

УДК 535.373.4:547.992.2

Спектральная зависимость самотушения флуоресценции гуминовых кислот

Н.Л. Лаврик, Н.У. Муллоев*

*Институт химической кинетики и горения СО РАН
630090, г. Новосибирск, ул. Институтская, 3*

Поступила в редакцию 17.03.2012 г.

Для трех фракций гуминовых кислот (ГК) с разной молекулярной массой, выделенных из одной почвы, изучена спектральная зависимость констант самотушения флуоресценции $K_{стл}$. Установлено, что каждая фракция характеризуется индивидуальной спектральной зависимостью эффективности самотушения. При этом установлен следующий экспериментальный факт: для исходных макромолекул ГК, которые обладают большими гидрофобными свойствами, эффективность самотушения «красной» флуоресценции выше, чем «синей» флуоресценции этой фракции, а для исходных макромолекул ГК, которые обладают меньшими гидрофобными свойствами, эффективность самотушения «синей» флуоресценции выше, чем «красной» флуоресценции этой фракции. Таким образом, для процесса самоассоциации ГК, с использованием методики наблюдения спектрального самотушения, впервые получена информация об изменении состояния флуорофоров в этом процессе.

Ключевые слова: фракции гуминовых кислот, флуоресценция, самотушение, константа Штерна–Фольмера, спектральная зависимость; *fractions of humic acids, fluorescence, self-quenching, constant of Stern–Volmer, spectral dependence.*

Введение

Интерес к изучению свойств макроструктуры гуминовых кислот (ГК) в водных растворах обусловлен тем, что только гуминовые вещества обладают всем комплексом свойств, которые создают в водных бассейнах Земли специфические экологические условия, имеющие общепланетарное значение. Структура макромолекул ГК изучается приблизительно 200 лет, но до сих пор является предметом дискуссий. Наиболее распространенная точка зрения на структуру макромолекулы ГК представляется следующей: имеются ядро (ароматический углеродный скелет) и периферия (полисахаридно-полипептидные цепи) [1]. Молекулярные фрагменты ядра и периферии одной макромолекулы ГК связаны химическими связями. Носителями специфических свойств гуминовых кислот являются конденсированные ароматические ядра, соединенные друг с другом ковалентными связями. Периферические нерегулярные структурные элементы (периферические цепи) являются переменными компонентами, и, соответственно, масса макромолекулы ГК может варьироваться и достигать более 300 000 кД (Д — дальтон). Эта вариабельность приводит к тому, что любой образец макромолекулы ГК характеризуется широким набором различных по структуре молекул, т.е. обладает свойством полидисперсности.

Одним из дискуссионных до настоящего времени является вопрос о структуре макромолекул ГК в водных растворах при изменении ее концентрации. Актуальность его изучения связана с общей проблемой комплексообразования ГК и, в частности, с проблемой механизма самоассоциации макромолекул ГК. Методологически понятно, что сведения об особенностях процесса самоассоциации могут быть получены при изучении концентрационных зависимостей параметров макромолекулы ГК, которые имеют отношение к их структуре. Такое изучение влияния концентрации на структуру ГК было предпринято в работе [2], в которой авторы исследовали концентрационные зависимости коэффициентов вязкости и поверхностного натяжения водных растворов ГК при различных величинах ионной силы раствора и величины pH. Вывод этой работы заключался в том, что в щелочных средах при низких концентрациях макроструктура ГК представляет собой гибкий линейный полимер, а при высоких концентрациях — жесткий сфероколлоид. Однако механизм изменения структуры макромолекулы ГК при переходе от цепного полимера к жесткому сфероколлоиду в [2] не был описан. Это связано с тем, что обсужденные выше эксперименты в принципе не могли дать информацию об изменении состояния сайтов макромолекул ГК при увеличении концентрации, поскольку для получения этих сведений необходим метод, позволяющий конкретно получать информацию о состоянии сайтов. Сведения о механизме самоассоциации, т.е. о том, какие конкретно фрагменты сайта

* Николай Львович Лаврик (lavrik@ns.kinetics.nsc.ru);
Нуролло Урунбойевич Муллоев.

макромолекул ГК претерпевают изменения в этом процессе, в настоящее время отсутствуют вообще.

Одним из активно развивающихся методов мониторинга структурных свойств ГК в последние 20 лет является флуорометрия. Этот метод позволяет получать информацию об изменении состояния флуорофоров в зависимости от изменения конформации любой молекулы и, в частности, от состояния флуорофоров на сайтах макромолекул ГК [3–17]. Проявление самоассоциации в спектрах флуоресценции обсуждалось в [12, 15, 17]. В [17] было установлено, что увеличение концентрации разных по массе фракций ГК приводит к самотушению флуоресценции. При этом величины констант самотушения $K_{СТ}$ оказались намного выше диффузионных, что позволило авторам [17] сделать заключение о том, что механизм самотушения ГК является статическим, т.е. в темновых условиях имеет место самоассоциация макромолекул ГК. Кроме того, в [17] было показано, что эффективность самотушения выше для более тяжелых фракций. Однако до последнего времени информация об изменении собственно состояния флуорофоров на сайтах макромолекул ГК при их ассоциации полностью отсутствовала.

