

П.Н. Линник¹, Я.С. Иванечко¹, Р.П. Линник², В.А. Жежеря¹

**МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ
ГУМУСОВЫХ ВЕЩЕСТВ В ПРИРОДНЫХ
ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДАХ**

¹Институт гидробиологии НАН Украины, г. Киев;

² Национальный университет им. Тараса Шевченко, г. Киев,
Украина

Рассмотрены методические особенности исследования гумусовых веществ в природных поверхностных водах. Показано, что использование хроматографических методов для извлечения гумусовых веществ из воды и исследования их молекулярно-массового распределения сопровождается потерями этих соединений в связи с явлением необратимой адсорбции. Дана сравнительная оценка методов определения концентрации гумусовых веществ, в частности спектрофотометрии и флуоресцентной спектроскопии, а также методов, базирующихся на результатах определения цветности воды и реакции азосочетания с использованием диазотированного 4-нитроанилина.

Ключевые слова: гумусовые вещества, гуминовые кислоты, молекулярно-массовое распределение, природные воды, фульвокислоты.

Введение. Состав и содержание растворенных органических веществ (РОВ) природных поверхностных вод определяются совокупностью многих, часто различных по своей природе и скорости, процессов. К важнейшим источникам формирования РОВ в водоемах и водотоках относятся прижизненные и посмертные выделения гидробионтов; поступления с атмосферными осадками и поверхностно-склоновым стоком вследствие взаимодействия указанных осадков с почвами и растительным покровом на поверхности водосбора; речные воды как источники питания озер и водохранилищ; болота и торфяники; промышленные и хозяйственно-бытовые сточные воды.

РОВ поверхностных водных объектов являются химически гетерогенной смесью, состоящей из различных классов и групп органических соединений, которые принадлежат к кислотам, основаниям

© П.Н. Линник, Я.С. Иванечко, Р.П. Линник, В.А. Жежеря, 2013

и нейтральным веществам; характеризуются разной степенью гидрофобности и гидрофильности и имеют различную молекулярную массу. К ним относятся органические кислоты, аминокислоты, углеводы, липиды, белки, полипептиды, лигнины, жиры, парафины, альдегиды, фенолы, гумусовые кислоты и многие другие [1– 4].

Среди органических соединений природных вод наиболее распространены гумусовые вещества (ГВ), в состав которых входят растворимые фракции гуминовых кислот (ГК) и фульвокислот (ФК) и нерастворимый остаток – гумин. Однако растворимость ГК и ФК различна: первые нерастворимы в кислой среде ($\text{pH} < 2$), а вторые растворимы как в кислой, так и в щелочной средах. На этом основано их разделение. Часто ГВ являются преобладающей фракцией РОВ и представлены главным образом фракцией ФК. Считается, что в составе РОВ пресноводных экосистем относительное содержание ФК достигает в среднем около 50% [5, 6].

Результатами многочисленных исследований установлено, что в низкоцветных поверхностных водах содержание ФК к ГК соотносится как 10:1, а в высокоцветных – как 5:1. Однако в поровых растворах донных отложений водоемов это отношение существенно меняется, составляя 1:3, что указывает на доминирование в них ГК [1].

В элементном составе водных ГВ около 50% приходится на углерод, 4–5% – на водород, 35–40% – на кислород, 1–2% – на азот и менее 1% – на серу и фосфор [7]. Среди функциональных групп ГВ доминируют карбоксильные, фенолгидроксильные, карбонильные и гидроксильные [1]. Кроме того, имеются хинонные и гидроксохинонные, фосфор- и серосодержащие группировки. Благодаря полифункциональности и разнообразию структуры ГВ участвуют в ионных, гидрофобных и электронных донорно-акцепторных взаимодействиях [8].

ГВ представляют собой сложные макромолекулярные структуры с широким интервалом молекулярной массы (М. м.) – от нескольких сотен до нескольких тысяч и даже десятков тысяч дальтон [7, 9– 11]. При этом ГК обладают большими размерами, чем ФК [12]. Объясняется это, с одной стороны, образованием водородных связей между фенолгидроксильными и карбоксильными функциональными группами, находящимися в составе их макромолекул, а с другой – агрегацией ГК с аморфным кремнием и глинистыми веществами [1, 13].

Несмотря на хорошую изученность ГВ, интерес к ним в последнее время не уменьшается, о чем свидетельствует возрастающее количе-

ство публикаций, в том числе монографических работ [1, 7, 11, 13 – 17]. Это вызвано следующими обстоятельствами. Во-первых, ГВ являются источником органического углерода ($C_{\text{орг}}$) и питательного вещества для растений, микроорганизмов и бентосных организмов. Они имеют большое значение в цикле таких биогенных элементов, как азот и фосфор. Во-вторых, ГВ принимают участие во многих биохимических и геохимических процессах, влияют на формирование гидрохимического режима водных объектов, в частности кислородного режима последних. В-третьих, чрезвычайно важна их роль в процессах детоксикации. Общеизвестно, что эти природные органические кислоты, благодаря их способности к комплексообразованию, связывают ионы металлов и органические токсиканты в комплексы или аддукты, снижая тем самым их химическую и биологическую активность, что отражается в конечном итоге на уменьшении их токсичности для живых организмов [2, 7, 9, 10, 13, 18 – 20]. Следовательно, можно утверждать о существенном влиянии ГВ на функционирование водных экосистем, включая их абиотическую и биотическую составляющие [2].

Непостоянство состава, гетерогенная природа и полифункциональность ГВ требуют привлечения для изучения их содержания и физико-химических свойств комплекса методов исследования, объединяющего различные способы извлечения, концентрирования, разделения и детектирования. На сегодняшний день прослеживается тенденция к созданию унифицированного подхода к изучению ГВ, однако многие методологические проблемы остаются еще не решенными. В частности, до конца не изученным остается влияние процесса разделения ГК и ФК в сильноокислой среде на их конформацию и структурное строение, зависимость результатов молекулярно-массового распределения ГВ от степени их концентрирования и др.

