

На правах рукописи

Муллоев Нурулло Урунбоевич

**ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ И АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ
МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГУМИНОВЫХ
КИСЛОТ С ИОНАМИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ**

Специальность **01.04.07** - Физика конденсированного состояния

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени доктора
физико-математических наук

Душанбе – 2017

Работа выполнена на кафедре оптики и спектроскопии Таджикского национального университета.

Научный консультант:	Лаврик Николай Львович- доктор химических наук, ведущий научный сотрудник Института химической кинетики и горения им. В.В.Воеводского СО РАН;
Официальные оппоненты:	Соколова Ирина Владимировна- доктор физ.-мат. наук, профессор, ведущий научный сотрудник Лаборатории фотофизики и фотохимии молекул ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»; Летута Сергей Николаевич- доктор физ.-мат. наук, профессор, директор Центра коллективного пользования «Институт микро- и нанотехнологий» ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет»; Левин Пётр Петрович- доктор хим. наук, ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М.Эммануэля» Российской АН.
Ведущая организация:	Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук

Защита состоится « 24 » октября **2017 года в 10⁰⁰ часов** на заседании объединенного Диссертационного совета Д 999.188.02 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Таджикском национальном университете по адресу: 734025, Республика Таджикистан, г. Душанбе, проспект Рудаки, 17, факс (992-372)21-77-11. Зал заседаний Ученого совета ТНУ.

Отзывы направлять по адресу: 734025, г. Душанбе, проспект Рудаки, 17, ТНУ, Диссертационный совет Д 999.188.02, E-mail: tgnu@mail.tj.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте Таджикского национального университета (www.tnu.tj).

Автореферат разослан « ____ » _____ 2017 г.

Ученый секретарь объединённого
диссертационного совета Д 999.188.02,
кандидат физ.-мат. наук, снс

Табаров С.Х.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Гуминовые вещества (ГВ), в частности, гуминовые кислоты (ГК) представляют собой наиболее обширный и реакционно-способный класс природных соединений, входящих в состав органического вещества почв, природных вод и воздуха (в форме аэрозолей).

Наличие в макромолекулах гуминовых кислот многочисленных функциональных групп (катехины, хиноны, фталаты, феноламины, салицилаты и т.д.) обуславливает их способность вступать в ионные и донорно-акцепторные взаимодействия, образовывать водородные связи и определяет их высокую реакционную способность по отношению к металлам. Благодаря этому свойству ГК сохраняют и накапливают элементы питания живых организмов, связывают токсичные и радиоактивные элементы в малоподвижные соединения, играют важную роль в процессах миграции тяжелых металлов, контролируя их потоки в окружающей среде и снижая токсичность тяжелых металлов [1,2].

Гуминовая кислота в различных ситуациях может себя вести как акцептор электронов, так и как донор. Это делает ГК мощным антиоксидантом, ловушкой свободных радикалов. Гуминовые препараты благодаря своей натуральности абсолютно безвредны, их применение не вызывает аллергии, или других побочных эффектов. При этом препарат не всасывается в кровь и понижает уровень холестерина. В связи с этим создание различные лекарственные препараты на основе ГК представляется очень перспективным.

В связи с нерегулярностью структурных элементов в периферических цепях ГК обладают уникальным свойством – полидисперсностью. Свойство полидисперсности макромолекул гуминовых кислот является их принципиально фундаментальным свойством, которое может позволить идентифицировать различные образцы ГК.

Для получения информации о структурных свойствах ГК применяются многочисленные физические методы [1], и, в частности, такой метод молекулярной спектроскопии, как флуоресценция. В настоящее время флуорес-

центная спектроскопия является одним из наиболее информативных и наиболее распространённых методов молекулярной спектроскопии для получения информации о структурных свойствах ГК [3-9].

В молекулярной спектроскопии свойство полидисперсности надёжно установлено. Оно проявляется в неоднородной природе контура спектров поглощения, флуоресценции и возбуждения. Тем не менее развитие новых подходов для изучения спектральных проявлений степени неоднородности является актуальным, и может служить инструментом исследования не только ГК, но и любых объектов, имеющих неоднородную природу контура спектров флуоресценции.

До последнего времени отсутствовал прямой экспериментальный подход, с помощью которого методом флуоресценции можно было бы наглядно оценить степень полидисперсности макромолекул ГК и определить число компонент в спектре флуоресценции, используя источник возбуждения спектра флуоресценции с одной длиной волны.

Кроме того из-за ряда систематических физических погрешностей, которые могут иметь место при записи спектров флуоресценции ГК, получение надёжных результатов о макроструктуре гуминовых кислот становится зачастую затруднительным. Эти погрешности прежде всего связаны с наличием такого физического фактора как эффекты внутреннего фильтра (ЭВФ) [10, 11]. Эффекты внутреннего фильтра заключаются в том, что величина оптической плотности на длинах волн возбуждения и наблюдения флуоресценции зависит от концентрации. В результате этого происходит искажение истинных значений интенсивностей и формы контуров спектров флуоресценции.

Исследования в рамках вышеперечисленных физических задач представляет интерес, поскольку их решение позволит получать надёжную информацию о таких физико-химических свойствах макромолекул ГК, как их степень полидисперсности, эффективность их взаимодействия при самоассоциации и при взаимодействии с ионами металлов.

Цель работы заключалась в развитии и применении новых молекулярно-спектроскопических подходов к изучению структурных свойств макромолекул ГК и, в частности, изучению свойств полидисперсности ГК при возбуждении её спектра флуоресценции монохроматическим светом.

Задачи исследования.

Для выполнения поставленной цели необходимо было решить следующие физико-математические и физико-химические задачи:

1. Разработка и создание методики наблюдения флуоресценции ГК с максимальным светосбором при возбуждении монохроматическим светом на базе монохроматора ДФС-12 с максимальным соотношением сигнал/шум.

2. Расчет и экспериментальная проверка геометрических параметров возбуждающего света для получения корректных спектров флуоресценции при лазерном возбуждении.

3. Систематическое изучение концентрационной зависимости спектров флуоресценции для разных по молекулярному весу фракций ГК.

4. Определение возможности метода спектральной зависимости эффективности тушения флуоресценции (СЗЭТФ) ГК ионами металлов для получения информации о степени полидисперсности образцов ГК.

5. Изучение процессов самоассоциации макромолекул ГК с использованием метода СЗЭТФ.

6. Сравнение полидисперсных свойств и эффективности процессов взаимодействия макромолекул ГК и производных салициловой кислоты, как модельных молекул, с ионами тяжелых металлов.

7. Сравнение влияния процессов самоассоциации на спектры поглощения и флуоресценции ГК и их модельных аналогов.

Научная новизна работы:

1. Разработан математический подход, позволяющий по величине поглощения и геометрии возбуждающего света определять условия получения корректных спектров флуоресценции.

2. Впервые корректно изучена концентрационная зависимость спектров флуоресценции разных по молекулярному весу фракций гуминовых кислот (ГК) в водных растворах.

3. Впервые применен метод Штерна-Фольмера для изучения особенностей изменения структуры макромолекул ГК при их ассоциации.

4. Предложен новый метод для изучения дисперсных свойств ГК, заключающийся в изучении спектральной зависимости констант тушения флуоресценции. Предложенный метод позволяет без специального математического аппарата выявить полидисперсные свойства макромолекул ГК при возбуждении ее спектра флуоресценции монохроматическом светом.

5. С использованием метода СЗЭТФ получена информация об изменении состояния флуорофоров, входящих в состав ядерных и периферийных сайтов ГК в процессе самоассоциации.

6. На молекулах производных салициловой кислоты ПСК (модельные аналоги ГК) с помощью методов абсорбции и флуоресценции продемонстрировано проявление эффективности межмолекулярного взаимодействия как при самоассоциации, так и при взаимодействии их с ионами металлов. Показана зависимость этого взаимодействия от величины рН.

Практическая значимость результатов:

1. Установленное соотношение между расстоянием от центра лазерного луча до выходной стенки рабочей кюветы, диаметром лазерного луча и оптической плотности, при которых исключаются погрешности от эффекта внутреннего фильтра, является методической разработкой, зачастую обязательной для практики флуоресцентной спектроскопии.

2. Для решения задач в области фундаментальной науки предложенный метод СЗЭТФ может получить дальнейшее развитие не только для изучения полидисперсных свойств ГК, но и для изучения неоднородной природы спектров флуоресценции любых молекул (белков, компонентов крови и т.д.).

3. При решении прикладных задач дальнейшее развитие метода СЗЭТФ позволит получать новую информацию о физико-химических свойствах мак-

ромолекул ГК и их производных. Это представляется чрезвычайно важным в связи с развитием производства солей ГК – гуматов, которые в настоящее время широко применяются в медицине (лекарства), сельском хозяйстве (удобрения) и т.д.

Выносимые на защиту положения:

1. Соотношение для учёта внутреннего фильтра, позволяющее вычислять зависимость интенсивности флуоресценции в поглощающей среде от диаметра лазерного луча, от расстояния центра лазерного луча до выходной стенки кюветы и величины оптической плотности.

2. Метод определения степени полидисперсности образцов гуминовых кислот по спектральной зависимости эффективности тушения флуоресценции.

3. Различие природы взаимодействия ядерных и периферических сайтов ГК при самоассоциации и зависимость этого взаимодействия от величины молекулярной массы.

4. Эффективности взаимодействия ядерных и периферических частей ГК при самоассоциации зависят от величины молекулярной массы.

5. Отсутствие спектрального проявления полидисперсности образцов производных салициловой кислоты (ПСК) как модельных молекул ГК.

Достоверность результатов подтверждается использованием стандартных методик, общепринятой калибровкой измерительной аппаратуры, воспроизводимостью результатов в широком диапазоне внешних условий, совпадением экспериментальных результатов контрольных экспериментов с данными других авторов.

Личный вклад автора является определяющим в постановке задач, планировании экспериментов, проведении измерений и расчётов, анализе и интерпретации результатов, подготовке и написании публикаций.

