

Концентрационная зависимость интенсивности 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 20.07.2011 г.

Изучена концентрационная зависимость интенсивности флуоресценции фракций гуминовых кислот (ГК) с известной молекулярной массой. Обнаружено, что с ростом концентрации ГК интенсивность флуоресценции для всех фракций уменьшается. Это уменьшение интерпретировано как проявление самогашения флуоресценции ГК. Для всех фракций измерены константы самогашения флуоресценции $K_{ст}$ ($K_{ст} > 10^7$ л/моль), которые заметно превышают значения констант тушения флуоресценции макромолекул ГК ионами металлов и органическими молекулами (10^3 – 10^5 л/моль). Установлен рост $K_{ст}$ с увеличением молекулярной массы фракций ГК. Интерпретация этому факту дается в рамках модели самоассоциации макромолекул ГК, в основе которой лежат представления о решающей роли гидрофобных сил.

Ключевые слова: самогашение флуоресценции, константа Штерна–Фольмера, фракции гуминовых кислот; self-quenching of fluorescence, the Stern–Volmer constant, fraction of humic acids.

Введение

Гуминовые кислоты (ГК) являются важнейшим компонентом окружающей среды. Они содержатся в почве, речной и морской воде (в растворенном виде), а также в воздухе (в составе аэрозолей). ГК по происхождению являются органическим материалом, который синтезируется при окислении сложных природных органических молекул, таких как карбонилнитраты, белки, лигнины. Они содержатся в остатках неживых растений и организмов. ГК играют важную роль в химии, биоактивности, транспорте гидрофобных органических молекул и поддержании pH поверхностных водоемов. Структура макромолекул ГК содержит много функционально разных химических групп (катехины, хиноны, фталаты, феноламины, салицилаты и т.д.), способных к комплексообразованию [1]. Благодаря этому свойству ГК влияют на концентрацию растворенных поллютантов (амины, фенолы, гетероциклические соединения, тяжелые металлы и т.д.) [1].

Совокупность простейших процессов комплексообразования (образование комплексов 1:1), в которых участвуют макромолекулы ГК с различными компонентами водной среды, можно представить в виде



В (1)–(3) ГК – молекула гуминовой кислоты; Me^{n+} – ионы металлов различной валентности; OM – органические молекулы; $\text{ГК} \cdot \text{Me}^{n+}$, $\text{ГК} \cdot \text{OM}$, $\text{ГК} \cdot \text{ГК}$ – комплексы гуминовой кислоты с ионами металлов, органическими молекулами и молекулами гуминовой кислоты соответственно. Для создания полной (исчерпывающей) модели процессов комплексообразования (связывания) ГК в водных растворах необходимо знание констант связывания ГК с ионами металлов K_{Me} , органическими молекулами K_{OM} , а также констант самоассоциации $K_{\text{ГК}}$.

Информация о константах связывания K_{Me} и K_{OM} извлекается из различных физико-химических методов, в частности флуоресцентного. В силу своей неинвазивности метод флуоресценции в настоящее время получил широкое распространение для получения сведений как о структурных свойствах и идентификации ГК, так и об их взаимодействии с посторонними молекулами [2–14].

Получение констант комплексообразования K_{Me} и K_{OM} методом флуоресценции основано на определении констант тушения интенсивности флуоресценции ГК ионами металлов или органическими молекулами. Формально K_{Me} и K_{OM} определяются из уравнения Штерна–Фольмера [4, 5, 8, 15]:

$$\varphi_0/\varphi = 1 + K_{\text{ШФ}}[Q], \quad (4)$$

где $[Q]$ – концентрация ионов металла или органических молекул; φ_0 и φ – значения квантовых выходов флуоресценции (интегральных или на определенной длине волны) при $[Q] = 0$ и $[Q] \neq 0$ соответственно; $K_{\text{ШФ}}$ – константа тушения Штерна–Фольмера, определяющая эффективность тушения. Следует подчеркнуть, что $K_{\text{ШФ}}$ численно равна

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

константам комплексообразования K_{Me} и K_{OM} только в том случае, если тушение имеет статическую (концентрационную), а не динамическую (диффузионную) природу [15], т.е. только в этом случае константы комплексообразования K_{Me} и K_{OM} являются измеренными константами тушения флуоресценции. Статическая природа тушения флуоресценции подразумевает, что уменьшение интенсивности флуоресценции происходит в результате уменьшения концентрации исходного флуорофора за счет образования не флуоресцирующего комплекса между молекулой флуорофора и тушителя [15]. Необходимым условием того, что тушение имеет статическую природу, считается для водных растворов превышение наблюдаемой константы скорости тушения флуоресценции K_q , равной 10^{10} л/(моль·с) (диффузионная константа скорости тушения) [8–11, 15]. Величина K_q определяется из соотношения

$$K_q = K_{ШФ} / \tau_0, \quad (5)$$

где τ_0 – время жизни флуоресценции флуорофора в отсутствие тушителя [15]. Другим признаком концентрационного тушения является независимость времени жизни флуоресценции от концентрации тушителя [15].

