

На правах рукописи

Позднякова Виолетта Юрьевна

**ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ ГУМИНОВЫХ
ВЕЩЕСТВ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ СВОЙСТВ**

Специальность 02.00.14 – радиохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2006

Работа выполнена на кафедре радиохимии, Химического факультета
на кафедре органической химии Химического факультета
на кафедре общего земледелия факультета Почвоведения
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Научный руководитель:

кандидат химических наук, доцент Бадун Г.А.

Официальные оппоненты:

доктор химических наук Сидоров Г.В.

доктор химических наук Алентьев А.Ю.

Ведущая организация: Институт геохимии и аналитической химии
им. В.И. Вернадского РАН

Защита состоится “25” мая 2006 года в 15⁰⁰ на заседании
Диссертационного Совета Д 501.001.42 при Московском
государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992,
Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический
факультет, кафедра радиохимии, ауд. 308.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Химического
факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан “25” апреля 2006 г.

Ученый секретарь

Диссертационного Совета Д 501.001.42,

кандидат химических наук



Бунцева И.М.

2006 А
9314

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Меченные тритием соединения нашли широкое применение в решении многих научных задач, так как тритий обладает уникальными ядерно-физическими свойствами (максимальная энергия бета-излучения 18.6 кэВ, период полураспада 12.3 года), тритиевую метку можно ввести практически в любую органическую молекулу, работа с меченными тритием веществами не требует чрезвычайных мер радиационной защиты, а удельная радиоактивность соединения, содержащего один атом трития на молекулу, составляет 1.07 ТБк/ммоль. В настоящее время разработано большое число методов, позволяющих получить меченные тритием соединения самых разных классов с высокой удельной радиоактивностью.

Современные исследования сложных природных образований выдвигают особые требования к меченым веществам. Так как такие системы содержат сложные смеси макромолекул переменного состава и нерегулярного строения, а для их описания используют интегральные характеристики состава, строения и других показателей, то для изучения подобных объектов с помощью радиоактивной метки требуется неизбирательное введение трития и его равномерное распределение по компонентам объектов. Причем процедура введения метки должна быть универсальной, а меченый препарат должен полностью сохранять свойства исходного. Перспективным видится использование метода термической активации трития, с помощью которого возможно неселективное введение метки в самые разные химические соединения.

Примером сложных природных образований являются гуминовые вещества (ГВ). За последние годы резко возросло число исследований физико-химических свойств ГВ и их физиологической активности с целью применения ГВ в сельском хозяйстве, ветеринарии, медицине, а также в качестве геохимических барьеров для экотоксикантов и радионуклидов. В настоящее время для изучения свойств ГВ используют титриметрические и другие аналитические методы анализа, различные варианты хроматографии, методы спектроскопии ^{13}C -ЯМР, ПМР и др. Несомненно, меченные тритием препараты могут быть мощным инструментом в исследовании свойств ГВ и их поведения в различных системах, в том числе в определении способности ГВ связываться с биологическими мембранами и усваиваться высшими растениями. Для таких исследований необходимо знать гидрофобность и поверхностную активность ГВ. Однако в настоящее время нет прямых методов определения таких свойств ГВ. В последние годы на Химическом факультете МГУ был разработан метод исследования адсорбции белков на границе раздела водный раствор-толуол со сцинтиллирующими добавками (метод сцинтиллирующей фазы). Адаптация данного метода к исследованию поверхностно-активных свойств ГВ и оценке их гидрофобности может помочь в прогнозировании их поведения в самых разных системах.



Цель настоящей работы – разработка способа получения меченных тритием ГВ с равномерным распределением метки по компонентам препаратов и изучение их гидрофобных и поверхностно-активных свойств методом сцинтиллирующей фазы (СФ).

Объекты исследования – гуминовые вещества (ГВ), представляющие собой сложные смеси устойчивых к биодеструкции высокомолекулярных темноокрашенных органических соединений природного происхождения, образующихся при разложении растительных и животных остатков под действием микроорганизмов и абиотических факторов среды. Гуминовые вещества являются макрокомпонентой органического вещества почвенных и водных экосистем, а также твердых горючих ископаемых. Характерной особенностью этих веществ являются: нестехиометричность состава, нерегулярность строения, гетерогенность структурных элементов, полидисперсность. Различают несколько групп ГВ: 1) гуминовые кислоты (ГК), растворимые только в щелочных растворах; 2) гиматомелановые кислоты (ГМК), извлекаемые из сырого остатка (геля) гуминовых кислот этиловым спиртом; 3) фульвокислоты (ФК), растворимые в воде, щелочных и кислых растворах; 4) гумин - практически нерастворимое и неизвлекаемое из природных тел и компостов органическое вещество.

Научная новизна работы сформулирована в виде следующих положений, которые выносятся на защиту:

1. Разработаны принципы введения тритиевой метки в природные и искусственные смеси биологически активных молекул посредством реакций атомарного трития, полученного при диссоциации трития на вольфрамовой проволоке при 1800-2000 К. Впервые получены меченные тритием ГВ с равномерным распределением метки по компонентам препаратов и удельной радиоактивностью, достаточной для их использования в химических и биохимических исследованиях. Разработана методика очистки меченых препаратов с помощью диализа через мембраны с различным размером пор. Идентичность исходных и меченых препаратов подтверждена с помощью эксклюзионной хроматографии.

2. Разработан новый вариант метода сцинтиллирующей фазы с целью его использования для определения гидрофобности и поверхностной активности ГВ и других сложных природных и искусственных смесей молекул. С помощью тритиевой метки впервые определены коэффициенты распределения ГВ в двухфазных системах толуол-вода и октанол-вода, а также получены изотермы адсорбции ГВ на границе раздела толуол-вода. Полученные результаты позволили построить шкалу гидрофобности и поверхностной активности ГВ.

Практическая значимость работы:

1. Разработанные методики были использованы для введения тритиевой метки в ГВ различной природы и происхождения, а также гуминоподобное вещество лигфол, обладающее биологической активностью и используемое в ветеринарии. С помощью меченных тритием гуминовых и гуминоподобных веществ получены их количественные характеристики

гидрофобности и поверхностной активности. Такая информация очень важна для прогнозирования поведения этих веществ в различных условиях и предсказания их биологической активности.

2. Меченные тритием ГВ использовали в экспериментах по исследованию связывания их с биологическими мембранами микроорганизмов и для определения их поступления в растения через корневую систему.

Апробация работы. Результаты работы доложены на 8, 9, 10-ой Международных научных конференциях по селекции атомов и молекул (Звенигород, Россия, 2003-2005 г.), на 4-ой Российской конференции по радиохимии (Озерск, Россия, 2003), на Международной конференции, организованной Болгарским гуминовым обществом (София, Болгария, 2003), на XII-ом Международном Симпозиуме Международного Гуминового Общества (IHSS) (Sao Paulo, Brazil, 2004), на 7-ом российско-финском симпозиуме по радиохимии (Санкт-Петербург, Россия, 2005), на Международных конференциях студентов и аспирантов по фундаментальным наукам “Ломоносов - 2003, 2004, 2005”, на московском семинаре Межведомственного научного совета по радиохимии при президиуме РАН и ФА РосАтом.

Публикации. Материалы диссертационной работы опубликованы в 4 статьях в научных журналах, в 8 статьях в научных сборниках и в 10 тезисах докладов на международных и всероссийских научных конференциях. По результатам диссертационной работы подана заявка на патент РФ.

Вклад автора в разработку проблемы. В основу диссертации положены результаты научных исследований, выполненных непосредственно автором в период 2002-2006 гг. Работа выполнялась на кафедре радиохимии Химического факультета Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова. Отдельные разделы работы выполнялись на кафедре органической химии Химического факультета МГУ и на кафедре общего земледелия факультета Почвоведения МГУ. Работа проведена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (гранты 03-03-32410 и 01-03-32664) и гранта FE 75184, BA 31/139166/02/U (Research Center for Environment and Health, GSF, Neuherberg, Germany).

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 123 страницах машинописного текста, иллюстрирована 34 рисунками и 18 таблицами. Работа состоит из введения, трех глав (обзор литературы, экспериментальная часть, результаты и их обсуждение), выводов, списка цитируемой литературы, который содержит 214 ссылок.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** показана важность проблемы изучения свойств ГВ, сформулирована цель, показаны научная новизна и практическая значимость работы, обозначены основные этапы исследования.

Первая глава посвящена обзору литературы. В ней приведена характеристика ГВ, проведен анализ существующих методов определения гидрофобности и поверхностной активности ГВ, рассмотрены возможные методы введения радионуклидов в ГВ, методы введения трития в органические молекулы, изложены основы метода термической активации трития, изложена суть метода СФ и его возможности в исследовании поверхностной активности и гидрофобности органических веществ.