В настоящей работе основное внимание было сосредоточено на некоторых методических проблемах, возникающих при исследовании ГВ поверхностных природных вод. Это касается, в частности, извлечения ГВ из природной воды, их концентрирования и разделения на фракции, а также методов определения.

Методика эксперимента. Объектами исследований были разнотипные водные объекты (реки, водохранилища, озера). Пробы воды отбирали батометром Руттнера из поверхностного слоя на глубине около 0,5 м.

Для отделения взвешенных веществ порцию свежееотобранной воды объемом 0,5 – 1,5 дм³ пропускали через мембранный фильтр

Synproг (Чехия) с диаметром пор 0,4 мкм под давлением $\approx 2,02 \cdot 10^5$ Па, которое создавалось с помощью установки УК 40-2М. Затем фильтрат природной воды (обычно 1 – 1,5 дм³) пропускали через стеклянную колонку, содержащую целлюлозный сорбент диэтиламиноэтилцеллюлозу (ДЭАЭ-целлюлозу), для извлечения ГВ. Параметры колонки: диаметр – 2,5, высота – 27,5, высота слоя сорбента – 3 см; свободный объем колонки – 12,5 см³. Для обеспечения полноты извлечения ГВ из колонки десорбцию последних осуществляли в три стадии. На первой стадии в качестве элюента использовали 0,3 моль/дм³ раствор КОН, на второй – 0,02 моль/дм³ раствор H₂SO₄ и на третьей – снова 0,3 моль/дм³ раствор КОН. Объем каждого элюента составлял 25 см³. После каждой стадии элюирования сорбент промывали 25 см³ бидистиллированной воды. Скорость элюирования – ~ 1 см³/мин.

Разделение ГВ на фракции ГК и ФК достигали путем подкисления полученного концентрата (рН 1,5 – 2) и выдерживания его при ~ 40 – 50°C в течение нескольких часов. После этого концентрат ГВ оставляли примерно на одни сутки, а образовавшийся осадок ГК отделяли центрифугированием. Раствор, содержащий ФК, упаривали в фарфоровой чашке до появления кристаллов солей на ее стенках. Раствор перенесли в другую чашку и продолжали упаривать. Операцию повторяли до прекращения выпадения солей. Полученный раствор ФК высушивали досуха в эксикаторе.

Молекулярно-массовое распределение ГВ исследовали методом гель-хроматографии, для чего использовали стеклянную колонку, заполненную гелем Toyopearl HW-50F (Япония). Параметры колонки: длина – 80, диаметр – 2,8, высота геля – ~ 60 см; свободный объем колонки – 145 см³. Предварительно колонка была откалибрована с помощью растворов полиэтиленгликолей с известной молекулярной массой (1,0; 2,0; 15,0 и 20,0 кДа) и глюкозы (0,18 кДа). Элюентом служил фосфатный буферный раствор (0,025 моль/дм³) с рН 7. Скорость элюирования – 1 см³/мин. Свободный объем колонки устанавливали с помощью раствора блюдекстрана (М. м. – 2000 кДа). Молекулярную массу ГВ оценивали по калибровочному графику, построенному в координатах "lg(M. м.) – R", где М. м. – молекулярная масса веществ, использованных для калибровки колонки, R – коэффициент распределения ($R = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$), здесь V_e – объем выхода из колонки полиэтиленгликоля определенной молекулярной массы и глюкозы, V_0 и V_t – соответственно свободный и общий объемы колонки).

Калибровочные графики для определения ГК и ФК были построены с использованием их препаратов (выделенных из воды Каневского водохранилища и Шацких озер), очищенных и высушенных в соответствии с методикой [21, 22].

Концентрацию ГВ определяли с помощью методов спектрофотометрии и флуоресцентной спектроскопии, а также по реакции азосочетания с диазотированным 4-нитроанилином [23]. Спектры поглощения и флуоресценции растворов ГВ во фракциях после гель-хроматографического разделения регистрировали с помощью спектрофотометра Unico UV 2800 и люминесцентного спектрометра Perkin Elmer LS-55 с ксеноновой импульсной лампой. При спектрофотометрическом и флуоресцентном определении концентрацию ГВ находили по калибровочным графикам "Оптическая плотность при 254 нм – концентрация ГВ, мг/дм³" и "Интенсивность флуоресценции (440 нм) – концентрация ГВ, мг/дм³". При фотометрическом определении с использованием реакции азосочетания концентрацию ГВ находили по калибровочному графику "Оптическая плотность при 540 нм – концентрация ГВ, мг/дм³". Кроме того, с помощью имитационной бихроматно-кобальтовой шкалы измеряли цветность фильтрованной воды и растворов во фракциях после гель-хроматографического разделения [24]. Иногда этот показатель используют для оценки концентрации ГВ в поверхностных природных водах [13].

Результаты и их обсуждение. Как уже отмечалось выше, ГВ часто являются преобладающей фракцией РОВ в пресных поверхностных водах. Полученные нами данные о концентрации этих органических кислот в поверхностных водных объектах, находящихся в различных физико-географических зонах Украины, также свидетельствуют в пользу изложенного. Относительное содержание ГВ в них составляло от 45 до 78% растворенного $C_{\text{орг}}$. Такой широкий разброс значений обусловлен, прежде всего, источниками формирования РОВ. Например, в речных водах бассейна р. Припяти основную роль в формировании РОВ в целом и ГВ в частности играет поверхностно-склоновый сток с заболоченной территории. Поэтому в таких водных объектах содержание ГВ наиболее высокое. По данным [6], в типичной речной воде с относительно невысокой концентрацией органического углерода (в среднем ~5,0 мг/дм³) содержание ГВ может составлять почти 60, в том числе ФК ~ 55% (рис. 1). Трансфильная фракция РОВ представляет собой кислоты с большей гидрофильностью, наиболее высоким содержанием азота и кислорода и меньшей ароматичностью по сравнению с фульвокислотами, выделенными из одной и той же пробы воды. В общем содержании РОВ она составляет 8 – 15% [14].