Конкретной целью нашей работы было получение информации об изменении состояния флуорофоров на сайтах ГК с различной молекулярной массой при увеличении их концентрации методом флуоресценции. Для решения поставленной задачи была изучена спектральная зависимость эффективности самотушения флуоресценции ГК. Метод спектральной зависимости эффективности тушения, т.е. получение информации о том, какова доступность сайтов, содержащих флуорофоры, для тушения флуоресценции ранее был предложен и успешно апробирован в работе [16]. В этой работе для получения информации об эффективности взаимодействия сайтов стандартного образца ГК с ионом $[Cu^{2+}]$ была изучена зависимость констант Штерна–Фольмера $K_{ШФ}$ (степень эффективности тушения) от длины волны флуоресценции. Полученная спектральная зависимость эффективности тушения оказалась немонотонной функцией, что свидетельствовало о наличии нескольких спектральных компонент.

Априори наличие спектральной зависимости эффективности самотушения $K_{СТ}$ при увеличении концентрации ГК можно ожидать, поскольку при наличии процессов самоассоциации макромолекул ГК [17] имеет место взаимодействие их сайтов, которые имеют различные амфифильные (химические) и структурные свойства (разная степень доступности). Это различие должно выявиться в разной эффективности взаимодействия сайтов и, соответственно, в разной эффективности тушения интенсивности флуоресценции хромофоров, находящихся на этих сайтах. Таким образом, при наличии процесса самоассоциации разные спектральные компоненты могут иметь разную эффективность тушения в силу различной доступности и химической природы флуорофора. Следовательно, изучая спектральную

зависимость эффективности самотушения, можно получить сведения о свойствах флуорофоров в структуре макромолекулы ГК. В настоящей работе эти сведения были получены нами на примере хорошо спектрально охарактеризованных фракций ГК с разной молекулярной массой [11, 16, 17]. Следует заметить, что предлагаемый подход к анализу природы флуорофоров в структуре сайтов макромолекул ГК с разной молекулярной массой в литературе не описан.

Экспериментальная часть

Материалы

Использовались фракции ГК, выделенные из одной почвы (курский чернозем, горизонт А). Выделение ГК и получение фракций, условно названных А, В и С + D, описаны в [11]. Молекулярные массы M этих фракций составляли 100–300, 60–100 и 5–30 кД соответственно [11]. За величину средней молекулярной массы фракции M^i принимались значения полусуммы максимальной и минимальной массы соответствующей фракции: $M^A = (100 + 300)/2 = 200$ кД, $M^B = (60 + 100)/2 = 80$ кД и $M^{C+D} = (5 + 30)/2 = 17,5$ кД.

Приготовление растворов ГК

Использовали щелочные растворы (NaOH, pH = 12,3), приготовленные на деионизированной воде. Величина pH = 12,3 была выбрана в связи с надежной растворимостью всех фракций ГК при этом значении pH, поскольку ранее в [11] было указано на низкую растворимость фракции А при pH = 6,5, в то время как при pH = 13 трудностей с растворением образцов ГК не возникало. Исходные растворы ГК готовили добавлением нескольких миллиграммов образца к 5 мл щелочного раствора. Растворы меньшей концентрации готовили разбавлением этого раствора. При приготовлении исходных растворов их встряхивали в течение 60 мин при комнатной температуре. Спектры флуоресценции записывали не менее чем через 24 ч после приготовления растворов. Для приготовления растворов использовали весы «Sartorius». Величины pH измеряли с помощью pH-метра «Redelkis».

Спектральная аппаратура

Спектры поглощения были получены на спектрометре Hewlett Packard 6041 в стандартных 1-см кварцевых кюветах. Спектры флуоресценции были получены на N_2 -лазерном импульсном флуориметре ($\lambda_{exc} = 337,1$ нм, 25 Гц, 80 мкВт, 10 нс) [18]. Луч лазера проходил через кювету сверху параллельно входной щели флуориметра. Длина оптического пути при возбуждении флуоресценции составляла 1 см. Диаметр лазерного луча 3 мм. Расстояние от центра лазерного луча до стенки рабочей кюветы, через которую регистрировалась флуоресценция, составляло 0,4 см. Регистрация флуоресценции проводилась под прямым углом относительно на-

правления возбуждающего света. Кювета заполнялась раствором таким образом, что мениск отсутствовал. Контроль стабильности интенсивности возбуждающего света проводился периодическим снятием внешнего стандарта (интенсивность Раман-спектра линии валентного ОН колебания в деионизированной воде). Температура проведения экспериментов $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Обработка экспериментальных данных