Вторая глава содержит описание экспериментальных методик, использованных в работе.

Введение тритиевой метки в препарат. Тритиевую метку в исследуемые препараты вводили с помощью метода термической активации трития. Описаны основные процедуры подготовки веществ к введению тритиевой метки и проведения эксперимента по обработке мишеней атомарным тритием.

Очистка меченных тритием препаратов. Описаны методики очистки и радиохроматографического анализа использованных в работе индивидуальных низкомолекулярных соединений, моделирующих компоненты ГВ. В работе были использованы различные варианты тонкослойной и колоночной хроматографии. Разделение аминокислот и определение их радиоактивности проводили на аминокислотном анализаторе с проточным измерением радиоактивности элюата. На всех стадиях работы проводили контроль радиоактивности с помощью жидкостного сцинтилляционного счета.

Очистку меченных тритием препаратов ГВ от лабильной метки осуществляли с помощью диализа в фосфатном буфере с концентрацией 0.028 М при pH 6.8 через мембраны соответствующего размера (MWCO от 2 до 12 кДа (Merk, Germany)) в течение не менее 30 суток при 4°C. Подбором размера пор мембраны минимизировались потери препарата во время диализа и сохранялось молекулярно-массовое распределение.

Определение молекулярно-массового распределения гуминовых и гуминоподобных веществ с помощью эксклюзионной хроматографии. Гель-хроматографическое фракционирование препаратов проводили на хроматографической системе Abimed. ГВ регистрировали спектрофотометрически при 254 нм. Для получения хроматографического профиля по радиоактивности меченого препарата собирали фракции и измеряли их радиоактивность в сцинтилляционной жидкости OptiPhase HiSafe3 на сцинтилляционном спектрометре RackBeta 1215. Контроль равномерности введения тритиевой метки осуществляли с помощью сравнения профилей выхода с колонки исходного и меченого препаратов по УФ-поглощению при 254 нм, а также по профилю радиоактивности меченого препарата.

Исследование гидрофобных и поверхностно-активных свойств меченных тритием препаратов проводили с использованием метода СФ. Эксперимент проводили в стандартных сцинтилляционных пластиковых флаконах диаметром 1.5 см. Во флакон сначала вносили 0.8 мл раствора

меченого вещества, а затем сверху аккуратно добавляли 3 мл толуола, содержащего 0.45 масс.% 2,5-дифенилоксазола. После добавления органической фазы флакон помещали в жидкостной сцинтилляционный спектрометр RackBeta 1215 и измеряли его радиоактивность через определенные промежутки времени. После уравнивания системы отбирали 2 мл органической фазы в другой флакон и измеряли скорость счета отобранной органической фазы и остатка. В независимых экспериментах исследовали распределение ГВ между водной фазой и октанолом. В этом случае для определения концентрации меченого препарата проводили отбор проб из водной и октанольной фаз и измеряли их радиоактивность в сцинтилляционной жидкости OptiPhase HiSafe 3. С помощью меченных тритием препаратов и метода сцинтиллирующей фазы были найдены величины адсорбции исследуемых веществ на границе раздела фаз двух жидкостей и коэффициенты распределения ГВ в системах толуол-вода и октанол-вода.

Определение факторов бионакопления гуминовых веществ бактериями и высшими растениями. Меченные тритием препараты ГВ использовали для исследования их связывания тетрациклин-устойчивым штаммом грам-отрицательной бактерии *Escherichia coli*. Описаны эксперименты по определению изотерм связывания ГВ бактериями. Количество ГВ определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного счета.

Поглощение ГВ высшими растениями изучали на ростках мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. Количество ГВ, поступивших в растения, рассчитывали на основании данных о начальной удельной радиоактивности растворов и удельной радиоактивности растворов после нахождения в них растений. Распределение ГВ в растении определяли с помощью автордиографии, в качестве фотографического детектора использовали рентгеновскую пленку Retina XBM.

В третьей главе представлены полученные экспериментальные результаты, а также их обсуждение.

Оптимизация условий введения тритиевой метки **Модельные эксперименты**

В настоящей работе метод термической активации трития впервые был использован для получения меченных тритием ГВ, представляющих собой сложные смеси органических соединений природного происхождения, что потребовало проведения модельных экспериментов с целью подбора оптимальных условий введения тритиевой метки. В качестве модельных веществ были использованы следующие индивидуальные вещества:

- гомологический ряд альфа-аминокислот от глицина до норлейцина, а также *p*-аминобензойная кислота, аспарагиновая кислота и лизин;
- поверхностно-активные вещества (ПАВ): бромиды алкилтриметиламмония с алкильными группами $C_{12}H_{25}$, $C_{14}H_{29}$, $C_{16}H_{33}$ (DTAB, TTAB, CTAB) и тритон TX-100;

- аминоксахар: глюкозамин.

Изучение закономерностей введения трития в аминокислоты и сахара с помощью метода термической активации трития чрезвычайно важно, так как они входят в состав макромолекул ГВ. С помощью ПАВ моделировали введение трития в углеводородные фрагменты молекул. На индивидуальных веществах была исследована зависимость выхода меченых соединений от времени реакции, массы мишени и температуры атомизатора. Анализ литературных данных позволил сразу предположить, что наилучшие условия для получения меченых соединений с минимальным количеством побочных продуктов и наиболее равномерным распределением трития по компонентам сложных смесей молекул создаются при бомбардировке холодных (77 К) мишеней потоком атомов, долетающих до мишени без потери энергии за счет столкновений с молекулами трития в газовой фазе. Для используемых в работе реакционных сосудов это условие выполняется при давлении газа не выше 0.5 Па. Соответственно, дальнейшие исследования проводили при давлении трития 0.5 Па.

Было изучено влияние времени реакции на соотношение выходов меченых соединений при обработке атомами трития смеси аминокислот глицина (Gly) и серина (Ser) и аминоксахара глюкозамина (Gam). Найденные значения удельной радиоактивности Ser и Gam нормировали на радиоактивность Gly, что позволяло нивелировать влияние невоспроизводимых факторов эксперимента, в том числе изменения изотопного состава газа и каталитической активности вольфрама. Оказалось, что закономерности взаимодействия атомарного трития с аминокислотами и сахарами различаются. При малых временах реакции скорость образования меченого Gam была в несколько раз выше, чем для аминокислот, что связано с активирующим действием гидроксильных групп. Однако из-за того, что у Gam больше функциональных групп, вероятность его деструкции под действием атомарного трития тоже выше, что приводило к уменьшению отношения радиоактивностей Gam и Gly при больших временах реакции. Следовательно, для получения меченных тритием сахаров с помощью метода термической активации трития необходимо использовать более мягкие условия, чем при введении трития в аминокислоты, и прежде всего, уменьшать время воздействия атомарного трития на мишень. Таким образом, сокращение времени обработки атомами трития сложных смесей молекул должно способствовать уменьшению количества меченых побочных продуктов.

Масса мишени. При малых временах реакции атомов трития с твердыми мишенями в реакцию вступают молекулы, находящиеся только в тонком поверхностном слое. Соответственно, максимально высокая удельная радиоактивность в этом случае будет достигаться при количестве вещества в мишени, достаточном только для образования мономолекулярного слоя на стенках реакционного сосуда. Специфика получения мишеней в методе термической активации трития такова, что для полного покрытия стенок реакционного сосуда веществом необходим приблизительно его

десятикратный избыток от расчетного, необходимого для равномерного мономолекулярного покрытия. Для стандартных реакционных сосудов с площадью мишени около 150 см^2 этому соответствует 0.1-0.2 мг вещества. Систематического исследования влияния массы мишени на удельную радиоактивность образующихся меченых соединений не проводили, так как подобные работы были выполнены для целого ряда низкомолекулярных веществ [1, 2]. Так как ГВ представляют собой смеси макромолекул со средней молекулярной массой от 8 до 40 кДа, то для получения мишени, гарантировано покрывающей стенки реакционного сосуда, необходимо от 0.2 до 0.6 мг. Анализ результатов по получению меченных ГВ подтвердил правильность такого выбора.

Температура атомизатора. При взаимодействии атомов трития с органическими молекулами помимо образования меченого материнского соединения возможно образование побочных продуктов. Для изучения влияния температуры источника атомов на соотношение основной и побочных реакций была проведена реакция атомов трития с аспарагиновой кислотой (Asp) и лизином (Lys) в интервале температур атомизатора 1690-2010 К. В результате замещения карбоксильных групп на тритий из Asp могли образовываться альфа- и бета-аланин (α -Ala и β -Ala), а при замещении аминогруппы на тритий в Lys - норлейцин (Nle).