Сведения о константах комплексообразования K_{Me} и K_{OM} , полученных с помощью метода тушения флуоресценции, содержатся в работах [3–11]. Напротив, информация о константах самоассоциации ГК $K_{ГК}$ вообще отсутствует. Между тем знание этих констант представляется весьма важным, поскольку данные о $K_{ГК}$ необходимы для создания полной модели взаимодействия (комплексообразования) макромолекул ГК с различными поллютантами.

Первым шагом к вычислению констант самоассоциации $K_{ГК}$ флуоресцентным методом могло бы быть знание констант самотушения $K_{СТ}$ флуоресценции ГК. Эта информация в настоящее время отсутствует. Ее можно попытаться получить, изучая концентрационную зависимость интенсивности флуоресценции ГК. При наличии уменьшения интенсивности можно предположить, что имеет место процесс самотушения флуоресценции и затем, применяя формализм Штерна–Фольмера, вычислить константы самотушения $K_{СТ}$ флуоресценции ГК.

Цель настоящей работы заключалась в изучении концентрационной зависимости интенсивности флуоресценции хорошо охарактеризованных фракций ГК и, при наличии процессов самотушения, получении сведений о константах самотушения флуоресценции фракций ГК. Выбор фракций ГК с известной молекулярной массой был обусловлен тем, что для сопоставления констант самотушения ГК $K_{СТ}$ с константами тушения K_{Me} и K_{OM} необходимо, чтобы они были выражены в одинаковых единицах (л/моль).

Следует априори заметить, что вопрос о получении собственно констант самоассоциации ГК $K_{ГК}$ с использованием знания $K_{СТ}$ в настоящей статье не рассматривался в связи с тем, что, как показало предварительное рассмотрение этого вопроса, при

наличии процессов самотушения $K_{ГК} \neq K_{СТ}$. Это обстоятельство обусловлено тем, что для получения абсолютных значений $K_{ГК}$ кроме знания $K_{СТ}$ необходимо точное определение времен жизни флуоресценции, которое выходило за рамки возможностей настоящей работы. Таким образом, ситуация с определением $K_{СТ}$ принципиально отличается от ситуации определения констант комплексообразования K_{Me} и K_{OM} , которые можно получить, измеряя только константы тушения флуоресценции.

Эксперимент

Материалы

Использовались фракции ГК, выделенные из одной почвы (курский чернозем, горизонт А). Выделение ГК и получение фракций, условно названных А, Б и С + Д, описаны в [16]. Молекулярные массы M используемых нами фракций составляли 100–300, 60–100 и 5–30 кД (Д – Дальтон) соответственно. За среднюю молекулярную массу фракции M^i принимались значения полусуммы максимальной и минимальной массы соответствующей фракции: $M^A = (100 + 300)/2 = 200$, $M^B = (60 + 100)/2 = 80$ и $M^{C+D} = (5 + 30)/2 = 17,5$ кД.

Приготовление растворов ГК

Щелочные растворы (NaOH, pH = 12,4) готовили на деионизованной воде. Значение pH = 12,4 было выбрано в связи с надежной растворимостью всех фракций ГК. (В [17] отмечена низкая растворимость фракции А при pH = 6,5, а при pH = 13 трудностей с растворением образцов ГК не возникало.) Исходные растворы ГК готовили растворением нескольких миллиграммов образца в 5 мл щелочного раствора. Растворы меньшей концентрации получали разбавлением этого раствора. Исходные растворы встряхивали в течение 60 мин при комнатной температуре. Контрольные измерения спектров поглощения фильтрованных и нефилтрованных исходных растворов ГК показали их совпадение. Спектры флуоресценции записывали через 24 ч после приготовления растворов. Навески для растворов взвешивались на весах «Sartorius», pH измеряли с помощью pH-метра «Redelkis».

