

УДК 631.417.2

## ПРЕПАРАТИВНЫЙ ВЫХОД И СВОЙСТВА ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ПРИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫХ ЩЕЛОЧНЫХ ЭКСТРАКЦИЯХ\*

© 2015 г. В. А. Холодов<sup>1,2</sup>, Н. В. Ярославцева<sup>1</sup>, А. И. Константинов<sup>3</sup>, И. В. Перминова<sup>3</sup><sup>1</sup>Почвенный институт им. В.В. Докучаева, 119017, Москва, Пыжевский пер., 7, стр. 2  
e-mail: vkholod@mail.ru<sup>2</sup>Факультет почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы<sup>3</sup>Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы

Поступила в редакцию 17.11.2014 г.

Исследованы препаративный выход, состав и структура гуминовых кислот, получаемых последовательными щелочными экстракциями из двух почв: дерново-подзолистой под лесом и типичного чернозема в варианте многолетнего опыта “бессменный чистый пар с 1964 г”. Препаративный выход гуминовых кислот из первой экстракции составил 0.40 и 0.94% для дерново-подзолистой почвы и чернозема соответственно. Препаративный выход второй экстракции по сравнению с первой был меньше в несколько раз, а третьей — на порядок. На основании анализа полученных препаратов методами элементного анализа, гель-проникающей хроматографии и спектроскопии ядерно-магнитного резонанса на ядрах <sup>13</sup>C показана незначительность изменений элементного, молекулярно-массового и структурно-группового состава гуминовых кислот от экстракции к экстракции. Высказано предположение, что это связано с особенностями почв: в случае дерново-подзолистой — с климатическими факторами, характерными для формирования этого подтипа, а в случае типичного чернозема — с видом использования почвы в многолетнем эксперименте. Сделан вывод о достаточности однократной экстракции при выделении гуминовых кислот для получения представительного образца.

**Ключевые слова:** гуминовые препараты, выделение гуминовых веществ, органическое вещество почв, многолетние полевые опыты, дерново-подзолистые почвы, черноземы, Chernozems, Retisols.

DOI: 10.7868/S0032180X15100056

### ВВЕДЕНИЕ

Для получения препаратов гуминовых кислот в настоящее время используют два основных метода: принятый в российской школе почвоведения [8] и рекомендованный Международным гуминовым обществом — International Humic Substances Society (IHSS) [24]. В основе обоих методов лежит общий принцип: щелочная экстракция гуминовых веществ из почв, разделение гуминовых кислот (ГК) и фульвокислот (ФК), очистка и сушка. Однако в методиках выделения имеется ряд различий:

— однократная щелочная экстракция гуминовых веществ при выделении препаратов рекомендована IHSS [24], российская методика предполагает многократную экстракцию [8];

— проведение щелочной экстракции в атмосфере азота предусмотрено методикой IHSS [24], в российском варианте ее проводят на воздухе [7];

— коагуляция минеральных взвесей: в методе, рекомендованном IHSS, эта операция осуществляется с ГК, уже отделенными от ФК, и коагулянтom служит KCl [24], согласно принятому в России методу, операцию проводят хлоридом натрия в щелочном экстракте гуминовых веществ, еще не разделенных на ГК и ФК [8];

— в методе IHSS на завершающем этапе проводят обработку осадка ГК смесью 0.1 М HCl/0.3 М HF для окончательного удаления тонких минеральных взвесей [24], в российском методе эта операция не предусмотрена.

Наиболее значимым отличием, которое потенциально может оказывать влияние на качество получаемых препаратов, и, безусловно, определять трудоемкость метода, является количество щелочных экстракций, используемых для выделения препарата. Как уже упоминалось, в методе IHSS рекомендована однократная щелочная экстракция, из которой и получают препарат ГК [24]. Согласно принятому в России методу, гуминовые вещества экстрагируют щелочью из почвы не менее трех раз, экстракты объединяют для получения интегральной пробы, из которой затем выде-

\* Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект РНФ № 14-26-00079.

ляют препарат ГК. Многократность экстракций мотивируют тем, что: "...гумусовые вещества в первых порциях экстракта могут несколько отличаться по своим свойствам и составу от веществ, экстрагируемых позднее..." [8, с. 122].