Оказалось, что зависимость выхода меченых материнских соединений от температуры атомизатора имела экстремальный характер с максимумом при 1800 К для Lys и 1900 К для Asp. Вместе с тем радиоактивность побочных продуктов увеличивалась с ростом температуры атомизатора. Соответственно, отношение радиоактивности побочных продуктов к радиоактивности меченых материнских соединений тоже росло при увеличении температуры вольфрамовой проволоки от 3.5 % до 42.5 % для пар α -Ala/Asp и β -Ala/Asp, от 1 % до 6 % для пары Nle/Lys. Аналогичная зависимость выхода меченого материнского соединения от температуры атомизатора была получена для п-аминобензойной кислоты и для гомологического ряда альфа-аминокислот от Gly до Nle. Вместе с тем наблюдалась безусловная закономерность увеличения молярной радиоактивности аминокислот и их радиохимического выхода с увеличением длины углеводородного хвоста для всех температур атомизатора.

Из проведенных экспериментов следует, что соотношение скоростей реакций образования меченого материнского соединения и побочных продуктов декарбоксилирования и дезаминирования сильно зависит от температуры источника атомов. При возрастании температуры атомизатора доля побочных продуктов росла, причем скорость реакции декарбоксилирования не зависела от положения карбоксильной группы в молекуле. Следствием этого является экстремальная зависимость радиохимического выхода и удельной радиоактивности меченого материнского соединения от температуры источника атомов. При температуре выше 1900 К выход меченого материнского соединения начинал уменьшаться ввиду конкуренции побочных реакций.

Также было изучено влияние температуры вольфрамовой проволоки на выход бромидов алкилтриметиламмония с углеводородными радикалами: $C_{12}H_{25}$, $C_{14}H_{29}$ и $C_{16}H_{33}$, являющимися катионными поверхностно-активными веществами (КПАВ). Радиохимический выход меченого материнского соединения для всех КПАВ оказался примерно одинаковым $80 \pm 10\%$ и мало зависел от температуры вольфрамовой проволоки. Это свидетельствует о том, что эти вещества практически не подвергаются деструкции под действием атомарного трития. Однако в случае бромидов тетраметиламмония и тетрабутиламмония выход материнского соединения был не более 3 %. Столь малые выходы для бромидов тетраалкиламмония с небольшими алкильными группами свидетельствуют о том, что увеличение выхода меченого материнского соединения для КПАВ связано с увеличением размера углеводородного хвоста, и подтверждают предположение о том, что глубина зоны, в которой происходит образование меченых соединений, составляет около 1 нм.

Обнаруженные закономерности образования меченых аминокислот, сахаров и ПАВ были использованы для выбора условий введения трития в гуминовые и гуминоподобные вещества.

Получение меченных тритием гуминовых веществ

Анализ влияния условий проведения эксперимента по введению трития в ГВ на характеристики меченого продукта провели на примере коммерческого препарата ГК угля леонардита (Humintech Ltd, Дюссельдорф, Германия). Условия экспериментов и основные результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1. Условия введения тритиевой метки и характеристика меченого тритием препарата ГК угля.

Серия эксперимента	Условия введения метки				Уд.р/акт. ГБК*г ⁻¹ (100% тритий)	Выход, %
	давление трития, Па	масса мишени, мг	время реакции *, с	температура атомизатора, К		
1-ая серия	0.5	2	20	1950	14	23.4
2-ая серия	0.5	0.26	10	1950	726	94.9
	0.5	0.26	20	1950	197	86.8
	0.5	0.26	40	1950	571	83.1

Примечание: (*) - реакция проводилась импульсами по 10 секунд с полным обновлением состава газовой фазы, (**) - очистка препаратов первой серии проводилась с помощью диализной мембраны MWCO 12 кДа, для остальных препаратов использовали мембраны MWCO 2 кДа.

В первой серии масса мишени составляла 2 мг, введение тритиевой метки осуществляли двумя импульсами по 10 с при температуре вольфрамового атомизатора 1950 К. Во второй серии экспериментов масса

мишени составляла 0.26 мг, а время реакции варьировали в пределах 10–40 с при давлении трития 0.5 Па и температуре атомизатора 1950 К. Удельная радиоактивность препаратов первой серии оказалась в пределах 10–50 ГБк*г⁻¹ в пересчете на 100 %-ный тритий, что существенно меньше, чем получено во второй серии (200–700 ГБк*г⁻¹). Прежде всего, это связано с тем, что масса мишени в первой серии экспериментов была практически на порядок больше. При лиофилизации водных растворов ГВ на стенках реакционного сосуда образовывалась плотная мишень с неразвитой поверхностью. В этом случае реакция с атомарным тритием протекала в тонком слое, включающем в себя только молекулы на поверхности мишени. Легко подтвердить соответствующими расчетами, что в первой серии экспериментов масса препарата, взятого для приготовления мишени, превышала необходимую для полного покрытия стенок реакционного сосуда величину примерно в 10 раз.

Увеличение радиоактивности препаратов с увеличением количества вступающего в реакцию трития и времени реакции может не произойти из-за того, что проницаемость твердых мишеней для атомарного трития ограничена. Как было показано на модельных соединениях, увеличение времени реакции может приводить к увеличению количества меченых побочных продуктов. Из результатов экспериментов второй серии следует, что увеличение времени реакции с 10 до 40 с приводило к снижению выхода меченых ГК угля, а также к снижению его удельной радиоактивности. На первый взгляд, сильное снижение удельной радиоактивности препарата при времени реакции 20 с, а затем ее рост при 40 с реакции выглядит необычным. Однако необходимо учесть то, что исследуемый препарат представлял собой смесь молекул со средней молекулярной массой 13 кДа. Причиной такой зависимости могло быть то обстоятельство, что при 1950 К создавался столь интенсивный поток атомов трития, что за первые 10 с достигалась максимальная радиоактивность молекул поверхностного слоя мишени. При более длительных экспозициях внешний слой молекул уже подвергался существенной модификации, а образование меченых соединений во внутренних слоях мишени происходило медленнее из-за сильного градиента потока атомов вглубь мишени. При очистке меченого препарата модифицированные молекулы удалялись, и так как количество молекул в мишени все равно примерно на порядок превышало количество молекул, способных реагировать с атомарным тритием, то «разбавление» меченых молекул немечеными приводило к слабой зависимости выхода меченого продукта от времени реакции и существенным колебаниям удельной активности препаратов. Аналогичные закономерности наблюдались при введении трития в модельные смеси аминокислот [3]. Таким образом, на примере ГК угля было показано, что для получения наибольшего выхода меченого продукта необходимо бомбардировать мишень атомами трития только 10 с.

В следующей серии экспериментов провели исследование влияния температуры атомизатора на образование меченых тритием ГК угля.

Соответственно, время реакции выбрали равным 10 с, а давление газа составляло 0.5 Па. На рисунке 1 показана зависимость удельной радиоактивности препаратов от температуры атомизатора. Зависимость имела такой же вид, как и у аминокислот, только максимум радиоактивности достигался при температуре атомизатора 1950 К. Так как в состав периферической части молекул ГВ входят в основном аминокислоты и сахара, а закономерности введения трития в сахара можно ожидать такими же, или даже с более ярко выраженной тенденцией к разрушению, то сходство найденных зависимостей вполне обоснованно. Необходимо отметить, что при температуре атомизатора 2000 К интенсивность потока атомов трития была настолько велика, что приводило к увеличению образования модифицированных меченых молекул, следствием чего явилось снижение выхода основного продукта.

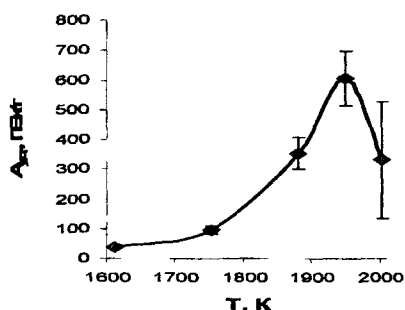


Рисунок 1. Зависимость удельной радиоактивности препаратов ГК угля от температуры атомизатора.

