

УДК 631.411.4:541.147

Роль фракционирования при изучении фотохимических свойств гумусовых веществ

К. Ришар, Ж. Гийо, Ж.-П. Агуер, А. тер Халле, О. Е. Трубецкая, О. А. Трубецкой

КЛЕР РИШАР (C. RICHARD) — доктор философии по химии (PhD), директор научных исследований, заведующая лабораторией молекулярной фотохимии Национального центра научных исследований Франции (CNRS). Область научных интересов: фотохимия и фотобиология макромолекул. E-mail claire.richar@univ-bpclermont.fr

ЖИСЛЯР ГИЙО (G. GUYOT) — доктор философии по химии (PhD), старший исследователь лаборатории молекулярной фотохимии CNRS. Область научных интересов: фотохимия макромолекул, молекулярная спектроскопия.

ЖАН-ПЬЕР АГУЕР (J.-P. AGUER) — доктор философии по химии (PhD), старший исследователь лаборатории молекулярной фотохимии CNRS. Область научных интересов: фотохимия и фотобиология макромолекул.

АЛЕКСАНДРА тер ХАЛЛЕ (A. ter HALLE) — доктор философии по химии (PhD), исследователь лаборатории молекулярной фотохимии CNRS. Область научных интересов: фотохимия и фотобиология макромолекул.

ОЛЬГА ЕВГЕНЬЕВНА ТРУБЕЦКАЯ — кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории химии белка филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Область научных интересов: молекулярная экология, биоорганическая химия природных биополимеров. E-mail trub@fibkh.serpukhov.su

ОЛЕГ АНАТОЛЬЕВИЧ ТРУБЕЦКОЙ — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной спектроскопии Института фундаментальных проблем биологии РАН. Область научных интересов: молекулярная экология, биогеохимия природных экосистем. E-mail olegi03@yahoo.com

142290 Пущино, Московская обл., Институт фундаментальных проблем биологии РАН, тел. (4967)73-28-80, факс (4967)33-05-32.

Введение

Гумусовые вещества (ГВ) представляют собой гетерогенную смесь темноокрашенных органических макромолекул сложного состава, они содержатся в почвенных и водных экосистемах, являются эффективным резервуаром углерода и снижают эмиссию углекислого газа. В состав ГВ входит до 60—70% общего углерода почв и 60—90% общего углерода, растворенного в природных водах. Гуминовые вещества играют исключительно важную роль в изоляции, трансформации и переносе органических ксенобиотиков и минеральных примесей.

Экстрагируемые ГВ разделяют на гуминовые кислоты (ГК) и фульвокислоты (ФК), они различаются по растворимости в кислых водных средах (при pH < 1 ФК растворимы, а ГК полностью выпадают в осадок). Эта

классификация основана на химических и физических различиях и является, по сути, условной, поэтому нельзя с уверенностью говорить о существовании двух типов органических молекул. В состав ГВ входят алифатические соединения (жирные кислоты, сложные эфиры, сахара, аминокислоты) и ароматические (лигнин и его производные). Долгое время предполагали, что ГВ состоят из полидисперсных макромолекул, молекулярная масса которых достигает 300 кДа, и их поведение в растворе зависит от pH [1, 2]. Благодаря новейшим методам исследования, адаптированным к таким комплексным соединениям, как ГВ, сравнительно недавно была выдвинута новая концепция их молекулярной организации, основанная на представлении о супрамолекулярном строении ГВ, по которой ГВ состоят из молекул относительно небольших размеров, соединенных между собой водородными или π — π связями, а

также поливалентными катионами [3—5]. При наличии внутригуминовых гидрофобных участков и внешних гидрофильных зон гипотеза о супрамолекулярном строении ГВ логично приводит к мицелярной модели их организации в водной среде. Некоторые эксперименты с использованием флуоресцентных зондов подтверждают существование таких мицелл [6—8].

Исследования, проводимые в лаборатории молекулярной фотохимии Национального центра научных исследований Франции (CNRS), направлены на изучение фотосенсибилизирующих свойств макромолекул ГВ [9, 10]. Способность ГВ поглощать солнечный свет и индуцировать деградацию органических поллютантов имеет огромное значение в окружающей среде. С другой стороны в Пушинском научном центре биологических исследований (НЦБИ РАН) на протяжении последних пятнадцати лет работают две научные группы, успешно использующие сочетания различных методов фракционирования ГВ, в т.ч. электрофорез в полиакриламидном геле (ЭПАГ) и эксклюзионную хроматографию (ЭХ) [11]. Оригинальность данного сочетания ЭХ—ЭПАГ состоит в том, что 7 М раствор мочевины разрывает водородные связи и используется в ЭПАГ и в ЭХ для предотвращения взаимодействия между фракционируемыми ГВ и твердой неподвижной фазой, в которой осуществляется разделение. Одновременно происходит дезагрегация ассоциатов ГВ, состоящих из объединенных водородными связями нативных гумусовых компонентов. Таким образом, предложенная процедура осуществляет разделение первичных структурных гумусовых компонентов, а не их агрегатов и решает одну из основных проблем при фракционировании ГВ.

