрирует, как изотопная фильтрация с дисперсией сигналов в четырехмерном пространстве позволяет провести исчерпывающий структурный анализ.

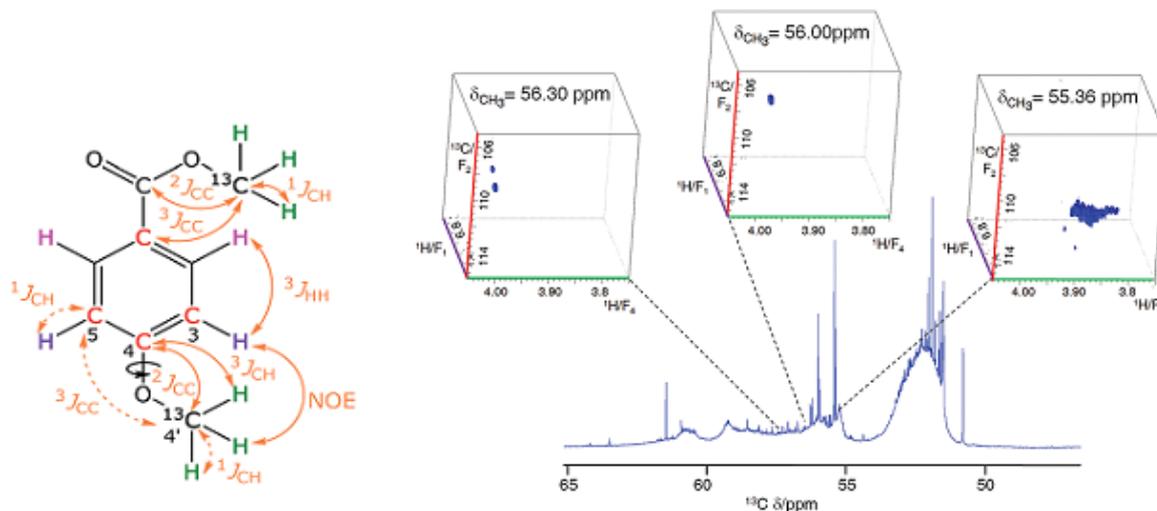


Рис. 1.19. Гипотетическая меченая структура фенольной компоненты ГВ, определенная с помощью 4D спектроскопии ЯМР, предложенной в работе [110].

Каждому сигналу меченных ядрами ^{13}C метокси-групп авторы соотносили 3 корреляционные проекции – F1F4 (Har-H₃), F1F2 (HarCar) и F2F4 (C_{ar}-H₃), последнюю из которых получали при первичной регистрации ^1H , ^{13}C HSQC спектра образца ФК [110]. В результате дополнения этих данных результатами 3D спектроскопии ЯМР, позволяющей выборочно фильтровать сигналы ароматических углеродов или водородов, было получено множество химических сдвигов и констант спин-спинового взаимодействия. Использование базы данных кросс-пиков AIST [111] позволило авторам присвоить сигналы девяти соединениям: 1,4, 1,2,4 и 1,3,5 замещенным фенолам. Некоторые из этих соединений были ранее идентифицированы методом термолитической ГХ-МС для ГВ, дериватизированных гидроксидом тетраметиламмония (ТМА) [112]. Данный подход, предложенный в группе д-ра Юрина, позволили впервые с помощью спектроскопии ЯМР определить структурный мотив единичных компонентов ГВ.

Таким образом, использование самого мощного метода структурного анализа – спектроскопии ЯМР – в комбинации с введением изотопных меток открыло возможности для описания структурно-группового состава ГВ. Основываясь на этих данных, нельзя описать структуру отдельных молекул, но можно определить набор селективных реакций, которые позволят решить эту задачу с помощью МС ИЦР ПФ. Однако слишком большое количество молекулярных серий привело бы в общем случае к наложению пиков продуктов на пики

присутствующих в исходных ГВ веществ. Поэтому более перспективным представляется пошаговое извлечение структурной информации об индивидуальных молекулах в составе ГВ с использованием обогащенных тяжелыми изотопами реагентов для введения меток в молекулярный ансамбль ГВ, что позволит отличить материнские и дочерние пики в масс-спектрах ИЦР ПФ. В связи с этим в следующей главе более подробно рассмотрены методы введения изотопных меток и их применение для изучения гуминовых веществ.

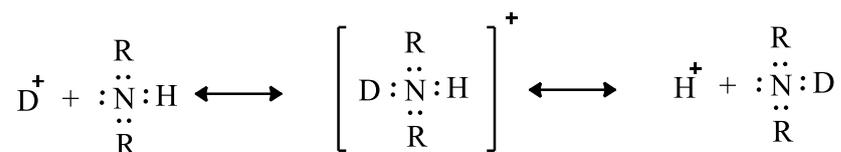
1.4. Методы введения изотопных меток в состав органических молекул и масс-спектрометрия изотопного обмена.

1.4.1. Методы введения изотопных меток

После открытия изотопии [113] введение меток стало важным методом изучения строения органических веществ. Целый ряд работ посвящен изотопным обменам в составе низкомолекулярных соединений [114–116], а так же в пептидах и белках [117–120]. Большое внимание было уделено исследованию механизмов изотопного обмена и развитию методов обогащения изотопами с помощью классических химических подходов [121]. В литературе хорошо освещены механизмы водородного, кислородного, азотного и других обменов [122, 123]. На настоящий момент наиболее изученным представляется H/D обмен. В 1954 Линдструм-Лэнг открыли новую эру в использовании водородного обмена [124] на примере исследования конформации убиквитина [125]. После этого методы H/D обмена активно применялись для установления строения коротких пептидов, белков, нуклеиновых кислот и т.д. [126–129]. Причем применение методов изотопного мечения для изучения строения и свойств сложных веществ основывалось не только на селективности изотопного обмена, но и на зависимости скоростей реакции от типа атомов [130].

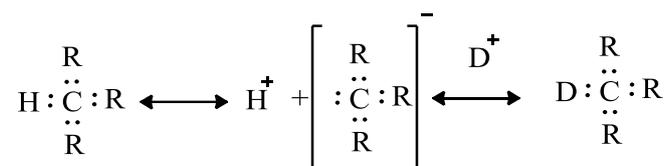
Уже в ранних работах по дейтерообмену было показано, что возможность обмена протона на дейтерий зависит от типа химической связи [122]. Так, в протонном растворителе обмен протонов, связанных с гетероатомами (кислородом, азотом, серой, галогенами),- происходит практически мгновенно. Напротив, скорость обмена протонов, связанных с углеродом, ничтожно мала. Например, протон карбоксильной группы в муравьиной кислоте подвергается мгновенному обмену в D₂O, в то время как второй протон обменивается в течение нескольких дней при кипячении. Различия в скорости обмена могут быть объяснены наличием свободных электронных пар в гетероатомах. Например, H/D обмен у атома азота может быть описан схемой 1.1:

Схема 1.1



В случае С-Н связи присоединение D^+ возможно только после элиминирования протона (схема 1.2).

Схема 1.2



Таким образом, реакции Н/Д обмена можно разделить на быстрые (с участием электронной пары) и медленные (преимущественно С-Н связи). Первый тип реакций реализуется мгновенно. В свою очередь, механизм и скорость обмена скелетных С-Н протонов зависит от структуры фрагмента, в котором происходит реакция.

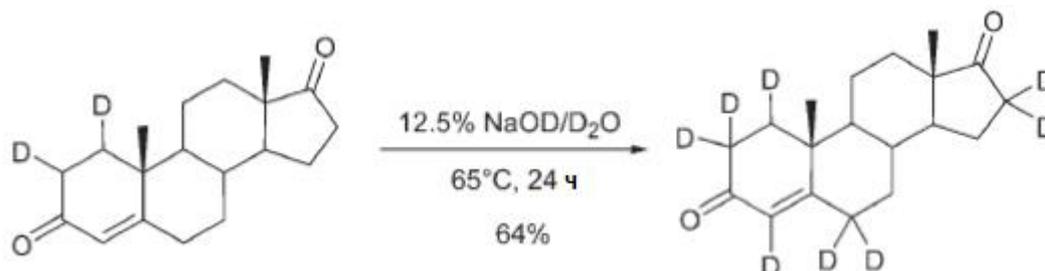
Неароматические С-Н связи. Углерод в гибридизованном состоянии не содержит свободной электронной пары. Поэтому первой стадией обмена является ионизация, которую можно описать следующими уравнениями:



С-Н связи характеризуются высокими значениями pK_a , поэтому в мягких условиях прямой обмен с тяжелой водой не реализуется даже при нагревании в течение нескольких дней. Сильные кислоты и, в особенности, основания катализируют реакцию отрыва протона [131]. Поэтому электроакцепторные группы ускоряют обмен за счет $\sigma \rightarrow \pi$ взаимодействия, повышающего С-Н кислотность α -СН протонов. Так, бензильные и аллильные α -СН-группы подвергаются селективному обмену только в присутствии сильных оснований [132]. В то же время в соединениях, содержащих карбонильную группу: кетоны, альдегиды, кислоты, сложные эфиры [133, 134], обмен α -СН протонов в условиях катализа основаниями проходит количественно [135]. В этих случаях обмен ускоряется за счет кето-енольной таутомерии. Селективность Н/Д обмена в условиях основного катализа может быть продемонстрирована на примере стероида андростендиона, содержащего карбонильные группы и двойную связь (схема 1.3). Нагревание щелочного раствора данного соединения в течение суток при $65^\circ C$ приводит к селективному

обмену протонов в α -положениях к карбонильной группе и двойной связи [136]. В то же время кислотный катализ не приводил к изотопному обмену.

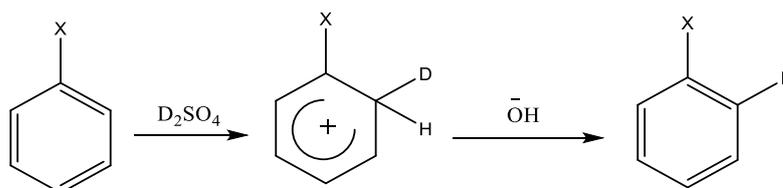
Схема 1.3



Таким образом, скорость и выход реакции обмена определяются сочетанием свойств растворителя, основания и субстрата. В качестве основания обычно используют растворы дейтериевых оксидов щелочных металлов в тяжелой воде, намного реже - алкоголяты в метаноле [130]. Третичные амины обладают слабой каталитической активностью. Тем не менее, в некоторых случаях удается получить значительные выходы $>80\%$, используя раствор триэтиламина в тяжелой воде в качестве основного катализатора [137].

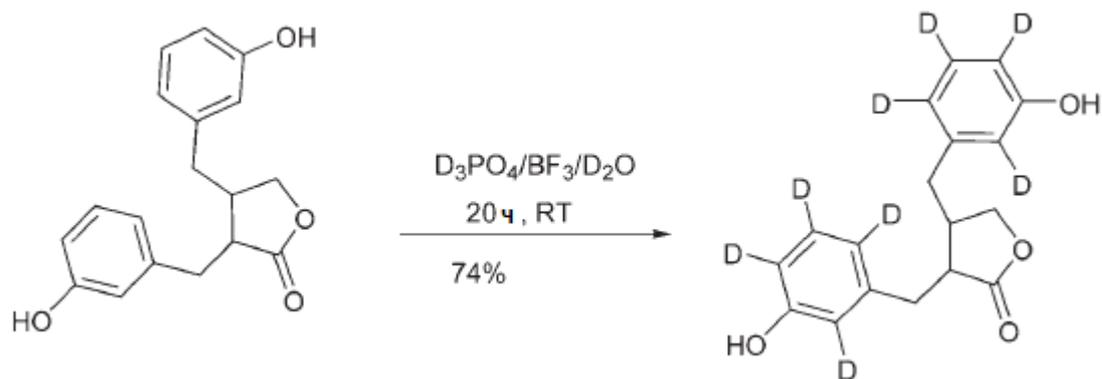
Ароматические С-Н связи. Основным механизмом, по которому реализуется Н/Д обмен в ароматических структурах, является классическое электрофильное замещение [130]. Скорость обмена зависит от мезомерного эффекта заместителей в ароматическом кольце, как показано на схеме 1.4.

Схема 1.4



Так, фенолы при растворении в тяжелой воде подвергаются быстрому обмену уже при комнатной температуре в орто- и пара- положения [138]. В общем случае для получения дейтерированного производного необходимо использование дейтерированной кислоты или кислот Льюиса в сочетании с источником дейтерия. Сравнение выходов и скоростей реакций Н/Д обмена для полифенолов, флавоноидов и лигнинов с помощью DCl , D_3PO_4 , BF_3 в D_2O показало отсутствие значимых различий в случае электрон-обогащенных положений ароматического кольца даже в отсутствие нагревания [139–142]. Однако при суточном нагреве свыше 100°C неактивированные положения также подвергаются Н/Д обмену с выходом более 70% [140] (схема 1.5).

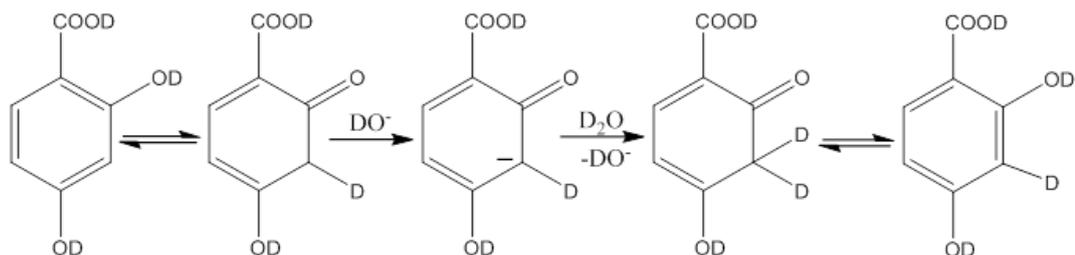
Схема 1.5



Во всех случаях алифатические заместители в ароматическом кольце оставались нетронутыми при кислотном катализе [143]. При наличии акцепторных заместителей наиболее обедненные положения кольца подвергаются обмену только в жестких условиях и с низким выходом [144]. Н/D обмен в кислой среде может быть значительно ускорен в условиях микроволнового облучения [145, 146], которое позволяет проводить реакции в течение минут, а не суток без потери селективности.

Особым случаем является изотопный обмен фенолов в водной среде. Это связано с тем, что в растворах фенолы участвуют в кето-енольной таутомерии [147]. Кето-форма может подвергаться Н/D обмену через образование карбаниона в орто- и пара-положения по аналогии с алифатическими карбонильными соединениями. Тем самым основания могут катализировать обмен ароматических С-Н протонов фенолов [147] по схеме 1.6.

Схема 1.6



Таким образом, можно заключить, что описанные в литературе подходы к Н/D обмену характеризуются высокими выходами и селективностью и являются перспективными для применения в изучении ГВ.

1.4.2. Введение изотопных меток в состав гуминовых веществ.

Использование различных радиоактивных изотопов позволяет определять гуминовые вещества даже при очень низких концентрациях [148–151], что позволяет использовать эти изотопы в биологических исследованиях [152]. Отдельно стоит отметить работы Г.А. Бадуна

(Химический факультет, МГУ), разработавшего подход для замены всех скелетных протонов на тритий в составе ГВ с помощью термической бомбардировки ядрами трития с сохранением более чем 90% исходной структуры и с равномерным распределением трития по молекулярному ансамблю ГВ [153]. Однако вводимых количеств радиоактивных меток недостаточно для структурного анализа. Поэтому основная часть работ посвящена использованию стабильных изотопов.

Одним из методов введения изотопных меток в состав ГВ является осуществление их взаимодействия с мечеными соединениями. Например, Юркевич и Масиэл [154] изучали взаимодействие ^{13}C меченных ацетона, трихлорэтилена и четыреххлористого углерода с гуминовыми веществами почв при их совместной инкубации. Анализ получающихся продуктов методом твердотельной спектроскопии ЯМР ^{13}C показал значительное уширение сигналов карбонильной группы ацетона, что свидетельствовало об образовании не ковалентных, а водородных связей [155]. Нанни и Хэтчер [156] регистрировали изменения во времени спин-решеточной релаксации ^{13}C меченного аценафтена после взаимодействия с почвенными ФК в водно-метанольной среде и показали три типа возможных типа нековалентного связывания: сорбция аценафтена на ФК, увеличение растворимости аценафтена под действием ФК и взаимодействие с растворителем. Авторы пришли к выводу, что гидрофобные участки ГВ способны инкапсулировать гидрофобные органические молекулы. В то же время, многие работы демонстрировали образование ковалентных эфирных и сложноэфирных связей ГВ с органическими веществами [157–159]. В частности, Хэтчер с соавторами [160], исследуя изменение химических сдвигов в ^{13}C ЯМР спектрах 2,4-дихлорфенола, меченного ядрами ^{13}C по С-2 и С-6 положениям, показал образование ковалентных углерод-углерод и углерод-кислород связей между вводимой молекулой и ГВ. Причем С-С связи образовывались исключительно с участием ароматических углеродов ГВ, а С-О представляли собой сложноэфирные связи, как это показано на Рис. 1.20.

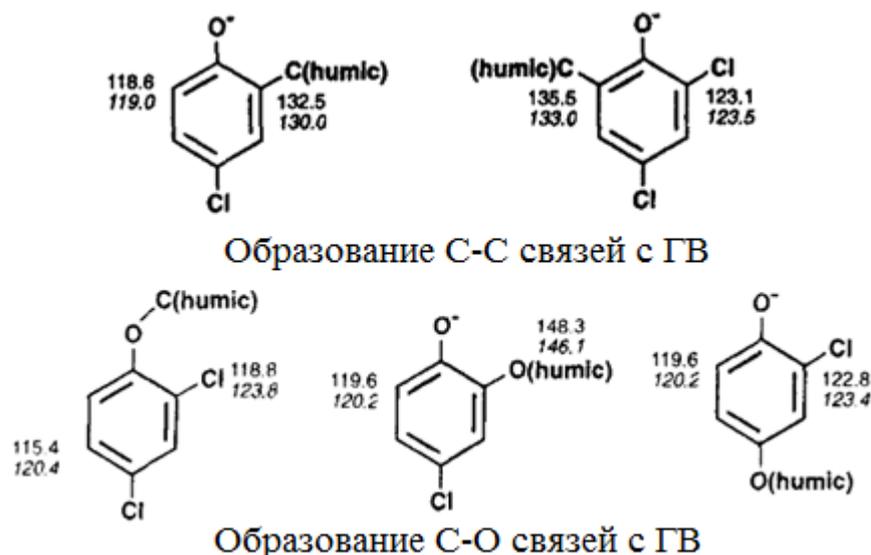


Рис. 1.20. Образование С-С и С-О связей при взаимодействии ГВ с ^{13}C меченным 2,4-дихлорфенолом, доказанное спектроскопией ЯМР ^{13}C [160].

Уникальными по сложности исполнения являются работы, посвященные введению ^{15}N меченных соединений в состав ГВ. Ковалентное связывание ГВ аминов может происходить путем нуклеофильного присоединения к карбонильным группам, может осуществляться в результате окисления фенолов, которое катализируется металлами или ферментами. Однако прямые спектроскопические доказательства образования подобных связей появились только благодаря работам Торна, в которых показано, что в результате взаимодействия водного раствора ^{15}N меченных аммиака и гидроксиламина [161] с ГВ торфа, вод и угля образуются, в основном, гетероциклические соединения азота. Это указывает на протекание взаимодействия одновременно с несколькими реакционными центрами ГВ и позволяет предположить такие механизмы реализации, как перегруппировка Бекмана или присоединение по Михаэлю. Более того, распределение азота не зависело от образца, что характерно для взаимодействия с однотипными функциональными группами. Похожие исследования были проведены по спектроскопическому подтверждению образования ковалентных и нековалентных связей между ГВ и ^{15}N меченным синтетическим пептидом, состоящим из трех меченых глицинов и немеченого аргинина GGGR [162]. Используя двумерную ^{15}N - ^1H HSQC спектроскопию ЯМР, авторы продемонстрировали образование ковалентных связей. Наблюдаемые изменения в положениях кросс-пиков пептида GGGR и гуминовых кислот торфа авторы объяснили протеканием реакции Михаэля между пептидом и хинонными структурами ГВ, и подтвердили это путем проведения подобного эксперимента с 1,4-нафтохиноном.

Исследования, посвященные введению изотопных меток в состав ГВ, неразрывно связаны с применением спектроскопии ЯМР ^{13}C . Например, использование диазометана меченного ^{13}C позволяет получить метильные сложные и простые эфиры, причем спиртовые группы ГВ при

этом не затрагиваются [163], в то же время обработка смесью $\text{CH}_3\text{I}/\text{NaN}$ позволяет получить образец, метилированный по всем гидроксильным группам. Регистрируя спектры ^{13}C ЯМР образца до и после каждого типа метилирования, можно идентифицировать различные функциональные группы с подвижными протонами [108]. Распределение гидроксильных групп в разных образцах ГВ позволяет сравнивать строение и делать выводы о процессах их природного синтеза. Другим подходом для количественного анализа функциональных групп ГВ является направленная дериватизация группой, обогащенной подходящим изотопом, в комбинации с двумерной спектроскопией ЯМР [164]. Например, триметилсилильная группа замещает все лабильные протоны в молекулах ГВ: карбоксильные и гидроксильные группы трансформируются в силилированные сложные и простые эфиры, амиды – в силиламиды.



Последующий гетероядерный анализ $^1\text{H}-^{29}\text{Si}$ и $^{13}\text{C}-^{29}\text{Si}$ позволяет полностью описать ароматические и алифатические кислоты [165]. Главное преимущество этого метода заключается в большей чувствительности HSQC корреляций по сравнению с описанным выше методом HMBC, описанном в параграфе 1.3 (Рис. 1.18).

В силу того, что регистрация ЯМР на ядрах ^2H затруднена, введение дейтериевых меток в состав ГВ обычно не применяется. Однако методы H/D обмена находят широкое применение в масс-спектрометрии высокого разрешения, и в настоящее время используются для исследования ГВ.

1.4.3. Масс-спектрометрия изотопного обмена для исследования строения гуминовых веществ.

Селективный изотопный обмен позволяет получить структурную информацию об индивидуальных молекулах, идентифицируемых с помощью МС ИЦР ПФ. Поэтому все большую популярность приобретают методы, основанные на проведении ионно-молекулярных реакций непосредственно в камере распылителя масс-спектрометра. В качестве таких реакций активно используется H/D обмен “активных” или подвижных протонов. Особое внимание этому методу стали уделять после открытия мягких методов ионизации, таких как электрораспыление [166–168] и фотоионизация [169–171]. Для гуминовых веществ впервые H/D обмен подвижных протонов в камере МС ИЦР ПФ спектрометра был проведен в 1999 году Солуки и Аломари [6]. Используемая в работе техника эксперимента позволила выделить узкий набор ионов и провести столкновения с нейтральными молекулами дейтерированных растворителей в газовой фазе с давлением не выше $1 \cdot 10^{-5}$ Тор. Схема прибора указана на Рис. 1.21.

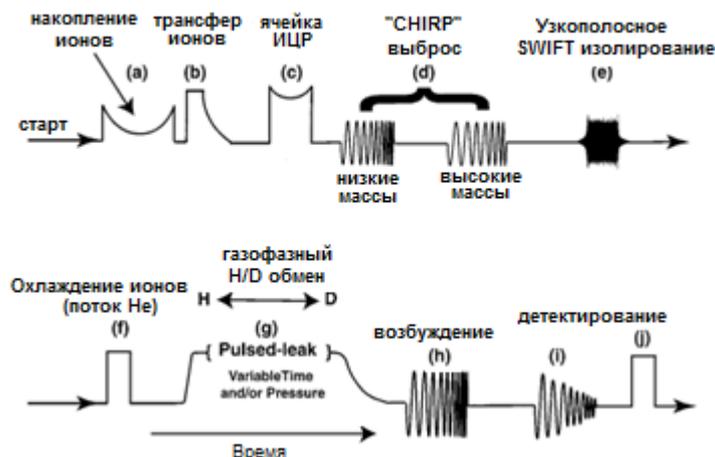


Рис. 1.21. Схема выделения индивидуального пика в составе ГВ и H/D обмен в масс-спектрометре [6].

Для предотвращения фрагментации и побочных реакций, ионы охлаждали пульсами гелия, способного уменьшить энергию ионов и, в отличие от тяжелого аргона, не вызывающего фрагментацию при столкновении. В результате авторы впервые определили количество подвижных водородов в составе отдельных компонентов ГВ, которое достигало 7-9, включая все возможные обмены в OH, COOH и NH_x группах. В работе использовали тяжелую воду, дейтерированный метанол и дейтероаммиак. Повышение основности реагента приводило к ускорению обменов в следующем ряду: D₂O < CD₃OD < ND₃. Предложенный метод открыл новые возможности для сравнения ГВ из различных источников, а так же для изучения комплексов ГВ с металлами. Так, развивая данный подход, эта же группа ученых во главе с Аломари описала взаимодействие ионов алюминия с водными ФК [172]. Ионы алюминия способны замещать при ионизации атомы водорода с образованием комплексов различного состава: [M+Al]⁺ или (M+Al(OH))⁺. Поэтому обычно по масс-спектру крайне тяжело или невозможно установить, с какой именно из множества исходных молекул произошла реакция. Применение изотопного обмена помогло авторам правильно идентифицировать как исходные пики, так и комплексы с ионами алюминия. Спектры изотопного обмена исходных образцов и комплексов с металлом указывали на уменьшение количества подвижных протонов в комплексах, а также позволяли определить их стехиометрический состав. Целью данных работ не являлось изучение структуры ГВ. Однако использование ион-молекулярных реакций для природного органического вещества открыло новое направление в изучении ГВ.

Проведение H/D обмена для подсчета подвижных протонов – это пример селективной ион-молекулярной реакции. Различные изомеры в большинстве случаев можно отличить по количеству H/D обменов. Руководствуясь этим предположением, Стенсон с коллегами [84] показали возможность применения изотопного обмена для идентификации изомеров в составе

фракций ФК. Анализируя длину серий Н/D обмена, авторы обнаружили, что соединения с одинаковыми молекулярными формулами, но идентифицированные в масс-спектрах разных фракциях, содержат разное количество подвижных протонов и, следовательно, представляют собой структурные изомеры в составе ГВ. Данная работа является первой и пока единственной, однозначно доказывающей наличие различных изомеров в составе ГВ. Такой подход очень перспективен, но требует больших затрат времени и использования накопительной октаполюсной ловушки для релаксации изолированного иона, исключая нежелательную фрагментацию [173], которая была разработана в группе проф. Маршалла (Университет Флориды, США) и не является пока коммерчески доступной.

В то же время современные приборы позволяют анализировать сложные органические смеси в широкополосном режиме. Основная сложность определения всех подвижных протонов в составе ГВ в режиме полного спектра связана с протеканием реакций обратного обмена дейтерированных соединений из-за присутствия следов воды в системе [174, 175]. Этому недостатка лишен новый метод, предложенный группой проф. Николаева (ИНЭПХФ РАН), предусматривающий обмен всех подвижных водородов непосредственно в источнике ионизации [176–178]. Дизайн эксперимента показан на Рис. 1.22.

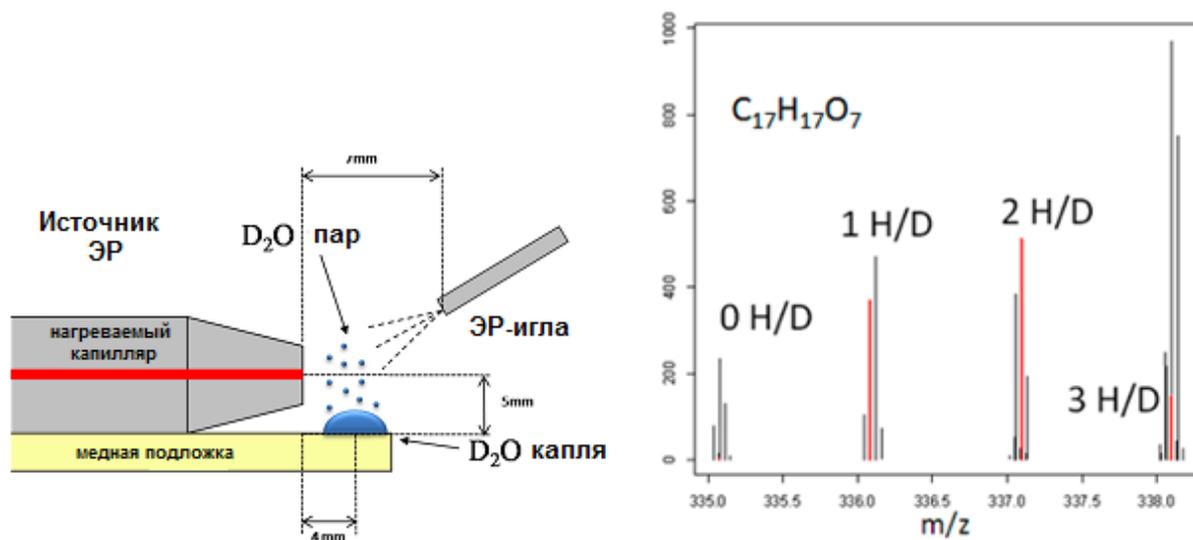


Рис. 1.22. Дизайн Н/D обмена подвижных протонов органических молекул в источнике электрораспыления [179].

Медная пластинка располагается непосредственно под нагревательным капилляром. На нее наносится дейтерированный растворитель, например, D_2O . Благодаря этому перед входом и в самом капилляре создается атмосфера с большим избытком реагента. Молекулы D_2O могут проникать в заряженную каплю с веществом, участвовать в ион-молекулярной реакции в капилляре или в вакуумной системе. Использование этого простого и удобного метода приводит

к исчерпывающему H/D обмену всех подвижных протонов во всех молекулах сложных органических смесей.

Авторами был предложен следующий принцип подсчета серий H/D обмена: участок спектра содержит несколько пиков на каждой номинальной массе; для каждой молекулы из спектра исходного образца можно найти смещенные на $1.00628 \cdot n$ пики, соответствующие n изотопным обменам, после добавления D₂O в систему (выделены красным на Рис. 1.22). Данный подход авторы применили для определения гидроксильных и карбоксильных водородов в компонентах ГВ [180]. Было показано, что он является удобным, эффективным и помогает избежать обратного обмена во время ионизации. Эта же группа авторов, в сотрудничестве с нашей научной группой, применила кислородный обмен ¹⁸O/¹⁶O в тандеме с МС ИЦР ПФ [181]. Известно, что обмену не подвергаются кислороды, участвующие в образовании спиртовых, эфирных и сложноэфирных связей [122]. Сопоставление для каждой молекулы количества обменов кислородов и водородов может повысить достоверность определения подвижных протонов.

Таким образом, селективный изотопный обмен, контролируемый МС ИЦР ПФ, является мощным методом для анализа структурных особенностей отдельных компонентов сложных смесей, позволяет идентифицировать разнообразие изомеров и сравнивать ГВ между собой. Описанные выше методы позволяют охарактеризовать некоторые функциональные группы в молекулах ГВ. Для определения структурных фрагментов необходима дополнительная информация о скелете молекул, то есть о связях С-Н. Однако работ, посвященных исследованию углеродного скелета отдельных молекул гуминовых веществ, пока нет.

1.5. Получение модельных гуминовых веществ.

Информация об основных предшественниках гуминовых веществ позволяет с высокой точностью предположить строительные блоки ароматического скелета ГВ. Учитывая внимание, которое ГВ привлекают для применения в медицине [38], получение синтетических гуминоподобных соединений является перспективным направлением, так как подобные вещества получают по известному протоколу, что позволяет контролировать их состав.

Первые модельные ГВ были получены в начале 20-го века окислительной полимеризацией фенолов [182, 183]. В 1971 году Гох и Стивенсон первыми провели структурное сравнение синтетических с природными ГВ методом ИК спектроскопии [184]. Авторы показали, что полимеры пара-бензохинона лишь немного похожи на почвенные ГВ, в то время как ИК спектры продуктов полимеризации протокатехиновой кислоты содержали основные сигналы почвенных ГВ [184]. Значительное сходство между ПМР и ¹³C ЯМР спектрами различных полифенольных соединений и торфяных ГВ были показаны Ханнинен [185] и Кательдо [186]. Как и в предыдущей

работе наибольшим сходством обладали гидроксикислоты (протокатехиновая и фенилуксусная). Авторы обнаружили наличие кислотных групп даже в полимерах, образованных фенолами без карбоксильных заместителей, что указывает на раскрытие и окисление ароматического кольца в результате реакции [186]. Это объясняет сложность ЯМР спектров синтетических гуминовых веществ (Рис. 1.23):

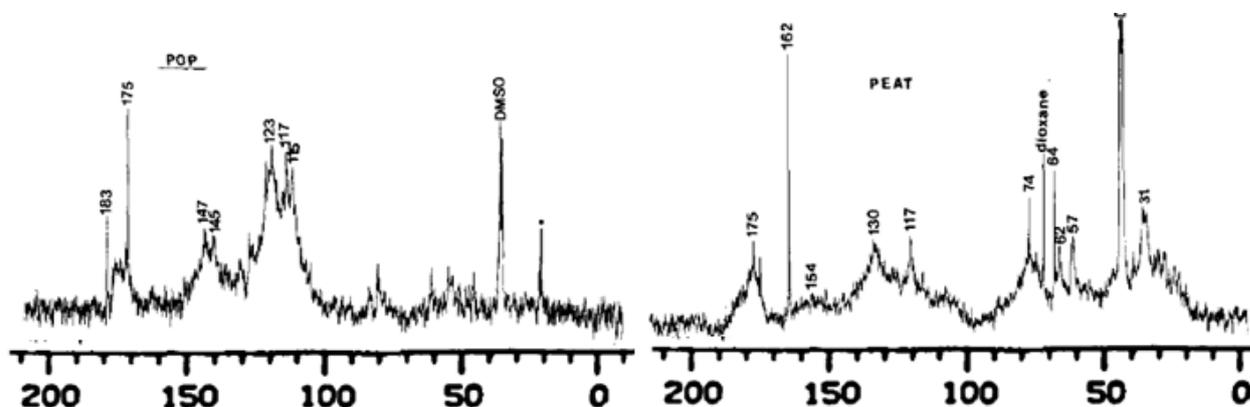


Рис. 1.23. ^{13}C ЯМР спектры торфяных ГВ и продуктов окислительной полимеризации фенилуксусной кислоты [185].

На основании полученных данных авторами был сделан вывод, что основным механизмом формирования гуминовых веществ в аэробных условиях является полимеризация и рекомбинация фенол-содержащих фрагментов со случайным распределением карбоксильных групп.

Окислительная полимеризация фенолов хорошо изучена с позиций получения синтетических ГВ [187]. Реакции чаще всего проводились с использованием различных окислителей (персульфат калия, оксид серебра(I), пероксид водорода) и различных ферментов [188]. В работе [189] было показано, что первичными продуктами окисления гидрохинона, из которых в дальнейшем образуются синтетические ГВ, являются семихинонные радикалы п-бензохинона и гидрокси-п-бензохинона. Это предположение подтверждается тем, что из реакционной смеси можно выделить продукты их рекомбинации: дифенилдихинон-2,5,2',5' (1), 4',4'-дигидрокси-дифенилдихинон-2,5,2',5' (2а, 2б) и 4-гидрокси-дифенилдихинон-2,5,2',5' (3) (Рис. 1.24).

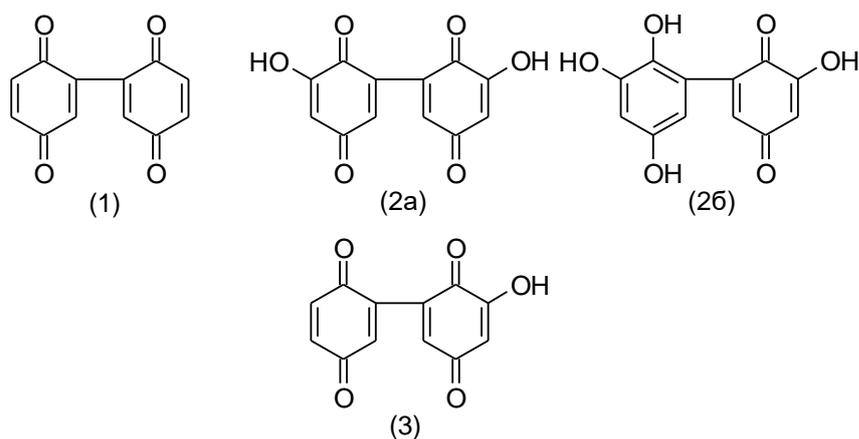


Рис. 1.24. Промежуточные продукты окислительной полимеризации гидрохинона [189].

Было показано, что скорость и выход реакции зависят от pH среды. При $\text{pH} < 6,9$ главным продуктом окисления гидрохинона является п-бензохинон, тогда как полимерные гуминоподобные продукты образуются, преимущественно, при $\text{pH} > 7,9$ [183]. Наибольший выход достигался при проведении реакции при $\text{pH} 8-10$. Присутствие в реакционной смеси ионов переходных металлов – меди, железа, марганца, а также добавление диспергентов, ускоряли реакцию [190]. Главными недостатками моделей ГВ такого типа являются отсутствие исходных фенилалкильных и карбоксильных фрагментов, присущих природным ГВ, и слабый контроль процесса.

Указанные исследования получили продолжение в работе Дросос с соавторами [191], которые использовали карбоксил-содержащие мономеры (галловую и протокатеховую кислоты) для проведения реакции конденсации в условиях контролируемого окислительно-восстановительного потенциала. Основные структурные характеристики полученных гуминоподобных веществ были установлены с помощью спектроскопии ЯМР. Сравнение полученных в статье синтетических и угольных ГК, являющихся стандартом Международного Гуминового Общества (МГО), показано на Рис. 1.25.

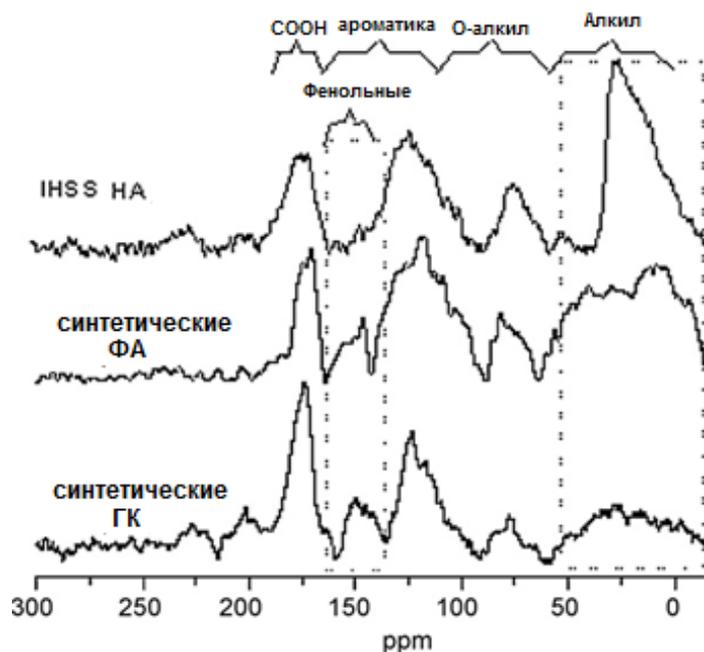


Рис. 1.25. ^{13}C ЯМР спектры модельных ГК, ФК и угольных ГК [191].

Анализ ЯМР-спектров показал, что наиболее конденсированные продукты с высокой молекулярной массой, полученные в отсутствие окислителя, имеют черты сходства со спектром природного образца сравнения, за исключением алифатической части. В то же время, добавление окислительного агента (перекиси водорода) приводило к получению ФК-подобных продуктов, характеризующихся большим вкладом алифатических компонентов. Учитывая ароматическую природу исходных мономеров, авторы предположили, что алифатические структуры появились в результате раскрытия ароматических колец и последующих побочных реакций. Соответствующий механизм получения основного продукта предложен в статье [191], но не доказан определением реакционных интермедиатов или индивидуальных веществ.

Помимо окислительной сополимеризации фенолов, другим возможным механизмом формирования природных ГВ является образование аминокислот и меланоидинов по реакции Меиларда [192]. Поэтому ряд авторов получали азот-содержащие синтетические ГВ с использованием каталитических реакций поликонденсации смесей фенолов, различных аминов и простейших сахаров [193–195], получая продукты с оптическими свойствами близкими к природным ГВ. Однако эти исследования были посвящены направленному синтезу природоподобных продуктов с более выраженными восстановительными и сорбционными свойствами, нежели чем изучению процессов гумификации и молекулярной организации ГВ [196, 197]. Несмотря на то, что искомые продукты обладали элементным составом близким к природным угольным и почвенным ГК эстоит отметить возможный значительный вклад в оптические свойства именно полифенольных компонентов, что нивелирует роль азотсодержащих молекул в данных исследованиях. Тем не менее, эти работы стали первыми

попытками получить модельные ГВ, молекулы которых состоят из строительных блоков различной природы и строения.

Из обзора литературы можно сделать вывод, что несмотря на разнообразие подходов для изучения строения гуминовых веществ и их синтетических аналогов, структурные фрагменты отдельных молекул, входящих в ансамбль ГВ, остаются неизвестными. Единственный метод, который позволяет определять индивидуальные компоненты в составе ГВ – МС ИЦР ПФ, описывает в общем случае лишь их элементный состав. Для решения задачи определения структурных фрагментов применяются методы изотопного обмена в комбинации с масс-спектрометрией. Однако используемые реакции обладают низкой степенью селективности и позволяют определять суммарное содержание различных типов функциональных групп, но не несут информации о строении углеродного скелета. Более того, изучение молекулярного состава модельных ГВ методом МС ИЦР ПФ в литературе не описано. В связи с вышеизложенным цель данной работы состояла в установлении закономерностей строения молекулярного ансамбля ГВ, включая определение особенностей строения индивидуальных компонентов с применением методов синтеза структурных аналогов, изотопно-меченных соединений и масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения.

Для достижения указанной цели решали следующие задачи:

- Получение структурных аналогов ГВ и применение масс-спектрометрии ИЦР ПФ для изучения их молекулярного состава
- Применение селективного дейтериевого обмена скелетных протонов в комбинации с МС ИЦР ПФ для изучения строения индивидуальных компонентов модельных гуминовых веществ
- Разработка методов изучения структурных фрагментов индивидуальных молекул в составе гуминовых веществ селективным мечением различных функциональных групп и углеродного скелета в комбинации с МС ИЦР ПФ

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для достижения основной цели диссертационной работы – выявления закономерностей строения индивидуальных компонентов ГВ – необходимо было решить следующие задачи: синтез более простых структурных аналогов ГВ, разработать способы введения изотопных меток в состав индивидуальных молекул сложной смеси и подходы для интерпретации результатов изотопного обмена, выполнить подбор оптимальных условий регистрации масс-спектров ИЦР ПФ ГВ, проанализировать широкую выборку ГВ из различных источников для оценки полноты получаемых методом МС ИЦР ПФ данных в сравнении с классическим элементным анализом, оценить влияние процедуры пробоподготовки на получаемые результаты.

2.1. Исследование гуминовых веществ различного происхождения и фракционного состава методом МС ИЦР ПФ

2.1.1. Выбор образцов гуминовых веществ и их первичная характеристика

Для установления закономерностей формирования молекулярного состава ГВ различного генезиса были выбраны ГК, ФК и гиматомелановые кислоты (ГМК), выделенные из углей, торфов, почв, и природных вод. Такой подбор образцов обеспечивал наиболее широкую выборку ГВ как по природным источникам, так и по фракционному составу. Полный список образцов и их элементный состав представлен в Таблице 2.1.

Таблица 2.1. Список образцов ГВ с описанием и результатами элементного анализа (% масс в расчете на беззольную пробу)

Шифр	Описание	С	Н	О	N	О/С	Н/С
Гуминовые вещества углей							
СНА-Pow7	ГК бурого угля	57.06	4.04	37.98	0.92	0.50	0.85
СНА-Gl02	ГК лигнита	56.99	3.44	36.63	2.94	0.48	0.72
СНА-SH4	ГК бурого угля	49.07	3.96	45.14	1.83	0.69	0.97
СНМ-Pow7	ГМК бурого угля	50.07	2.17	46.75	1.01	0.70	0.52
СНМ-Irk	ГМК бурого угля	55.73	3.58	39.19	1.50	0.53	0.77

СНМ-G102	ГМК лигнита	42.76	2.92	50.98	3.34	0.89	0.82
Гуминовые вещества торфов							
РНА-T798	ГК верхового торфа	52.13	4.68	41.87	1.32	0.60	1.08
РНА-TTL98	ГК низинного торфа	50.09	4.37	43.48	2.06	0.65	1.05
РНМ-Sk300	ГМК торфа	53.54	2.96	42.02	1.47	0.59	0.66
РНМ-TTL98	ГМК низинного торфа	45.87	4.89	46.75	2.49	0.76	1.28
РФА-T798	ФК верхового торфа	46.06	4.73	48.48	0.73	0.79	1.23
РФА-TTL98	ФК низинного торфа	46.86	3.78	48.24	1.12	0.77	0.97
Гуминовые вещества почв							
SHA-Ctk04	ГК чернозема	57.28	3.29	34.81	4.61	0.46	0.69
SHA-Pw04	ГК дерново- подзолистой почвы	51.31	4.92	38.60	5.18	0.56	1.15
SFA-Ctk04	ФК чернозема	51.14	4.27	40.95	3.65	0.60	1.00
SFA-Pw04	ФК дерново- подзолистой почвы	52.87	4.46	40.00	2.68	0.57	1.01
Гуминовые вещества природных вод							
SRHA	ГК р. Суванни	52.63	4.28	42.04	1.17	0.60	0.98

SRFA	ФК р. Суванни	52.34	4.36	42.98	0.67	0.62	1.00
SRDOM	РОВ р. Суванни	52.47	4.19	42.69	1.1	0.61	0.96
AHF-SSX-13	РОВ озера Сион, сорбент ХАD-8	39.30	4.54	55.43	0.73	1.06	1.39
AHF-SSP-13	РОВ озера Сион, сорбент PPL	48.70	5.67	44.27	1.36	0.68	1.40
RHF-SSP-13	РОВ р. Паниковка, сорбент PPL	55.12	4.72	38.74	1.42	0.53	1.03

Элементный состав показывает, в первую очередь, что С, Н и О составляют основную часть ГВ, а содержание азота гораздо ниже, что типично для ГВ [12]. Сравнение результатов для различных препаратов позволяет заключить, что в целом фракции ГК характеризуются более высоким содержанием С и низким значением О/С по сравнению с ФК. Это согласуется с растворимостью ФК при кислых рН. В то же время, ГК угля содержат меньше всего кислорода, что указывает на их гидрофобность и высокую степень конденсированности. Отношение Н/С не позволяет разделить образцы на классы, однако указывает на закономерные различия в структуре фракций. Так, ФК почв и торфов характеризуются более высоким содержанием кислорода и низким отношением Н/С по сравнению с ГК. Это можно объяснить большим вкладом гидролизуемых таннинов в состав ФК и насыщенных соединений (углеводы, жиры) - в состав ГК. Низкие значения Н/С для ГК углей объясняются большим вкладом конденсированных ароматических структур и отсутствием углеводов. В целом полученные закономерности элементного состава от источника происхождения и фракционного состава ГВ хорошо согласуются с литературными данными [12].

Сравнение водных образцов ГВ, выделенных на смоле Амберлит ХАD-8 и твердофазных картриджах PPL BondElut, показало существенно более высокое содержание кислорода в образце, выделенном на ХАD-8 (AHF-SSX-13), что говорит о большем вкладе окисленных молекул в его состав. Для образца, выделенном на картридже Bond Elut PPL (AHF-SSP-13), напротив, отмечалось большее содержание азота, что указывает на вклад аминокислот и пептидных остатков. Сходная тенденция наблюдалась для образцов ГВ из арктических рек,

выделенных на XAD-8 и картриджах PPL [198]. Тем самым выбор сорбента для экстракции существенно влияет на функциональную периферию ГВ (содержание кислорода и азота), и в меньшей степени - на основные компоненты углеродного скелета (близкие соотношения Н/С).