Для получения констант самотушения $K_{\text{СТ}\lambda}$ флуоресценции ГК использовали уравнение Штерна–Фольмера с учетом того, что тушителем при возрастании концентрации ГК является сама молекула ГК:

$$I_{0\lambda}/I_\lambda = 1 + K_{\text{СТ}\lambda} [\text{ГК}], \quad (1)$$

где $[\text{ГК}]$ – концентрация фракций ГК (мг/л); $I_{0\lambda}$ и I_λ – значения относительных квантовых выходов флуоресценции растворов ГК при $[\text{ГК}] \rightarrow 0$ и $[\text{ГК}] \neq 0$ соответственно. Написание выражения (1) подразумевает, что изначально имеется бесконечно разбавленный раствор ГК (в пределе одна молекула, у которой квантовый выход составляет величину $I_{0\lambda}$) и к этому раствору добавляются молекулы-тушители, которые могут быть любой природы (включая те же самые макромолекулы ГК). Следует заметить, что при $K_{\text{СТ}\lambda} = 0$ $I_\lambda = I_{0\lambda}$ для любой концентрации ГК, т.е. процесс самотушения отсутствует. Такую ситуацию легко представить, например, в случае проведения экспериментов с мицеллами: величина квантового выхода флуорофоров, находящихся внутри мицеллы, не будет меняться при изменении общей концентрации флуорофоров, если концентрацию флуорофоров внутри мицеллы поддерживать постоянной.

Величина $I_{0\lambda}$ экспериментально не определяется. Она вычислялась из анаморфозы

$$(I_\lambda)^{-1} = (I_{0\lambda})^{-1} + K_{\text{СТ}\lambda} (I_{0\lambda})^{-1} [\text{ГК}]. \quad (2)$$

Из (2) видно, что, строя зависимость $(I_\lambda)^{-1}$ от $[\text{ГК}]$, по отсечению на оси ординат находится величина $(I_{0\lambda})^{-1}$, а из тангенса наклона этой зависимости определяется значение $K_{\text{СТ}\lambda} (I_{0\lambda})^{-1}$ и далее $K_{\text{СТ}\lambda}$.

Величины относительных квантовых выходов флуоресценции растворов ГК I_λ вычислялись из соотношения

$$I_\lambda = (1 - 10^{-\text{OD}_{337}})^{-1} \int I_{\text{отн}}(\lambda) 10^{\text{OD}_{\lambda\text{ем}}} d\lambda, \quad (3)$$

где $I_{\text{отн}}(\lambda)$ – экспериментально наблюдаемая относительная интенсивность флуоресценции растворов ГК на длине волны λ ; OD_{337} – оптическая плотность раствора ГК на $\lambda = 337,1$ нм при длине оптического пути 1 см; $\text{OD}_{\lambda\text{ем}}$ – оптическая плотность раствора ГК на длине волны флуоресценции λ при длине оптического пути 0,4 см в спектральном диа-

пазоне 350–650 нм. Сомножитель $(1 - 10^{-\text{OD}_{337}})^{-1}$ в (3) учитывает изменение количества поглощенных квантов света при изменении концентрации флуорофоров в образце ГК. Интегрирование (суммирование) скорректированного контура спектра флуоресценции проводилось в спектральном диапазоне 350–650 нм (величины нижнего и верхнего предела для знака интеграла \int) с помощью стандартной программы из «Origin 7». Сомножитель $10^{\text{OD}_{\lambda\text{ем}}}$ является корректирующей поправкой на эффект внутреннего фильтра при испускании флуоресценции. На принципиальную важность учета эффектов внутреннего фильтра при работе с растворами гуминовых кислот указывалось ранее [19–21].

Для получения качественной информации о спектральной эффективности самотушения флуоресценции ГК использовали также величину α_λ – отношение квантовых выходов флуоресценции фракций ГК на длине волны λ при концентрациях ГК 1 ($I_\lambda^{1\text{мг}}$) и 10 мг/л ($I_\lambda^{10\text{мг}}$) соответственно:

$$\alpha_\lambda = I_\lambda^{1\text{мг}} / I_\lambda^{10\text{мг}}. \quad (4)$$

В величину $I_{\text{отн}}(\lambda)$ в формуле (3) дает вклад флуоресценция растворителя. Этот вклад всегда учитывался. Доля этого вклада как в интегральную интенсивность, так и в интенсивность на определенной длине волны зависела от концентрации ГК и не превышала 8%. Однако при определении $K_{\text{СТ}\lambda}$ как с учетом, так без учета этого вклада различий в полученных значениях $K_{\text{СТ}\lambda}$ в пределах погрешности ее определения ($\pm 10\%$) установлено не было.

