

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ УГЛЕРОДА ПО ФУНКЦИОНАЛЬНЫМ ГРУППАМ В ГУМИНОВЫХ КИСЛОТАХ ПРИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫХ ЩЕЛОЧНЫХ ЭКСТРАКЦИЯХ ИЗ СЕРОЙ ЛЕСНОЙ ПОЧВЫ

© 2009 г. В. А. Холодов¹, А. И. Константинов², И. В. Перминова²

¹ Почвенный институт им. В.В. Докучаева РАСХН, 119017, Москва, Пыжевский пер., 7

² Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы

e-mail: vkholod@mail.ru

Поступила в редакцию 26.05.2008 г.

Проведено выделение препаратов гуминовых кислот (ГК) из серой лесной почвы с помощью последовательных щелочных экстракций. При навеске 500 г из первой щелочной вытяжки было получено 2.24 г препарата ГК из второй и третьей – 0.23 и 0.20 г соответственно. Структура препаратов была определена методом ¹³С-ЯМР спектроскопии. В препаратах ГК с каждой экстракцией возрастала доля алифатических фрагментов и снижалось содержание ароматических структур. Сделан вывод о достаточности однократной экстракции при выделении ГК для получения их представительного образца.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для выделения из почв препаратов гуминовых кислот (ГК) используется два основных метода: принятый в Российской школе почвоведения [7] и рекомендованный Международным гуминовым обществом – International Humic Substances Society (IHSS) [15]. В основе обоих методов лежит общий принцип: щелочная экстракция гуминовых веществ из почв. Однако в методическом плане имеется ряд различий.

Одно из них заключается в количестве экстракций, используемых для выделения препарата: согласно принятому в России методу почву экстрагируют щелочью не менее трех раз, экстракты объединяют для получения интегральной пробы из которой затем и выделяют препарат ГК. В то же время методика, рекомендованная IHSS, предусматривает только однократную экстракцию почвы щелочью и, соответственно, выделение ГК осуществляют из первичного щелочного экстракта.

К другим различиям относятся: а) проведение щелочной экстракции в атмосфере азота, предусмотренное методикой IHSS [15]; б) коагуляция минеральных взвесей: согласно принятому в России методу проводится в щелочном экстракте хлоридом натрия [7], а в методе, рекомендованном IHSS, эта операция осуществляется с ГК, уже отделенными от фульвокислот, и коагулянтом служит KCl [15]; в) в рекомендациях IHSS дополнительно предусмотрена обработка осадка ГК смесью 0.1 М HCl/0.3 М HF для окончательного удаления тонких минеральных взвесей [15].

При этом для корректной интеркалибровки указанных методов необходима оценка влияния

каждого из указанных различий на состав получаемых препаратов ГК.

Прежде всего, нам представлялось необходимым выяснить влияние количества экстракций на строение и свойства получаемых препаратов. Количество щелочных экстракций определяет, во-первых, трудозатратность и длительность процедуры выделения ГК и, во-вторых, влияет на степень изменения органического вещества почв в процессе выделения.

Как уже упоминалось, в методе, принятом в России, в отличие от IHSS рекомендуют проводить не менее трех экстракций, считая, что “гумусовые вещества в первых порциях экстракта могут несколько отличаться по своим свойствам и составу от веществ, экстрагируемых позднее” [7]. В результате при использовании российского метода, с одной стороны, должны получаться препараты ГК более представительные и в большем количестве, но, с другой стороны, резко возрастает трудоемкость метода. Кроме того, необходимое в случае российского метода длительное – не менее трех суток – нахождение почвенной суспензии в щелочи и сопутствующие этому процессы глубокого гидролиза могут привести к извлечению препарата, существенно отличного по строению и свойствам от гуминовых веществ, присутствующих в почве.

Таким образом, одним из необходимых условий для сопоставления препаратов ГК, выделенных по принятому в России и рекомендованному IHSS протоколам, является сопоставление строения и свойств препаратов, извлекаемых однократной и многократной щелочными экстракциями из почв.