2.1.2. Изучение молекулярного состава гуминовых кислот углей в оптимальных условиях электрораспыления

Ранее в нашей научной группе было показано, что варьирование условий ионизации и состава растворителя может сильно влиять на эффективность ионизации ГВ водного происхождения [199]. В оптимальных условиях анализ индивидуальных компонентов ГВ природных вод методом МС ИЦР ПФ ЭР проводится за минимальное время благодаря высокой эффективности ионизации [60, 200], в то время как получение масс-спектров высокого разрешения для ГВ твердых горючих ископаемых и почв является сложной методической проблемой. Это связано с высоким содержанием неионогенных высокомолекулярных компонентов в составе ГВ угля и торфа, характеризующихся низкой эффективностью ионизации [98]. В то же время получение достоверных данных о молекулярном составе ГВ угля и торфа исключительно важно для решения поставленной в работе задачи изучения структуры индивидуальных соединений ГВ с применением методов изотопного мечения.

Подбор оптимальных условий ионизации, описанный в Главе 3.1.3. данной работы, позволил впервые сравнить ГК, выделенные из различных углей, в терминах молекулярного состава, который определяли методом МС ИЦР ПФ. Для анализа использовали ГК леонардита (СНА-Pow7) и двух лигнитов (СНА-SH4 и СНА-GI02). В масс-спектрах ИЦР ПФ СНА-Pow7 и СНА-SH4 было идентифицировано более 4000 индивидуальных соединений с молекулярными формулами $C_cH_nN_nO_oS_s$, и около 3000 - для образца СНА-GI02 (Рис. 2.1).

Рис. 2.1(А) показывает, что самое большое содержание молекул, включающих только С, Н, О атомы (далее - СНО молекулы) было характерно для образца СНА-Pow7, выделенного из самого окисленного угля - леонардита, в то время как два образца, выделенные из лигнитов (СНА-SH4 и СНА-GI02) характеризовались большим вкладом молекул, содержащих гетероатомы N, S. Самое большое количество азотсодержащих соединений было определено для образца СНА-GI02, что согласуется с его элементным составом: в нем наблюдалось самое высокое содержание азота (2.9%) в сравнении с 0.92% и 1.83% для СНА-Pow7 и СНА-SH4, соответственно (Таблица. 2.1).

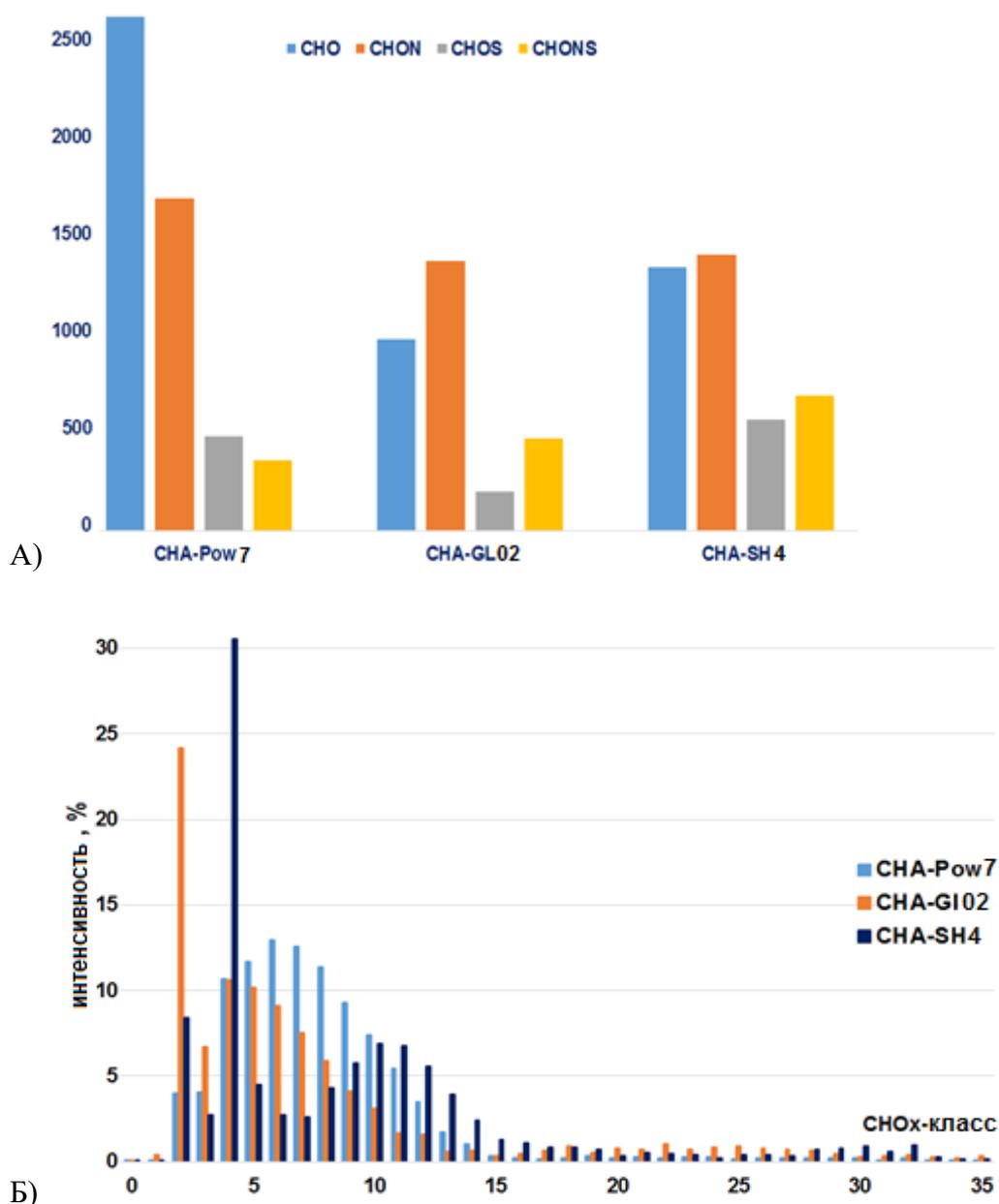


Рис. 2.1. Количество различных молекулярных составов (CHO, CHON, CHOS, и CHONS), полученных (-) ЭР МС ИЦР ПФ для трех образцов ГК угля (А), и распределение кислорода среди различных СНО_х-классов в исследуемых образцах ГК угля (Б).

Для сопоставления функционально-группового состава исследуемых образцов ГК было рассчитано распределение кислородсодержащих соединений, которое показывает относительный вклад интенсивности пиков молекулярных компонентов с разным количеством кислорода (СНО_х-класс), в суммарную интенсивность масс спектра [201, 202].

Полученное СНО_х-распределение для трех исследованных препаратов ГВ представлено на Рис. 2.1(Б) в виде гистограммы, где в качестве оси Х представлены номера, соответствующие количеству атомов кислорода, по оси У - относительная суммарная интенсивность соответствующих СНО_х-классов. На гистограмме видны значительные различия сравниваемых

образцов. Основной вклад в общую интенсивность препаратов CHA-SH4 и CHA-GL02 вносят молекулы, содержащие 4 и 2 атома кислорода (CHO₄ and CHO₂ классы), соответственно. Максимум распределения в случае CHA-Pow7 смещен в сторону более окисленных тяжелых молекул (6 атомов кислорода в молекулах), что согласуется с максимальной окисленностью данного угля. В случае CHA-SH4 наблюдалось явное бимодальное распределение кислородных классов. Это указывает на присутствие двух различных групп веществ в составе этого образца: насыщенных (жиры и жирные кислоты) и ароматических (конденсированные танины) соединений.

Далее полученные брутто-формулы были нанесены на диаграммы Ван Кревелена (Рис. 2.2) [203].

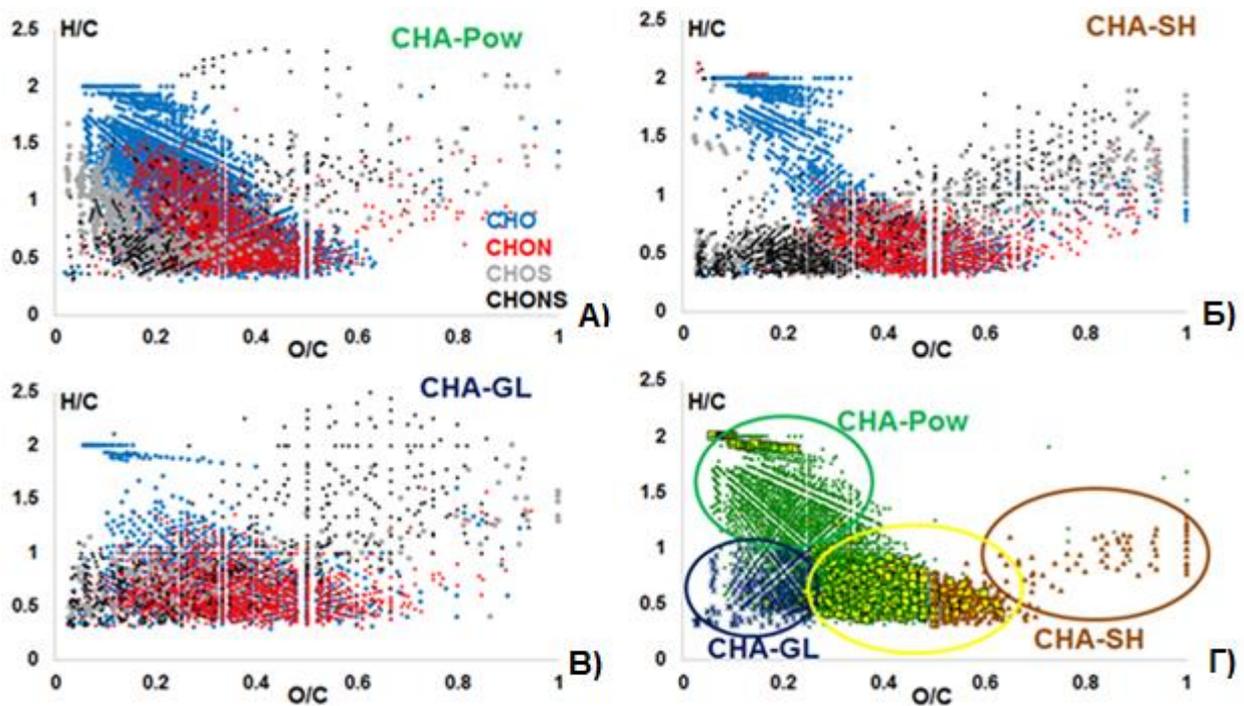


Рис. 2.2. Диаграммы Ван Кревелена для ГК углей из различных источников: А) CHA-Pow7, Б) CHA-SH4, В) CHA-GL02; Г) общие и уникальные молекулы в исследованных образцах: темно-синие точки обозначают уникальные компоненты CHA-GL02, зеленые - CHA-Pow7, коричневые - CHA-SH4, а желтые - общие формулы для всех образцов [203].

Как видно, образцы обладают как общими, так и уникальными компонентами молекулярного пространства. Все образцы содержат молекулы в области конденсированных танинов (Рис. 2.2Г), которые можно рассматривать как самый характеристичный пул гуминовых компонентов углей. Рассмотрение положения азотсодержащих соединений (далее CHON формул) на диаграмме Ван Кревелена указывает на сходство всех образцов по азотсодержащим компонентам с атомными отношениями $0.3 < \text{H/C} < 0.8$ и $\text{O/C} < 0.4$. Согласно

литературным данным, эти молекулы могут содержать гетероциклический азот в составе пиридинов и пирролов [204]. Наличие гетероциклических соединений так же характерно для серосодержащих соединений (далее CHOS молекул), наблюдаемых в области конденсированных ароматических соединений. В качестве наиболее вероятных структур можно предположить вклад тиофенов [204]. В то же время образец СНА-Pow7 обладал самым уникальным составом, включая область на диаграмме с высокой плотностью точек с $1.0 < \text{H/C} < 1.5$ и $0 < \text{O/C} < 0.5$, которая практически отсутствовала как в составе СНА-SH4, так и СНА-GI02. Это указывает на присутствие лигнинных и алифатических фрагментов, обогащенных карбоксильными группами в составе СНА-Pow7, что согласуется с видом гистограммы распределения кислорода (Рис. 2.1Б). Самое большое количество конденсированных ароматических молекул было обнаружено в составе СНА-GI02, которые располагались в области так называемого «black carbon» («черного углерода, сажи») [205] и вносили наибольший вклад в молекулярный состав данного образца. Напротив, СНА-SH4 включал наиболее окисленные СНО и CHOS молекулы с $\text{O/C} > 0.6$, которых было гораздо меньше в ГК из другого лигнита - СНА-GI02 и вовсе не обнаруживалось в ГК леонардита - СНА-Pow7 (Рис. 2.2).

Для количественного сравнения вклада ароматических структур в состав изученных угольных ГК рассчитывали индекс ароматичности (AI) [80]. Рассчитанные доли компонентов с указанными пороговыми значениями AI для исследованных образцов ГК угля представлены в Таблице 2.2.

Таблица 2.2. Количество ароматических ($\text{AI} > 0.5$) и конденсированных ($\text{AI} > 0.67$) компонентов в составе исследованных ГК угля

Вклад соединений, % от общего количества identifications	Образец ГК угля		
	СНА-Pow7	СНА-GI02	СНА-SH4
Конденсированные соединения	10	24	16
Ароматические соединения	33	58	41

Рассчитанные значения индекса ароматичности показывают, что конденсированная ароматика вносит наибольший вклад (24%) в состав СНА-GI02. СНА-Pow7, для которого была отмечена высокая заселенность лигнинной области, содержит минимальное количество конденсированных молекул (10%). В то же время для всех образцов характерен значительный вклад ароматических структур с $\text{AI} > 0.5$, что является особенностью угольных ГК [205].

2.1.3. Определение влияния процедуры выделения на молекулярный состав гуминовых веществ

В силу того, что наблюдению молекулярного состава водных ГВ предшествует процедура их сорбционного извлечения, мы провели исследование молекулярной селективности наиболее распространенных сорбентов. Соотношение оптических плотностей с учетом разбавления исходной высокоцветной воды составило 20:7:1 для исходного РОВ и растворов, прошедших через XAD-8 и PPL, соответственно. Это позволило сделать вывод о более высокой эффективности извлечения РОВ на картридже PPL BondElut по сравнению с макроситовой смолой Амберлит XAD-8. Полученным образцам были присвоены шифры АНФ-SSP-13 и АНФ-SSX-13. Из элементного состава, представленного в Таблице 2.1, можно сделать вывод, что в полученных образцах отсутствовали существенные различия по содержанию алифатических и ароматических фрагментов, на что указывают близкие значения Н/С. Поэтому для детального сравнения необходим анализ образцов методом МС ИЦР ПФ.

Масс-спектры образцов АНФ-SSP-13 и АНФ-SSX-13 показаны на Рис. 2.3. На сходство полученных ГВ указывают одинаковая форма спектров с максимумом интенсивности в районе 360 m/z и близкие среднечисленные массы 461 и 446, соответственно (Таблица. 2.3). В то же время масс-спектр АНФ-SSP-13 состоял из меньшего числа пиков – 5540 по сравнению с АНФ-SSX-13, состоящим из 11923 пиков, причем в последнем случае наблюдались двухзарядные ионы низкой интенсивности, что не повлияло на M_n , но отразилось на установлении брутто-формулы.

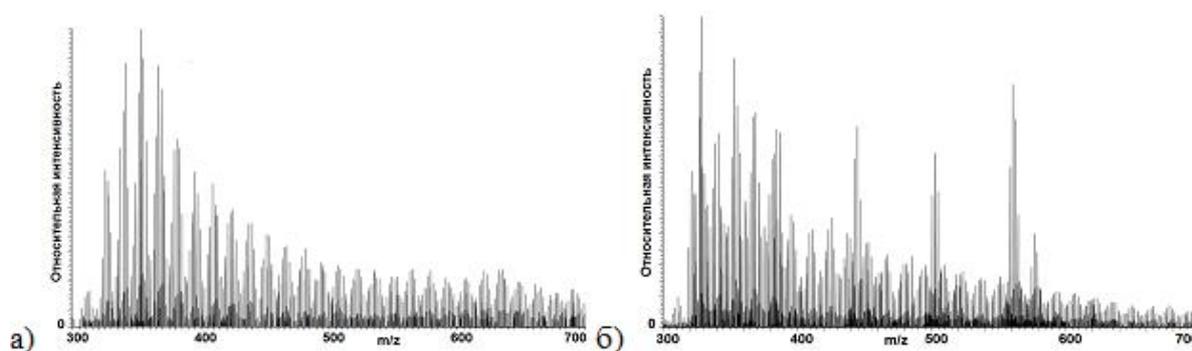


Рис. 2.3. Масс-спектры образцов АНФ-SSP-13 (а) и АНФ-SSX-13 (б).

В результате обработки полученных данных МС ИЦР ПФ образцам АНФ-SSP-13 и АНФ-SSX-13 было присвоено 1677 и 2845 уникальных формул, соответственно. Их представление в виде 3D диаграммы Ван Кревелена показано на Рис. 2.4, где в качестве третьего измерения выступает молекулярная масс (А, Б) и индекс ароматичности (В,Г) индивидуальных соединений.

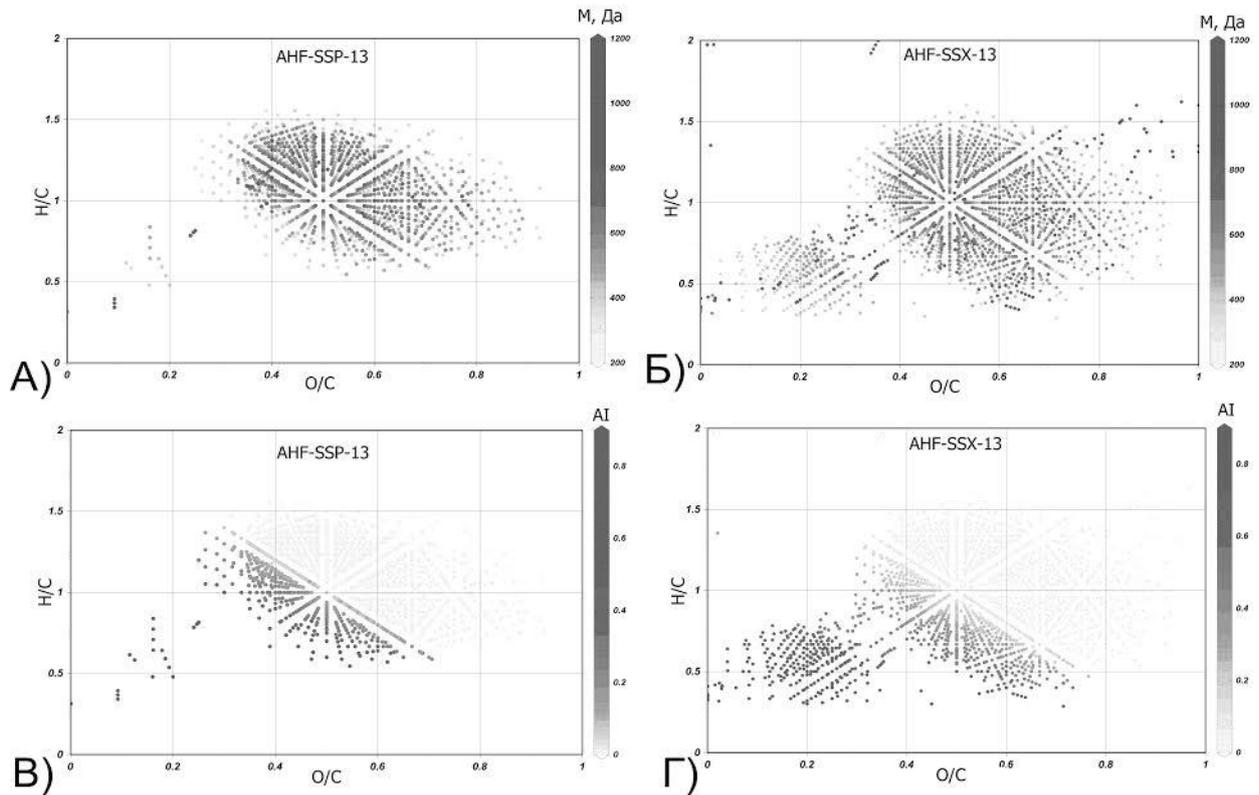


Рис. 2.4. 3D диаграммы Ван Кревелена для препаратов ГВ, выделенных на твердофазном картридже PPL (AHF-SSP-13) и на смоле Amberlite XAD-8 (AHF-SSX-13), где интенсивность окраски точки пропорциональна молекулярной массе M (а, б) и индексу ароматичности AI (в, г) [206].

Сравнение найденных индивидуальных компонентов выявляет целый ряд различий между двумя образцами. Так, AHF-SSX-13, выделенный на смоле XAD-8, содержит ансамбль молекул, расположенных в области значений H/C от 0.2 до 0.8 и O/C – от 0 до 0.3, что соответствует классу конденсированных ароматических соединений (типа флавоноидов или других конденсированных таннинов). В образце AHF-SSP-13 данные компоненты отсутствуют, при этом наблюдается высокая заселенность области гидролизуемых таннинов (H/C от 0.3 до 1.3 и O/C > 0.5), пептидов и аминокислот [3]. Подобная тенденция отмечалась и для образцов ГВ из арктических рек [198]. В то же время образцы имели 1400 общих молекулярных идентификаций. Следовательно, несмотря на различную процедуру выделения, образцы ГВ из одного и того же источника характеризуются наличием общей консервативной части, но разными уникальными компонентами.

Распределение молекулярной массы по молекулярному пространству ГВ (Рис. 2.4 А,Б) указывает на присутствие в образце AHF-SSX-13, выделенном на XAD-8, низко- и высокомолекулярных ароматических и конденсированных соединений. Масс-спектр ИЦР ПФ образца AHF-SSP-13 не содержал многозарядные ионы, поэтому диапазон масс составил 200-900

Да, что типично для МС ИЦР ПФ водных ГВ [52]. Распределение индекса ароматичности AI, показанное на Рис. 2.4 (В,Г) указывает на большое содержание ароматических соединений в этом образце. Оценивая AI для индивидуальных компонентов можно сделать вывод о незначительном присутствии конденсированных соединений ($AI \geq 0.67$) в обоих образцах, что свойственно образцам растворенного органического вещества (POB) [80]. Однако ароматические структуры с $AI > 0.5$ определяются в обоих препаратах, причем в образце ANF-SSX-13 их количество значительно, в то время, как образец ANF-SSP-13, в основном, состоит из более насыщенных соединений с $AI < 0.5$. Обнаруженная закономерность распределения AI подтверждает молекулярную селективность использованных в работе сорбентов: XAD-8 имеет предпочтительную сорбцию по отношению к ароматическим компонентам, тогда как картридж PPL извлекает более насыщенные соединения, в том числе обогащенные азотом.

Для сопоставления окисленных составляющих образцов ГВ было рассчитано распределение кислородсодержащих соединений, которое показано на (Рис. 2.5). Гистограмма распределения показывает процентный вклад в общую интенсивность на масс-спектре групп молекул с разным количеством кислорода (CHO_x-класс) [201, 202].

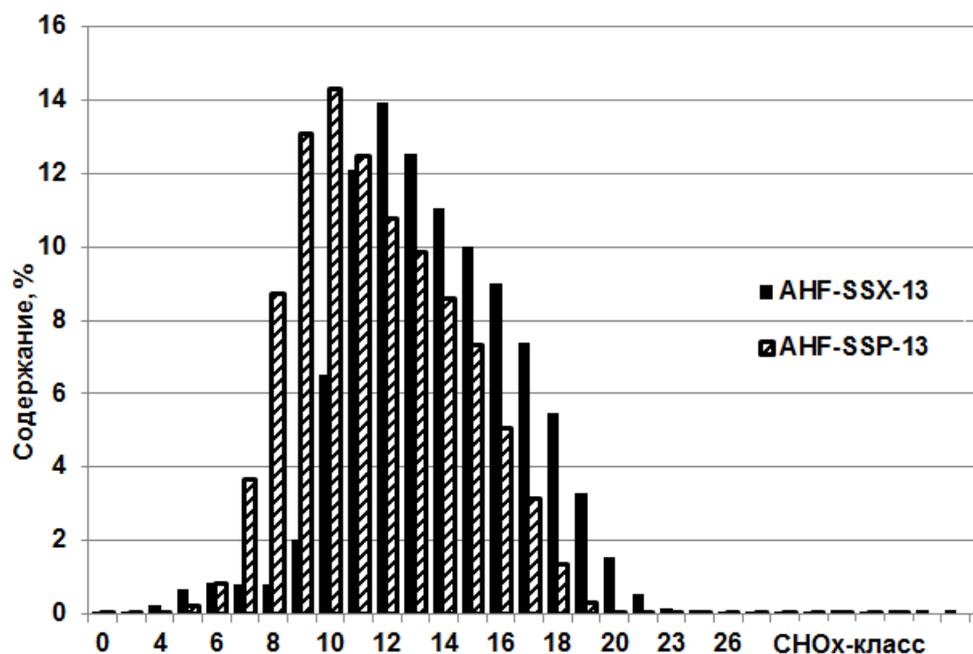


Рис. 2.5. Распределение кислородсодержащих соединений (CHO_x-класс) в исследуемых препаратах ГВ, выделенных на разных сорбентах: черный цвет соответствует образцу, выделенному на смоле Amberlite XAD-8 (ANF-SSX-13); штрих - образцу, выделенному на картридже PPL (ANF-SSP-13) [206].

Рис. 2.5 показывает, что максимум распределения в образце ANF-SSX-13 соответствует группе молекул с 12 атомами кислорода (CHO₁₂-класс), в то время как наибольший вклад в образец ANF-SSP-13 вносит CHO₁₀-класс. Максимум распределения согласуется как со средним

О/С значением, так и с элементным анализом препаратов (Таблица. 2.1). Ещё одно существенное различие наблюдается для классов с максимальным содержанием кислорода: группы $\text{CHO}_{x>12}$ обладают значительно большей интенсивностью в образце, выделенном на ХАД-8, по сравнению с образцом, полученным на РРЛ, что так же согласуется с данными элементного анализа.

Таким образом, анализ методом МС ИЦР ПФ образцов РОВ, полученных из одного источника с использованием разных сорбентов указывает на влияние процедуры выделения на молекулярный состав образцов. Значительное количество уникальных молекул свидетельствует о большей эффективности экстракции ароматических компонентов в случае смолы ХАД-8, тогда как РРЛ имеет повышенное сродство к экстракции алифатических азотсодержащих соединений. Полученные результаты согласуются с литературными данными по селективности сорбентов [198, 207]. В то же время оба типа сорбентов позволяют выделить обширный пул консервативных молекулярных компонентов полифенольной природы: таннины и лигнины, причем картридж РРЛ продемонстрировал высокую эффективность их извлечения. Поэтому, учитывая более удобную процедуру выделения и очистки, в дальнейшем в работе использовался этот сорбент.

2.1.4. Сравнение молекулярного состава гуминовых веществ различного происхождения методом МС ИЦР ПФ

Для углубленной характеристики молекулярного состава выделенных препаратов ГВ необходимо привлечение масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения - МС ИЦР ПФ, которая позволяет устанавливать формулы индивидуальных соединений в сложной многокомпонентной системе [56, 60, 208]. При этом использование мягкого метода ионизации электрораспылением (ЭР) позволяет избежать фрагментации, в результате чего полученные спектры содержат только молекулярные ионы. Типичные масс-спектры ИЦР ПФ ЭР гуминовых веществ природных вод, угля и торфа, полученные в данной работе, представлены на Рис. 2.6.

Основное количество пиков в масс-спектре ИЦР ПФ гуминовых веществ лежит в области 200-700 m/z с максимумом интенсивности в районе 450 m/z . Высокое разрешение метода позволяет различить на одном номинальном значении m/z множество ионов с точностью определения масс до 5 знака после запятой. Если вид масс-спектра похож для всех исследуемых образцов, то распределение пиков на одной номинальной массе, как это показано на Рис. 2.6 на примере $m/z=411$, раскрывает основные отличия ГВ, выделенных из различных источников. Для образцов ФК торфа и воды, мы наблюдаем мономодальное распределение с максимумом $m/z = 411.07240$ и 411.05765 (Рис. 2.6А,В), которые соответствуют брутто-формулам $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{O}_9$ и $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{O}_{12}$.

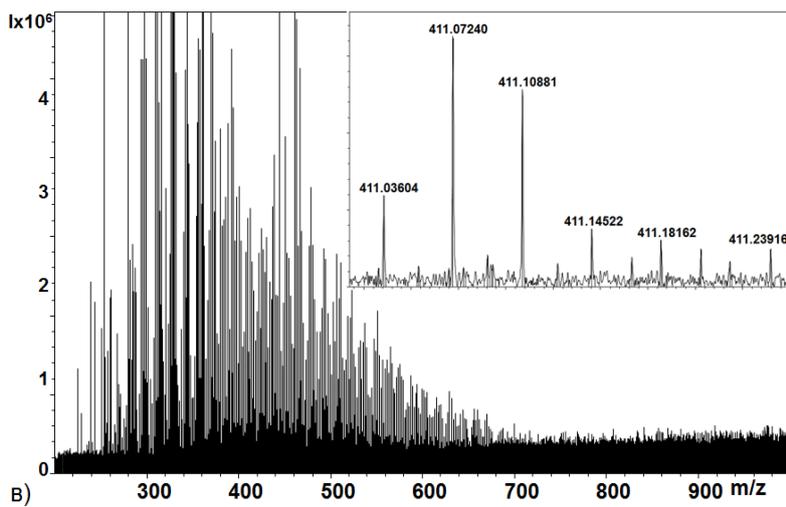
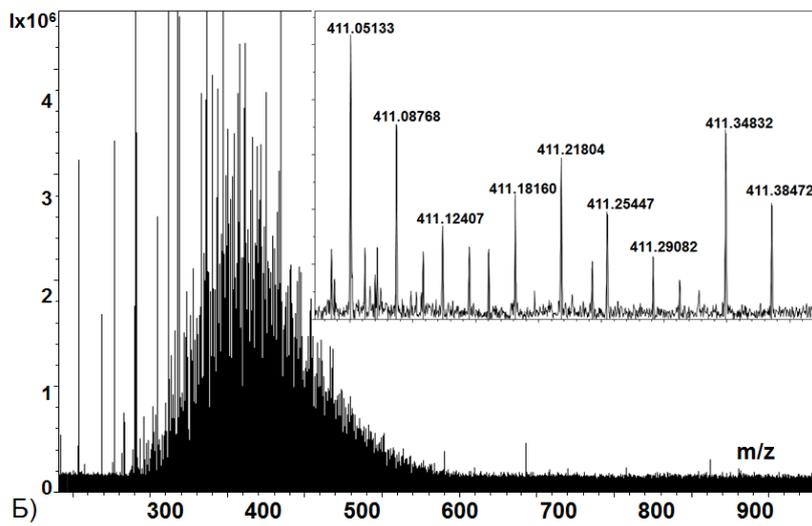
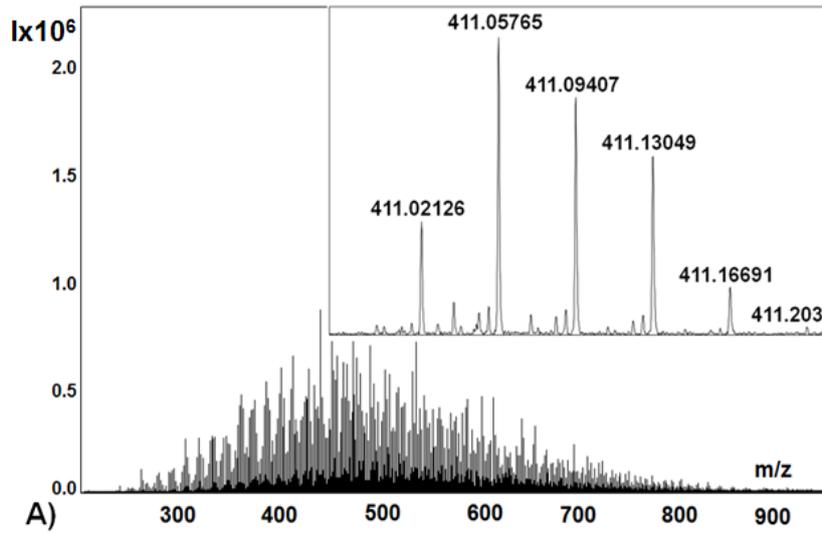


Рис. 2.6. Типичные масс-спектры ИЦР ПФ ЭР гуминовых веществ А) SRFA Б) CHA-Pow7 В) PFA-TTL98 с выделенной областью с номинальным значением $m/z = 411$.

Оба молекулярных состава характеризуются ароматическим характером ($H/C < 0.9$), но в значительной мере отличаются содержанием кислорода: $O/C = 0.42$ (PFA-TTL) указывает на существенный вклад конденсированных танинов, в то время как значение 0.71 (SRFA) характерно для гидролизуемых танинов [76]. В случае ГК угля распределение пиков на одной номинальной массе является полимодальным с максимумами в 411.05133, 411.21804 и 411.34832, отвечающим молекулярным формулам $C_{24}H_{11}O_7$, $C_{25}H_{31}O_5$ и $C_{25}H_{47}O_4$, соответственно. Такое отличие указывает на максимальную гетерогенность угольных ГК: в составе СНА-Pow7 присутствуют конденсированные ароматические соединения, лигниноподобные с H/C в районе 1.2 и алифатические соединения с $H/C \approx 2$, которые можно отнести к жирным кислотам [205]. Графически полученные отличия показаны на Рис. 2.7. в виде диаграмм Ван Кревелена для 4 ГВ, различной природы.

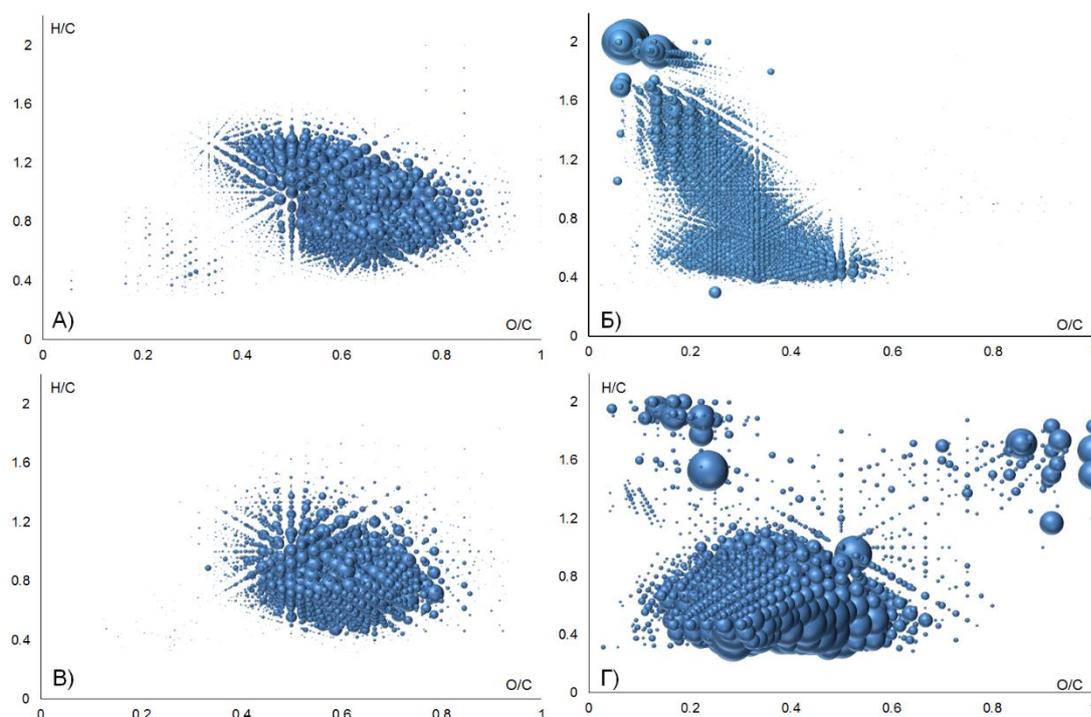


Рис. 2.7. 3D диаграммы Ван Кревелена, построенные по результатам МС ИЦР ПФ А) SRFA Б) СНА-Pow7 В) PFA-TTL98 Г) СНА-Ctk04.

Распределение молекулярных составов по диаграмме Ван Кревелена для ГК природных вод и почвы (Рис. 2.7.А, В) имеет похожий вид с преобладанием окисленных ароматических соединений с $O/C > 0.5$ и $H/C < 1$. В то же время основными компонентами ГК угля и почвы (Рис. 2.2.А, Г) являются слабо окисленные ароматические соединения, часто относимые к конденсированным танинам [76]. Уникальность СНА-Pow7 заключается в присутствии в его молекулярном составе множества лигниноподобных и насыщенных компонентов (Рис. 2.7.Б). Таким образом, различные распределения пиков в масс-спектрах ИЦР ПФ ГВ определяет

большое разнообразие их молекулярных составов. Основные характеристики полученных спектров для всех образцов из выборки представлены в Таблице 2.3.

Таблица 2.3. Характеристики масс-спектров ИЦР ПФ гуминовых веществ различного происхождения и фракционного состава и относительный вклад $C_cH_hO_oN_nS_s$ формул в суммарную интенсивность спектра (%).

Шифр	Число пиков	Mn*	CHO	CHON	CHOS	CHONS	O/C _n *	H/C _n *
Гуминовые вещества углей								
CHA-Pow7	20454	476	69	27	3	1	0.29	0.93
CHA-GI02	19396	375	45	46	3	6	0.31	0.83
CHA-SH4	16398	472	52	43	3	2	0.36	0.93
CHM-Pow7	7313	468	81	15	3	1	0.42	0.84
CHM-Irk	7054	496	77	18	4	1	0.44	0.78
CHM-GI02	7165	512	63	34	1	2	0.50	0.66
Гуминовые вещества торфов								
PHA-T798	17775	488	92	3	4	1	0.39	1.30
PHA-TTL98	12120	466	84	6	4	6	0.46	1.04
PHM-Sk300	5894	520	88	1	4	7	0.50	0.72
PHM-TTL98	9635	495	84	6	4	6	0.54	0.84
PFA-T798	12393	474	96	2	1	1	0.56	0.93
PFA-TTL98	13191	470	90	7	2	1	0.58	0.83
Гуминовые вещества почв								
SHA-Ctk04	16640	417	61	25	8	6	0.38	0.71
SHA-Pw04	30061**	459	66	16	9	9	0.37	0.95
SFA-Ctk04	21400**	488	85	10	4	1	0.55	0.98
SFA-Pw04	41380**	530	91	6	2	1	0.56	0.95
Гуминовые вещества природных вод								
SRHA	13361	477	91	4	1	4	0.58	0.82
SRFA	9979	496	95	3	1	1	0.60	0.91
SRDOM	12994	480	95	3	1	1	0.53	1.11
AHF-SSX13	11923	461	82	6	11	1	0.56	1.01
AHF-SSP13	5439	460	94	3	3	0	0.55	1.09
RHF-SSP13	11206	493	84	3	13	0	0.48	1.24

* - среднечисленные значения, ** - общее количество пиков получено суммированием спектров в узкополосном режиме съемки

Как видно из таблицы, все масс-спектры ГВ характеризуются высокой сложностью – состоят из десятков тысяч пиков. Значения среднечисленных масс изменяются от 370 до 530 Да, что согласуется с литературными данными по МС ИЦР ПФ анализу ГВ природных вод [209, 210]. Для присвоения конкретных молекулярных формул необходимо определить зарядовое состояние пиков. Для этой цели определяют расстояние между основными и изотопными пиками [3]. Так

как содержание изотопа ^{13}C составляет 1%, то для определения зарядового состояния используют именно пару основной пик (^{12}C) - ^{13}C изотопный пики. Для ионов со значением $z = 1$ изотопный пик отстоит от основного на 1.00336 m/z, в то время как для двухзарядного иона эта разность составляет 0.50168 m/z. Спектр также содержит пики, соответствующие другим изотопам, которые можно определить путем поиска ионов, отличающихся от основных на известные точные массы: $\Delta m(^{18}\text{O}-^{16}\text{O}) = 2.00425$, $\Delta m(^{34}\text{S}-^{32}\text{S}) = 1.99579$. Используя данный подход мы показали, что подавляющее число пиков в масс спектре ГВ при таком рассмотрении являлись однозарядными, что согласуется с литературными данными [64]. Это означает, что при анализе ГВ методом МС ИЦР ПФ из рассмотрения исключаются высокомолекулярные компоненты. Несмотря на это, количество идентифицированных молекул составляло несколько тысяч для всех образцов. В том числе, благодаря высокой чувствительности прибора, было определено множество индивидуальных азот- и серосодержащих молекул. Однако оценка относительного вклада CHO , CHON , CHOS и CHONS формул в общую интенсивность (Таблица 2.3) позволяет заключить, что в общем случае вклад CHO молекул превышает 85% от общего содержания. Исключением являются образцы ГК, выделенные из углей, особенно СНА-G102, который характеризуется 46% относительным вкладом CHON молекул в суммарную интенсивность и большим содержанием азота (2.9%). Ранее многообразие азотсодержащих молекул в органических экстрактах угля было показано Маршаллом [66].

Для сравнения данных, полученных элементным анализом и МС ИЦР ПФ, среднечисленные значения атомных отношений O/C и H/C были помещены в Таблицу 2.4.

Таблица 2.4. Атомные отношения, полученные по результатам элементного анализа, и МС ИЦ ПФ.

Тип	Элементный анализ			МС ИЦР ПФ		
	O/C^*	H/C^*	N/C^*	O/C_n^{**}	H/C_n^{**}	N/C_n^{**}
ГВ угля	0.63	0.78	0.033	0.39	0.83	0.030
ГВ торфа	0.69	1.05	0.027	0.51	0.94	0.016
ГВ почвы	0.55	0.96	0.065	0.46	0.90	0.033
РОВ	0.68	1.13	0.018	0.55	1.03	0.010

* - усредненные значения по источнику; ** - среднечисленные значения

Как видно из Таблицы 2.4., данные МС ИЦР ПФ и элементного анализа имеют значительные отличия. Это объясняется сравнительно низкой эффективностью ионизации при электрораспылении не только высокомолекулярных соединений, но и молекул средней массы [211]. Это касается наиболее гидрофильных молекул (например, углеводов) и конденсированных ароматических соединений [212]. Действительно, гидрофобные молекулы, обладающие кислотными группами, такими как алифатические кислоты, находятся в поверхностном слое

заряженных микрокапель, что приводит к их приоритетному испарению и, следовательно, к более эффективной ионизации в источнике. Это приводит, с одной стороны, к заниженным средним значениям O/C_n (например, 0.36 и 0.57 для SHA-Ctk) из-за недоопределения МС ИЦР ПФ неионогенных окисленных молекул [212], входящих в состав ГВ, и с другой стороны, может приводить к завышению значений H/C_n в случае значительного вклада гидрофобных молекул, например, в составе углей – 0.93 и 0.85 для СНА-Pow7.

Так же мы наблюдали расхождение в определении азотсодержащих молекул. Торф и почва содержат азот в виде гетероциклов и цепочек пептидов. Большое расхождение элементного анализа и МС ИЦР ПФ можно объяснить недоопределением именно пептидного азота, так как в случае угольных образцов, которые в основном содержат ароматические гетероциклы [66], расхождение незначительно. Тем не менее, все тренды, вытекающие из данных элементного анализа, сохраняются для МС ИЦР ПФ. Так, ФК являются более окисленными по сравнению с ГК из того же источника. Например, O/C_n для РНА-TTL98 и РФА-TTL98 составляют 0.45 и 0.58 соответственно (Таблица 2.3). ГВ почв и РОВ характеризуются наибольшим и наименьшим количествами азота, соответственно (Таблица. 2.4). Таким образом, несмотря на обнаруженные ограничения, метод МС ИЦР ПФ позволяет адекватно сравнивать образцы между собой.

Для дальнейшего сравнения образцов все присвоенные молекулярные формулы были поделены на группы с элементными составами, соответствующими основным прекурсором ГВ, как это описано в литературе [4]: насыщенные соединения, пептиды, лигнин, конденсированные и гидролизуемые танины и углеводы (Рис. 2.8А). Полученная гистограмма взвешенного по относительной интенсивности распределения молекулярных составов, усредненного по источнику ГВ, представлена на Рис. 2.8Б.

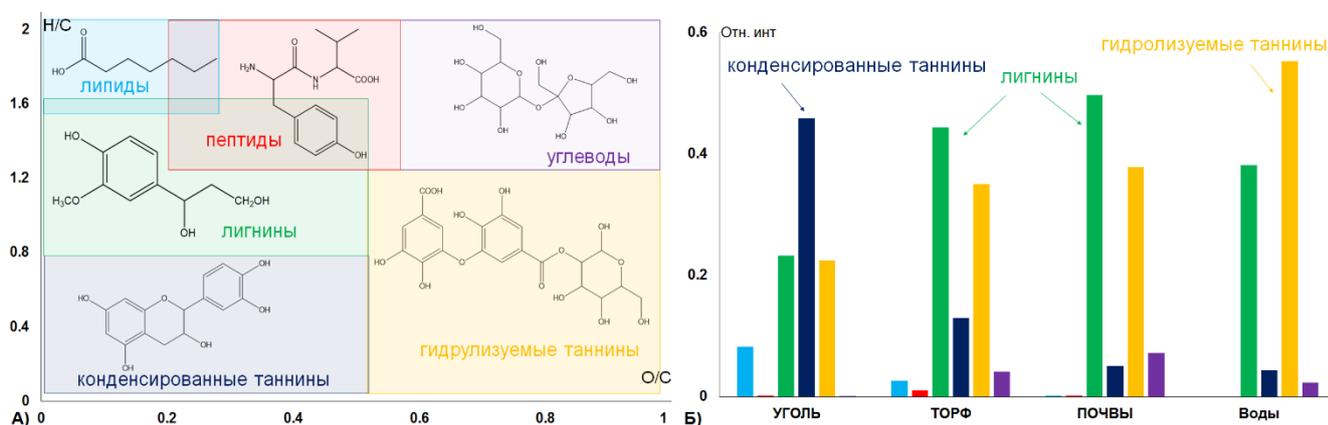


Рис. 2.8. А) Модельная диаграмма Ван Кревелена с выделенными областями прекурсоров ГВ [4]. Б) Распределение взвешенных по интенсивности идентифицированных формул по основным прекурсорам ГВ, усредненное по источнику: уголь, торф, почва и вода.

Как видно из полученных данных, ароматические компоненты вносят основной вклад в молекулярный состав ГВ из всех источников, что согласуется с гипотезами гумификации [13]. Отличительной особенностью угольных ГВ является максимальный вклад конденсированных таннинов – низкоокисленных ароматических соединений. В то же время водные ГВ характеризуются максимальным содержанием гидролизуемых таннинов – группы окисленных ароматических соединений и полигидроксикислот [4]. Это согласуется с максимальным содержанием кислорода в водных образцах и минимальным отношением Н/С в случае угольных препаратов, по результатам элементного анализа (Таблица 2.1). Образцы торфа и почвы так же включали углеводные фрагменты, что согласуется с данными ЯМР, полученными в предыдущих работах [95]. Таким образом, все рассмотренные образцы характеризуются особенностями молекулярного состава. Относительные вклады различных прекурсоров в молекулярный ансамбль ГВ могут выступать в качестве численных дескрипторов для сравнения ГВ, выделенных из различных источников. Однако, полученные данные не несут информации о структурах молекулярных компонентов.

2.2. Синтез структурных аналогов гуминовых веществ

Опираясь на полученные данные по молекулярному составу ГВ, можно предложить оптимальные исходные материалы для получения синтетических гуминоподобных веществ, обладающих основным структурными и функциональными особенностями природных ГВ. Во-первых, синтетическая модель может состоять исключительно из СНО молекул, так как они обладают основным вкладом в природные ГВ. Во-вторых, гуминоподобные вещества должны быть составлены из полифенольных и лигниноподобных молекул, так как они составляют основную часть ГВ. В качестве фенольной компоненты в нашей работе использовался гидрохинон. Для формирования компонентов лигнина, мы синтезировали окисленный фенилпропановый мономер, структурно близкий кониферилловому спирту, но содержащий карбоксильную группу вместо первичного спирта, что соответствует модели окисленного лигнина [2, 19, 213].