Результаты

На рис. 1, а представлены концентрационные зависимости спектров поглощения для фракций С + D. Для других фракций получены аналогичные зависимости. Спектры поглощения для всех фракций ГК в спектральном диапазоне 250–700 нм были аналогичны спектрам [11, 17] и представляют собой функцию, значения которой монотонно уменьшаются с увеличением длины волны. Для всех спектров поглощения ГК наблюдалась линейная зависимость величины оптической плотности от концентрации флуорофора, т.е. закон Бугера–Ламберта–Бера выполнялся.

Увеличение концентрации ГК приводило к росту экспериментально наблюдаемой интенсивности флуоресценции (рис. 1, б). Аналогичные концентрационные зависимости имели место для фракций А и В. Однако после введения поправок [по (3)] зависимость квантового выхода флуоресценции ГК от концентрации становится противоположной – интенсивность спектров уменьшается с ростом концентрации (рис. 1, в). Этот результат позволил в [17] сделать заключение, что при увеличении концентрации ГК имеет место самотушение флуоресценции ГК. Аналогичный вывод следует из данных рис. 1, в: для любых длин волн во всех фракциях наблюдается самотушение флуоресценции.

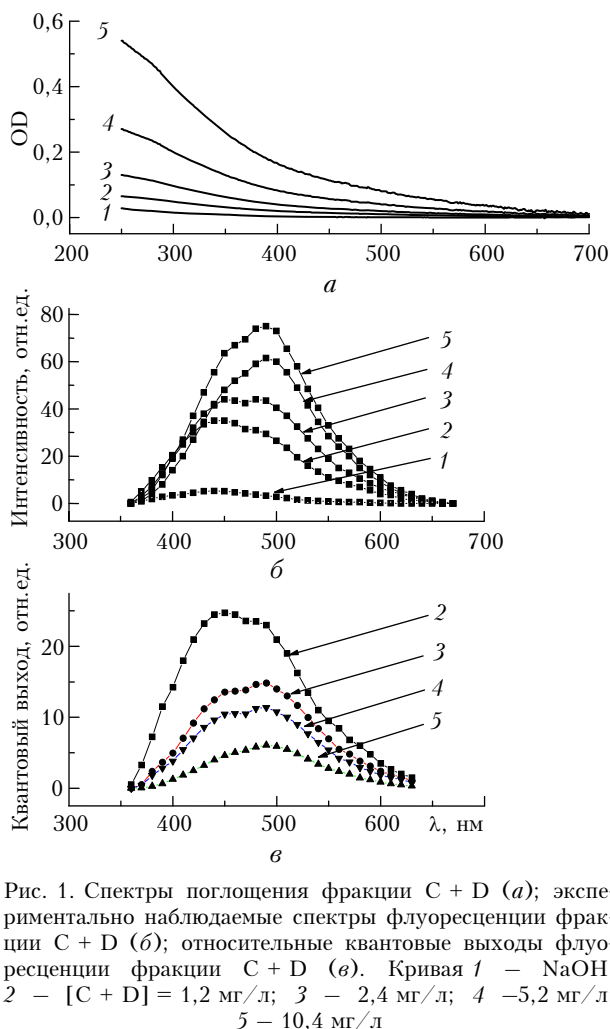


Рис. 1. Спектры поглощения фракции С + D (а); экспериментально наблюдаемые спектры флуоресценции фракции С + D (б); относительные квантовые выходы флуоресценции фракции С + D (в). Кривая 1 – NaOH; 2 – [С + D] = 1,2 мг/л; 3 – 2,4 мг/л; 4 – 5,2 мг/л; 5 – 10,4 мг/л

На рис. 2 представлены зависимости $(I_\lambda)^{-1}$ от [ГК] при некоторых длинах волн для фракций А, В и С + D соответственно.

Как видно из приведенных данных, для всех фракций наблюдались удовлетворительные линейные зависимости, что позволило по (2) определить значения $K_{СТ\lambda}$. Исключение составляют зависимости $(I_\lambda)^{-1}$ от [ГК] для фракции А в спектральном диапазоне длин волн 380–480 нм. В этом диапазоне спрямления не наблюдается (рис. 3).