Спектральная аппаратура

Спектры поглощения были получены на спектрометре «Hewlett Packard». Использовались кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см. Спектры флуоресценции были измерены на N₂-лазерном импульсном флуориметре ($\lambda_{возб} = 337,1$ нм, 25 Гц, 80 мкДж, 10 нс) [18]. 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 направления возбуждающего света. Эксперимент проводился при температуре $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Обработка экспериментальных данных

Для получения констант самогашения $K_{СТ}$ флуоресценции ГК использовали уравнение Штерна–Фольмера (4) с учетом того, что тушителем при возрастании концентрации ГК является сама молекула ГК, т.е. выражение (4) переходит в уравнение

$$\varphi_0/\varphi = 1 + K_{СТ}[\text{ГК}], \quad (6)$$

где $[\text{ГК}]$ – концентрация фракций ГК, мг/л; φ_0 и φ – относительные квантовые выходы флуоресценции растворов ГК при $[\text{ГК}] \rightarrow 0$ и $[\text{ГК}] = [\text{ГК}]$ соответственно. Написание выражения (6) подразумевает, что изначально имеется бесконечно разбавленный раствор ГК (в пределе одна молекула) и к этому раствору (молекуле) добавляются молекулы-тушители, которые могут быть любой природы (включая те же самые молекулы ГК). Следует заметить, что при $K_{СТ} = 0$ $\varphi = \varphi_0$ при любой концентрации ГК, т.е. процесс самогашения отсутствует. Такую ситуацию можно ожидать, 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 φ_0 экспериментально не определяется. Она вычислялась из анаморфозы [19–23]:

$$(\varphi)^{-1} = (\varphi_0)^{-1} + K_{СТ}(\varphi_0)^{-1}[\text{ГК}]. \quad (7)$$

Из (7) видно, что, строя зависимость $(\varphi)^{-1}$ от $[\text{ГК}]$, по отсечению на оси ординат находится величина $(\varphi_0)^{-1}$, а из тангенса наклона этой зависимости определяется значение угла $K_{СТ}(\varphi_0)^{-1}$ и далее $K_{СТ}$.

Относительные квантовые выходы флуоресценции растворов ГК φ вычислялись из соотношения

$$\varphi = (1 - 10^{-\text{OD}_{337}})^{-1} \int I_{\text{отн}}(\lambda) 10^{-\text{OD}_{\lambda_{\text{ем}}}} d\lambda. \quad (8)$$

Здесь $I_{\text{отн}}(\lambda)$ – относительная интенсивность флуоресценции растворов ГК на длине волны флуоресценции λ ; $I_{\text{отн}}(\lambda) = \gamma I_{\text{exp}}(\lambda)$; $I_{\text{exp}}(\lambda)$ – экспериментально наблюдаемая интенсивность флуоресценции растворов ГК на длине волны флуоресценции λ ; γ – постоянный для конкретного эксперимента коэффициент, учитывающий условия наблюдения $I_{\text{exp}}(\lambda)$ (интенсивность возбуждающего света, напряжение на ФЭУ, ширина щелей монохроматора); OD_{337} – величина оптической плотности раствора ГК на $\lambda = 337,1$ нм при длине оптического пути 1 см. Сомножитель $(1 - 10^{-\text{OD}_{337}})^{-1}$ в (8) учитывает изменение количества поглощенных квантов света при изменении концентрации флуорофоров в образце ГК; $\text{OD}_{\lambda_{\text{ем}}}$ – величина оптической плотности раствора ГК на длине волны флуоресценции λ при длине оптического пути 0,4 см в спектральном диапазоне 350–650 нм. Сомножитель $10^{\text{OD}_{\lambda_{\text{ем}}}}$ является корректирующей поправкой на эффект внутреннего фильтра при испускании флуоресценции. На принципиальную важность учета эффектов внутреннего

фильтра на испускание при работе с растворами гуминовых кислот указывалось ранее [7, 24, 25]. Интегрирование (суммирование) скорректированного контура спектра флуоресценции проводилось в спектральном диапазоне 350–650 нм (нижний и верхний пределы для знака интеграла) с помощью стандартной программы из «Origin 7».

В величину $I_{\text{отн}}(\lambda)$ в формуле (8) дает вклад флуоресценция растворителя. Доля этого вклада в интегральную интенсивность зависела от концентрации ГК и не превышала 8% (вычислялась по [15, с. 216]). Однако при определении $K_{СТ}$ по (7) как с учетом, так и без учета этого вклада не было установлено различий в полученных значениях $K_{СТ}$ в пределах погрешности ее определения ($\pm 10\%$).

Результаты и обсуждение

На рис. 1, а, б представлены спектры поглощения для всех фракций ГК в спектральном диапазоне 250–700 нм.