2.2.1. Синтез этил 3-(4-(этоксикарбонилокси)-3-метоксифенил)-3-оксопропионата

Синтез этил 3-(4-(этоксикарбонилокси)-3-метоксифенил)-3-оксопропионата – предшественника 3-(4-(этоксикарбонилокси)-3-метоксифенил)-3-оксопропионовой кислоты, которую было предложено использовать в качестве мономера для сополимеризации с

многоатомными фенолами, проводили по оригинальной методике из ванилиновой кислоты. Общая схема синтеза представлена на Рис. 2.9.

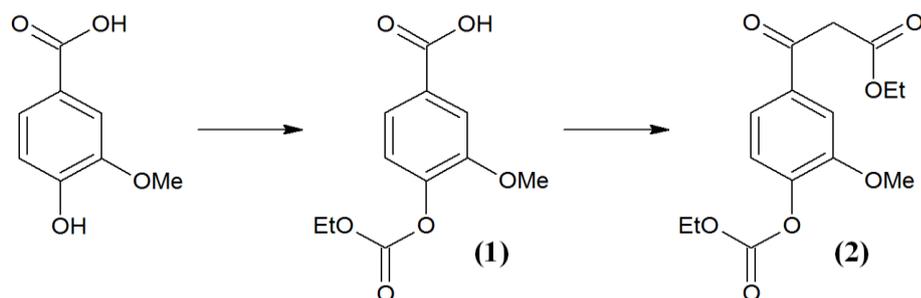
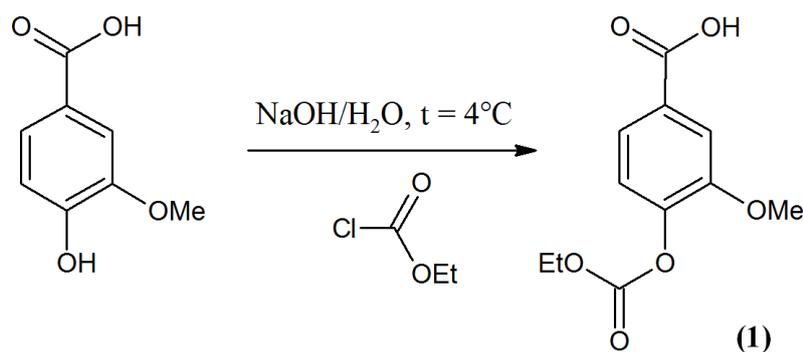


Рис. 2.9. Общая схема синтеза этил 3-(4-(этоксикарбонилокси)-3-метоксифенил)-3-оксoproпионата.

На первой стадии получения фенилпропилового структурного фрагмента химически высокореакционную фенольную группу коммерчески доступной ванилиновой кислоты защищали этоксикарбонильной группой, легко отщепляемой последующим щелочным гидролизом (схема 2.1).

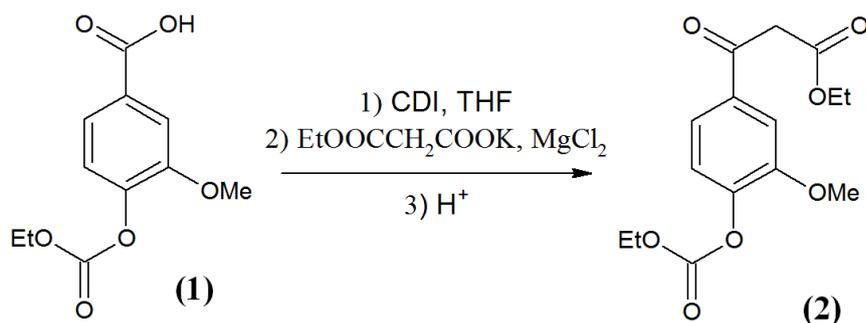
Схема 2.1



Неописанное ранее соединение (1) выделено в индивидуальном состоянии и охарактеризовано методами спектроскопии ЯМР ¹H и ¹³C.

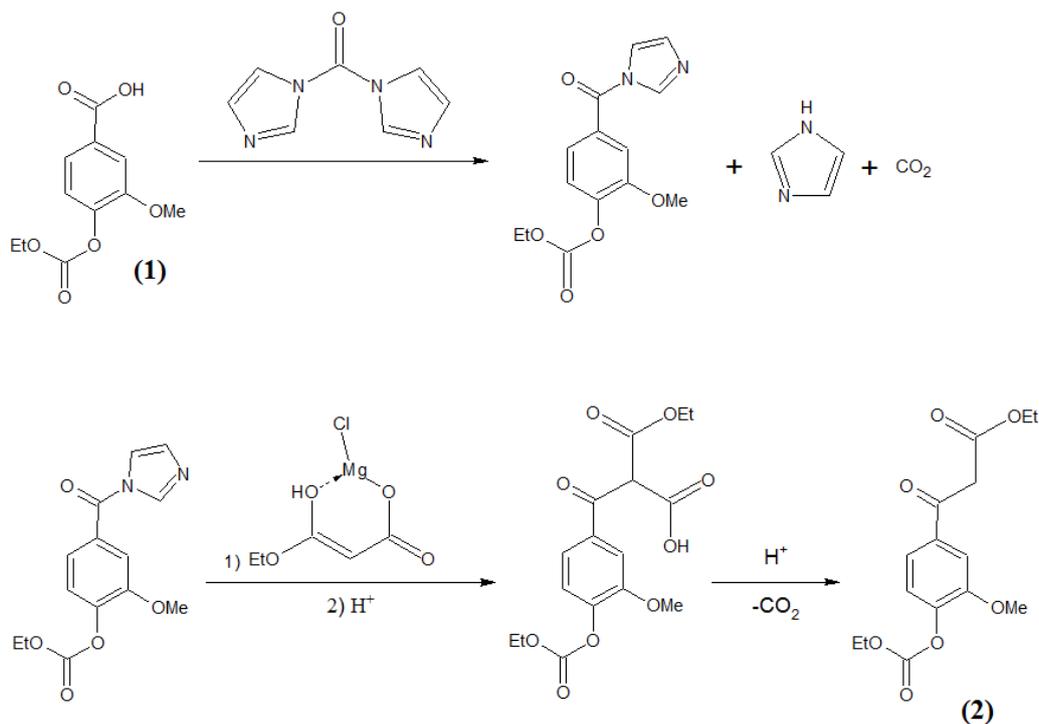
Для получения 2 из соединения 1 использовали реакцию с калий этилмалонатом в присутствии безводного хлорида магния [214]. Для активации карбоксильной группы применяли карбонилдиимдазол (CDI). Соединение 2 может быть получено конденсацией малонового эфира с хлорангидридом 4-этоксикарбонилокси-3-метоксибензойной кислоты с хорошим выходом [215], но был выбран более удобный путь (схема 2.2).

Схема 2.2



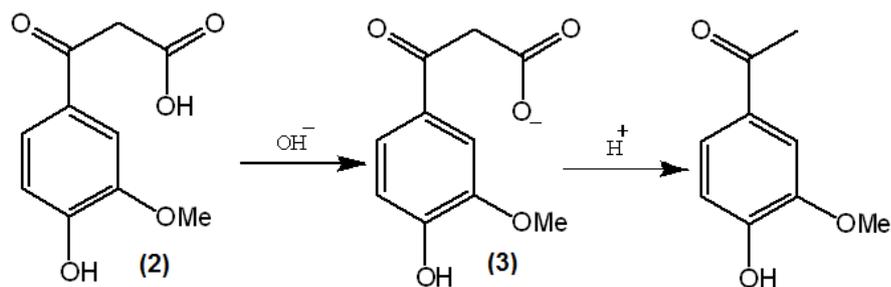
Состав соединения **2** установлен на основании данных элементного анализа, а структура в растворе установлена на основании данных спектроскопии ЯМР ¹H и ¹³C. В спектре ЯМР ¹³C наблюдаются пики карбонильной группы при 191,3 м.д., карбоксильной группы при 167,3 м.д. и метиленовой группы при 45,9 м.д.

Синтез соединения **2** из 4-этоксикарбонилокси-3-метоксибензойной кислоты (**1**) включает в себя следующие превращения (Рис. 2.10) [214]:

Рис. 2.10. Схема получения соединения **2** из **1**.

На последней стадии получения 3-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-3-оксoproпионовой кислоты, проводили щелочной гидролиз соединения **2** (схема 2.3). Однако при попытке выделить свободную кислоту при последующем подкислении нам удалось выделить с высоким выходом 4-гидрокси-3-метоксиацетофенон. Образование данного продукта вместо соответствующей свободной кислоты объясняется реакцией декарбосилирования. Поэтому в дальнейшем соединение **3** в чистом виде не выделяли.

Схема 2.3



2.2.2. Проведение окислительной сополимеризации для получения модельных гуминовых веществ

Для получения гуминоподобных веществ, синтезированный фенилпропановый мономер (2) подвергли окислительному сочетанию с гидрохиноном (НҚ) в щелочных условиях с большим избытком персульфата калия [188]. Гидрохинон является классическим агентом фенольной поликонденсации, поэтому он был выбран в этой работе для получения гуминоподобных продуктов. Основываясь на литературных данных и результатах, полученных в данной работе, мы предложили реакцию схему, приводящую в выбранных условиях к конечным синтетическим ГВ [216–219].

Благодаря электрофильной природе сульфат-радикала, он атакует преимущественно положения с максимальной электронной плотностью, например, фенолят-анион или атомы ароматических углеродов в орто- и пара-положениях к ОН-группе (Рис. 2.11а). Дальнейший гидролиз сульфата приводит к продукту гидроксирования ароматического кольца (Рис. 2.11б) [217].

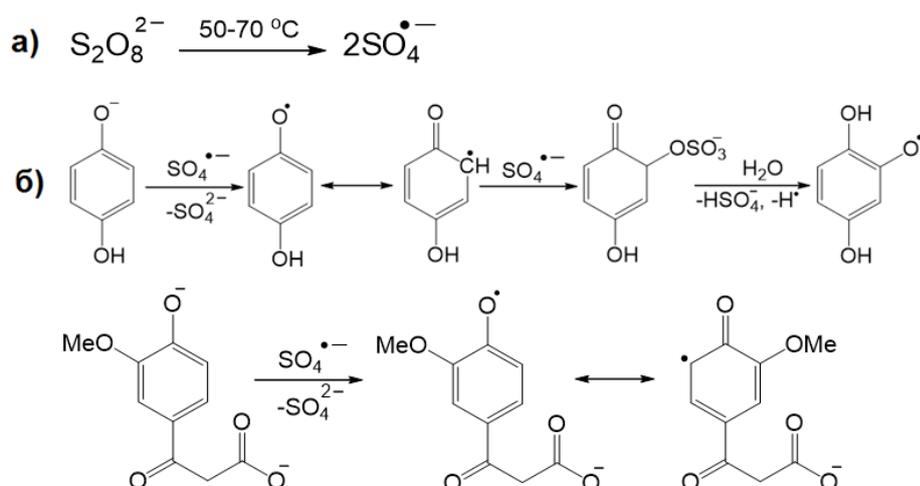


Рис. 2.11. Окисление НҚ и М по реакции Эльбса: а) температурное разложение персульфата калия в щелочной среде; б) образование свободных феноксильных радикалов и их гидроксирование.

Однако в избытке персульфата, окислительное сочетание феноксильных радикалов становится основным направлением реакции, приводя к образованию полимерных гуминоподобных продуктов, соединенных С-О-С (Рис. 2.12а) и С-С (Рис. 2.12б) связями [216]. Окислительное сочетание так же включает рекомбинацию радикалов, что приводит к образованию димеров и олигомеров (Рис. 2.12в).

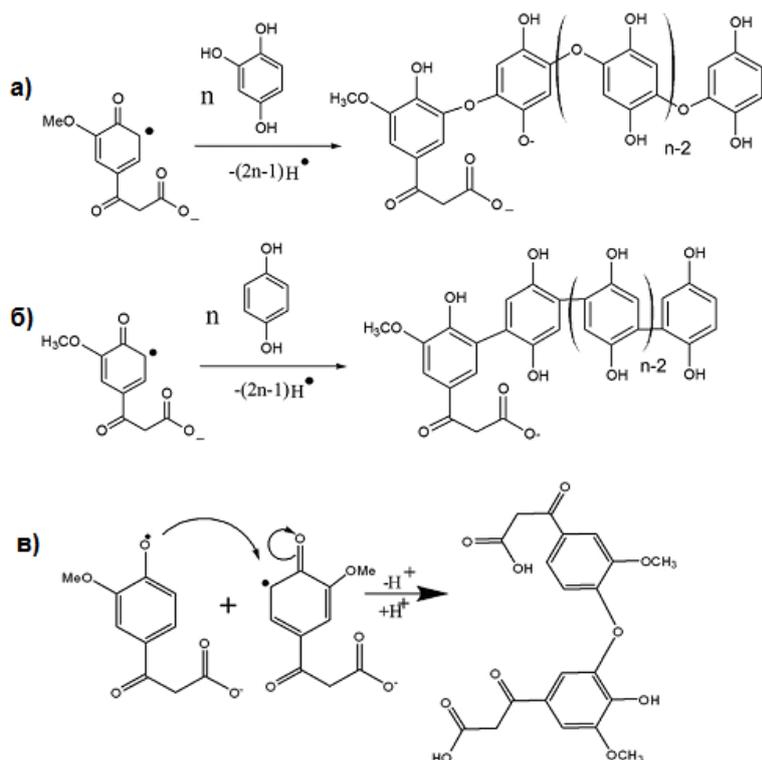


Рис. 2.12. Окислительное сочетание феноксильного радикала, приводящее к образованию гуминоподобных продуктов за счет образования (а) С-О-С связей, (б) С-С связей, (в) рекомбинации радикалов (образование димеров).

Учитывая жесткие окислительные условия, реакция может сопровождаться и раскрытием ароматического кольца, и декарбоксилированием, которые не показаны в силу сложности предсказания их пути. Тем самым получается сложная смесь продуктов реакций. Тем не менее, предложенная схема поликонденсации позволяет предсказать основные структурные мотивы, которые могут присутствовать в гуминоподобных соединениях, синтезированных в данной работе.

Полученную реакционную смесь разделяли на ГК (МНQ-НА)- и ФК (МНQ-ФА)-подобные фракции путем подкисления до pH 2. В результате выделяли осадок ГК-подобных соединений, а твердофазной экстракцией выделяли ФК-подобную фракцию на сорбенте Amberlite XAD-8 [220]. Выход полученных продуктов (180 мг и 730 мг для МНQ-НА и МНQ-ФА, соответственно) указывает на низкую степень полимеризации синтетических ГВ, полученных в данных условиях.

Это может быть связано с коротким временем проведения реакции (1 час). Элементный состав, полученных фракций представлен в Таблице 2.5.

Таблица 2.5. Содержание элементов (% от массы) и атомные отношения для синтетических ГВ.

Образец	%, С	%, Н	%, О	Н/С	О/С
МНQ-НА	67.45	5.16	27.38	0.92	0.30
МНQ-ФА	52.67	4.26	43.07	0.97	0.61

Результаты элементного анализа показывают ароматический характер обоих продуктов с $N/C < 1$, что следует из выбора исходных веществ. Продукт МНQ-НА характеризуется большим вкладом слабоокисленных ароматических соединений по сравнению с МНQ-ФА: $O/C = 0.3$ и 0.61 , соответственно. Такой же тренд наблюдается для пар ГК-ФК природных образцов (Таблица 2.1). Фракция МНQ-ФА имеет атомные отношения близкие к торфяным ФК и речному РОВ, но различное содержание элементов. Элементный состав МНQ-НА так же далек от природных ГК. Полученные различия можно объяснить выбором мономеров, которые не способны к образованию углеводных или насыщенных соединений. Поэтому для адекватного сравнения с природными ГВ необходимо изучить молекулярные компоненты синтетических продуктов.

2.2.3. Изучение молекулярного состава модельных гуминовых веществ методом МС ИЦРПФ

Модельные ГВ, полученные в нашей работе методом окислительной сополимеризации фенолов, были проанализированы методом МС ИЦРПФ ЭР. Зарегистрированные масс-спектры представлены на Рис. 2.13.

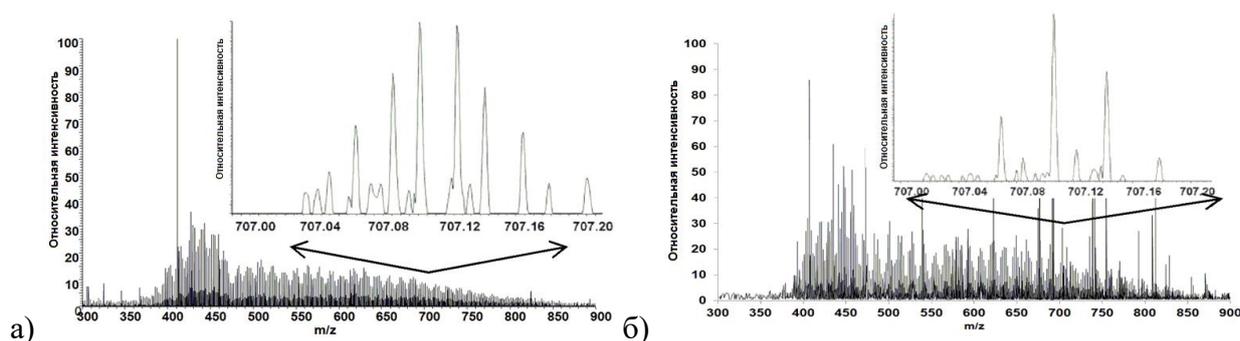


Рис. 2.13. Масс-спектры ИЦРПФ ЭР модельных ГВ, полученных окислительным сочетанием соединения **3** и гидрохинона (HQ): А) МНQ-ФА Б) МНQ-НА [208].

Хорошо видно, что модельные ГВ характеризуются высокой плотностью пиков в диапазоне m/z от 300 до 900 с максимумом при $400 m/z$, что типично и для природных ГВ. Анализ зарядовых состояний показал, что подавляющая часть сигналов представляла собой однозарядные ионы, что так же типично для ГВ [221]. Анализ спектров позволил

идентифицировать 1271 и 989 СНО формул для МНQ-FA и МНQ-НА, соответственно. Полученные данные были нанесены на диаграммы Кендрика, позволяющие провести поиск различных гомологических серий в сложных органических смесях [51, 65, 66]. Диаграммы с основаниями CH_2 , CO_2 и O_2 представлены на Рис. 2.14.

Вид CH_2 -диаграммы Кендрика для обеих фракций (Рис. 2.14А,Б) свидетельствует об отсутствии продленных серий CH_2 -гомологов, в то время как прослеживаются явные диагональные серии, которые соответствуют CO_2 -гомологам. Соответствующая диаграмма с основанием CO_2 (Рис. 2.14В,Г) указывает на обширные серии декарбоксилирования, которое происходит во время реакции в окислительных условиях. Так как при окислительном сочетании фенолов в водной среде могут происходить процессы гидроксילирования [189], мы так же строили диаграмму Кендрика по основанию O . Рис. 2.14(Д,Е) показывает, что O -гомологичные серии являются наиболее характеристичными для обоих образцов.

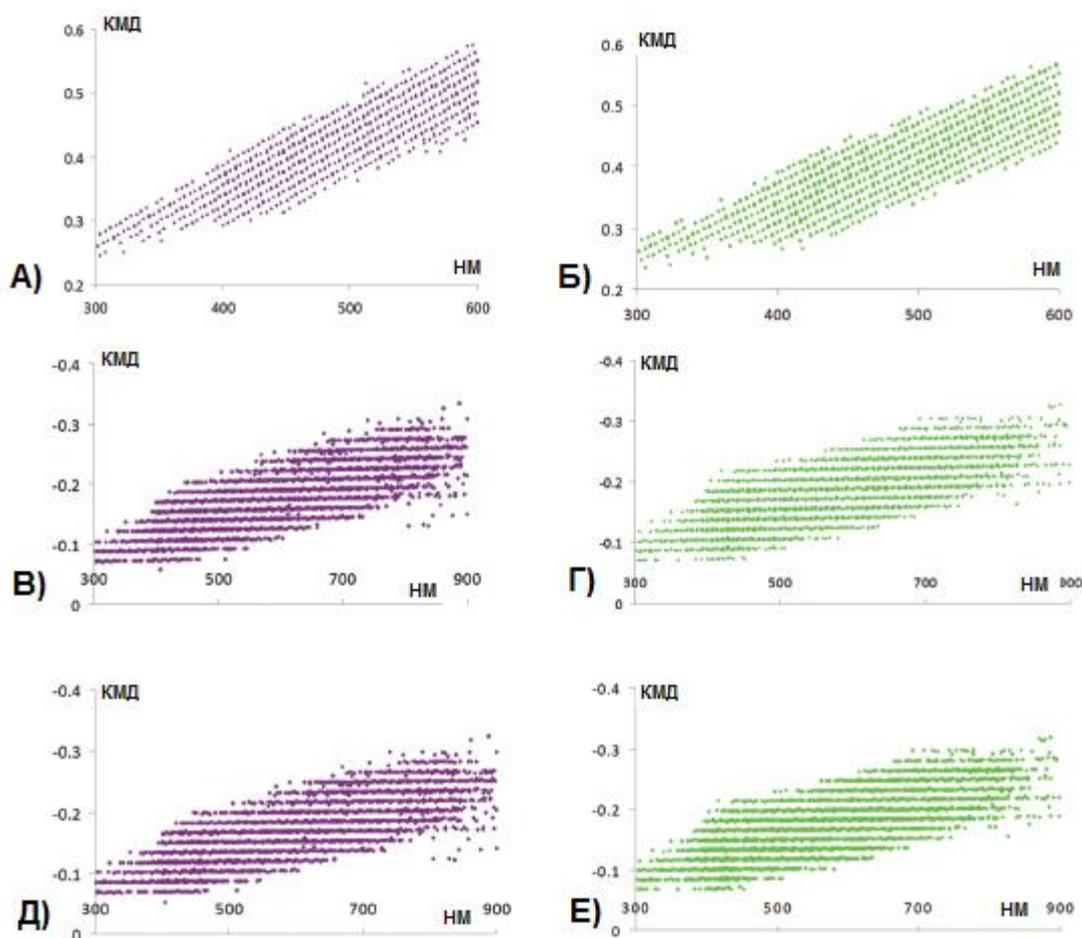


Рис. 2.14. Диаграммы Кендрика по различным основаниям для модельных ГВ: А,Б – CH_2 -диаграмма, В,Г) CO_2 -диаграмма, Д,Е) O -диаграмма. Фиолетовый цвет относится к МНQ-НА, зеленый – к МНQ-FA.

Для визуализации состава молекулярных компонентов, данные МС ИЦР ПФ были так же нанесены на диаграмму Ван Кревелена, показанную на Рис. 2.15. Хорошо видно, что подавляющая часть молекулярных компонентов ГК-подобной фракции лежат в области конденсированных таннинов, в то время как совсем небольшая часть расположена в области лигнинов и гидролизуемых таннинов [3, 4, 222]. Это указывает на высокую гидрофобность выделенной фракции, что согласуется с осаждением МНQ-НА при подкислении до pH 2. С другой стороны, значительная часть компонентов МНQ-ФА располагалась в области лигнинов и полигидроксо- ароматических карбоновых кислот, что объясняет большую гидрофильность данного образца. Увеличение количества точек с высоким отношением O/C, которое наблюдалось для образца МНQ-ФА по сравнению с МНQ-НА, согласуется с самыми широкими сериями гидроксирования на диаграммах Кендрика (Рис. 2.14).

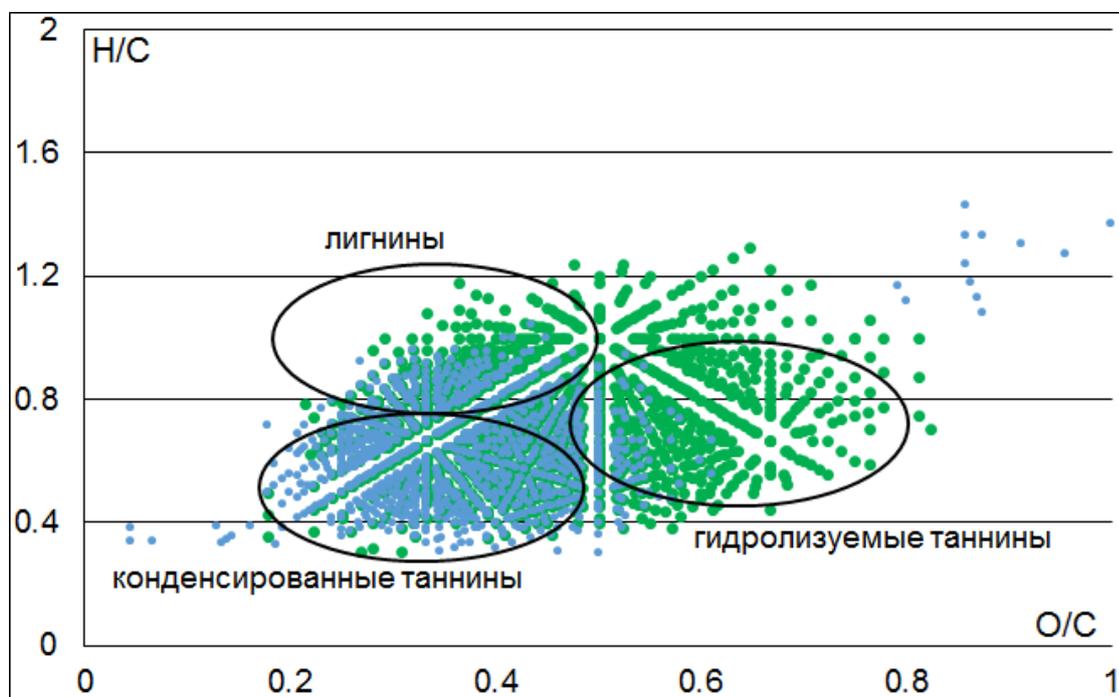


Рис. 2.15. Диаграмма Ван Кревелена модельных ГВ: розовые точки соответствует МНQ-НА и зеленые точки – МНQ-ФА. Кружками отмечены типичные области прекурсоров ГВ: лигнины, конденсированные и гидролизуемые таннины [3, 4, 222].

Для визуализации различий элементного состава синтетических и природных ГВ мы провели сравнение диаграмм Ван Кревелена для МНQ-ФА и ГК-торфа – РНА-Т7 (Рис. 2.16). Молекулярные компоненты МНQ-ФА практически полностью покрывают области, соответствующие таннинам, и частично - область лигнинов. Однако насыщенные соединения с $H/C > 1.2$ (включая углеводы), присутствующие в образце РНА-Т7 в большом разнообразии, отсутствуют в синтетических ГВ. Это согласуется с выбором мономеров для поликонденсации.

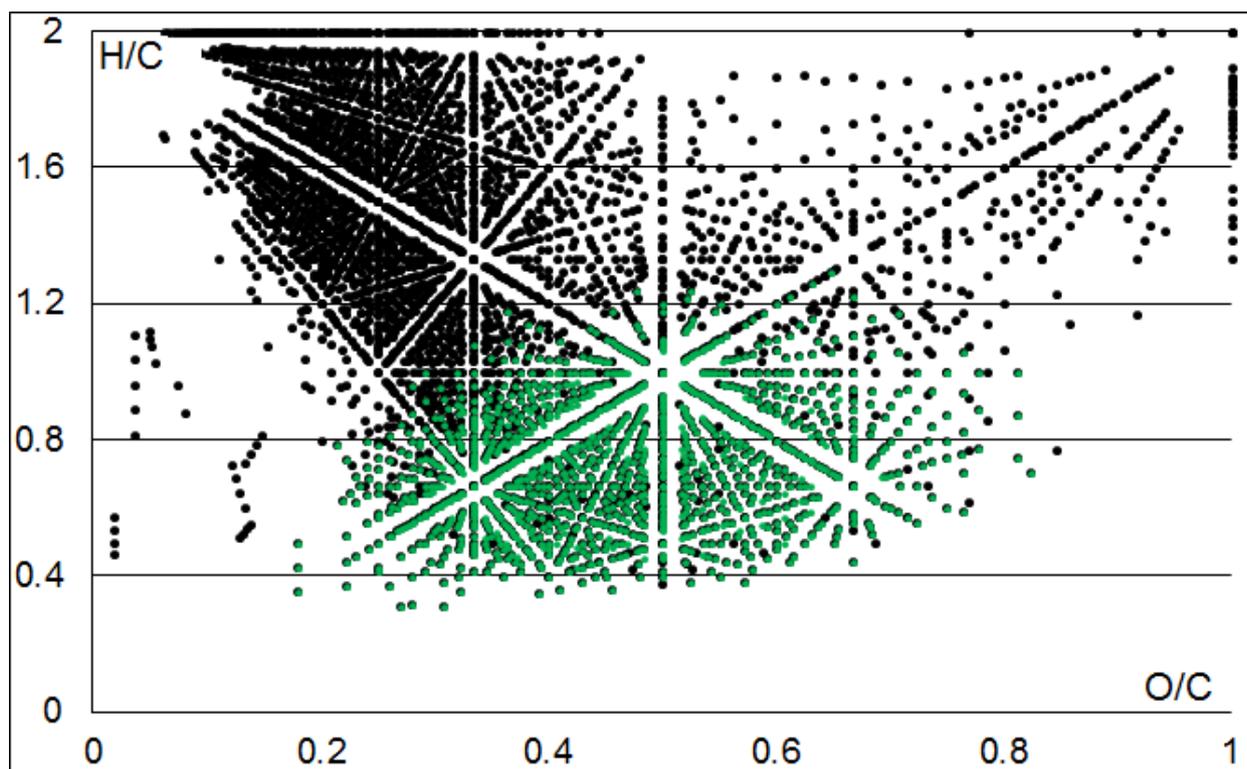


Рис. 2.16. Диаграммы Ван Кревелена для образцов природных торфяных и модельных ГВ, построенные по данным МС ИЦР ПФ. Черными точками отмечен РНА-Т7, зелеными – МНQ-FA.

Для того чтобы оценить, действительно ли синтезированный фенилпропановый фрагмент обеспечивает наличие молекулярных компонентов в области лигнинов на диаграмме Ван Кревелена, были получены синтетические ГВ путем поликонденсации гидрохинона. Реакция проводилась в тех же условиях, что и сочетание с соединением **3**. В результате фракционирования продуктов конденсации были получены ГК-подобный образец НQ-НА и ФК-подобный НQ-FA. Полученные продукты были проанализированы методом МС ИЦР ПФ. Результаты показаны на диаграмме Ван Кревелена с выделенными областями основных прекурсоров ГВ, рассмотренных для МНQ-НА и МНQ-FA (Рис. 2.15). Как и в случае продуктов конденсации лигнинного мономера и гидрохинона, основная часть точек на диаграмме Ван Кревелена для монополимеров гидрохинона попала в область конденсированных танинов и оксикислот. Однако, несмотря на множество побочных реакций, для НQ-НА и НQ-FA не были обнаружены лигниноподобные вещества (Рис. 2.17). Таким образом, можно сделать вывод, что для образования наиболее близких к природным синтетических ГВ необходимо вводить в реакцию мономеры со структурами, отвечающими фрагментам основных предшественников ГВ.

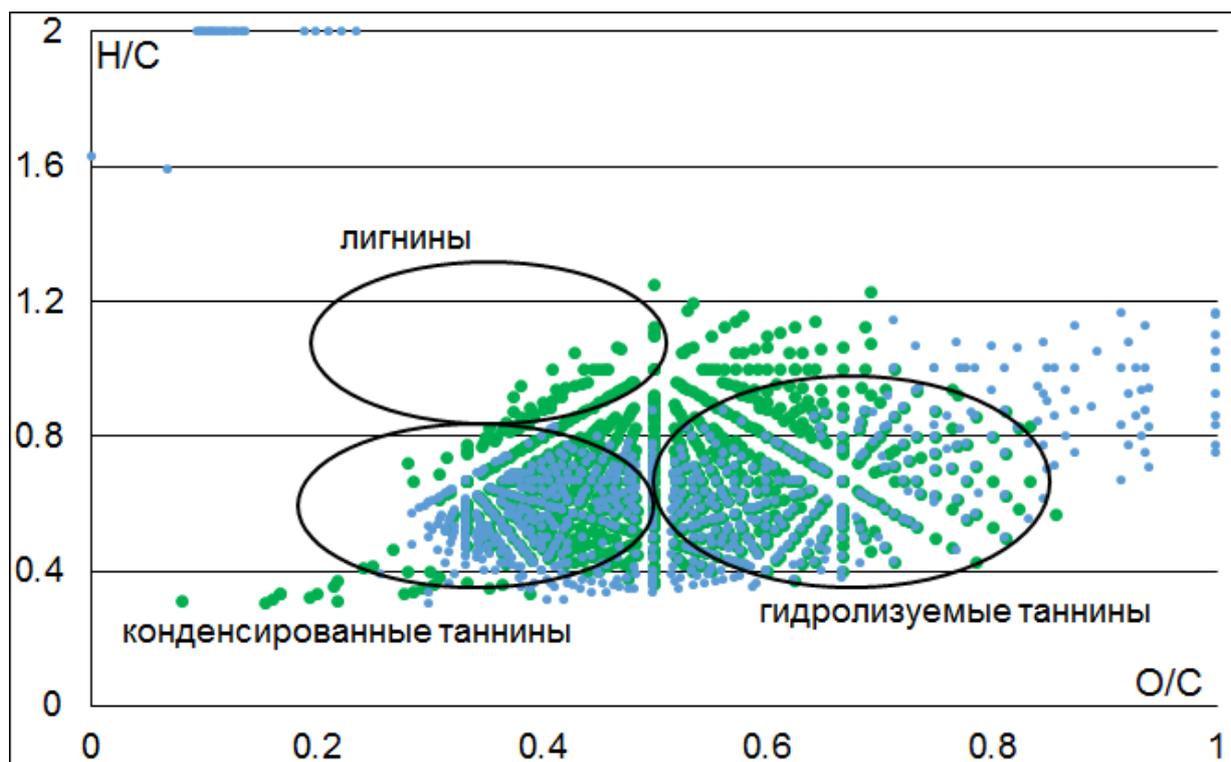


Рис. 2.17. Диаграмма Ван Кревелена модельных ГА: синие точки соответствует HQ-НА и зеленые точки – HQ-ФА. Овалами отмечены типичные области прекурсоров ГА: лигнины, конденсированные и гидролизуемые танины [3, 4, 222].

Для анализа структурных характеристик МНQ-НА и МНQ-ФА, применяли спектроскопию ПМР, которая позволяет идентифицировать различные типы протонов в сложных молекулярных системах [100]. ПМР спектры для обоих образцов (Рис. 2.18) характеризуются наличием широкого сигнала в области ароматических и α -СН протонов, что указывает на полимерную природу образцов. Помимо этого, наблюдались хорошо разрешенные резонансы при следующих хим. сдвигах (м.д.): 3.81 (ОСН₃-группа), 3.83 (С(О)СН₂СООН), 6.93 (протоны терминального фрагмента гидрохинона), 7.5 (ароматические протоны мономера и гидрохинона) и 2.43 (интенсивный синглет, который соответствует α -СН₃ группе).

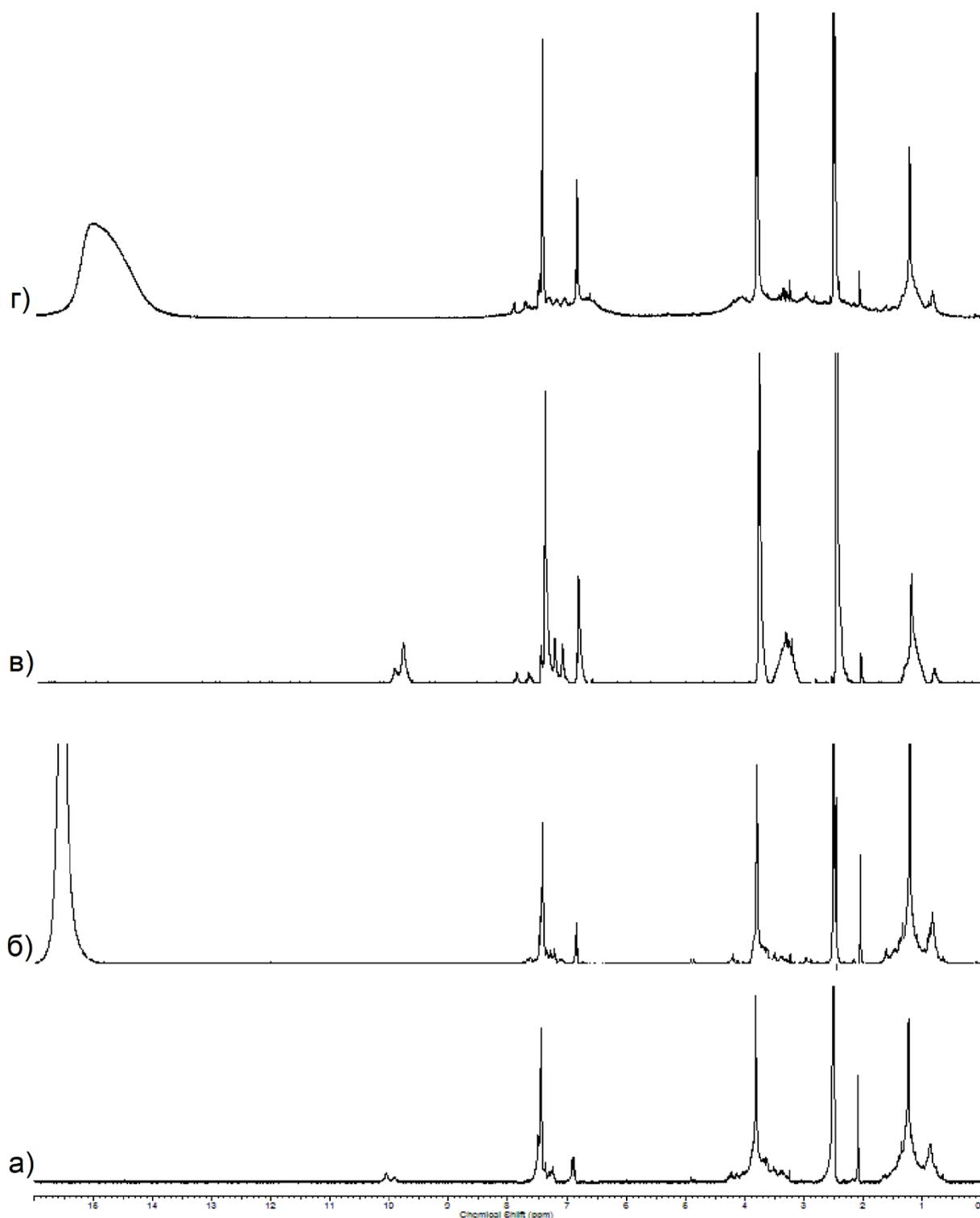
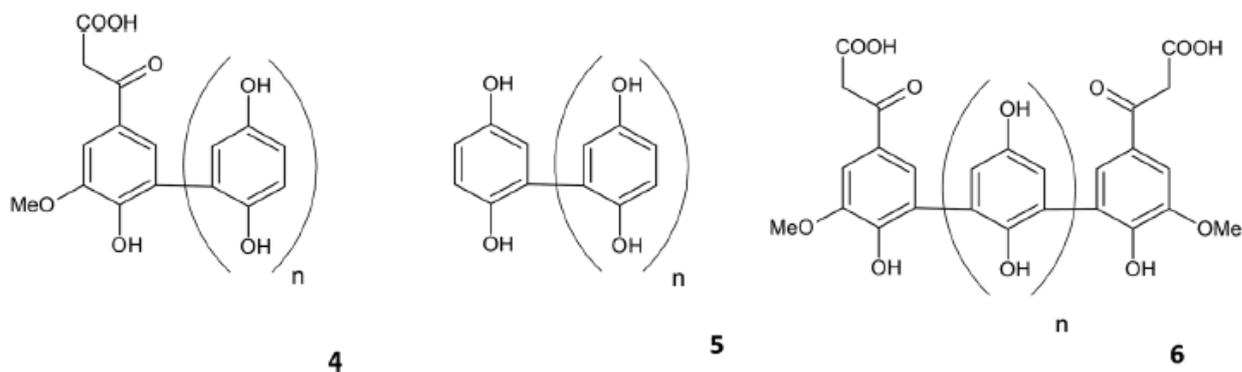


Рис. 2.18. ПМР спектры модельных ГВ, растворенных в ДМСО- d_6 без и с добавлением трифторуксусной кислоты (ТФК): а) МНQ-НА б) МНQ-НА с ТФК в) МНQ-ФА г) МНQ-ФА с ТФК.

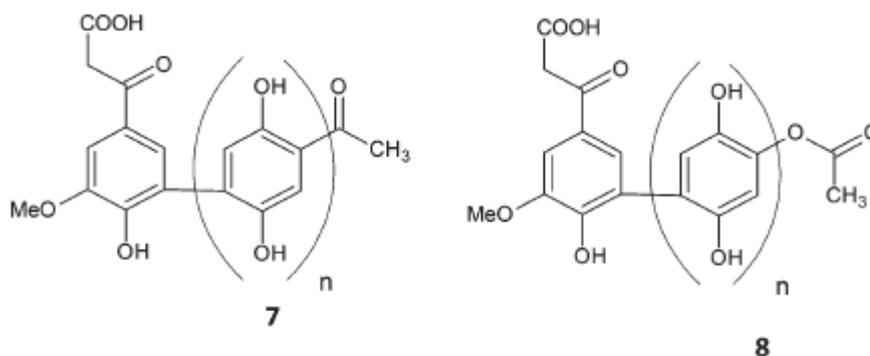
Из полученных данных мы можем заключить, что боковая цепь лигнинного мономера М остается практически нетронутой в ходе реакции (сигнал при 3.93 м.д.). Следовательно, образование полимерной цепочки происходит в основном через сочетание ароматических колец, как показано на Рис. 2.12. Поэтому получающиеся молекулы можно представить следующими структурами (схема 2.4):

Схема 2.4



В то же время, присутствие сигнала α -CH₃-группы предполагает наличие следующих структур (схема 2.5):

Схема 2.5



Можно предположить, что структуры **7,8** образуются в результате процессов декарбосилирования, показанных статистикой масс Кендрика (Рис. 2.14В,Г).

Таким образом, можно заключить, что данные МС ИЦР ПФ и ПМР согласуются с предложенной схемой реакции образования синтетических ГВ. Однако, полученных данных недостаточно для определения структур индивидуальных компонентов синтетических ГВ, что необходимо для подтверждения механизма и более полного описания соединений. Для повышения информативности обоих методов анализа мы применили методы изотопного обмена.

2.2.4. Извлечение структур индивидуальных компонентов модельных гуминовых веществ методом селективного Н/Д обмена, контролируемого МС ИЦР ПФ

Для подтверждения образования структур **4-8**, изображенных выше на схемах 2.4 и 2.5, мы провели реакции Н/Д обмена синтетических ГВ в основной и кислой средах с последующим анализом получаемых продуктов методом МС ИЦР ПФ. Применение такого подхода основывалось на литературных данных о том, что основание катализирует изотопный обмен протонов, расположенных в α -положении к енолизуемым функциональным группам, бензильных группах, орто- и пара-положениях к фенольным группам, в то время как в кислых условиях

обмену подвергаются ароматические протоны в положениях ароматического кольца, которые характеризуются повышенной электронной плотностью [130, 223]. Тем самым появляется возможность различить типы скелетных протонов в одной и той же молекуле. На Рис. 2.19 показана схема предполагаемого обмена.

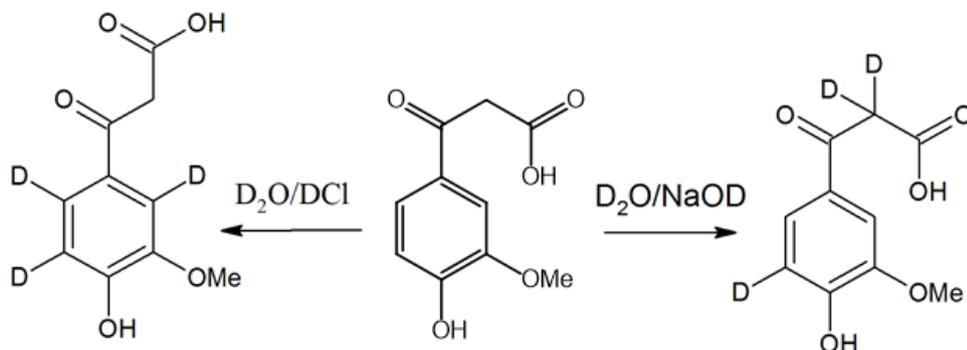


Рис. 2.19. Схемы основного (А) и кислотного (Б) катализа реакции Н/Д обмена [130, 223].

Для выделения продукта реакции применяли твердофазную экстракцию на картриджах PPL [224], как это описано в Экспериментальной части. Процедура Н/Д обмена показана схематически на Рис. 2.20.

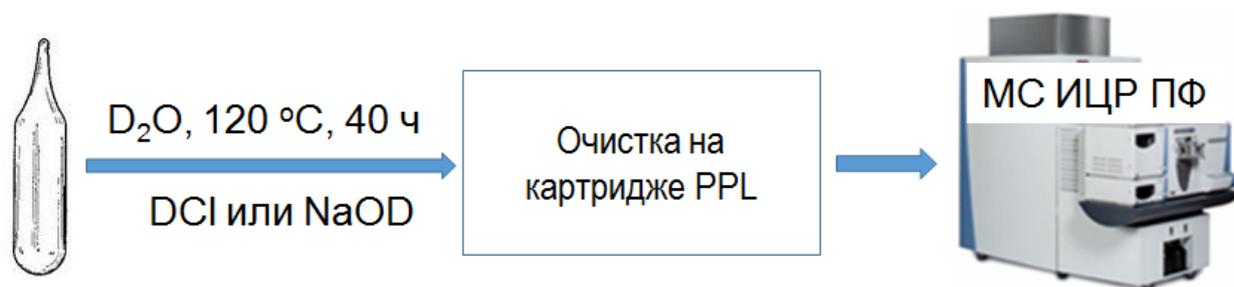


Рис. 2.20. Схема процесса Н/Д обмена синтетических ГВ в запаянной ампуле с последующим анализом МС ИЦР ПФ.

Важным преимуществом очистки препаратов ГВ на картриджах PPL для последующего МС ИЦР ПФ анализа является использование метанола для элюирования органического вещества согласно стандартному протоколу [224]. Более того, в процессе выделения происходит обратный обмен всех подвижных дейтериев на протоны [130], и последующий анализ обменных серий [181] выявляет исключительно количество меченых скелетных С-Н групп. Так как механизм формирования МНQ-НА и МНQ-ФА близок, что следует из спектров ПМР и масс-спектров, Н/Д обмен проводили только для образца МНQ-ФА.

В результате обогащения синтетических ГВ атомами дейтерия значительно меняется вид масс-спектров исходного образца из-за появления новых пиков. Для иллюстрации рассмотрим фрагменты масс-спектров МНQ-ФА и МНQ-ФА-D, полученного дейтерированием в NaOD (Рис. 2.21). Масс-спектр образца состоит из более чем 1500 интенсивных сигналов с нечетным m/z , которые соответствуют СНО-соединениям, и низко интенсивных ^{13}C -изотопных ионов (Рис.

2.21А). После протекания реакции плотность пиков в спектре увеличилась (Рис. 2.21Б), и существенно поменялось распределение масс: за счет замещения протонов с номинальной массой 1 на атомы дейтерия с массой 2, пики с четными значениями m/z стали гораздо интенсивнее (Рис. 2.21Г), что свидетельствует о высокой степени дейтерирования [223, 225].