Как видно из рис. 3, наблюдается изгиб зависимости $(I_\lambda)^{-1}$ от [ГК] к оси X. Такой изгиб характерен для случая, когда одна часть флуорофоров доступна для тушения, а другая не доступна [19]. Для определения константы тушения в этом случае используют модифицированное уравнение Штерна–Фольмера [19]:

$$I_{0\lambda}/\Delta I_\lambda = 1/(f_1 K_{СТ\lambda} [\text{ГК}]) + 1/f_1, \quad (5)$$

где $I_{0\lambda}$, $K_{СТ\lambda}$, [ГК] означают то же, что и в (1); $\Delta I_\lambda = I_{0\lambda} - I_\lambda$ – разница квантовых выходов флуоресценции образца при $[\text{ГК}] \rightarrow 0$ и $[\text{ГК}] \neq 0$ на длине волны λ ; f_1 – доля доступной для тушения фракции флуоресцирующего образца. Эта модифи-

цированная форма уравнения Штерна–Фольмера позволяет графически определить $K_{СТ\lambda}$ и f_1 : на графике зависимости $I_{0\lambda}/\Delta I_\lambda$ от $[\text{ГК}]^{-1}$ и при наличии спрямления значение f_1 определяется из отсекаемого отрезка на оси Y, а величина $1/(f_1 K_{СТ\lambda})$ – из тангенса угла наклона.

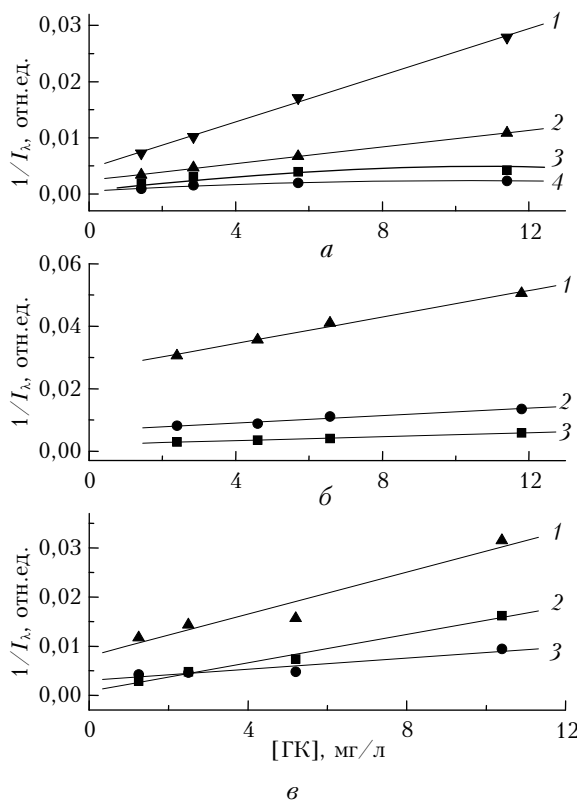


Рис. 2. Зависимости $(I_\lambda)^{-1}$ от [ГК]: а – фракция А; 1 – $\lambda = 580$; 2 – 540, 3 – 400, 4 – 440 нм; б – фракция В; 1 – $\lambda = 580$; 2 – 520; 3 – 440 нм; в – фракция С + D; 1 – $\lambda = 580$; 2 – 420; 3 – 520 нм

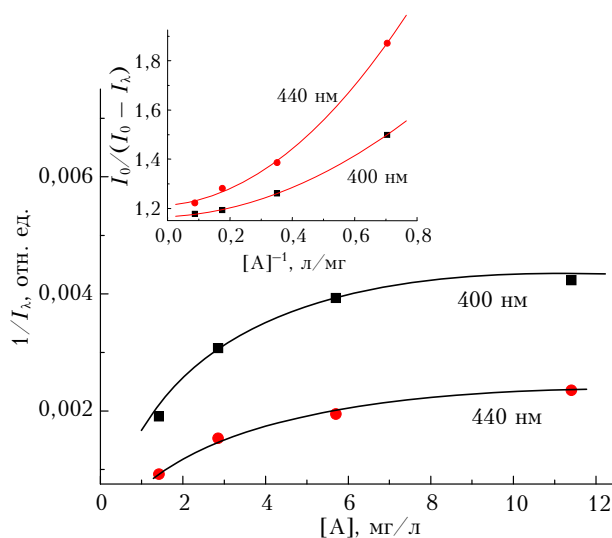


Рис. 3. Зависимости $(I_\lambda)^{-1}$ от [ГК] для фракции А при $\lambda = 400$ и 440 нм. На фрагменте – анаморфозы для интенсивностей на этих длинах волн по уравнению (5)

Однако в нашем случае (фрагмент на рис. 3) такого спрямления не наблюдается. Отсутствие спрямления зависимости $I_{0\lambda}/\Delta I_{\lambda}$ от $1/[\text{ГК}]$ означает, что изгиб зависимости $(I_{\lambda})^{-1}$ от $[\text{ГК}]$ к оси X (рис. 3) для фракции А связан, по-видимому, не только с наличием сайтов с флуорофорами, недоступными для тушения, но и с другими, не установленными в настоящее время факторами. (В частности, одним из таких факторов может быть зависимый от концентрации стерический фактор данного сайта ГК.) Таким образом, с помощью общеизвестных подходов для фракции А в спектральном диапазоне 380–480 нм определение констант $K_{\text{СТ}\lambda}$ не представлялось возможным.