Количество щелочных экстракций — ключевой момент в различии методик. Во-первых, если при выделении препарата из 500 г почвы однократная экстракция составляет 5 л, то при трехкратном экстрагировании гуминовых веществ рабочий объем составит 15 л, что существенно увеличивает трудозатраты. Во-вторых, однократная экстракция занимает не более суток, а при трехкратной экстракции почва находится в щелочном растворе около 3 суток, что может вызвать изменения в строении гуминовых веществ вызванных щелочной или микробной деструкцией. В-третьих, трехкратное увеличение объема неизбежно приведет к уменьшению процентного выхода препарата из-за резко возросшей трудоемкости. Однако предположительно при использовании российского метода должны получаться препараты ГК более представительные и в большем количестве.

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

Ранее на основе изучения элементного состава, молекулярно-массового распределения и распределения углерода по функциональным группам для ГК трех последовательных щелочных экстракций из типичного чернозема ежегодно косимой степи (залежь более ста лет) и нативной серой лесной почвы [3] выявили ряд закономерностей [11, 13]. Показано, что препарат, извлекаемый первой экстракцией, существенно отличается от двух последующих, которые, в свою очередь, весьма близки друг к другу. В ГК типичного чернозема первой экстракции было больше углерода и меньше водорода и азота по сравнению с ГК последующих вытяжек, количество кислорода при этом практически не менялось. Соответственно, в последующих экстракциях в сравнении с первой увеличивалось атомное отношение Н/С и снижалось С/Н. Средневесовое значение молекулярной массы было меньше в ГК первой экстракции и демонстрировало близкие значения для двух последующих извлечений. В углеродном скелете ГК первой экстракции, согласно данным <sup>13</sup>С-ЯМР-спектроскопии, было меньше алифатических и больше ароматических и карбоксильных фрагментов [11]. Аналогичные закономерности по распределению углерода по функциональным группам отмечены и для ГК, полученных из по-

следующих щелочных экстракций из серой лесной почвы [13]. Следует отметить, что подобный подход (использование гуминовых веществ из последовательных отдельных экстракций) был использован ранее в серии работ проведенных в СПбГУ [14–16], в ходе которых для выбранных объектов показано, что только первая и вторая экстракция несут значимую информацию о строении гуминовых веществ.

Показано, что ГК типичного чернозема ежегодно косимой степи и серой лесной нативной почвы, получаемые в первой экстракции отличаются от выделяемых из последующих вытяжек. Однако различия их не настолько большие, чтобы выходить за рамки значений, характерных для ГК данных почв.

Однако все отмеченные различия препаратов последовательных щелочных экстракций нивелируются в интегральном препарате. Это связано с тем, что препаративный выход ГК из первой экстракции в несколько раз превышает выход всех ГК из последующих. Так, массовый выход препарата ГК из типичного чернозема с каждой последующей экстракцией уменьшался в 3–4 раза [11], а в случае серой лесной почвы из первой экстракции было получено почти в 10 раз больше препарата, чем из второй [13]. Таким образом, для нативных (многолетне залежных) почв (типичного чернозема и серой лесной) показано, что интегральный препарат, полученный смешением всех щелочных вытяжек, наследует свойства именно первой экстракции ГК в силу их гораздо большего выхода.

Как видно из изложенного, выделение препаратов ГК черноземов и серых лесных почв многократными экстракциями с объединением вытяжек не дает заметного прироста в выходе препарата и существенно не изменяет его состав в сравнении с препаратом, полученным из одной вытяжки. При этом в несколько раз увеличивается рабочий объем для выделения, как следствие этого, возрастают трудоемкость, из-за этого увеличивается вероятность возможных потерь, что вызывает уменьшение относительного выхода препарата и эффективность всего процесса выделения в целом. В связи с этим при препаративном выделении ГК из этих почв лучше ограничиваться одной экстракцией.

Для более широкого использования высказанной рекомендации и придания ей более универсального характера проведены исследования строения и структуры ГК, получаемых последовательными щелочными вытяжками из дерново-подзолистой почвы под лесом и типичного чернозема, используемого в опытном варианте бессменный чистый пар с 1964 г. Первая почва выбрана как представитель зонального ряда дерново-подзолистые почвы — серые лесные — черноземы для за-

вершения серии работ по данной проблеме. Органическое вещество второй почвы — типичного чернозема в варианте использования бесценный чистый пар — характеризуется максимально возможной для этого типа почв степенью гумусированности на фоне минимального содержания органического вещества, вследствие особенностей опыта (с 1964 г. в почву не поступают растительные остатки [5]). Использование этой почвы поможет оценить выход ГК при последовательных щелочных экстракциях при крайней степени выпаханности. Также на выбор почв оказало влияние близкое в них содержание органического вещества.