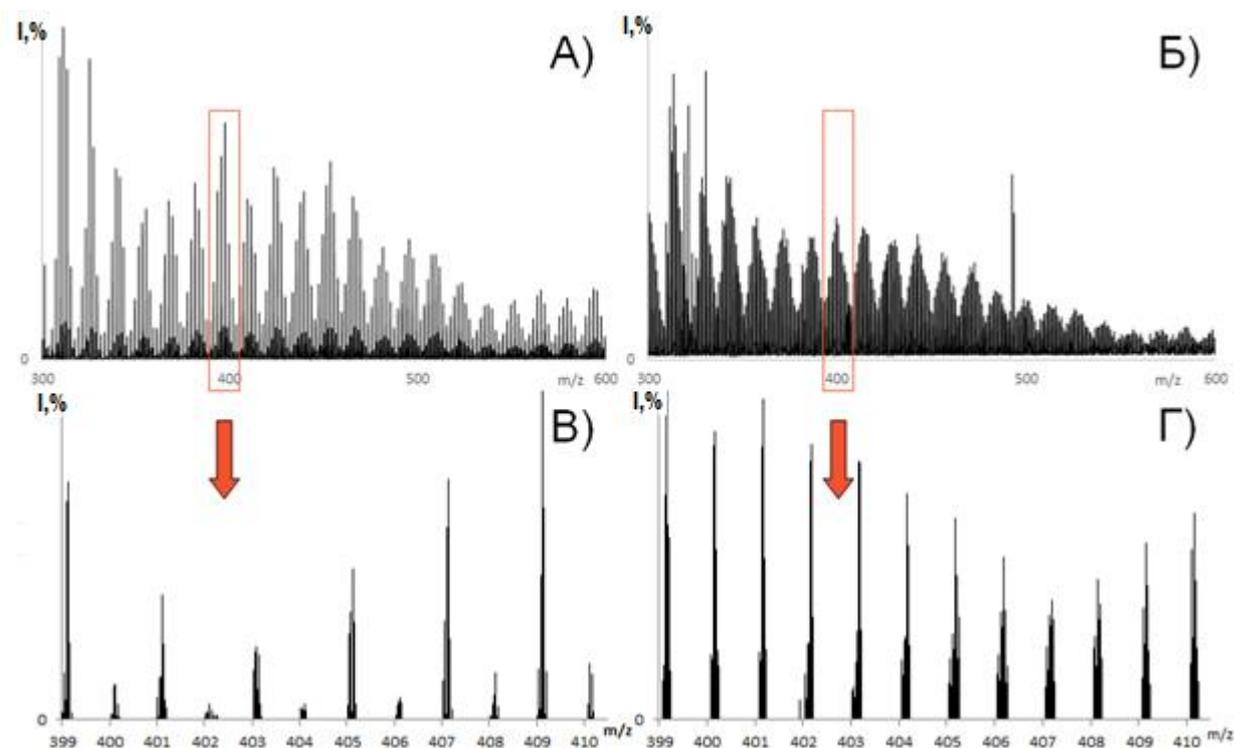
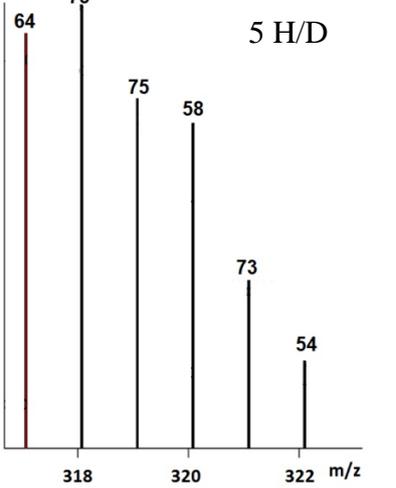
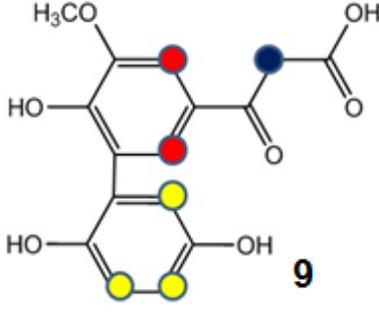
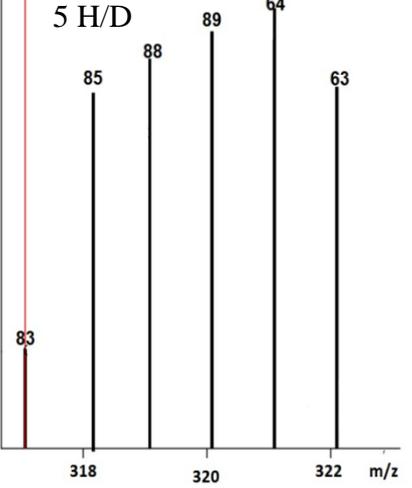
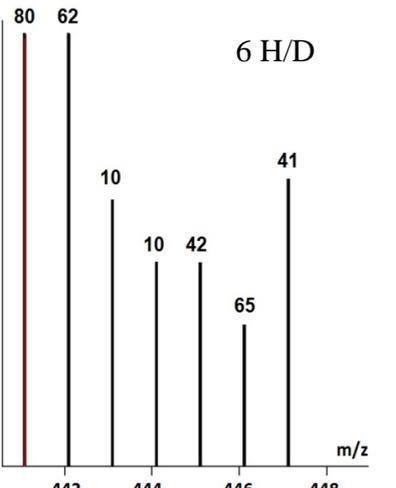
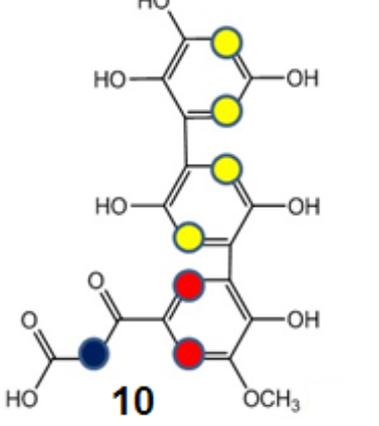
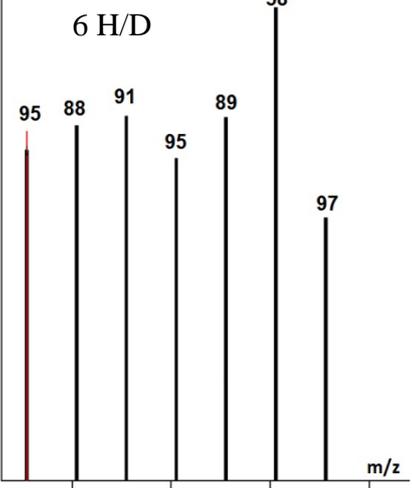


Рис. 2.21. Диапазоны 300-600 m/z в масс-спектрах MNQ-FA (А) и MNQ-FA-D (Б) с выделенным фрагментом 399-410 m/z , показывающим изменение распределения интенсивностей четных и нечетных m/z в образце, меченном дейтерием (Г), по сравнению с исходным (В).

Анализ масс-спектров ИЦР ПФ исходных и D-меченных синтетических ГВ позволил провести расчет длины серий Н/D обмена, как это описано в Экспериментальной части: пики в масс-спектре меченого образца, отличающиеся от материнского иона и друг от друга на $\Delta m/z=1.00628$ составляют обменные серии, длина которых равна количеству обмениваемых в выбранных условиях протонов.

Опираясь на известную информацию о селективности обмена в разных условиях, можно отличить структурные изомеры. Мы применили этот подход для определения структур, предложенных по результатам ПМР-спектроскопии. На первой стадии проводили поиск молекулярных составов, соответствующих структурам 4-8 (схемы 2.4 и 2.5) с количеством мономеров в продуктах реакции (n) от 1 до 2. Найденные молекулы и фрагменты масс-спектров, соответствующие сериям Н/D обменов в DCl и NaOD, показаны в Таблице 2.6.

Таблица 2.6. Извлеченные фрагменты масс-спектров ИЦР ПФ, соответствующие сериям Н/D обмена для пяти найденных молекулярных формул и предложенные для них структуры* [208].

Извлеченные спектры Н/D обмена в DCI	Установленные структуры*	Извлеченные спектры Н/D обмена в NaOD
 <p>5 H/D</p>	<p>$C_{16}H_{14}O_7$ ($m/z = 317.06601$)</p>  <p>9</p>	 <p>5 H/D</p>
 <p>6 H/D</p>	<p>$C_{22}H_{18}O_{10}$ ($m/z = 441.08206$)</p>  <p>10</p>	 <p>6 H/D</p>

<p>5 H/D</p>	<p>C₁₆H₁₄O₈ (m/z = 333.06093)</p> <p>11</p>	<p>5 H/D</p>
<p>5 H/D</p>	<p>C₂₀H₁₈O₁₀ (m/z = 417.08206)</p> <p>12</p>	<p>4 H/D</p>
<p>5 H/D</p>	<p>C₁₈H₁₈O₈ (m/z = 361.09223)</p> <p>13</p>	<p>7 H/D</p>

*Синие, и красные точки обозначают положения скелета, доступные для селективного обмена в условиях кислотного и основного катализа, соответственно. Желтые точки обозначают центры обмена в обоих условиях. Значения над выделенными пиками обозначают ошибку определения, умноженную на 10^5 .

Найденные структуры **9-13** соответствуют молекулярным формулам $C_{16}H_{14}O_7$, $C_{22}H_{18}O_{10}$, $C_{16}H_{14}O_8$, $C_{20}H_{18}O_{10}$, and $C_{18}H_{18}O_8$, соответственно. Соединение **9** является результатом рекомбинации радикалов M и HQ, соединения **10** и **11** представляют собой гидроксिलированные изомеры структуры **4** с $n = 1$ и 2 , соответственно. Вещество **12** является димером 3-(4-окси-3-метоксифенил)-3-оксипропионовой кислоты, которая была использована в качестве фенилпропаноидного мономера (M). Соединение **13** представляет собой ацилированный изомер структуры **7** с $n=1$. Найденные структуры хорошо соотносятся со схемой реакции, показанной на Рис. 2.12 (б,в) для соединения **12**, за исключением образования ацилированного продукта. Для объяснения образования соединения **13**, мы предположили раскрытие в окислительных условиях ароматического кольца мономера M с последующей потерей карбоксильной группы α -кето-кислотой, что приводит к образованию нестабильного ацил-карбаниона [226]. Карбанион может легко окисляться персульфатом калия до ацил-радикала, который рекомбинирует с семихинонным радикалом. Образованный 1-(2,5-дигидроксифенил)этанон может присоединяться к M по реакции образования фенольного радикала, как показано на Рис. 2.12. Общая схема реакции получения соединения **13** показана на Рис. 2.22.

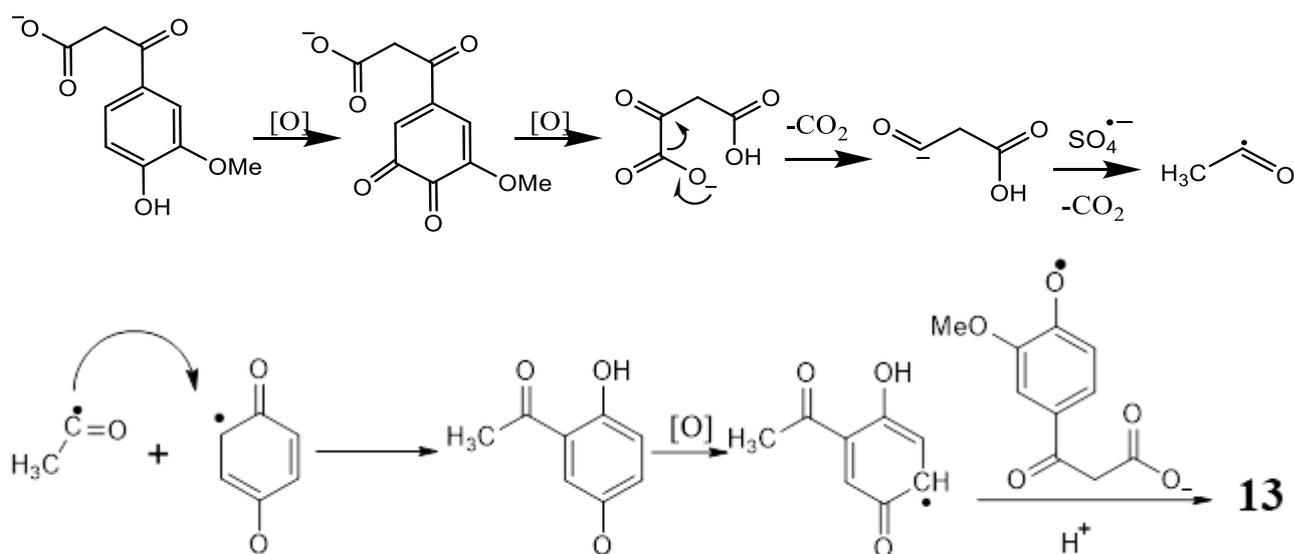


Рис. 2.22. Предполагаемая схема образования ацилированного соединения **13** [208].

Таким образом, разработанный метод H/D обмена скелетных протонов синтетических ГВ в DCI и NaOD показывает, что введение изотопных меток в комбинации с МС ИЦР ПФ позволяет идентифицировать конкретные структурные формулы индивидуальных нкомпонентов в составе сложных смесей. Проведенная идентификация стала возможна благодаря использованию известных мономеров и механизма формирования модельных ГВ.

2.3. Применение дейтериевого обмена для извлечения структурной информации из масс-спектров ИЦР ПФ гуминовых веществ.

2.3.1. Исследование устойчивости меченных дейтерием соединений при ионизации электрораспылением

Для правильной интерпретации данных по количеству H/D обменов компонентами ГВ методом МС ИЦР ПФ, необходимо было выяснить влияние условий ионизации на возможные реакции обратного обмена. Для этой цели был проведен H/D обмен в источнике ионизации для целого ряда модельных гидроксibenзойных и аминокислот в воде и метаноле при разных температурах осушительного капилляра. Список исследуемых соединений и результаты H/D обмена при обычной (200 °C) и повышенной (400 °C) температуре осушительного капилляра представлены в Таблица 2.7. Модельные соединения призваны были представлять компоненты ГВ различного происхождения [227].

Таблица 2.7. Количество H/D обменов в модельных соединениях при взаимодействии с D₂O при нормальной (200 °C) и высокой (400 °C) температуре осушающего капилляра.

Ионизируемая молекула	Кол-во подвижных атомов Н в анионе или катионе*	Макс. Кол-во H/D обменов при 200 °C	Макс. Кол-во H/D обменов при 400 °C**
2,4-ОН[С ₆ Н ₃]СООН (14)	2	2	4
2,5- ОН[С ₆ Н ₃]СООН (15)	2	2	2
2,3- ОН[С ₆ Н ₃]СООН (16)	2	2	3
3,4,5-ОН[С ₆ Н ₂]СООН (17)	3	3	5
4-ОН[С ₆ Н ₄]СН ₂ СН(Н ₂)СООН (18)	3	3	3
3,4-ОН[С ₆ Н ₃]СН ₂ СН(Н ₂)СООН (19)	4 or 6*	4 or 6*	7 or 9*
3,4-ОН[С ₆ Н ₃]СН ₂ СН ₂ Н ₂ (20)	5*	5*	8*
2-ОН,5-СН ₃ СО[С ₆ Н ₃]СООН (21)	1	1	4
2,2-С ₆ Н ₅ [СН]СООН (22)	0	0	1

* катионы в режиме положительных ионов; ** смесь вода-метанол (1:1 V/V) использована в качестве растворителя

Так как карбоксильная группа обладает сильным –M эффектом, мы включили в модельный ряд соединения с карбоксильной группой в кольце (14-17) и аминокислоты с СООН-

группой в боковой цепи (**18**, **19**). Для сравнения были включены ароматический амин без карбоксильной группы (**20**), 5-ацетил-салициловая и 2,2-дифенил-уксусная кислоты (**21** и **22**, соответственно). Выбранные модельные соединения включали в себя широкий набор структурных фрагментов, что было необходимо для установления взаимосвязи между структурой и свойствами молекул.

Как видно из Таблицы 2.7 при температуре капилляра 200⁰С количество изотопных обменов соответствовало максимальному теоретическому количеству подвижных протонов, присутствующих в составе анионов и катионов исследуемых соединений. Однако при нагреве до 400⁰С наблюдалась совсем иное поведение модельных соединений.

На Рис. 2.23 показаны масс-спектры обменных Н/Д серий для трех изомерных дигидроксibenзойных кислот (ДГБ).

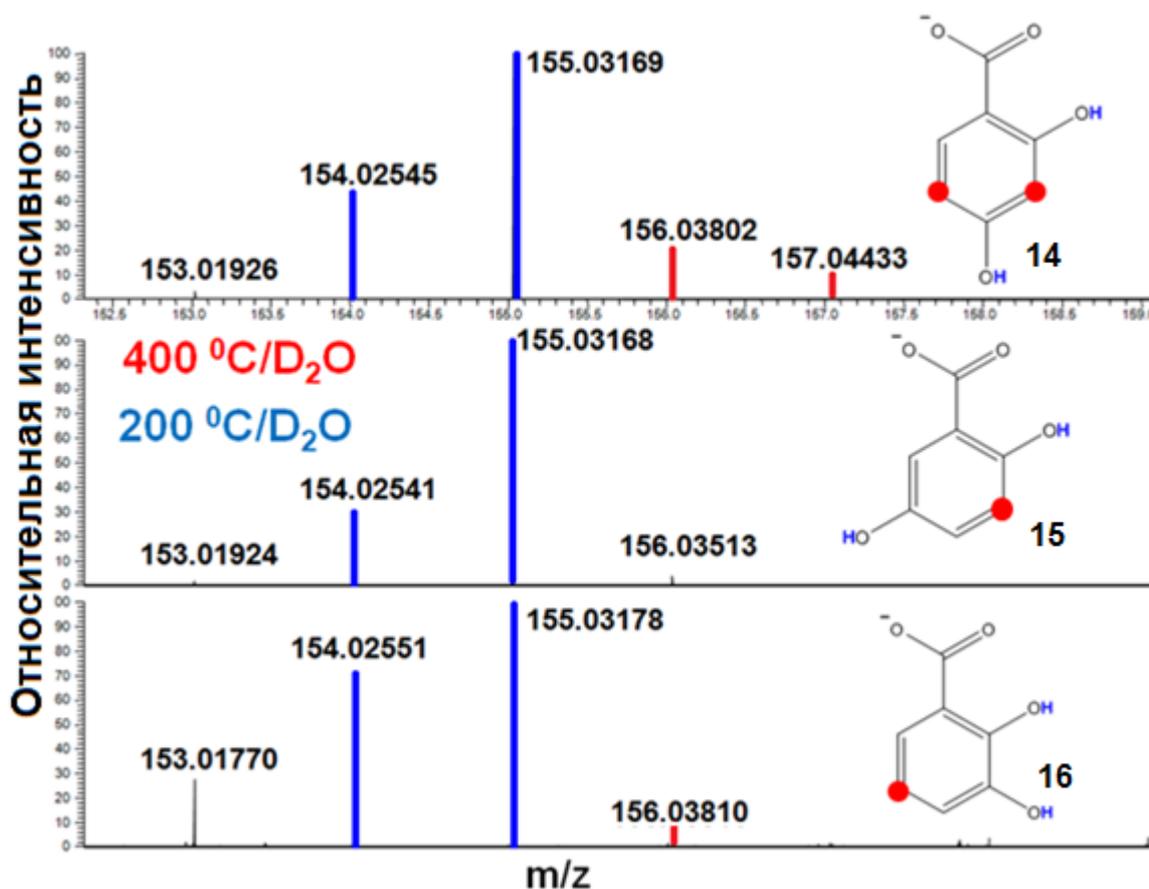


Рис. 2.23. Серии Н/Д обмена для 2,4-ДГБ, 2,5- ДГБ и 2,3- ДГБ при 200 °С (синие линии) и 400 °С (дополнительные пики окрашены красным). Красные точки в структурных формулах обозначают возможные центры дейтерирования согласно кето-енольной таутомерии и мезомерному эффекту заместителей в ароматическом кольце.

При 200⁰С длина изотопных серий равнялась двум, что соответствовало количеству подвижных протонов (выделены синим цветом на масс-спектрах и в формулах). При 400⁰С спектр не изменился для соединения **15**, но появились 1 и 2 дополнительных пика для соединений

16 и **14**, соответственно (выделены красным цветом). Мы предположили, что дополнительные пики при увеличении температуры капилляра могут соответствовать Н/D обмену активных центров в ароматическом кольце, появляющихся в результате кето-енольной таутомерии (отмечены красным на Рис. 2.23). Это положения 3,5 для 2,4-ДГБ (**14**), 3 для 2,5-ДГБ (**15**) и 5 для 2,3-ДГБ (**16**). Положения выбраны сообразно +M эффекту гидроксильных групп и нейтральному эффекту COOH-групп, находящихся в мета-положении к заместителю. Однако, в случае 2,5-ДГБ (**15**) мы не обнаружили дополнительных обменов при повышенной температуре капилляра, в то время как значительные интенсивности дополнительных пиков наблюдались для 2,3-ДГБ и 2,4-ДГБ.

Для объяснения данных различий, мы учли потерю протона кето-формой фенолов из-за присутствия основания, образующегося из растворителя в источнике ионизации при электрораспылении [228]. Получающиеся карбанионные интермедиаты подвергаются Н/D обмену. В отсутствие основания отрыв протона является лимитирующей стадией реакции [138, 229], и во временном масштабе МС-анализа значительно влияет на результаты. Для увеличения концентрации ОН-анионов в реакционной смеси, направленного на ускорение отрыва протона, мы использовали 10% раствор NH₃ в D₂O. Мы провели Н/D обмен пирогалловой кислоты в отсутствие и с добавлением аммиака. Полученные масс-спектры представлены на Рис. 2.24.

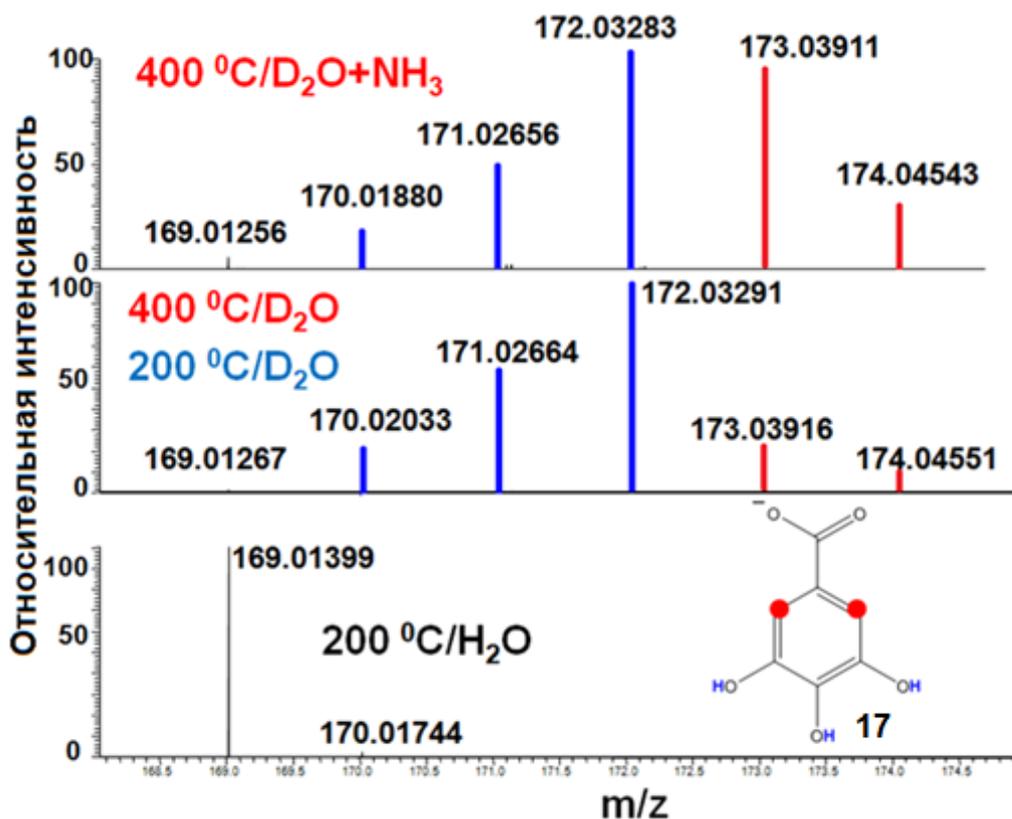


Рис. 2.24. Серии Н/D обмена галловой кислоты (**17**) в отсутствие и с добавлением аммиака. Пики, соответствующие подвижным и скелетным дейтериям, отмечены синим и красным цветами. Красные точки в структурных формулах обозначают возможные центры дейтерирования.

В выбранных условиях при 200 °С обменялись все подвижные протоны пирогалловой кислоты. Увеличение температуры привело к обмену двух дополнительных атомов дейтерия, что указывает на H/D обмен во все C-H положения ароматического кольца. Более того, добавление NH₃ к D₂O значительно увеличило количество обменов в C-H положения при повышенной температуре. Мы предположили, что добавление основания катализирует реакцию изотопного обмена подобно реакциям в растворе, катализируемым основаниями.

Для оценки влияния карбоксильного заместителя, являющегося сильным акцептором электронов, на H/D обмен в ароматическом кольце, мы провели мечение тирозина (**18**) и 3,4-диоксифенилаланина (ДОФА) (**19**). Основное структурное отличие между **18** и **19** заключается в одной и двух гидроксильных группах в ароматическом кольце, соответственно. Рис. 2.25(а) показывает 3 и 4 обмена относящихся к подвижным протонам в случае тирозина и ДОФА. При повышенной температуре наблюдались значительные отличия в обменных сериях соединений **18** и **19**: только ДОФА подвергался дополнительным 3-м обменам при 400 °С.

Как и в случае с 2,3-ДГБ, ДОФА вступал в реакции изотопного обмена скелетных протонов в отличие от тирозина, который не содержит двух близко расположенных гидроксильных групп. В то же время, ни одна из ДГБ не давала 3-х обменов при повышенной температуре. Это можно объяснить –M эффектом карбоксильной группы, который отсутствует в случае соединения **19**.

Для выяснения того, влияет ли режим электрораспыления на H/D обмен, мы провели эксперименты по H/D обмену с ДОФА (**19**) и дофамином (**20**) в режиме положительных ионов. Полученные масс-спектры представлены на Рис. 2.25(б). Мы наблюдали 6 и 5 H/D обменов для ДОФА и дофамина, соответственно, при 200°С (синие линии), которые соответствовали количеству подвижных протонов, но при 400°С оба соединения подверглись 3-м дополнительным обменам (красные линии). При этом интенсивность дополнительных пиков была значительно меньше, чем в режиме отрицательных ионов. Для объяснения данного явления мы предположили, что в режиме положительных ионов H/D обмен в источнике ионизации протекает по механизму электрофильного замещения. Это связано с тем, что в режиме положительных ионов заряд создается H₃O⁺-ионами, которые обладают низкой каталитической активностью для инициации H/D обмена в ароматическом кольце [130], но этот момент компенсируется за счет больших скоростей реакций в заряженных микрокаплях [230].

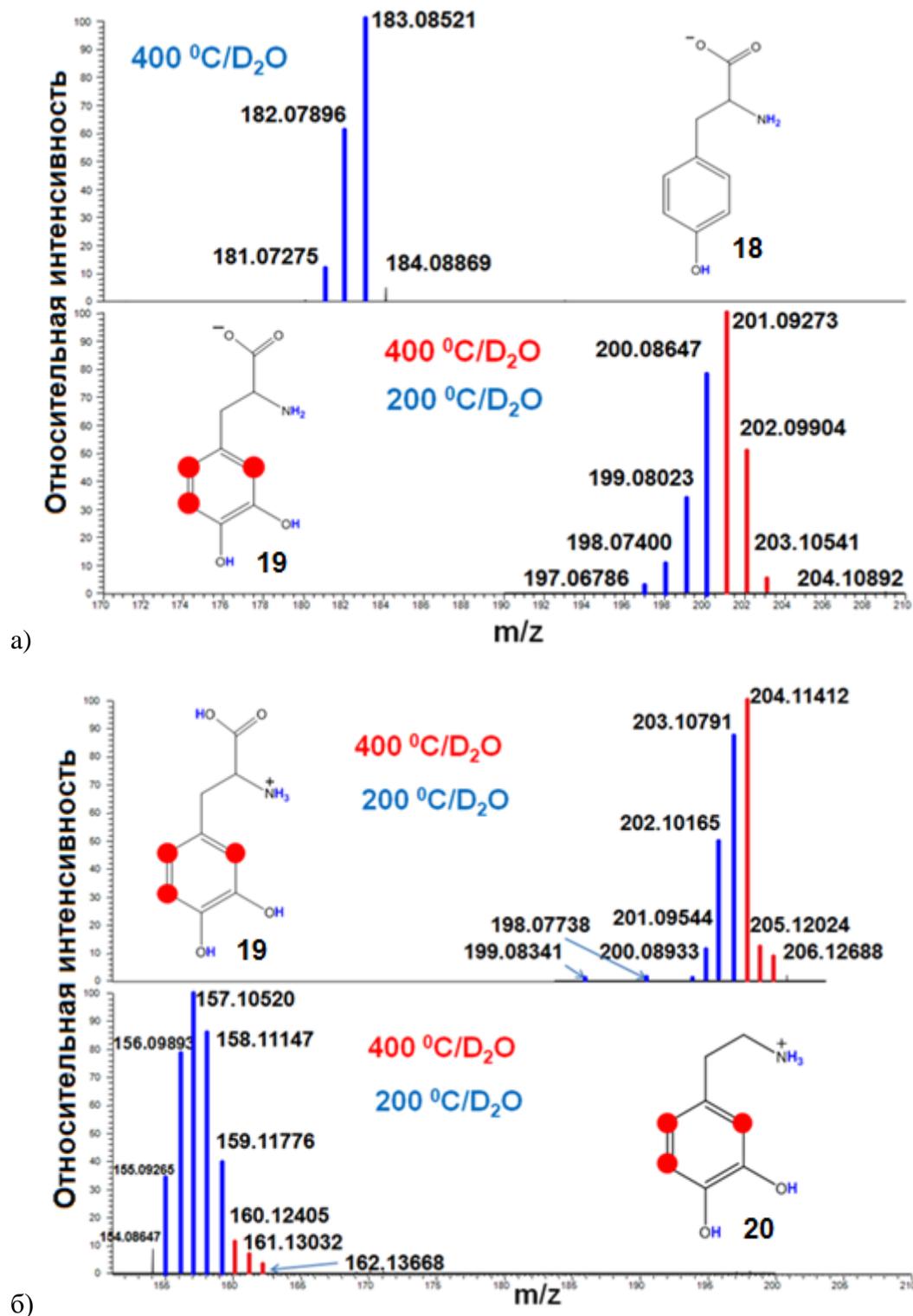


Рис. 2.25. Серии Н/Д обмена при 400 °С для тирозина (**18**) и дигидроксифенилаланина (ДОФА) (**19**) в режиме отрицательных ионов (а), и для ДОФА (**19**) и дофамина (**20**) в режиме положительных ионов (б). Пики, относящиеся к подвижным и скелетным дейтериям, отмечены синим и красным цветом, соответственно.

Обобщая полученные результаты, можно сделать вывод о значительном вкладе кето-енольной таутомерии в Н/Д обмен скелетных протонов при повышенной температуре. Это

указывает на то, что в условиях насыщения испарительной камеры масс-спектрометра парами дейтерированной воды реакции обмена проходят скорее в заряженных микрокаплях, чем в газовой фазе, как предполагали ранее [176]. В зависимости от режима распыления – отрицательных или положительных ионов – данные капли содержат ионы H^+ или OH^- , соответственно [231, 232]. Наличие данных ионов может катализировать обмен скелетных протонов по аналогии с такими реакциями в растворах, как электрофильное замещение и кето-енольная таутомерия [130]. Более того, было показано, что нагрев осушительного капилляра может вызвать обмен ароматических протонов 2-нитро-флюороглюцина [233]. Это стало возможным благодаря дизайну эксперимента, когда атмосфера между источником ЭР и осушающим капилляром насыщена парами D_2O . В этом случае нагрев капилляра в присутствии основания приводит к диссоциации ДГБ по второй ступени с образованием феноксильного аниона. Это объясняется значительной температурной зависимостью диссоциации гидроксильных групп, что существенно отличает ее от карбоксильной: фенолы обладают значениями dpK_a/dT от -0.1 до -0.2 единиц на 10 K [234]. В результате, амбидентатный феноксил анион образует карбокатионы в орто- и пара-положениях. [235] Эти положения могут подвергаться H/D обмену по механизму «реле», предложенному Ганом и Энке [236] для газофазных H/D обменов ароматических соединений. Механизм «реле» заключается в образовании промежуточного шестичленного кольца между положением с локализованным отрицательным зарядом в ароматическом кольце и D_2O с переносом заряда на соседний центр [236]. Возможен и другой механизм H/D обмена скелетных протонов в газовой фазе: межмолекулярный пренос дейтерия, предложенный для аниона, образованного при электрораспылении [237, 238]. Механизм основан на термохимическом расчете, проведенном Тианом [238] для объяснения дополнительных H/D обменов, обнаруженных для ароматических атомов водорода, расположенных между двумя карбоксильными группами. Это объяснялось образованием водородных связей с дейтерированным растворителем, который стабилизировал арил-анион. На последней стадии происходил межмолекулярный перенос D на положение с локализованным отрицательным зарядом.

Необходимо отметить, что оба механизма, «реле» и «D-перенос», не объясняют результаты H/D обмена, полученные в нашей работе. Согласно механизму D-переноса нам стоило ожидать 0 скелетных обменов для 2,3-ДГБ, 1 - для 2,4-ДГБ и 1 интенсивный обмен - для 2,5-ДГБ, которая содержит ароматический протон между карбоксильной и гидроксильной группами. Однако результаты экспериментов не соответствуют такому предположению: 1, 2 и 0 для 2,3-ДГБ, 2,4-ДГБ и 2,5-ДГБ, соответственно. Это может служить подтверждением того, что реакция проходит скорее в заряженных каплях, нежели чем в газовой фазе в вакуумной части масс-спектрометра. На самом деле, при реакции в газовой фазе состав изначального растворителя

не должен влиять на результаты реакции, которая протекает между D_2O и веществом. Однако, проведение эксперимента с использованием чистого метанола в качестве растворителя, не привело к дополнительным обменам. Более того, известно, что ионизация гидроксibenзойной кислоты из метанола протекает по фенольной группе [239]. В случае газофазной реакции это приводило бы к образованию интермедиата, благоприятного для механизма D-переноса, который не был подтвержден экспериментом. Разница в результатах H/D обмена в случае смеси вода-метанол и чистого метанола может быть объяснена составом микрокапель – только при добавлении воды в смеси образуются OH-анионы [240], катализирующие реакцию. Это подчеркивает особую важность присутствия основания при проведении H/D обмена и указывает на прохождения реакции в заряженных микрокаплях, а не в газовой фазе, как это показано на Рис. 2.26 [231, 232].

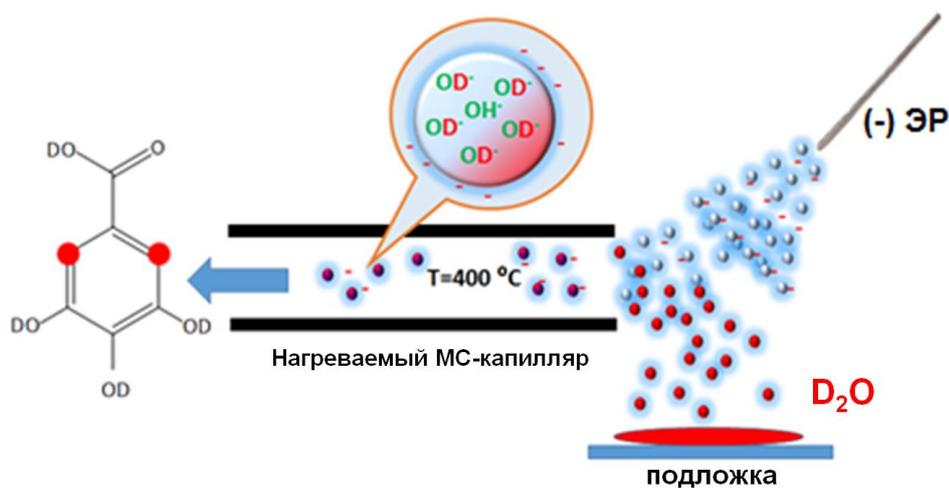


Рис. 2.26. Дизайн эксперимента по H/D обмену в источнике ионизации масс-спектрометра на примере галловой кислоты. Заряженные капли, содержащие гидроксилы, образуются в источнике ЭР; проходят через область, насыщенную D_2O , попадают в нагреваемый капилляр и испаряются, образуя газофазные ионы. В течение этого процесса капли взаимодействуют с D_2O и обменивают протоны на дейтерий.

В результате интерпретации полученных результатов, мы предложили механизм H/D обмена с учетом кето-енольной таутомерии в заряженных каплях при повышенной температуре на примере ДГБ (Рис. 2.27). В случае 2,4-ДГБ карбанион в обеих резонансных формах сопряжен с карбоксильной группой, в то время как для 2,3-ДГБ сопряжена одна форма и нет сопряжения для 2,5-ДГБ. Тем самым таутомерная форма 2,4-ДГБ относительно стабилизирована, что приводит к значительной степени дейтерирования обоих C-H положений при 400 °C. Возможный механизм представлен на Рис. 2.27(A). Высокая температура капилляра приводит к диссоциации фенола, последующей кето-енольной таутомерии феноксильного аниона и дейтерированию карбаниона молекулой D_2O , ориентированной карбонильным кислородом. Последующий отрыв

протона приводит к образованию стабильной меченой ароматической структуры. Пути Н/Д обмена для 2,3-ДГБ и 2,5-ДГБ показаны на Рис. 2.27(Б,В), соответственно.

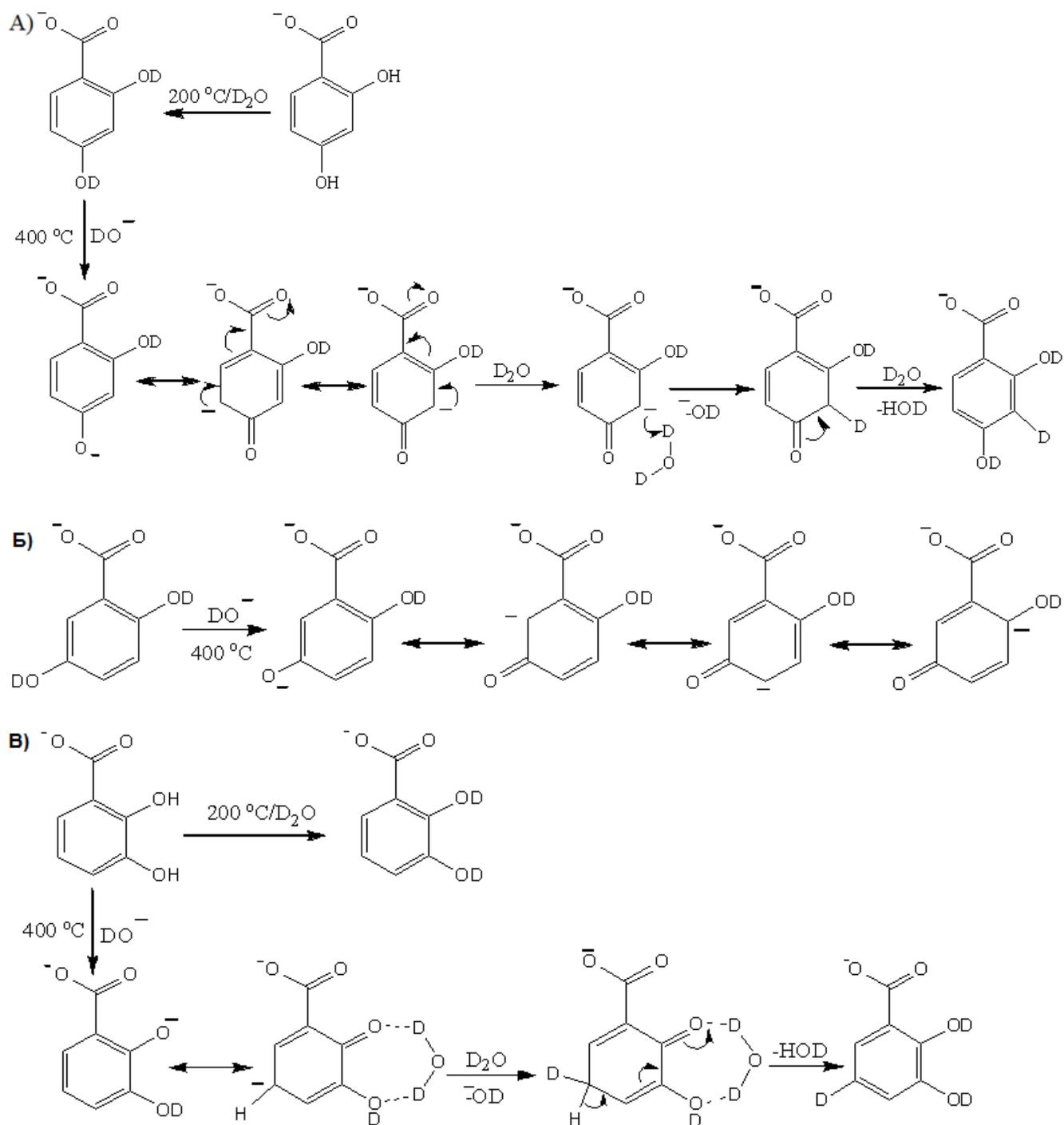


Рис. 2.27. Механизм реакции Н/Д обмена ароматических протонов в заряженных микрокаплях в атмосфере D_2O при повышенной температуре осушающего капилляра ($400^\circ C$), облегчающей протекание кето-енольной трансформации дигидроксibenзойных кислот (ДГБ) в режиме отрицательных ионов: А) 2,4-ДГБ, Б) 2,5-ДГБ, В) 2,3-ДГБ. (Обмен второго ароматического протона в 2,4-ДГБ (А) реализуется через первую резонансную структуру) [241].

Хотя эти изомеры имеют сходный характер замещения, 2,3-ДГБ подвергается 3 Н/D обменам, в то время как 2,5-ДГБ только двум. Это указывает на один дополнительный обмен в случае 2,3-ДГБ. Обмен ароматического протона может являться результатом стабилизации короткоживущего кетона водородной связью между двумя соседними группами согласно «реле» механизму [242]. Подобная стабилизации не выполнима в случае 2,5-ДГБ, которая не подвергается обмену в С-Н положение.

С целью подтверждения важности кето-енольной таутомерии для протекания Н/D обмена скелетных протонов, мы провели Н/D обмен в источнике ионизации для 5-ацетил-салициловой кислоты (**21**) и дифенилуксусной кислоты (**22**), которые характеризуются наличием как неактивных ароматических протонов, так и активных α -протонов. Мы ожидали увидеть 3 дополнительных Н/D обмена в случае ацетилсалициловой кислоты, относящихся к CH_3 -группе боковой цепи, и один обмен в случае дифенилуксусной кислоты – протона мостиковой CH -группы, находящейся в α -положении к двум ароматическим кольцам и COOH -группе. Полученные результаты показаны на Рис. 2.28. Нагревание капилляра до 400°C действительно привело к 3 и 1 обмену в случае соединений **21** и **22**.

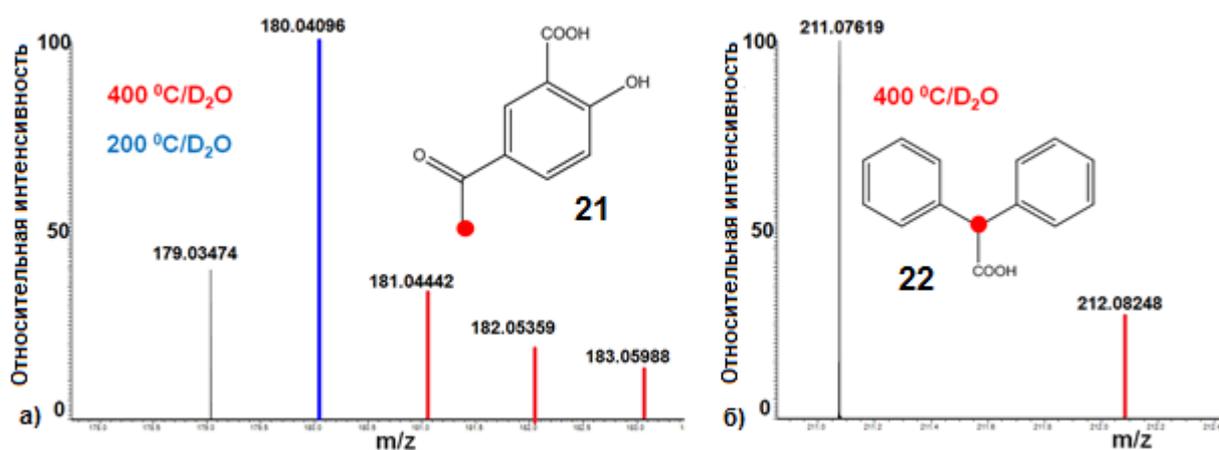


Рис. 2.28. Серии Н/D обмена а) 5-ацетилсалициловой кислоты (**21**) и б) дифенилуксусной кислоты (**22**). Красные точки обозначают α -углероды.

Для дополнительного подтверждения выявленной ведущей роли кето-енольной таутомерии для Н/D обмена скелетных протонов, для ряда модельных соединений был проведен обмен в растворе NaOD в D₂O при нагревании с последующим анализом продуктов методом спектроскопии ЯМР на ядрах ^2H . Для эксперимента были выбраны 3 соединения, показавшие самые интенсивные обмены в МС экспериментах: ДОФА (**19**), 2,4-ДГБ (**16**) и 5-ацетилсалициловая кислота (**21**). Полученные спектры ЯМР представлены на Рис. 2.29.

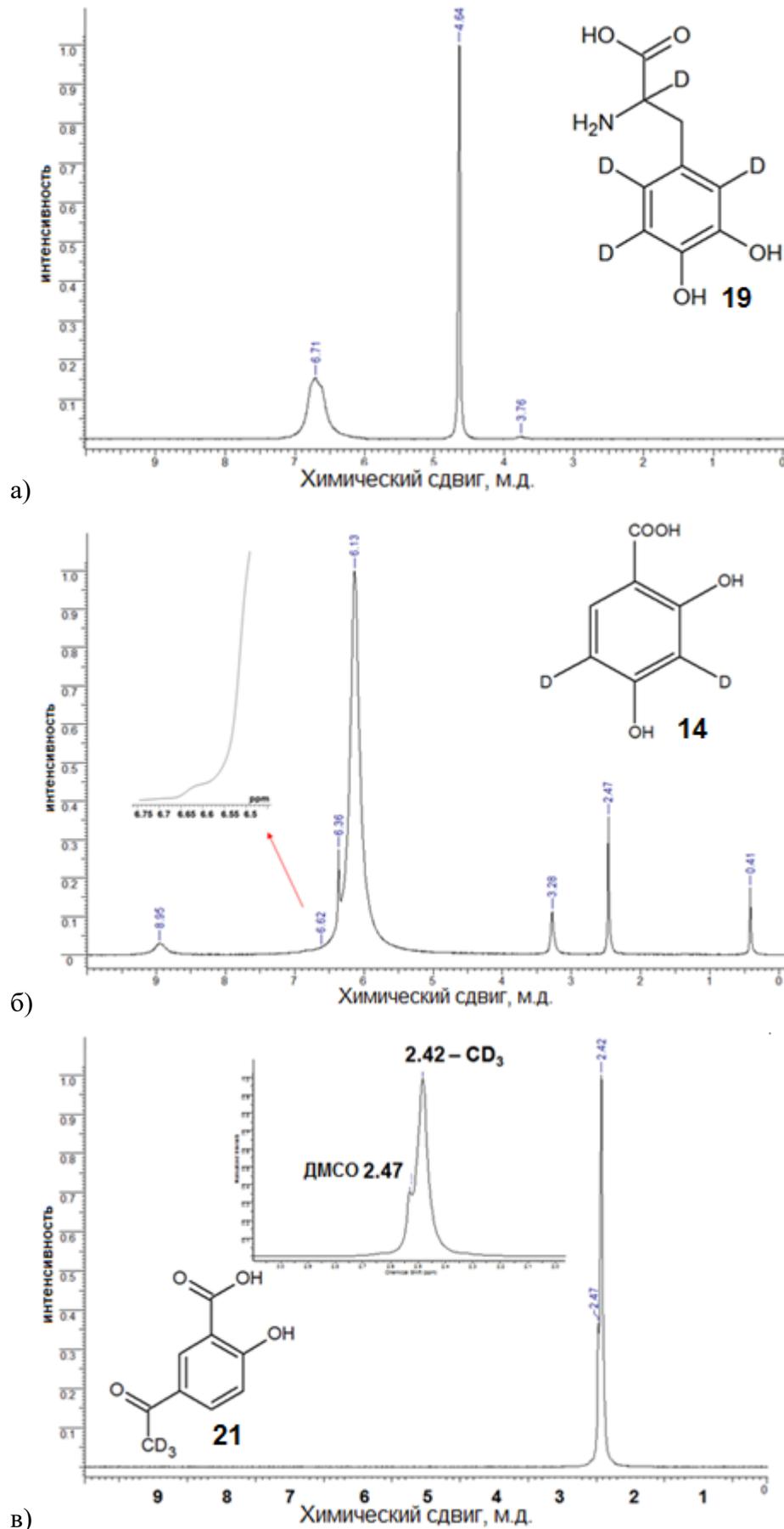


Рис. 2.29. Спектры ЯМР ^2H для продуктов Н/Д обмена, проведенного в растворе $\text{NaOD}/\text{D}_2\text{O}$, для трех модельных соединений: А) ДОФА, Б) 2,4-ДГБ и В) 5-ацетилсалициловой кислоты.