На рис. 4, а показаны спектральные зависимости констант самотушения $K_{\text{СТ}\lambda}$ для изученных фракций. (Константы самотушения представлены в размерности л/мг и не переведены в размерности л/моль, как в [17], поскольку в дальнейшем будет обсуждаться только относительные спектральные изменения $K_{\text{СТ}\lambda}$ для каждой фракции, а сравнение абсолютных величин $K_{\text{СТ}\lambda}$ между фракциями не будет проводиться.)

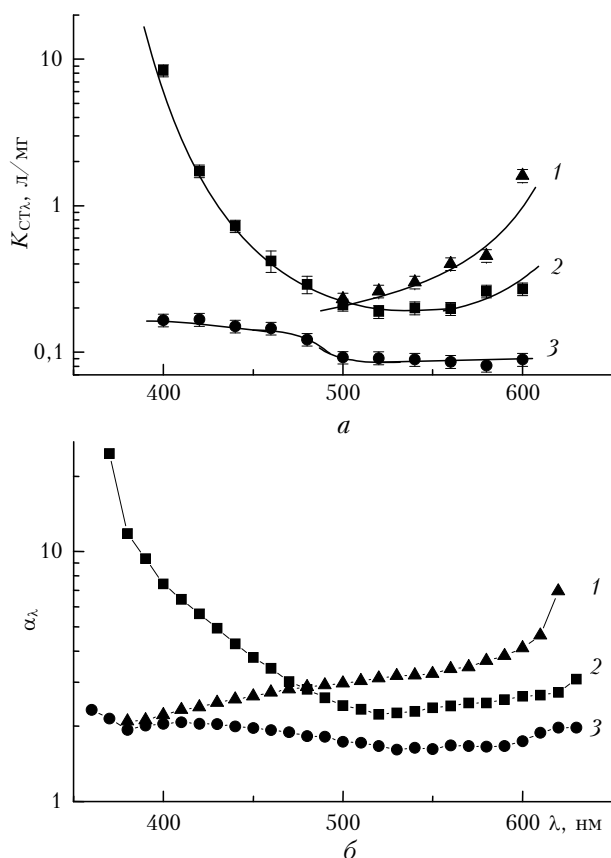


Рис. 4. Спектральные зависимости констант самотушения $K_{\text{СТ}\lambda}$ (а) и α_{λ} (б) для фракций А (1), В (2) и С + D (3)

Как видно из рис. 4, а, зависимости $K_{\text{СТ}\lambda}$ индивидуальны, т.е. принципиально отличаются друг от друга. Это свидетельствует о том, что сайты, содержащие флуорофоры, испускающие свет в од-

ной и той же спектральной области, но входящие в состав разных фракций, имеют разную природу (химическую, структурную, химически-структурную и т.д.) и, соответственно, разную эффективность тушения. В частности, для фракции А (тяжелая фракция) большее самотушение претерпевают флуорофоры, испускающие свет с $\lambda > 500$ нм («красные» флуорофоры), относительно самотушения флуоресценции в спектральном диапазоне $\lambda < 500$ нм («синие» флуорофоры), а для фракции С + D (легкая фракция), напротив, большее самотушение претерпевают «синие» флуорофоры. Спектральная эффективность тушения флуоресценции фракции В, молекулярная масса которой имеет промежуточное значение между самой тяжелой и самой легкой фракциями, не претерпевает заметных изменений в зависимости от длины волны флуоресценции: лишь в «синей» области спектра ($\lambda < 500$ нм) наблюдается небольшое увеличение $K_{\text{СТ}\lambda}$.

На рис. 4, б представлены спектральные зависимости α_{λ} для рассмотренных фракций. Как видно из сравнения рис. 4, а, б абрисы спектральных зависимостей $K_{\text{СТ}\lambda}$ и α_{λ} практически полностью подобны. Отсюда следует, что параметр α_{λ} можно использовать для качественных выводов о спектральной зависимости эффективности самотушения флуоресценции макромолекул ГК. Дополнительно можно отметить достоинство использования α_{λ} : этот параметр позволяет анализировать изменения контура спектра флуоресценции в любом спектральном диапазоне без каких-либо ограничений. Например, в нашем случае возможна интерпретация спектральной зависимости параметра α_{λ} для фракции А в диапазоне $\lambda < 500$ нм, т.е. во всем спектральном интервале испускания флуоресценции.

Обсуждение

Итак, как видно из рис. 4, для каждой фракции имеется индивидуальная спектральная зависимость эффективности самотушения флуоресценции $K_{\text{СТ}\lambda}$ и α_{λ} , что отражает индивидуальные особенности структуры каждой из этих фракций. Так, в частности, структура макромолекул фракции В такова, что при самоассоциации сайты с флуорофорами, испускающими как «красную», так и «синюю» флуоресценцию, претерпевают примерно одинаковое тушение. Для тяжелой фракции А наблюдается большая эффективность тушения в «красной» области спектра, чем в «синей», а для легкой фракции С + D — имеет место большая эффективность тушения «синей» относительно «красной» флуоресценции.