Рис. 1. Диаграмма распределения растворенного C_{org} среди различных групп органических веществ в типичной речной воде ($C_{org} = 5 \text{ мг/дм}^3$) [6].

В качестве примера приведены данные о содержании ГК и ФК в некоторых исследованных нами водных объектах (рис. 2), также убеждающие в том, что фракция ФК преобладает в составе ГВ. Относительное содержание фракции ГК колеблется в пределах от 2 до 20%. Такое соотношение фракций ГК и ФК обусловлено различиями в их растворимости, о чем упоминалось ранее, и способности к адсорбции на взвешенных веществах.

Как известно, адсорбция на взвесах поверхностных вод характерна для ГК в большей степени, чем для ФК.

Для извлечения ГВ из природной воды используют различные сорбенты [13, 25]. Способ, рекомендуемый Международным обществом гумусовых веществ (International Humic Substances Society, IHSS), предусматривает использование смолы XAD-8 [5]. ГВ, полученные по данной методике, содержат только гидрофобные органические кислоты. Часто для этой цели применяют также слабоосновный анионит ДЭАЭ-целлюлозу, который позволяет отделить органические кислоты, в том числе и ГВ, от неорганических анионов, катионов и веществ нейтральной природы [26]. В отличие от смол серии XAD, используемых для извлечения ГВ, сорбция этих веществ ДЭАЭ-целлюлозой происходит не за счет гидрофобных взаимодействий, а по механизму ионного обмена [26]. Это обстоятельство, а также то, что адсорбция веществ

происходит преимущественно на поверхности сорбента, существенно облегчает их элюирование. Однако даже в этом случае наблюдается неполная десорбция ГВ с поверхности сорбента. При одностадийном элюировании 0,3 моль/дм³ раствором КОН потери, обусловленные необоротной сорбцией, могут составлять от 2 до 26%.

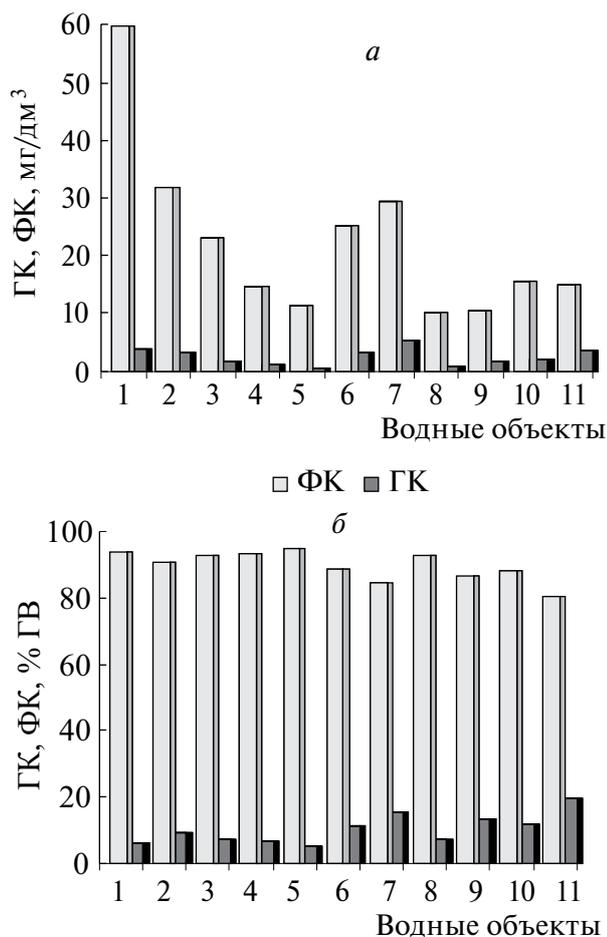


Рис. 2. Абсолютное (а) и относительное (б) содержание гуминовых кислот и фульвокислот в водных объектах: 1 – р. Припять (04.07.2012); 2 – оз. Люцимир (16.02.2011); 3, 4 – Каневское водохранилище, рукав Десенка (01.06.2011 и 01.11.2011); 5 – р. Десна (12.07.2011); 6 – р. Шуя, г. Петрозаводск (13.09.2012); 7 – Каневское водохранилище, Оболонский залив (29.05.2012); 8, 9 – Китаевский пруд, г. Киев (24.06.2012 и 27.09.2012); 10 – р. Дунай, Килийский рукав (15.11.2012); 11 – р. Горный Тикич, с. Черная Каменка (30.09.2012).

К тому же максимальные потери, достигающие 18 – 26%, в большей степени характерны для высокоцветных вод. Повысить степень десорбции удается путем трехстадийного элюирования веществ из колонки: вначале 0,3 моль/дм³ раствором КОН (фракция К₁), затем 0,02 моль/дм³ раствором Н₂SO₄ (фракция К₂) и снова 0,3 моль/дм³ раствором КОН (фракция К₃) (табл. 1)

Дополнительным преимуществом использования анионитов для извлечения ГВ из природных вод является возможность многократного их концентрирования (в 20 – 50 и более раз) в процессе адсорбции, что очень удобно при проведении дальнейших исследований [13, 21, 22]. Концентрирование необходимо, например, при изучении молекулярно-массового распределения ГВ методом гель-хроматографии.