Цель работы — изучение препаративного выхода, строения и структуры ГК последовательных щелочных экстракций из дерново-подзолистой почвы под лесом и типичного чернозема в опытном варианте использования “бесценный чистый пар с 1964 г.”.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали дерново-подзолистую почву, отобранную на территории Московской обл. под лесным участком (ельник) на территории УОПЭЦ “Чашниково” МГУ им. М.В. Ломоносова.

Образцы типичного чернозема отбирали на длительном опыте Почвенного института им. В.В. Докучаева на территории Курского НИИ агропромышленного производства в варианте бесценный чистый пар, опыт заложен в 1964 г.

Смешанный почвенный образец составляли из пяти индивидуальных проб. Индивидуальные пробы (каждая проба около 2 кг) отбирали с участка радиусом примерно 5 м из гумусового (A1) или пахотного (Апах) горизонта на глубине 5–15 см. Из полученного образца (около 10 кг) квартованием создавали средний образец (1.5 кг).

В образцах определяли содержание органического углерода (С орг) сжиганием в бихромате калия по Тюрину со спектрофотометрическим окончанием [8] и величины рН в отношении почва : вода 1 : 2.5 [1]. Для дерново-подзолистой почвы содержание С орг составило 2.77%, а величина рН 4.7, для типичного чернозема под бесценным чистым паром С орг 2.79%, рН 6.5. Полученные значения соответствует приводимым в литературе интервалам этих показателей [10].

Из подготовленных и охарактеризованных образцов почвы были выделены препараты ГК. Препараты получали по схеме, объединяющей как принятый в России метод выделения ГК [8], так и рекомендованный IHSS [24]. Согласно принятому в России методу, провели несколько щелочных экстракций гуминовых веществ, однако полученные вытяжки не объединяли, а из каждой отдельно выделяли ГК. Строение и структуру по-

лученных препаратов оценивали по элементному составу, молекулярно-массовому распределению (ММР) и по распределению углерода по функциональным группам.

Выделение препаратов ГК. Для выделения препаратов, из среднего образца брали пять навесок по 100 г, таким образом общая масса почвы, взятая для выделения составила 500 г. Каждую навеску декальцировали добавлением соляной кислоты в концентрации 1 М до установления рН 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, оставляли на ночь, затем отделяли супернатант от твердой фазы почвы декантацией. Далее декальцированную почву нейтрализовывали путем добавления 1 М NaOH до установления рН 7, а затем добавляли 0.1 М NaOH до конечного соотношения почва : раствор 1 : 10 (по массе). Суспензию периодически перемешивали в течение 6 ч и оставляли на ночь. Через 24 ч после начала экстракции, щелочную вытяжку отделяли от почвы декантацией и центрифугированием (3000 об. мин, 5 мин), на этой стадии все пять повторностей, полученные из пяти навесок почвы, объединяли в одну вытяжку (вытяжка 1) которую сохраняли. Затем к тем же пяти навескам почвы вновь добавляли 0.1 М NaOH в соотношении 1 : 10, периодически перемешивали в течение 6 ч, оставляли на ночь и через 24 ч получали щелочной экстракт, который объединяли из всех пяти повторностей и сохраняли (вытяжка 2). Эту процедуру повторяли еще раз для получения вытяжки 3. Каждую из вытяжек использовали для выделения препаратов ГК, посредством отделения ФК и очистки ГК от неорганических примесей. ГК отделяли от ФК осаждением, подкисляя раствор до рН 1–2 6 М HCl и центрифугированием отделяя осадок ГК. Затем ГК вновь 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 кремнийсодержащих тонкодисперсных примесей, согласно методике рекомендованной IHSS [24]. Обработанную суспензию ГК очищали диализом, высушивали на ротационном вакуумном испарителе и выдерживали в эксикаторе над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> не менее 21 дня. В результате из вытяжек 1, 2 и 3 были получены препараты гуминовых кислот дерново-подзолистой почвы. Оценку выхода ГК в ходе каждой экстракции проводили взвешиванием полученных препаратов.