Во введении указывалось, что эффективность тушения флуоресценции ГК может зависеть от двух факторов: химической природы флуорофора и доступности флуорофора для тушителя. Наличие этих двух факторов для каждой фракции ГК может приводить к четырем формально возможным причинам самотушения флуоресценции фракций ГК: 1) химически одинаковые флуорофоры и одинаковая доступность; 2) химически одинаковые флуорофоры

и разная доступность; 3) химически разные флуорофоры и одинаковая доступность; 4) химически разные флуорофоры и разная доступность. В связи с наличием свойства полидисперсности любой образец фракции ГК может иметь произвольную комбинацию факторов тушения. Из-за этого обстоятельства однозначная интерпретация наблюдаемых спектральных зависимостей эффективности тушения одной фракции и абсолютное различие эффективностей тушения разных фракций не представляются возможными. Очевидным является только то, что ввиду заметно различающихся спектральных зависимостей эффективности тушения $K_{Ст}$ и α_x (см. рис. 4) для разных фракций ГК возможная причина № 1 может быть отвергнута, поскольку, если бы ее вклад в зависимость был значителен, то эти зависимости для разных фракций были бы, по крайней мере, подобны.

В связи с невозможностью однозначной интерпретации мы ограничимся объяснением полученных данных с помощью следующего экспериментально установленного факта. В [22, 23] было показано, что более тяжелые фракции ГК относительно легких содержат большую долю алифатических и ароматических фрагментов, т.е., можно думать, обладают более гидрофобными свойствами. Отсюда можно сделать следующее заключение. Увеличение степени гидрофобности исходной макромолекулы ГК приводит к тому, что с ростом концентрации, т.е. при самоассоциации, изменение структуры макромолекулы ГК происходит таким образом, что в тяжелой фракции А, в которой степень гидрофобности выше, чем в легкой, более сильное тушение претерпевает «красная» флуоресценция. В легкой фракции С + D, в которой степень гидрофобности менее высокая, чем в тяжелой, наиболее сильное тушение претерпевает «синяя» флуоресценция. Таким образом, в рамках представлений о наличии у образцов ГК разной доли гидрофобных групп возможна непротиворечивая интерпретация спектральных зависимостей эффективности самотушения флуоресценции фракций ГК.

Заключение

Изучены спектральные зависимости эффективности самотушения для трех фракций ГК разной массы. Оказалось, что каждая фракция характеризуется индивидуальной спектральной зависимостью эффективности самотушения. При этом установлен следующий экспериментальный факт: для исходных макромолекул ГК, которые обладают большими гидрофобными свойствами, эффективность самотушения «красной» флуоресценции выше, чем «синей», а для исходных макромолекул ГК, которые обладают меньшими гидрофобными свойствами, эффективность самотушения «синей» флуоресценции выше, чем «красной». Таким образом, для процесса самоассоциации ГК с использованием методики наблюдения спектрального самотушения впервые получена информация об изменении состояния флуорофоров в этом процессе. Предло-

женный нами подход (изучение спектральной зависимости самотушения (возгорания) для дискриминации свойств флуорофоров фракций ГК) может быть полезен при изучении свойств структуры любых макромолекул ГК.

Авторы искренне признательны О.Е. Трубецкой и О.А. Трубецкому за любезное предоставление образцов фракций ГК.