Таблица 1. Некоторые физико-химические характеристики серой лесной почвы

Показатель	$\bar{x} \pm t_{\alpha} s_{\bar{x}}^*$
pH водный	6.7 ± 0.1
C орг, %	1.59 ± 0.1
C гк/С фк	1.6 ± 0.1
Обменные основания, ммоль экв/100 г	
Ca ²⁺	10.7 ± 0.2
Mg ²⁺	8.6 ± 0.2
K ⁺	0.50 ± 0.05
Na ⁺	—
Содержание частиц, %	
<0.01 мм	35.8 ± 0.2
<0.001 мм	15.5 ± 0.2

* $\pm t_{\alpha} s_{\bar{x}}$ – доверительный интервал, рассчитанный при $\alpha = 0.05$, $n = 3$.

Ранее на примере типичного чернозема нами было показано, что для получения представительного препарата ГК чернозема достаточно одной экстракции [10]. В предлагаемой работе для серых лесных почв рассматривается подобный вопрос: можно ли считать представительным образцом препарат ГК, полученный из одной экстракции, или для получения представительного образца необходимо многократное извлечение ГК щелочью.

Спектроскопия ЯМР на ядрах ¹³C в жидкой фазе является одним из самых информативных методов структурного исследования гуминовых веществ в целом и ГК в частности. Она позволяет описать распределение углерода в молекулах ГК по структурным фрагментам, отличающимся по химическим сдвигам составляющих их ядер углерода. Таким образом, с помощью ¹³C-ЯМР спектроскопии в жидкой фазе можно количественно оценить содержание структурных единиц в углеродном скелете ГК [5, 12, 14], что позволяет описать изменения, происходящие в структуре ГК с каждой последовательной вытяжкой.

Целью работы было изучение изменений, происходящих в структуре ГК при их последовательном извлечении из декальцированной серой лесной почвы.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Для выделения препаратов ГК был использован гумусоаккумулятивный горизонт целинной серой лесной почвы – по классификации 1977 г. [3] или серой – по классификации 2004 г. [4]. Площадка пробоотбора располагалась недалеко от г. Озеры Московской обл. на территории опорного пункта Почвенного института им. В.В. Докучаева.

Почвенный образец был составлен из пяти индивидуальных образцов. Индивидуальные пробы (каждая проба составляла около 2 кг) отбирали с почвенного участка площадью примерно 5 м² из верхнего гумусоаккумулятивного горизонта на глубине 5–15 см.

Из полученного образца (около 10 кг) методом квартования был создан средний образец (1.5 кг). Из среднего образца были отобраны крупные корни, он был перетерт и пропущен через сито с диаметром ячеек 1 мм.

В приготовленной таким образом почве были определены основные физико-химические показатели: pH, содержание обменных оснований [1], содержание физической глины и ила пиррофосфатным методом [2], содержание органического углерода и показатель C гк/С фк [7]. Полученные данные приведены в табл. 1.

Полученные показатели соответствовали приводимым в литературе диапазонам значений, характерным для серых лесных почв [8, 9]. Таким образом, почва является характерным представителем типа серые лесные почвы, что полностью отвечает цели исследования.

Из подготовленного и охарактеризованного образца почвы были получены препараты ГК. Препараты получали по схеме, объединяющей как принятый в России метод выделения ГК [7], так и рекомендованный IHSS [15]. Согласно принятому в России методу, было проведено несколько щелочных экстракций гуминовых веществ, однако полученные вытяжки не объединялись, а из каждой отдельно были выделены ГК. Структура полученных препаратов была проанализирована методом спектроскопии ЯМР на ядрах ¹³C.

Выделение препаратов ГК. Навеску почвы (500 г) декальцировали путем добавления 1 М соляной кислоты до установления pH суспензии в диапазоне 1–2, после чего добавляли 0.1 М HCl до конечного массового соотношения почва : раствор 1 : 10. Полученную суспензию периодически перемешивали в течение 6 ч, сутки отстаивали, и отделяли супернатант от твердой фазы почвы декантацией. Далее декальцированную почву нейтрализовали путем добавления 1 М NaOH до установления pH 7, а затем добавляли 0.1 М NaOH до конечного соотношения почва : раствор 1 : 10 (по массе). Суспензию периодически перемешивали в течение 6 ч, затем оставляли на ночь. Через 24 ч после начала экстракции щелочную вытяжку (вытяжка 1) сливали через сифон и сохраняли. Затем к почве вновь добавляли 0.1 М NaOH в соотношении 1 : 10, периодически перемешивали в течение 6 ч, оставляли на ночь и через 24 ч сливали щелочной экстракт (вытяжка 2), который сохраняли. Эту процедуру повторяли еще раз для получения вытяжки 3. Каждую из полученных вытяжек использовали для выделения препаратов ГК посредством отделения ФК и