Для ДОФА (Рис. 2.29А) наблюдали большой широкий пик при 6.71 м.д., соответствующий перекрывающимися сигналам дейтеронов ароматического кольца и пик низкой интенсивности, который относили к α -дейтеронам при 3.76 м.д. Спектр ЯМР ^2H меченной дейтерием 2,4-ДГБ (Рис. 2.29Б) показал наличие интенсивного пика при 6.13 м.д., который соответствует дейтерию в положениях 3 и 5 ароматического кольца, и сигнал очень низкой интенсивности при 6.92 м.д., относящийся к дейтерию в положении 6. Спектр ЯМР ^2H соединения **21** показал наличие интенсивного резонанса при 2.42 м.д. (Рис. 2.29В), который соответствует α -дейтеронам. Таким образом, полученные результаты служат подтверждением правильности реакционных центров, которые были выбраны ранее на основе кетто-енольной таутомерии.

Достоинством спектроскопии ЯМР на ядрах ^2H по сравнению с масс-спектрометрией является возможность оценивать не только количество обменов, но и степень дейтерирования. Это достигается благодаря тому, что спектроскопия ЯМР на ядрах дейтерия, позволяет получить интегральную интенсивность сигналов даже при измерении природного содержания дейтерия [243, 244]. Для исследуемых соединений в случае 2,4-ДГБ отношение общего интеграла дейтерия в положениях 3 и 5 к сигналу дейтерия в положении 6 составило 215. Для ацетилсалициловой кислоты относительный интеграл метильной группы составил 100%: сигналы в ароматической области обнаружены не были. Найденные интегральные интенсивности находятся в соответствии с результатами масс-спектрометрии для данных соединений, которые показали 2 и 3 скелетных обмена, соответственно.

Таким образом, мы продемонстрировали возможность осуществления селективного обмена активированных скелетных протонов, вовлеченных в кето-енольную таутомерию, при ионизации в камере масс-спектрометра при повышенной температуре. При этом использование метанола в качестве растворителя предотвращает возможный обратный обмен из-за отсутствия основного катализа. Тем самым открывается возможность идентификации структурных изомеров по данным изотопной МСИЦР ПФ, что может быть полезным для извлечения структурной информации для сложных органических матриц, таких как ГВ, нефти протеины.

2.3.2. Н/D обмен скелетных протонов гуминовых веществ в кислой и основной средах

Для получения информации о структуре индивидуальных соединений в составе ГВ мы провели реакции Н/D обмена в основной и кислотной средах с последующим анализом получаемых продуктов методом МС ИЦР ПФ. Для выделения продукта реакции применяли твердофазную экстракцию на картриджах PPL, как описано в экспериментальной части.

Сверхвысокое разрешение метода МС ИЦР ПФ позволяет осуществить идентификацию серий Н/D обмена даже для такой сложной смеси, как природные ГВ. На одном номинальном

значении m/z в масс-спектрах ГВ присутствуют десятки ионов с разницей масс менее 0.001 Да. Тем не менее, мы можем отличить пики, присутствующие в исходном образце, от новых сигналов, соответствующих молекулам с разной степенью мечения, как это показано на Рис. 2.30.

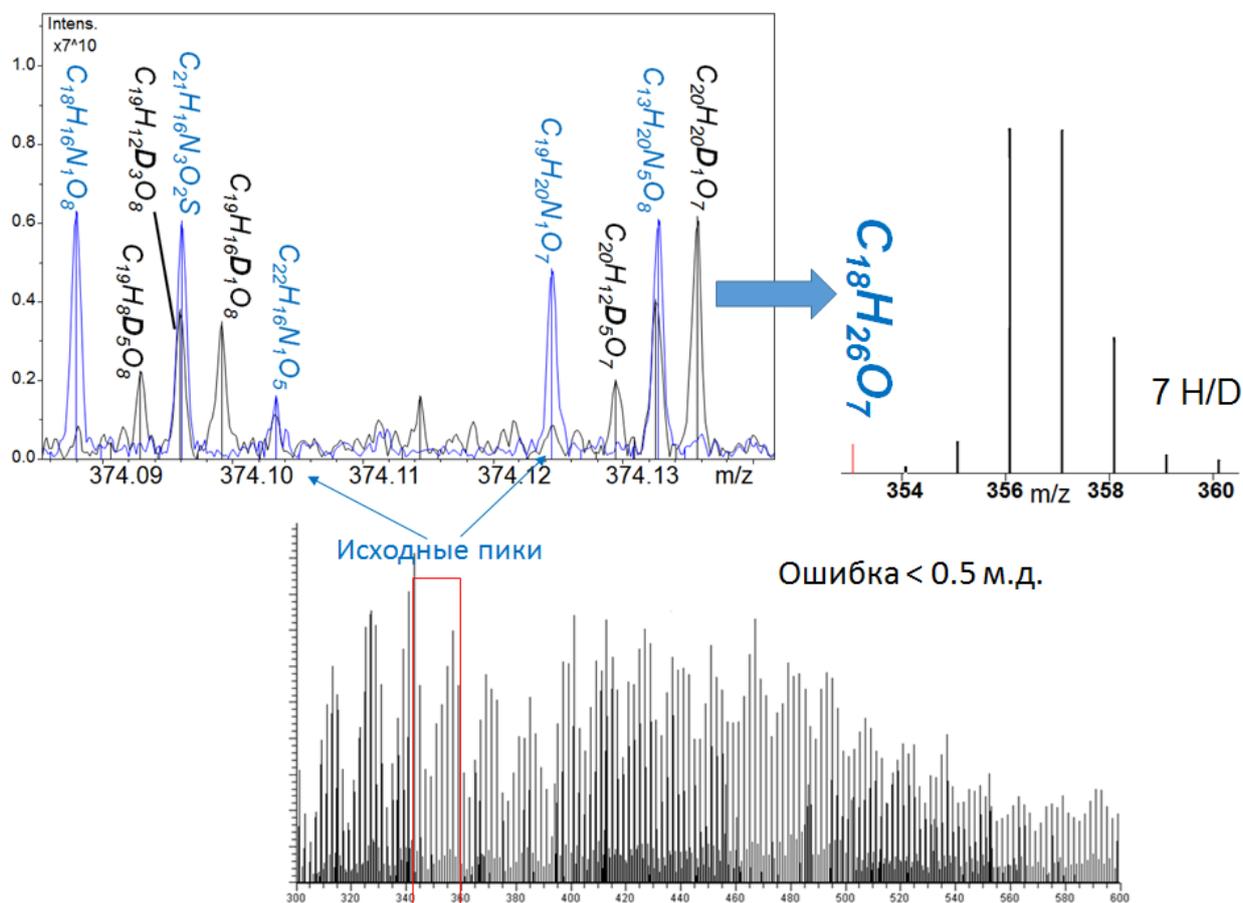


Рис. 2.30. Масс-спектр меченных дейтерием ГВ (СНМ-Row07) с выделенным фрагментом номинального значения $m/z=374$, на котором синим цветом обозначены пики исходного образца, черным – содержащие атомы дейтерия. На врезке показано определение длины серии Н/D обмена (количество обмененных Н) на примере идентифицированного молекулярного состава $C_{18}H_{26}O_7$.

Из масс-спектра ИЦР ПФ меченных дейтерием ГВ могут быть математически извлечены пики, соответствующие сериям Н/D обмена выбранного иона в исходном образце. Это позволяет получить информацию о количестве обмениваемых в выбранных условиях протонов для конкретного соединения. Пример такого определения показан на Рис. 2.30 на примере молекулы $C_{18}H_{26}O_7$, идентифицированной в составе образца СНМ-Row7. Полученная информация позволяет сравнивать образцы ГВ не только по наличию уникальных формул, но и оценить сходство строения компонентов с одинаковым молекулярным составом.

В силу значимости угольных ГВ в исследованиях, посвященных биологической активности [36–38] и созданию органоминеральных удобрений [245], для изучения были

выбраны гиматомелановые кислоты угля СМ-Рow7, СМ-Irk и СМ-GI02. Результаты МС ИЦР ПФ анализа выбранных образцов представлены на 3D диаграммах Ван Кревелена, где в качестве третьего измерения представлена относительная интенсивность сигналов ионов в масс-спектре, пропорциональная размеру точек (Рис. 2.31А-В). Так как подавляющий вклад в общую интенсивность вносят СНО-формулы (Таблица. 2.2), мы рассматривали молекулы, не содержащие азот и серу.

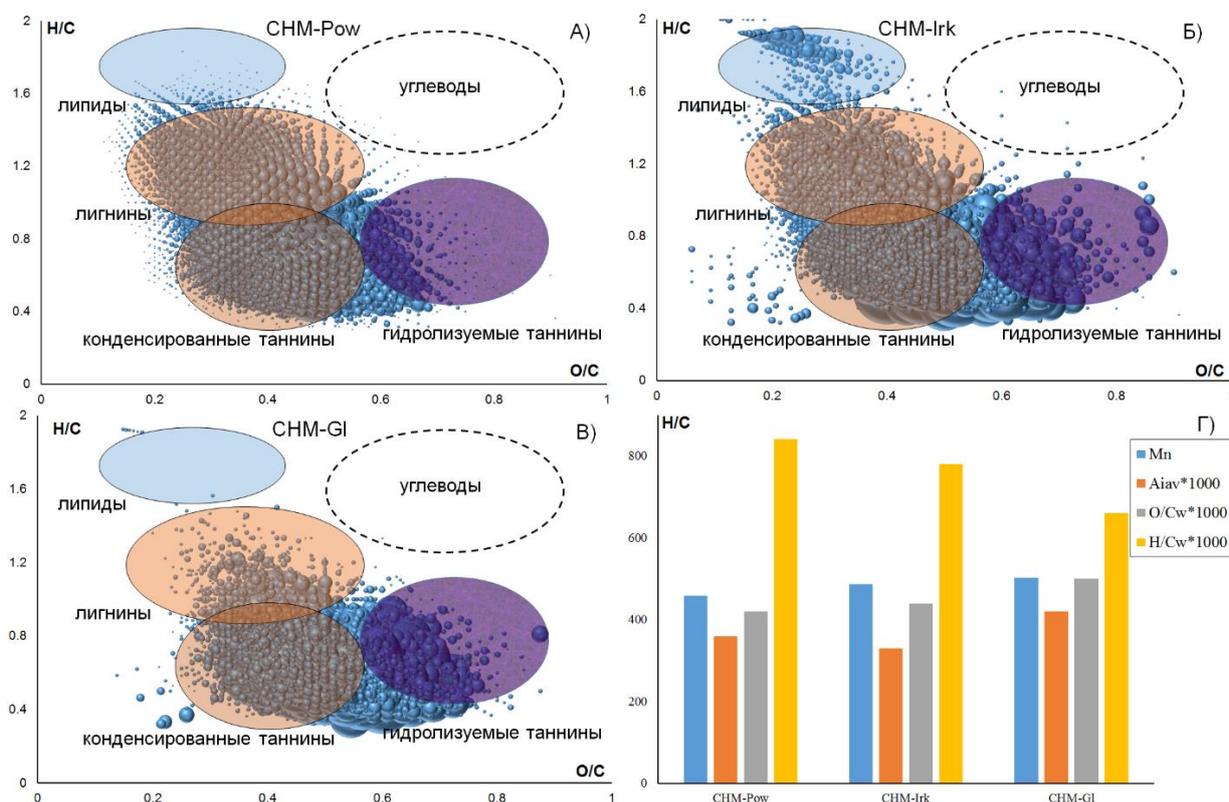


Рис. 2.31. 3D диаграммы Ван Кревелена для А) СМ-Рow7, Б) СМ-Irk, В) СМ-GI02, с относительной интенсивностью, соответствующей размеру точек. Г) распределение средних молекулярной массы (M_n), индекса ароматичности (A_{Iav}), атомных соотношений (O/C_w , H/C_w).

На диаграммах Ван Кревелена видно, что использование картриджей PPL для очистки образцов позволяет убрать липиды и жирные кислоты, подавляющие ионизацию ароматических молекул [212]. Только образец СМ-Irk содержал незначительное количество насыщенных соединений. Основные компоненты располагались в областях диаграммы, соответствующих лигнинам, конденсированным и гидролизуемым таннинам. Такое обозначение областей не отражает реальную структуру вещества, но является общепринятым [3, 4], поэтому в дальнейшем мы будем использовать данные обозначения. Максимум интенсивности во всех образцах относился к окисленным ароматическим молекулам, что свойственно для ГВ. Однако на диаграммах видно, что в случае СМ-Рow7 наибольшее содержание составили лигнины, в то время как в двух других – окисленные полифенольные соединения, характеризующиеся большим

вкладом ароматических систем (Рис. 2.31А-В). Наиболее окисленным является образец СНМ-GI02. Резкое смещение интенсивности в область гидролизуемых танинов говорит также о его большей ароматичности. Для количественного сравнения образцов была построена гистограмма средних показателей: молекулярной массы (M_n), индекса ароматичности (AI_{av}), атомных отношений (O/C_w , H/C_w), представленная на Рис. 2.31(Г). Результаты соответствуют предположениям, сделанным из вида диаграмм. СНА-GI02 характеризуется максимальным значением $AI_{av}=0.42$, в то время как значения для СНА-Pow7 и СНА-Irk близки (0.36 и 0.33, соответственно). Хотя в последний образец вносят вклад липиды, среднее значение H/C_w максимально для образца СНМ-Pow7. То есть большой вклад лигнинов характерен, как для гиматомелановых кислот (СНМ-Pow7), так и для ГК (СНА-Pow7), рассмотренных выше. СНМ-GI02, как и ГК из того же источника, характеризуется максимальной в серии образцов ароматичностью и минимальным H/C_w значением. Хотя тренды для рассмотренных ГМК повторяют тренды для ГК, различие между сериями существенное – фракции ГМК содержат минимальное количество конденсированных ароматических соединений и обогащены лигниновыми компонентами по сравнению с ГК из тех же углей.

Несмотря на видимые различия, образцы гиматомелановых кислот имели 1872 общих формулы, что составляет более 50% от общего количества для каждого препарата. Для выявления различий в этих соединениях мы применили Н/D обмен с кислотным и основным катализом. В Таблице 2.8 представлены длины обменных серий для некоторых общих для всех углей формул, находящихся в областях лигнинов, конденсированных и гидролизуемых танинов.

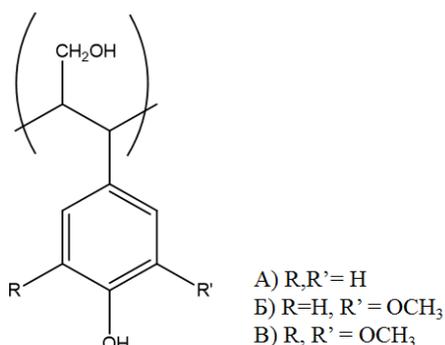
Таблица. 2.8. Количество Н/D обменов в условиях кислотного (DCI) и щелочного (NaOD) катализа в D_2O .

Формула	СНМ-Pow7	СНМ-Irk	СНМ-GI02
$C_{16}H_{16}O_7$	4(5)	2(2)	2(3)
$C_{17}H_{20}O_7$	4(5)	3(3)	1(3)
$C_{17}H_{10}O_7$	5(4)	6(4)	4 (4)
$C_{20}H_{14}O_6$	5(5)	4(1)	2(3)
$C_{14}H_{10}O_9$	0(0)	4(4)	3(3)
$C_{16}H_{10}O_{10}$	1(1)	4(4)	4(6)

Из Таблицы 2.8 видно, что сравнение образцов ГМК углей только по результатам МС ИЦР ПФ может привести к ложным выводам о сходстве соединений с одинаковыми молекулярными формулами. Подсчет длин серий Н/D обмена указывает на различия в структурах выбранных молекулярных компонентов. Так, соединения $C_{17}H_{20}O_7$ и $C_{16}H_{16}O_7$, расположенные в области лигнинов, обладают максимальным количеством обмениваемых протонов как в кислой, так и в

основной среде, в образце СНМ-Pow7: 4 и 5, соответственно. Принимая во внимание, что обмен в кислой среде идет непосредственно в ароматические кольца, то данный факт может указывать на меньшую степень замещения колец в образце СНМ-Pow7 по сравнению с СНМ-Irk и СНМ-G102. Это можно проиллюстрировать различиями в структуре модельных фенолпропановых спиртов, образующих лигнины (схема 2.6): паракумарильный (А), кониферильный (Б) и синапильный (В) [246].

Схема 2.6



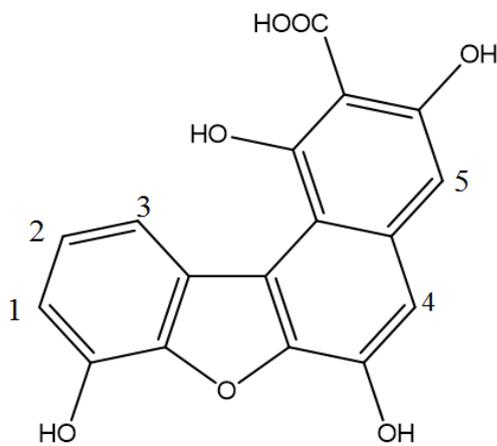
Молекулярные формулы $C_{17}H_{20}O_7$ и $C_{16}H_{16}O_7$ характеризуются значением DBE = 8 и 9, что равносильно присутствию не более 2-х ароматических колец. Учитывая, что молекула может содержать карбоксильные и карбонильные группы, которые так же содержат DBE [19], то можно предположить присутствие лишь одного кольца, и тогда количество обменов в кислой среде указывает на различное происхождение обменов в рассмотренных ГМК углей: 4 обмена для СНМ-Pow7 означают наличие паракумарильного фрагмента, в то время как 2 и 3 обмена для СНМ-Irk и СНМ-G102 указывают на присутствие синапильного и кониферильного компонентов, соответственно. Всего лишь 1 обмен для молекулы $C_{17}H_{20}O_7$ в случае СНМ-G102 указывает, скорее всего, на наличие 5-членного дигидрофуранового цикла, показанного для лигнинов, в результате чего в ароматическом кольце появляется дополнительный заместитель [47].

Наличие боковой цепи в лигнинных блоках объясняет большее количество обменов в NaOD, чем в DCl для рассматриваемых образцов. Исходя из предположения о структуре ароматического ядра, можно утверждать, что для $C_{17}H_{20}O_7$ и $C_{16}H_{16}O_7$ мы наблюдаем 3 обмена в боковой цепи для СНМ-Pow7, так как только 2 протона в о-положении к фенольной группе в ароматическом кольце подвергаются обмену в NaOD. В случае СНМ-G102 все 3 обмена в основной среде относятся к боковой цепи, так как в структуре синапильного спирта о-положения заняты метокси-группами. В образце СНМ-Irk мы наблюдали 3 и 2 обмена в NaOD для молекул $C_{17}H_{20}O_7$ и $C_{16}H_{16}O_7$, соответственно. Кониферильный и синапильный спирт отличаются вакантным о-положением в кольце, поэтому мы предполагаем, что боковые цепи молекул $C_{17}H_{20}O_7$ и $C_{16}H_{16}O_7$ имеют похожее строение с 2 обмениваемыми в основной среде протонами. Тем самым можно предположить, что лигнинные компоненты СНМ-Irk и СНМ-G102 имеют

близкое строение ароматического ядра, в то время как СНМ-Pow7 и СНМ-G102 характеризуются сходным строением боковой цепи.

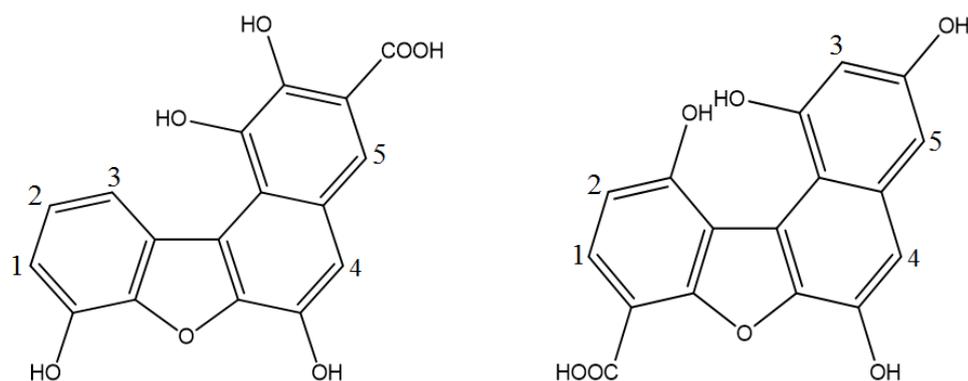
Рассмотрение результатов Н/Д обмена для молекул в области конденсированных танинов так же выявляет некоторые различия между строением молекул с одинаковым составом. Так, для молекулярной формулы $C_{17}H_{10}O_7$ мы наблюдали 5, 6 и 4 обмена в DCI для СНМ-Pow7, СНМ-Irk и СНМ-G102, соответственно. В данном случае количество обменов указывает на большее количество ароматических протонов в образце СНМ-Pow7, для которого можно предложить структуру (схема 2.7), типичную для флавоноидов.

Схема 2.7



В представленной структуре присутствует 5 активных положений (показаны цифрами), которые подвергаются Н/Д обмену в DCI, что согласуется с данными эксперимента для СНМ-Pow7. Более того, при обмене в NaOD мы наблюдали 4 обмена для этой молекулы. Действительно, так как положение 2 не находится в о- или п-положении к фенольной группе, Н/Д обмен в основной среде в этом положении не происходит, что подтверждает предложенную структуру. Меняя порядок заместителей, можно изменять активность ароматического кольца. Для СНМ-G102 мы наблюдали 4 обмена в кислой среде, поэтому в этом случае для молекулы $C_{17}H_{10}O_7$ можно предположить следующие структуры (схема 2.8):

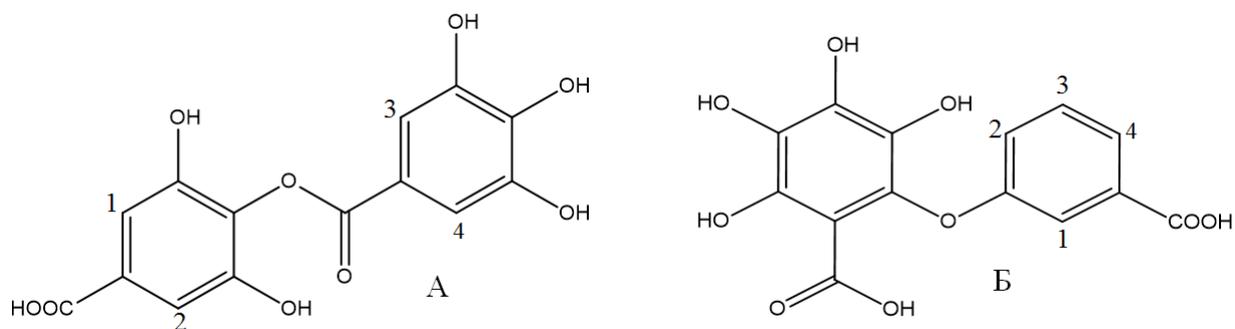
Схема 2.8



Действительно, в левой и правой структурах карбоксильный заместитель дезактивирует положения 5 и 1, соответственно. В результате мы наблюдаем 4 обмена в DCl. Наблюдение 4-х обменов в NaOD не позволяет определить, какая из предложенных формул верна, так как положения 1,3,5,4 в левой и 2,3,4,5 в правой структурах подвергаются H/D обмену в основных условиях. Полученные результаты показывают, что компоненты в области конденсированных таннинов могут отличаться расположением заместителей. Более того, применение изотопного обмена позволяет отфильтровать структурные изомеры, не согласующиеся со свойствами молекулы, т.е. не удовлетворяющие количеству обмениваемых протонов.

Уникальность образца СНМ-Pow7 подтверждается и результатами H/D обмена для молекул из области гидролизуемых таннинов на диаграмме Ван Кревелена. Так, для соединения $C_{14}H_{10}O_9$ в случае СНМ-Irk мы наблюдали 4 обмена как в NaOD, так и в DCl. Количество активных центров согласуется со структурой дигалловой кислоты (схема 2.9А) - типичного представителя таннинных кислот [247]: положения 1,2,3,4 подвергаются электрофильному обмену как в DCl, так и в щелочной среде за счет таутомерных превращений фенолов. В случае же СНМ-Pow7 мы не наблюдали ионов, соответствующих обмену. Для соединения $C_{14}H_{10}O_9$ мы можем предложить структуру, в которой одно из колец полностью гидроксильно, а второе содержит карбоксильную группу (схема 2.9Б): в такой молекуле отмеченные положения неактивны для обмена в DCl или NaOD.

Схема 2.9



2.3.3. Распределение обмениваемых протонов в кислой и основной средах по диаграмме Ван Кревелена гуминовых веществ

Кроме сравнения различных ГВ, H/D обмен может быть применен и для выявления структурных особенностей молекул, составляющих образец. Полученная информация может быть использована для оценки того, насколько справедливо отнесение найденных молекулярных составов к тем или иным классам предшественников ГВ [4]. С этой целью для СНМ-Pow были посчитаны серии H/D обмена в условиях кислотного и основного катализа для 800 ионов,

относительная интенсивность сигналов которых в масс-спектре превышала 1%, что является достаточным для описания образца ГВ [248]. Результаты обменов были нанесены на диаграммы Ван Кревелена, для которых цвета точек соответствовали количеству обменов в NaOD и DCl (Рис. 2.32).

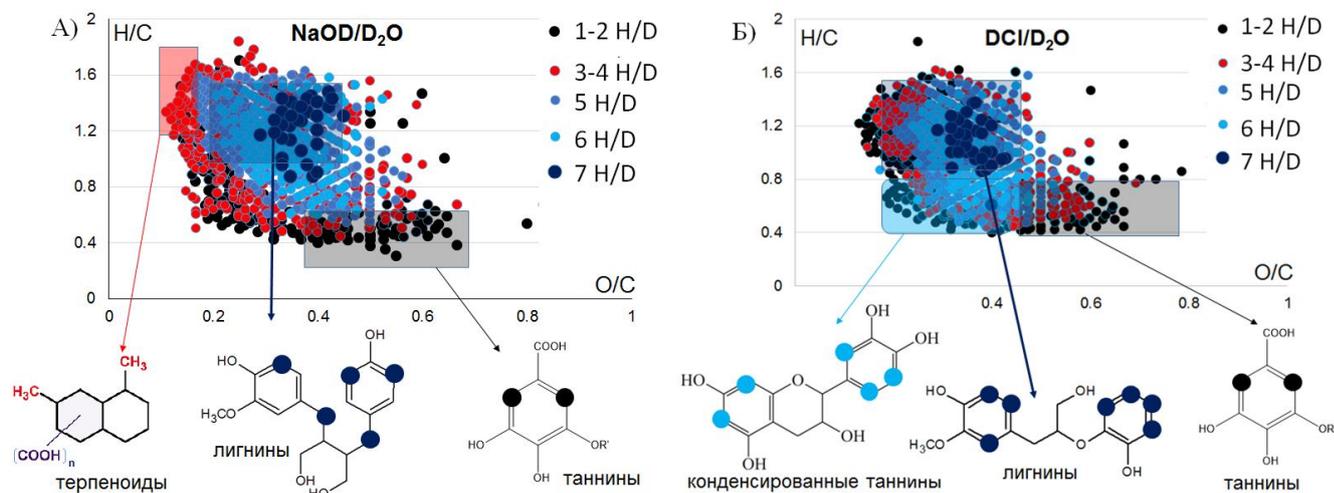


Рис. 2.32. Диаграммы Ван Кревелена для CHM-Pow7 с обозначенными цветами количеством H/D обменов при действии А) NaOD, Б) DCl с гипотетическими структурами, соответствующими результатам обмена и элементным составам.

Как видно из Рис. 2.32, области на диаграммах характеризуются различными количествами обмениваемых протонов, причем обменные серии не имеют четкой зависимости от соотношений H/C и O/C. Тем не менее, тщательный анализ указывает на хорошее согласие полученных результатов типам модельных структур, предложенных для различных областей диаграммы Ван Кревелена.

Так, окисленные ароматические молекулы образца CHM-Pow7 с $O/C > 0.5$ и $H/C < 0.6$ характеризуются минимальным (1-2 H/D) количеством обмениваемых в NaOD протонов (Рис. 2.32А). Эти результаты согласуются с модельными дигалловыми кислотами, предложенными для танинов [247]. Область низкоокисленных неароматических углеводов с $H/C > 1.2$ и $O/C < 0.2$ характеризуется 3-4 H/D обменами в NaOD. Так как изотопный обмен в этом случае происходит у групп с высокой C-H кислотностью [133, 134], то для данных компонентов можно предположить наличие карбонильных и карбоксильных групп, ускоряющих обмен в α -положении [131]. Действительно, методом спектроскопии ЯМР ранее было показано присутствие алициклических карбоксильных кислот в составе ГВ [107], что позволяет отнести рассматриваемые компоненты к циклическим карбоксилсодержащим терпеноидам.

Особой интерес представляют молекулы в области лигнинов и лигнанов, которым приписывают наибольшую биологическую активность в составе ГВ [249]. Количество

обмениваемых протонов изменяется от 5 до 7 с ростом отношения О/С. Увеличение относительного содержания кислорода характеризует степень окисления молекулы. В процессе формирования ГВ угля из торфа могут происходить процессы гидроксирования, спирты могут окисляться в кетоны и кислоты [42], в результате чего повышается С-Н кислотность и, следовательно, появляются новые активные центры Н/D обмена. С другой стороны, столь большое количество обменов указывает на наличие активных центров в боковой цепи, которые отсутствуют в классических β -О-4 лигниновых структурах [47]. Действительно, существенный вклад в ароматические компоненты СНМ вносят фенилпропановые спирты, для которых возможно не более двух обменов в ароматическом кольце в условиях основного катализа. В свою очередь, молекулы лигнанов содержат бензильные группы, способные к Н/D обмену в основной среде. Так, модельные структуры молекул лигнанов, дибензил-бутиролактолы А, Б и В (Рис. 2.33) [250], содержат три бензильных протона в положениях 5,5' и четыре - в положениях 4,4' и 4',5, соответственно.

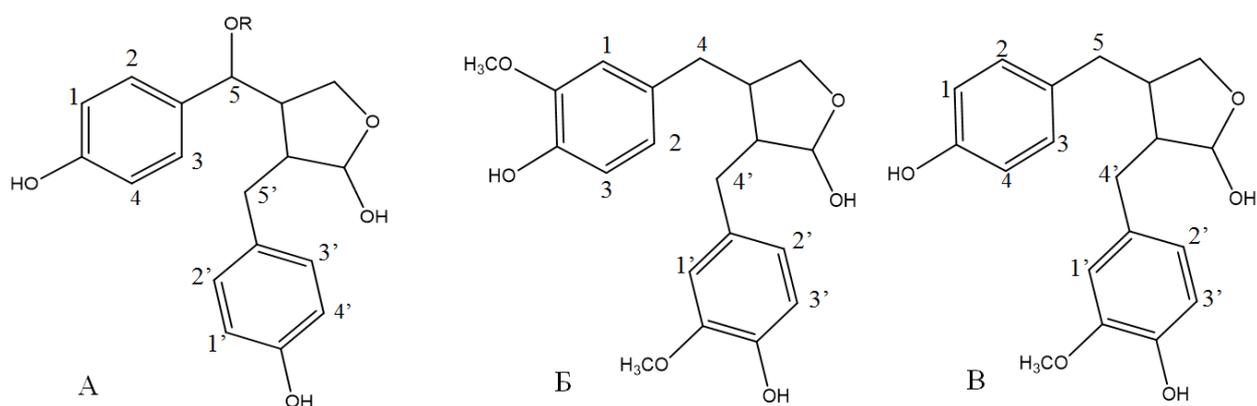


Рис. 2.33. Модельные структуры молекул лигнанов, дибензил-бутиролактолы [250].

Структуры лигнанов различаются строением ароматических систем: молекула А включает в себя ароматическое кольцо паракумарилового спирта, Б - кониферилового, В - обоих типов (Рис. 2.33). Все эти структуры и их производные не противоречат результатам Н/D обмена.

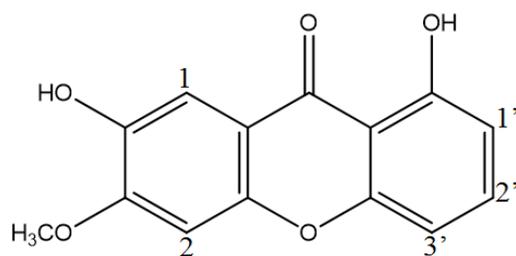
Для области гидролизуемых таннинов результаты Н/D обмена в DCl и NaOD совпадают (Рис. 2.32Б), что так же подтверждает модельные структуры.

Для области алициклических терпеноидов Н/D обменов не было обнаружено, что согласуется с отсутствием в них ароматических структур, поэтому данные точки не были нанесены на диаграмму.

Явное различие результатов Н/D обмена в условиях кислотного и основного катализа наблюдалось для области конденсированных таннинов. В случае DCl были обнаружены компоненты с количеством обменных ароматических протонов, достигающим 6. Действительно, согласно приведенной ниже модельной структуре флавоноидов (схема 2.10), фенольные группы

не обеспечивают обмен всех протонов в NaOD, в то время как под действием DCl обмениваются все ароматические протоны.

Схема 2.10



Так, в рассмотренной модельной структуре конденсированных таннинов [251], в DCl обмениваются протоны в активных положениях 1,2, и 1',2',3', в то время как в NaOD - только в положениях 1,1',3'.

Максимальное количество H/D обменов как в DCl, так и в NaOD наблюдалось для лигнинных компонентов (Рис. 2.32). Это объясняется тем, что отсутствие карбоксильных заместителей в ароматическом кольце приводит к эффективному электрофильному замещению всех ароматических протонов на дейтероны [130]. Таким образом, мы убедительно показали, что результаты H/D обмена прямо указывают на степень замещения ароматических колец, что позволяет предположить конкретный тип фенилпропанового мономера, входящего в состав соединения. Например, молекула C₁₉H₂₂O₅ (Рис. 2.33В) и C₂₀H₂₄O₆ (Рис. 2.33Б) имеют 7 и 6 ароматических протонов, что соответствует парам кониферил-паракумарил и кониферил-кониферил спирты. Это подтверждается данными H/D обмена.

Необходимо отметить, что количество H/D обменов, катализируемых DCl, увеличивается с повышением DBE (понижением отношения Н/С) и увеличением отношения О/С (Рис. 2.32Б). Анализируя подобную тенденцию для обменных серий в NaOD, мы относили этот эффект к процессам окисления боковой цепи и гидроксирования. Однако работы, посвященные изучению химических реакций, протекающих при углефикации лигнинов [252, 253], показали, что кроме процессов окисления, процесс гумификации сопровождается гидролизом метилового эфира и восстановлением фенольной группы в ароматическом кольце, что может приводить либо к появлению новой фенольной группы, либо ароматического протона, соответственно, как это показано на Рис. 2.34. Появление пирокатехиновой структуры (Рис. 2.34) приводит к увеличению отношения О/С и уменьшению Н/С. В результате появляются дополнительные положения для обмена ароматических протонов в NaOD, что мы и наблюдали при смещении по диаграмме Ван Кревелена (Рис. 2.32А). Дальнейшая потеря фенольной группы (Рис. 2.34) приводит к появлению дополнительных ароматических протонов, в результате чего количество H/D обменов в DCl в молекулах лигнинной области увеличивается. Например, молекула C₂₀H₂₈O₈ обладает шестью

ароматическими протонами, что указывает на два фрагмента кониферилового спирта; в то же время, соединение $C_{19}H_{26}O_7$ отличается от $C_{20}H_{28}O_8$ на массу OCH_2 и имеет 7 ароматических протонов, что явно указывает на потерю метоксильной группы в ароматическом кольце и приводит к появлению фрагмента паракумарилового спирта.



Рис. 2.34. Общая схема реакции деметилирования, приводящая к потере метоксильной группы в лигнине и образованию в итоге пирокатехиновой и фенольной подструктур [252].

Мы можем заключить, что в образце гиматомелановых кислот угля (СНМ-Ров7) содержатся молекулы лигнинов на различных стадиях гумификации. При этом описанные процессы объясняют увеличение количества обмениваемых протонов в кислой среде от 4 до 7. Таким образом, селективное введение изотопных меток в комбинации с МС ИЦР ПФ позволило различить типы фенилпропановых мономеров, входящих в состав отдельных молекул ГВ.

2.4. Определение количества карбоксильных групп в составе индивидуальных компонентов гуминовых веществ

2.4.1. Дейтерометилирование гуминовых веществ

Введение изотопных меток в условиях кислотного катализа в комбинации с МС ИЦР ПФ позволяет получить информацию о различных типах скелетных протонов, но не о функциональных группах. В то же время Н/Д обмен подвижных протонов позволяет определить количество подвижных протонов в молекулах [180], но не обладает достаточной селективностью для разделения карбоксильных, фенольных и спиртовых групп, каждая из которых ответственна за различные свойства молекулы [254]. Для решения этой проблемы мы применили реакцию дейтерометилирования в комбинации с МС ИЦР ПФ для трех образцов ГВ: стандартному образцу водных ФК МГО – SRFA, гиматомелановым кислотам угля СНМ-Irk и гиматомелановым кислотам торфа РНМ-TTL. Выбор образцов обосновывался существенным различием их

кислотно-основных свойств: речные ФК представляют собой высоко окисленные гуминовые вещества с максимальным вкладом карбоксильных групп, в то время как угольный и торфяной образцы характеризуются более высоким вкладом фенольных фрагментов. Результаты МС ИЦР ПФ для исходных образцов приведены на диаграмме Ван Кревелена (Рис. 2.35).

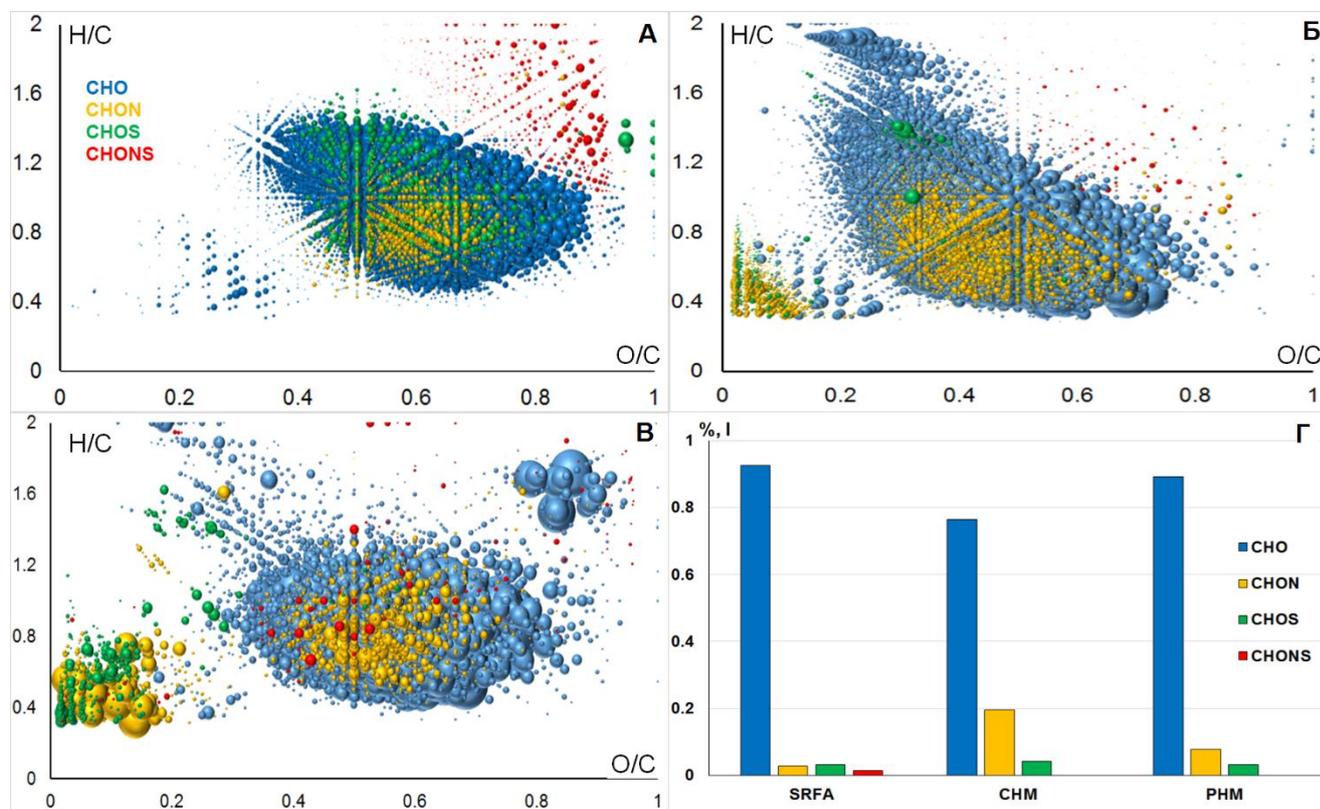


Рис. 2.35. Диаграммы Ван Кревелена для исследуемых образцов А) SRFA Б) CHM-Irk, В) PHM-TTL и гистограмма распределения интенсивности по различным присвоенным $C_cH_nO_oN_nS_s$ формулам (Г) [255].

Полученные данные указывают на значительные различия между образцами. SRFA характеризуются максимальным вкладом окисленных молекул с $0.4 < O/C < 0.9$. CHM-Irk характеризуется наибольшим содержанием ароматических и алициклических молекул с $0.4 < O/C < 0.6$. PHM-TTL содержал наиболее значительное количество карбогидратных компонентов с $0.6 < O/C < 1$. В то же время все образцы характеризовались доминирующим содержанием CHO молекул, вклад в общую интенсивность которых достигал 0.92, 0.76 и 0.89 для SRFA, CHM-Irk и PHM-TTL, соответственно. Поэтому при поиске карбоксилсодержащих молекул мы ограничились CHO компонентами, исключив из рассмотрения для простоты интерпретации CHON, CHOS и CHONS соединения.

Для характеристики распределения протонов в исследуемых образцах мы использовали спектроскопию ПМР. Для получения наиболее информативных спектров образцы растворяли в безводном апротонном растворителе - ДМСО- d_6 , что позволяет замедлить скорость обмена

подвижных протонов и тем самым найти количественное содержание карбоксильных протонов [100]. Полученные спектры показаны на Рис. 2.36.

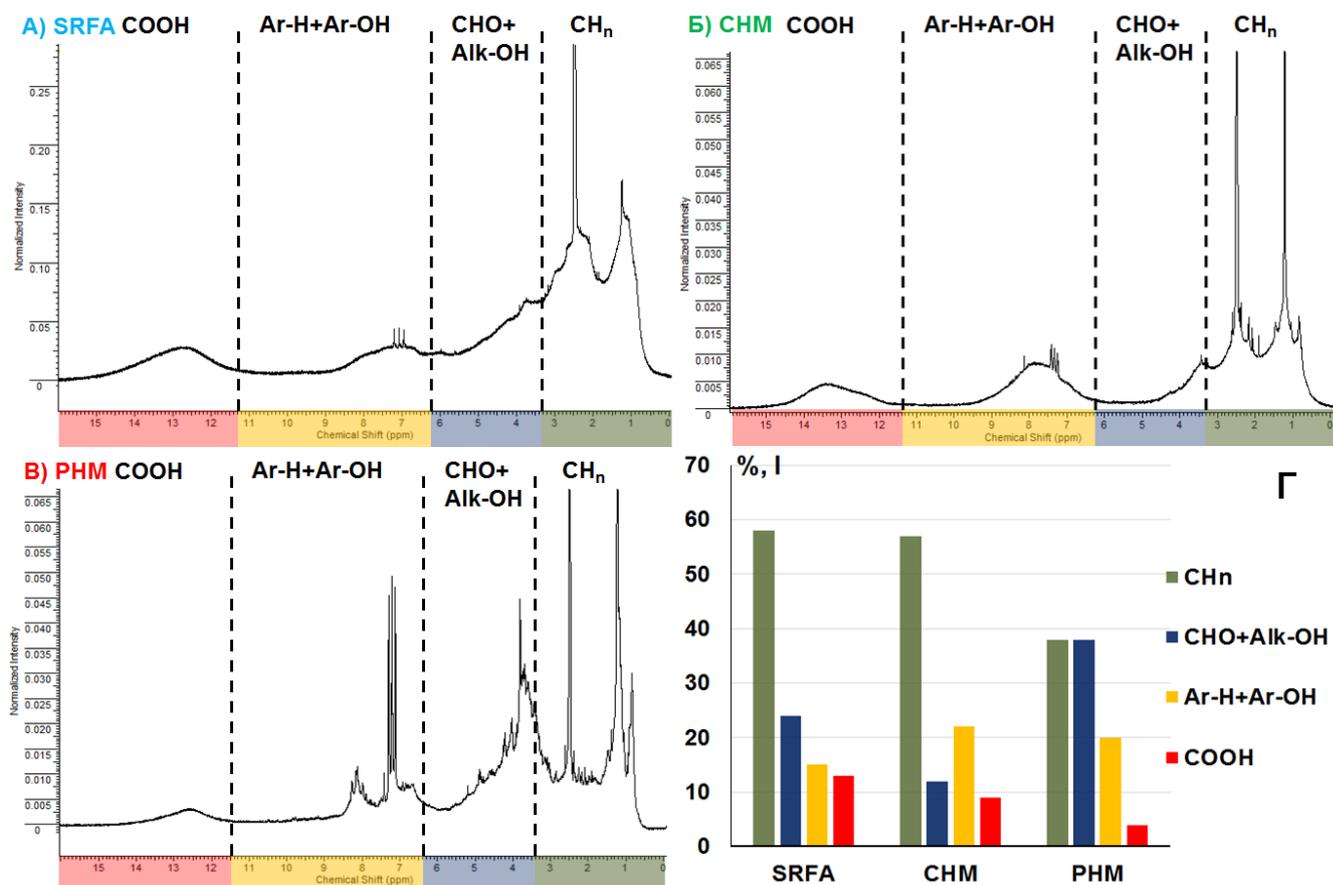


Рис. 2.36. ПМР спектры исследуемых образцов ГВ: А) SRFA, Б) CHM-Irk, В) PHM-TTL посчитанными интегральными интенсивностями выделенных диапазонов сигналов (Г) [90, 100].

Благодаря тщательной осушке образца ГВ и использованию безводного ДМСО, мы наблюдали значительную спектральную плотность в области 11.5-16 м.д., соответствующей карбоксильным протонам, для всех препаратов [90, 100]. Максимальное значение интеграла карбоксильных протонов составляло 13% и наблюдалось для SRFA, для CHM-Irk и PHM-TTL значения были существенно ниже – 9% и 4%, соответственно (Рис. 2.36Г). В то же время, PHM-TTL характеризовался максимальным вкладом углеводных протонов (>30%), а CHM-Irk – наибольшим содержанием ароматических и фенольных протонов (Рис. 2.36Г). Таким образом, тренды полученные для исследованных препаратов методом МС ИЦР ПФ, хорошо согласуются с данными спектроскопии ПМР и подтверждают существенные различия в содержании карбоксильных групп в указанных образцах ГВ.

На Рис. 2.37 показана схема проведения реакции дейтерометилирования образцов ГВ с использованием дейтерометанола-d₄ и тионилхлорида. Этот метод этерификации приводит к селективной модификации всех карбоксильных групп с высоким выходом, не затрагивая другие

гидроксисодержащие группы [256–258]. Более того, относительно мягкие условия проведения реакции предотвращают процессы переэтерификации, в результате чего не затрагиваются сложноэфирные группы, присутствующие в ГВ.