Целью сотрудничества лабораторий CNRS (Франция) и НЦБИ РАН является проведение фотохимических исследований на фракциях ГВ, более однородных по размерам и электрофоретической подвижности, чем нефракционированные ГВ. В процессе совместных исследований нам удалось не только связать фотосенсибилизирующие свойства макромолекул с макропараметрами ГВ, но и определить принадлежность флуорофоров и других светочувствительных компонентов отдельным фракциям ГВ. Исследования проводились на гуминовых кислотах, экстрагированных из пяти почв различного генезиса и геоклиматического происхождения.

Первый этап экспериментов состоял в фракционировании ГК сочетанием методов ЭХ—ЭПАГ и разработкой препаративного количества фракций с различной электрофоретической подвижностью и молекулярным размером. На втором этапе исследований были проведены элементный и флуоресцентный анализы исходных препаратов и фракций, а также измерены спектры поглощения всех препаратов. На последнем этапе сравнивали фоточувствительные свойства ГК и их фракций, используя 2,4,6-триметилфенол (ТМФ) в качестве тест-молекулы, способной окисляться гуминовыми веществами, приведенными в возбужденное состояние при освещении [12]. Использование ТМФ позволило

определить свойства, необходимые для образования окислительных триплетов.

Экспериментальная часть

Почвенные образцы были взяты из горизонтов А чернозема типичного (Курская область, Россия), чернозема обыкновенного (Западная Сибирь, Россия), подзолистой почвы (Восточная Сибирь, Россия), андосола (Аурилак, Франция), кальцисола (Болонья, Италия). Гуминовые кислоты (ГК) выделяли по методике, рекомендованной Международным обществом по исследованию гуминовых веществ (более подробную информацию о методе выделения ГК можно найти на сайте www.ihss.gatech.edu).

Спектры поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях были получены на спектрофотометре Cary 3 (Varian) в кварцевой кювете длиной 1 см. Препараты ГК растворяли в 6,6 мМ фосфатном буфере (рН 6,5) до концентрации сухого вещества 100 мг/л, фильтровали через фильтр Millipore 0,45 мкм. Трехмерные флуоресцентные спектры были получены на спектрометре LS-55 (Perkin-Elmer) с ксеноновым источником возбуждения. Для снижения возможного влияния эффектов внутреннего фильтра на результаты измерений флуоресценции препараты ГК и фракций разбавляли в 3,3 мМ фосфатном буфере (рН 6,5) до $A_{300} = 0,1$. Спектры были нормированы на одинаковую концентрацию сухого вещества.

Фототрансформация 2,4,6-триметилфенола [ТМФ] фотосенсибилизированной ГК была описана ранее [9]. За кинетикой реакции следили с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием обращенно-фазовой колонки Spherisorb ODS-2 с детекцией ТМФ при 220 нм.

Сочетание ЭХ—ЭПАГ было использовано для получения препаративных количеств стабильных электрофоретических фракций ГК по ранее описанной методике [11]. На колонку наносили 5—20 мг ГК, растворенного в 1 мл 7 М мочевины. Хроматографию ГК проводили на стеклянной колонке размером 1,5×100 см, заполненной предварительно набухшим в растворе 7 М мочевины сефадексом G-75. Ультрафиолетовый детектор UA-5 (ISCO) регистрировал выход вещества из колонки по поглощению при $\lambda = 280$ нм. Общий объем колонки (V_t) был равен 160 мл, свободный объем колонки ($V_0 = 47$ мл) определяли с помощью голубого декстрана (Dextran Blue 2000). Скорость элюции была 15 мл/час. С помощью коллектора фракций объем элюции от V_0 до V_i разделили на аликвоты объемом 2 мл, каждую третью аликвоту анализировали электрофорезом в 10% ПАГ (для электрофоретического анализа из каждой аликвоты отбирали по 0,1 мл элюата). На основании электрофоретического анализа из хроматографического профиля было выделено три группы аликвот, отображающих при ЭПАГ-тестировке одну электрофоретическую зону в матрице ПАГ. Объединенные фракции (аликвоты) были диализованы в диализных мешках с номинальным размером пор 5 кДа и лиофилизованы. Препараты ГК и их фракции хранили в сухом виде в плотно закрывающихся