Апробация работы. Основные результаты работы докладывались на: Республиканской научно-технической конференции «Проблемы физики прочности и пластичности и физики жидкого состояния» (Душанбе, 1995); Международной научной конференции «Координационные соединения и ас-

пекты их применения» (Душанбе, 1997); III Всероссийской конференции «Гуминовые вещества в биосфере» (Россия, Санкт - Петербург, 2005); Международной конференции по химической физике (Армения, Ереван, 2008); Международной конференции по химической биологии и фундаментальным проблемам бионанотехнологии (Россия, Новосибирск, 2009); International Conference "Organic nanophotonics"(Russia,Sankt-Peterburg, 2009); XXII Симпозиум «Современная химическая физика» (Россия, Туапсе, 2010); XXV Internationalen Conference on Photochemistry.China, 2011); Международной конференции «Современные вопросы молекулярной спектроскопии конденсированных сред» (Таджикистан, Душанбе, 2011); Russian-Chinese Workshop on Environmental Photochemistry (Russia, Novosibirsk, 2012); 5th International conference ecological chemistry (Moldova, Chisinau, 2012); Второй международной конференции по гуминовым инновационным технологиям «Природные и синтетические наночастицы в технологиях очистки вод и почв» (Россия, Москва, 2012); VIII Voevodsky Conference "Physics and Chemistry of Elementary Chemical Processes" (Russia, Novosibirsk, 2012); VIII Международной научно-технической конференции (Россия, Тула, 2013); VI Всероссийской научной конференции с международным участием «Гуминовые вещества в биосфере» (Россия, Сыктывкар, Республика Коми, 2014); XIV Всероссийской научно-технической конференции (Россия, Тула, 2014); XXVI Симпозиуме «Современная химическая физика» (Россия, Туапсе, 2014); Third International Conference of CIS IHSS on Humic Innovative Technologies.Tenth International Conference daRostim.«Humic Substances and Other Biologically Active Compounds in Agriculture» HIT-daRostim-2014 (Russia, Moscow, 2014); V съезде биофизиков России (Россия, Ростов-на Дону, 2015); XXVIII Симпозиуме «Современная химическая физика» (Россия, Туапсе, 2016); научных семинарах ИХКиГ СО РАН, ФТИ им. С.У.Умарова АН РТ, физического факультета Таджикского национального ниверситета и ежегодных научных апрельских конференциях Таджикского национального университета.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 43 научных труда, в том числе 22 статьи, 19 из которых в рецензируемых журналах из Перечня ВАК РФ, 3 в сборниках и 21 статья в сборниках трудов конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 7 глав, выводов и списка литературы, включающего 285 работ. Диссертация изложена на 209 страницах, проиллюстрирована 56 рисунками и 5 таблицами.

Ключевые слова: гумины, флюоресценция, абсорбция, спектр, тушение, интеркомбинационный переход, спектральная зависимость, полидисперсность, тяжёлые металлы, эффект внутреннего фильтра.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во Введении приводятся обоснование актуальности темы, цель работы, научная новизна и практическая значимость полученных результатов, приведены основные положения, выносимые на защиту, указан личный вклад автора.

В первой главе проведён анализ литературных данных по строению, физико-химическим свойствам и способностью к межмолекулярному взаимодействию макромолекул гуминовых кислот. В результате обобщения и анализа имеющихся данных обосновывается актуальность темы исследования и необходимость проведения работы по выбранному направлению. Формулируется постановка задачи.

Вторая глава посвящена описанию методики эксперимента. Описываются методы приготовления растворов, экспериментальная установка и ее характеристики, способы регистрации и обработки спектров.

При определении истинных спектров флуоресценции в поглощающих средах, в частности, при изучении спектров флуоресценции ГК имеет место проблема учета эффекта внутреннего фильтра ЭВФ, которая возникает из-за поглощения возбуждающего и испускаемого света флуоресценции через объем исследуемого образца. В результате этого поглощения происходит иска-

жение истинных интенсивностей и формы контуров спектров люминесценции.

В данной главе описан метод определения величины точного поправочного коэффициента на ЭВФ в условиях реального флуоресцентного эксперимента с лазерным возбуждением. Показано, что для учёта эффектов внутреннего фильтра в испускании флуоресценции необходимо учитывать радиус лазерного луча R , расстояние от центра лазерного луча до выходной стенки кюветы a и величину оптической плотности εC . Получены поправки, позволяющие учесть эффект внутреннего фильтра для испускания флуоресценции в условиях конкретного эксперимента (α – отношение интенсивности регистрируемого света $I_{рег}$ к интенсивности излучаемого света $I_{ист}$)

$$\alpha = I_{рег} / I_{ист} = \frac{2\rho I_0}{\varepsilon C \ln 10} \int_0^R (10^{(-\varepsilon C(a-\sqrt{R^2-y^2}))} - 10^{(-\varepsilon C(a+\sqrt{R^2-y^2}))}) dy / (\pi R^2 \rho I_0) \quad (1)$$

где ρ - плотность интенсивности излучающих центров, а I_0 – их излучательная способность. Сравнение спектров флуоресценции водного раствора гуминовой кислоты ГК с учётом ЭВФ по формуле (1) (рис.1а) и с учётом ЭВФ по закону Бугера-Ламберта-Бера (БЛБ) (рис.1б) показывает, что точный учёт поправки на ЭВФ приводит к заметному уменьшению интенсивности спектра

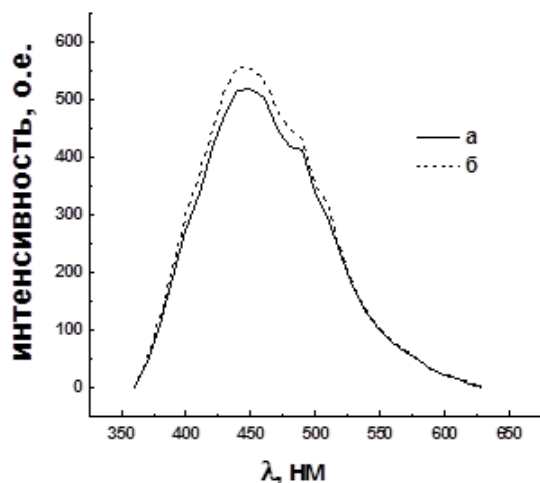


Рис.1. Спектры флуоресценции водного раствора гуминовой кислоты, выделенной из чернозёма, с учётом ЭВФ: а - спектр с поправкой по формуле (1); б - спектр с поправкой по закону БЛБ.

флуоресценции. Кроме того, для изученного образца ГК различие в величинах первого момента экспериментально измеренного спектра и спектра с учётом поправки на ЭВФ по формуле (1) составляет 7 нм. Таким образом, сравнение полученных данных показало, что в условиях высокой оптической

плотности образца размер возбуждающего луча может вносить заметные искажения в наблюдаемый контур флуоресценции.

В третьей главе представлены результаты исследования структурных свойств водных растворов ГК различной концентрации методом тушения флуоресценции. Важность информации об изменении структуры макромолекул ГК в зависимости от концентрации раствора связана с необходимостью определения констант связывания ГК с различными молекулами - поллютантами. Спектральным параметром наблюдения изменения спектров флуоресценции различающихся по весу фракций ГК была выбрана величина первого момента $M_1 = \sum I_i \lambda_i / \sum I_i$.

На рис.2 показаны спектры поглощения фракции В + С в зависимости

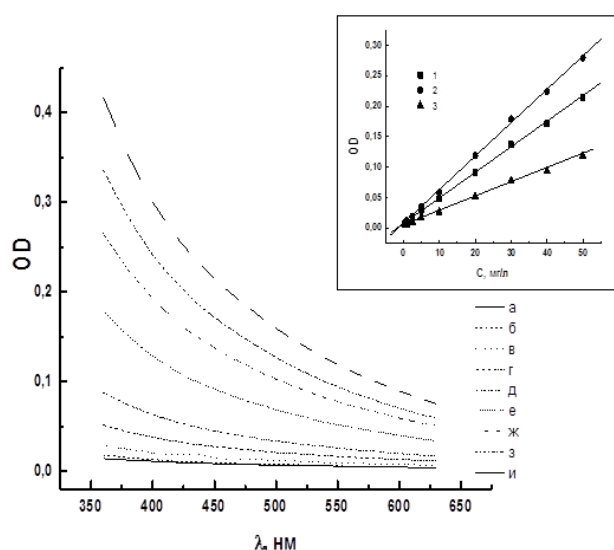


Рис.2. Концентрационная зависимость спектров поглощения образца фракции В+С. а – 0.5 мг/л; б – 1 мг/л; в – 2.5 мг/л; г – 5 мг/л; д – 10 мг/л; е – 20 мг/л; ж – 30 мг/л; з – 40 мг/л; и – 50 мг/л. Т = 295К. На врезке: зависимость оптической плотности образца фракции В + С от концентрации. 1 - $\lambda = 440$ нм; 2 - $\lambda = 480$ нм; 3 - $\lambda = 530$ нм. Т = 295К.

от концентрации ГК. Из рисунка видно, что изменение концентрации не меняет формы спектра поглощения. На врезке рис. 2 представлены концентрационные зависимости величин OD для нескольких длин волн фракции В + С. Выполнение закона БЛБ в исследованном диапазоне концентраций означает, что оптические свойства ансамбля хромофоров, которые формируют спектры поглощения макромолекул ГК, не претерпевают изменений при изменении концентрации раствора.

Разложение корректированных спектров флуоресценции ГК (фракции С+Д) на две составляющие (рис. 3) показывает, что с ростом концентрации возрастает интенсивность длинноволновой компоненты. Кроме того, с увеличением концентрации наблюдается длинноволновый сдвиг всех компонент (см. врезку на рис.3).

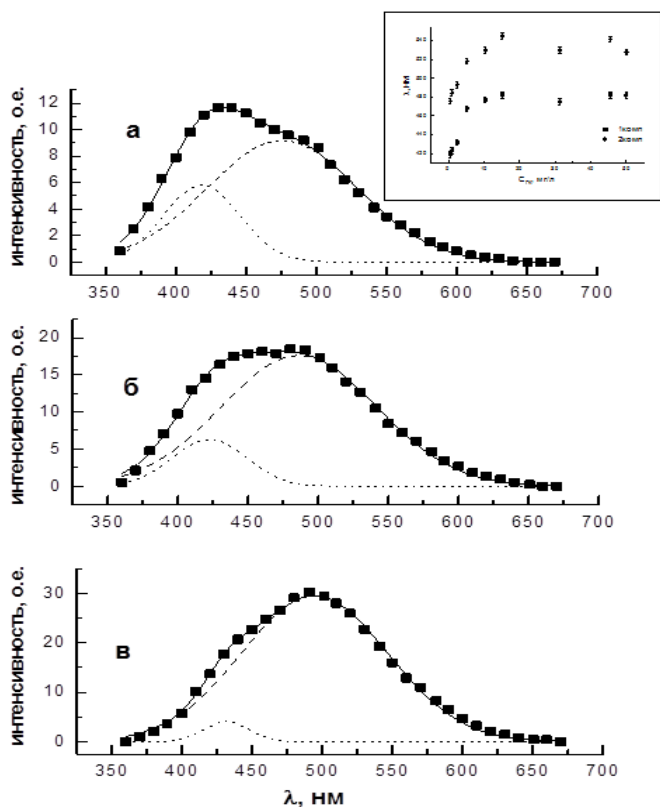


Рис.3. Концентрационная зависимость компонентов спектров флуоресценции: а- $C_{ГК} = 0.5$ мг/л; б- $C_{ГК} = 1$ мг/л; в- $C_{ГК} = 2,5$ мг/л. Квадраты – эксперимент, точки- первая компонента, пунктир- вторая компонента. Сплошная линия - сумма двух компонент. На врезке: концентрационная зависимость положения максимумов компонент спектра флуоресценции. Квадраты - первая компонента, кружки - вторая компонента.