Некоторое различие в зависимостях выхода и удельной радиоактивности меченых продуктов от температуры атомизатора для индивидуальных аминокислот и ГВ может быть связано с тем, что в состав ГВ помимо аминокислотно-углеводной периферии входит и гидрофобное ядро с высоким содержанием ароматических и алифатических углеводородных фрагментов. Для углеводов наблюдается монотонное увеличение рассматриваемых характеристик с ростом температуры атомизатора вплоть до 2000 К. Нельзя исключить и незначительную модификацию меченых молекул ГВ за счет реакций декарбоксилирования, дезаминирования и дегидроксилирования, скорость которых возрастает гораздо быстрее при увеличении температуры, чем реакция замещения водорода на тритий по связи С-Н, как это наблюдалось в экспериментах с аминокислотами, сахарами. Так как ГВ представляют собой высокомолекулярные соединения стохастического строения, то модификация некоторых молекул за счет указанных выше процессов не должна сильно изменить свойства исследуемых препаратов.

Очистка меченных тритием гуминовых веществ от лабильного трития

Атомарный тритий, получаемый при термической диссоциации на вольфрамовой проволоке, способен замещать любые стерически доступные атомы водорода в молекулах мишени. При этом тритий, который заместил водород в составе углеводородного скелета, представляет собой необменный или скелетный тритий. В то же время тритий, который заместил водород функциональных групп, и находится в составе карбоксильных, гидроксильных и аминогрупп, представляет собой подвижный или обменный тритий, который легко обменивается в воде. Поэтому для получения меченного тритием соединения исключительно важным этапом является очистка меченого препарата от лабильной (способной обмениваться с водой) метки. Тщательность такой очистки определяет достоверность результатов, полученных при использовании радиоактивной метки. Поэтому особое внимание в нашей работе было уделено выбору оптимального способа очистки меченого препарата от лабильной метки.

Так как ГВ представляют собой набор молекул, масса которых составляет от тысячи до десятков тысяч Дальтон, то вполне вероятно, что у таких макромолекул есть функциональные группы, содержащие водород, обмен которого с растворителем затруднен. Следовательно, для удаления трития из таких положений требуются или жесткие условия обмена, или длительное время для достижения равновесия. Первый путь может быть реализован нагреванием и изменением pH раствора, однако для ГВ он неприемлем из-за опасности необратимых изменений препаратов. В данной работе мы показали, что для удаления основной части лабильного трития необходимо выдерживать раствор меченого ГВ в фосфатном буфере при pH 6.8 в течение 30 суток при 4⁰С. Для контроля за полнотой обмена выдерживали 1-2 мл препарата в пробирке, отделенной диализной мембраной с соответствующим размером пор, от 1 л фосфатного буфера, который периодически заменялся. В случае, если размер пор превышал допустимый для рассматриваемого препарата, то происходили значительные потери вещества, и изменялся молекулярно-массовый состав препарата (молекулы меньших масс проходили через мембрану). Для большинства препаратов использование мембраны с MWCO 2 кДа было оптимальным, при этом потери вещества сводились к минимуму и сохранялось молекулярно-массовое распределение молекул.

Подтверждение равномерности введения метки в гуминовые вещества

Для оценки идентичности исходного и меченого препарата, очищенного от лабильной метки, проводили их гель-хроматографирование с регистрацией по УФ-поглощению при 254 нм. Об идентичности препаратов судили по совпадению УФ профилей исходного и меченого препаратов. В большинстве случаев наблюдалось полное совпадение профилей по УФ-поглощению исходных и меченых ГВ (рис. 2), что означало сохранение молекулярно-массового распределения в препарате.

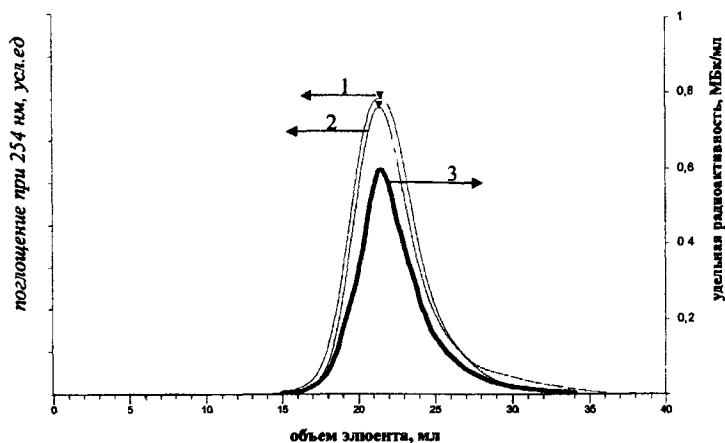


Рисунок 2. Профили выхода по УФ-поглощению (1, 2) и радиоактивности (3) при эксклюзионной хроматографии препаратов ГК угля: 1 – исходный препарат; 2, 3 – меченый препарат, очищенный с помощью диализа.

Иногда происходило небольшое смещение пика выхода с колонки меченого препарата в область более высоких молекулярных масс. Причиной такого смещения заключалась в частичной потере низкомолекулярных фракций препарата при диализе.

Одновременно с гель-хроматографическим анализом проводили его фракционирование, и радиоактивность собранных фракций измеряли с помощью жидкостного сцинтилляционного счета. В большинстве случаев полученный профиль по радиоактивности совпадал с профилем по УФ-поглощению (рис. 2), что свидетельствовало о равномерном распределении метки по компонентам ГВ. В случае, когда введение тритиевой метки проводили в неоптимальных условиях, профиль по радиоактивности не всегда совпадал с профилем по УФ-поглощению, что свидетельствовало о наличии в меченом препарате модифицированных молекул, которые не удалялись при диализной очистке.

Характеристика меченных тритием гуминовых веществ

При выполнении работы было получено 28 меченных тритием препаратов ГВ из различных источников происхождения (10 групп). В таблице 2 приведены данные по удельной радиоактивности и выходу некоторых меченых препаратов ГВ. При малых временах реакции (10 с), давлении трития 0.5 Па, температуре атомизатора от 1900 до 2000 К, массе мишени 0.25-0.35 мг и при использовании диализных мембран MWCO 2 кДа достигались удельные радиоактивности 0.2-0.7 ТБк*г⁻¹. Было показано, что при использовании мембран с большим размером пор для диализной очистки происходило обеднение препаратов низкомолекулярными фракциями, однако удельная радиоактивность при этом не менялась. Это является

дополнительным доказательством равномерности распределения трития по компонентам ГВ.

Таблица 2. Характеристики меченных тритием препаратов ГВ

Препарат	Источник	Средняя мол. масса, кДа	Удельная р/акт-ть, ТБк*г ⁻¹	Выход, %
ГК угля	коммерческий препарат (леонардит)	20.0	0.72	96
ГМК угля	получен из коммерческого препарата (леонардита)	18.0	0.28	21*
ГК торфа	сфагновый верховой торф (Тверская обл.)	32.2	0.28	81
ФК торфа	Сфагновый верховой торф (Тверская обл.)	15.4	0.18	53*
ГК почвы	чернозем (Липецкая обл.)	15.1	0.17	89
ФК почвы	чернозем (Липецкая обл.)	11.3	0.63	85
ФК почвы	дерново-подзол почвы (Московская обл.)	11.1	0.35	82

Примечание: (*) – произошли неконтролируемые потери препарата в процессе очистки.

Адаптация метода сцинтиллирующей фазы к исследованию свойств гуминовых веществ

В методе СФ следят за поведением меченного тритием вещества по его излучению, которое регистрируется в органической фазе (сцинтиллирующая жидкость на основе толуола) с помощью жидкостного сцинтилляционного спектрометра. Учитывая малый пробег бета-частиц трития, также происходит регистрация излучения из тонкого (около 1 мкм) слоя водной фазы, что позволяет непосредственно определять количество ПАВ на границе раздела двух жидкостей. Важным достоинством такого подхода является возможность непрерывного измерения скорости счета меченного тритием вещества без нарушения целостности системы. В данной работе был предложен ряд усовершенствований метода СФ, позволяющих использовать его как для исследования кинетики адсорбции, так и равновесной адсорбции веществ самой разной природы на границе раздела органическая «сцинтиллирующая фаза» - водный раствор, а также для определения коэффициента распределения веществ в этой системе.

Так как регистрация излучения трития в рассматриваемой системе возможна из органической фазы и из тонкого слоя водного раствора на границе раздела фаз, то скорость счета складывалась из двух составляющих: «объемной» составляющей (I_v), обусловленной регистрацией меченого соединения, растворенного в толуоле,

$$I_V = \epsilon_V \cdot a \cdot c_{орг} \cdot V \quad (1)$$

и «поверхностной» составляющей (I_S), относящейся к регистрации бета-излучения трития из тонкого (около 1 мкм) поверхностного слоя водной фазы на границе раздела с органической фазой

$$I_S = \epsilon_V \cdot a \cdot (0.5 \Gamma + 0.27 c_w \cdot h) \cdot S, \quad (2)$$

где $c_{орг}$ и c_w – концентрации меченого соединения в органической и водной фазах, Γ – величина удельной адсорбции поверхностно-активного вещества на границе раздела фаз, ϵ_V – эффективность регистрации излучения в органической фазе, V – объем органической фазы, S – площадь границы раздела, h – толщина зоны водной фазы, из которой возможна регистрация излучения трития, a – удельная радиоактивность меченого соединения.