Характеристика препаратов ГК<sup>1</sup>. Состав и структуру полученных препаратов оценивали по элементному составу, ММР – методом гель-проникающей хроматографии и распределению углерода по функциональным группам методом спектроскопии ЯМР на ядрах <sup>13</sup>C.

Элементный состав определяли на элементном анализаторе модели 1106 фирмы Carlo Erba Strumentazione (Италия). Содержание гигроскопической воды во всех препаратах принимали равным 8% [9]. Зольность выделенных ГК определяли гравиметрически в индивидуальной навеске методом сжигания в кварцевых трубках в атмосфере кислорода при температуре 750°C в течение 40 мин. Содержание кислорода рассчитывали по разности между массой беззольной безводной навески и суммарным содержанием С, Н, N.

Молекулярно-массовое распределение ГК определяли методом гель-проникающей хроматографии в соответствии с [19–22]. Гель-хроматографическая система Abimed (Gilson, Франция) включала: колонку, насос, автоматический пробоотборник и проточный ультрафиолетовый детектор. Гель-хроматографическая колонка имела размеры 25 мм × 20 см. В качестве неподвижной фазы использовали гель Toyopearl TSK HW-55S (Toso Haas, Япония), в качестве подвижной фазы – 0.028 М фосфатный буфер с рН 6.8. Свободный объем колонки определяли с помощью голубого декстрана (20000 кДа), общий – ацетона (48 Да). Они составили 12 и 34 мл соответственно. Для калибровки использовали натриевые соли полистиролсульфоновых кислот со значениями молекулярных масс (в пике) 14.00, 20.70, 45.10, и 80.84 кДа (Polymer Standard Service, Германия). На основе полученных хроматограмм и калибровочных кривых находили значения средневесовой и среднечисловой молекулярных масс (*M<sub>w</sub>* и *M<sub>n</sub>*), а также полидисперсность (*M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub>*) [2, 18]. Для оценки возможной сорбции вещества на геле определяли выход вещества с колонки. Проведенные холостые эксперименты показали, что в среднем с колонки выходило 85% нанесенных ГК.

Спектроскопия ЯМР на ядрах <sup>13</sup>C в жидкой фазе является одним из самых информативных методов структурного исследования органических веществ стохастического строения 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 <sup>13</sup>C-ЯМР-спектроскопии можно количественно оценить содержание

структурных единиц в углеродном скелете ГК [4, 17, 19, 23]. В связи с этим, с помощью <sup>13</sup>C-ЯМР-спектроскопии можно описывать различия в структуре ГК, извлекаемых последующей щелочной вытяжкой.

Образцы ГК для ЯМР-исследования готовили растворением навески (80 мг) в 0.6 мл 0.3М NaOD/D<sub>2</sub>O. Смесь помещали в ультразвуковую ванну на 30 мин, далее центрифугировали 5 мин при 18 g, раствор отделяли от осадка и переносили в 5-миллиметровую ампулу для ЯМР-спектроскопии. Спектры <sup>13</sup>C-ЯМР регистрировали на спектрометре Avance 400 компании Bruker (Германия) с рабочей частотой 100 МГц для ядер <sup>13</sup>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. 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 (lb) 100 Гц и последующему преобразованию Фурье для перевода сигнала с разверткой по времени в спектр с разверткой по частоте, измеряемой в миллионных долях (ppm) от несущей частоты спектрометра (100 МГц для ядер <sup>13</sup>C). Указанную обработку и преобразование спектров осуществляли при помощи программного обеспечения “MestReC” одноименной компании. Интегрирование спектров по интервалам проводили, используя программное обеспечение “Gel-Treat” (© А.В. Кудрявцев).