Рост интенсивности длинноволновой компоненты и длинноволновый сдвиг обеих компонент с увеличением концентрации должен приводить к росту величины M_1 общего спектра флуоресценции, что и наблюдается в эксперименте (рис. 4). Наблюдаемый рост величины M_1 может быть обусловлен увеличением вклада в общую интенсивность длинноволновой составляющей и длинноволновым сдвигом обеих компонент.

Из рис. 4 видно, что концентрационные зависимости M_1 могут быть с плато (фракции С+Д, В, А) и без плато (фракции В+С, не фракционированная ГК). Наблюдаемые зависимости интерпретированы в рамках гипотезы образования ассоциатов. В рамках этой гипотезы изменение величины M_1 (рис.4, для фракций В + С и не фракционированной ГК) можно объяснить,

если принять, что ассоциат (димер, тример и т.д.) имеет длину волны флуоресценции, отличную от мономера. Действительно, в этом случае величина M_1 будет меняться во всём исследованном интервале концентраций ГК, поскольку соотношение концентраций ассоциатов разного стехиометрического состава будет зависеть от общей концентрации молекул.

Наличие плато в зависимости величины M_1 от концентрации для этих фракций (фракции А, В и С + D) можно объяснить тем, что параметры флуорофоров из-за особенностей структуры макромолекулы ГК не претерпевают изменений уже после образования димеров.

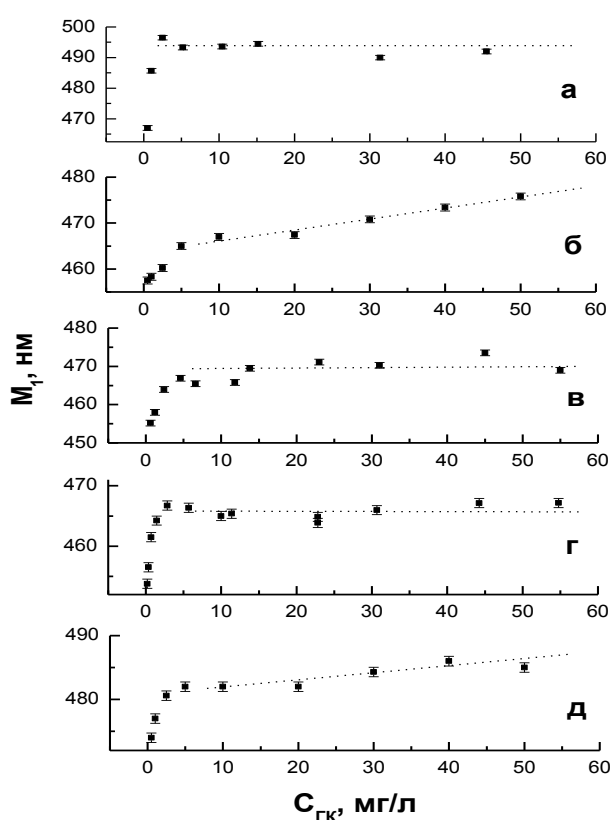


Рис.4. Концентрационные зависимости величин M_1 спектров флуоресценции фракций ГК, выделенных из Курского чернозёма: а – фракция С+D; б – фракция В+С; в – фракция Б; г – фракция А; д – не фракционированная ГК.

Одной из возможных физических причин изменения величины M_1 в спектрах флуоресценции ГК при их ассоциации может быть связана с конформационными изменениями окружения флуорофора. Эти изменения могут быть связаны с тем, что благодаря процессу ассоциации исходное состояние структуры макромолекулы незначительно деформируется из-за перераспределения электронной плотности внутри макромолекулы ГК.

Другая причина концентрационной зависимости M_1 может быть связана с изменениями полярности микроокружения флуорофора. Изменение положения спектра флуоресценции в зависимости от полярности среды зависит от типа электронного перехода: при увеличении полярности окружения флуорофора его спектр флуоресценции претерпевает батохромный сдвиг, если он определяется $\pi - \pi^*$ типом и наблюдается гипсохромный сдвиг, если спектр определяется флуорофорами, имеющими $n - \pi^*$ тип.

С целью получения дополнительных сведений об изменении структуры макромолекул ГК при ассоциации использован метод тушения флуоресценции (метод Штерна-Фольмера ШФ). Суть предлагаемого подхода для получения информации об изменении структуры ГК благодаря влиянию ассоциации заключается в нахождении концентрационной зависимости констант тушения флуоресценции ГК молекулой (ионом) – тушителем. Затем из вида этих зависимостей можно сделать заключение об изменении доступности флуорофоров для тушения, т.е., в конечном счёте, об изменении структуры макромолекулы ГК при ассоциации.

Константа Штерна-Фольмера определялась из соотношения

$$I_0 / I = 1 + K_T [Q] \quad (2)$$

где K_T - константа тушения Штерна-Фольмера, определяющая эффективность тушения, $[Q]$ – концентрация тушителя (ион металла).

Были выбраны две разные по весу фракции ГК, выделенные из одной почвы (Курский чернозём). В качестве иона металла был взят ион Cd^{2+} . Сведений об изучении константы тушения флуоресценции ГК ионами металлов в зависимости от концентрации ГК в литературе отсутствовали.

На рис. 5 а, б показаны спектры флуоресценции фракций С+D и В. Различия в спектрах флуоресценции между легкой и тяжёлой фракциями ГК весьма заметны и свидетельствуют о различии этих фракций по химическому составу хромофоров.

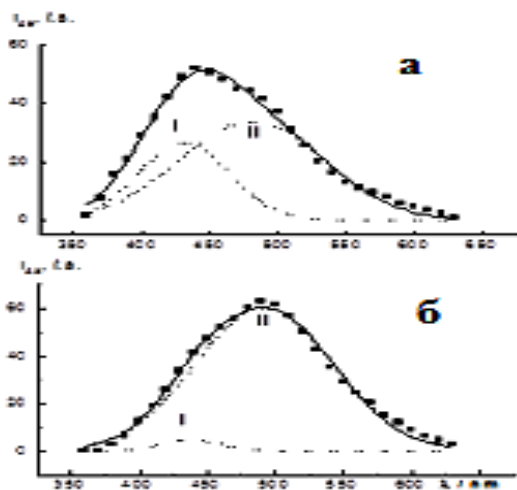


Рис.5.Спектры флуоресценции фракций ГК. Фракция В ($\lambda_{\text{макс, I}} = 438 \pm 7$ нм и $\lambda_{\text{макс, II}} = 491 \pm 3$ нм) - а; фракция С+D ($\lambda_{\text{макс, I}} = 432 \pm 4$ нм, $\lambda_{\text{макс, II}} = 482 \pm 28$ нм) - б. [ГК] = 10 мг/л. Эксперимент – квадраты. Компьютерное разложение – пунктир и сплошная линия.

На рис.6 приведены концентрационные зависимости констант ШФ для фракций В и С+D. Различие в виде концентрационных зависимостей величин K_T для разных фракций ГК может демонстрировать либо различие в доступности сайтов фракций ГК для тушения, либо различную химическую природу сайта ГК, с которым происходит взаимодействие иона Cd^{+2} и является дополнительным аргументом в пользу различия структур фракций ГК. Из рис. 6

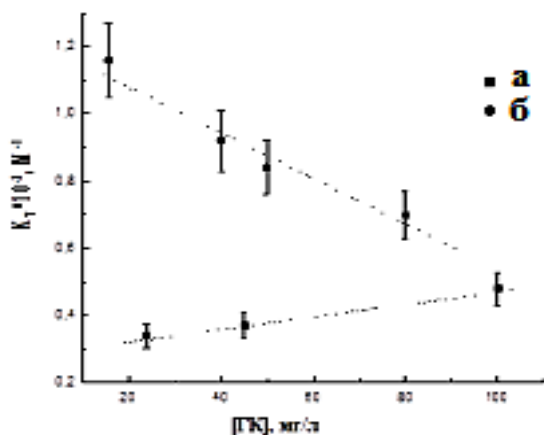


Рис.6. Зависимости величины K_T от концентрации фракции ГК: а - фракции В; б - фракции С+D.

видно, что вид концентрационных зависимостей констант Штерна-Фольмера для разных фракций ГК разнонаправлен: для фракции С+D величины K_T с ростом концентрации ГК уменьшаются, а для фракции В растут.

Для легкой фракции С+D, в которой флуорофоры, по-видимому, находятся преимущественно в ядре, это приводит к уменьшению доступности для тушителя и, соответственно, должно наблюдаться уменьшение константы

тушения. При ассоциации макромолекул тяжёлой фракции В имеют место два фактора, которые противоположным образом влияют на доступность тушителя к флуорофору: флуорофоры, находящиеся в ядре экранируются, что приводит к уменьшению константы тушения, а флуорофоры, находящиеся в периферической части дезэкранируются, т.е. становятся более доступными для тушения, что приводит к росту константы тушения K_T .

Предложенная модель влияния ассоциации фракций ГК на доступность флуорофора для тушителя (экранирование ядерной и дезэкранирование периферической части макромолекулы ГК) позволяет объяснить выше описанные результаты, которые заключались в том, что при ассоциации спектр флуоресценции тяжёлой фракции В претерпевал меньший батохромный сдвиг, чем линия флуоресценции легкой фракция С+D.

Представляется, что изучение зависимостей констант Штерна-Фольмера от концентрации ГК может служить дополнительным инструментом для выявления структурных свойств разных типов ГК и способствовать прогрессу в понимании механизма их связывания с ионами металлов.

Четвертая глава посвящена исследованию свойства полидисперсности макромолекул ГК с помощью изучения спектральной зависимости эффективности тушения флуоресценции (метод СЗЭТФ). Это новый подход, позволяющий без применения специального математического аппарата и используя только монохроматическое возбуждение спектров флуоресценции, наглядно оценить полидисперсные свойства макромолекул ГК.

В работе была изучена спектральная зависимость эффективности тушения флуоресценции стандартного образца ГК ионом Cu^{2+} . В качестве количественной меры эффективности тушения была выбрана константа Штерна-Фольмера. Для растворов ГК величина рН была 12.5, поскольку ГК растворяются в щелочных растворах [1].

На рис. 7 представлены экспериментальные спектры флуоресценции образцов ГК (образец IHSS) при добавлении ионов Cu^{2+} после вычитания спектра флуоресценции образца растворителя (раствор NaOH +

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Как видно из представленных данных, увеличение концентрации тушителя приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции.