Эффективность регистрации трития в объеме органической фазы определяли с помощью методов внешнего и внутреннего стандартов. Эффективность регистрации с поверхности раздела фаз принимали равной $0.5\epsilon_V$ для адсорбционных слоев ПАВ и $0.27\epsilon_V$ для регистрации излучения из приповерхностного слоя водной фазы, ограниченного пробегом бета-частиц трития в воде, что и отражено в формуле (2).

Для разделения вклада «объемной» и «поверхностной» составляющих в скорость счета препарата использовали два способа. По первому способу готовили серию образцов с разным количеством органической фазы. Определяли зависимость равновесной скорости счета препарата от объема толуола, аппроксимировали экспериментальные значения прямой, по углу наклона определяли «объемную» составляющую скорости счета и концентрацию меченых молекул в толуоле, а «поверхностную» составляющую находили экстраполяцией скорости счета к нулевому объему толуола.

По второму способу определения I_V и I_S к водному раствору меченого вещества добавляли V мл органической фазы, после достижения равновесия в системе измеряли скорость счета флакона (I), отбирали в другой флакон V_1 мл органической фазы и повторно измеряли скорость счета отобранного раствора (I_1) и остатка (I_2). «Объемную» составляющую скорости счета определяли из соотношения $I_V = (V/V_1) \cdot I_1$, «поверхностную» составляющую рассчитывали по двум выражениям: $I_S = I - (V/V_1) \cdot I_1$ и $I_S = I_2 - (V/V_1 - 1) \cdot I_1$. Расхождение между значениями «поверхностной» составляющей скорости счета, рассчитанной разными способами, не превышало 5 %. Обычно использовали 3 мл органической фазы, после уравнивания системы отбирали 2 мл раствора.

Начальную концентрацию меченого соединения в водной фазе определяли, отбирая аликвоту раствора и измеряя ее радиоактивность. Равновесную концентрацию меченого соединения в водной фазе (c_w) рассчитывали, учитывая переход вещества в органическую фазу и его концентрирование на межфазной границе, а также контролировали в отдельных экспериментах, отбирая аликвоты на счет. Коэффициент

распределения вещества между водной и органической фазой определяли по соотношению $D = c_{org} / c_w$.

В отличие от первоначального варианта метода [4] вместо стандартного стеклянного флакона объемом 20 мл использовали полипропиленовый флакон объемом 7 мл, что принципиально изменило геометрию границы раздела фаз. Так как в случае используемого в классическом варианте метода СФ стеклянного флакона водная фаза смачивала его поверхность и образовывался вогнутый мениск границы раздела фаз, то существенный вклад в скорость счета с границы раздела фаз вносила поверхность, непосредственно прилегающая к стенкам флакона, что затрудняло интерпретацию результатов. В случае полипропиленового флакона водная фаза не смачивала его стенки, и образовывался выпуклый мениск, а при объеме водной фазы меньше 0.7 мл водная фаза представляла собой каплю на дне флакона. В этом случае практически можно пренебречь трехфазным контактом стенка флакона - водная фаза - органическая фаза.

Таким образом, представилось возможным использовать два варианта проведения эксперимента в пластиковом флаконе малого размера: в виде двухслойной и капельной систем. Двухслойная система реализовывалась при объеме водной фазы более 0.7 мл, при этом объем органической фазы мог составлять от 2 до 5 мл. Капельная система реализовывалась при объемах водной фазы менее 0.6 мл. При изучении зависимости скорости счета флакона от объема водной фазы было установлено, что для капельной системы скорость счета флакона росла с увеличением объема водной фазы, а при образовании двухслойной системы скорость счета не зависела от объема водной фазы. Время установления равновесия в исследуемых системах зависело от молекулярной массы (диффузионной подвижности) молекул и лежало в пределах от 5 часов (третичевая вода) до 6 суток (ГВ).

На примере препарата ГК угля провели сопоставление двухслойной и капельной систем при исследовании адсорбции на границе толуол-вода. Разделение объемной и поверхностной составляющих скорости счета проводили с помощью отбора части толуола в другой флакон после уравнивания системы. На рис. 3 представлены зависимости количества адсорбированного вещества на границе раздела от концентрации ГК в водном растворе для объемов водной фазы 0.2 и 1.0 см³. Оказалось, что зависимости имеют сходный вид с выходом на плато при концентрации ГК более 40 мг*см⁻³. Отношение количества вещества на границе раздела толуол-вода в двухфазной системе к капельной системе составило 1.98 ± 0.04 . Такое же соотношение было получено и в экспериментах с СТАВ. Учитывая, что в случае капельной системы водная фаза имела форму, близкую к форме шара, а контактом водной фазы со стенками полиэтиленового флакона можно пренебречь, то можно принять площадь границы раздела для капли объемом 0.2 см³ равной 1.65 см². Тогда для двухфазной системы, которая реализуется при объеме водной фазы ≥ 0.7 см³, площадь границы раздела будет, исходя из указанного выше соотношения количеств вещества, равна 3.3 см². Предельная величина адсорбции ГК угля на границе раздела толуол-

вода, рассчитанная из данных капельной и двухслойной систем, оказалась равной $71 \pm 7 \text{ нг} \cdot \text{см}^{-2}$.

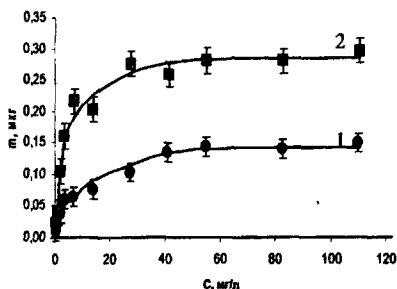


Рисунок 3. Зависимость количества ГК угля, адсорбировавшегося на границе раздела толуол-вода, от концентрации ГК угля в водном растворе:
 1 — капельная система, объем водной фазы 0.2 мл;
 2 — двухслойная система, объем водной фазы 1.0 мл.

С помощью тритиевой воды были подтверждены найденные параметры системы. Так, растворимость воды в толуоле оказалась равной $0.39 \pm 0.03 \text{ г/л}$ при 22°C , что хорошо согласуется с литературными данными. Толщина зоны регистрации бета-частиц трития из водной фазы (h), оцененная из выражения (2) при условии равномерного распределения меченого вещества в водной фазе ($\Gamma = 0$), составила $1.6 \pm 0.4 \text{ мкм}$.

Разработанный вариант метода СФ был использован для исследования распределения между фазами альфа-аминокислот с неразветвленной углеводородной цепью: аланина, норвалина и норлейцина. На рис. 4 представлена зависимость скорости счета от концентрации аминокислот аланина и норвалина в водной фазе. Видно, что для аланина скорость счета росла практически линейно во всем диапазоне концентраций. Для норвалина получена аналогичная зависимость при pH 1.6, однако при pH 6.0 и 7.8 при концентрации выше $3 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ наблюдались более высокие значения скорости счета. Отбором части толуольной фазы в другой флакон определили объемную и поверхностную составляющую скорости счета. Оказалось, что для аланина рост скорости счета с увеличением концентрации раствора удовлетворительно описывается выражением (2), в котором величина Γ в пределах ошибки эксперимента равна нулю, а толщина зоны регистрации трития из водной фазы составляет $1.6 \pm 0.8 \text{ мкм}$. Аналогичная зависимость скорости счета от концентрации раствора получена и для норвалина при pH 2. Однако в нейтральном и слабощелочном растворе норвалина при концентрации больше $3 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ возрастала поверхностная составляющая скорости счета, что свидетельствовало о концентрировании норвалина на границе раздела фаз.

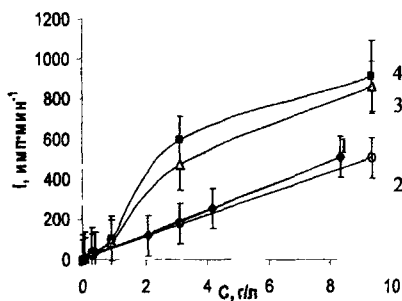


Рисунок 4. Зависимость равновесной скорости счета двухфазной системы толуол-вода от концентрации аминокислоты в водном растворе: 1 – аланин при pH 6.0; 2 – норвалин при pH 1.6; 3 – норвалин при pH 6.0; 4 – норвалин при pH 7.8.