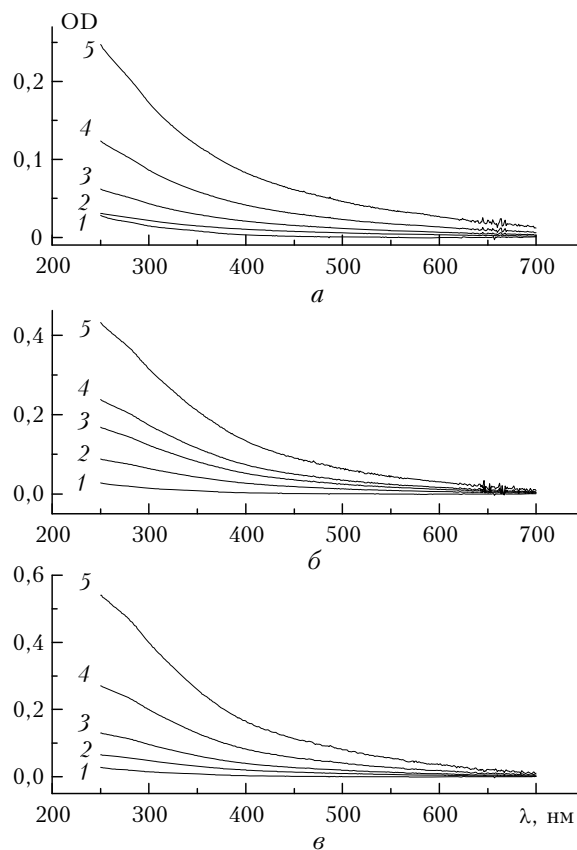


Рис. 1. Спектры поглощения для фракций А (а), Б (б) и С + Д (в). Спектр растворителя (NaOH, pH = 12,4; а – А = 0 (кривая 1); 1,42; 2,85; 5,7; 11,4 мг/л (2–5); б – Б = 0 (кривая 1); 2,4; 4,6; 6,5; 11,8 мг/л (2–5); в – С + Д = 0 (кривая 1); 1,25, 2,5, 5,2, 10,4 мг/л (2–5))

Общий вид спектров поглощения аналогичен опубликованным ранее [11, 17, 26] и представляет собой функцию, значения которой монотонно уменьшаются с ростом длины волны. Для одинаковых концентраций фракций ГК величины оптической

плотности были максимальны для фракции С+Д и минимальны для фракции А, что совпадает с данными [17, 26]. Для всех спектров поглощения ГК наблюдалась линейная зависимость оптической плотности от концентрации флуорофора, т.е. закон Бугера—Ламберта—Бера выполнялся.

На рис. 2 представлены экспериментально наблюдаемые некорректированные спектры флуоресценции изученных фракций ГК. Видно, что увеличение концентрации ГК приводит к росту интенсивности флуоресценции.

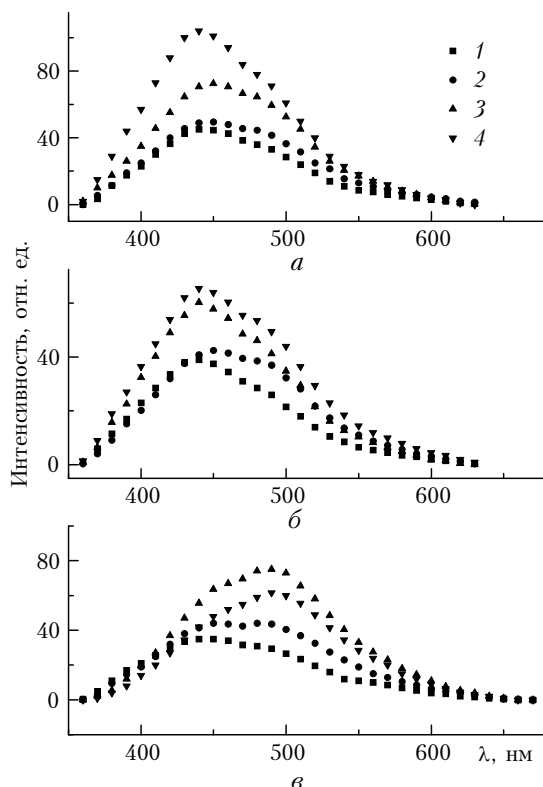


Рис. 2. Экспериментально наблюдаемые некорректированные спектры флуоресценции для фракции А (а), Б (б) и С + Д (в); а — А = 1,42; 2,85; 5,7; 11,4 мг/л (кривые 1–4); б — Б = 2,4; 4,6; 6,5; 11,8 мг/л (1–4); в — С + Д = 1,25; 2,5; 5,2; 10,4 мг/л (1–4)