Таблица 1. Содержание гумусовых веществ в природной воде и степени их десорбции из колонки с ДЭАЭ-целлюлозой

Объект исследования, дата отбора проб	Концентрация ГВ в воде				
	после прямого определения, мг/дм ³	после I стадии десорбции		после I–III стадии десорбции	
		мг/дм ³	степень десорбции, %	мг/дм ³	степень десорбции, %
Каневское водохранилище, Оболонский залив, 25.05.2012	40,2	30,8	76,6	38,7	96,3
р. Десна, устье, 27.05.2011	15,6	11,6	74,4	14,6	93,6
р. Десна, устье, 02.11.2011	11,9	9,9	83,2	10,7	90,0
р. Десна, устье, 09.02.2012	20,0	17,1	85,5	18,6	93,0
р. Серет, вблизи г. Тернополя, 09.10.2011	7,9	6,9	87,3	7,2	91,2
р. Рось, г. Белая Церковь, 27.11.2011	9,3	8,4	90,3	8,9	95,7

Примечание. Содержание ГВ находили по результатам определения цветности природной воды и концентратов, полученных после десорбции.

Применение данного метода неизбежно приводит к разбавлению исследуемых проб в процессе разделения, что, в свою очередь, осложняет определение концентрации ГВ в полученных фракциях спектрофотометрическим методом. В то же время оказалось, что степень концентрирования влияет на соотношение различных по молекулярной массе фракций ГВ (рис. 3). С повышением степени концентрирования происходит существенное увеличение доли веществ с молекулярной массой $> 5,0$ кДа, достигающее почти 20% (см. рис. 3).

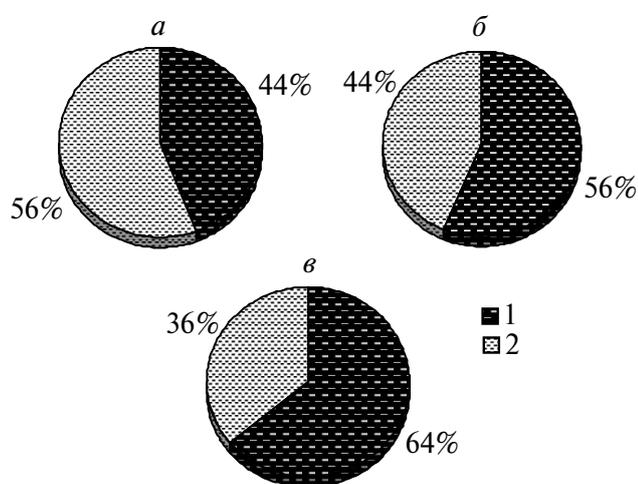


Рис. 3. Относительное содержание фракций гумусовых веществ с различной молекулярной массой ($> 5,0$ (1), $\leq 2,0$ кДа (2)) в воде Каневского водохранилища (Десенка, 06.12.2011г.) в зависимости от степени их концентрирования на колонке с ДЭА-целлюлозой: в 12 (а), 25 (б) и 38 раз (в). $C_{ГВ} = 19,5$ мг/дм³.

Поэтому полученные данные о распределении веществ по фракциям с различной молекулярной массой будут зависеть от степени концентрирования пробы воды. Такие отличия чаще всего проявляются для проб природных вод с повышенным содержанием гумуса (реки бассейна Припяти, болотные воды). Причина повышения относительного содержания веществ с большей молекулярной массой в составе ГВ при концентрировании объясняется их укрупнением или агрегацией за счет соединений с меньшей молекулярной массой (рис.4). Наибольших изменений претерпевает фракция ГВ с наименьшей молекулярной массой ($< 1,0$ кДа).

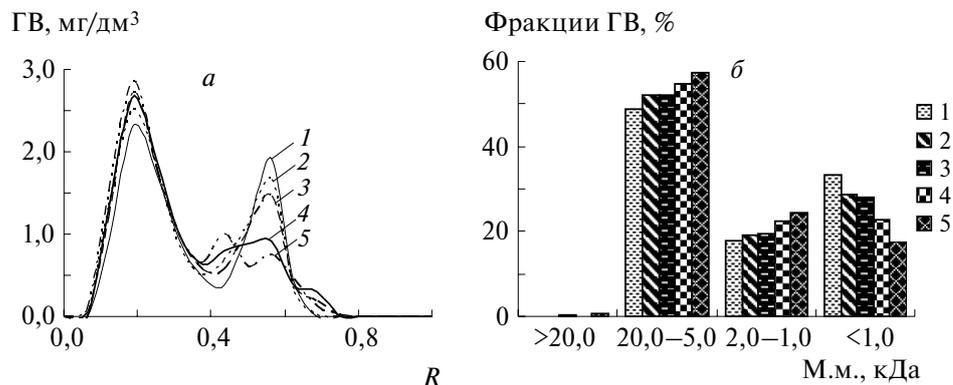


Рис. 4. Гель-хроматограммы гумусовых веществ (а), выделенных из воды Каневского водохранилища (Десенка; 24.01.2012 г.), и относительное содержание их фракций различной молекулярной массой (б) в зависимости от степени концентрирования на колонке с ДЭА-целлюлозой. 1–5 – степень концентрирования гумусовых веществ соответственно в 12; 25; 40; 60 и 96 раз. $C_{ГВ} = 10,7 \text{ мг/дм}^3$.

Таким образом, при подготовке концентратов для исследований необходимо учитывать концентрацию ГВ в исходной пробе. По нашему мнению, степень концентрирования ГВ не должна превышать 10 – 12 раз для высокоцветных вод (50 – 100 и более град Сг – Со-шкалы) и 40 – 50 раз для вод с невысокой цветностью (10 – 15 град Сг – Со-шкалы).