очистки ГК от неорганических примесей. ГК отделяли от ФК осаждением 6 М HCl путем подкисления раствора до pH 1–2 и центрифугирования полученного осадка. Затем ГК растворяли в минимальном объеме 0.1 М KOH и добавляли KCl до конечной концентрации K^+ 0.3 М для коагуляции тонкодисперсных минеральных частиц. Скоагулированные твердые примеси отделяли центрифугированием. Далее ГК переосаждали и обрабатывали раствором 0.1 М HCl/0.3 М HF для удаления кремний-содержащих примесей согласно методике рекомендованной IHSS [15]. Обработанную суспензию ГК диализовали, высушивали на ротационном вакуумном испарителе при температуре 65°C и выдерживали в эксикаторе над P_2O_5 не менее 21 дня. В результате из вытяжек 1, 2 и 3 были получены препараты гуминовых кислот серой лесной почвы названные ГК-СЛ 1, ГК-СЛ 2 и ГК-СЛ 3 соответственно. Оценку выхода ГК в ходе каждой экстракции проводили путем взвешивания полученных препаратов.

Структурная характеристика полученных препаратов ГК. Структуру препаратов определяли методом спектроскопии ЯМР ^{13}C в жидкой фазе [5]. Образцы ГК для ЯМР-исследования готовили растворением навески (80 мг) в 0.6 мл 0.3 М NaOD/D₂O. Смесь помещали в ультразвуковую баню на 30 мин, далее центрифугировали 5 мин при 18 g, раствор отделяли от осадка и переносили в ампулу диаметром 5 мм для ЯМР-спектроскопии. Спектры ЯМР ^{13}C регистрировали на спектрометре "Avance 400" компании "Bruker" (Германия) с рабочей частотой 100 МГц для ядер ^{13}C , используя импульсную последовательность CPMG с первым импульсом последовательности 90°, временем регистрации сигнала спада свободной индукции 0.2 с и временем релаксационной задержки 7.8 с. Широкополосная развязка от протонов была включена во время регистрации сигнала и выключена во время релаксационной задержки для исключения ядерного эффекта Оверхаузера [11]. Продолжительность одного ЯМР эксперимента составляла порядка 12 ч.

Зарегистрированные сигналы спада свободной индукции для улучшения соотношения "сигнал–шум" подвергали умножению на спадающую экспоненту с параметром уширения спектральной линии (Ib) 100 Гц и последующему преобразованию Фурье для перевода сигнала с разверткой по времени в спектр с разверткой по частоте, измеряемой в миллионных долях (м.д.) от несущей частоты спектрометра (100 МГц для ядер ^{13}C). Указанную обработку и преобразование спектров осуществляли при помощи программного обеспечения "MestReC" одноименной компании. Интегрирование спектров по интервалам осуществляли, используя программное обеспечение "GelTreat" (автор и правообладатель – А.В. Кудрявцев).

Распределение атомов углерода по структурным фрагментам определяли интегрированием соответствующих спектральных областей. В спектре делали следующие отнесения согласно [5] (м.д.): 220–187 – углерод кетонных и хинонных групп ($C_{C=O}$); 187–165 – углерод карбоксильных, сложноэфирных и амидных групп ($C_{COO-H,R}$); 165–145 – углерод O, N-замещенных ароматических фрагментов ($C_{Ar-O,N}$), 145–108 – углерод незамещенных и C-замещенных ароматических фрагментов ($C_{Ar-H,R}$); 108–48 – углерод O, N-замещенных алифатических фрагментов ($C_{Alk-O,N}$); 48–5 – углерод алифатических фрагментов, не связанных с гетероатомами ($C_{Alk-H,R}$).