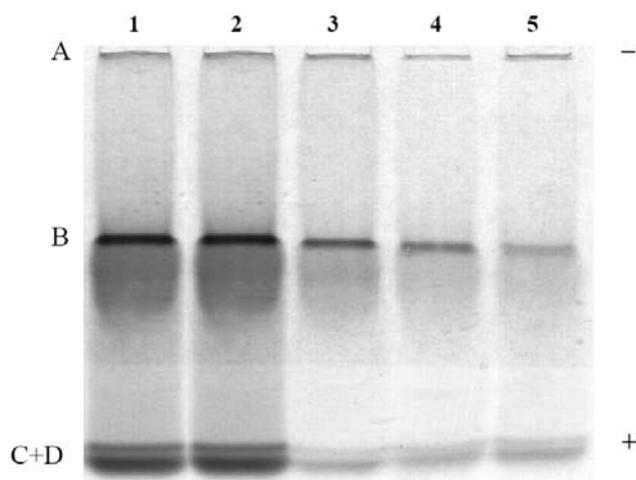


Рис. 1. Электрофорез гуминовых кислот почв в 10% полиакриламидном геле в присутствии денатурирующих агентов:

1 — чернозем (Западная Сибирь, Россия); 2 — чернозем (Курск, Россия); 3 — подзол (Россия); 4 — андосол (Франция); 5 — кальцисол (Италия)

стеклянных баночках в темноте при комнатной температуре и использовали для дальнейших анализов.

Фракционирование гуминовых кислот

Гуминовые кислоты, выделенные из пяти различных по генезису почв, фракционировали электрофорезом в полиакриламидном геле (рис. 1). Все исходные ГК разделились на четыре дискретные яркие естественно-окрашенные электрофоретические зоны: А — стартовая зона, не проникающая в поры 10% полиакриламидного геля, В — узкая зона в средней части геля; С и D — зоны в нижней части геля, объединенные во фракцию С+D из-за близких электрофоретических подвижностей. Использование сочетания методов ЭХ-ЭПАГ позволило наработать препаративные количества стабильных электрофоретических фракций А, В и С+D.

Для получения препаративных количеств индивидуальных электрофоретических фракций исходный препарат ГК фракционировали с помощью эксклюзионной хроматографии на колонке (100 см × 1,5 см) с сефадексом G-75 в растворе 7М мочевины (рис. 2). Все фракционированное вещество вышло в пределах общего объема колонки (160 мл). Прямоугольниками на оси абсцисс обозначены зоны хроматографического профиля, содержащие индивидуальные фракции А, В или С+D, выявленные с помощью электрофоретического анализа хроматографических аликвот.

После анализа хроматографического профиля с помощью электрофореза в ПАГ было обнаружено, что в объеме элюции 47—60 мл содержится фракция А, в объеме элюции 61—80 мл — фракция В, в объеме элюции 111—160 мл — фракция С+D, в объеме элюции 81—110 мл была детектирована смесь фракций В и С+D. На основании хроматографического поведения фракций можно сделать вывод о том, что их молекуляр-

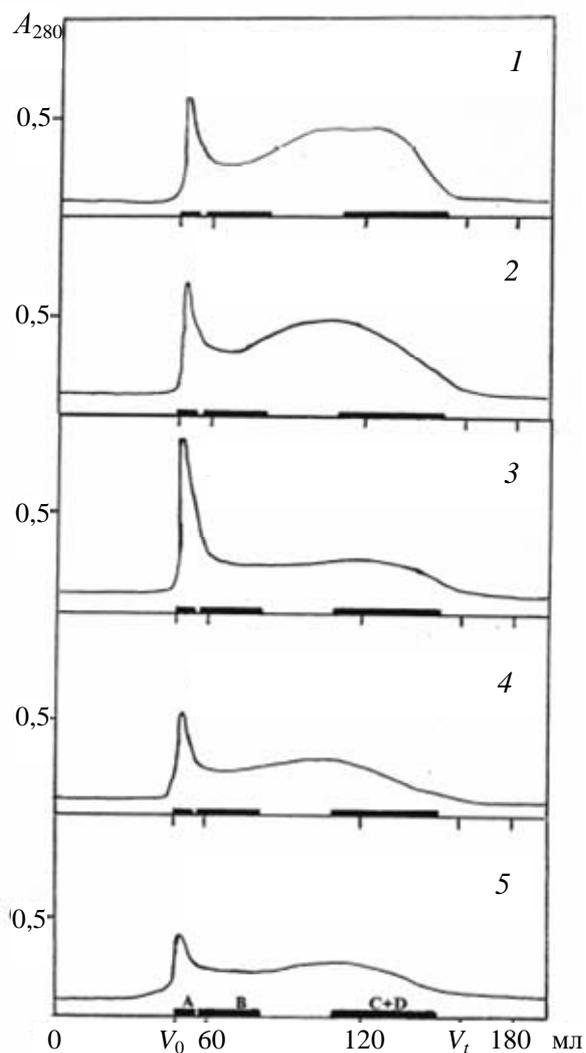


Рис. 2. Эксклюзионная хроматография ГК почв различного генезиса в растворе мочевины:

1 — чернозем (Западная Сибирь, Россия); 2 — чернозем (Курск, Россия); 3 — подзол (Россия); 4 — андосол (Франция); 5 — кальцисол (Италия)

ные размеры уменьшаются в последовательности $MP_A > MP_B > MP_{C+D}$. Весовое содержание фракций А, В и С+D представлено в табл. 1. Смесь фракций В и С+D в дальнейших экспериментах не использовали.

Характеристика фракций

Элементный состав

В табл. 2 приведен элементный состав (С, Н и N) исследуемых гуминовых кислот и электрофоретических фракций в расчете на сухое беззольное вещество. Содержание углерода изменялось в пределах 54—62%, водорода 4,6—5,9%, азота 4,5—7,3%, что соответствует литературным данным [13], однако содержание азота во фракциях значительно уменьшается с уменьшением среднего молекулярного размера фракций. Соотношения С/Н и С/N в высокомолекулярной фракции А ниже,

Таблица 1

Массовое содержание электрофоретических фракций А, В и С+D в гуминовых кислотах различного генезиса

Источник ГК	Содержание фракций, %			
	А	В	С + D	Смесь фракций В и С+D
Чернозем, Западная Сибирь	19	30	31	20
Чернозем, Курск	19	21	36	24
Подзол	23	24	19	34
Андосол	18	30	25	27
Кальцисол	23	34	22	21

Таблица 2

Состав препаратов гуминовых кислот

Источник ГК	С	Н	N	Зольность %	Вода
Чернозем, Курск	62,3	4,6	5,5	5,4	9,6
фракция А	53,8	5,5	8,0	6,7	10,3
фракция В	57,2	4,6	6,1	10,4	10,7
фракция С+D	57,0	4,7	4,2	9,4	10,2
Подзол	60,7	5,9	4,8	9,0	9,3
Андосол	56,1	5,8	7,3	3,8	9,1
Кальцисол	54,7	н.д.	7,3	32,5	4,2

чем в низкомолекулярных фракциях В и С+D и исходной ГК, что указывает на алифатический характер и большее содержание азотистых компонентов во фракции А.

Спектральные свойства

На рис. 3 представлены спектры поглощения четырех ГК и их фракций в видимой и УФ областях при их концентрации в воде 50 мг/л и рН = 6,5. В общем, спектры поглощения ГК довольно похожи. Можно заметить, что для любой ГК с уменьшением молекулярного размера фракции увеличивается интенсивность поглощения. Это значит, что концентрация поглощающих свет компонентов увеличивается с уменьшением молекулярного размера частиц. Можно предположить, что светопоглощающие компоненты — это в основном ароматические соединения, производные лигни-

на. Процентное содержание ароматического углерода вероятно уменьшается от фракции С+D к фракции А. В соответствии с этим фракция А более алифатична по сравнению с другими фракциями. Образование комплексов с переносом заряда ароматическими соединениями описано в литературе для объяснения явления усиления абсорбции света [14].

С помощью метода трехмерной флуоресценции показаны отчетливые различия в свойствах ГК и их фракций. На рис. 4 представлены трехмерные спектры, полученные для ГК кальцисола, подзола, андосола и их фракций. Максимум первой эмиссионной полосы спектра ГК соответствует длине волны 345 нм. Это значение характерно для соединений типа триптофана. Вторая эмиссионная полоса намного шире, она расположена в промежутке длин волн от 400 до 600 нм с максимумом между 500 и 550 нм, что является результатом наложения спектров излучения нескольких различных флуорофоров, требующих дальнейшей идентификации. Спектральные свойства фракций резко различаются. Фракции А и В излучают главным образом при 345 нм и слабая эмиссия обнаружена между 400 и 450 нм в случае фракции А. Очень широкая эмиссионная полоса с максимумом между 500 и 550 нм наблюдается только в случае фракции С+D. Для ГК андосола эта полоса