Изменение рН раствора – еще один фактор, способный оказывать влияние на результаты молекулярно-массового распределения ГВ. Значительное изменение рН имеет место, например, при разделении ГВ на фракции ГК и ФК, которое базируется на различии в их растворимости в кислой среде. Об изменении соотношения веществ с различной молекулярной массой до и после такого разделения свидетельствуют данные, приведенные на рис. 5. Очевидно, что при подкислении и нагревании концентрата ГВ с целью их разделения на фракции ГК и ФК происходят структурные изменения, способствующие трансформации высокомолекулярных ассоциатов в вещества с низкой молекулярной массой. В то же время избежать подобных нарушений не удастся, поскольку альтернативного способа разделения ГВ на фракции ГК и ФК не существует. Необходимость такого разделения важна, прежде всего, для исследования химических свойств ГК и ФК, включая их комплексообразующую способность по отношению к ионам металлов. Кроме того, это разделение может представлять определенный практический интерес для научно обоснованного использования коагулянтов на станциях подготовки воды для питьевого снабжения населения.

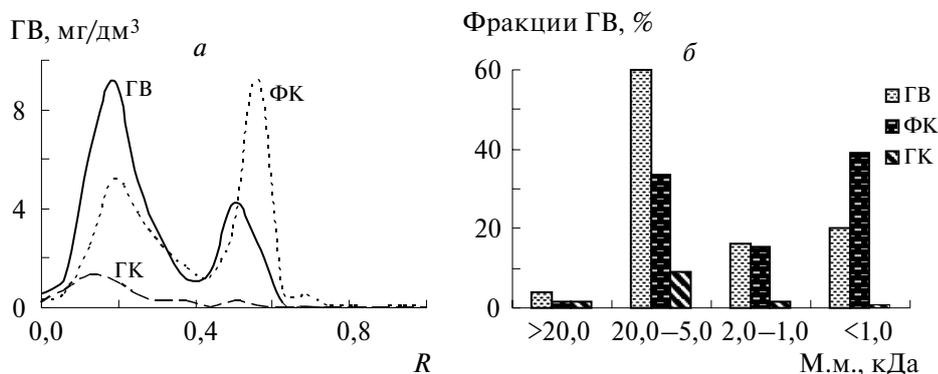


Рис. 5. Гель-хроматограммы гумусовых веществ, фульво-и гуминовых кислот (а), выделенных из воды оз. Люцимир (16.02.2011), и соотношение их различных по молекулярной массе фракций (б).

При определении концентрации ГВ в пробах природных вод чаще всего используют спектрофотометрию и метод флуоресцентной спектроскопии, реже – методы, связанные с определением цветности воды и применением реакции азосочетания [13, 27]. В табл. 2 сопоставлены данные определения концентрации ГВ в природных водах указанными методами. В большинстве случаев величины концентрации ГВ оказались достаточно близкими и отличались в пределах 3 – 8%, но для некоторых водных объектов различия в полученных данных достигали около 20 – 30%. Следовательно, все эти методы можно использовать для определения концентрации ГВ в природных водах, поскольку позволяют получить удовлетворительные результаты. В то же время авторы [13] считают, что данные о содержании ГВ, полученные по результатам измерения цветности воды с использованием платино-кобальтовой шкалы, могут быть несколько завышенными. Однозначно подтвердить или опровергнуть это утверждение нам не удалось.

Наиболее заметные различия возникают при использовании спектрофотометрии и флуоресцентной спектроскопии для детектирования ГВ во фракциях после гель-хроматографического разделения при исследовании их молекулярно-массового распределения. Оказалось, что соотношение различных по молекулярной массе фракций ГВ существенно отличается в зависимости от того, какой метод был использован для определения их концентрации в отдельных фракциях (рис. 6). Для каждой из них ($\leq 2,0$ или $> 5,0$ кДа) разница составляет

от 16 до 25%, хотя суммарное содержание ГВ в полученных фракциях при этом мало отличается. В воде р. Десны оно составляет 10,2 и 11,5, а в воде Каневского водохранилища – 17,6 и 19,5 мг/дм³. Указанное различие может быть обусловлено несколькими причинами.

Таблица 2. Содержание гумусовых веществ в поверхностных природных водах при определении его различными методами

Объекты исследований, даты отбора проб воды	Методы определения			
	спектро- фото- метрический	флуорес- центный	по цветно- сти воды	по реакции азосочета- ния
	Концентрация ГВ, мг/дм ³			
р. Южный Буг, 03.07.2011 г.	9,6	12,8	11,4	Не опр.
р. Десна, устье, 02.11.2011 г.	10,2	11,5	9,9	10,9
р. Десна, устье, 27.05.2011 г.	14,8	15,3	11,6	13,2
р. Десна, устье, 09.02.2012 г.	19,3	21,0	18,3	20,2
р. Рось, 22.05.2011 г.	7,9	7,3	6,3	Не опр.
р. Рось, 27.11.2011 г.	10,6	10,1	8,9	10,2
р. Дунай, устье, 15.11.2012 г.	17,7	19,4	18,4	19,0
Каневское водохра- нилище (рукав Де- сенка), 25.05.2012 г.	34,8	37,5	36,0	37,2

Во-первых, вполне вероятно, что отдельные фракции ГВ характеризуются различными флуоресцентными свойствами. Например, было показано [28], что фракции с меньшей молекулярной массой обладают большей интенсивностью флуоресценции, чем высокомолекулярные. Полученные нами гель-хроматограммы в большинстве случаев характеризуются наличием двух пиков, один из которых соответствует выходу высокомолекулярных веществ, а второй – веществ с невысокой молекулярной массой. При этом второй пик, по результатам измерения интенсивности флуоресценции, часто оказывался выше первого (см. рис. 6, а). Иногда в обла-

сти выхода веществ с меньшей молекулярной массой проявлялись несколько пиков (см. рис. 6, в).