Ранее в работах [17, 26] для некорректированных спектров флуоресценции было установлено, что при рН = 6,5 интенсивности флуоресценции образцов фракций А в 7–8, а фракции Б в 5–6 раз меньше, чем интенсивность флуоресценции образца фракции С + Д. К сожалению, в [17] имеются сведения об интенсивности при рН = 13 только для фракции С + Д, и поэтому даже грубое сравнение интенсивностей флуоресценции различных фракций для этого значения рН (наиболее близкого значению 12,4, используемому в настоящей статье) не представляется возможным. В условиях нашего эксперимента (импульсная лазерно-индуцированная флуоресценция) заметного различия между интенсивностями флуоресценции тяжелых и легких фракций ГК не выявлено. Возможными причинами различия в соотношении некорректированных ин-

тенсивностей флуоресценции фракций А, Б и С + Д между данными настоящей статьи и приведенными в [17, 26] могут быть следующие физико-химические и методические факторы.

1. Нелинейные эффекты во флуоресценции гуминовых веществ при лазерном возбуждении [27].

2. Различия в величине рН.

3. Наличие буфера [17, 26], который отсутствовал в наших экспериментах. Буфер, как показала наша предварительная работа, оказывает значительное влияние на константы тушения флуоресценции, что неудивительно, поскольку растворы ГК с буфером и без него представляют собой две различные субстанции.

4. Возможная химическая невоспроизводимость фракций ГК при их выделении. Это отчетливо заметно при сравнении спектров поглощения для одинаковых концентраций образцов фракции С + Д и нефракционированной ГК, приведенных в работах [17, 26]. В работе [17] интенсивность поглощения образца фракции С + Д больше, чем нефракционированной, а в работе [26], напротив, интенсивность поглощения образца нефракционированной ГК больше, чем фракции С + Д.

5. Различия в геометрии кюветного отделения, что неизбежно приводит к разным величинам искажающих эффектов внутреннего фильтра как при возбуждении, так и при испускании флуоресценции.

На рис. 3 показаны концентрационные зависимости ϕ и ϕ^{-1} для изученных фракций ГК.

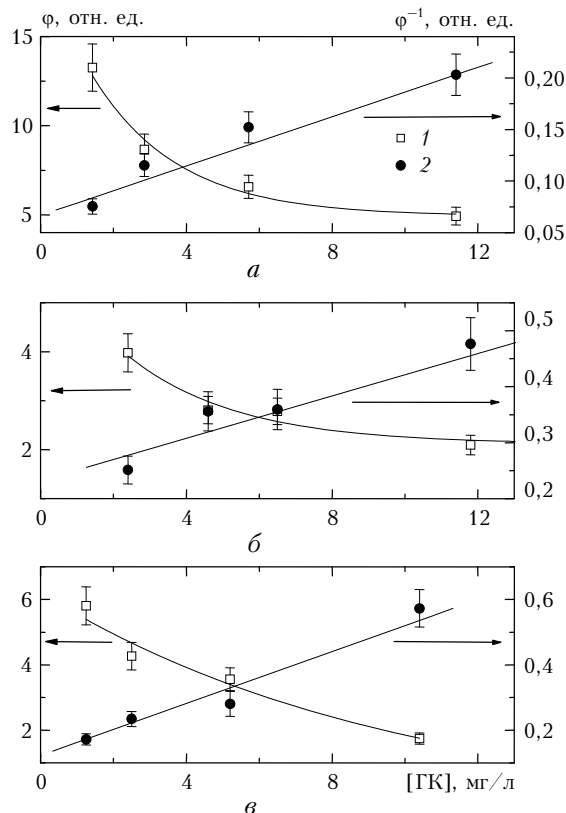


Рис. 3. Зависимости ϕ (1) и ϕ^{-1} (2) от концентрации для фракций А (а), Б (б) и С + Д (в)

Как видно из представленных данных, увеличение концентрации для скорректированных спектров приводит к уменьшению квантового выхода флуоресценции для всех фракций ГК. Уменьшение ϕ свидетельствует о наличии процессов самотушения.

Зависимость ϕ^{-1} от концентрации удовлетворительно описывается линейной зависимостью. Полученные из этих данных значения $K_{СТ}$ по (7) для фракций А, Б, С + Д приведены в таблице.

Константы самотушения $K_{СТ}$ и константы скорости тушения флуоресценции K_q фракций ГК

Фракция	M_1 , кД	$K_{СТ}$, л/мг	$K_{СТ} \cdot 10^{-6}$, л/моль	$K_q \cdot 10^{-15}$, л/(моль·с)	ΔM_1 , нм [28] («концентрационный сдвиг»)
А	200	$0,165 \pm 0,016$	$33 \pm 3,3$	$11 \pm 1,1$	$13 \pm 1,3$
Б	80	$0,115 \pm 0,01$	$9,2 \pm 0,9$	$3,1 \pm 0,3$	$17 \pm 1,7$
С + Д	17,5	$0,4 \pm 0,04$	$7 \pm 0,7$	$2,3 \pm 0,2$	$25 \pm 2,5$

* $\Delta M_1 = M_1^{50} - M_1^5$; M_1^{50} и M_1^5 — величины первых моментов (центров тяжести) спектров флуоресценции фракций ГК при концентрациях 50 и 5 мг/л соответственно ($M_1 = (\Sigma I_\lambda \cdot \lambda) / \Sigma I_\lambda$).