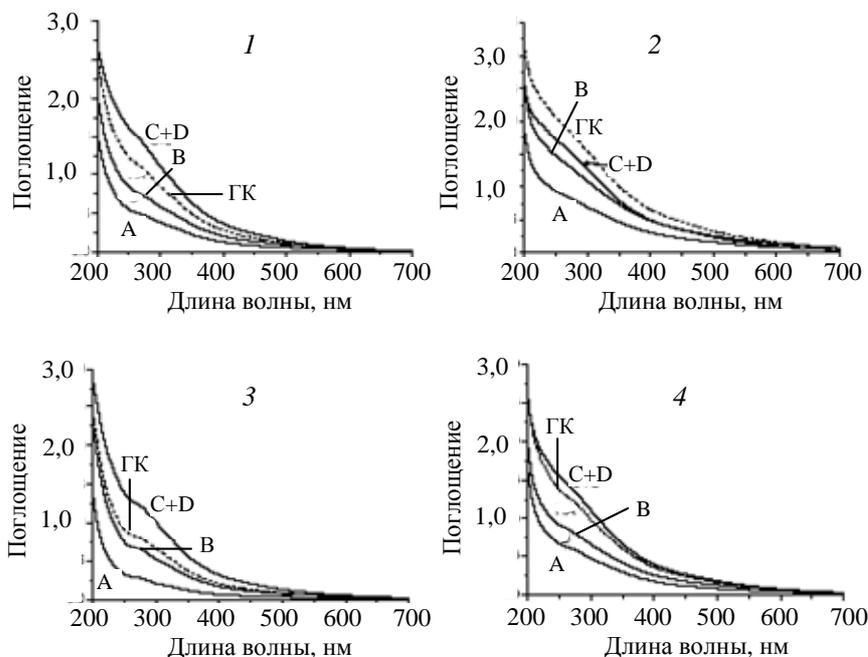


Рис. 3. Спектры поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях препаратов ГК и их электрофоретических фракций:

1 — андосол; 2 — чернозем, Курск; 3 — кальцисол; 4 — подзол

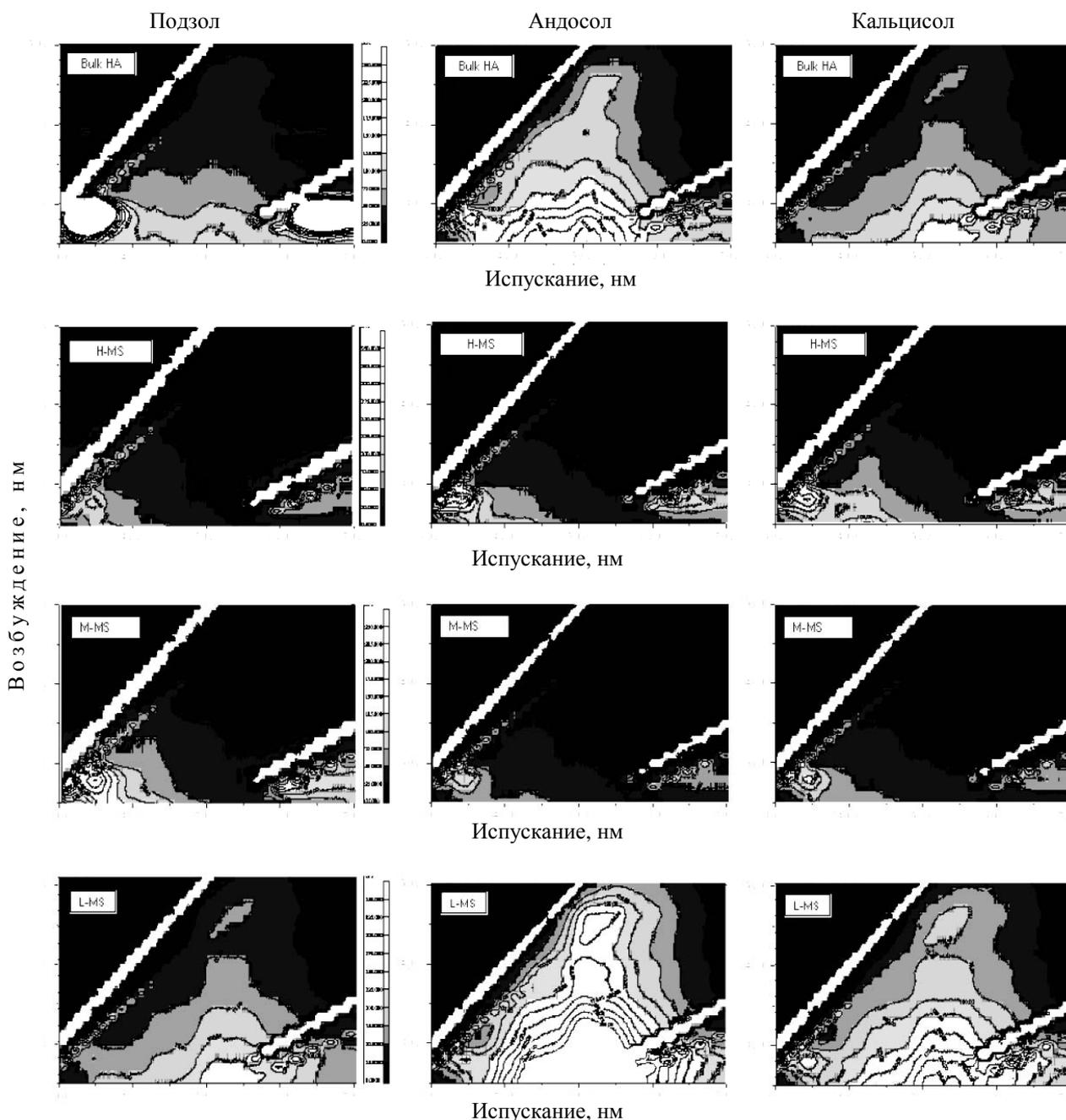


Рис. 4. Трехмерные спектры флуоресценции гуминовых кислот подзола, андосола, кальцисола и их фракций: HA — исходный препарат ГК; H-MS — фракция А; M-MS — фракция В; L-MS — фракция С+D.

даже более интенсивна, чем для гуминовых кислот в целом. В случае других ГК порядок величины эмиссии тот же, либо чуть выше для фракции С+D. Таким образом, флуоресцирующие компоненты содержатся либо только во фракциях наименьшего молекулярного размера, либо во всех фракциях, но в высокомолекулярных фракциях происходит сильное тушение флуоресценции, что маловероятно, т.к. в качестве элюата при хроматографии ГК выступает 7 М мочевины, не являющаяся тушителем флуоресценции.

Способность фракций сенсibilизировать трансформацию 2,4,6-триметилфенола

Чтобы проверить способность различных фракций фотосенсibilизировать трансформацию ТМФ, растворы, содержащие ТМФ (10^{-4} М), ГК или их фракции (25 мг/л) и фосфатный буфер с рН = 6,5 ($3 \cdot 10^{-3}$ М) облучали лампами Вуда (основное излучение при 365 нм) в цилиндрическом реакторе в течение 60—70 минут. Образцы были извлечены и проанализированы с по-