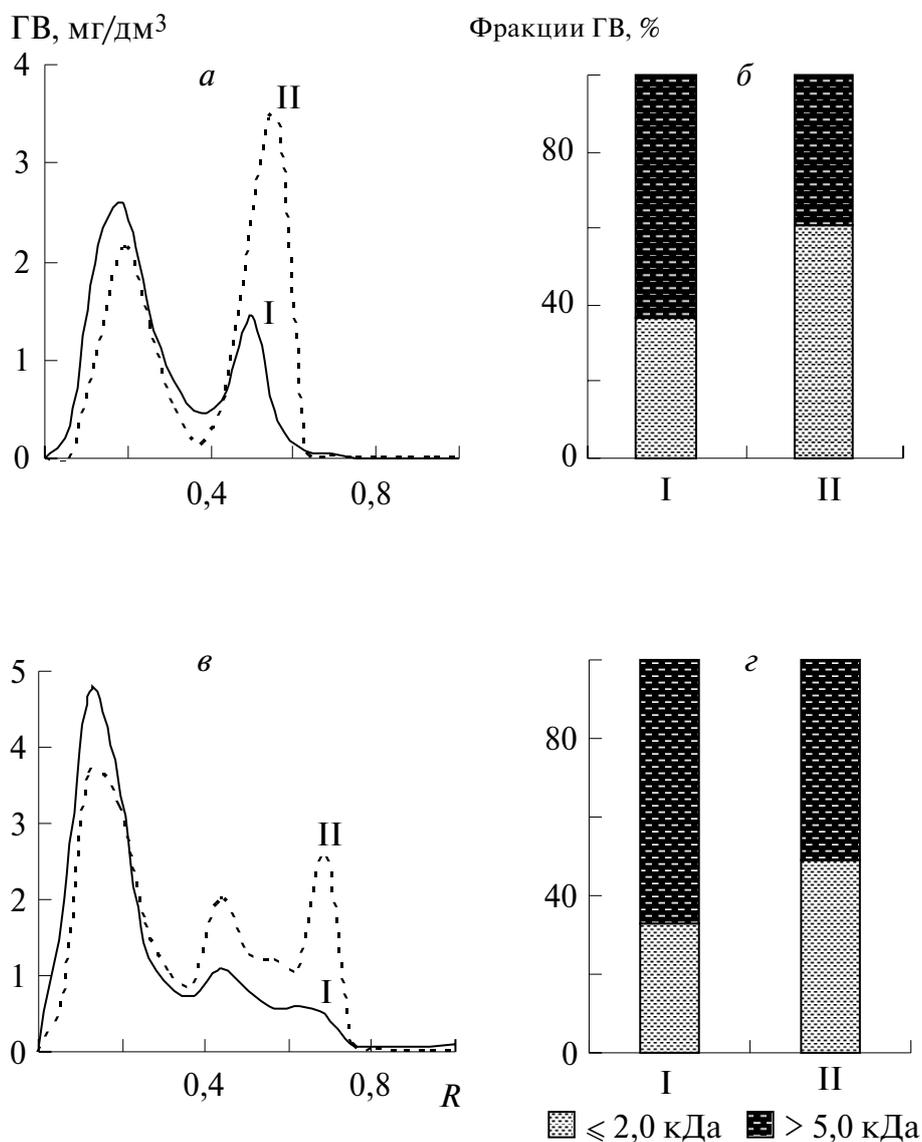


Рис. 6. Гель-хроматограммы гумусовых веществ, выделенных из воды р. Десны (а–02.11.2011г.) и Каневского водохранилища, рукав Десенка (в–06.12.2011г.), и соотношение их различных по молекулярной массе фракций (б, з). I и II – соответственно спектрофотометрический (A_{254}) и флуоресцентный методы определения концентрации гумусовых веществ.

Во-вторых, существенное влияние на результаты определения концентрации ГВ флуоресцентным методом может оказывать комплексообразование с ионами металлов, способствующее снижению интенсивности флуоресценции ГВ [13]. Подтверждением этому могут служить полученные нами данные о содержании некоторых металлов во фракциях ГВ с различной молекулярной массой. В качестве примера на рис. 7 сопоставлены гель-хроматограммы ГВ и комплексных соединений Fe(III), Al(III) и Cu(II) с этими природными органическими лигандами. Оказалось, что для фракций с высоким содержанием металлов в составе комплексов с ГВ характерна меньшая интенсивность флуоресценции по сравнению с фракциями, где концентрация металлов ниже. Такое влияние наблюдалось как для низкомолекулярных (см. рис. 7, а – в), так и высокомолекулярных фракций (г – е).

По всей видимости, метод флуоресцентной спектроскопии целесообразно рекомендовать для изучения физико-химических свойств препаратов ГВ, предварительно очищенных от ионов металлов. Кроме того, метод гашения флуоресценции находит широкое применение для исследования комплексообразующей способности ГВ по отношению к ионам различных металлов, а также для установления источников происхождения этих природных органических кислот [13, 27, 29].

Использование гель-проникающей хроматографии для изучения молекулярно-массового распределения ГВ неизбежно связано с их частичными потерями вследствие сорбции гелями. Сорбционная способность ГВ зачастую зависит от того, из какого водного объекта они извлечены. По всей видимости, в данном случае большую роль играет состав ГВ. Наш опыт использования этого метода свидетельствует, что необратимая сорбция на колонке с гелем Toyopearl HW-50F в большей степени характерна для ГК как более гидрофобной фракции ГВ, и в меньшей – для ФК. В целом же, считается, что элюирование ФК из колонки на уровне ~ 85 % следует признать вполне приемлемым [9].

Выводы. Таким образом, в процессе исследования ГВ в поверхностных природных водах возникает ряд методических проблем, связанных с извлечением и концентрированием этих веществ, а также с особенностями молекулярно-массового распределения при использовании различных методов определения концентрации во фракциях после гель-хроматографического разделения. При извлечении ГВ из воды наиболее полная их десорбция из колонки с ДЭАЭ-целлюлозой обеспечивается после трехстадийного элюирования и достигает 90 – 96%.