Для оценки K_q по соотношению (5) (таблица) значение τ_0 составляло 3 нс [6, 13]. Как было указано во введении, превышение константы скорости тушения K_q , равной 10^{10} л/(моль·с), свидетельствует о статической (концентрационной) природе тушения [15]. Таким образом, получение K_q более 10^{16} л/(моль·с) означает статическую природу механизма самотушения флуоресценции ГК [15]. Дополнительным аргументом в пользу наличия статического тушения может являться отсутствие зависимости времени жизни флуоресценции ГК от ее концентрации [13]. Статическое тушение предполагает образование комплексов в отсутствие света при тушении флуоресцирующих молекул посторонним тушителем [15]. В случае самотушения флуоресценции статическое тушение можно, по-видимому, связать с процессом самоассоциации молекул. Это предположение нам представляется наиболее естественным, и на такую возможность указывалось, в частности, ранее [13].

Эффективность процесса самоассоциации макромолекул ГК может зависеть от диполь-дипольного, ион-дипольного и дисперсионного взаимодействий (силы Ван-дер-Ваальса), энергии Н-связей между данной макромолекулой ГК с окружением и силы гидрофобных взаимодействий «вода-ГК». Какое из этих взаимодействий дает в образование самоассоциата наибольший вклад, априори определить затруднительно. Для этого нужно иметь исчерпывающую информацию о химическом строении флуороформных групп, об их конкретном расположении в структурном «скелете» макромолекулы ГК, а также изменении этих параметров при самоассоциации. Эти данные в настоящее время отсут-

ствуют. Тем не менее мы можем сделать осторожное предположение, что основной движущей силой при ассоциации ГК являются гидрофобные и дисперсионные взаимодействия. Это предположение основывается на данных работ [12, 29, 30], в которых было показано, что более тяжелые фракции содержат большую долю ароматических фрагментов [29] и алифатических групп [12, 30], чем легкие, т.е. являются более гидрофобными.

Таким образом, наблюдаемые нами большие константы для более тяжелых фракций можно связать с большим гидрофобным эффектом для этих фракций. Дополнительным косвенным аргументом в пользу того, что диполь-дипольные, ион-дипольные взаимодействия и образование Н-связей между данной макромолекулой ГК и окружением играют, по-видимому, меньшую роль, является то, что константы тушения (связывания) K_{Me} , K_{OM} в системах ГК + ионы металлов (или органические молекулы), в которых имеется полный набор указанных взаимодействий, имеют порядок величин 10^3 – 10^5 л/моль [4–7], т.е. значительно меньше. При этом следует принять во внимание, что ионы металлов могут образовывать с макромолекулами ГК координационные соединения [31], которые имеют большую энергию связи, чем перечисленные взаимодействия.

Ранее в [28] было установлено, что увеличение концентрации фракций ГК приводит к bathochromному сдвигу спектра флуоресценции этих фракций. При этом величина сдвига уменьшалась с увеличением средней массы фракции (см. таблицу). Как следует из приведенных данных, меньшему сдвигу соответствует большая константа самотушения, т.е. чем больший спектральный сдвиг претерпевает спектр флуорофора, тем меньше его эффективность самотушения. Величина сдвига спектра флуоресценции зависит от изменения межмолекулярного окружения [15], константа самотушения — от способности фракции ГК к самоассоциации, т.е., как мы и предположили, от степени гидрофобности фракции.

Сопоставляя представления об изменении межмолекулярного окружения при увеличении концентрации ГК и большей эффективности самоассоциации для более тяжелых макромолекул ГК, приходим к следующему, одному из возможных, заключению о механизме структурных перестроек в макромолекуле ГК в процессе самоассоциации. При увеличении концентрации макромолекул ГК для более легких фракций имеет место большее изменение микроокружения флуорофора. А поскольку сила гидрофобных взаимодействий для более легких фракций меньше, чем для тяжелых, то этот процесс для более легких фракций проходит «на фоне» меньшей эффективности самоассоциации ($K_{СТ}^{С+Д} < K_{СТ}^А$). «Структурно» это заключение можно представить таким образом: у более тяжелой фракции по сравнению с более легкой благодаря большому объему гидрофобной части сайты с флуорофорами расположены в менее доступных для тушения местах (например, в ядре макромолекулы ГК), поэтому при самоассоциации

их окружение претерпевает меньшее изменение, чем в более легких, у которых доступность сайтов для тушения выше.