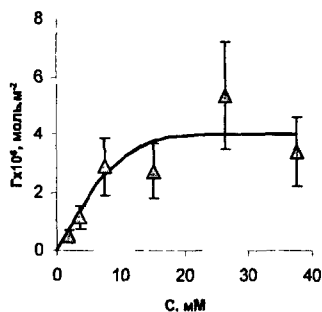


Рисунок 5. Изотерма адсорбции норлейцина на границе раздела толуол-вода при pH 6.0.

Количество адсорбированного вещества в данном эксперименте можно было определить с большой погрешностью из-за того, что эта величина была невысокой и, соответственно, скорость счета флаконов при определении поверхностной и объемной составляющих также была маленькой. Повысить точность определения можно, используя вещества с более высокой удельной радиоактивностью, однако в этом случае в сцинтилляционные флаконы пришлось бы вносить препараты с большой радиоактивностью. Такой же эксперимент с норлейцином позволил построить изотерму адсорбции норлейцина на границе раздела толуол-вода (рис.5). Предельная величина адсорбции достигалась при концентрации норлейцина в водном растворе более $1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ и составила $3.6 \pm 1.6 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2}$, что соответствует площади поверхности, приходящейся на одну молекулу, равной $0.46 \pm 0.20 \text{ нм}^2$.

В случае поверхностно-активных веществ, адсорбция которых на границе раздела толуол-вода оказывается значительной при концентрации в водном растворе до $100 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, метод сцинтиллирующей фазы позволяет надежно определить избыточное количество вещества на границе раздела фаз. Например, для СТАВ были найдены величины избыточного количества молекул на границе раздела толуол-вода, которые вполне согласуются с данными, полученными другими методами. Так при концентрации 0.03 мМ количество молекул СТАВ на границе раздела было найдено равным $(4.1 \pm 0.7) \cdot 10^{-7}$, что достаточно для образования адсорбционного слоя с расположением углеводородных «хвостов» параллельно границе раздела. При концентрации 0.43 мМ эта величина достигала $(3.0 \pm 0.4) \cdot 10^{-6} \text{ моль} \cdot \text{м}^{-2}$, что соответствует насыщенному монослою ПАВ с ориентацией молекул перпендикулярно границе раздела.

Определение гидрофобности и поверхностной активности гуминовых веществ с помощью метода сцинтиллирующей фазы

С помощью меченных тритием ГВ и нового варианта метода СФ были определены коэффициенты распределения ГВ между водой и толуолом, а также найдена величина адсорбции на границе раздела фаз двух жидкостей. Зависимость равновесной концентрации ГВ в органической фазе от их концентрации в водной фазе имела линейный характер, что позволило рассчитать коэффициенты распределения исследуемых веществ между водой и толуолом (K_{tw}). Так как для характеристики гидрофобности вещества принято использовать коэффициент распределения между октанолом и водой (K_{ow}), то с помощью меченных тритием ГВ были определены соответствующие коэффициенты. Концентрацию ГВ в воде и октанол-е определяли по радиоактивности отбором проб на счет.

Найдена хорошая линейная корреляция между K_{tw} и K_{ow} (рис. 6). Это означает, что с помощью метода СФ и меченных тритием препаратов можно получать количественные характеристики гидрофобности ГВ. С помощью коэффициентов распределения между толуолом и водой была построена шкала гидрофобности ГВ. Оказалось, что гидрофобность ГВ увеличивается в следующем порядке:

ФК почв < ГК почв < ГК торфа $\approx$ ФК торфа < ГК угля

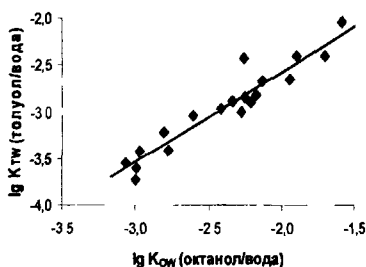


Рисунок 6. Корреляция между коэффициентами распределения ГВ в системах толуол-вода (K_{tw}) и октанол-вода (K_{ow}).

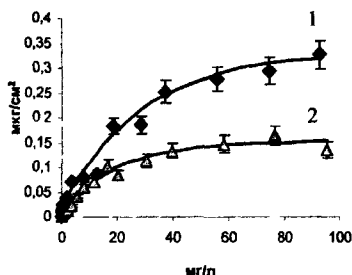


Рисунок 7. Изотермы адсорбции ГК (1) и ФК (2) торфа на границе раздела фаз толуол-вода.

Удельная радиоактивность меченых ГВ оказалась достаточной для достоверного определения количества ГВ на границе раздела фаз в диапазоне концентрации в водной фазе $0,1-100 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$. При более высоких концентрациях работа затруднялась необходимостью учета цветового гашения в водном растворе, что затрудняло определение количества вещества на границе раздела. Однако при таких высоких концентрациях обычно уже происходило образование насыщенного адсорбционного слоя. Определение количества ГВ на границе толуол-вода в широком интервале

построить изотермы адсорбции, которые в большинстве случаев оказались Лэнгмюровского типа (рис. 7).

При увеличении концентрации препарата в водной фазе в диапазоне от 0.1 до 5 мг*л⁻¹ наблюдалось быстрое увеличение количества адсорбированных меченых молекул ГВ на границе раздела толуол-вода. При концентрации от 20 до 60 мг*л⁻¹ происходило насыщение адсорбционного слоя, и при дальнейшем увеличении концентрации вещества в водной фазе количество молекул ГВ на границе раздела практически не менялось. Величина предельной адсорбции лежала в пределах от 0.08 мг*м⁻² (ФК почвы) до 2.8 мг*м⁻² (ГК торфа). На основании проделанных экспериментов был получен ряд изменения адсорбции исследованных препаратов на границе толуол-вода, который выглядит следующим образом:

ФК почв < ГК почв < ГК угля < ФК торфа < ГК торфа

Было показано, что гидрофобность препаратов мало менялась при их дальнейшем фракционировании с помощью диализных мембран с порами разного размера или выделения высоко- и низкомолекулярных фракций при эксклюзионной хроматографии меченых препаратов. В то же время было найдено, что количество вещества, способного адсорбироваться на границе раздела толуол-вода сильно возрастало для препаратов, обедненных низкомолекулярными компонентами.

Использование разработанных методов для исследования физико-химических свойств биологически активного препарата лигфол

Разработанные в работе методы и подходы были использованы для получения меченного тритием биологически активного препарата лигфол, который является продуктом переработки целлюлозы и представляет собой гуминоподобное вещество. Введение трития осуществляли в условиях, который оказались оптимальными при работе с ГВ. Процедуры очистки и анализа также были проведены по аналогичной схеме.

Как оказалось, исследованный препарат лигфол, в отличие от ГВ, имел в своем составе достаточно много низкомолекулярных фракций, что привело к значительным его потерям при диализной очистке и к изменению молекулярно-массового распределения, что было подтверждено с помощью эксклюзионной хроматографии. Вместе с тем лигфол не меняет своих свойств в результате ряда последовательных процедур растворения-лиофилизации, что и было использовано для удаления лабильной метки. Суммарное время выдерживания раствора лигфола, как и в случае диализной очистки, составило 30 суток, что обеспечило полное удаление трития из лабильных положений. При эксклюзионной хроматографии препаратов было обнаружено, что максимум кривой элюирования диализованного препарата сдвинут в сторону больших молекулярных масс. Тем не менее, для обоих меченых препаратов наблюдалось хорошее совпадение профилей их выхода по УФ-поглощению и по радиоактивности, что свидетельствовало о равномерном распределении трития по компонентам препаратов.

В таблице 3 приведены основные характеристики меченых препаратов лигфола. Препараты с такой удельной радиоактивностью вполне пригодны для проведения химических и биохимических исследований с регистрацией их количества по радиоактивности.

Таблица 3. Характеристика меченых препаратов лигфола.