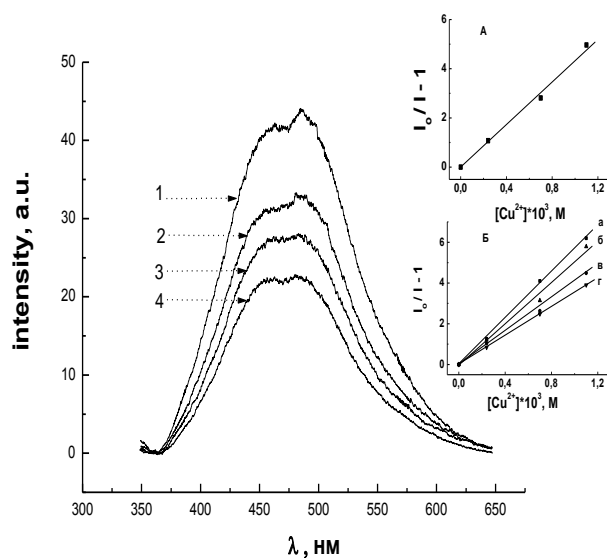


Рис.7. Спектры флуоресценции ГК с учётом флуоресценции растворителя. $[\text{ГК}] = 5 \text{ мг/л}$. $[\text{Cu}^{2+}] = 0$ (1); $2.4 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ (2); $7 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ (3); $1.1 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ (4). На врезке: А - зависимость Штерна-Фольмера; Б-зависимости Штерна-Фольмера для длин волн 380 нм (а), 580 нм (б), 450 нм (в), 600 нм (г).

На врезке А рис.7 представлена зависимость Штерна-Фольмера, построенная с учетом поправки на ЭВФ. Вычисленный тангенс наклона (константа Штерна-Фольмера, $K_{\text{шф}}$) составил 4300 М^{-1} . Используя значение полученной величины $K_{\text{шф}}$ для образца ГК и воспользовавшись данными по временам жизни флуоресценции ГК $\tau_0 \sim 4 \text{ нс}$ [10,12], для образца ГК можно вычислить константу скорости тушения флуоресценции K_g ($K_g = K_{\text{шф}} / \tau_0$). Величина K_g составила $1.4 \cdot 10^{12} \text{ М}^{-1} \text{сек}^{-1}$. Это значение заметно превышает диффузионную константу скорости тушения флуоресценции (для динамического тушения в воде $\sim 10^{10} \text{ М}^{-1} \text{сек}^{-1}$), что свидетельствует о наличии статического тушения [10]. В этом случае константу тушения Штерна-Фольмера численно можно считать константой связывания или константой комплексообразования и полагать, что макромолекулы ГК образуют комплексы с ионом Cu^{2+} в темновых условиях [10].

На вставке Б рис.7 представлены зависимости Штерна-Фольмера тушения флуоресценции образца ИСС ионом меди для разных длин волн флуоресценции. Видно, что тангенсы углов наклона заметно различаются,

что свидетельствует о различной эффективности тушения для разных длин волн флуоресценции.

Спектральная зависимость констант $K_{ШФ}^{\lambda}$ для всего спектрального диапазона 400-630 нм флуоресценции ГК показана на рис. 8 (черные квадраты). Видно, что зависимость $K_{ШФ}^{\lambda}$ от λ не монотонна и заметно различаются: в спектральных диапазонах $\lambda \sim 400$ нм и $\lambda \sim 560$ нм величины $K_{ШФ}^{\lambda}$ максимальны и составляют величины 4600 - 4800 M^{-1} , а в спектральных диапазонах $\lambda \sim 450$ нм и $\lambda \sim 600$ нм они заметно меньше и составляют 4000 - 4200 M^{-1} . Если принять, что наличие немонотонной зависимости связано с

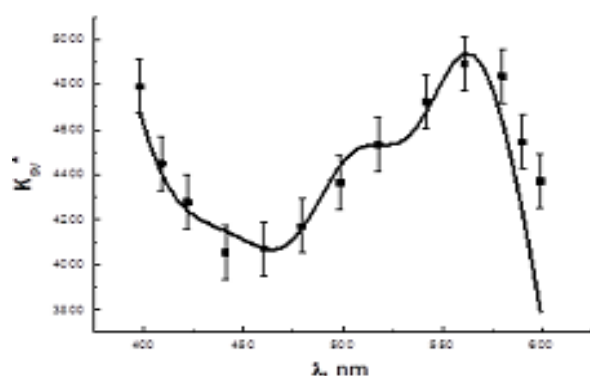


Рис.8. Спектральная зависимость констант Штерна-Фольмера $K_{ШФ}^{\lambda}$ для образца ГК: квадраты - эксперимент; сплошная - моделирование.

разной эффективностью тушения флуоресценции от хромофоров, входящих в состав различных сайтов макромолекул ГК, то можно сделать заключение, что имеется несколько независимых сайтов с хромофорами, флуоресцирующих на разных длинах волн и претерпевающих различное тушение. Моделирование экспериментальной зависимости $K_{ШФ}^{\lambda}$, показанной на рис.8, показало, что для удовлетворительного совпадения с экспериментальными данными минимальное количество составляющих компонент должно быть не менее 3. Положения максимумов полос флуоресценции составляют 444 ± 1 (компонента I), 499 ± 1 (компонента II) и 520 ± 5 нм (компонента III). Разложение скорректированных спектров флуоресценции на составляющие исходного образца и с добавками ионов ($[Cu^{2+}] = 7 \cdot 10^{-4} M$) показано на рис.9А и 9Б соответственно. На вставке рис.9А показаны зависимости ШФ для компонент I, II и III.

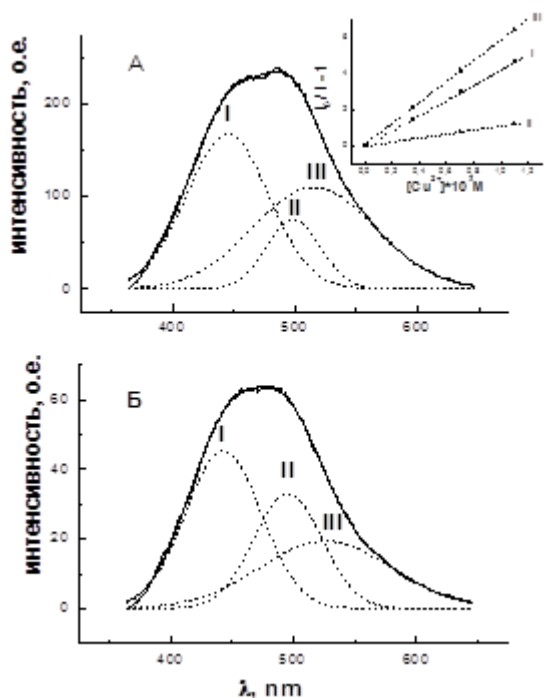


Рис.9. Корректированные спектры флуоресценции образцов ГК(толстые линии). А - $[Cu^{2+}] = 0$, Б - $[Cu^{2+}] = 7 \cdot 10^{-4} M$. Составляющие компоненты - пунктирные линии. Суммарный спектр – сплошная тонкая линия. На врезке: зависимости Штерна-Фольмера для трёх компонент. Обозначения I, II и III компонент см. в тексте.

Сравнение эффективностей тушения флуоресценции ГК и её модельных соединений (производных салициловой кислоты (салицилат натрия (SS)-I и 5-сульфосалициловая кислота (SSA)-II)), предположительно входящих в состав макромолекулы ГК, показало, что для этих соединений свойство полидисперсности отсутствует.

Для оценки спектральной эффективности тушения был использован параметр

$$\alpha_{\lambda} = \frac{I_{0\lambda}}{I_{\lambda}} \quad (3),$$

который характеризует изменение формы контура флуоресценции при добавлении тушителя. Из выражения $K_{ШФ}^{\lambda} = (\alpha_{\lambda} - 1) / [Cu^{2+}]$ следует, что любое проявление немонотонности в спектральной зависимости $K_{ШФ}^{\lambda}$ проявится и в спектральной зависимости параметра α_{λ} .

На рис.10 а-в представлены спектральные зависимости α_{λ} для изученных образцов. Видно, что эти зависимости принципиально различаются: для модельных молекул имеет место монотонный характер (рис.10 б, в), а для образца IHSS эта зависимость немонотонная (рис.11а). Полученные ре-

зультаты показывают, что образец ГК содержит несколько спектральных компонент (несколько типов флуорофоров, принадлежащих разным сайтам макромолекулы ГК), которые претерпевают разное тушение, а образцы производных салициловой кислоты имеют только одну спектральную компоненту (один вид флуорофоров). Слабый монотонный рост α_λ в длинноволновой части спектра флуоресценции образцов II объясняется легким сдвигом линии флуоресценции в красную область благодаря комплексообразованию.

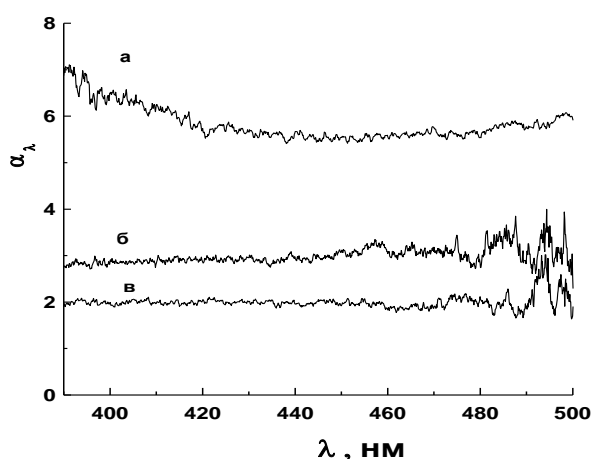


Рис.10.Спектральные зависимости параметра α_λ : а - ГК для $[Cu^{2+}] = 1.1 \cdot 10^{-3} M$; б- I для $[Cu^{2+}] = 3.3 \cdot 10^{-3} M$; в- II для $[Cu^{2+}] = 3.3 \cdot 10^{-3} M$.

С целью изучения влияния размера иона на взаимодействие ГК- Me^{2+} было проведено сравнение спектральных зависимостей эффективностей тушения образцов ГК ионами Cd^{2+} и Cu^{2+} . Эти ионы имеют различные радиусы - 1.08 \AA и 0.8 \AA для Cd^{2+} и Cu^{2+} соответственно и можно было ожидать, что их взаимодействие с флуорофорами будет различным.

Для констант ШФ получены величины $(2560 \pm 250) M^{-1}$ и $(4300 \pm 250) M^{-1}$ при тушении ионами Cd^{2+} и Cu^{2+} и, соответственно, значения констант скорости тушения ШФ K_g составили $8,5 \cdot 10^{11} M^{-1} s^{-1}$ и $1,4 \cdot 10^{12} M^{-1} s^{-1}$. Эти величины превышают диффузионные, которые для водных растворов составляют $\sim 10^{10} M^{-1} s^{-1}$ [10]. Отсюда следует образование комплексов между макромолекулами ГК и ионами металла в темновых условиях [10].