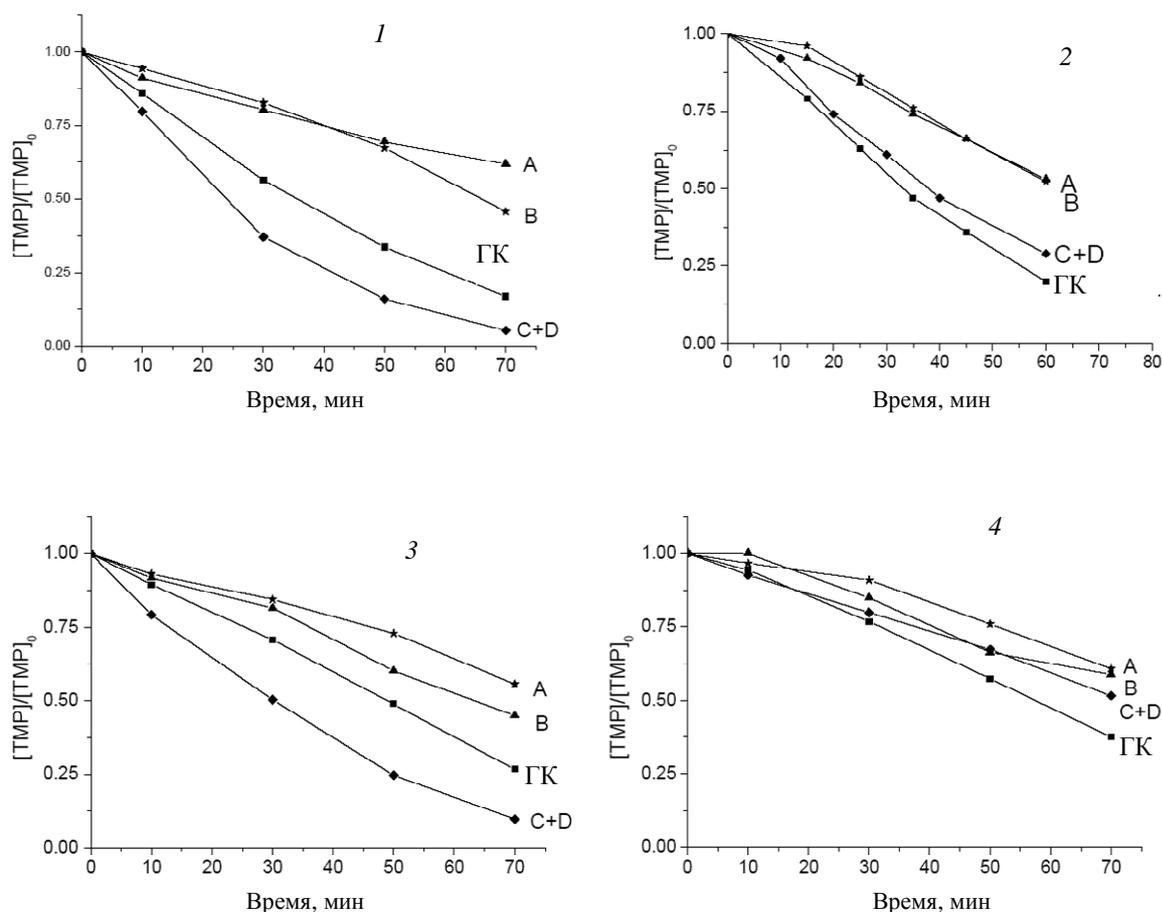


Рис. 5. Фототрансформация 2,4,6-триметилфенола в присутствии гуминовых кислот почв и их фракций

1 — андосол; 2 — чернозем, Курск; 3 — кальцисол; 4 — подзол

мощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, чтобы проследить исчезновение сигнала от ТМФ. Кинетика снижения содержания ТМФ в реакционной смеси представлена на рис. 5. В случае ГК андосола, кальцисола и курского чернозема были обнаружены существенные различия в активности между фракциями А и В с одной стороны и фракцией С+D, показавшей наибольшую способность фотосенсибилизировать трансформацию ТМФ. Для андосола и кальцисола фракция С+D даже более активна, чем исходный препарат ГК. В случае ГК подзола свойства трех фракций и исходной ГК различались незначительно.

Во всех случаях было отмечено, что кинетика трансформации ТМФ имеет первый порядок. Константы скорости первого порядка приведены в табл. 3. Если допустить, что только часть поглощающих компонентов производит триплеты, способные окислять ТМФ, то скорость разложения ТМФ можно записать так:

$$v_{\text{ТМФ}} = I_0 \cdot A^{\text{CP}}/A \cdot (1 - 10^{-A}) \cdot \alpha \cdot [\text{ТМФ}]$$

тогда k — константа скорости первого порядка:

$$k = I_0 \cdot A^{\text{CP}}/A \cdot (1 - 10^{-A}) \cdot \alpha$$

Таблица 3

Кинетические константы трансформации ТМФ для гуминовых кислот и их фракций

Почва	Фракция	$k \cdot 10^{-4}, \text{с}^{-1}$	A	$k \cdot A / (1 - 10^{-A})$
Чернозем	Исходная ГК	3,3	0,62	2,6
	Курск			
Курск	А	1,7	0,29	1,3
	В	1,7	0,45	1,2
	С+D	2,8	0,48	2,0
Андосол	Исходная ГК	2,4	0,29	1,4
	А	1,0	0,13	0,5
	В	1,1	0,21	0,6
	С+D	3,5	0,37	2,2
Кальци- сол	Исходная ГК	1,7	0,21	0,9
	А	1,0	0,07	0,5
	В	1,3	0,18	0,7
	С+D	3,2	0,33	2,0
Подзол	Исходная ГК	2,0	0,36	1,3
	А	1,8	0,17	0,9
	В	1,6	0,25	0,9
	С+D	1,2	0,40	0,8

где I_0 — поток вторичных фотонов, излучаемых источником, A^{CP} — коэффициент поглощения фотосенсибилизирующих компонентов при 365 нм, A — общий коэффициент поглощения раствора при 365 нм и α — величина, объединяющая все кинетические параметры, в частности, квантовый выход перехода окислителей в возбужденное триплетное состояние.

Если предположить, что величина α одинакова для всех, тогда изменения A^{CP} в зависимости от фракций выражается через $k \cdot A / (1 - 10^{-4})$. Таким образом, значение A^{CP} для фракций C+D гуминовых кислот андосола, кальцисола и курского чернозема в 1,6—4,3 раза больше, чем для фракций А и В (табл. 3). Заметим также, что изменение значения A^{CP} коррелирует с изменением значения A . При сокращении размера макромолекул происходит сильное увеличение концентрации сенсибилизирующих компонентов. Выход фотосенсибилизирующих абсорбирующих компонентов по отношению ко всем абсорбирующим компонентам мало меняется от одной фракции к другой.