Заклучение

Итак, нами изучена концентрационная зависимость относительного квантового выхода флуоресценции различающихся по массе фракций ГК и установлено, что при увеличении концентрации для всех фракций ГК до ~ 10 мг/л имеет место его уменьшение. Уменьшение квантового выхода флуоресценции фракций ГК было интерпретировано как проявление процесса самогашения флуоресценции. Для этого процесса определены константы самогашения флуоресценции для всех фракций ГК. Эти константы ($K_{СТ} > 10^7$ л/моль) заметно превышают константы тушения флуоресценции ГК ионами металлов и органическими молекулами, равные 10^3 – 10^5 л/моль. Установлено, что константы самогашения флуоресценции фракций ГК возрастают при увеличении молекулярной массы. Предложена модель механизма самоассоциации макромолекул ГК, основанная на преобладающем влиянии гидрофобных сил. Эта модель непротиворечиво объясняет совокупность данных, полученных нами по концентрационной зависимости квантового выхода флуоресценции фракций ГК и ранее полученных результатов по концентрационной зависимости первого момента спектров флуоресценции фракций ГК. Таким образом, наши результаты позволили поддержать гипотезу о наличии процесса самоассоциации, обусловленного гидрофобными взаимодействиями, и в рамках этой гипотезы сделать заключение о большей эффективности процессов самоассоциации для макромолекул ГК с большей массой.

Авторы искренне признательны О.А. Трубецкому и О.Е. Трубецкой за любезное предоставление образцов фракций гуминовых кислот и Н.М. Бажину за внимание к работе.

1. *Stevenson F.J.* Humus Chemistry. Genesis, Composition, Reactions. 2nd Ed. N.Y.: John Wiley and Sons, Inc., 1994. 386 p.
2. *Senesi N., Miano T.M., Provenzano M.R., Brunetti G.* Characterization, differentiation and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy // *Soil Sci.* 1991. V. 152, N 4. P. 259–271.
3. *Provenzano M.R., D'Orazio V., Jerzykiewicz M., Senesi N.* Fluorescence behaviour of Zn and Ni complexes of humic acids from different sources // *Chemosphere.* 2004. V. 55, N 6. P. 885–892.
4. *Hays M.D., Ryan D.K., Pennel S.* Multi-wavelength fluorescence-quenching model for determination of Cu^{2+} conditional stability constants and ligand concentrations of fulvic acid // *Appl. Spectrosc.* 2003. V. 57, N 4. P. 454–460.
5. *Monteil-Rivera F., Dumonceau G.* Fluorescence spectrometry for quantitative characterization of cobalt (II) complexation by Leonardite humic acid // *J. Anal. Bioanal. Chem.* 2002. V. 374, N 7. P. 1105–1109.
6. *Chen S., Inskip W.P., Williams S.A., Callis P.R.* Fluorescence lifetime measurements of fluoranthene, 1-naphthol and napropamide in the presence of dissolved humic acid // *Environ. Sci. Technol.* 1994. V. 28, N 9. P. 1582–1586.
7. *Gauthler T.D., Seltz W.R., Grant C.L.* Effect of structural and compositional variations of dissolved humic materials on pyrene K_{oc} values // *Environ. Sci. Technol.* 1987. V. 21, N 3. P. 243–248.
8. *Яценко Н.Ю., Перминова И.В., Петросян В.С., Филиппова Е.М., Фадеев В.В.* Взаимодействие гумусовых кислот различного происхождения с полиароматическими углеводородами: влияние pH и ионной силы раствора // *Вестн. МГУ. Сер. 2.* 1999. Т. 40, N 2. С. 188–193.
9. *Ryan D.K., Weber J.H.* Copper (II) complexing capacities of natural waters by fluorescence quenching // *Environ. Sci. Technol.* 1982. V. 16, N 12. P. 866–872.
10. *Piana M.J., Zahir K.O.* Investigation of metal ions binding of humic substances using fluorescence emission and synchronous-scan spectroscopy // *Environ. Sci. Health.* 2002. V. 35, N 1. P. 87–102.
11. *Лаврик Н.Л., Муллоев Н.У.* Изучение влияния ассоциации на структуру гуминовых кислот по тушению флуоресценции // *Ж. прикл. спектроскопии.* 2010. Т. 77, № 4. С. 627–632.
12. *Shin H.S., Monsallier J.M., Choppin G.R.* Spectroscopic and chemical characterizations of molecular size fractionated humic acid // *Talanta.* 1999. T. 50, N 5. P. 641–647.
13. *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.
14. *Соколова И.В., Чайковская О.Н., Бегунина А.А.* Спектрально-люминесцентные свойства гуминовых кислот // *Оптика атмосф. и океана.* 2004. Т. 17, № 2–3. С. 241–244.
15. *Паркер С.* Фотолюминесценция растворов / Пер. с англ. М.: Мир, 1972. 510 с.
16. *Trubetskoj O.A., Trubetskaya O.E., Afanas'eva G.V., Reznikova O.I., Saiz-Jimenez C.* Polyamide gel electrophoresis of soil humic acid fractionated by size exclusion chromatography and ultrafiltration // *J. Chromatography A.* 1997. V. 767, N 2. P. 285–288.
17. *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 Geochemistry.* 2002. V. 33, N 2. P. 213–220.
18. *Лаврик Н.Л., Августиневич И.А.* Простой наносекундный флуориметр на базе спектрометра ДФС-12 // *Ж. физ. хим.* 1986. Т. 54, № 12. С. 1216–1218.
19. *Khoe S., Memarian H.R.* Fluorescence self-quenching of substituted N, α -diphenylnitrones in various solvents // *J. Photochem. Photobiol. A.* 2006. V. 177, N 2. P. 276–285.
20. *MacDonald R.I.* Characteristics of self-quenching of the fluorescence of lipid-conjugated rhodamine in membranes // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265, N 23. P. 13533–13539.
21. *Phillips D., Gray D., Khalid-Al-Ani.* On the self-quenching of the first excited Singlet States of aromatic molecules in gas phase // *J. Chem. Soc. (A).* 1971. V. 3, N 6. P. 905–908.
22. *Sorokin N.I., Lavrik N.L., Skubnevskaya G.I., Bazhin N.M., Molin Yu.N.* Magnetic field effects on the fluorescence of formaldehyde- h_2 and formaldehyde- d_2 // *Noveau Journal de Chimie.* 1980. V. 4, N 2. P. 395–401.
23. *Weisshaar J.C., Baronaoski A.P., Cabello A., Moore C.B.* Collisionless decay, vibrational relaxation, and