Распределение атомов углерода по различным структурным фрагментам определяли интегрированием соответствующих спектральных областей. В спектре делали следующие отнесения согласно [4, 19] (ppm): 220–187 – углерод кетонных и хинонных групп (C<sub>C=O</sub>); 187–165 – углерод карбоксильных, сложноэфирных и амидных групп (C<sub>COO-H, R</sub>); 165–145 – углерод O, N-замещенных ароматических фрагментов (C<sub>Ar-O, N</sub>), 145–108 – углерод незамещенных и C-замещенных ароматических фрагментов (C<sub>Ar-H, R</sub>); 108–48 – углерод O, N-замещенных алифатических фрагментов (C<sub>Alk-O, N</sub>); 48–5 – углерод алифатических фрагментов, не связанных с гетероатомами (C<sub>Alk-H, R</sub>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные в ходе выделения препараты для каждой экстракции перед анализом взвешивали для оценки препаративного выхода. Как следует из табл. 1, препаративный выход ГК для дерново-

<sup>1</sup> Характеристику препаратов проводили на химическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова соавторы статьи – сотрудники этого факультета.

**Таблица 1.** Выход препарата ГК из последовательных щелочных экстракций

| Номер щелочной экстракции               | Выход препарата ГК |            |
|---|--------------------|------------|
|   | % от массы почвы   | % от С орг |
| Дерново-подзолистая почва под лесом     |                    |            |
| 1                                       | 0.40               | 14.4       |
| 2                                       | 0.12               | 4.3        |
| 3                                       | 0.01               | 0.4        |
| Чернозем типичный, бесменный чистый пар |                    |            |
| 1                                       | 0.94               | 33.6       |
| 2                                       | 0.25               | 8.9        |
| 3                                       | 0.05               | 1.9        |

**Таблица 2.** Атомные отношения в ГК из последовательных щелочных экстракций (расчет на беззольную и безводную навеску, влажность 8% [9])

| Номер щелочной экстракции               | H/C  | O/C  | C/N  |
|---|------|------|------|
| Дерново-подзолистая почва под лесом     |      |      |      |
| 1                                       | 1.06 | 0.45 | 10.9 |
| 2                                       | 1.08 | 0.43 | 11.0 |
| 3                                       | 1.07 | 0.44 | 10.8 |
| <i>M</i> *                              | 1.06 | 0.45 | 10.9 |
| Чернозем типичный, бесменный чистый пар |      |      |      |
| 1                                       | 0.54 | 0.42 | 19.6 |
| 2                                       | 0.75 | 0.36 | 17.9 |
| 3                                       | 0.59 | 0.38 | 16.0 |
| <i>M</i>                                | 0.58 | 0.41 | 19.1 |

\* Здесь и далее: *M* – средневзвешенное значение параметра ГК для всех трех экстракций.

подзолистой почвы после второй экстракции снизился более чем в 3 раза, а после третьей в 40 раз по сравнению с первой. В случае чернозема под бесменным чистым паром наблюдали уменьшение выхода ГК после второй экстракции почти в 4 раза, а после третьей – более чем в 30 раз по сравнению с первой. Сходные отношения получали и при расчете выхода препарата не на навеску почвы, а на содержание в ней органического углерода.

Интересно отметить что, препаративный выход из дерново-подзолистой почвы был в 2 раза меньше по сравнению с черноземом, несмотря на то, что содержание органического углерода в обеих почвах близко. Большой выход ГК из чернозема, вероятно, объясняется большим содержанием

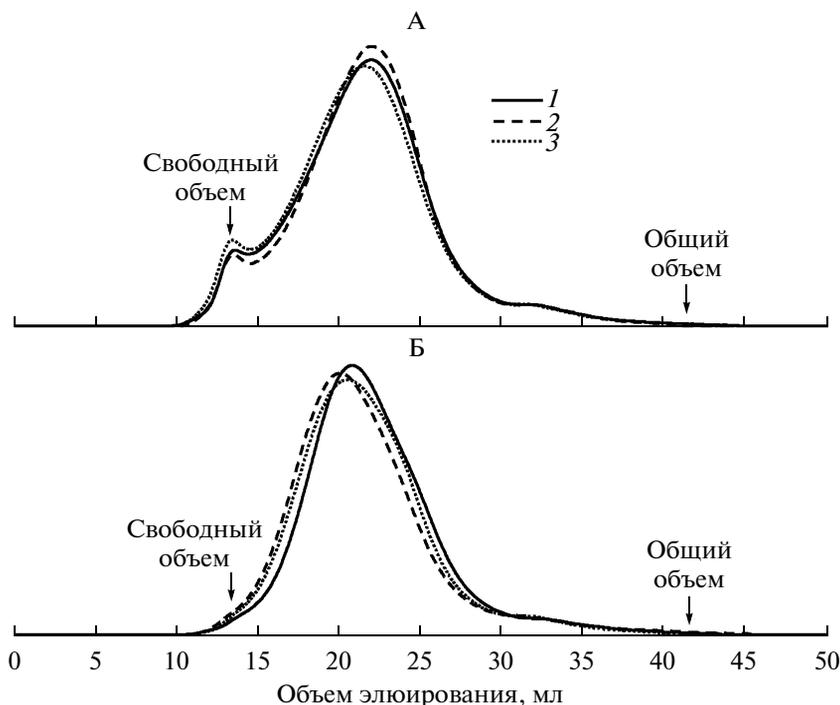
в этой почве собственно ГК [6, 7]. При этом уменьшение препаративного выхода ГК с каждой последовательной экстракцией остается одного порядка для обеих рассматриваемых почв.