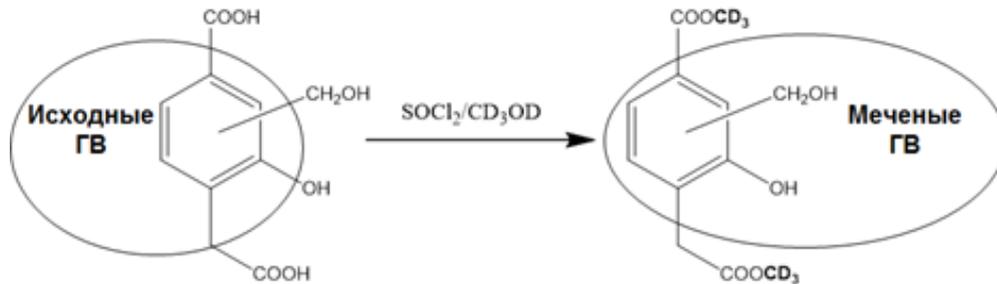


Рис. 2.37. Схема селективного введения изотопных меток в состав карбоксильных групп ГВ путем их этерификации метанолом-d₄ в присутствии тионилхлорида.

Перед анализом МС ИЦР ПФ, дейтерометилированные продукты были очищены от неорганических солей на картриджах PPL [224], чтобы избежать образования аддуктов (M+Cl)⁻, которые образуются при электрораспылении и ухудшают качество масс-спектров [76]. Масс-спектры ИЦР ПФ исходных и меченых образцов (на примере SRFA) показаны на Рис. 2.38А и Б, соответственно. Исходный спектр SRFA содержал 9182 молекулярных пика, в то время как SRFA-CD₃ состоял из 11094 пиков с S/N ≥ 6. Несмотря на значительное усложнение спектра, разрешающая способность была достаточной для определения серий дейтерометилирования. Рассмотрение участка спектра (Рис. 2.38А,Б) показывает, что пики, соответствующие молекулам с карбоксильными группами, присутствующими в исходном спектре, отсутствуют или обладают низкой интенсивностью на масс-спектре SRFA-CD₃. Это указывает на высокую степень дериватизации. Необходимо отметить, что в отрицательной моде электрораспыления, ионизация ГВ обеспечивается в основном карбоксильной кислотностью. Это подразумевает уменьшением эффективности ионизации метилированных ГВ, в силу гораздо более низких значений фенольной и С-Н кислотности [167]. В результате интенсивность пиков, соответствующих полностью метилированным компонентам, может быть значительно ниже, чем интенсивность частично прореагировавших молекул.

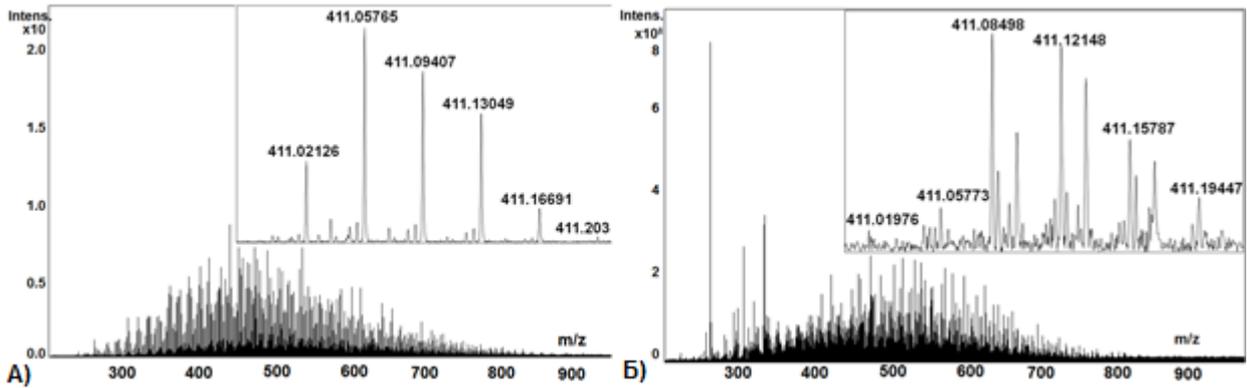


Рис. 2.38. Масс-спектры ИЦР ПФ исходного SRFA и этерифицированного дейтерометанолом образца (SRFA-CD₃) с увеличенным фрагментом с номинальным значением $m/z = 411$ (А и Б, соответственно).

Для подсчета количества карбоксильных групп, подвергшихся этерификации, мы извлекали серии дейтерометилирования материнских ионов в масс-спектрах исходных образцов, как подробно описано в Экспериментальной части (параграф 3.2.2). Благодаря уникальной способности МС ИЦР ПФ определять массы ионов с точностью до пятого знака после запятой, мы могли достоверно различать ионы, содержащие дейтероны [181]. Затем, учитывая низкое содержание азота и серы в образцах, мы исключили из рассмотрения материнские молекулы, содержащие N и S [51]. В результате, данный подход был применен к 500 наиболее интенсивным пикам, соответствующих СНО молекулам, для исследуемых препаратов ГВ.

Рис. 2.39А показывает типичные примеры фрагментов масс-спектров, содержащих материнский ион и пики, соответствующие дейтерометилированным в разной степени исходным молекулам, причем количество дочерних пиков равно количеству карбоксильных групп для рассматриваемого исходного соединения. Рис. 2.39 демонстрирует, что пики, которые отстоят от красной линии на 17.03448 m/z , составляют серии дейтерометилирования, длина которых соответствует количеству карбоксильных групп в ионе. Например, извлеченные масс-спектры для соединений C₁₅H₁₆O₈, C₁₅H₁₀O₈ и C₁₃H₈O₁₀ (Рис. 2.39А) содержат 4, 2 и 1 таких пиков (или карбоксильных групп). Более того, наблюдаемая обратная связь между интенсивностью пиков и количеством дейтерометильных групп находится в соответствии с уменьшением эффективности ионизации метилированных соединений.

Для демонстрации различий между доминирующими компонентам ГВ, содержащими карбоксильные группы, мы выбрали пики с одинаковым значением m/z для трех исследуемых образцов и сравнили соответствующие серии дейтерометилирования, как это показано на Рис. 2.39Б, для пика с элементным составом C₁₈H₁₄O₁₀. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что в случае речных ФК- SRFA, соответствующая молекула содержит 4 COOH группы, в то время как в случае гиматомелановых кислот угля и торфа, СНМ-Irk и РНМ-TTL, молекулы с

таким же составом имеют только 2 COOH-группы. Это согласуется с данными спектроскопии ПМР, согласно которым SRFA содержит наибольшее количество карбоксильных групп по сравнению с угольным и торфяным препаратами.

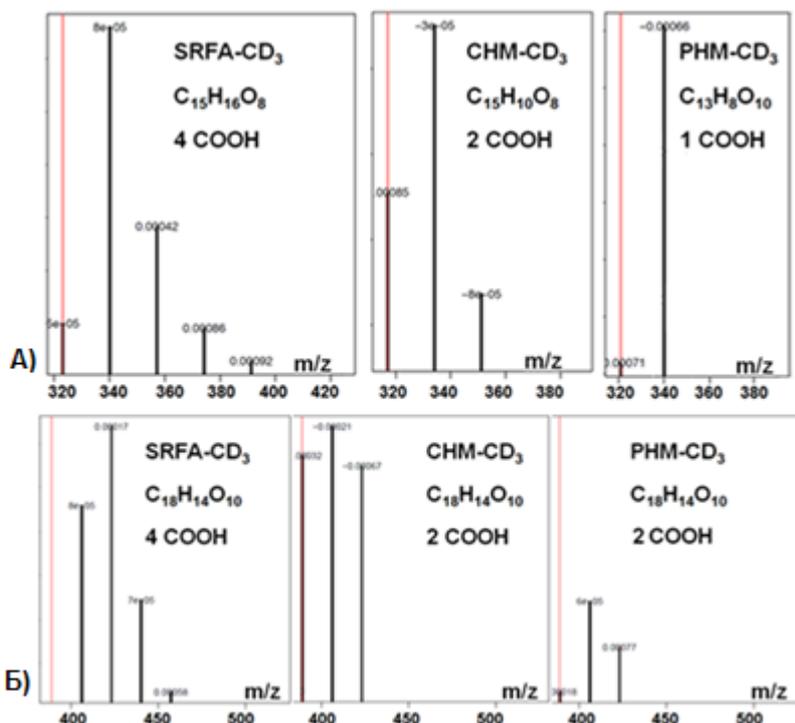


Рис. 2.39. А) Различные серии дейтерометилирования, типичные для SRFA-CD₃, CHM- CD₃ и PHM- CD₃; Б) Серии дейтерометилирования для молекулы C₁₈H₁₄O₁₀, присутствующей во всех исследуемых образцах. Красные линии указывают на положение материнского пика; количество последующих дочерних ионов соответствует содержанию карбоксильных групп.

Для визуализации данных о количестве карбоксильных групп в индивидуальных компонентах исследованных образцов, мы нанесли их на диаграммы Ван Кревелена с цветовым обозначением количества COOH-групп. Полученные диаграммы представлены на Рис. 2.40А-В. В предыдущей главе мы показали, что типы гуминовых прекурсоров, приписываемые определенным областям диаграммы Ван Кревелена (лигнинам, конденсированным и гидролизуемым таннинам, карбогидратам) в целом согласуются с данными о структурных фрагментах этих молекул. Поэтому мы относили молекулы к данным классам на основании их положения на диаграмме Ван Кревелена, как показано на Рис. 2.41Г.

Рис. 2.40А показывает, что SRFA содержит значительное количество молекул с 5 и 6 COOH группами, которые могут быть отнесены к поликарбокси- алициклическим соединениям (CRAM) [106], в то время, как наиболее окисленные компоненты CHM-Irk (Рис. 2.40Б) включают 3 и 4 COOH-группы, что позволяет их отнести к гидролизуемым таннинам. CHM также содержит фракцию молекул в области лигнинов без карбоксильных групп. Чтобы лучше проследить

тенденцию в распределении карбоксильных групп по молекулярным составляющим ГВ, мы сравнили полученные данные с модельными структурами, показанными на Рис. 2.40Г. Хорошо видно, что найденные количества карбоксильных групп находятся в полном соответствии с предложенными структурами. Например, молекулы флавоноа или рабинозы (Рис. 2.40Г), которые представляют конденсированные танины и карбогидраты, соответственно, не содержат карбоксильных групп, и соответствующие области на диаграммах Ван Кревелена для образцов СНМ-Irk и РНМ-TTL представлены соединениями, содержащими 0 и/или 1 COOH-группу. В то же время, гидролизуемые танины содержат значительное количество карбоксильных групп, что подтверждается высокой заселенностью этой области поликарбоксильными молекулами.

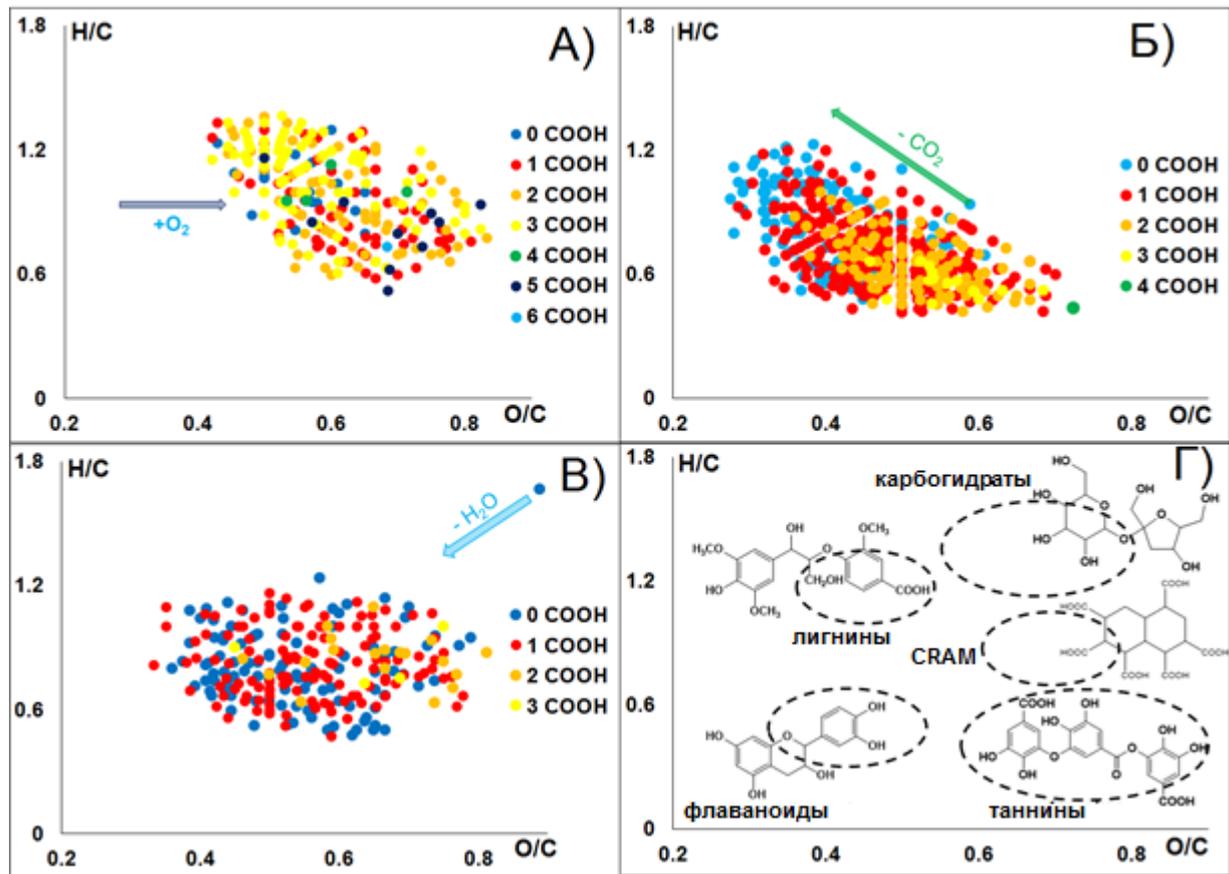


Рис. 2.40. Диаграмма Ван Кревелена для 500 наиболее распространенных СНО молекул, с количествами COOH групп, отмеченными синим (0), красным (1), оранжевым (2), желтым (3), зеленым (4), тёмно-синим (5) и бирюзовым (6) цветами для образцов: А) SRFA, Б) СНМ-Irk, В) РНМ-TTL. Г) Диаграмма Ван Кревелена прекурсоров ГВ [255].

Учитывая, что точки на диаграмме Ван Кревелена ложатся на эволюционные прямые, соответствующие процессам конденсации, декарбоксилирования, окисления и др. [259, 260], мы отметили эти тренды на диаграммах Ван Кревелена для всех исследованных образцов. В случае SRFA (Рис. 2.40А) основным процессом трансформации является окисление, которое приводит к окислению первичных спиртов, присутствующих в лигнинах, до карбоксильных групп,

увеличение количества которых наблюдается в регионе таннинов. Для образца СНМ-Irk (Рис. 2.40Б) тренд декарбоксилирования виден для молекул с высоким отношением О/С, который приводит к смещению в область полифенольных лигнинов. Для препарата РНМ-TTL (Рис. 2.40В) наблюдается большой вклад карбогидратов, не обнаруженных для других образцов, что свойственно торфяным ГВ [93]. В этом случае мы не наблюдали изменения содержания карбоксильных групп вдоль линии конденсации.

Для количественного сравнения вклада различных карбоксилсодержащих соединений в молекулярный состав изученных образцов, мы разделили компоненты на группы с одинаковым количеством карбоксильных групп (COOH-классы) и построили гистограмму их относительной интенсивности по аналогии с описанными в предыдущей главе кислородными классами [201, 202]. Полученное распределение карбоксильных групп, показанное на Рис. 2.41А, позволяет сделать вывод о том, что образцы СНМ-Irk и РНМ-TTL характеризуются максимальным содержанием компонентов с одной карбоксильной группой или без них, в то время как SRFA содержит максимальное количество компонентов с высоким содержанием карбоксильных групп: 3- 4 COOH-группы на молекулу. Эти данные хорошо согласуются с результатами спектроскопии ПМР, показанными на Рис. 2.36: наибольшее содержание карбоксильных групп наблюдалось для SRFA (13%) и гораздо меньшее содержание - для угольных и торфяных ГВ. В то же время, СНМ-Irk характеризуется большим содержанием карбоксильных фрагментов по сравнению с РНМ-TTL (9 и 4%, соответственно). Подобный тренд описан и в литературе по данным ^{13}C ЯМР [104, 261].

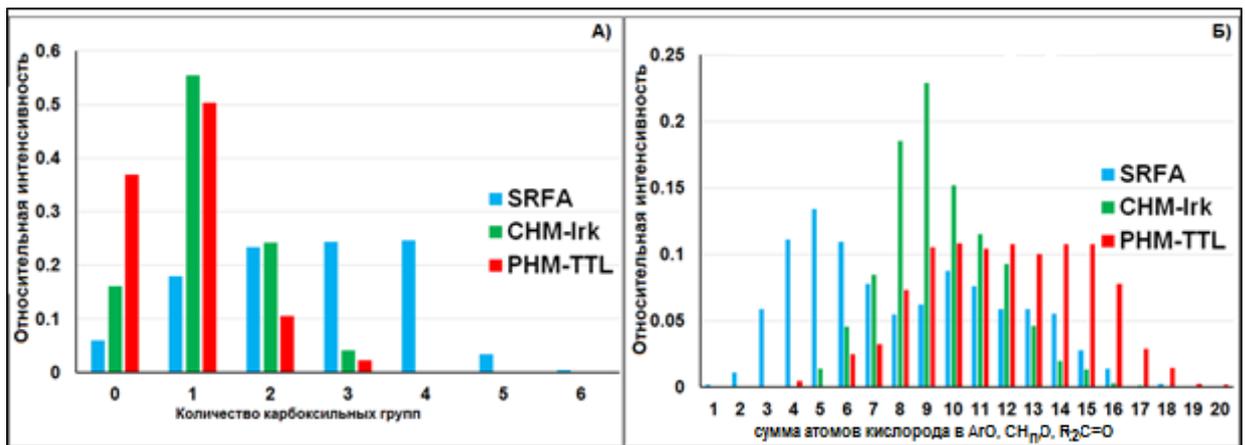


Рис. 2.41. Гистограммы распределений А) COOH-групп и (Б) атомов кислорода в фенольных, спиртовых и карбонильных функциональных группах, определенных дейтерометилированием с последующим анализом МС ИЦР ПФ. SRFA, СНМ и РНМ показаны синим, зеленым и красным цветами, соответственно.

Мы также посчитали распределение атомов кислорода, не входящих в карбоксильные группы, по молекулярному ансамблю трех исследованных ГВ. Полученная гистограмма

представлена на Рис. 2.41Б. Минимальное содержание некарбоксильного кислорода было обнаружено для SRFA (4 атома на молекулу), в то время как более высокие количества (9 и 14 атомов на молекулу) наблюдались для СНМ-Irk и РНМ-TTL, соответственно. Максимальное содержание некарбоксильного кислорода в образце РНМ-TTL можно объяснить значительным вкладом карбогидратов, которые содержат большое количество спиртового кислорода. Этот тренд так же соответствует данным ПМР (Рис. 2.36), который показывает максимальный вклад (38%) карбогидратных протонов в РНМ-TTL по сравнению с 24% в SRFA и 12% в СНМ-Irk. Найденное количество некарбоксильного кислорода так же согласуется с возрастающим трендом содержания фенольных групп в образцах РОВ, торфа и угля, установленным с помощью спектроскопии ПМР (12, 20, и 22%, соответственно), и показанным в литературе [104].

Таким образом, мы разработали новый метод определения количества карбоксильных групп в индивидуальных компонентах ГВ, что позволило рассчитать распределение COOH-групп по всему молекулярному пространству. Более того, мы обнаружили, что молекулы с близким содержанием карбоксильных групп занимают одну и ту же область на диаграммах Ван Кревелена вне зависимости от источника происхождения. Подобная информация не может быть получена другими методами структурного анализа, включая спектроскопию ЯМР.

2.4.2. Фракционирование гуминовых веществ

Известно, что экстракция органических веществ на картриджах PPL основывается на гидрофобном взаимодействии молекул с сорбентом [224]. Можно предположить, что в зависимости от pH раствора молекулы с различными кислотно-основными свойствами будут по-разному взаимодействовать с сорбентом. Основная часть молекул в низком pKa присутствует в растворе в диссоциированной форме при $\text{pH} > 2$. Увеличение pKa смещает протолитическое равновесие в сторону протонированной формы. Например, 90% молекул бензойной кислоты находятся в протонированной форме при $\text{pH} = 3$ и только 10% при $\text{pH} = 5$. В то же время фенолы практически не диссоциируют при $\text{pH} < 7$ [262]. Поэтому мы провели пошаговую экстракцию двух образцов ГВ (СНМ-Irk и SRFA) при $\text{pH} = 7, 5, 3, 2$ на картриджах PPL. Полученные фракции обозначались индексами, которые соответствовали pH выделения, например, СНМ-Irk-2 и SRFA-2 означают фракции ГВ, выделенные при $\text{pH} = 2$. Выбранные значения pH соответствовали уменьшению значений pKa в следующем порядке: фенолы ($\text{pKa} > 7$), карбоксильные кислоты ($\text{pKa} = 5$), ароматические карбоксильные кислоты ($\text{pKa} > 3$), β -кето карбоксильные и поликрабоксильные кислоты ($\text{pKa} < 2.5$) [263]. После элюирования молекулярные составы каждой из фракций были исследованы методом МС ИЦР ПФ. Масс-спектры ИЦР ПФ, полученные для фракций угольного образца СНМ-Pow7 представлены на Рис. 2.42. Из полученных результатов видно, что массовый диапазон остается практически

неизменным для всех фракций. Рассмотрение тонкой структуры спектров выявляется значительные отличия между фракциями одного и того же образца, как было выше показано для ГВ из различных источников. На Рис. 2.42 так же показаны пики на номинальном значении $m/z = 359$. При $pH = 7$ максимальная интенсивность у пиков с большим дефектом масс, как $C_{20}H_{23}O_6$ и $C_{21}H_{21}O_5$ – гидрофобные лигнинные компоненты [3]. При понижении pH максимум распределения смещается к более ароматическим окисленным молекулам, как $C_{16}H_7O_{10}$ и $C_{14}H_9O_{11}$, которые можно отнести к сильным поликарбоксильным кислотам [222]. Это подтверждает связь молекулярного состава и кислотных свойств, предложенную при определении распределения карбоксильных групп по ансамблю ГВ.

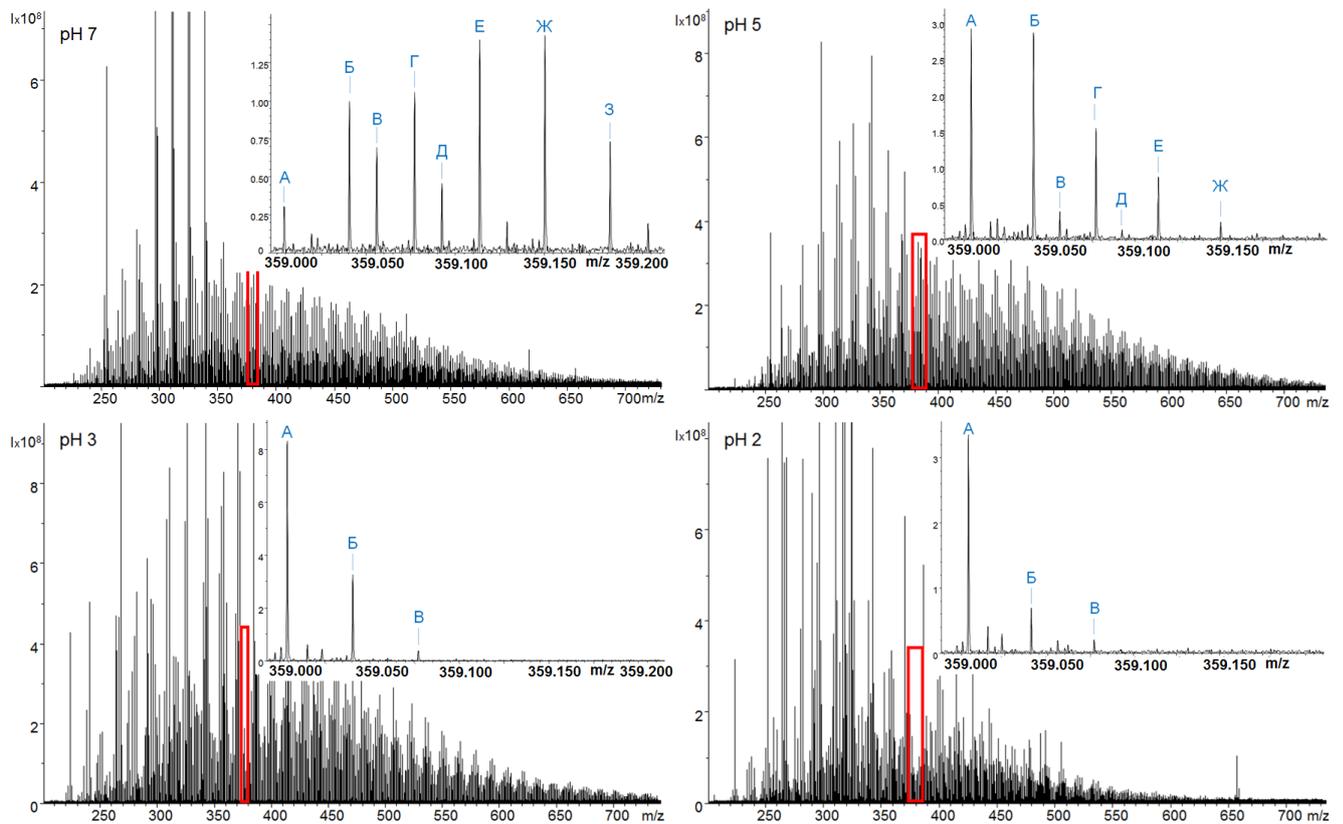


Рис. 2.42. Масс-спектры ИЦР ПФ фракций СНМ-Pow7, выделенных на кратриджах PPL при разных pH . Пики А, Б, В, Г, Д, Е, Ж, З соответствуют молекулярным составам $C_{16}H_7O_{10}$, $C_{17}H_{11}O_9$, $C_{21}H_{11}O_6$, $C_{18}H_{15}O_8$, $C_{22}H_{15}O_5$, $C_{19}H_{19}O_7$, $C_{20}H_{23}O_6$, $C_{21}H_{27}O_5$, соответственно.

Далее посчитанные элементные составы, полученные МС ИЦР ПФ для всех фракций СНМ-Irk и SRHA, были помещены на диаграмму Ван Кревелена [2]. Как предполагалось, мы наблюдали эволюцию молекулярного ансамбля ГВ с изменением pH . Из представленных данных на Рис. 2.43 видно, что распределение интенсивности по молекулярному составу прогрессивно смещается от относительно насыщенных низкоокисленных соединений с $H/C > 1$, наблюдаемых при $pH = 7$, к высоко ароматичным [4] окисленным молекулам с $O/C > 0.6$, составляющим фракции SRHA-2 and СНМ-Irk-2. Отмеченный сдвиг совпадает с эволюционной

прямой СО для ГВ [2], что указывает одновременно на процессы конденсации (уменьшение отношения Н/С) и изменение кислотных свойств. Это согласуется с нашими наблюдениями о принадлежности молекул с одинаковым окличеством карбоксильных групп к одному классу соединений на диаграмме Ван Кревелена [255]. Можно заключить, что обнаруженные при рН = 7 молекулы могут быть однозначно приписаны к неокисленным лигнинным компонентам, содержащим фенольную и спиртовые группы. Фракции SRНА-5 и СНМ-Irk-5 (Рис 2.43Б,Е) содержат молекулы, в которых первичные спирты лигнинов окислены до карбоксильных групп [264], которые не сопряжены с ароматическим кольцом и характеризуются значениями рКа алифатических кислот. Другой класс карбоксильных кислот предложенный для ГВ, СРАМ [106], значение рКа которых менее 3.5. СРАМ по своему молекулярному составу перекрывается с лигнинами и таннинами на диаграмме Ван Кревелена, но обладает выраженными кислотными свойствами. Рис. 2.43 (В,Ж) показывает, что фракции, выделенные при рН = 3 занимают область СРАМ с отношением Н/С близким к 1 в случае SRНА и гидролизуемых таннинов с Н/С < 1 для СНМ-Irk. Согласно Leenheer et al. [265] соединения в SRНА с максимальной кислотностью являются поликарбоксильными кето-кислотами с рКа < 2.5, отвечающие за 35% общей кислотности образца. Таким образом, мы можем отнести компоненты, выделенные при рН = 2, к сопряженным кето-кислотам, причем данные соединения характеризуются максимальным отношением О/С.

Все фракции SRНА имеют отличный молекулярный состав, в то время как СНМ-Irk-2 и СНМ-Irk-3 в значительной мере повторяют друг друга. Это объясняется отсутствием в составе СНМ-Irk поликарбоксильных соединений, как это было показано выше методом дейтерометилирования ГВ.

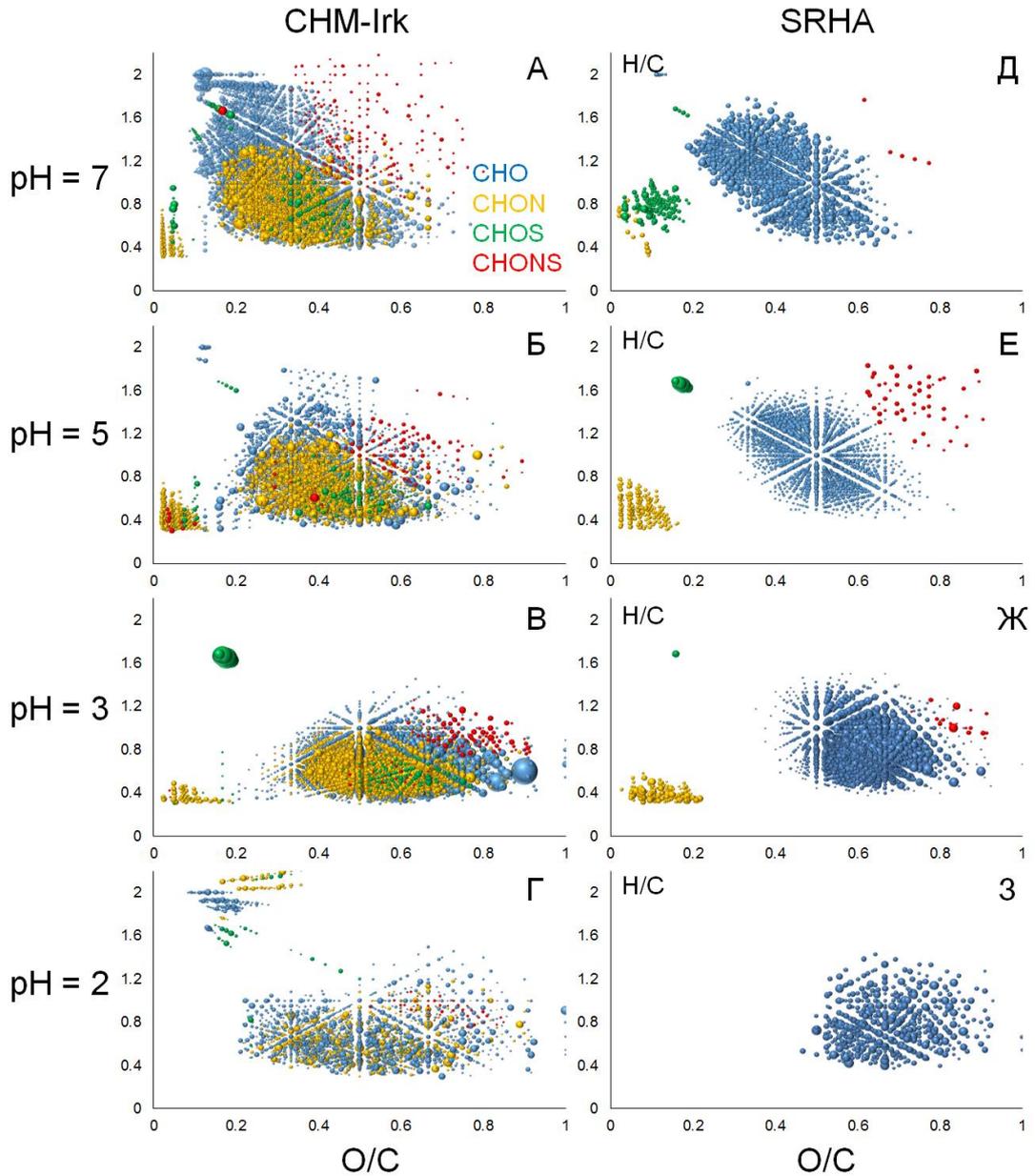


Рис. 2.43. Диаграмма Ван Кревелена фракций, выделенных на картриджах PPL при пошаговом уменьшении pH раствора. Левая часть соответствует фракциям CHM-Irk, правая- SRHA. Размер точек отражает относительную интенсивность пика на масс-спектре.

Рис. 2.44 показывает диаграммы Ван Кревелена, на которых отмечены общие и уникальные молекулярные состав обнаруженные МС ИЦР ПФ в исходных образцах ГВ, выделенных согласно описанному в литературе протоколу [224], и их фракций. Так как СНО-составы вносят основной вклад, мы не рассматривали азот- и сера-содержащие молекулы.

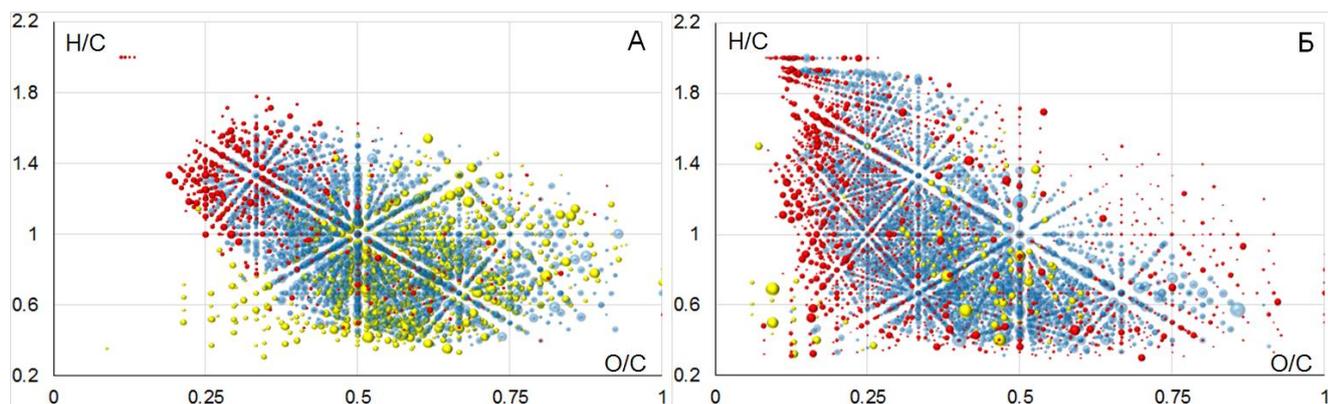


Рис. 2.44. Диаграммы Ван Кревелена для CHO-составов, идентифицированных в А) SRHA, Б) CHM-Irk и их фракциях по данным МС ИЦР ПФ. Красные и желтые точки обозначают уникальные молекулы в составе фракций и исходных образцов, соответственно. Синие точки обозначают общие молекулярные составы, обнаруженные в нефракционированных образцах и в их фракциях.

Как видно из данных, сумированный состав всех фракций покрывает молекулярный ансамбль нефракционированных образцов. Мы обнаружили 1315 и 2406 общих элементных составов из посчитанных 2299 и 2535 CHO-формул в случае SRHA и CHM-IRK, соответственно. Нефракционированный SRHA содержит большее количество окисленных соединений с $O/C > 0.5$ по сравнению с фракциями (Рис. 2.44А). В то же время, для фракций были обнаружены алифатические компоненты, вероятно терпеноиды [107], с $H/C > 1.2$, которые отсутствовали в SRHA. Такой же тренд наблюдался для CHM-Irk – только для фракций были посчитаны низкоокисленные молекулы с $O/C < 0.2$ (Рис. 2.44Б), которые то же можно отнести к терпеноидам. Разделение молекул по кислотно-основным свойствам позволило обнаружить наиболее окисленные соединений с $O/C > 0.7$ и $H/C > 1$ в составе CHM-Irk.

Полученные результаты можно объяснить влиянием процедуры экстракции на картриджах PPL и динамическим диапазоном метода МС ИЦР ПФ. Действительно, сорбция органического вещества основывается на взаимодействии с неподвижной фазой [224] и конкуренция между различными компонентами ГВ за активные центры сорбента влияют на состав выделяемого продукта [266]. Это ведет к уменьшению доли наиболее гидрофобных и гидрофильных компонентов в составе нефракционированного образца, и отсутствием соответствующих ионов в масс-спектрах. Поэтому масс-спектры SRHA содержат мало ионов алифатических компонентов, а CHM- высокоокисленных. Использование предложенного подхода к разделению компонентов, позволяет уменьшить конкуренцию и улучшить определение молекулярного состава ГВ. Проведение данного эксперимента стало возможным благодаря результатам исследования распределения карбоксильных групп по ансамблю ГВ методами дейтерометилирования и МС ИЦР ПФ.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Реактивы и оборудование

3.1.1. Реактивы

Дистиллированную воду высокой степени очистки готовили с использованием системы водоподготовки «Millipore Simplicity 185». Взвешивание образцов проводили на аналитических весах «Scaltec SPB31». Для растворения твёрдых образцов использовали ультразвуковую баню «Sonorex super RK102H». pH растворов измеряли на pH-метре pH-713 (Metrohm, Швейцария), оснащенного универсальным стеклянным электродом.

Для извлечения ГВ использовали смолу Amberlite XAD-8 (Room&Naas), диаметр пор 250Å, площадь пор 140 м²/г, которая является модифицированным полимером метилметакрилата, и картриджи Bond Elut PPL объемом 60 мл (Agilent Technologies), который представляет собой модифицированный поверхностно-активный сополимер полистирола и дивинилбензола. В качестве катионообменной смолы использовали Amberlite IR 120 (H⁺) (Fluka), ионная емкость > 1.8 экв/л. Для оценки эффективности извлечения РОВ из вод высокоцветного озера использовали сравнение оптической плотности растворов до и после прохождения колонки, наполненной макроситовой смолой XAD-8, и SPE картриджа на длине волны 254 нм, характеристичной для ГВ [267].

Все использованные реагенты были марки х.ч. или выше. Обогащение D₂O (Merck) и MeOD (ООО «Астрахим») составляло 99.8%. Диметилсульфоксид-d₆ (Merck) в ампулах по 0.7 мл, изотопной чистоты 99.9% атомных, содержал не более 0.02% воды. Использованные протонные растворители абсолютировались по стандартным методикам [268].

Использованные в работе препараты ГК и ФК были предоставлены лабораторией проф. Перминовой И.В. (кафедра медицинской химии и тонкого органического синтеза Химического факультета МГУ). Образцы воды для выделения РОВ отбирали из Сионского озера и реки Паниковка, расположенных в Приокско-Террасном государственном природном заповеднике. Полный список исследованных образцов представлен в Таблице 2.2.

3.1.2. Методы

Элементный анализ образцов проводили на CHNS-анализаторе Vario Micro Cube (Германия).

Масс-спектрометрические исследования проводили на 2х масс-спектрометрах ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье. Водные образцы и ГК углей были проанализированы на гибридном масс-спектрометре LTQ-FT, оборудованном сверхпроводящим магнитом с напряженностью магнитного поля 7 Тесла и электрораспылением Ion Max (Thermo

Electron Corp., Бремен Германия). Температура десольвирующего капилляра (105*0.5 мм) менялась с 200 °С до 400 °С. Напряжение на игле электрораспыления составляла 3 кВ. Разрешение составляло 400 тыс для $m/z = 400$. Указанный масс-спектрометр расположен в лаборатории проф. Е.Н. Николаева в Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН. Остальные образцы анализировали на FT MS Bruker Apex Ultra (Bruker Daltonics), оснащенного ячейкой с динамической гармонизацией, сверхпроводящим магнитом напряженностью 7Т и источником электрораспыления. Разрешение составляло 520 тыс для $m/z = 400$. Прибор расположен в НИИ биомедицинской химии РАН имени В.Н. Ореховича.

Для подготовки проб ГК к анализу навеску образца (1 мг) растворяли в 1 мл 10% раствора аммиака в дистиллированной воде (Milli-Q). Полученный раствор сразу же разбавляли, используя в качестве растворителя метанол или ацетонитрил. Анализ остальных образцов проводился из метанольного раствора. Во всех экспериментах вещество в концентрации 0.4 мг/л вводилось в прибор с помощью микрошприца со скоростью 90 мкл/ч. Все спектры регистрировались в режиме отрицательных ионов путем накопления 300 сканов. Полученные спектры были откалиброваны по типичным молекулярным сериям ГВ и остаточным сигналам жирных кислот для достижения точности определения масс не превышающей 0,2 м.д.

Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) ^1H и ^{13}C мономерных соединений регистрировали в дейтерохлороформе на приборе «Bruker Avance 400» (^1H 400 МГц, ^{13}C 100 МГц). Химические сдвиги измерены относительно тетраметилсилана.

Спектры ПМР ГВ регистрировали на приборе «Bruker Avance 600» в ДМСО- d_6 (чистота 99.9%) с шириной импульса 90°C и временем релаксации – 9 мкс путем накопления 100 сканов. Для подготовки проб к анализу, 13 мг ГВ в 5 мм ампулах сушили под вакуумом ($<5 \cdot 10^{-2}$) при 50°C в течение 5 часов. Затем в атмосфере аргона пробу растворяли в ДМСО- d_6 . В качестве внутреннего стандарта использовали сигнал остаточных протонов дейтерорастворителя (25 м.д.). Преобразование Фурье, фазовую коррекцию и интегрирование проводили на ПО ACD-Labs версии 10 (Advanced Chemistry Development, Канада)

Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) ^2H регистрировали на приборе Agilent 400MR (61.397 МГц), позволяющем регистрировать спектры с дейтерий-протонной развязкой и оборудованном зондом для 10 мм ампул. Продолжительность 90° импульса для атомов D составляла 25 мкс. Время накопления составляло 4 с, и время релаксации между импульсами - 1 с. Спектральная ширина составляла 1100 Гц. Химический сдвиг вычисляли относительно сигнала растворителя (D_2O – 4.72 мд, ДМСО – 2.47 мд). Интегральные интенсивности вычисляли с использованием программы INTSPECT2 [243].

Хроматографические исследования проводили на хроматографической системе Abimed, включающей: ВЭЖХ насос, автосамплер, стеклянную колонку ($\varnothing 15\text{мм}$, $L=20\text{см}$),

спектрофотометрический УФ-детектор, настроенный на длину волны $\lambda=254$ нм, плату АЦП для регистрации аналитического сигнала и регистрирующего компьютера. Колонку заполняли гелем “Тоуорепарл” TSK HW-55s (Toso-Haas, Япония) с диапазоном фракционирования 1000-200000 Да по полидекстранам.

Для калибровки колонки в качестве образцов сравнения использовали полистиролсульфонаты, молекулярные массы калибровочных веществ в пике хроматограммы составляли 4480, 14000, 20700, 45100 и 80840 Да (Polymer Standard Service, Mainz, Germany). Их полидисперсность не превышала 1,2. Для определения «мертвого» объема колонки использовали голубой декстран с молекулярной массой 2000000, полный объем колонки определяли по элюированию ацетона (о.с.ч.).

Для обработки данных гель-хроматографии использовали ПО Gealtreat, написанное А. Кудрявцевым (Хим-фак МГУ).

Электронные спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре «Cary 50 Probe» (Varian) в видимом и УФ-диапазоне длин волн (200-800 нм), оснащенного световодом и погружной кюветой с длиной оптического пути 1 см.

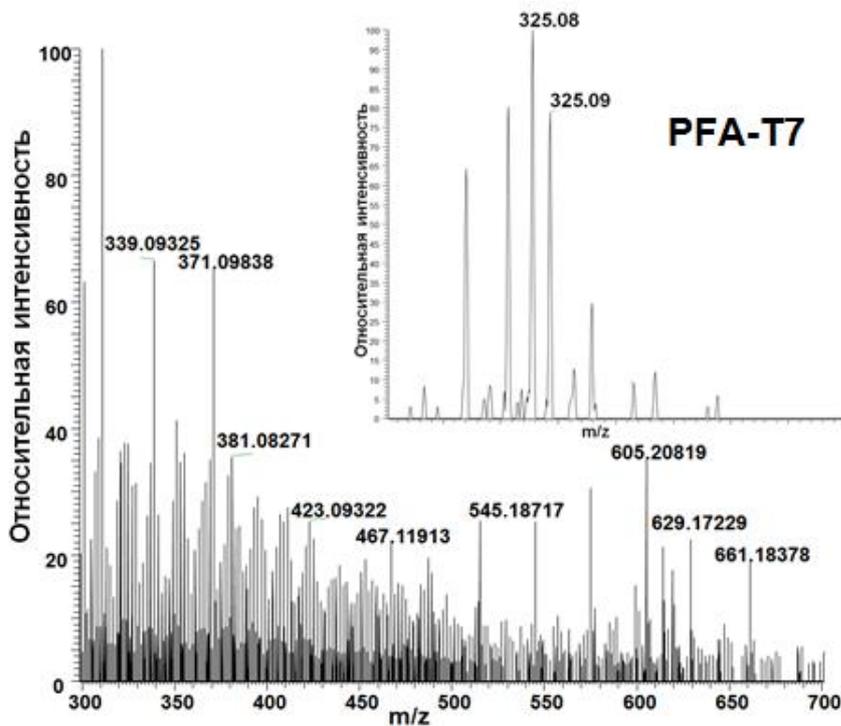
3.2. Выбор оптимальных условий электрораспыления ГВ

Оптимизация условий заключалась в подборе растворителя и напряжения на капилляре, которые позволяют получить максимальную интенсивность пиков в масс-спектре за кратчайшее время. При этом интенсивность является показателем эффективности ионизации [52]. Основные растворители, которые используют для МС ИЦР ПФ, – это водно-органические смеси на основе метанола и ацетонитрила [52, 63, 269]. ГВ торфа и угля, как правило, не растворяются в чистых органических растворителях, поэтому сначала их растворяют в щелочных водных растворах, а затем разбавляют нужным органическим растворителем. В нашей работе мы использовали смеси: вода:метанол (1:4), вода:метанол (1:3) и вода:ацетонитрил (1:4). В качестве оптимизируемого критерия определяли суммарную интенсивность шести реперных пиков, воспроизводимо регистрируемых в спектрах ГВ, которые наблюдались в каждом из использованных растворителей с интенсивностью достаточной для регистрации даже в не оптимальных условиях. Для каждой системы растворителей проводили варьирование напряжения на капилляре электрораспыления. Выбор указанных реперных пиков осуществлялся по следующим критериям:

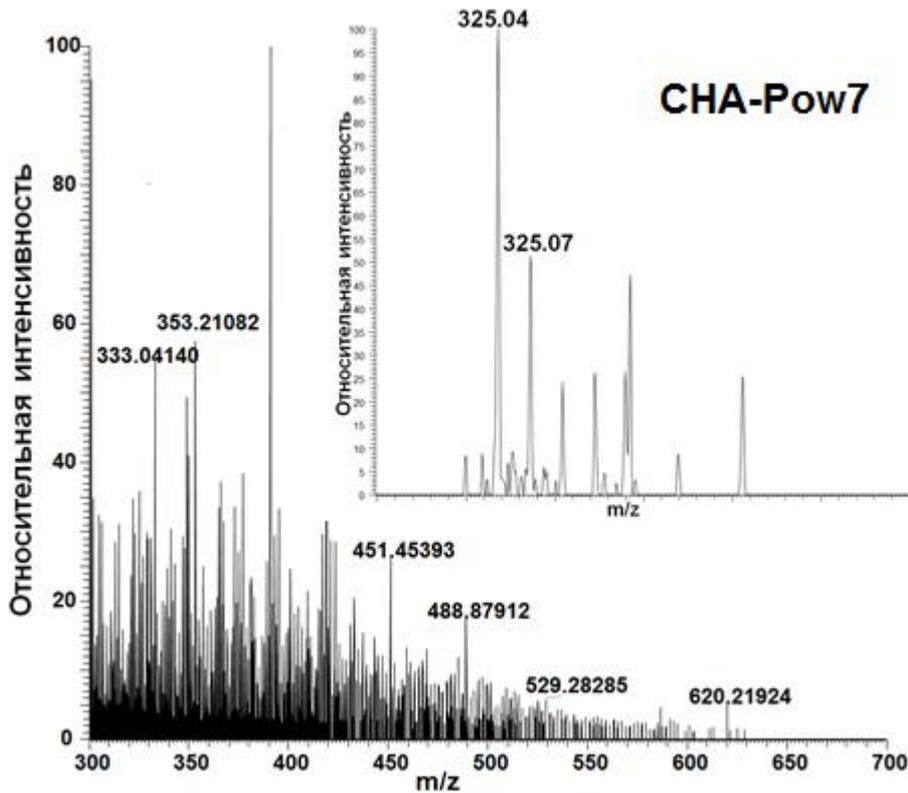
- 1) пик должен обладать достаточно высокой относительной интенсивностью даже в не оптимальных условиях ионизации

- 2) выбор трех различных значений номинальных масс обеспечивает большую представительность в пределах исследуемого диапазона масс
- 3) выбор пары наиболее интенсивных пиков при каждой номинальной массе обеспечивает уменьшение вклада случайной погрешности в получаемые результаты
- 4) исключение одиночных пиков, так как для ГВ характерно распределение интенсивностей на одной номинальной массе.