Препарат	Способ очистки от лабильной метки	Исходная радиоактивность, МБк	Радиоактивность после очистки, МБк	Удельная радиоактивность очищенного препарата, ГБк/г		Выход (остаток после очистки), %
				реальная (25%-ный тритий)	пересчет на 100%-ный тритий	
1	диализ	165	49.7	115	460	67%
2	лиофилизация	149	58.3	93	370	98%

Исследование гидрофобных и поверхностно-активных свойств меченных тритием препаратов лигфола проводили с использованием метода СФ. Оказалось, что коэффициент распределения лигфола между водной фазой и толуолом зависел от способа удаления лабильной метки и составил 0.0031 ± 0.001 для диализованного препарата и 0.0020 ± 0.001 для лиофилизованного препарата. Для системы октанол-вода коэффициент распределения лигфола тоже зависел от способа очистки меченых препаратов: $K_{ow} = 0.0065 \pm 0.003$ для диализованного препарата и $K_{ow} = 0.0052 \pm 0.003$ для лиофилизованного. Зависимость коэффициента распределения между органической и водной фазой от способа очистки препарата свидетельствует о том, что гидрофобные свойства препарата неодинаковы для его различных фракций, и высокомолекулярные фракции лигфола более гидрофобны. Так, при диализной очистке из препарата удалялись низкомолекулярные фракции, и происходило увеличение коэффициента распределения между органической и водной фазами. Аналогичная зависимость коэффициента распределения от фракционного состава препаратов наблюдалась для ГК угля, очищенных через диализные мембраны с различными размерами пор.

Изотермы адсорбции на границе раздела толуол-водный раствор у препаратов лигфола, подвергнутых диализу и лиофилизации, также различались. Для диализованного препарата наблюдались более высокие значения избыточного количества вещества на границе раздела во всем диапазоне концентраций. В области концентраций в водной фазе $40-80 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, когда для большинства препаратов ГВ наблюдается образование насыщенного адсорбционного слоя на границе раздела толуол-вода, величины избыточного количества вещества составили $54 \pm 8 \text{ нг} \cdot \text{см}^{-2}$ для диализованного препарата и $33 \pm 12 \text{ нг} \cdot \text{см}^{-2}$ для лиофилизованного препарата. Для диализованного препарата наблюдалась тенденция роста количества вещества на границе раздела при увеличении концентрации в водной фазе от

40 до 80 мг*л⁻¹, тогда как для диализованного препарата достигалась предельная величина адсорбционного слоя.

Найденные величины предельной адсорбции свидетельствуют о том, что для лигфола характерна довольно низкая адсорбционная способность на гидрофобных поверхностях. Величина адсорбции при концентрации 40-80 мг*л⁻¹ у лигфола выше, чем у ГК почв, однако значительно ниже, чем у ГК торфа, для которых характерная величина адсорбции составляет в указанных условиях 150-330 нг*см⁻².

Исследование связывания гуминовых веществ бактериями и высшими растениями

Несмотря на разнообразие данных, свидетельствующих о физиологической активности ГВ по отношению к различным биологическим объектам, механизм их действия до сих пор не установлен. В частности, нерешенным остается вопрос о возможности поступления ГВ в клетки живых организмов. Полученные меченные тритием препараты ГВ позволили впервые получить доказательства их поступления в бактерии и растения и дать количественную характеристику этому процессу.

Взаимодействие гуминовых веществ с бактериями *Escherichia coli*. Полученные результаты показали, что факторы бионакопления ГВ варьируются в пределах 0.9-1.8 л*кг⁻¹ для ФК и 2.3-13 л*кг⁻¹ для ГК. При этом было показано, определенное количество сорбированных ГВ поступает внутрь клетки, т.е. способно проникать через мембрану. Количество поглощенных клетками бактерий ГВ изменялось от 0.9 до 5.5 нг/млн. клеток.

Взаимодействие гуминовых веществ с растениями *Triticum aestivum* L. Установлено, что факторы бионакопления ГВ растениями мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. лежат в пределах 3.2-38.7 л*кг⁻¹, при этом минимальные значения этого показателя наблюдали для ГМК угля, а максимальные – для ГК торфа.

Распределение ГК угля в тканях высших растений с помощью автордиографии показало, что максимальная концентрация ГВ наблюдается в корневой части растений, тогда как в надземную часть поступает лишь их незначительная часть. При этом распределение ГК в органах растений также оказалось неоднородным: в участках апикальных меристем корней и побегов было отмечено локальное возращание концентраций ГВ в 1.8-2.1 раза.

ВЫВОДЫ

1. Разработан способ получения меченных тритием гуминовых веществ с равномерным распределением метки по компонентам препарата. Для выбора оптимальных условий введения тритиевой метки в гуминовые вещества были проведены модельные эксперименты с индивидуальными веществами. Было установлено, что наилучшие условия для получения меченых гуминовых веществ с минимальным количеством побочных продуктов и равномерным распределением трития по компонентам

препаратов создаются при давлении газа не выше 0.5 Па, времени реакции 10 секунд и температуре атомизатора от 1900 до 2000 К. Равномерность распределения трития по компонентам меченых препаратов гуминовых веществ подтверждена с помощью эксклюзионной хроматографии.

2. Для очистки меченых препаратов гуминовых веществ от лабильной метки предложено использовать диализ через мембраны с размером пор MWCO 2-12 кДа в фосфатном буфере при pH 6.8 в течение 30 суток при 4⁰ С. Показано, что при использовании мембран с большим диаметром пор возможно обеднение препаратов низкомолекулярными фракциями, однако удельная радиоактивность препаратов оставалась при этом постоянной, что подтверждало равномерность распределения трития по компонентам препарата.

3. Разработан новый вариант метода сцинтиллирующей фазы с целью его использования для определения гидрофобности и поверхностной активности гуминовых и гуминоподобных веществ. Достоверность получаемых результатов была подтверждена при исследовании меченных тритием аминокислот и поверхностно-активных веществ.

4. С помощью метода сцинтиллирующей фазы определены коэффициенты распределения гуминовых веществ различного происхождения в системе толуол-вода, а также получены изотермы адсорбции гуминовых веществ на границе раздела толуол-вода. Найдена хорошая корреляция между коэффициентами распределения гуминовых веществ в системах толуол-вода и октанол-вода, что позволило построить шкалу гидрофобности, согласно которой гидрофобность гуминовых веществ увеличивается в следующем порядке: ФК почв < ГК почв < ГК торфа ≈ ФК торфа < ГК угля. Получен ряд адсорбционной способности гуминовых веществ на границе толуол-вода, который выглядит следующим образом: ФК почв < ГК почв < ГК угля < ФК торфа < ГК торфа.

5. Разработанные методики были использованы для получения меченного тритием биологически активного препарата лигфол (гуминоподобное вещество). Равномерность распределения трития по компонентам лигфола подтверждена с помощью эксклюзионной хроматографии. С помощью меченного тритием лигфола и метода сцинтиллирующей фазы были определены коэффициенты распределения лигфола между водой и толуолом, а также найдена величина адсорбции на границе раздела толуол-вода.

6. С помощью жидкостного сцинтилляционного счета и автордиографии на примере бактерий *Escherichia coli* и растений мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L была показана возможность использования меченных тритием препаратов ГВ в биологических исследованиях, направленных на изучение поглощения и распределения сложных смесей органических веществ природного происхождения в живых организмах.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ИЗЛОЖЕНО В СЛЕДУЮЩИХ ПУБЛИКАЦИЯХ:

Заявка на патент

1. Бадун Г.А., Позднякова В.Ю., Чернышева М.Г., Куликова Н.А., Перминова И.В., Шмит-Копплин Ф. Способ получения меченных тритием гуминовых и гуминоподобных веществ. Заявка на патент 2005139586. Дата поступления 19.12.2005.

Статьи в журналах

1. Badun G.A., Pozdnyakova V.Yu., Kudryavtsev A.V., Perminova I.V. Preparation of tritium-labeled humic substances using thermal activation method. // Ecology and Future. Bulgar. J. of Ecological Science, 2003, V.2, N 3-4, P.26-27.
2. Бадун Г.А., Ксенофонтов А.Л., Лукашина Е.В., Позднякова В.Ю., Федосеев В.М. Сравнительное исследование взаимодействия атомарного трития с глюкозамином и аминокислотами. // Радиохимия, 2005, Т.47, № 3, С. 281-283.
3. Бадун Г.А., Чернышева М.Г., Позднякова В.Ю., Федосеев В.М. Новый вариант метода сцинтиллирующей фазы. // Радиохимия, 2005, Т.47, № 6, С. 536-540.
4. Чернышева М.Г., Бадун Г.А., Тясто З.А., Позднякова В.Ю., Федосеев В.М., Ксенофонтов А.Л. Неравновесные процессы при взаимодействии горячих атомов трития с охлажденными твердыми мишенями. Влияние температуры атомизатора на образование меченых веществ. // Радиохимия, 2007, Т.49, № 1 (в печати).