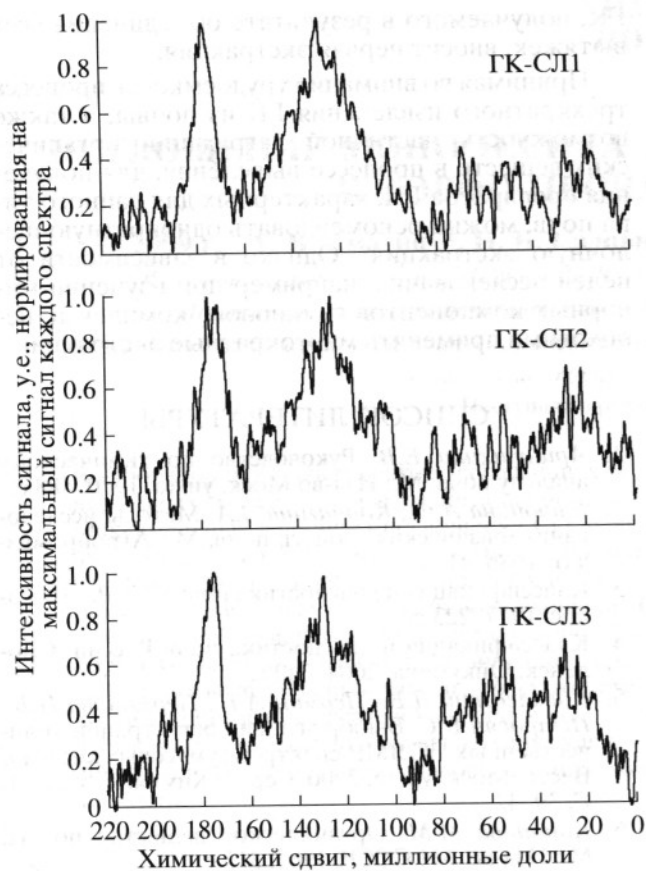
Полученные данные по структуре ГК использовали для сравнения выделенных препаратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из 500 г серой лесной почвы было получено: из первой щелочной экстракции 2.24 г препарата (ГК-СЛ 1), из второй – 0.23 г (ГК-СЛ 2), из третьей 0.20 г (ГК-СЛ 3) препаратов. Таким образом, препаративный выход ГК в результате первой экстракции примерно в 10 раз превышал количества препарата, полученного в результате второй или третьей экстракций. При этом препаративный выход из второй и третьей вытяжки был практически одинаковым. Таким образом, показано, что из декальцированной серой лесной почвы большая часть ГК экстрагируется 0.1 М NaOH уже при первой вытяжке. Ранее в подобном же эксперименте с типичным черноземом ежегоднокопсистой степи Курской обл., нами было показано, что препаративный выход ГК уменьшается в 3–4 раза с каждой последующей экстракцией [10]. Более полный выход ГК в первой вытяжке из серой лесной почвы можно объяснить тем, что в сравнении с черноземом, эта почва содержит меньше трудноэкстрагируемых ГК, например, связанных с кальцием или глинистыми минералами [6].

Для оценки структурных изменений, происходящих с ГК от экстракции к экстракции, методом ^{13}C -ЯМР спектроскопии было определено распределение углерода по структурным группам ГК. Полученные спектры приведены на рисунке.

В целом, во всех спектрах присутствуют характерные для гуминовых веществ пики: в области ароматического углерода (165–108 м.д.), карбоксильных групп (187–165 м.д.), замещенного (105–48 м.д.) и незамещенного алифатического углерода (48–5 м.д.). При этом интенсивность сигнала в области ароматического углерода больше у ГК-СЛ 1, в сравнении с ГК, выделенными из последующих вытяжек. В то же время, в спектрах препаратов ГК-СЛ 2 и ГК-СЛ 3, по сравнению с ГК-СЛ 1, регистрируются более интенсивные пики в областях 108–48 м.д., где располагаются сигналы углерода, замещенного гетероатомами (O, N), в частности – углеводных и аминных фрагментов, и 48–5 м.д.,



13С-ЯМР спектры ГК, полученных из последовательных щелочных экстракций.

где регистрируются сигналы алифатического углерода.

В табл. 2 приведены данные по количественной оценке распределения спектральной интенсивности в спектрах ¹³С ЯМР для препаратов ГК, выделенных из трех последовательных щелочных вытяжек.