На Рис. 3.1 представлены типичные масс-спектры ИЦР ПФ для ГВ торфа и угля (PFA-T7 и СНА-Pow7, соответственно), полученные усреднением 50 сканирований из различных растворителей с напряжением на капилляре -3 кВ. В качестве реперных были выбраны пики со значениями m/z 325.08, 325.09, 337.02, 337.06, 599.14, 599.16 для PFA и 325.04, 325.07, 337.04, 337.07 и 599.12, 599.16 для СНА-Pow7, так как они соответствовали всем критериям: пики воспроизводились во всех растворителях в широком диапазоне напряжений.



A)



Б)

Рис. 3.1. Масс-спектры ИЦР ПФ образцов гуминовых веществ А) торфа (PFA-T7) и Б) угля (CHA-Pow7) с выделенными фрагментами с примером реперных пиков [270].

Зависимости сумм интенсивностей указанных пиков от напряжения на капилляре для различных растворителей представлены на Рис. 3.2.

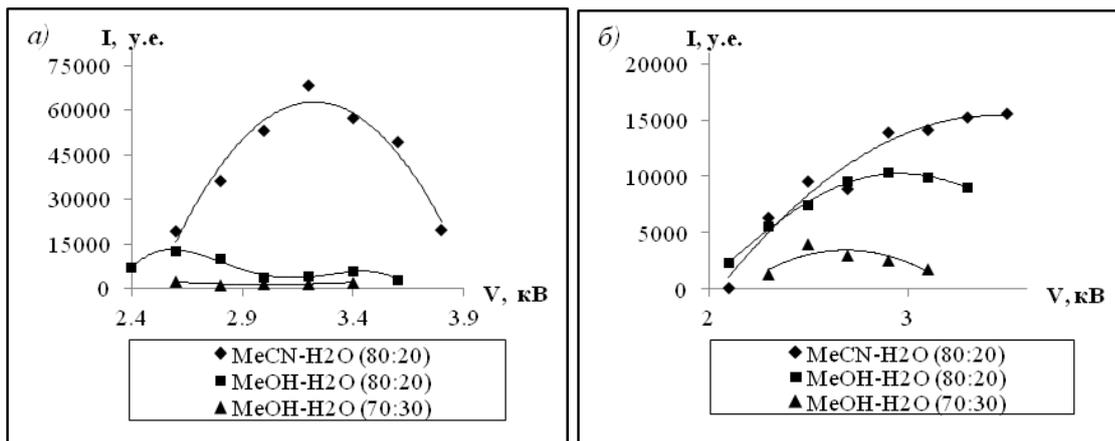


Рис. 3.2. Зависимость суммарной интенсивности шести реперных пиков для образцов фульвокислот торфа PFA-T7 (а) и гуминовых кислот угля CHA-Pow7 (б) [270].

Как видно из Рис. 3.2, зависимость суммарной интенсивности выбранных пиков в спектрах ГВ от потенциала ЭР в диапазоне величин от -2 до -4 кВ имела экстремальный характер. Возрастание потенциала ЭР приводило к росту интенсивности значения. При достижении

критической величины напряжения происходило резкое падение интенсивности. Видимо, при данной величине потенциала ЭР наблюдалось появление коронного разряда и, соответственно, уменьшение сигнала. Появление разряда фиксировали как визуально (с помощью камеры, передающей увеличенное изображение наконечника распылителя на монитор), так и по резкому росту измеряемого значения ионного тока, в отсутствие разряда находящемуся в пределах 0.12–0.25 мкА. Было показано, что при постоянном напряжении суммарная интенсивность выбранных пиков возрастает в ряду водно-метанольная смесь (1:3), водно-метанольная смесь (1:4) и водно-ацетонитрильная смесь (1:4). Таким образом, мы показали, что увеличение количества органического растворителя (особенно ацетонитрила) приводит к увеличению сигнала.

На основании проведенных исследований был сделан вывод о том, что наиболее оптимальным напряжением ЭР является -3,2 кВ – величина, значительно превышающая таковую для типичных условий получения спектров водных ГВ. Состав растворителя также влияет на эффективность ионизации – лучшие результаты соответствуют водно-органическим смесям с максимальным содержанием органической компоненты.

3.3. Обработка масс-спектров ИЦР ПФ

3.2.1. Идентификация молекулярных формул

Масс-спектры ИЦР обрабатывали с использованием программного обеспечения Xcalibur 1.4 (Thermo Electron Corp., Bremen, Germany) и Data Analysis (Bruker Daltonics, USA) для преобразования в масс-лист, который сохраняли в виде текстового файла. Определение брутто-формулы в масс-спектрах исходных ГВ проводилась на ПО «Трансгумус». Полученные формулы были отфильтрованы по сериям статистики разности масс [70] и в соответствии со следующими условиями: $O/C \leq 1$, $H/C \leq 2$, $C \leq 120$, $H \leq 200$, $O \leq 60$, $N \leq 2$, $S \leq 1$. AI рассчитывался из молекулярных формул содержащих C, H, O, N, S и P

$$AI = \frac{1 + C - O - S - 0.5H}{C - O - S - N - P}$$

Распределение кислородных классов высчитывалось по относительному вкладу молекул с одинаковым количеством атомов кислорода в суммарную интенсивность идентифицированных соединений

$$\text{Вклад } (CHO_x) = \frac{\sum_x I(CHO_x)}{\sum_{x=1}^{\max(x)} I(CHO_x)}$$

Распределение интенсивности по компонентам, элементный состав которых соответствует набору основных прекурсоров ГВ, высчитывалось по формуле

$$D_k = \frac{\sum_{i=1}^{N_k} I_i}{\sum_{j=1}^N I_j}, k = 1, 2, \dots, n,$$

Где D_k – вклад класса молекул в суммарную интенсивность, $\sum I_i$ – суммарная интенсивность молекул внутри одного класса, $\sum I_j$ – суммарная интенсивность всех молекул.

Разделение по класса проводили согласно ограничениями, описанными в литературе [4]: Липиды ($0 < O/C < 0.3$, $1.6 \leq H/C < 2.2$), пептиды ($1 \leq N$, $0.1 \leq O/C < 0.65$, $1 \leq H/C < 2.2$), лигнины ($0.1 \leq O/C < 0.65$, $0.7 \leq H/C < 1.6$), конденсированные танины ($0 < O/C < 0.5$, $0.3 \leq H/C < 0.7$), гидролизуемые танины ($0.5 \leq O/C < 1$, $0.3 \leq H/C < 0.7$ и $0.65 \leq O/C < 1$, $0.7 \leq H/C < 1.3$), углеводы ($0.65 \leq O/C < 1$, $1.3 \leq H/C < 2.2$).

3.2.2. Определение серий Н/D обмена и дейтерометилирования

Обработку масс-спектров меченых образцов проводили согласно [180, 181]. Сначала составлялась таблица данных:

$$T_{\text{исходн}} = \{m_i, I_i, c_i, (h-1)_i, o_i\},$$

где m_i – масса i -пика, I_i – интенсивность пиков, c_i , $(h-1)_i$, o_i – элементный состав идентифицированных ионов. Нейтральные СНО молекулы имели молекулярный состав c_i , h_i , o_i .

Затем для каждой формулы из $T_{\text{исходн}}$ находили пики с такими M_n^i , что $(M_n^i - m_i) - k \cdot d < E$, где целочисленные k изменяются от 0, 1..., K , причем K – максимально возможное количество Н/D обменов (дейтерометильных групп), d – разница масс, равная 1.006277 для Н/D обмена и 17.03448 для дейтерометилирования. Ошибка определения во всех экспериментах составляла $E < 1 \cdot 10^{-3}$, что меньше 1 м.д. для выбранного массового диапазона. Далее для всех m_i были получены и проанализированы выделенные участки масс-спектров, состоящие исключительно из пиков серия изотопного обмена

$T_{\text{выдел}}^i = \{M_n^i, I_n^i\}$ для определения количества обменов. Схематично реализованный алгоритм показан на Рис. 3.3. Изучение выделенных масс-спектров проводилось вручную как минимум для 500 самых интенсивных пиков.

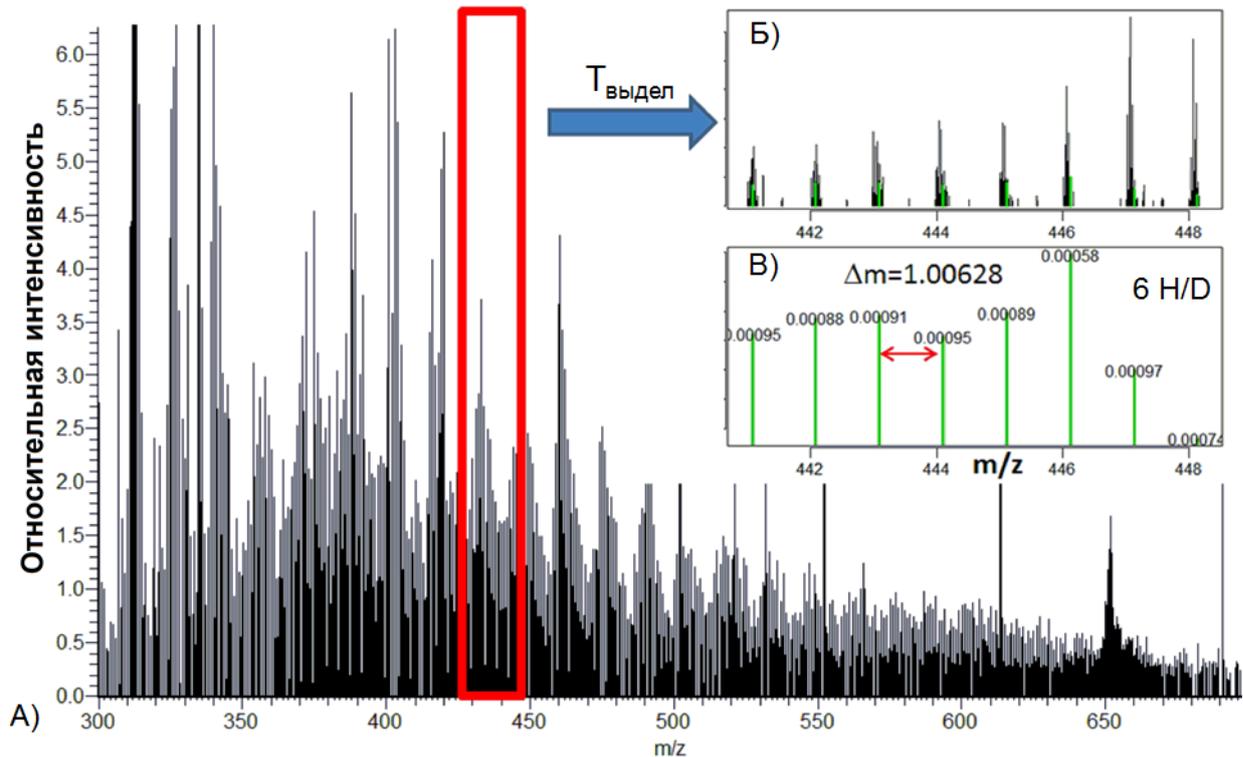


Рис. 3.3. Схема определения серий H/D обмена методом МС ИЦР ПФ. А) Масс-спектр меченого образца Б) определение пиков, отличающихся от материнского иона на разницу масс атомов D и H на примере $m/z=441$ В) подсчет количества пиков, составляющих обменные серии в масс-спектре ИЦР ПФ [208].

3.3. Выделение образцов гуминовых веществ

3.3.1. Методика выделения гуминовых веществ на смоле Amberlite XAD-8

Выделение проводили по стандартной методике МГО [271]. Для этой цели 3 л отобранной цветной воды пропускали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм для удаления взвешенного органического вещества. Профильтрованную воду подкисляли 1М HCl до pH 2. 200 г смолы Amberlite XAD 8 промывали 200 мл этанола и помещали в стеклянную колонку 30 см x 3см². Затем смолу промывали 2 объемами воды, 3 объемами 0,1 М NaOH и 0,1 М HCl. Затем пропускали 3 л. воды, подкисленной до pH 2, со скоростью 10 мл/мин. Эффективность экстракции контролировали измерением оптической плотности элюата при 254 нм. После этого через колонку пропускали 1 объем 0,01М HCl и дистиллированной воды для удаления солей. Затем десорбировали ГВ элюированием 0,1 М NaOH со скоростью 2 мл/мин. В результате получили 200 мл темно-коричневого элюата. Для обессоливания ГВ раствор пропускали через катионообменную смолу в H-форме. Затем обессоленный элюат упаривали на роторном

испарителе при 40 °С и доводили до постоянной массы в вакуумном шкафу при той же температуре. Выход конечного продукта 200 мг. Образец обозначали АНФ-SSX-13.

3.3.2. Методика выделения РОВ на SPE картридже Bond Elut PPL

Выделение проводили по адаптированной методике для РОВ морской воды [224]. Непосредственно перед экстракцией картридж активировали пропусканием 30 мл метанола. Через подготовленный картридж пропускали 2 л. воды, пропущенной через фильтр 0.45 мкм и подкисленной до рН 2, со скоростью 20 мл/мин. Затем картридж промывали 60 мл 0,01 М HCl для полного удаления солей и высушивали в токе воздуха. ГВ элюировали сразу же после высушивания пропусканием 80 мл метанола со скоростью 2 мл/мин. Собранный элюат темно-коричневого цвета упаривали на роторном испарителе. Твердый остаток высушивали в вакуумном шкафу при 40°С. Выход конечного продукта 160 мг. Образец обозначали АНФ-SSP-13.

3.3.3. Методика выделения ГМК на SPE картридже Bond Elute PPL

Для выделения исходных и меченых ГМК была адаптирована методика экстракции растворенного органического вещества морской воды на картридже Bond Elute PPL [224]. По 5 мг образцов было растворено в 10 мл 0.1М NaOH, после чего проводили аккуратное подкисление добавлением 1М HCl до рН= 2 для предотвращения выпадения осадка. Непосредственно перед экстракцией 100 мг картридж активировали пропусканием 6 мл метанола. Через подготовленный картридж пропускали 10 мл раствора образца с рН 2, со скоростью 5 мл/мин. Необходимая скорость создавалась присоединением картриджей к вакуумному коллектору с регулируемым давлением (Текнокрома). Затем картридж промывали 12 мл 0,01 М HCl для полного удаления солей и высушивали в токе воздуха. Элюирование проводили сразу же после высушивания путем пропускания 6 мл метанола со скоростью 2 мл/мин до обесцвечивания элюата. Собранный метанольный раствор темно-коричневого цвета использовали для дальнейшего анализа.

3.3.4. Фракционирование гуминовых веществ на картриджах PPL

Фракционирование образцов SRHA и CHM-Irk на картриджах PPL проводили согласно модифицированной методике [224]. Сначала, рН растворов ГВ было доведено до рН = 7, после чего их пропустили через активированный картридж как это описано выше. Прошедший раствор был собран и далее подкислен до рН = 5 для экстракции на следующем картридже. Таким образом экстракция проводилась при рН = 7, 5, 3 и 2. В результате получили фракции SRHA и CHM-Irk, обозначенные соответствующими индексами, например, CHM-Irk-7.

3.4. Селективное введение дейтериевых меток в состав гуминовых веществ

3.4.1. Проведение реакции Н/Д обмена в источнике ионизации масс-спектрометра

Для проведения обмена в области между иглой распылителя и нагреваемым десольватирующим капилляром масс-спектрометра ИЦР ПФ LTQ-FT располагали медную пластинку, на которую помещали 400 мкл тяжелой воды. В результате создавали атмосферу D₂O, пролетая через которую ионы подвергались Н/Д обмену [179]. Для изменения глубины Н/Д обмена, использовали 2 температуры десольватирующего капилляра: 200 и 400 °С. Для изучения влияния растворителя использовали метанол и смесь вода-метанол (1:1). Эксперименты проводили на модельных соединениях, перечень которых представлен в Таблице 2.7.

3.4.2. Проведение реакции Н/Д обмена скелетных протонов гуминовых веществ

Н/Д обмена скелетных протонов проводился согласно адаптированной методике [223]: смесь 5 мг образца и 300 мкл 4 М NaOD или 16% DCl в D₂O в запаянной стеклянной ампуле выдерживалась 40 ч при 120 °С. После вскрытия ампулы меченые образцы выделяли из реакционной смеси твердофазной экстракцией на картриджах PPL, как это описано в пункте 3.3.

3.4.3. Получение меченных дейтерием модельных соединений

1-амино-2-(3,4-диокси-2,5,6-тридейтерофенил) пропионовая кислота (ДОФА-d₃).

Дейтерирование проводили согласно модифицированной методике [225]. 200 мг ДГФА помещали в стеклянную ампулу, после чего добавляли 660 мкл 4М NaOD. Запаянную ампулу выдерживали при 120 °С в течение 40 ч. После охлаждения, ампулу вскрывали, раствор переносили в стеклянный стакан и подкисляли HCl (конц) до прекращения выпадения осадка. Полученный осадок отфильтровывали на стеклянном фильтре и промывали холодной водой. Выход неочищенного образца составил 193 мг (95%).

2,4-дигидрокси-дейтеробензойная кислота (2,4-ДГБ-d₃) и 5-дейтероацетил-салициловая кислота.

В стеклянную ампулу помещали навеску 150 мг 2,4-ДГБ (5-ацетилсалициловой кислоты), к которой добавляли 660 мкл 4М NaOD. Запаянную ампулу выдерживали при 120 °С в течение 40 ч. После охлаждения, ампулу вскрывали, раствор переносили в стеклянный стакан, разбавляли водой до 5 мл и подкисляли HCl (конц) до pH = 2, после чего экстрагировали этилацетатом (2*10 мл). Объединенные органические фракции сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали на бумажном фильтре и отгоняли растворитель на роторном испарителе. Выход неочищенного образца составил 130 мг (86%).

3.4.4. Проведение реакции дейтерометилирования гуминовых веществ

Этерификация карбоксильных групп проводилась по модифицированной методике [257, 258]. В круглодонной колбе на 10 мл, снабженной магнитной мешалкой, растворяли 1 мг ГВ в 1.5 мл CD₃OD. Затем на ледяной бане при интенсивном перемешивании добавляли по каплям тионилхлорид (60 мкл). После добавления реагента, убирали охлаждение, и смесь кипятили 4 ч с обратным холодильником. Затем отгоняли растворитель на роторном испарителе. Твердый остаток растворяли в 1.5 мл охлажденного 1М NaOH, разбавляли водой и выделяли на картридже PPL, как это описано в пункте 3.3.

3.5. Синтез структурных аналогов гуминовых веществ

4-этоксикарбонилокси-3-метоксибензойная кислота [272] (1)

В трехгорлой колбе, снабженной магнитной мешалкой, капельной воронкой и термометром, растворили 5,00 г (0,029 моль) ванилиновой кислоты в растворе 3,35 г NaOH (0,084 моль) в 20 мл воды. Охладили раствор в ледяной бане и медленно прикапали 4,54 мл (0,047 моль) этилхлорформиата, при этом температура не поднималась выше 5°C. Раствор перемешивали 4 часа, после чего подкислили соляной кислотой до pH 5. Выпавший осадок отфильтровали, промыли водой, перекристаллизовали из спирта.

Выход: 5,11 г (72%). $T_{пл} = 147-149^{\circ}\text{C}$.

ЯМР ¹H (δ, м.д.): 7,79-7,74 (м, 2H, Ph), 7,26 (д, J=8,2 Hz, 1H, Ph), 4,35 (к, J = 6,93 Hz, 2H, CH₃CH₂O), 3,95 (с, 3H, CH₃O), 1,41 (т, J = 7,11 Hz, 3H, CH₃CH₂O).

ЯМР ¹³C (δ, м.д.): 171,4 (COOH), 152,6 (COOEt), 151,2 (Ph, четв.), 144,5 (Ph, четв.), 128,0 (Ph, четв.), 123,4 (Ph), 122,5 (Ph), 113,9 (Ph), 65,3 (CH₃CH₂O), 56,2 (OCH₃), 14,1 (CH₃CH₂O).

Калий этилмалонат [273]

В трехгорлой колбе, снабженной магнитной мешалкой, капельной воронкой и обратным холодильником, растворили 50,00 г малонового эфира (0,313 моль) в 200 мл абсолютного спирта в среде аргона. При интенсивном перемешивании прибавили по каплям раствор 17,50 г KOH в 200 мл абсолютного спирта. Затем перемешивали еще два часа. Полученный осадок оставили на ночь. На следующий день нагрели смесь до кипения и провели горячее фильтрование. Маточный раствор охладили на ледяной бане, выпавший осадок отфильтровали, промыли небольшим количеством эфира и высушили на воздухе. Выход 40,20 г (75%).

Синтез безводного хлорида магния [274]

В трехгорлой колбе на 500 мл, снабженной магнитной мешалкой и обратным холодильником, соединенным с аргоновой системой, и капельной воронкой, поместили 12,49 г Mg (0,520 моль) и 200,0 мл ТГФ. Прикапали небольшое количество дихлорэтана. После того, как

реакция началась, медленно прикапали 60,5 мл (0,6 моль) дихлорэтана в 50 мл ТГФ. После прибавления всего дихлорэтана смесь кипятили 50 минут. Затем растворитель упарили в вакууме водоструйного насоса, и осадок высушили на масляном насосе.

Этил 3-(4-(этоксикарбонилокси)-3-метоксифенил)-3-оксопропионат (2)

Растворили 12,48 г (0,052 моль) ванилиновой кислоты в 200 мл ТГФ и добавили 9,30 г карбонилдимидазола (0,057 моль). Перемешивали в течение часа. В отдельной колбе смешали 8,84 г (0,052 моль) калий этилмалоната и 7,41 г (0,078 моль) $MgCl_2$. Перенесли эту смесь в первую колбу, смесь перемешивали 12 часов. Растворитель упарили в вакууме, затем осадок растворили в хлористом метиле и промыли 20% лимонной кислотой. Органическую фазу очистили флэш-хроматографией, элюент – гексан/этилацетат (1:1).

Выход: 8,23 г (52%).

Найдено, %: Н 5,82, С 58,04. $C_{15}H_{18}O_7$. Вычислено, %: С 58,06, Н 5,85.

ЯМР 1H (δ , м.д.): 7,85-7,16 (м, 3H, Ph), 4,36-4,19 (м, 4H, $(OCH_2CH_3)_2$), 3,98 (с, 2H, $PhC(O)CH_2$), 3,91 (с, 3H, OCH_3), 1,40-1,23 (м, 6H, $(OCH_2CH_3)_2$).

ЯМР ^{13}C (δ , м.д.): 191,3 ($PhC=O$), 167,3 (CH_2COOEt), 152,5 ($PhOCOEt$), 151,6 (Ph, четв.), 144,4 (Ph, четв), 134,8 (Ph, четв), 122,5 (Ph), 122,0 (Ph), 111,9 (Ph), 65,3 (CH_2CH_3), 61,6 (CH_2CH_3), 56,1 (OCH_3), 45,9 (CH_2COOEt), 14,1 (CH_2CH_3), 14,0 (CH_2CH_3).

1-(4-гидрокси-3-метоксифенил)этанон

В круглодонной колбе, снабженной магнитной мешалкой и обратным холодильником, растворили 300 мг (0,0009 моль) этил 3-(4-(этоксикарбонилокси)-3-метоксифенил)-3-оксопропаноата (2) в минимальном количестве спирта после чего объем раствора довели до 100 мл 3M NaOH. Смесь при интенсивном перемешивании кипятили 2 часа. Затем довели до комнатной температуры, и упарили растворитель на вакууме. Затем осадок перерастворили в воде, после чего подкислили соляной кислотой до pH 1. Выпавший осадок отфильтровали, промыли холодной водой, перекристаллизовали из спирта.

Выход: 262 мг (87%).

ЯМР 1H (δ , м.д.): 7,79-7,51 (м, 2H, Ph), 6,95 (д, $J=8,2$ Hz, 1H, Ph), 3,93 (с, 3H, CH_3O), 2,56 (с, 3H, $(C=O)CH_3$).

ЯМР ^{13}C (δ , м.д.): 197,26 ($PhC=O$), 150,95 (Ph, четв.), 146,99 (Ph, четв.), 130,07 (Ph, четв.), 124,11 (Ph), 114,21 (Ph), 110,22 (Ph), 56,04 (OCH_3), 26,07 ($(C=O)CH_3$).

Сополимеризация этил 3-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-3-оксопропионата с гидрохиноном [197]

В колбе, снабженной магнитной мешалкой и обратным холодильником, поместили 1,000 г (0,003 моль) этил 3-(4-(этоксикарбонилокси)-3-метоксифенил)-3-оксопропаноата (2) в 100 мл 3M NaOH. Смесь кипятили в течение 2х часов. Дали раствору охладиться до комнатной температуры, разбавили в три раза водой и добавили 0,66 г гидрохинона (0,006 моль). Затем

раствор нагрели до 60 °С. В течение получаса порционно добавляли 3,240 г $K_2S_2O_8$. После добавления раствор перемешивали еще час. Затем довели до комнатной температуры и подкислили 2М HCl. При подкислении выпал осадок МНQ-НА. Осадок выделили центрифугированием. Маточный раствор довели до pH 2 и пропустили через сорбент XAD-8. Сорбированную часть смыли 0,1 М раствором NaOH и пропустили через катионит Amberlite IR 120. В результате получили вещество МНQ-ФА.

МНQ-НА:

Выход: 90 мг.

Найдено, %: Н 5,16 С 67,45.

ГПХ: $M_w = 6.3$ кДа, $M_n = 3.3$ кДа, ПД (M_w/M_n) = 1.90.

ЯМР 1H (ДМСO-d₆, δ , м.д.): 10,14-9,70 (уш. с, 1H, COOH), 7,7-6,64 (м, 5H, Ph), 4,36-2,76 (м, 6H, CH₂COOH+OCH₃), 2,73-2,20 (уш. с, 3H, α -CH₃), 1,62-0,47 (м, 5H, CH_n)

ЯМР ^{13}C (0,3 М NaOD/D₂O, δ , м.д.): 186-172 (обл. (C=O)CH₂COOH), 167-135 (Ph, кислородзамещ.), 135-99 (Ph), 58-51 (OCH₃), 31-26 (обл. (C=O)CH₂).

ИК (см⁻¹): 3500-3200 (OH), 1702 (C=O), 1625-1592 (2 полосы, C-C, Ph), 1458 (CH, деф.), 1209 (PhOCH₃).

МНQ-ФА:

Выход: 532 мг.

Найдено, %: Н 4,26, С 52,67.

ГПХ: $M_w = 6.9$ кДа, $M_n = 3.7$ кДа, ПД (M_w/M_n) = 1.86.

ЯМР 1H (ДМСO-d₆, δ , м.д.): 10,14-9,70 (уш. с, 1H, COOH), 7,92-6,30 (м, 4H, Ph), 5,94-4,91 (уш. с, 1H, PhOH), 4,56-2,76 (м, 10H, CH₂COOH+ OCH₃), 2,72-2,12 (уш. с, 3H, α -CH₃), 1,55-0,51 (м, 2H, CH_n).

ВЫВОДЫ

1. На основании исследования молекулярного состава ГВ методом МС ИЦР ПФ показано, что в составе угольных ГВ доминируют конденсированные таннины (> 45% от общего количества идентификаций), в торфяных и почвенных ГВ - лигнины (> 44%), в водных ГВ - гидролизуемые таннины (> 55%).
2. Установлено, что окислительная поликонденсация лигнинного мономера и гидрохинона позволяет воссоздать более 50% лигнинно-полифенольных компонентов природных ГВ. Предложен подход к определению типа структурной изомерии аналогов ГВ с помощью изотопного обмена и МС ИЦР ПФ.
3. Показано, что в условиях ионизации электрораспылением активные центры молекул, участвующие в кето-енольной таутомерии, подвергаются Н/D обмену с D₂O в заряженных микрокаплях аналогично реакциям в растворах.
4. Применение реакций селективного Н/D обмена в комбинации с МС ИЦР ПФ впервые позволило идентифицировать различные изомеры в составе ароматических фрагментов угольных ГВ: установлено, что лигнинные компоненты различаются количеством ОСН₃ – групп в ароматическом кольце, предложен порядок расположения заместителей в кольце флавоноидных фрагментов.
5. Сочетание методов дейтерометилирования и МС ИЦР ПФ впервые позволило определить количество СООН-групп в индивидуальных компонентах ГВ. Установлено, что молекулярные компоненты с одинаковым количеством СООН групп характеризуются близким элементным составом вне зависимости от источника происхождения ГВ. Впервые осуществлено разделение ГВ на фракции в соответствии с реакционной способностью их кислотных групп.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AI – индекс ароматичности

M_n – среднечисленная масса

M_w – средневзвешенная масса

H/D - дейтериеводородный

HQ – гидрохинон

SPE – твердофазная экстракция

ГВ – гуминовые вещества

ГК – гуминовые кислоты

ГМК – гимномелановые кислоты

ГПХ – гель-проникающая хроматография

ДГБ – дигидроксibenзойная кислота

ДМСО – диметилсульфоксид

ДОФА – диоксифенилаланин

КМД – дефект масс Кендрика

МС ИЦР ПФ – масс-спектрометрия ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье

ПД - полидисперсность

ПМР – протонный магнитный резонанс

РОВ – растворенное органическое вещество

ФК – фульвокислоты

ЭР - электрораспыление

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

ВЫРАЖЕНИЕ ПРИЗНАТЕЛЬНОСТИ

Автор выражает глубокую признательность:

- Научному руководителю д.х.н. проф. Перминовой И.В. за всестороннюю помощь в выполнении работы.
- Рабочему коллективу лаборатории Перминовой И.В. за оказанную помощь в создании выборки ГВ, отборе образцов ГВ из двух природных вод и проведении анализа образцов методом спектроскопии ЯМР.
- Сотруднику кафедры органической химии к.х.н. Зайцеву К.В. за помощь в проведении синтетических экспериментов.
- Приокско-террасному государственному природному биосферному заповеднику за разрешение отобрать пробы из о. Сионское и р. Паниковка.
- Заведующему лаборатории масс-спектрометрии биомакромолекул ИБХФ РАН Проф. Николаеву Е. Н., к.ф.-м.н. Кононихину А.С. и к.ф.-м.н. Костюкевичу Ю. И. за помощь в проведении анализа образцов методом МС ИЦР ПФ, проведении экспериментов по изотопному обмену в источнике ионизации, написания ПО для реализации алгоритма подсчета серий изотопного обмена и помощь в интерпретации данных.

А также организациям, оказавшим финансовую поддержку при выполнении данной работы:

- Международному гуминовому обществу IHSS
- Российскому Фонду фундаментальных исследований (гранты 16-33-00914 мол_а, 13-04-01853 А, 16-04-01753 А, 16-03-01057 А)
- Российскому научному фонду (гранты 16-14-00167 и 14-24-00114)

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hertkorn N., Ruecker C., Meringer M., Gugisch R., Frommberger M., Perdue E.M., Witt M., Schmitt-Kopplin P. High-precision frequency measurements: indispensable tools at the core of the molecular-level analysis of complex systems // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2007. – V. 389. – № 5. – P. 1311–1327.
2. Kim S., Kramer R.W., Hatcher P.G. Graphical method for analysis of ultrahigh-resolution broadband mass spectra of natural organic matter, the van Krevelen diagram // *Anal. Chem.* – 2003. – V. 75. – № 20. – P. 5336–5344.
3. Kujawinski E.B., Behn M.D. Automated analysis of electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectra of natural organic matter // *Anal. Chem.* – 2006. – V. 78. – № 13. – P. 4363–4373.
4. Hockaday W.C., Purcell J.M., Marshall A.G., Baldock J.A., Hatcher P.G. Electrospray and photoionization mass spectrometry for the characterization of organic matter in natural waters: a qualitative assessment // *Limnol. Oceanogr.* – 2009. – V. 7. – P. 81–95.
5. Witt M., Fuchser J., Koch B.P. Fragmentation studies of fulvic acids using collision induced dissociation fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry // *Anal. Chem.* – 2009. – V. 81. – № 7. – P. 2688–2694.
6. Solouki T., Freitas M.A., Alomary A. Gas-Phase Hydrogen/Deuterium Exchange Reactions of Fulvic Acids: An Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectral Study // *Anal. Chem.* – 1999. – V. 71. – № 20. – P. 4719–4726.
7. MacCarthy P. The principles of humic substances // *Soil Sci.* – 2001. – V. 166. – № 11. – P. 738–751.
8. Schnitzer M., Kahn S.U. Humic substances in the environment / M. Dekker, – 1972.
9. Thurman E.M. Organic Geochemistry of Natural Waters. / Dordrecht: Springer, – 1985.
10. Stevenson F.J. Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions, Second Edition (Stevenson, F. J.) // *J. Chem. Educ.* – 1995. – V. 72. – № 4. – P. A93.
11. Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации / М.: Изд-во Моск. Ун-та, – 1990. – 324 с.
12. Rice J.A., MacCarthy P. Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances // *Org. Geochem.* – 1991. – V. 17. – № 5. – P. 635–648.
13. Кононова М.М. Органическое вещество почвы, его природа, свойства и методы изучения. Изд-во Академии наук СССР, – 1963.
14. Орлов Д.С. Химия почв: учебник / М.: Изд-во Моск. Ун-та, – 1985. – 376 с.
15. Migration and Fate of Pollutants in Soils and Subsoils / ed. Petruzzelli D., Helfferich F.G. Berlin: Springer, – 1993.
16. Schulten H.R. A chemical structure for humic acid. Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry and pyrolysis-soft ionization mass spectrometry evidence // *Humic Subst. Glob. Environ.* – 1994. – P. 43–56.
17. Stevenson F.J., Goh K.M. Infrared spectra of humic and fulvic acids and their methylated

- derivatives: evidence for nonspecificity of analytical methods for oxygen-containing functional groups // *Soil Sci.* – 1972. – V. 113. – № 5. – P. 334-345.
18. Kleinhempel D. Ein Beitrag zur Theorie des Huminstoffzustandes // *Arch. Agron. Soil Sci.* – 1970. – V. 14. – № 1. – P. 3–14.
 19. Shevchenko S.M., Bailey G.W. The mystery of the lignin-carbohydrate complex: A computational approach // *J. Mol. Struct. Theochem.* – 1996. – V. 364. – № 2. – P. 197–208.
 20. Piccolo A. The supramolecular structure of humic substances // *Soil Sci.* – 2001. – V. 166. – № 11. – P. 810–832.
 21. Piccolo A. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science // *Adv. Agron.* – 2002. – V. 75. – P. 57–134.
 22. Wershaw R.L., Burcar P.J., Sutula C.L., Wiginton B.J. Sodium humate solution studied with small-angle x-ray scattering // *Science.* – 1967. – V. 157. – № 3795. – P. 1429–1431.
 23. Haan H., Jones R.I., Salonen K. Does ionic strength affect the configuration of aquatic humic substances, as indicated by gel filtration? // *Freshw. Biol.* – 1987. – V. 17. – № 3. – P. 453–459.
 24. Piccolo A., Nardi S., Concheri G. Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size exclusion chromatography // *Chemosphere.* – 1996. – V. 33. – № 4. – P. 595–602.
 25. Piccolo A., Conte P., Trivellone E., van Lagen B., Buurman P. Reduced heterogeneity of a lignite humic acid by preparative HPSEC following interaction with an organic acid. Characterization of size-separates by Pyr-GC-MS and ¹H-NMR spectroscopy // *Environ. Sci. Technol.* – 2002. – V. 36. – № 1. – P. 76–84.
 26. Perminova I. V., Frimmel F.H., Kudryavtsev A. V., Kulikova N.A., Abbt-Braun G., Hesse S., Petrosyan V.S. Molecular Weight Characteristics of Humic Substances from Different Environments As Determined by Size Exclusion Chromatography and Their Statistical Evaluation // *Environ. Sci. Technol.* – 2003. – V. 37. – № 11. – P. 2477–2485.
 27. Lehn J.M. Supramolecular chemistry // *Science.* – 1993. – V. 260. – № 5115. – P. 1762–1763.
 28. Nebbioso A., Piccolo A. Basis of a humeomics science: chemical fractionation and molecular characterization of humic biosuprastructures // *Biomacromolecules.* – 2011. – V. 12. – № 4. – P. 1187–1199.
 29. Fiorentino G., Spaccini R., Piccolo A. Separation of molecular constituents from a humic acid by solid-phase extraction following a transesterification reaction // *Talanta.* – 2006. – V. 68. – № 4. – P. 1135–1142.
 30. Cabaniss S.E., Madey G., Leff L., Maurice P.A., Wetzel R. A stochastic model for the synthesis and degradation of natural organic matter. Part I. Data structures and reaction kinetics // *Biogeochemistry.* – 2005. – V. 76. – № 2. – P. 319–347.
 31. Cabaniss S.E., Madey G., Leff L., Maurice P.A., Wetzel R. A stochastic model for the synthesis and degradation of natural organic matter part II: molecular property distributions // *Biogeochemistry.* – 2007. – V. 86. – № 3. – P. 269–286.
 32. Kaupenjohann M., Friedel J. Haider, K. Biochemie des Bodens // *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkd.* – 1997. – V. 160. – № 1. – P. 115–115.
 33. Steelink C., Wershaw R.L., Thorn K.A., Wilson M.A. Application of liquid-state NMR

- spectroscopy to humic substances // *Humic Subst. II. In Search of Structure.* – 1989. – P. 281–308.
34. Орлов Д.С., Садовникова Л.К., Саврова А.Л. Сравнительное изучение сорбционного поглощения тяжелых металлов гуминовыми кислотами различного происхождения // *Докл. РАН, сер. Геохимия.* – 1995. – Т. 345. – № 4. – С. 1.
 35. Petrosyan V.S., Perminova I. V, Yashchenko N.Y. Detoxification of heavy metals, polyaromatic hydrocarbons and pesticides by humic substances in waters and soils // *Int. Congr. Water Ecol. Technol.* – 1994. – P. 1136–1142.
 36. Kulikova N.A., Stepanova E. V, Koroleva O. V. Mitigating activity of humic substances: direct influence on biota / *In Use humic Subst. to remediati. polluted environ.: from theory to pract.* Springer, – 2005. – P. 285–309.
 37. Steinbüchel A., Marchessault R.H. *Biopolymers for medical and pharmaceutical applications* / John Wiley, – 2005.
 38. Klöcking R., Helbig B. Medical aspects and applications of humic substances // *Biopolym. Med. Pharm. Appl.* – 2005. – P. 3–16.
 39. Корнилаева Г.В., Перминова И.В., Гилязова А.В., Хаметова К.М., Карамов Э.В. Гуминовые вещества как перспективные соединения для создания антибиотических препаратов // *Российский иммунологический журнал.* 2010. Т. 4. № 3. С. 255–260.
 40. Hedges J.I. Polymerization of humic substances in natural environments // *Humic Subst. their role Environ.* – 1988. – V. 41. – P. 45–58.
 41. Karhunen P., Rummakko P., Sipilä J., Brunow G., Kilpeläinen I. The formation of dibenzodioxocin structures by oxidative coupling. A model reaction for lignin biosynthesis // *Tetrahedron Lett.* – 1995. – V. 36. – № 25. – P. 4501–4504.
 42. Flaig W., Beutelspacher H., Rietz E. Chemical composition and physical properties of humic substances: incollection // *Soil components.* – 1975. – P. 1–211.
 43. Piccolo A., Spaccini R., Nieder R., Richter J. Sequestration of a biologically labile organic carbon in soils by humified organic matter // *Clim. Change.* – 2004. – V. 67. – № 2. – P. 329–343.
 44. Зефилов Н.С., Кулов Н.Н. *Химическая энциклопедия.* / М.: Изд-во "Большая российская энциклопедия", – 1995. – Т. 4. – С. 524.
 45. Боголицын К.Г., Лунин В.В., Косяков Д.С. и др. *Физическая химия лигнина* / М. Академкнига, – 2010.
 46. Ralph J., Lundquist K., Brunow G., Lu F., Kim H., Schatz P.F., Marita J.M., Hatfield R.D., Ralph S.A., Christensen J.H. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids // *Phytochem. Rev.* – 2004. – V. 3. – № 1–2. – P. 29–60.
 47. Brunow G., Kilpeläinen I., Sipilä J., Syrjänen K., Karhunen P., Setälä H., Rummakko P. *Oxidative coupling of phenols and the biosynthesis of lignin* / American Chemical Society, – 1998.
 48. Ertel J.R., Hedges J.I. The lignin component of humic substances: distribution among soil and sedimentary humic, fulvic, and base-insoluble fractions // *Geochim. Cosmochim. Acta.* – 1984. – V. 48. – № 10. – P. 2065–2074.
 49. Newman R.H., Condron L.M. Separating subspectra from cross-polarization magic-angle

- spinning nuclear magnetic resonance spectra by proton spin relaxation editing // *Solid State Nucl. Magn. Reson.* – 1995. – V. 4. – № 5. – P. 259–266.
50. Chefetz B., Tarchitzky J., Deshmukh A.P., Hatcher P.G., Chen Y. Structural Characterization of Soil Organic Matter and Humic Acids in Particle-Size Fractions of an Agricultural Soil // *Soil Sci. Soc.* – 2002. – V. 66. – № 1. – P. 129.
 51. Hertkorn N., Ruecker C., Meringer M., Gugisch R., Frommberger M., Perdue E.M., Witt M., Schmitt-Kopplin P. High-precision frequency measurements: indispensable tools at the core of the molecular-level analysis of complex systems // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2007. – V. 389. – № 5. – P. 1311–1327.
 52. Sleighter R.L., Hatcher P.G. The application of electrospray ionization coupled to ultrahigh resolution mass spectrometry for the molecular characterization of natural organic matter // *J. Mass Spectrom.* – 2007. – V. 42. – № 5. – P. 559–574.
 53. Kebarle P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry // *J. Mass Spectrom.* – 2000. – V. 35. – № 7. – P. 804–817.
 54. Marshall A.G., Hendrickson C.L., Jackson G.S. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer // *Mass Spectrom. Rev.* – 1998. – V. 17. – № 1. – P. 1–35.
 55. Лебедев А. Масс-спектрометрия для анализа объектов окружающей среды / Litres, – 2016.
 56. Marshall A.G., Hendrickson C.L., Jackson G.S. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer // *Mass Spectrom. Rev.* – 1998. – V. 17. – № 1. – P. 1–35.
 57. Marshall A.G., Hendrickson C.L. Fourier transform ion cyclotron resonance detection: principles and experimental configurations // *Int. J. Mass Spectrom.* – 2002. – V. 215. – № 1. – P. 59–75.
 58. He F., Hendrickson C.L., Marshall A.G. Baseline mass resolution of peptide isobars: a record for molecular mass resolution // *Anal. Chem.* – 2001. – V. 73. – № 3. – P. 647–650.
 59. Robb D.B., Covey T.R., Bruins A.P. Atmospheric pressure photoionization: an ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry // *Anal. Chem.* – 2000. – V. 72. – № 15. – P. 3653–3659.
 60. Stenson A.C., Marshall A.G., Cooper W.T. Exact masses and chemical formulas of individual Suwannee River fulvic acids from ultrahigh resolution electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectra // *Anal. Chem.* – 2003. – V. 75. – № 6. – P. 1275–1284.
 61. Stenson A.C., Landing W.M., Marshall A.G., Cooper W.T. Ionization and Fragmentation of Humic Substances in Electrospray Ionization Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry // *Anal. Chem.* – 2002. – V. 74. – № 17. – P. 4397–4409.
 62. Meija J. Mathematical tools in analytical mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2006. – V. 385. – № 3. – P. 486–499.
 63. Kujawinski E.B., Hatcher P.G., Freitas M.A. High-Resolution Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry of Humic and Fulvic Acids: Improvements and Comparisons // *Anal. Chem.* – 2002. – V. 74. – № 2. – P. 413–419.
 64. Gaspar A., Kunenkov E. V, Lock R., Desor M., Perminova I., Schmitt-Kopplin P. Combined utilization of ion mobility and ultra-high-resolution mass spectrometry to identify multiply charged constituents in natural organic matter // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2009. – V. 23. – № 5. – P. 683–688.

65. Kendrick E. A Mass Scale Based on $CH_2 = 14.0000$ for High Resolution Mass Spectrometry of Organic Compounds // *Anal. Chem.* – 1963. – V. 35. – № 13. – P. 2146–2154.
66. Wu Z., Jernström S., Hughey C.A., Rodgers R.P., Marshall A.G. Resolution of 10 000 Compositionally Distinct Components in Polar Coal Extracts by Negative-Ion Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry // *Energy & Fuels.* – 2003. – V. 17. – № 4. – P. 946–953.
67. Hughey C.A., Rodgers R.P., Marshall A.G., Qian K., Robbins W.K. Identification of acidic NSO compounds in crude oils of different geochemical origins by negative ion electrospray Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry // *Org. Geochem.* – 2002. – V. 33. – № 7. – P. 743–759.
68. Wu Z., Rodgers R.P., Marshall A.G. Two- and three-dimensional van krevelen diagrams: a graphical analysis complementary to the kendrick mass plot for sorting elemental compositions of complex organic mixtures based on ultrahigh-resolution broadband fourier transform ion cyclotron resonance // *Anal. Chem.* – 2004. – V. 76. – № 9. – P. 2511–2516.
69. Kujawinski E.B., Freitas M.A., Zang X., Hatcher P.G., Green-Church K.B., Jones R.B. The application of electrospray ionization mass spectrometry (ESI MS) to the structural characterization of natural organic matter // *Org. Geochem.* – 2002. – V. 33. – № 3. – P. 171–180.
70. Kunenkov E. V, Kononikhin A.S., Perminova I. V, Hertkorn N., Gaspar A., Schmitt-Kopplin P., Popov I.A., Garmash A. V, Nikolaev E.N. Total Mass Difference Statistics Algorithm: A New Approach to Identification of High-Mass Building Blocks in Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Mass Spectrometry Data of Natural Organic Matter // *Anal. Chem.* – 2009. – V. 81. – № 24. – P. 10106–10115.
71. Longnecker K., Futrelle J., Coburn E., Soule M.C.K., Kujawinski E.B. Environmental metabolomics: Databases and tools for data analysis // *Mar. Chem.* – 2015. – V. 177. – P. 366–373.
72. Qi Y., Hempelmann R., Volmer D.A. Two-dimensional mass defect matrix plots for mapping genealogical links in mixtures of lignin depolymerisation products // *Anal. Bioanal. Chem.* Springer Berlin Heidelberg, – 2016. – V. 408. – № 18. – P. 4835–4843.
73. Tziotis D., Hertkorn N., Schmitt-Kopplin P. Letter: Kendrick-analogous network visualisation of ion cyclotron resonance Fourier transform mass spectra: improved options for the assignment of elemental compositions and the classification of organic molecular complexity // *Eur. J. Mass Spectrom.* – 2011. – V. 17. – № 4. – P. 415.
74. Van Krevelen D.W. Graphical-statistical method for the study of structure and reaction processes of coal // *Fuel.* – 1950. – V. 29. – P. 269--284.
75. Waggoner D.C., Chen H., Willoughby A.S., Hatcher P.G. Formation of black carbon-like and alicyclic aliphatic compounds by hydroxyl radical initiated degradation of lignin // *Org. Geochem.* – 2015. – V. 82. – P. 69–76.
76. Sleighter R.L., Hatcher P.G. Fourier transform mass spectrometry for the molecular level characterization of natural organic matter: Instrument capabilities, applications, and limitations / INTECH, – 2011.
77. Benecke C., Grund R., Hohberger R., Kerber A., Laue R., Wieland T. MOLGEN+, a generator of connectivity isomers and stereoisomers for molecular structure elucidation // *Anal. Chim. Acta.* – 1995. – V. 314. – № 3. – P. 141–147.