Статьи в научных сборниках

1. Badun G.A., Pozdnyakova V.Yu., Chernysheva M.G., Shchepina N.E., Fedoseev V.M. Determination of hydrophobicity and surface activity of substances in system toluene - water with help of tritium labeled compounds. // Proc. of 8th Int. Sc. Conf. "Physical and Chemical Processes on Selection of Atoms and Molecules" October 6-10, 2003. Zvenigorod, Russia, P.193-198.
2. Badun G.A., Pozdnyakova V.Yu., Chernysheva M.G., Tyasto Z.A., Perminova I.V. Use of tritium labeled preparations for direct measurements of humic substance hydrophobicity and their interfacial adsorption in toluene-water system. // Proceed. XII Intern. Meeting of IHSS "Humic Substances and Soil and Water Environment" July 25-30, 2004, Colina Verde Hotel, Sao Pedro, Sao Paulo, Brazil, P.251-253.
3. Kulikova N.A., Badun G.A., Perminova I.V., Pozdnyakova V.Yu., Belyaeva E.Yu., Kudryavtsev A.V. Tritium-labeled humic preparations as a perspective tool for membranotropic studies. // Proceed. XII Intern. Meeting of IHSS "Humic Substances and Soil and Water Environment" July 25-30, 2004, Colina Verde Hotel, Sao Pedro, Sao Paulo, Brazil, P.383-385.
4. Badun G.A., Chernysheva M.G., Pozdnyakova V.Yu., Tyasto Z.A., Fedoseev V.M., Shchepina N.E. Nonequilibrium processes during tritium atoms interaction formed by thermal dissociation on tungsten wire with targets of complex chemical composite. // Proc. of 9th Int. Sc. Conf. "Physical and Chemical Processes on

Selection of Atoms and Molecules" October 4-8, 2004, Zvenigorod, Russia, P.149-153.

5. Позднякова В.Ю., Чернышева М.Г., Бадун Г.А., Перминова И.В., Федосеев В.М. Получение меченных тритием гуминовых препаратов и изучение их гидрофобных и поверхностно-активных свойств. // Сборник докладов 10-ой Всеросс. (междунар.) научной конф. «Физико-хим. процессы при селекции атомов и молекул» Звенигород, 3-7 октября 2005 г. ЦНИИАТОМИНФОРМ, 2005, С.284-287.

6. Badun G.A., Chernysheva M.G., Mikhulina E.V., Pozdnyakova V.Yu., Tyasto Z.A., Fedoseev V.M. Investigations of nonequilibrium processes in the interaction of hot tritium atoms generated on tungsten filaments with cooled solid targets: probability of reaction during first collision and characteristic size of reaction zone. // Proceed. 7th Russian-Finnish Symposium on Radiochemistry "Modern Problems of Radiochemistry – 2005" Saint-Petersburg, Russia. November 16 - 18, 2005, P.59-60.

7. Pozdnyakova V.Yu., Badun G.A., Chernysheva M.G., Tyasto Z.A., Fedoseev V.M., Perminova I.V. Tritium Probe for Investigation of Humic Materials. // Proceed. XIII Intern. Meeting of IHSS "Humic Substances – Linking Structure to Functions" July 30-August 4, 2006, Karlsruhe, Germany (in press).

8. Kulikova N.A., Badun G.A., Korobkov V.I., Pozdnyakova V.Yu., Perminova I.V. Uptake of humic acids by wheat plants: direct evidence using tritium tritium autoradiography. // Proceed. XIII Intern. Meeting of IHSS "Humic Substances – Linking Structure to Functions" July 30-August 4, 2006, Karlsruhe, Germany (in press).

Тезисы докладов на научных конференциях

1. Бадун Г.А., Позднякова В.Ю., Чернышева М.Г. Модификация метода «сцинтиллирующей фазы» для исследования поведения вещества в системе водный раствор - граница раздела - органическая фаза. // Тезисы докл. 4-ой Росс. конф. по радиохимии. 20-25 окт. 2003 г. Озерск, Россия, С.293.

2. Позднякова В.Ю., Бадун Г.А., Кудрявцев А.В., Перминова И.В., Федосеев В.М. Получение меченных тритием гуминовых веществ и исследование их физико-химических свойств. // Тезисы докл. 4-ой Росс. конф. по радиохимии. 20-25 окт. 2003 г. Озерск, Россия, С.293-294.

3. Бадун Г.А., Позднякова В.Ю., Чернышева М.Г., Щепина Н.Е., Федосеев В.М. Определение гидрофобности и поверхностной активности веществ в системе толуол-вода с помощью меченных тритием соединений. // Тезисы докл. 6-ой Всеросс. (междунар.) научной конф. "Физико-хим. процессы при селекции атомов и молекул" Звенигород, 6-10 октября 2003 г.

4. Бадун Г.А., Чернышева М.Г., Позднякова В.Ю., Тясто З.А., Федосеев В.М., Щепина Н.Е. Неравновесные процессы при взаимодействии атомов трития, полученных при термической диссоциации на вольфрамовой проволоке, с мишенями сложного химического состава. // Тезисы докл. 9-ой Всеросс. (междунар.) научной конф. «Физико-хим. процессы при селекции атомов и молекул» Звенигород, 4-8 октября 2004 г., С.36.

5. Позднякова В.Ю., Чернышева М.Г., Бадун Г.А., Перминова И.В., Федосеев В.М. Получение меченных тритием гуминовых препаратов и изучение их гидрофобных и поверхностно-активных свойств. // Тезисы докл. 10-ой Всеросс. (междунар.) научной конф. «Физико-хим. процессы при селекции атомов и молекул» Звенигород, 3-7 октября 2005 г., С.49.
6. Позднякова В.Ю. Получение меченных тритием компонентов гуминовых веществ и их анализ с помощью гель-хроматографии. // Материалы Междунар. конф. студентов и аспирантов по фундамент. наукам «Ломоносов-2003». Секция Химия, Т.2, М., С.328.
7. Позднякова В.Ю., Чернышёва М.Г. Использование метода сцинтиллирующей фазы для исследования поверхностно-активных и гидрофобных свойств компонентов гуминовых веществ. // Материалы Междунар. конф. студентов и аспирантов по фундамент. наукам «Ломоносов-2004» 12-15 апр. 2004 г. Секция химия, Т.1, М., С.154.
8. Чернышёва М.Г., Позднякова В.Ю. Кинетические аспекты использования метода сцинтиллирующей фазы для исследования гидрофобных и адсорбционных свойств веществ. // Материалы Междунар. конф. студентов и аспирантов по фундамент. наукам «Ломоносов-2004». 12-15 апр. 2004 г. Секция химия, Т.1, М., С.163.
9. Чернышёва М.Г., Тясто З.А., Позднякова В.Ю. Взаимодействие «горячих» (1600-2000 К) атомов трития с холодными (77К) мишенями аминокислот и алкилтриметиламмоний бромидов. // Материалы Междунар. конф. студентов и аспирантов по фундамент. наукам «Ломоносов-2005». 12-15 апр. 2005 г. Секция Химия, Т.2, М., С.133.
10. Позднякова В.Ю., Чернышёва М.Г. Специфика поведения меченных тритием гуминовых веществ в двухфазных системах вода-толуол и вода-октанол. Материалы Междунар. конф. студентов и аспирантов по фундамент. наукам «Ломоносов-2005». 12-15 апр. 2005 г. Секция Химия, Т.2, М., С.124.

В автореферате использованы ссылки на работы:

- [1] Хэ Дон Гир, Бадун Г.А., Ярцева И.В., Розенберг С.Г., Зимакова Н.И., Симонов Е.Ф., Филатов Э.С. Получение меченных тритием препаратов асалина для медицинских исследований. // Вестн. ун-та, сер. 2, Химия, 1992, Т.33, № 5, С.455-459.
- [2] Сидоров Г.В., Бадун Г.А., Баитова Е.А., Баитов А.А., Платошина А.М., Мясоєдов Н.Ф., Федосеев В.М. Сравнительное изучение реакций термически активированного трития и твердофазной каталитической гидрогенизации тритием с сахарами и диазинами. // Радиохимия. 2005, Т.47, № 3, С.284-288.
- [3] Бадун Г.А., Лукашина Е.В., Ксенофонтов А.Л., Федосеев В.М. Кинетические закономерности образования меченых продуктов при действии атомарного трития на замороженные растворы и лиофилизированные смеси аминокислот. // Радиохимия. 2001, Т.43, № 3, С.272-276.
- [4] Алентьев А.Ю., Филатов Э.С. Радиометрический метод исследования межфазных границ двух несмешивающихся жидкостей. // Радиохимия. 1991, Т.33, С.80-87.

2006А
9314

№ - 9314

Подписано в печать 21.04.2006
Формат 60×88 1/16. Объем 3.75 п.л.
Тираж 100экз. Заказ № 513
Отпечатано в ООО «Соцветие красок»
119992 г.Москва, Ленинские горы, д.1
Главное здание МГУ, к.102