1. *Stevenson F.J.* Humus Chemistry. Genesis, Composition, Reactions; 2nd ed. New York: John Wiley and Sons, Inc., 1994. 386 p.
2. *Ghosh K., Schnitzer M.* Macromolecular structures of humic substances // *Soil Sci.* 1980. V. 129, N 5. P. 266–275.
3. *Senesi N., Miano T.M., Provinziano M.R., Brunetti G.* Characterization, differentiation and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy // *Soil Sci.* 1991. V. 152, N 4. P. 259–271.
4. *Zsolnau A., Baigar E., Jimenez M.* Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying // *Chemosphere.* 1998. V. 38, N 1. P. 45–52.
5. *Лаврик Н.Л., Дергачева М.И., Ковалева Е.И.* Применение методов ИК и люминесцентной спектроскопии для изучения структурных свойств гуминовых кислот // *Химия в интересах устойчивого развития.* 2000. Т. 8, № 6. С. 815–820.
6. *Лаврик Н.Л.* Изучение полидисперсных свойств молекул гуминовых кислот с помощью люминесцентной спектроскопии // *Химия в интересах устойчивого развития.* 2003. Т. 11, № 5. С. 751–755.
7. *Лаврик Н.Л., Сагдиев А.М., Дергачева М.И.* Изучение структуры гуминовых кислот, выделенных из горизонта А, методами поглощения и флуоресценции // *Химия в интересах устойчивого развития.* 2004. Т. 12, № 3. С. 451–455.
8. *Соколова И.В., Чайковская О.Н., Бегина А.А.* Спектрально-люминесцентные свойства гуминовых кислот // *Оптика атмосф. и океана.* 2004. Т. 17, № 2–3. С. 241–244.
9. *Лаврик Н.Л., Дергачева М.И.* Изучение фотохимической активности гуминовых кислот методом люминесценции // *Химия в интересах устойчивого развития.* 2005. Т. 13, № 1. С. 79–84.
10. *Лаврик Н.Л., Муллоев Н.У.* Влияние концентрации гуминовых кислот в водных растворах на структуру их макромолекул. // *Химия в интересах устойчивого развития* 2006. Т. 14, № 4. С. 379–390.
11. *Trubetskaya O., Trubetskoj O., Giyot G., Andreux F., Richard C.* Fluorescence of soil humic acids and their fractions obtained by tandem size exclusion chromatography – polyacrylamide gel electrophoresis // *Organic Geochem.* 2002. V. 33, N 2. P. 213–220.
12. *Lochmuller C.H., Saavedra S.S.* Conformational changes in a soil fulvic acid measured by time-dependent fluorescence depolarization // *Anal. Chem.* 1986. V. 58, N 9. P. 1978–1981.
13. *Shin H.S., Monsallier J.-M., Choppin G.R.* Spectroscopic and chemical characterizations of molecular size fractionated humic acid // *Talanta.* 1999. T. 50, N 4. P. 641–647.
14. *Pallem V.L., Stretz H.A., Wells M.J.M.* Evaluating aggregation of gold nanoparticles and humic substances using fluorescence spectroscopy // *Environ. Sci. Technol.* 2009. V. 43, N 19. P. 7531–7535.

15. Лаврик Н.Л., Муллоев Н.У. Изучение влияния ассоциации на структуру гуминовых кислот по тушению флуоресценции // Ж. прикл. спектроскопии. 2010. Т. 77, № 4. С. 278–285.
16. Лаврик Н.Л., Муллоев Н.У. Метод изучения полидисперсности гуминовой кислоты по тушению флуоресценции ионами Cu^{2+} // Ж. прикл. спектроскопии. 2011. Т. 78, № 5. С. 757–763.
17. Лаврик Н.Л., Муллоев Н.У. Самотушение флуоресценции гуминовых кислот в водных растворах // Оптика атмосфер. и океана. 2012. Т. 25, № 9. С. 833–839.
18. Лаврик Н.Л., Августиневич И.А. Простой наносекундный флуориметр на базе спектрометра ДФС-12 // Журн. физ. хим. 1986. Т. 54, № 12. С. 1216–1218.
19. Лакович Д. Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир, 1986. 496 с.
20. Лаврик Н.Л., Ефимов Ю.Я., Муллоев Н.У. Зависимость эффекта внутреннего фильтра от диаметра возбуждающего луча в спектрах испускания флуоресценции // Оптика атмосфер. и океана. 2008. Т. 21, № 3. С. 381–385.
21. Mobed J.J., Hemmingsen S.L., Autry J.L., McGown L.B. Fluorescence characterization of IHSS humic substances: total luminescence spectra with absorption correction // Environ. Sci. Technol. 1996. V. 30, N 19. P. 3061–3065.
22. Christl I., Knicker H., Kogel-Knaber I., Kretzschmar R. Chemical heterogeneity of humic substances: characterization of size fractions obtained by hollow fibre ultrafiltration // European J. Soil Sci. 2002. V. 51, N 4. P. 617–621.
23. Swift R.S., Leonard R.I., Newman R.H., Theng B.K.G. Changes in humic acid composition with molecular weight as detected by C-13 nuclear magnetic-resonance spectroscopy // Sci. Total Environ. 1992. V. 118, N 1. P. 53–61.

N.L. Lavrik, N.U. Mulloev. The spectral dependence of fluorescence self-quenching of humic acids.

For three fractions of humic acids HA of different molecular weight, isolated from one soil, spectral dependence of fluorescence self-quenching constants K_{SQ} was studied. It was established that each fraction is characterized by individual spectral dependence of the self-quenching efficiency. The following experimental fact is thus established: for initial macromolecules HA, which have strong hydrophobic properties, the efficiency of self-quenching of “red” fluorescence is higher than “blue” fluorescence of this fraction, and for initial macromolecules HA, which have weaker hydrophobic properties, efficiency of self-quenching of “blue” fluorescence is higher than for “red” fluorescence of this fraction. Thus, for self-association HA process, using a technique of observation of spectral self-quenching, the information on changes in fluorophores in this process is received for the first time.