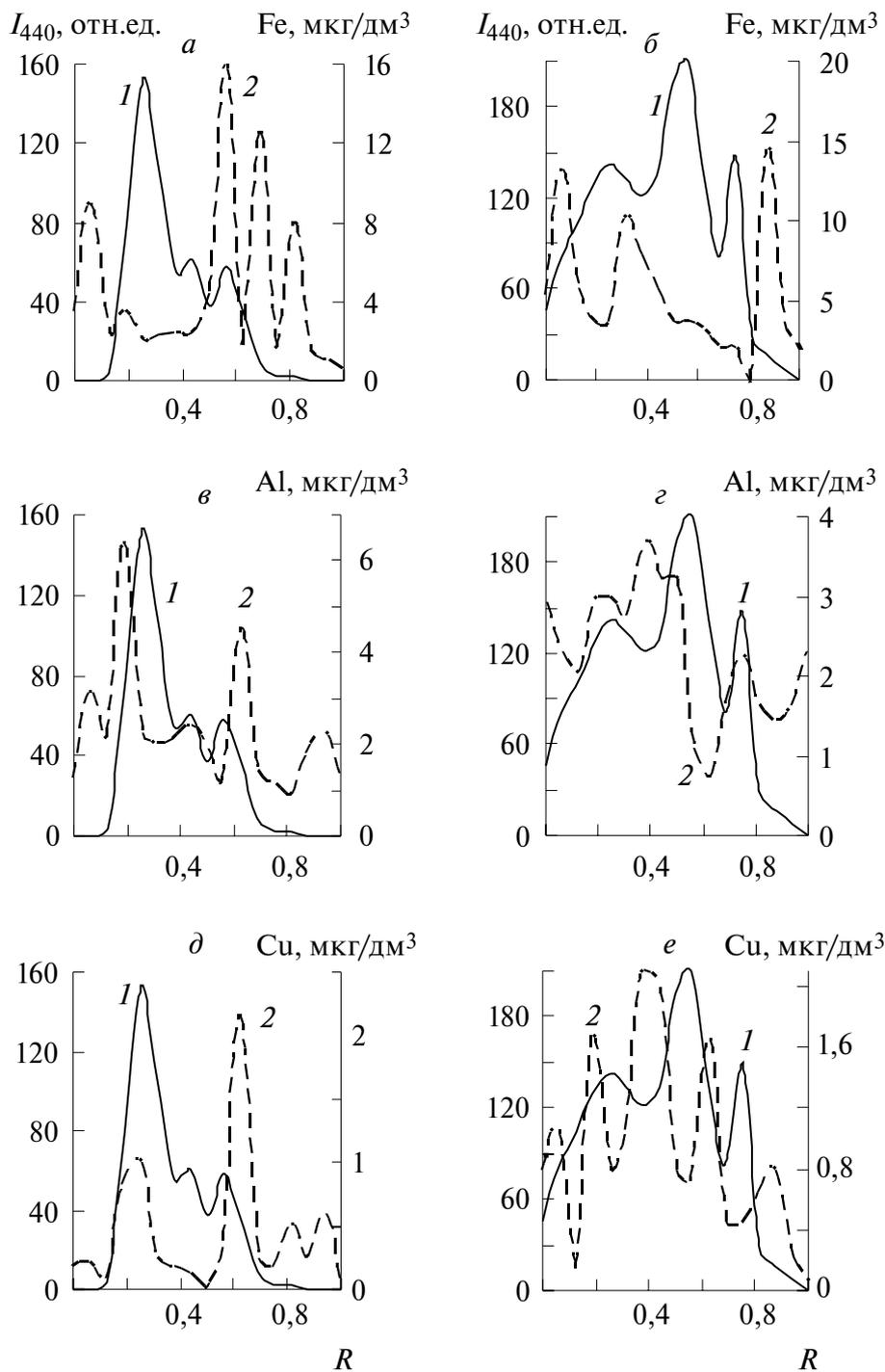


Рис. 7. Гель-хроматограммы гумусовых веществ (1), извлеченных из воды р. Десна (устье), и комплексных соединений железа (а, б), алюминия (в, г) и меди (д, е) с этими веществами (2). Даты отбора проб воды: а, в, д – 27.05.2011 г.; б, г, е – 03.02.2011 г.

Концентрирование ГВ на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой отражается на соотношении их фракций с большей ($>5,0$ кДа) и меньшей ($<2,0$ кДа) молекулярными массами, причем, чем выше степень концентрирования, тем больше ее влияние на это соотношение. Для природных вод с высокой цветностью (50 – 100 и более град Сг – Со-шкалы) и, соответственно, повышенным содержанием ГВ степень концентрирования не должна превышать 10 – 12 раз, а для вод с низкой цветностью (10 – 15 град Сг – Со-шкалы) – 40 – 50 раз.

Для определения концентрации ГВ в природных поверхностных водах приемлемы как спектрофотометрия и флуоресцентная спектроскопия, так и методы, базирующиеся на данных по определению цветности воды и реакции азосочетания с использованием диазотированного 4-нитроанилина, поскольку дают возможность получить удовлетворительные результаты.

В то же время при гель-хроматографическом исследовании молекулярно-массового распределения ГВ и соотношения фракций с большей и меньшей молекулярными массами полученные данные могут различаться в зависимости от того, какой метод (спектрофотометрический или флуоресцентный) используется для определения их концентрации во фракциях. Различия в относительном содержании отдельных фракций ГВ ($>5,0$ или $<2,0$ кДа) могут достигать от 16 до 25%. Это обусловлено различиями в интенсивности флуоресценции отдельных фракций ГВ, а также тушением флуоресценции вследствие образования комплексных соединений с ионами таких металлов, как Fe(III), Al(III), Cu(II) и др.

Резюме. Розглянуто методичні особливості дослідження гумусових речовин природних поверхневих вод. Показано, що використання хроматографічних методів для вилучення гумусових речовин з води і дослідження їхнього молекулярно-масового розподілу супроводжується втратами цих сполук через незворотну адсорбцію. Дано порівнювальну оцінку методів визначення концентрації гумусових речовин, зокрема спектрофотометрії та флуоресцентної спектроскопії, а також методів, що базуються на результатах визначення кольоровості води і реакції азосполучення з використанням діазотованого 4-нітроаніліну.