При анализе экспериментальных данных также использовали величину β_λ – отношение величин α_λ для Cu^{2+} и Cd^{2+} соответственно:

$$\beta_{\lambda} = \frac{\alpha_{\lambda}(Cu^{2+})}{\alpha_{\lambda}(Cd^{2+})} \quad (4)$$

На рис.11а показаны спектральные зависимости α_{λ} для тушения флуоресценции ГК ионами Cd^{2+} (1) и Cu^{2+} (2) при приблизительно равной их концентрации. Видно, что в области спектра $400 < \lambda < 600$ нм ионы кадмия тушат флуоресценцию более слабо, чем ионы меди (величина α_{λ} для Cd^{2+} меньше, чем для Cu^{2+}). Это означает, что в макромолекуле ГК сайты, содержащие одинаковые флуорофоры, слабее взаимодействуют с ионом кадмия, чем с ионом меди. Наблюдаемое значение $\alpha_{\lambda} < 1$ для ионов кадмия при $\lambda > 600$ нм означает возгорание флуоресценции.

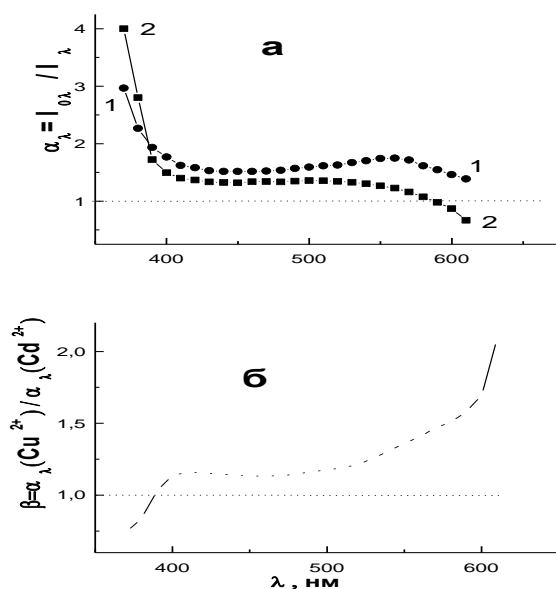


Рис. 11. а - спектральные зависимости параметра α_{λ} : 1- для иона меди; 2 - для иона кадмия, б - спектральные зависимости параметра β_{λ}

На рис.11б представлена спектральная зависимость величины β_{λ} . Видно, что зависимость β_{λ} от λ представляет собой функцию, значения которой возрастают с ростом длины волны флуоресценции ГК. Это означает, что эффективность тушения ионами меди относительно ионов кадмия растёт с увеличением длины волны флуоресценции.

В главе 5 приведены результаты изучения спектральной зависимости эффективности самоотушения флуоресценции ГК при различных концентрациях растворов ГК.

Вопрос о структуре макромолекул ГК в водных растворах при изменении ее концентрации связан с общей проблемой комплексообразования ГК и,

в частности, с механизмом самоассоциации молекул ГК. Численные значения констант самоассоциации $K_{ГК}$ представляют интерес с точки зрения создания полной модели межмолекулярного взаимодействия молекул ГК с различными молекулами.

Первым шагом к вычислению величин $K_{ГК}$ флуоресцентным методом может быть знание констант самотушения $K_{СТ}$ флуоресценции ГК. Для получения $K_{СТ}$ разных фракций ГК было использовано уравнение Штерна - Фольмера (5) с учётом того, что тушителем для процесса самотушения является сама молекула ГК:

$$I_0 / I = 1 + K_{СТ}[ГК], \quad (5)$$

где $[ГК]$ – концентрация фракций ГК (мг/литр); I_0 и I – значения скорректированной интегральной интенсивности флуоресценции при $[ГК] = 0$ и $[ГК] \neq 0$ соответственно.

Установлено, что с ростом концентрации $[ГК]$ имеет место снижение интенсивности спектра флуоресценции ГК, что свидетельствует о наличии процессов самотушения. Полученные значения $K_{СТ}$ для фракций А, Б, С+Д, представлены в табл.1. Из таблицы видно, что полученные константы само-

Таблица 1

Константы самотушения $K_{СТ}$ и константы скорости тушения флуоресценции K_g для различных фракций ГК

Фракция	M, kD	$K_{СТ}$, л/мг	$K_{СТ} \cdot 10^{-6}$, л/моль	$K_g \cdot 10^{-15}$, л/моль·сек	ΔM_1 , нм* («концентрационный сдвиг»)
А	200	0.165 ± 0.016	33 ± 2.3	11 ± 0.8	13 ± 1.3
Б	80	0.115 ± 0.01	$9,2 \pm 0,9$	3.1 ± 0.3	17 ± 1.7
С+Д	17.5	0.4 ± 0.04	7 ± 0.7	$2,3 \pm 0.2$	25 ± 2.5

* Разница значений первых моментов (центров тяжести) спектров флуоресценции ГК при концентрациях фракций 50 и 5 мг/л.

тушения ($K_{CT} > 10^7$ литр/моль) заметно превышают константы тушения флуоресценции ГК ионами металлов и органическими молекулами, концентрация которых лежит в пределах $10^3 - 10^5$ л/моль. Также видно, что величины K_{CT} возрастают с ростом их молекулярной массы. Значения констант скорости тушения K_q составляет более 10^{16} л/(моль·сек), что означает статическую природу механизма самотушения флуоресценции ГК. Статическое тушение предполагает наличие образования комплексов в отсутствие света при тушении флуоресцирующих молекул посторонним тушителем [10]. В случае самотушения флуоресценции статическое тушение можно, по-видимому, связать с процессом самоассоциации молекул.

Полученные результаты интерпретированы в рамках представлений о преобладающем влиянии гидрофобных сил для процессов самоассоциации. Наблюдаемые нами большие константы для более тяжёлых фракций можно связать с большим гидрофобным эффектом для этих фракций.

Для дальнейшего понимания структурных свойств макромолекул ГК, а также механизма самоассоциации, был использован метод СЗЭТФ. Для этого использовали величины констант самотушения $K_{CT\lambda}$ и α_λ - отношение квантовых выходов флуоресценции фракций ГК на длине волны λ при концентрациях ГК 1 (I_λ^{1M}) и 10 мг/л (I_λ^{10M}) соответственно:

$$\alpha_\lambda = I_\lambda^{1M} / I_\lambda^{10M} \quad (6)$$

На рис. 12 а показаны спектральные зависимости констант самотушения $K_{CT\lambda}$ для изученных фракций. Видно, что зависимости $K_{CT\lambda}$ для разных фракций отличаются друг от друга. Это свидетельствует о том, что сайты, содержащие флуорофоры, испускающие свет в одной и той же спектральной области, но входящие в состав разных фракций, имеют разную природу (химическую, структурную и т.д.) и, соответственно, разную эффективность тушения.

На рис. 12б представлены спектральные зависимости α_λ для рассмотренных фракций. Как видно из сравнения рис. 12 а, б, абрисы спектральных

зависимостей $K_{стл}$ и α_λ практически подобны. Отсюда следует, что параметр α_λ можно использовать для качественных выводов о спектральной зависимости эффективности самотушения флуоресценции молекул ГК. Кроме того параметр α_λ позволяет анализировать изменения контура спектра флуоресценции в любом спектральном диапазоне.

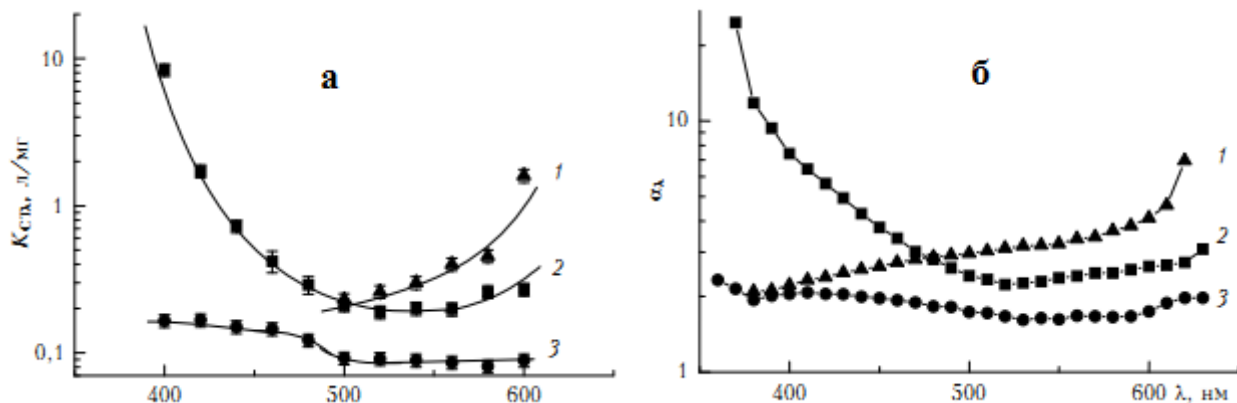


Рис. 12. Спектральные зависимости констант самотушения $K_{стл}$ (а) и α_λ (б) для фракций А (1), В (3) и С +D (2).

Полученные результаты (рис.12) показывают, что для каждой фракции имеется индивидуальная спектральная зависимость эффективности самотушения флуоресценции $K_{стл}$ и α_λ , что отражает индивидуальные особенности структуры каждой из этих фракций.

В шестой главе приводятся результаты применения метода абсорбции для получения сведений о структуре водных растворов ГК и проявление взаимодействия ГК с ионами металлов. Ранее такой экспериментальный подход вообще не применялся.

Исследование состояния Н-связей в водных растворах с помощью спектров поглощения было проведено в области поглощения ОН-колебаний 3 обертона (длина волны поглощения ~ 750 нм). Было изучено несколько водных растворов, имеющих различие по энергии (силе) Н-связи молекул воды. Измеряемыми параметрами были величины первого момента полос поглощения M_1 (центры тяжести полос).

В таблице 2 представлены величины первых моментов M_1 изученных образцов. Из представленных данных видно, что добавление к растворам щелочи и ГК медного купороса приводит к росту величины M_1 . Это означает, что сила Н-связей при добавлении соли возрастает. Напротив добавление

Таблица 2. Зависимость M_1 от вида раствора.