Как показывают приведенные данные, по своей структуре препарат, выделенный из первой

вытяжки, отличается от препаратов второй и третьей вытяжек, которые, в свою очередь, очень близки друг к другу. Как можно видеть, у ГК-СЛ 2 и ГК-СЛ 3 значительно различается только содержание алифатического углерода, замещенного гетероатомами, причем отличие для этого показателя довольно незначительное (по абсолютной величине – 3%). Разница в количестве гетероатомзамещенного алифатического углерода в ГК-СЛ 2 и ГК-СЛ 3 может быть связана с гидролизом соединений негуминовой природы – целлюлозных и белковых остатков, присутствующих в почве.

Самое существенное отличие в структуре ГК-СЛ 1 от двух других препаратов заключается в содержании ароматического, алифатического замещенного и алифатического незамещенного углерода. Так по суммарному содержанию ароматического углерода ГК первой вытяжки (43%) на 7% превосходят ГК-СЛ 2 и ГК-СЛ 3 (36%). В то же время, для ГК-СЛ 1 наблюдается самое низкое относительное содержание алифатических фрагментов (14%) по сравнению с двумя другими препаратами (20–21%). Также наблюдается закономерное увеличение содержания алифатического углерода, связанного с гетероатомами, в ряду полученных препаратов от ГК-СЛ 1 до ГК-СЛ 3 с 18 до 23%. Кроме того, следует отметить тенденцию уменьшения содержания углерода карбоксильных групп в ГК от экстракции к экстракции.

Выявленные для серой лесной почвы закономерности – возрастание содержания алифатических фрагментов и уменьшение вклада ароматических структур – хорошо согласуются с литературными данными о структурно-групповом составе ГК, выделенных из последовательных щелочных экстрактов торфяной маршевой почвы [13]. Также они соответствуют нашим данным, полученным ранее для типичного чернозема [10].

В табл. 2 также приведены средневесовые значения распределения углерода по структурным фрагментам. Эти значения рассчитаны для ГК, которые были бы получены при объединении всех трех вытяжек в одну с учетом вклада по массе каждого полученного препарата ГК. Такой со-

Таблица 2. Распределение углерода по структурным фрагментам в препаратах ГК, полученных путем последовательных щелочных экстракций из серой лесной почвы (% от С общ)

Препарат	Спектральные области, м.д.					
	5–48 (C _{Alk-H,R})	48–108 (C _{Alk-O,N})	108–145 (C _{Ar-H,R})	145–165 (C _{Ar-O,N})	165–187 (C _{COO-H,R})	187–220 (C _{C=O})
ГК-СЛ 1	14	18	34	10	17	7
ГК-СЛ 2	21	20	28	8	16	7
ГК-СЛ 3	20	23	27	8	15	7
Ср. вес*	15	18	33	10	17	7
±t _α s _x **	3	1	2	2	1	2

* Средневзвешенное значение по всем препаратам.

** ±t_αs_x – доверительный интервал, рассчитанный при α = 0.05, n = 3.

став был бы характерен для интегрального препарата ГК, выделяемого с использованием российского протокола [7], тогда как состав препарата, выделенного по методике, рекомендованной IHSS [15], соответствует препарату ГК-СЛ 1. Как можно видеть, несмотря на довольно серьезные отличия препаратов разных вытяжек, рассчитанные средневесовые значения весьма близки к данным, полученным для ГК первой вытяжки. Таким образом, в случае получения препарата ГК серой лесной почвы из последовательной трехкратной объединенной щелочной вытяжки, их структурно-групповой состав был бы очень близок к ГК, извлекаемым первой экстракцией. Это делает возможным сопоставление препаратов ГК серой лесной почвы, выделенных методом, принятым в России [7] с препаратами, полученными в соответствии с рекомендациями IHSS [15].

Полученные данные позволяют с большой долей вероятности предположить, что для получения препарата ГК, несущего черты, наиболее характерные данному типу почв, достаточно однократной экстракции, что согласуется с методикой, рекомендованной IHSS. В то же время для получения глубокого представления о специфических минорных компонентах, входящих в состав гуминового комплекса данной почвы, рекомендуется использовать многократную экстракцию согласно протоколу, принятому в России. При этом можно рекомендовать отдельное изучение каждой последовательной вытяжки для получения наиболее полной картины.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показывают, что в случае серой лесной почвы при многократном экстрагировании щелочью, структура получаемых препаратов ГК закономерно изменяется от экстракции к экстракции.