P.N. Linnik, Ya.S. Ivanechko, R.P. Linnik, V.A. Zhezherya

METHODICAL FEATURES OF THE STUDY OF HUMIC SUBSTANCES IN NATURAL SURFACE WATER

Summary

Methodical features of the study of humic substances in natural surface waters are considered. It is shown that the use of chromatographic methods for the extraction of humic substances from water and study their molecular weight distribution is accompanied by losses of these compounds due to the irreversible adsorption phenomena. A comparative evaluation of the methods for determination of the humic substances concentration, in particular spectrophotometry and fluorescence spectroscopy, as well as methods based on the results of the determination of the water colority and azo coupling reaction with diazotized 4-nitroaniline is given.

Список использованной литературы

- [1] *Aquatic ecosystems: interactivity of dissolved organic matter* / Eds. S.E.G. Findlay, R.L. Sinsabaugh. – San Diego: Acad. Press, 2003. – 512 p.
- [2] *Секи Хумитаке*. Органические вещества в водных экосистемах. – Л.: Гидрометеиздат, 1986. – 200 с.
- [3] *Семенов А.Д.* // Автореф. дис. ... докт. хим. наук. – Новочеркасск, 1971. – 40 с.
- [4] *Сакевич О.Й., Усенко О.М.* Алелопатія в гідроекосистемах. – К.: Ін-т гідробіології НАН України, 2008. – 342 с.
- [5] *Thurman E.M., Malcolm R.L.* // *Environ. Sci. and Technol.* – 1981. – **15**. – P. 463 – 466.
- [6] *Thurman E.M.* *Organic Geochemistry of Natural Waters.* – Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. – 516 p.
- [7] *Tipping E.* *Cation binding by humic substances.* – Cambridge: Cambridge University Press, 2004. – 434 p.
- [8] *Vogl J., Heumann K.G.* // *Fresenius' J. Anal. Chem.* – 1997. – **359**. – P. 438 – 441.
- [9] *Перминова И.В.* // Автореф. дис. ... докт. хим. наук. – М., 2000. – 50 с.
- [10] *Линник П.Н., Васильчук Т.А., Линник Р.П.* // *Гидробиол. журн.* – 2004. – **40**, № 1. – С. 81 – 107.
- [11] *Humic substances in soil, sediment and water* / Eds. G.R. Aiken, D.M. McKnight, R.L. Wershaw, P. MacCarthy. – New York: John Wiley and Sons, Inc., 1985. – 692 p.

- [12] *Thurman E.M., Wershaw R.L., Malcolm R.L. et al.* // *Organic. Geochem.* – 1982. – **4**. – P. 27 – 35.
- [13] *McDonald S., Bishop A.G., Prenzler P.D. et al.* // *Anal. Chim. Acta.* – 2004. – **527**. – P. 105 – 124.
- [14] *Aiken G.R., McKnight D.M., Thorn K.A. et al.* // *Org. Geochem.* – 1992. – **18**. – P. 567 – 573.
- [15] *Brown A., McKnight D.M., Chin Yu-Ping et al.* // *Mar. Chem.* – 2004. – **89**. – P. 327– 337.
- [16] *Попов А.И.* Гуминовые вещества: свойства, строение, образование / Под ред. Е.И. Ермакова. – СПб.: Изд-во Санкт-Петербург. ун-та, 2004. – 248 с.
- [17] *Humic substances: Nature's most versatile materials* / Eds. E.A. Ghabbour, G. Davies. – New York: Taylor and Francis, Inc., 2005. – 252 p.
- [18] *Моисеенко Т.И., Кудрявцева Л.П., Гашкина Н.А.* Рассеянные элементы в поверхностных водах суши: технофильность, биоаккумуляция и экотоксикология. – М.: Наука, 2006. – 261 с.
- [19] *Linnik P.N., Vasilchuk T.A.* // *Use of humic substances to remediate polluted environments: from theory to practice* NATO Science. Ser. IV. Earth and Environmental Series. – Dordrecht: Springer, 2005. – **52**. – P. 135 – 154.
- [20] *Линник П.Н., Щербань Э.П.* // *Экол. химия.* – 1999. – **8**, № 3. – С. 168 – 176.
- [21] *Варшал Г.М., Велюханова Т.К., Сироткина И.С., Ярцева Р.Д.* // *Гидрохим. материалы.* – 1973. – **59**. – С. 143–151.
- [22] *Сироткина И.С.* // Автореф. дис. ... канд. хим. наук. – М.: ГЕОХИ АН СССР, 1974. – 25 с.
- [23] *Попович Г.М.* // Автореф. дис. ... канд. хим. наук. – К.: 1990. – 23 с.
- [24] *Набиванець Б.Й., Осадчий В.І., Осадча Н.М., Набиванець Ю.Б.* Аналітична хімія поверхневих вод. – К.: Наук. думка, 2007. – 456 с.
- [25] *Vaken S., Degryse F., Verheyen L. et al.* // *Environ. Sci. and Technol.* – 2011. – **45**. – P. 2584 – 2590.
- [26] *Miles C.J., Tuschall J.R., Brezonik P.L.* // *Anal. Chem.* – 1983. – **55**. – P. 410 – 411.
- [27] *Hudson N., Baker A., Reynolds D.* // *River Res. Applic.* – 2007. – **23**. – P. 631 – 649.
- [28] *Abbt-Braun G., Lankes U., Frimmel F.H.* // *Aquat. Sci.* – 2004. – **66**. – P. 151– 170.
- [29] *Esteves da Silva J.C.G., Machado A.S.C., Oliveira C.J.S., Pinto M.S.S.D.S.* // *Talanta.* – 1998. – **45**. – P. 1155 – 1165.

Поступила в редакцию 14.01.2013 г.