Раствор	M_1 , нм
NaOH	$756,36 \pm 0,07$
10^{-3} М CuSO ₄	$757,29 \pm 0.07$
ГК	$755,49 \pm 0,07$
ГК+ $2.5 \cdot 10^{-3}$ М CuSO ₄	$755,7 \pm 0,07$

ГК к раствору щелочи приводит к ослаблению силы Н-связей. Следует заметить, что влияние макромолекул ГК на состояние Н-связей в водных растворах установлено впервые. Природа этого эффекта

предположительно может быть связана с тем, что сетка Н-связей в растворе щелочи при добавлении ГК нарушается таким образом, что образуются состояния с меньшей энергией Н-связей между молекулами воды. Нарушение исходной сетки Н-связей может происходить как за счёт изменения длины Н-связи $R(O \cdots O)$, так и угла её изгиба $\varphi (O-H \cdots O)$.

Таким образом, показано, что с помощью спектров поглощения в области поглощения ОН-колебаний 3 обертона, применяя стандартный спектрофотометр на видимую область, можно получать достоверную информацию об изменении состояния Н-связей в водных растворах.

Изучение взаимодействия гуминовой кислоты с катионом металла в зависимости от величины рН раствора было проведено в спектральном диапазоне 210-350 нм. Было установлено (см. рис. 13), что дополнительное поглощение новой полосы в растворах ГК + CuSO₄·5H₂O при $\lambda = 270$ нм ($\Delta D_{270\text{нм}}$), полученное вычитанием из оптической плотности $D_{270\text{нм}}$ раствора ГК + CuSO₄·5H₂O величины $D_{270\text{нм}}$ растворов ГК и CuSO₄·5H₂O, возрастает с уве-

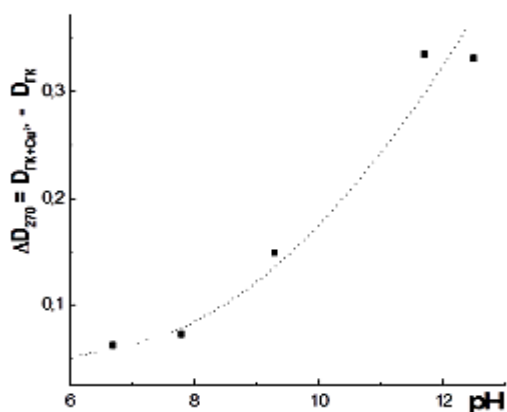


Рис.13. Зависимость величины $D_{270\text{нм}}$ от рН.

личением рН. Это возрастание объясняется тем, что рост концентрации взаимодействующих сайтов ГК с ионом меди может быть обусловлен ростом эффективности реакции диссоциации с увеличением величины рН:



Соответственно рост $[A^{-}]$ будет приводить к росту количества взаимодействующих пар $\{A^{-}(ГК^{-}) - Cu^{2+}\}$



Седьмая глава посвящена изучению взаимодействия производных салициловой кислоты (салицилат натрия (NaSA), 5-сульфосалициловая (SSA) и 5-аминобензойная кислоты (ABA)), как модельных для ГК молекул, с ионами тяжелых металлов методами абсорбции и флуоресценции. По изменениям контура полосы поглощения ПСК в спектральном диапазоне порядка 300 нм изучена эффективность комплексообразования ПСК с ионами меди, никеля и марганца. Проведена оценка констант связывания ПСК с ионами металлов. Показано, что наибольшую эффективность связывания имеет ион Mn^{2+} . Этот ион имеет наибольший размер и, по-видимому, наиболее плотно встраивается в структуру молекул ПСК, у которых комплексообразующими (хелатообразующими) сайтами являются гидроксильная и карбоксильная группы.

Для дальнейшего сравнения коэффициентов молярного поглощения (КМП) макромолекул ГК с молекулами ПСК было проведено его определение на примере молекулы CuSal. Молекула CuSal образуется в результате реакции:



где K – константа равновесия.

$$K = [\text{CuSal}] / [\text{HSal}^-][\text{Cu}^{2+}] \quad (10)$$

Величина $\varepsilon_{\text{HSal}^-}$ вычислялась из соотношения

$$\varepsilon_{\text{HSal}^-} = OD_0 / [\text{HSal}^-]_0 \quad (11)$$

Величина КМП CuSal на длине волны 320 нм составила $(1.44 \pm 0.09) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Эта величина в 25 раз превосходит величину КМП исходного иона HSaI⁻. Большой, чем у моноаниона HSaI⁻ коэффициент молярного поглощения молекулы CuSal в спектре поглощения на $\lambda = 320$ нм может быть связан с образованием хелатных структур, в которых имеет место перераспределение электронной плотности π -системы ароматического кольца исходной молекулы. В результате этого перераспределения электрон переходит на не заполненную d-орбиталь иона меди и, таким образом, исходные молекулярные орбитали HSaI⁻ претерпевают изменения.

Взаимодействие производных моноаниона (салицилат натрия в воде, SS) и дианиона (5-сульфосалициловая кислота, SSA) салициловой кислоты с ионами Cu^{2+} изучалась методом тушения флуоресценции. На рис. 14 а,б приведены спектры флуоресценции образцов производных СК в зависимости от концентрации Cu^{2+} . Установлено заметное тушение флуоресценции, но при любых концентрациях тушителя спектр флуоресценции не претерпевает изменений (величины первого момента спектров флуоресценции M_1 и полуширина спектра не меняются).

На рис.15 а-б показаны зависимости Штерна – Фольмера для тушения интенсивности флуоресценции SS и SSA. Видно, что зависимости линейны и позволяют определить величины $K_{\text{шф}}$. Тангенсы наклонов этих зависимостей ($K_{\text{шф}}$) составляют 600 M^{-1} и 250 M^{-1} для образцов SS и SSA соответственно. Оценка констант скорости тушения с учётом того, что $\tau_0 \sim 4$ нс, даёт величины $1.43 \cdot 10^{11}$ л/мол·сек и $6 \cdot 10^{10}$ литр/мол·сек для образцов SS и SSA соответственно. Полученные значения превышают диффузионные, что сви-

свидетельствуют о статическом механизме тушения и, соответственно, об образовании комплексов {ПСК – Cu²⁺}.

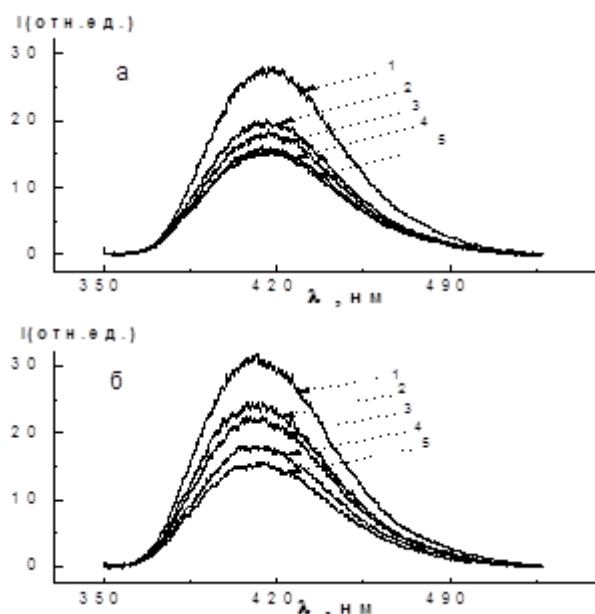


Рис.14. Спектры флуоресценции образцов СК в зависимости от [Cu²⁺]. Салицилат натрия – а, 5-сульфосалициловая кислота – б. [Cu²⁺] = 0 – 1, 10⁻³ моль/л – 2, 1.65*10⁻³ моль/л – 3, 3.3*10⁻³ моль/л – 4, 5*10⁻³ моль/л – 5.

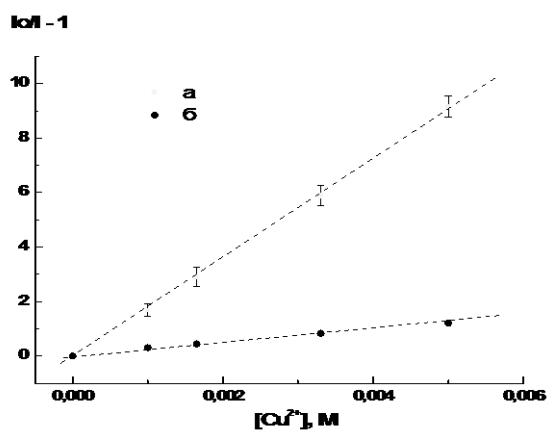


Рис.15. Зависимости Штерна-Фольмера для производных СК: а-салицилат натрия; б-5-сульфосалициловая кислота.

Из полученных данных видно, что эффективность взаимодействия для моноаниона SS выше, чем для дианиона SSA. Это связано с тем, что энергия сольватации комплекса SSA - вода выше, чем комплекса SS - вода, т.е. молекулы воды образуют с ССК более прочный комплекс. Взаимодействие СК – Cu²⁺ будет больше для комплекса, где связь СК - вода слабее, поскольку в этом случае иону меди для образования комплекса более выгодно заместить молекулу воды из ближайшей к СК координационной сферы. Следовательно,

взаимодействие дианиона с ионом меди будет меньше из-за большей прочности комплекса ССК - вода. В результате константа комплексообразования ССК - Cu^{2+} должна быть меньше, что и наблюдается экспериментально.

Методами абсорбции и флуоресценции было проведено изучение эффективности межмолекулярного взаимодействия нейтральной формы и моноаниона салициловой кислоты с ионом Cd^{2+} в диапазоне величин $\text{pH} = 1,5 \div 8$. Эффективность взаимодействия определялась по изменению контура полосы поглощения и интенсивности флуоресценции различных форм ПСК. Установлено, что в зависимости от формы ПСК (т.е. от величины pH [13,14]) добавление CdBr_2 к исходному раствору приводит к образованию коротковолнового плеча при $\lambda > 320$ нм в спектрах поглощения нейтральной формы (при $\text{pH} < 3$) и образованию длинноволнового плеча для моноаниона HSal^- (при $\text{pH} > 4$). В спектрах флуоресценции был установлен рост интенсивности для нейтральной формы ПСК (при $\text{pH} < 3$) и уменьшение интенсивности для моноаниона HSal^- (при $\text{pH} > 4$) (рис. 16).

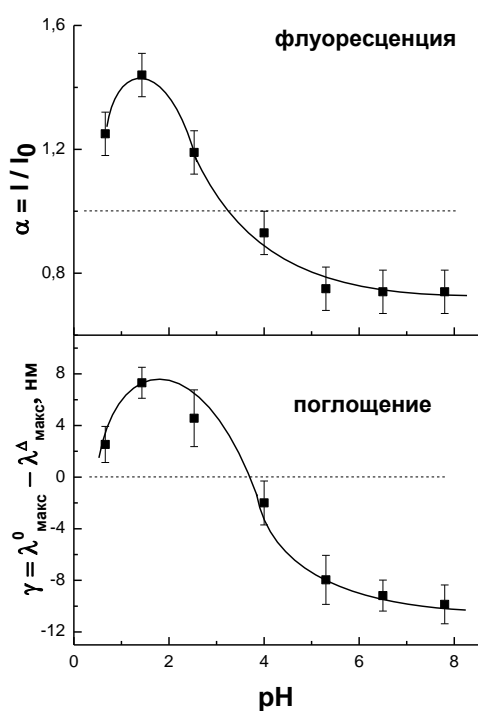


Рис.16. pH - зависимость относительной интенсивности флуоресценции ПСК и величины дополнительного поглощения на $\lambda = 320$ нм.