Выводы

В результате проведенных исследований показано, что концентрация фотосенсибилизирующих хромофоров во фракциях с меньшей молекулярной массой (5—30 кДа) значительно выше, чем в высокомолекулярных фракциях. Наиболее показательные данные получены с помощью флуоресценции, так как флуорофоры, излучающие при 450 нм, вероятно, локализованы в этой фракции. Только ГК подзола явилась исключением: фракция C+D вела себя сходно с другими фракциями исследуемой почвы с точки зрения фотосенсибилизации, однако подзолистая почва, из которой ГК была извлечена, была особенно богата оксидом железа и содержание фракции C+D в ней значительно меньше, чем в других исследованных ГК. Более детальные исследования, возможно, прояснят эти различия.

Использованная методика разделения ГК позволяет получать фракции макромолекул определенных размеров с характерным диапазоном значений электрофоретической подвижности, различными структурными и спектральными характеристиками и фотореакционной способностью. Такое отличие в химической природе макромолекул говорит о том, что по мере протекания процесса гумификации состав основных компонентов (полисахариды, полипептиды и лигнин) в целом сохраняется. Результаты последних исследований [15—17] показывают, что фракции с высокой молекулярной массой — алифатические и обогащены жирными кислотами, полисахаридами и полипептидами, в то время как фракции с низкой молекулярной массой содержат в основном производные лигнина. Использование 7 М раствора мочевины при фракционировании приводит к

разрыву водородных связей и разрушает макромолекулярный ансамбль.

В дальнейшем мы планируем идентифицировать фотосенсибилизирующие и люминесцентные хромофоры гуминовых кислот и продолжить исследование состава и свойств фракций с меньшими молекулярными размерами, так как только они обладают выраженными фотохимическими свойствами. Особенно важно было бы подробнее рассмотреть фракции с молекулярными массами меньше 5 кДа.

Работа выполнена в рамках проекта INTAS 05-8055 и сотрудничества РАН—CNRS. Авторы благодарят группу профессора Клаудио Чиаватта Университета г. Болонья (Италия) за предоставленные образцы гуминовых кислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Stevenson F.J.* Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions, 2nd Ed. American Chemical Society: Washington, DC, 1994.
2. *Орлов Д.С.* Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. М.: Изд. МГУ, 1990, 324 с.
3. *Simpson A.J., Kingery W.L., Hayes M.H., Spraul M., Humpfer E., Dvortsak P.* Naturwissenschaften, 2002, v. 89, p. 84—88.
4. *Simpson A.J., Kingery W.L., Spraul M., Humpfer E., Dvortsak P., Kerssebaum R.* Environ. Sci. Technol., 2001, v. 35, p. 4421—4425.
5. *Stenson A.C., Landing W.M., Marshall A.G., Cooper W.T.* Anal. Chem., 2002, v. 74, p. 4397—4409.
6. *Wershaw R.L.* Soil Sci., 1999, v. 164, p. 803—813.
7. *Kerner, M., Hohenberg, H., Ertl, S., Reckermann, M., Spitz, A.* Nature, 2003, v. 422, p. 150—154.
8. *Von Wandruszka R.* Soil Sci., 1998, v. 163, p. 921—930.
9. *Aguer J.-P., Richard C., Andreux C.* Analusis, 1999, v. 27, p. 387—390.
10. *Richard C., Vialaton D., Aguer J.-P., Andreux C.* J. Photochem. Photobiol. A, 1997, v. 111, p. 265—271.
11. *Trubetskoy O.A., Trubetskaya O.E., Reznikova O.I., Afanasieva G.V., Saiz-Jimenes C.* J. Chromatogr. A, 1997, v. 767, p. 285—292.
12. *Halladja S., ter Halle A., Aguer J.P., Boulkamh A., Richard C.* Environ. Sci. Technol., 2007, v. 41, p. 6066—6073.
13. *Visser S.A.* Water Res., 1983, v. 17, p. 1393—1396.
14. *Ariese F., Van Assema F., Gooijer C., Bruccoleri A.G., Langford C.H.* Aquat. Sci., 2004, v. 66, p. 86—94.
15. *Trubetskaya O., Trubetskoy O., Richard C.* J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry, 2007, v. 189, p. 247—252.
16. *Richard C., Guyot G., Rivaton A., Trubetskaya O., Trubetskoy O., Cavani L., Ciavatta C.* Geoderma, 2007, v. 142, p. 210—216.
17. *Saiz-Jimenez C., Hermosin B., Trubetskaya O., Reznikova O., Afanas'eva G., Trubetskoy O.* Ibid., 2006, v. 131, p. 22—32.