78. Hu C.-Y., Xu L. Developing molecular identification numbers by an all-paths method // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* – 1997. – V. 37. – № 2. – P. 311–315.
79. Kim S., Kaplan L.A., Benner R., Hatcher P.G. Hydrogen-deficient molecules in natural riverine water samples—evidence for the existence of black carbon in DOM // *Mar. Chem.* – 2004. – V. 92. – № 1. – P. 225–234.
80. Koch B.P., Dittmar T. From mass to structure: an aromaticity index for high-resolution mass data of natural organic matter // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2006. – V. 20. – № 5. – P. 926–932.
81. Novotny N.R., Capley E.N., Stenson A.C. Fact or artifact: the representativeness of ESI-MS for complex natural organic mixtures // *J. Mass Spectrom.* – 2014. – V. 49. – № 4. – P. 316–326.
82. Popov I.A., Nagornov K., Vladimirov G.N., Kostyukevich Y.I., Nikolaev E.N. Twelve million resolving power on 4.7 T Fourier transform ion cyclotron resonance instrument with dynamically harmonized cell—observation of fine structure in peptide mass spectra // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2014. – V. 25. – № 5. – P. 790–799.
83. Capley E.N., Tipton J.D., Marshall A.G., Stenson A.C. Chromatographic reduction of isobaric and isomeric complexity of fulvic acids to enable multistage tandem mass spectral characterization // *Anal. Chem.* – 2010. – V. 82. – № 19. – P. 8194–8202.
84. Stenson A.C., Ruddy B.M., Bythell B.J. Ion molecule reaction H/D exchange as a probe for isomeric fractionation in chromatographically separated natural organic matter // *Int. J. Mass Spectrom.* – 2014. – V. 360. – P. 45–53.
85. Pohlabein A.M., Dittmar T. Novel insights into the molecular structure of non-volatile marine dissolved organic sulfur // *Mar. Chem.* – 2015. – V. 168. – P. 86–94.
86. Skjellberg U., Qian J., Frech W., Xia K., Bleam W.F. Distribution of mercury, methyl mercury and organic sulphur species in soil, soil solution and stream of a boreal forest catchment // *Biogeochemistry.* – 2003. – V. 64. – № 1. – P. 53–76.
87. Cutter G.A., Cutter L.S., Filippino K.C. Sources and cycling of carbonyl sulfide in the Sargasso Sea // *Limnol. Oceanogr.* – 2004. – V. 49. – № 2. – P. 555–565.
88. Lobo G.-A.M., Chitre S.A., Rathod S.M., Smith R.B., Leslie R., Livingstone C., Davis J. Determination of total reduced thiol levels in plasma using a bromide substituted quinone // *Electroanalysis.* – 2007. – V. 19. – № 24. – P. 2523–2528.
89. Bahrami K., Khodaei M.M., Sohrabnezhad S. Cyanuric chloride as promoter for the oxidation of sulfides and deoxygenation of sulfoxides // *Tetrahedron Lett.* – 2011. – V. 52. – № 48. – P. 6420–6423.
90. Hertkorn N., Kettrup A. Molecular Level Structural Analysis of Natural Organic Matter and of Humic Substances by Multinuclear and Higher Dimensional NMR Spectroscopy // *Use Humic Subst. to Remediat. Polluted Environ. From Theory to Pract.* Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, – 2005. – P. 391–435.
91. Aiken G.R., McKnight D.M., Wershaw R.L., MacCarthy P. Humic substances in soil, sediment, and water: geochemistry, isolation and characterization / *J. Wiley & Sons*, – 1985. – 561-582 p.
92. Schnitzer M., Preston C.M. Analysis of humic acids by solution and solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance // *Soil Sci. Soc.* – 1986. – V. 50. – № 2. – P. 326–331.

93. Hertkorn N., Permin A., Perminova I., Kovalevskii D., Yudov M., Petrosyan V., Kettrup A. Comparative analysis of partial structures of a peat humic and fulvic acid using one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy // *J. Environ. Qual.* – V. 31. – № 2. – P. 375–387.
94. Kovalevskii D. V, Permin A.B., Perminova I. V, Petrosyan V.S. Conditions for acquiring quantitative ^{13}C NMR spectra of humic substances // *Moscow Univ. Chem. Bull.* – 2000. – V. 41. – P. 39–42.
95. Wilson M.A. *NMR Techniques and Applications in Geochemistry and Soil Chemistry* / Elsevier, – 2013.
96. Nanny M.A., Leenheer J.A., Minear R.A. *Nuclear magnetic resonance spectroscopy in environmental chemistry* / Oxford University Press, – 1997.
97. Averett R.C., Leenheer J.A., McKnight D.M., Thorn K.A. Humic substances in the Suwannee River, Georgia; interactions, properties, and proposed structures / *Water Supply Pap.* – 1994.
98. Ковалевский Д.В., Пермин А.Б., Перминова И.В., Коннов Д.В., Петросян В.С. Количественное определение обменных и скелетных протонов гумусовых кислот с помощью спектроскопии ПМР // *Вестник МГУ, сер. Хим.* – 1999. – Т. 2. – С. 375–380.
99. Ruggiero P., Interesse F., Cassidei L., Sciacovelli O. ^1H NMR spectra of humic and fulvic acids and their peracetic oxidation products // *Geochim. Cosmochim. Acta.* – 1980. – V. 44. – № 4. – P. 603–609.
100. Kovalevskii D. V, Permin A.B., Perminova I. V, Konnov D. V, Petrosyan V.S. Quantitative ^1H NMR spectroscopic determination of exchangeable and backbone protons of humic substances // *Moscow Univ. Chem. Bull.* – 1999. – V. 40. – P. 375–380.
101. Abate G., Masini J.C. Acid-basic and complexation properties of a sedimentary humic acid. A study on the Barra Bonita reservoir of Tietê river, São Paulo State, Brazil // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2001. – V. 12. – № 1. – P. 109–116.
102. Perminova I. V, Grechishcheva N.Y., Petrosyan V.S. Relationships between structure and binding affinity of humic substances for polycyclic aromatic hydrocarbons: Relevance of molecular descriptors // *Environ. Sci. Technol.* – 1999. – V. 33. – № 21. – P. 3781–3787.
103. Wong M.T.F., Nortcliff S., Swift R.S. Method for determining the acid ameliorating capacity of plant residue compost, urban waste compost, farmyard manure, and peat applied to tropical soils // *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* – 1998. – V. 29. – № 19–20. – P. 2927–2937.
104. Ritchie J.D., Perdue E.M. Analytical constraints on acidic functional groups in humic substances // *Org. Geochem.* – 2008. – V. 39. – № 6. – P. 783–799.
105. Kinniburgh D.G., Milne C.J., Benedetti M.F., Pinheiro J.P., Filius J., Koopal L.K., Van Riemsdijk W.H. Metal Ion Binding by Humic Acid: Application of the NICA-Donnan Model // *Environ. Sci. Technol.* – 1996. – V. 30. – № 5. – P. 1687–1698.
106. Hertkorn N., Benner R., Frommberger M., Schmitt-Kopplin P., Witt M., Kaiser K., Kettrup A., Hedges J.I. Characterization of a major refractory component of marine dissolved organic matter // *Geochim. Cosmochim. Acta.* – 2006. – V. 70. – № 12. – P. 2990–3010.
107. Lam B., Baer A., Alae M., Lefebvre B., Moser A., Williams A., Simpson A.J. Major Structural Components in Freshwater Dissolved Organic Matter // *Environ. Sci. Technol.* – 2007. – V. 41. – № 24. – P. 8240–8247.

108. Thorn K.A., Steelink C., Wershaw R.L. Methylation patterns of aquatic humic substances determined by ^{13}C NMR spectroscopy // *Org. Geochem.* – 1987. – V. 11. – № 3. – P. 123–137.
109. Bell N.G.A., Murray L., Graham M.C., Uhrin D. NMR methodology for complex mixture “separation” // *Chem. Commun.* – 2014. – V. 50. – № 14. – P. 1694–1697.
110. Bell N.G.A., Michalchuk A.A.L., Blackburn J.W.T., Graham M.C., Uhrin D. Isotope-Filtered 4D NMR Spectroscopy for Structure Determination of Humic Substances // *Angew. Chem. Int.* – 2015. – V. 54. – № 29. – P. 8382–8385.
111. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) [Electronic resource]. – 2015. – https://www.aist.go.jp/index_en.html.
112. Chefetz B., Chen Y., Clapp C.E., Hatcher P.G. Characterization of Organic Matter in Soils by Thermochemolysis Using Tetramethylammonium Hydroxide (TMAH) // *Soil Sci. Soc.* – 2000. – V. 64. – № 2. – P. 583.
113. Soddy F. Radioactivity // *Annu. Reports Prog. Chem.* – 1913. – V. 10. – P. 262.
114. Mears W.H. The Oxygen Exchange Reaction of Glycine Hydrochloride and Water // *J. Chem. Phys.* – 1938. – V. 6. – № 5. – P. 295.
115. Cross P.C., Leighton P.A. Exchange Reactions with Deuterium I. Deuterium and Hydrogen Chloride // *J. Chem. Phys.* – 1936. – V. 4. – № 1. – P. 28.
116. Crist R.H., Dalin G.A. The Exchange Reaction of Hydrogen and Deuterium Oxide // *J. Chem. Phys.* – 1934. – V. 2. – № 8. – P. 548.
117. Mears W.H., Sobotka H. Heavy Oxygen Exchange Reactions of Proteins and Amino Acids // *J. Am. Chem. Soc.* – 1939. – V. 61. – № 4. – P. 880–886.
118. Ussing H.H. The exchange of H and D atoms between water and protein in vivo and in vitro 1 // *Skand. Arch. Physiol.* – 1938. – V. 78. – № 1. – P. 225–241.
119. Ussing H.H. The exchange of H and D atoms between water and protein in vivo and in vitro 1 // *Skand. Arch. Physiol.* – 1937. – V. 77. – № 2. – P. 107–122.
120. Krogh A., Ussing H.H. The exchange of hydrogen between the free water and the organic substances in the living organism 1 // *Skand. Arch. Physiol.* – 1936. – V. 75. – № 1–2. – P. 90–104.
121. Biemann K. The Application of Mass Spectrometry in Organic Chemistry: Determination of the Structure of Natural Products // *Angew. Chemie Int.* – 1962. – V. 1. – № 2. – P. 98–111.
122. Бродский А.И. Химия изотопов / Изд-во Академии наук СССР, – 1957. – с. 595.
123. Murray A., Williams D.L. Organic syntheses with isotopes / Interscience, – 1958.
124. Englander S.W., Mayne L., Bai Y., Sosnick T.R. Hydrogen exchange: the modern legacy of Linderstrøm-Lang // *Protein Sci.* – 1997. – V. 6. – № 5. – P. 1101–1109.
125. Hvidt A., Linderstrøm-Lang K. Exchange of hydrogen atoms in insulin with deuterium atoms in aqueous solutions // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1954. – V. 14. – № 4. – P. 574–575.
126. Hvidt A. Deuterium exchange between ribonuclease and water // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1955. – V. 18. – P. 306–308.

127. Englander S.W., Kallenbach N.R. Hydrogen exchange and structural dynamics of proteins and nucleic acids // *Q. Rev. Biophys.* – 2009. – V. 16. – № 4. – P. 521.
128. Hvidt A., Nielsen S.O. Hydrogen exchange in proteins // *Adv. Protein Chem.* – 1966. – V. 21. – P. 287–386.
129. Hvidt A. A discussion of the pH dependence of the hydrogen-deuterium exchange of proteins. // *C. R. Trav. Lab.* 1964. – V. 34. – P. 299–317.
130. Atzrodt J., Derdau V., Fey T., Zimmermann J. The renaissance of H/D exchange // *Angew. Chem. Int.* – 2007. – V. 46. – № 41. – P. 7744–7765.
131. Фіалков Ю.Я. Применение изотопов в химии и химической промышленности / Киев Техніка, – 1975.
132. Coumbarides G.S., Dingjan M., Eames J., Flinn A., Northen J. An efficient laboratory synthesis of α -deuterated proteins // *J. Label. Compd. Radiopharm.* – 2006. – V. 49. – № 10. – P. 903–914.
133. Castell J. V, Mart'inez L.A., Miranda M.A., Tárrega P. A general procedure for isotopic (deuterium) labelling of non-steroidal antiinflammatory 2-arylpropionic acids // *J. Label. Compd. Radiopharm.* – 1994. – V. 34. – № 1. – P. 93–100.
134. Hill R.K., Abächerli C., Hagishita S. Synthesis of (2 S, 4 S)- and (2 S, 4 R)-[5, 5, 5- $^2\text{H}_3$] leucine from (R)-pulegone // *Can. J. Chem.* – 1994. – V. 72. – № 1. – P. 110–113.
135. Wähälä K., Väänänen T., Hase T., Leinonen A. Synthesis of [^2H] 5-epitestosterone // *J. Label. Compd. Radiopharm.* – 1995. – V. 36. – № 5. – P. 493–496.
136. Terry A.M. Deuteration of Androstenedione by Use of Keto-Enol Tautomerization: thesis. – 2002.
137. Scheiget J., Berthelette C., Li C., Zamboni R.J. Base-catalyzed deuterium and tritium labeling of aryl methyl sulfones // *J. Label. Compd. Radiopharm.* – 2004. – V. 47. – № 12. – P. 881–889.
138. Olah G.A. Aromatic substitution. XXVIII. Mechanism of electrophilic aromatic substitutions // *Acc. Chem. Res.* – 1971. – V. 4. – № 7. – P. 240–248.
139. Yavorsky P.M., Gorin E. New reagent for labeling organic compounds with tritium // *J. Am. Chem. Soc.* – 1962. – V. 84. – № 6. – P. 1071–1072.
140. Wähälä K., Rasku S. Synthesis of D 4-genistein, a stable deuterio labeled isoflavone, by a perdeuteration—Selective dedeuteration approach // *Tetrahedron Lett.* – 1997. – V. 38. – № 41. – P. 7287–7290.
141. Rasku S., Wähälä K., Koskimies J., Hase T. Synthesis of isoflavonoid deuterium labeled polyphenolic phytoestrogens // *Tetrahedron.* – 1999. – V. 55. – № 11. – P. 3445–3454.
142. Rasku S., Wähälä K. Synthesis of deuterium labeled polyhydroxy flavones and 3-flavonols // *Tetrahedron.* – 2000. – V. 56. – № 6. – P. 913–916.
143. Leppälä E., Wähälä K. Synthesis of [$^2\text{H}_8$]-enterolactone and [$^2\text{H}_{10}$]-enterodiol // *J. Label. Compd. Radiopharm.* – 2004. – V. 47. – № 1. – P. 25–30.
144. Rasku S., Wähälä K. Synthesis of D₆-daidzein // *J. Label. Compd. Radiopharm.* – 2000. – V. 43. – № 8. – P. 849–854.
145. Kiuru P.S., Wähälä K. Microwave-assisted synthesis of deuterium labeled estrogen fatty acid

- esters // *Steroids*. – 2006. – V. 71. – № 1. – P. 54–60.
146. Barthez J.M., Filikov A. V, Frederiksen L.B., Huguet M.-L., Jones J.R., Lu S.-Y. Microwave-enhanced metal-and acid-catalysed hydrogen isotope exchange reactions // *Can. J. Chem.* – 1998. – V. 76. – № 6. – P. 726–728.
147. Traven V.F., Negrebetsky V. V, Vorobjeva L.I., Carberry E.A. Keto-enol tautomerism, NMR spectra, and H-D exchange of 4-hydroxycoumarins // *Can. J. Chem.* – 1997. – V. 75. – № 4. – P. 377–383.
148. Mansel A., Kupsch H. Radiolabelling of humic substances with (14)C by azo coupling [(14)C]phenyldiazonium ions // *Appl. Radiat. Isot.* – 2007. – V. 65. – № 7. – P. 793–797.
149. Franke K., Patt Jö.T., Kupsch H., Warwick P. Radioiodination of Humic Substances via Azocoupling with 3-[125 I]Iodoaniline // *Environ. Sci. Technol.* – 2008. – V. 42. – № 11. – P. 4083–4087.
150. Mansel A., Kupsch H. Influence of Geochemical Parameters on the Mobility of Metal-Humate Complexes // *Spec. Publ. Soc. Chem.* – 2003. – V. 291. – P. 368–374.
151. Rößler D., Franke K., Süß R., Becker E., Kupsch H. Synthesis and chromatographic characterization of [Tc-99m] technetium-humic acid species // *Radiochim. Acta.* – 2000. – V. 88. – № 2. – P. 95.
152. Chunxia W., Zijian W., Chunlin Y., Wenhua W., An P. The evidence for the incorporation of fulvic acid into the bone and cartilage of rats // *Sci. Total Environ.* – 1996. – V. 191. – № 3. – P. 197–202.
153. Badun G.A., Chernysheva M.G., Tyasto Z.A., Kulikova N.A., Kudryavtsev A. V., Perminova I. V. A new technique for tritium labeling of humic substances // *Radiochim. Acta.* – 2010. – V. 98. – № 3.
154. Jurkiewicz A., Maciel G.E. Solid-state 13C NMR studies of the interaction of acetone, carbon tetrachloride and trichloroethylene with soil components // *Sci. Total Environ.* – 1995. – V. 164. – № 3. – P. 195–202.
155. Jacqueline M. Bortiatynski, Patrick G. Hatcher, Heike Knicker. *Humic and Fulvic Acids* / ed. Gaffney J.S., Marley N.A., Clark S.B. W: Am. Chem. Soc., – 1996. – V. 651. 57-77 p.
156. Nanny M.A., Bortiatynski J.M., Hatcher P.G. Noncovalent Interactions between Acenaphthenone and Dissolved Fulvic Acid As Determined by 13 C NMR T 1 Relaxation Measurements // *Environ. Sci. Technol.* – 1997. – V. 31. – № 2. – P. 530–534.
157. Haider K., Spiteller M., Wais A., Fild M. Evaluation of the Binding Mechanism of Anilazine and its Metabolites in Soil Organic Matter // *Int. J. Environ. Anal. Chem.* – 1993. – V. 53. – № 2. – P. 125–137.
158. Nanny M.A., Bortiatynski J.M., Hatcher P.G., Tien M. Investigations of enzymatic alterations of 2,4-dichlorophenol using 13 C-nuclear magnetic resonance in combination with site-specific 13 C-labeling: Understanding the environmental fate of this pollutant // *Environ. Toxicol. Chem.* – 1996. – V. 15. – № 11. – P. 1857–1864.
159. Dec J., Haider K., Benesi A., Rangaswamy V., Schäffer A., Plücken U., Bollag J.-M. Analysis of Soil-Bound Residues of 13 C-Labeled Fungicide Cyprodinil by NMR Spectroscopy // *Environ. Sci. Technol.* – 1997. – V. 31. – № 4. – P. 1128–1135.

160. Hatcher P.G., Bortiatynski J.M., Minard R.D., Dec J., Bollag J.M. Use of high-resolution carbon-13 NMR to examine the enzymatic covalent binding of carbon-13-labeled 2,4-dichlorophenol to humic substances // *Environ. Sci. Technol.* – 1993. – V. 27. – № 10. – P. 2098–2103.
161. Thorn K.A., Arterburn J.B., Mikita M.A. Nitrogen-15 and carbon-13 NMR investigation of hydroxylamine-derivatized humic substances // *Environ. Sci. Technol.* – 1992. – V. 26. – № 1. – P. 107–116.
162. Hsu P.-H., Hatcher P.G. New evidence for covalent coupling of peptides to humic acids based on 2D NMR spectroscopy: A means for preservation // *Geochim. Cosmochim. Acta.* – 2005. – V. 69. – № 18. – P. 4521–4533.
163. Mikita M.A., Steelink C., Wershaw R.L. Carbon-13 enriched nuclear magnetic resonance method for the determination of hydroxyl functionality in humic substances // *Anal. Chem.* – 1981. – V. 53. – № 11. – P. 1715–1717.
164. Hertkorn N., Guenzl A., Freitag D., Kettrup A. Nuclear magnetic resonance spectroscopy investigations of silylated refractory organic substances // *Refract. Org. Subst. Environ.* – 2008.
165. Schraml J., Koehler P., Licht K., Engelhardt G. Substituent effects in ^{29}Si nmr of ring-substituted phenoxy- and phenyl-silanes, enhancement by the oxygen link // *J. Organomet. Chem.* – 1976. – V. 121. – № 1. – P. C1-C3.
166. Green-Church K.B., Limbach P.A., Freitas M.A., Marshall A.G. Gas-phase hydrogen/deuterium exchange of positively charged mononucleotides by use of Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2001. – V. 12. – № 3. – P. 268–277.
167. Reed D.R., Kass S.R. Hydrogen-deuterium exchange at non-labile sites: a new reaction facet with broad implications for structural and dynamic determinations // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2001. – V. 12. – № 11. – P. 1163–1168.
168. Hemling M.E., Conboy J.J., Bean M.F., Mentzer M., Carr S.A. Gas phase hydrogen / deuterium exchange in electrospray ionization mass spectrometry as a practical tool for structure elucidation // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 1994. – V. 5. – № 5. – P. 434–442.
169. Attygalle A.B., Gangam R., Pavlov J. Real-time monitoring of in situ gas-phase H/D exchange reactions of cations by atmospheric pressure helium plasma ionization mass spectrometry (HePI-MS) // *Anal. Chem.* – 2014. – V. 86. – № 1. – P. 928–935.
170. Cho Y., Ahmed A., Kim S. Application of atmospheric pressure photo ionization hydrogen/deuterium exchange high-resolution mass spectrometry for the molecular level speciation of nitrogen compounds in heavy crude oils // *Anal. Chem.* – 2013. – V. 85. – № 20. – P. 9758–9763.
171. Ahmed A., Kim S. Atmospheric pressure photo ionization hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry--a method to differentiate isomers by mass spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2013. – V. 24. – № 12. – P. 1900–1905.
172. Alomary A., Solouki T., Patterson H.H., Cronan C.S. Elucidation of Aluminum–Fulvic Acid Interactions by Gas-Phase Hydrogen/Deuterium (H/D) Exchange and Electrospray Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry (ESI FT-ICR) // *Environ. Sci. Technol.* – 2000. – V. 34. – № 13. – P. 2830–2838.
173. Wilcox B.E., Hendrickson C.L., Marshall A.G. Improved ion extraction from a linear octopole

- ion trap: SIMION analysis and experimental demonstration // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2002. – V. 13. – № 11. – P. 1304–1312.
174. Acter T., Cho Y., Kim S., Ahmed A., Kim B., Kim S. Optimization and Application of APCI Hydrogen-Deuterium Exchange Mass Spectrometry (HDX MS) for the Speciation of Nitrogen Compounds // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2015. – V. 26. – № 9. – P. 1522–1531.
175. Walters B.T., Ricciuti A., Mayne L., Englander S.W. Minimizing back exchange in the hydrogen exchange-mass spectrometry experiment // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2012. – V. 23. – № 12. – P. 2132–2139.
176. Kostyukevich Y., Kononikhin A., Popov I., Nikolaev E. In-ESI source hydrogen/deuterium exchange of carbohydrate ions // *Anal. Chem.* – 2014. – V. 86. – № 5. – P. 2595–2600.
177. Kostyukevich Y., Kononikhin A., Popov I., Spasskiy A., Nikolaev E. In ESI-source H/D exchange under atmospheric pressure for peptides and proteins of different molecular weights from 1 to 66 kDa: the role of the temperature of the desolvating capillary on H/D exchange // *J. Mass Spectrom.* – 2015. – V. 50. – № 1. – P. 49–55.
178. Kostyukevich Y., Kononikhin A., Popov I., Starodubtzevad N., Pekov S., Kukaev E., Indeykina M., Nikolaev E. Letter: Analytical potential of the in-electrospray ionization source hydrogen/deuterium exchange for the investigation of oligonucleotides // *Eur. J. Mass Spectrom.* – 2015. – V. 21. – № 1. – P. 59–63.
179. Kostyukevich Y., Kononikhin A., Popov I., Nikolaev E. Simple atmospheric hydrogen/deuterium exchange method for enumeration of labile hydrogens by electrospray ionization mass spectrometry // *Anal. Chem.* – 2013. – V. 85. – № 11. – P. 5330–5334.
180. Kostyukevich Y., Kononikhin A., Popov I., Kharybin O., Perminova I., Konstantinov A., Nikolaev E. Enumeration of labile hydrogens in natural organic matter by use of hydrogen/deuterium exchange Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry // *Anal. Chem.* – 2013. – V. 85. – № 22. – P. 11007–11013.
181. Kostyukevich Y., Kononikhin A., Zhrebker A., Popov I., Perminova I., Nikolaev E. Enumeration of non-labile oxygen atoms in dissolved organic matter by use of $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ exchange and Fourier transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2014. – V. 406. – № 26. – P. 6655–6664.
182. Erdtman H., Granath M. Studies on humic acids. 5. The reaction of para-benzoquinone with alkali. // *Acta Chem. Scand.* 1954. V. 8. № 5. P. 811–816.
183. Eller W. Studien über Huminsäuren. IV. Darstellung und Eigenschaften K{ü}nstlicher und nat{ü}rlicher Huminsäuren // *Justus Liebigs Ann. Chem.* – 1923. – V. 431. – № 1. – P. 133–161.
184. Goh K.M., Stevenson F.J. Comparison of infrared spectra of synthetic and natural humic and fulvic acids // *Soil Sci.* – 1971.
185. Hänninen K.I., Klöcking R., Helbig B. Synthesis and characterization of humic acid-like polymers // *Sci. Total Environ.* – 1987. – V. 62. – P. 201–210.
186. Cataldo F. On the structure of macromolecules obtained by oxidative polymerization of polyhydroxyphenols and quinones // *Polym. Int.* – 1998. – V. 46. – № 4. – P. 263–268.
187. Ladd J.N., Butler J.H.A. Comparison of some properties of soil humic acids and synthetic phenolic polymers incorporating amino derivatives // *Soil Res.* – 1966. – V. 4. – № 1. – P. 41–54.

188. Sachs S., Bubner M., Schmeide K., Choppin G.R., Heise K.H., Bernhard G. Carbon-13 NMR spectroscopic studies on chemically modified and unmodified synthetic and natural humic acids // *Talanta*. – 2002. – V. 57. – № 5. – P. 999–1009.
189. Flaig W., Salfeld J.C. Nachweis der Bildung von Hydroxy-p-benzochinon als Zwischenprodukt bei der Autoxydation von Hydrochinon in schwach alkalischer Lösung // *Naturwissenschaften*. – 1960. – V. 47. – № 22. – P. 516.
190. Flaig W. Zur Kenntnis der Huminsäuren. I. Mitteilung. Zur chemischen Konstitution der Huminsäuren // *Zeitschrift für Pflanzenenerziehung, Düngung, Bodenkd.* – 1950. – V. 51. – № 3. – P. 193–212.
191. Drosos M., Jerzykiewicz M., Louloudi M., Deligiannakis Y. Progress towards synthetic modelling of humic acid: Peering into the physicochemical polymerization mechanism // *Colloids Surfaces A*. – 2011. – V. 389. – № 1. – P. 254–265.
192. Jokic A., Wang M.C., Liu C., Frenkel A.I., Huang P.M. Integration of the polyphenol and Maillard reactions into a unified abiotic pathway for humification in nature: the role of δ -MnO₂ // *Org. Geochem.* – 2004. – V. 35. – № 6. – P. 747–762.
193. Jung A.-V., Frochot C., Parant S., Lartiges B.S., Selve C., Viriot M.-L., Bersillon J.-L. Synthesis of amino-phenolic humic-like substances and comparison with natural aquatic humic acids: a multi-analytical techniques approach // *Org. Geochem.* – 2005. – V. 36. – № 9. – P. 1252–1271.
194. Arfaioli P., Ugolini F.C., Bosetto M., Corti G. Synthesis of humic-like substances under sterile and non-sterile conditions in presence of quartz and volcanic ash // *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* – 2003. – V. 34. – № 1–2. – P. 285–298.
195. Litvin V.A., Galagan R.L., Minaev B.F. Synthesis and properties of synthetic analogs of natural humic acids // *Russ. J. Appl. Chem.* – 2012. – V. 85. – № 2. – P. 296–302.
196. Giannakopoulos E., Drosos M., Deligiannakis Y. A humic-acid-like polycondensate produced with no use of catalyst // *J. Colloid Interface Sci.* – 2009. – V. 336. – № 1. – P. 59–66.
197. Sachs S., Bernhard G. Humic acid model substances with pronounced redox functionality for the study of environmentally relevant interaction processes of metal ions in the presence of humic acid // *Geoderma*. – 2011. – V. 162. – № 1. – P. 132–140.
198. Perminova I. V et al. Molecular Mapping of Sorbent Selectivities with Respect to Isolation of Arctic Dissolved Organic Matter as Measured by Fourier Transform Mass Spectrometry // *Environ. Sci. Technol.* – 2014. – V. 48. – № 13. – P. 7461–7468.
199. Куненков Э.В., Кононихин А.С., Перминова И.В., Гармаш А.В., Попов И.А., Николаев Е.Н. Выбор оптимальных условий ионизации гуминовых веществ природных вод электрораспылением для анализа методом масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье // *Вестник Московского Университета*. – 2010. – Т. 51. – № 5. – С. 364–368.
200. Hertkorn N., Frommberger M., Witt M., Koch B.P., Schmitt-Kopplin P., Perdue E.M. Natural organic matter and the event horizon of mass spectrometry // *Anal. Chem.* – 2008. – V. 80. – № 23. – P. 8908–8919.
201. Kovács K., Gáspár A., Sajgó C., Schmitt-Kopplin P., Tombácz E. Comparison of humic substances isolated from thermal water and surface water by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry // *Eur. J. Mass Spectrom.* – 2010. – V. 16.

– № 5. – P. 625–630.

202. Kovacs K., Gaspar A., Sajgo C., Schmitt-Kopplin P., Tombacz E. Comparative study on humic substances isolated in thermal groundwaters from deep aquifers below 700 m // *Geochem. J.* – 2012. – V. 46. – № 3. – P. 211–224.
203. Zhrebker A.Y., Kostyukevich Y.I., Kononikhin A.S., Nikolaev E.N., Perminova I. V. Molecular compositions of humic acids extracted from leonardite and lignite as determined by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry // *Mendeleev Commun.* – 2016. – V. 26. – № 5. – P. 446–448.
204. Helms J.R., Kong X., Salmon E., Hatcher P.G., Schmidt-Rohr K., Mao J. Structural characterization of gilsonite bitumen by advanced nuclear magnetic resonance spectroscopy and ultrahigh resolution mass spectrometry revealing pyrrolic and aromatic rings substituted with aliphatic chains // *Org. Geochem.* – 2012. – V. 44. – P. 21–36.
205. Hartman B.E., Chen H., Hatcher P.G. A non-thermogenic source of black carbon in peat and coal // *Int. J. Coal Geol.* – 2015. – V. 144–145. – P. 15–22.
206. Zhrebker A.Y., Perminova I. V., Konstantinov A.I., Volikov A.B., Kostyukevich Y.I., Kononikhin A.S., Nikolaev E.N. Extraction of humic substances from fresh waters on solid-phase cartridges and their study by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry // *J. Anal. Chem.* – 2016. – V. 71. – № 4. – P. 372–378.
207. Raeke J., Lechtenfeld O.J., Wagner M., Herzsprung P., Reemtsma T. Selectivity of solid phase extraction of freshwater dissolved organic matter and its effect on ultrahigh resolution mass spectra // *Environ. Sci. Process. Impacts.* – 2016. – V. 18. – № 7. – P. 918–927.
208. Zhrebker A.Y., Airapetyan D., Konstantinov A.I., Kostyukevich Y.I., Kononikhin A.S., Popov I.A., Zaitsev K. V, Nikolaev E.N., Perminova I. V. Synthesis of model humic substances: a mechanistic study using controllable H/D exchange and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry // *Analyst.* – 2015. – V. 140. – № 13. – P. 4708–4719.
209. Koch B.P., Ludwichowski K.-U., Kattner G., Dittmar T., Witt M. Advanced characterization of marine dissolved organic matter by combining reversed-phase liquid chromatography and FT-ICR-MS // *Mar. Chem.* – 2008. – V. 111. – № 3. – P. 233–241.
210. Koch B.P., Witt M., Engbrodt R., Dittmar T., Kattner G. Molecular formulae of marine and terrigenous dissolved organic matter detected by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry // *Geochim. Cosmochim. Acta.* – 2005. – V. 69. – № 13. – P. 3299–3308.
211. Nebbioso A., Piccolo A., Lamshöft M., Spiteller M. Molecular characterization of an end-residue of humeomics applied to a soil humic acid // *RSC Adv.* – 2014. – V. 4. – № 45. – P. 23658–23665.
212. Nebbioso A., Piccolo A., Spiteller M. Limitations of electrospray ionization in the analysis of a heterogeneous mixture of naturally occurring hydrophilic and hydrophobic compounds // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2010. – V. 24. – № 21. – P. 3163–3170.
213. Hatfield R., Vermerris W. Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity // *Plant Physiol.* – 2001. – V. 126. – № 4. – P. 1351–1357.
214. Neyer G., Achatz J., Danzer B., Ugi I. The synthesis of carbapenem and carbacephem derivatives by a combination of 4CC with the chemistry of oxazoles and N-Boc-carbonamides //

- Heterocycles. – 1990. – V. 30. – № 2. – P. 863–869.
215. Ragavan R.V., Vijayakumar V., Kumari N.S. Synthesis of some novel bioactive 4-oxy/thio substituted-1H-pyrazol-5 (4H)-ones via efficient cross-Claisen condensation // *Eur. J. Med. Chem.* – 2009. – V. 44. – № 10. – P. 3852–3857.
216. Behrman E.J., Behrman, J. E. The Persulfate Oxidation of Phenols and Arylamines (The Elbs and the Boyland-Sims Oxidations) // *Org. React.* – 1988. – P. 421–511.
217. Peyton G.R. The free-radical chemistry of persulfate-based total organic carbon analyzers // *Mar. Chem.* – 1993. – V. 41. – № 1. – P. 91–103.
218. Moad G., Solomon D.H. *The chemistry of radical polymerization* / Elsevier, – 2005.
219. Musso H. Über Phenol-Oxydationen // *Angew. Chemie.* – 1963. – V. 75. – № 20. – P. 965–977.
220. Aiken G.R., Thurman E.M., Malcolm R.L., Walton H.F. Comparison of XAD macroporous resins for the concentration of fulvic acid from aqueous solution // *Anal. Chem.* – 1979. – V. 51. – № 11. – P. 1799–1803.
221. Hertkorn N., Harir M., Koch B.P., Michalke B., Schmitt-Kopplin P. High-field NMR spectroscopy and FTICR mass spectrometry: powerful discovery tools for the molecular level characterization of marine dissolved organic matter // *Biogeosciences.* – 2013. – V. 10. – № 3. – P. 1583–1624.
222. Tfaily M.M., Hodgkins S., Podgorski D.C., Chanton J.P., Cooper W.T. Comparison of dialysis and solid-phase extraction for isolation and concentration of dissolved organic matter prior to Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2012. – V. 404. – № 2. – P. 447–457.
223. Lindström B., Sjöquist B., Anggard E. Preparation of deuterium labelled catecholamines, catecholamine precursors and metabolites for use as internal standards in mass fragmentographic determination and for turnover studies // *J. Labelled Compd.* – 1974. – V. 10. – № 2. – P. 187–194.
224. Dittmar T., Koch B., Hertkorn N., Kattner G. A simple and efficient method for the solid-phase extraction of dissolved organic matter (SPE-DOM) from seawater // *Limnol. Ocean. Methods.* – 2008. – V. 6. – P. 230–235.
225. Saraswat L.D., Kenny J.M., Davis S.K., Justice J.B. Preparation of deuterium labelled catecholamines // *J. Label. Compd. Radiopharm.* – 1981. – V. 18. – № 10. – P. 1507–1516.
226. Hanson R.W. Decarboxylation of a keto acids // *J. Chem. Educ.* – 1987. – V. 64. – № 7. – P. 591.
227. Ghabbour E.A., Davies G., Britain R.S. *Humic Substances: Structures, Models and Functions* / Royal Society of Chemistry, – 2001. 387 p.
228. *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry* / ed. Cole R.B. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, – 2010.
229. Reutov O.A. New mechanism for electrophilic substitution in organometallic chemistry: SE1(N) mechanism in organic chemistry // *Bull. Acad. Sci. USSR Div. Chem. Sci.* – 1980. – V. 29. – № 9. – P. 1461–1478.
230. Müller T., Badu-Tawiah A., Cooks R.G. Accelerated carbon-carbon bond-forming reactions in

- preparative electrospray // *Angew. Chem. Int.* – 2012. – V. 51. – № 47. – P. 11832–11835.
231. Bruins A.P. Mechanistic aspects of electrospray ionization // *J. Chromatogr. A.* – 1998. – V. 794. – № 1–2. – P. 345–357.
232. Kebarle P., Tang L. From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry // *Anal. Chem.* – 1993. – V. 65. – № 22. – P. 972A–986A.
233. Kostyukevich Y., Kononikhin A., Popov I., Starodubtseva N., Kukaev E., Nikotaev E. Separation of tautomeric forms of [2-nitrophenol-glucinol-H]- by an in-electrospray ionization source hydrogen/deuterium exchange approach // *Eur. J. Mass Spectrom.* – 2014. – V. 20. – № 4. – P. 345–349.
234. Reijenga J.C., Gagliardi L.G., Kenndler E. Temperature dependence of acidity constants, a tool to affect separation selectivity in capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. A.* – 2007. – V. 1155. – № 2. – P. 142–145.
235. Wheatley W.B., Cheney L.C., Binkley S.B. 2-Benzylphenol Derivatives. III. 1 Basic Ethers // *J. Am. Chem. Soc.* – 1949. – V. 71. – № 11. – P. 3795–3797.
236. Ghan S., Enke C.G. Mechanistic study of hydrogen/deuterium exchange between [M - 1](-) ions of chlorinated benzenes and D₂O or ND₃ // *J Am Soc Mass Spectrom.* – 1994. – V. 5. – № 4. – P. 282–291.
237. Chipuk J.E., Brodbelt J.S. Investigation of the gas-phase hydrogen/deuterium exchange behavior of aromatic dicarboxylic acids in a quadrupole ion trap // *Int. J. Mass Spectrom.* – 2007. – V. 267. – № 1–3. – P. 98–108.
238. Tian Z., Reed D.R., Kass S.R. H/D exchange pathways: Flip-flop and relay processes // *Int. J. Mass Spectrom.* – 2015. – V. 377. – P. 130–138.
239. Schröder D., Buděšínský M., Roithová J. Deprotonation of p-hydroxybenzoic acid: does electrospray ionization sample solution or gas-phase structures? // *J. Am. Chem. Soc.* – 2012. – V. 134. – № 38. – P. 15897–15905.
240. Banerjee S., Mazumdar S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte // *Int. J. Anal. Chem.* – 2012. – V. 2012. – P. article ID282574.
241. Zhrebker A., Kostyukevich Y., Kononikhin A., Roznyatovsky V.A., Popov I., Grishin Y.K., Perminova I. V., Nikolaev E. High desolvation temperature facilitates the ESI-source H/D exchange at non-labile sites of hydroxybenzoic acids and aromatic amino acids // *Analyst.* – 2016. – V. 141. – № 8. – P. 2426–2434.
242. Traven V.F., Negrebetsky V. V., Vorobjeva L.I., Carberry E.A. Keto–enol tautomerism, NMR spectra, and H–D exchange of 4-hydroxycoumarins // *Can. J. Chem.* – 1997. – V. 75. – № 4. – P. 377–383.
243. Roznyatovsky V.A., Gerdov S.M., Grishin Y.K., Laikov D.N., Ustynyuk Y.A. Quantitative ²H NMR spectroscopy. 1. Thermodynamic H/D isotope effects in N,N-dimethylformamide and cyclopentadiene molecules // *Russ. Chem. Bull.* – V. 52. – № 3. – P. 552–556.
244. Silvestre V., Goupry S., Trierweiler M., Robins R., Akoka S. Determination of Substrate and Product Concentrations in Lactic Acid Bacterial Fermentations by Proton NMR Using the ERETIC Method // *Anal. Chem.* – 2001. – V. 73. – № 8. – P. 1862–1868.

245. Volikov A.B., Ponomarenko S.A., Gutsche A., Nirschl H., Hatfield K., Perminova I. V. Targeted design of water-based humic substances-silsesquioxane soft materials for nature-inspired remedial applications // *RSC Adv.* – 2016. – V. 6. – № 53. – P. 48222–48230.
246. Закис Г.Ф. Синтез модельных соединений лигнина: Методики / Высшая школа, – 1980.
247. Delahaye P., Verzele M. Analysis of gallic, digallic and trigallic acids in tannic acids by high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 1983. – V. 265. 363-367 p.
248. Sleighter R.L., Liu Z., Xue J., Hatcher P.G. Multivariate statistical approaches for the characterization of dissolved organic matter analyzed by ultrahigh resolution mass spectrometry // *Environ. Sci. Technol.* – 2010. – V. 44. – № 19. – P. 7576–7582.
249. Zhernov Y. V. et al. Supramolecular Combinations of Fractionated Humic Polyanions as Potent and Cost-Effective Microbicides with Polymodal anti-HIV-Activities and Low Cytotoxicity // *New J. Chem.* – 2016.
250. Marcotullio M., Pelosi A., Curini M. Hinokinin, an Emerging Bioactive Lignan // *Molecules.* – 2014. – V. 19. – № 9. – P. 14862–14878.
251. Tetko I.V., Tanchuk V.Yu., Kasheva T. N., Villa A.E.P. Estimation of Aqueous Solubility of Chemical Compounds Using E-State Indices // *J. chem. inform. comp. sci.* – 2001. – V. 41. – № 6. – P. 1488-1493.
252. Hatcher P.G., Faulon J.L. Coalification of lignin to form vitrinite: A new structural template based on an helical structure: techreport / *Am. Chem. Soc.*, – 1994.
253. Hatcher P.G., Lerch H.E., Verheyen T.V. Organic geochemical studies of the transformation of gymnospermous xylem during peatification and coalification to subbituminous coal // *Int. J. Coal Geol.* – 1990. – V. 16. – № 1. – P. 193–196.
254. Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments: From Theory to Practice / ed. Perminova I. V., Hatfield K., Hertkorn N. B: Springer-Verlag, – 2005. – V. 52.
255. Zhrebker A., Kostyukevich Y., Kononikhin A., Kharybin O., Konstantinov A.I., Zaitsev K. V, Nikolaev E., Perminova I. V. Enumeration of carboxyl groups carried on individual components of humic systems using deuteromethylation and Fourier transform mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2017. – V. 407. – № 9. – P. 2477-2488.
256. Li J., Sha Y. A Convenient Synthesis of Amino Acid Methyl Esters // *Molecules.* – 2008. – V. 13. – № 5. – P. 1111–1119.
257. Hosangadi B.D., Dave R.H. An efficient general method for esterification of aromatic carboxylic acids // *Tetrahedron Lett.* – 1996. – V. 37. – № 35. – P. 6375–6378.
258. Andjelkovic T., Perovic J., Purenovic M., Blagojevic S., Nikolic R., Andjelkovic D., Bojic A. A direct potentiometric titration study of the dissociation of humic acid with selectively blocked functional groups // *Eclética Química.* – 2006. – V. 31. – № 3. – P. 39–46.
259. D'Andrilli J., Cooper W.T., Foreman C.M., Marshall A.G. An ultrahigh-resolution mass spectrometry index to estimate natural organic matter lability // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2015. – V. 29. – № 24. – P. 2385–2401.
260. D'Andrilli J., Foreman C.M., Marshall A.G., McKnight D.M. Characterization of IHSS Pony Lake fulvic acid dissolved organic matter by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and fluorescence spectroscopy // *Org. Geochem.* – 2013.

- V. 65. – P. 19–28.
261. Gondar D., Lopez R., Fiol S., Antelo J.M., Arce F. Characterization and acid–base properties of fulvic and humic acids isolated from two horizons of an ombrotrophic peat bog // *Geoderma*. – 2005. – V. 126. – № 3–4. – P. 367–374.
262. Smith M.B., March J. *March’s advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure* / John Wiley & Sons, – 2007.
263. Ragnar M., Lindgren C.T., Nilvebrant N.-O. pKa-values of guaiacyl and syringyl phenols related to lignin // *J. wood Chem. Technol.* – 2000. – V. 20. – № 3. – P. 277–305.
264. Zhrebker A.Y., Airapetyan D., Konstantinov A.I., Kostyukevich Y.I., Kononikhin A.S., Popov I.A., Zaitsev K. V, Nikolaev E.N., Perminova I. V. Synthesis of model humic substances: a mechanistic study using controllable H/D exchange and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry // *Analyst*. – 2015. – V. 140. – № 13. – P. 4708–4719.
265. Leenheer J.A., Wershaw R.L., Reddy M.M. Strong-acid, carboxyl-group structures in fulvic acid from the Suwannee River, Georgia. 2. Major structures // *Environ. Sci. Technol.* – 1995. – V. 29. – № 2. – P. 399–405.
266. Li Y., Harir M., Lucio M., Kanawati B., Smirnov K., Flerus R., Koch B.P., Schmitt-Kopplin P., Hertkorn N. Proposed guidelines for solid phase extraction of Suwannee River dissolved organic matter // *Anal. Chem.* – 2016. – V. 88. – № 13. – P. 6680–6688.
267. Traina S.J., Novak J., Smeck N.E. An Ultraviolet Absorbance Method of Estimating the Percent Aromatic Carbon Content of Humic Acids // *J. Environ. Qual.* – 1990. – V. 19. – № 1. – P. 151.
268. Беккер Г., Бергер В. *Органикум. Практикум по органической химии*. т. 1, 2 / М.: Мир, – 1992.
269. Bossio R.E., Marshall A.G. Baseline resolution of isobaric phosphorylated and sulfated peptides and nucleotides by electrospray ionization FTICR ms: another step toward mass spectrometry-based proteomics // *Anal. Chem.* – 2002. – V. 74. – № 7. – P. 1674–1679.
270. Кононихин А.С., Жеребкер А.Я., Казачков М.А., Григорьев А.С., Костюкевич Ю.И., Пеков С.И., Бочаров К.В., Попов И.А., Перминова И.В., Николаев Е.Н. Исследование молекулярного состава гуминовых веществ угля и торфа при помощи масс-спектрометрии высокого разрешения в условиях оптимального электрораспыления // *Изв. РАН сер. Энергетика*. – 2017. № 1. – С. 107–114.
271. Aiken G.R. Isolation and concentration techniques for aquatic humic substances // *Humic Subst. soil, sediment water geochemistry Isol.* / ed. G.R. Aiken, D.M. McKnight, R.L. Wershaw and P.M. NY: Wiley-Interscience, – 1985.
272. Kašpar M., Hamplová V., Novotná V., Glogarová M., Vaněk P. New banana-type liquid crystal with a methoxy group substituted near the central ring // *J. Mater. Chem. Royal Society of Chemistry*, – 2002. – V. 12. – № 8. – P. 2221–2224.
273. Strube R.E. Ethyl tert-Butyl Malonate // *Org. Synth.* – 1963. – P. 34.
274. Rieke R.D., Bales S.E., Hudnall P.M., Burns T.P. Highly Reactive Magnesium for the Preparation of Grignard Reagents: 1-Norbornanecarboxylic Acid // *Org. Synth.* – 1979. – P. 85.