Наблюдаемые спектральные изменения объясняются в рамках единых представлений об изменении природы межмолекулярного взаимодействия

ПСК с ионом Cd^{2+} в зависимости от исходной величины pH раствора. Суть представлений заключается в том, что при добавлении CdBr_2 в ПСК надо принимать во внимание наличие трёх физико-химических факторов, которые определяют взаимодействие ПСК с ионом Cd^{2+} , влияющих на параметры спектров поглощения и флуоресценции. Этими факторами являются: уменьшение величины pH при добавлении CdBr_2 к раствору ПСК (фактор 1); уменьшение эффективности H-связывания молекулы ПСК с молекулами воды (фактор 2); наличие электростатического ион-ионного взаимодействия моноиона HSaI^- с ионом Cd^{2+} (фактор 3).

Полученные константы тушения флуоресценции моноиона HSaI^- ($8,3 \pm 1,5$ M^{-1}) при $\text{pH} > 5$ оказались значительно меньше констант ударного (диффузионного) или концентрационного (статического) тушения.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

В диссертационной работе предложен и апробирован подход к изучению молекулярных полидисперсных систем на примере макромолекул гуминовых кислот, которые являются типичным образцом полидисперсных систем. Подход основан на анализе спектральной зависимости эффективности тушения интенсивности флуоресценции ГК ионами металлов. Использование этого подхода позволило получить ранее не известную информацию о расположении флуорофоров в структуре макромолекулы ГК. Наглядность и эффективность применения предложенного метода была продемонстрирована на примере изучения модельных молекул, у которых свойство полидисперсности отсутствует.

1. Для учёта эффекта внутреннего фильтра в испускании флуоресценции получено соотношение, позволяющее вычислять зависимость интенсивности флуоресценции в поглощающей среде от диаметра лазерного луча, расстояния центра лазерного луча до выходной стенки кюветы и величины оптической плотности. Показано, что в условиях высокой оптической плотности

образца диаметр возбуждающего луча может вносить заметные искажения в наблюдаемый контур флуоресценции.

2. Предложен подход к изучению дисперсных свойств ГК, заключающийся в изучении спектральной зависимости эффективности тушения флуоресценции (СЗЭТФ). Метод СЗЭТФ позволяет без специального математического аппарата выявлять степень полидисперсных свойств макромолекул ГК при возбуждении спектра флуоресценции монохроматическом светом. Предложенный подход может быть использован не только для изучения полидисперсных свойств образцов ГК, но и для выявления неоднородной природы спектров флуоресценции любых молекул.

3. При изучении СЗЭТФ образцов гуминовых кислот ГК (IHSS) ионами Cd^{2+} и Cu^{2+} установлено, что в спектральном диапазоне 400 - 600 нм изменения СЗЭТФ α_λ для ионов Cd^{2+} и Cu^{2+} отличаются. Несовпадения полученных зависимостей α_λ для ионов Cd^{2+} и Cu^{2+} объяснено в рамках представлений о различной доступности сайтов, содержащих флуорофоры, связанной с различием радиусов ионов (1.08Å и 0.8Å для Cd^{2+} и Cu^{2+} , соответственно). На основании большей эффективности тушения флуоресценции в коротковолновой области спектра делается заключение о принадлежности флуорофоров, испускающих эту флуоресценцию, сайтам, находящимся на периферии макромолекул ГК.

4. С использованием метода СЗЭТФ получена информация об изменении состояния флуорофоров ГК в процессе самоассоциации ГК. Предполагается, что природа самоассоциации для всех молекул заключается в гидрофобных свойствах макромолекул ГК. Оценочные значения констант самотушения ($K_{\text{СТ}} > 10^7$ литр/моль) заметно превышают константы тушения флуоресценции ГК ионами металлов и органическими молекулами ($10^3 - 10^5$ л/моль). Установлено, что величины констант самотушения флуоресценции фракций ГК возрастают с ростом их молекулярной массы.

5. В экспериментах по абсорбции впервые обнаружено образование дополнительного поглощения, которое связывается с взаимодействием молекул

гуминовой кислоты ГК с ионом металла (Cu^{2+}). Установлено, что увеличение величины рН раствора приводит к росту дополнительного поглощения. Этот эффект интерпретируется в рамках представлений об увеличении концентрации анионов ГК и, соответственно, увеличении эффективности взаимодействия макромолекулы ГК с катионом Cu^{2+} .

6. На основании данных по абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии проведена единая интерпретация проявления особенностей структуры макромолекул ГК как в исходном состоянии, так и при изменении внешних условий (вариация концентрации, рН и добавление ионов тяжёлых металлов).

7. Методом тушения флуоресценции изучено взаимодействие производных салициловой кислоты (ПСК) с ионом меди. Установлено, что величина скорости тушения для образцов салициловой и сульфосалициловой кислот ионами меди составляет $1.43 \cdot 10^{11}$ л/мол·сек и $6 \cdot 10^{10}$ литр/мол·сек соответственно, что свидетельствуют о статическом механизме тушения и, соответственно, об образовании комплексов $\{\text{ПСК} - \text{Cu}^{2+}\}$. Показано, что эффективность взаимодействия для моноаниона салициловой кислоты выше, чем для дианиона сульфосалициловой кислоты.

8. Установлено изменение спектральных параметров полосы поглощения на длине волны ~ 300 нм при изменении концентрации производных салициловой кислоты (салицилат натрия (NaHSA), 5-сульфосалициловая (SSA) и 5-аминобензойная кислоты (ABA)). Эти изменения интерпретированы в рамках представлений о межмолекулярном взаимодействии этих молекул. Эффективность взаимодействия молекул ПСК между собой располагается в порядке $\text{NaHSA} < \text{SSA} < \text{ABA}$.

9. При добавлении к раствору салицилата натрия NaHSal ионов Cu^{2+} в спектрах поглощения обнаружено дополнительное поглощение в спектральном диапазоне более 300 нм. В предположении, что дополнительное поглощение обусловлено только образованием молекулы салицилата меди CuSal , была проведена оценка коэффициентов молярного поглощения КМП этих молекул

на длине волны 320 нм, которая составила $(1.44 \pm 0.09) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Эта величина в 25 раз превосходит величину КМП исходного иона HSal^- . Делается предположение, что одной из возможных причин такого отличия может быть образование хелатных структур, в которых имеет место перераспределение электронной плотности π - системы ароматического кольца исходной молекулы.

10. Методами поглощения и флуоресценции изучена эффективность взаимодействия нейтральной формы и моноаниона салициловой кислоты с ионами Cd^{2+} в диапазоне величин $\text{pH} = 1.5 \div 8$. Получены константы тушения флуоресценции моноиона HSal^- , которые значительно меньше диффузионных. Для всех форм салициловой кислоты сделано заключение об отсутствии их взаимодействия с Cd^{2+} , образующихся в темновых условиях. Наблюдаемые спектральные изменения контуров полос поглощения и линий флуоресценции объясняются в рамках единых молекулярно-физических представлений об изменении природы межмолекулярного взаимодействия кислот с ионами Cd^{2+} в зависимости от величины pH раствора (при увеличении pH диполь-ионный характер взаимодействия сменяется ион-ионным).

Благодарности

Автор выражает искреннюю признательность Лаврику Н.Л.- научному консультанту за неустанную заботу, бескорыстную помощь и руководство над настоящим трудом, О.Е.Трубецкой и О.А.Трубецкому за предоставленные образцы гуминовых кислот из Курского чернозёма, коллективу лаборатории фотохимии Института химической кинетики и горения им. В.В.Воеводского СО РАН за предоставленную возможность работы на лабораторном оборудовании и обсуждение полученных результатов.

Основные публикации по теме диссертации

1. Н.Л.Лаврик, Н.У.Муллоев, А.Тармышева, О.Трубецкой, О.Трубецкая, К.Ричард. Изучение концентрационной зависимости структуры гумино-

- вых кислот с помощью метода флуоресценции // Гуминовые вещества в биосфере: Тезисы докладов III Всероссийской конференции, Санкт-Петербург, 2005.-С.72-73.
2. Н.Л.Лаврик, Н.У.Муллоев Влияние концентрации на структуру макромолекул гуминовых кислот в водных растворах // Химия в интересах устойчивого развития, 2006-Т.13.-№4.-С.379-390.
 3. Н.Л.Лаврик, Ю.Я.Ефимов, Н.У.Муллоев. Зависимость эффекта внутреннего фильтра от диаметра возбуждающего луча в спектрах испускания флуоресценции // Оптика атмосферы и океана, 2008.-Т.21.-№ 5.-С.381-385.
 4. Н.Л.Лаврик, Н.У.Муллоев. Концентрационная и спектральная зависимость констант тушения флуоресценции гуминовых кислот ионами металлов как новый подход к изучению полидисперсных свойств структуры гуминовых кислот // Тезисы докладов Международной конференции по химической физике. Ереван, 20-25 октября 2008.-С15.
 5. Н.Л.Лаврик, Н.У.Муллоев. Изучение комплексообразования моно и дианионов салициловой кислоты с ионом Cu^{2+} в водных растворах методом тушения флуоресценции // Химия высоких энергий, 2010.-Т.44.-№2.-С.173-176.
 6. N.L.Lavrik, N.U.Mulloev. The studying of nanocomplex of salicylic acid with natural aminoacids by optical spectroscopic methods // Book of abstracts of International Conference "Organic nanophotonics". Sankt-Peterburg, Russia, 2009.-P.143.
 7. Н.Л.Лаврик, Н.У.Муллоев. Изучение влияния ассоциации на структуру ГК по тушению флуоресценции // Журнал прикладной спектроскопии, 2010.-Т.77.-№4.-С.627-632.
 8. N.L.Lavrik, N.U.Mulloev. Self-quenching of fluorescence of humic acids in aqueous solutions // XXV International conference on Photochemistry. Beijing, China, 2011.-P.159.