ГК, выделенные из первой экстракции, существенно отличаются от ГК второй и третьей экстракций, которые, в свою очередь, весьма близки друг к другу по большинству структурных показателей. Возможно, многократные щелочные экстракции способствуют гидролизу соединений негуминовой природы – целлюлозных и белковых остатков, присутствующих в почве – и их совместному извлечению с ГК.

В целом в препаратах с каждой экстракцией отмечается увеличение доли алифатических фрагментов и уменьшение содержания ароматических групп. Также замечена тенденция увеличения карбогидратов с каждой последующей вытяжкой.

Показано, что с точки зрения препаративного выделения, большинство ГК серой лесной почвы извлекается в первой экстракции: выход препарата ГК из первой вытяжки примерно в 10 раз больше выхода из последующих. Поэтому определяющий вклад в структуру интегрального образца

ГК, получаемого в результате объединения всех вытяжек, вносит первая экстракция.

Принимая во внимание трудоемкость процесса трехкратного извлечения ГК из почвы, а также возможность частичной деградации органических веществ в процессе выделения, для получения препаратов ГК, характерных для данного типа почв, можно рекомендовать однократную щелочную экстракцию. Однако в зависимости от целей исследования, например при изучении минорных компонентов гуминового комплекса, необходимо применять многократные экстракции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аринушкина Е.В. Руководство по химическому анализу почв. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1970. 488 с.
2. Вадюнина А.Ф., Корчагина З.А. Методы исследования физических свойств почв. М.: Агропромиздат, 1986. 416 с.
3. Классификация и диагностика почв СССР. М.: Колос, 1977. 223 с.
4. Классификация и диагностика почв России. Смоленск: Ойкумена, 2004. 342 с.
5. Ковалевский Д.В., Пермин А.Б., Перминова И.В., Петросян В.С. Выбор условий регистрации количественных ¹³C ЯМР-спектров гумусовых кислот // Вестн. Моск. ун-та. 2000. Сер. 2. Химия. Т. 41. № 1. С. 39–42.
6. Кононова М.М. Органическое вещество почвы. М.: Изд-во АН СССР, 1963. 315 с.
7. Орлов Д.С., Гришина Л.А. Практикум по химии гумуса. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1981. 272 с.
8. Почвоведение. Типы почв, их география и использование / Под ред. В.А. Ковды, Б.Г. Розанова. М.: Высшая школа, 1988. Ч. 2. 368 с.
9. Почвы Московской области и их использование / Под ред. Л.Л. Шишова, Н.В. Войтовича. М.: Почв. ин-им. В.В. Докучаева, 2002. Т. 1. 500 с.
10. Холодов В.А., Константинов А.И., Беляева Е.Ю., Куликова Н.А., Кирюшин А.В., Перминова И.В. Сравнительная характеристика строения гуминовых кислот, извлекаемых в ходе последовательной щелочной экстракции из типичного чернозема // Почвоведение. 2009. № 10. С. 1177–1183.
11. Claridge T.D.W. High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry. Elsevier Science Ltd., Amsterdam – Lausanne – New York – Oxford – Shannon – Singapore – Tokyo, 1999. 382 p.
12. Hertkorn N., Permin A.B., Perminova I.V., Kovalenskii D.V., Yudov M.V., Ketrup A. Comparative Analysis of Partial Structures of a Peat Humic and Fulvic Acid using One and Two Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy // J. Environ. Qual. 2002. V. 31. P. 375–387.
13. Li L., Huang W., Peng P., Sheng G., Fu J. Chemical and molecular heterogeneity of humic acids repetitively extracted from a peat // Soil Science Society American J. 2003. V. 67. P. 740–746.
14. Preston C.M. Applications of NMR to soil organic matter analysis: History and prospects // Soil Sci. 1996. V. 161. P. 144–166.
15. Swift R.S. Organic matter characterization (chap 35) // Methods of soil analysis. Madison, WI: Soil Science Society of America, 1996. P. 3. P. 1018–1020.