- intermediate case quenching of S1 formaldehyde // J. Chem. Phys. 1978. V. 69, N 13. P. 4720–4731.
24. *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 15. P. 3061–3065.
 25. *Лаврик Н.Л., Ефимов Ю.Я., Муллоев Н.У.* Зависимость эффекта внутреннего фильтра от диаметра возбуждающего луча в спектрах испускания флуоресценции // Оптика атмосф. и океана. 2008. Т. 21, № 5. С. 381–385.
 26. *Ришар К., Гийо Ж., Азур Ж.-П., тер-Хале А., Трубецкая О.Е., Трубецкой О.А.* Роль фракционирования при изучении фотохимических свойств гумусовых веществ // Рос. хим. ж. 2008. Т. 11, № 1. С. 107–113.
 27. *Пацаева С.В., Фадеев В.В., Филиппова Е.М., Чубаров В.В., Южаков В.И.* Эффект насыщения флуоресценции растворенных натуральных, органических веществ // Вест. МГУ. Сер. 3. 1992. Т. 33, № 5. С. 38–42.
 28. *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, № 2. С. 379–390.
 29. *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.
 30. *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 // Science of the Total Environ. 1992. V. 118, N 1. P. 53–61.
 31. *Korshin G.V., Frenkel A.I., Stern E.A.* EXAVS study of the inner shell structure in copper (II) complexes with humic substances // Environ. Sci. Technol. 1998. V. 32, N 18. P. 2699–2705.

M.L. Lavrik, N.U. Mulloev. **Concentration dependence of the humic acid fluorescence intensity.**

The concentration dependence of the fluorescence intensity of humic acid fractions of HA with known molecular weight is studied. It was found that with increasing concentration of HA fluorescence intensity for all fractions decreased. This decrease is interpreted as a manifestation of self-quenching of fluorescence of HA. For all the fractions fluorescence self-quenching constant K_{SQ} are measured. The resulting self-quenching constant ($K_{SQ} > 10^7$ l/mol) is considerably higher than the constants of fluorescence quenching by metal ions HA macromolecules and organic molecules (10^3 – 10^5 l/mole). It is found that K_{SQ} increases in the values with increasing molecular weight fractions of HA. The interpretation of this fact is given in the framework of the self-assembly of HA macromolecules, based on ideas about the crucial role of hydrophobic forces.