9. Н.Л.Лаврик, Н.У. Муллоев. Метод изучения полидисперсности гуминовой кислоты по тушению флуоресценции ионами Cu^{2+} // Журнал прикладной спектроскопии, 2011.-Т.78.-№5.-С.757-764.
10. Н.Лаврик, Н.Муллоев. Изучение взаимодействия производных салициловой кислоты с природными аминокислотами и белками методами молекулярной спектроскопии // Международная конференция «Современные вопросы молекулярной спектроскопии конденсированных сред». Душанбе, Таджикистан, 11-12 ноября 2011.-С. 31-32.
11. Н.У.Муллоев, Н.Л.Лаврик, Б.Н.Нарзиев. Анализ спектральных зависимостей тушения флуоресценции макромолекул гуминовых кислот и их модельных молекул // Доклады Академии наук Республики Таджикистан, 2012.-Т.55.-№10.-С.800-805.
12. N.L.Lavrik, N.U.Mulloev. Spectral Dependence of the Efficiency of Fluorescence Quenching as a New Method to Study the Polydispersity of Humic Acid // Book of Abstracts 5th International conference ecological chemistry, Chisinau (Moldova), 2012.-P.121.
13. Н.Л.Лаврик, Н.У.Муллоев Спектральная зависимость эффективности тушения флуоресценции как метод изучения дисперсности гуминовых кислот // Сборник «Современные проблемы экологии», Тула: Изд-во Инновационные технологии, 2012.-С.56-62.
14. Н.Л.Лаврик, Н.У.Муллоев. Концентрационная зависимость интенсивности флуоресценции гуминовых кислот // Оптика атмосферы и океана, 2012.-Т.25.-№9.-С.833-839.
15. N.L.Lavrik, N.U.Mulloev. The Study of Complexation Features of Humic Acids Macromolecules with Metal Ions by The Spectral Dependence of the Fluorescence Quenching Efficiency // Book of Abstracts of Russian-Chinese Workshop on Environmental Photochemistry. Novosibirsk (Russia), 2012.-P.24.
16. N.L.Lavrik, N.U.Mulloev. The Study of Complexation Features of Humic Acids Macromolecules with Metal Ions by the Spectral Dependence of the Fluorescence Quenching Efficiency // Тезисы второй Международной конферен-

- ции по гуминовым инновационным технологиям «Природные и синтетические наночастицы в технологиях очистки вод и почв» Москва, 2012,- С.144.
- 17.Н.Л.Лаврик, Н.У.Муллоев. Спектральная зависимость самотушения флуоресценции гуминовых кислот // Оптика атмосферы и океана,2012.-Т.25.- №10.-С.913-919.
- 18.N.L.Lavrik, N.U.Mulloev. Fluorescence Quenching of Salicylic Acid Derivatives by Copper(II) Ions // Book of Abstracts the VIII Voevodsky Conference "Physics and Chemistry of Elementary Chemical Processes", Novosibirsk(Russia),2012.-P.206.
- 19.Н.У.Муллоев, Н.Л.Лаврик, Б.Н.Нарзиев. Спектральные особенности эффективности тушения флуоресценции макромолекул гуминовых кислот ионами кадмия и меди // Доклады Академии наук Республики Таджикистан,2013.-Т.56.-№ 4.-С.290-296.
- 20.Н.Л.Лаврик, Н.У.Муллоев. Применение спектрометра УФ и видимого диапазона для изучения колебательных спектров водных растворов // Современные проблемы экологии. VIII Международная научно-техническая конференция. Тула:Изд-во «Инновационные технологии»,2013,-С.106-107.
- 21.N.L.Lavrik, N.U.Mulloev. Concentration dependence of humic acid fluorescence intensity // Fluorophores characterization, synthesis and applications; Nova Science Publishers, Inc.:New York.2013.-PP.77-93.
- 22.Н.Л.Лаврик, Н.У.Муллоев. Влияние кислотно-щелочного равновесия на спектры поглощения гуминовой кислоты в присутствии ионов меди // Журнал прикладной спектроскопии,2014.-Т.81.-№1.-С.159-162.
- 23.Н.Л.Лаврик, Н.У.Муллоев. Новые спектроскопические подходы для изучения структуры гуминовых кислот методами флуоресцентной и абсорбционной спектроскопии // Материалы VI Всероссийской научной конференции с международным участием «Гуминовые вещества в биосфере», Сыктывкар, Республика Коми, Россия,2014.-С.189-191.

24. Лаврик Н.Л., Муллоев Н.У. Новые подходы для изучения комплексообразования гуминовых кислот методами флуоресцентной и абсорбционной спектроскопии // Third International Conference of CIS IHSS on Humic Innovative Technologies. Tenth International Conference daRostim. «Humic Substances and Other Biologically Active Compounds in Agriculture» HIT-daRostim. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, 19-23 November 2014.-PP.187-188.
25. Лаврик Н.Л., Муллоев Н.У. Определение констант связывания гуминовых кислот с ионами металлов методом абсорбции // XXVI Симпозиум «Современная химическая физика», Туапсе, 20 сентября-1 октября 2014, С.89.
26. Nikolay L.Lavrik, Nurullo U.Mulloev. The Analysis of the Quenching Efficiency of Humic Acid Fluorescence by Cadmium and Copper Ions // American Journal of Analytical Chemistry, 2014.-V.5.-№.17.-PP.1167-1173.
27. N.L.Lavrik and N.U.Mulloev. The Self-association of Salicylic Acid Derivatives in Aqueous Solutions Studied by Methods of Absorption and Fluorescence // In Book “Salicylic Acid and Jasmonic Acid: Biosynthesis, Functions and Role in Plant Development”, Editors: Phyllis Santos, Nova Science Publishers, 2014.-PP.67-82. ISBN:978-1-63482-139-1.
28. Н.У.Муллоев, Н.Л.Лаврик. Спектральная зависимость эффективности тушения флуоресценции - новый подход для изучения полидисперсных свойств гумусовых кислот // Вестник Таджикского национального университета, серия естественных наук, 2015.-№1/4(168).-С.68-75.
29. Н.У.Муллоев, Н.Л.Лаврик. Возможность изучения самоассоциации макромолекул гуминовых кислот методом флуоресцентной спектроскопии (Обзор) // Вестник Таджикского национального университета, серия естественных наук, 2015.-№1/5(188).-С.65-82.
30. К.Х.Салимов, Н.Ш.Иброхимов, Н.У.Муллоев. Изучение содержания гуминовых кислот в почвах Таджикистана методом ИК-спектроскопии // Доклады Таджикской академии сельскохозяйственных наук, 2015.-№1(43).-С.33-37.

31. Н.У. Муллоев, Н.Л. Лаврик. Изучение состояние Н- связей в водных растворах по спектрам 3 обертона ОН колебания воды с помощью стандартного спектрофотометра // Вестник Таджикского технического университета, 2015.-№1(29).-С.22-24.
32. Н.У. Муллоев, Н.Л. Лаврик. Особенности взаимодействия производных салициловой кислоты с ионами двухвалентных металлов по данным УФ - спектроскопии // Вестник Таджикского национального Университета, серия естественных наук, 2015.-№1/1(156).-С.79-82.
33. Н.У. Муллоев, Н.Л. Лаврик. Самоассоциация молекул производных салициловой кислоты // Вестник Таджикского национального Университета, серия естественных наук, 2015.-№1/3(56).-С.64-73.
34. Н.У. Муллоев Изучение взаимодействия гуминовых кислот и производных салициловой кислоты методом тушения флуоресценции // Вестник Таджикского национального университета. Серия естественных наук, 2016.-№1/3(200).-С.56-63.
35. Н.У. Муллоев, Н.Л. Лаврик. Б.И. Махсудов. Оценка коэффициента молярного поглощения спектра салицилата меди в ультрафиолетовой области // Вестник Таджикского национального Университета, серия естественных наук, 2016.-№1/3(200).-С.101-105.

Цитируемая литература

1. F.J.Stevenson. Humic chemistry: genesis, composition, reaction // Chichester, Wiley, 1982.-V.1.-443 с.
2. Перминова И.В. Анализ, классификация и прогноз свойств гумусовых кислот // Автореферат дисс. докт. хим. наук, 2000.-50 с.
3. Senesi N, Miano TM, Provenzano MR, Brunetti G. Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy // Soil Science, 1991.-V.152.-№4.-PP.259-271.

4. В.М.Мажуль, Л.С.Ивашкевич, Д.Г.Щербин, Н.А.Павловская, Г.В.Наумова, Т.Ф.Овчинникова. Люминесцентные свойства гуминовых веществ // Журнал прикладной спектроскопии, 1997.-Т.64.-№4.-С.489-493.
5. И.В.Соколова, О.Н.Чайковская, А.А.Бегинина. Спектрально-люминесцентные свойства гуминовых кислот // Оптика атмосферы и океана, 2004.-Т.17.-№2-3.-С.241-244.
6. Enev V, Pospíšilová L., Klučáková M., Liptaj T., Doskočil L. Spectral Characterization of Selected Humic Substances // Soil & Water Research, 2014.-V.9.-№1.-PP.9-17.
7. Sona Konecna, Nadezda Fasurova, Martina Klucakova. Study of humic substances by fluorescence spectroscopy // Journal of Biochemical Technology, 2010.-V.2.-№5.-PP.S102-S103.
8. O.Trubetskaya, O.Trubetskoj, G.Guyot, F.Andreuxd, C.Richar. Fluorescence of soil humic acids and their fractions obtained by tandem size exclusion chromatography-polyacrylamide gel electrophoresis // Organic Geochemistry, 2002.-V.33.-№2.-PP.213-220.
9. Н.Л. Лаврик. Изучение полидисперсных свойств молекул гуминовых кислот с помощью люминесцентной спектроскопии // Химия в интересах устойчивого развития, 2003.-Т.11.-№5.-С.751-753.
- 10.Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии // М.:Изд-во Мир, 1986.-496 с.
- 11.М.Kubista, R.Sjöback, S.Eriksson, B.Albinsson. Experimental correction for the inner-filter effect in fluorescence spectra // Analyst, 1994.-V.119.-№3.-PP.417-419.
12. Chen S, Inskeep WP, Williams SA, Callis PR. Fluorescence Lifetime Measurements of Fluoranthene, 1-Naphthol, and Napropamide in the Presence of Dissolved Humic Acid // Environmental Science & Technology, 1994.-V.28.-№9.-PP1582-1588.
- 13.I.P.Pozdnyakov, V.F.Plyusnin, V.P.Grivin D.Yu.Vorobyev, A.I.Kruppa, H. Lemmetyinen. Photochemistry of sulfosalicylic acid in aqueous solutions //

Journal of Photochemistry and Photobiology A:Chemistry,2004.-V.162.-№1.-
PP.153-162.

14.I.P.Pozdnyakov, A.Pigliucci, N.Tkachenko, V.F.Plyusnin, E.Vauthey,
H.Lemmetyinen. The photophysics of salicylic acid derivatives in aqueous so-
lution // Journal of Physical Organic Chemistry,2009.-V.22.-№5.-PP.449-454.