Сходные результаты получены ранее для типичного чернозема под ежегодно косимой степью [11] – выход ГК первой экстракции (1.18%) был близок к чернозему под бесменным паром, а уменьшение выхода по сравнению с первой экстракцией отметили в четырех и почти в 13-и раз для второй и третьей экстракций соответственно. Для целиной серой лесной почвы препаративный выход из первой экстракции (0.45%) был близок к наблюдаемому выходу ГК из дерново-подзолистой почвы [13]. Однако вторая экстракция из серой лесной почвы выпала из наблюдаемого ряда – уменьшение выхода по сравнению с первой экстракцией было в 10 раз, возможно, такое расхождение следует отнести к случайному выбросу, связанному с ошибкой, либо объясняется особенностями данного типа почв. Скорее всего, верно первое предположение, так как третья экстракция из серой лесной почвы также продемонстрировала уменьшение выхода по сравнению с первой в 11 раз, что является значением того же порядка, полученного для черноземов и дерново-подзолистой почвы.

Показатели элементного состава – атомные отношения в препаратах ГК, полученных последовательными экстракциями, приводятся в табл. 2. В дерново-подзолистой почве не было значимых изменений в атомных отношениях последовательных экстракций, при этом полученные показатели были близки к средним значениям, приводимым для этих почв [7].

В случае типичного чернозема под бесменным чистым паром отмечена большая разница между отношением H/C ГК первых и второй вытяжки (0.54 и 0.75) соответственно. Указанный факт может свидетельствовать об увеличении доли алифатических фрагментов в ГК, извлекаемых при второй экстракции. Кроме того, в ГК второй экстракции меньше отношение O/C, что может указывать на большее количество окисленных ГК в первой вытяжке, это вполне возможно, учитывая общую деструктивную направленность процессов трансформации органического вещества в опытном варианте бесменный чистый пар с 1964 г. Резонно предположить, что более окисленные ГК будут легче извлекаться. Следует отметить, что ГК третьей экстракции из чернозема по атомным отношениям элементного состава занимают промежуточное положение между ГК первой и второй.

Для оценки вклада ГК из каждой щелочной экстракции в объединенный препарат, который был бы получен при объединенных экстракциях,



**Рис. 1.** Гель-хроматограммы образцов ГК, полученных из последовательных щелочных вытяжек: А – из дерново-подзолистой почвы под лесом, Б – из типичного чернозема в опытном варианте “бессменный чистый пар с 1964 г.” (здесь и далее: 1–3 – номер щелочной экстракции); все хроматограммы нормализованы на значение площади, равное единице.

для всех параметров рассчитали средневзвешенный параметр ( $M$ ). Расчет проводили по формуле:

$$M = \frac{\sum p_i M_i}{\sum p_i},$$

где  $p_i$  – математический вес параметра для  $i$ -ой экстракции (оценивается по доле выхода ГК для каждой экстракции, табл. 1);  $M_i$  – значение параметра в  $i$ -ой экстракции.

Средневзвешенные значения атомных отношений для ГК дерново-подзолистой почвы полностью соответствуют значениям, полученным для первой экстракции. В случае черноземных ГК средневзвешенные значения также мало отличались от показателей первой экстракции, расхождения для Н/С, О/С и С/Н составили 0,4, 0,1, 0,5 соответственно, что близко к ошибке эксперимента.

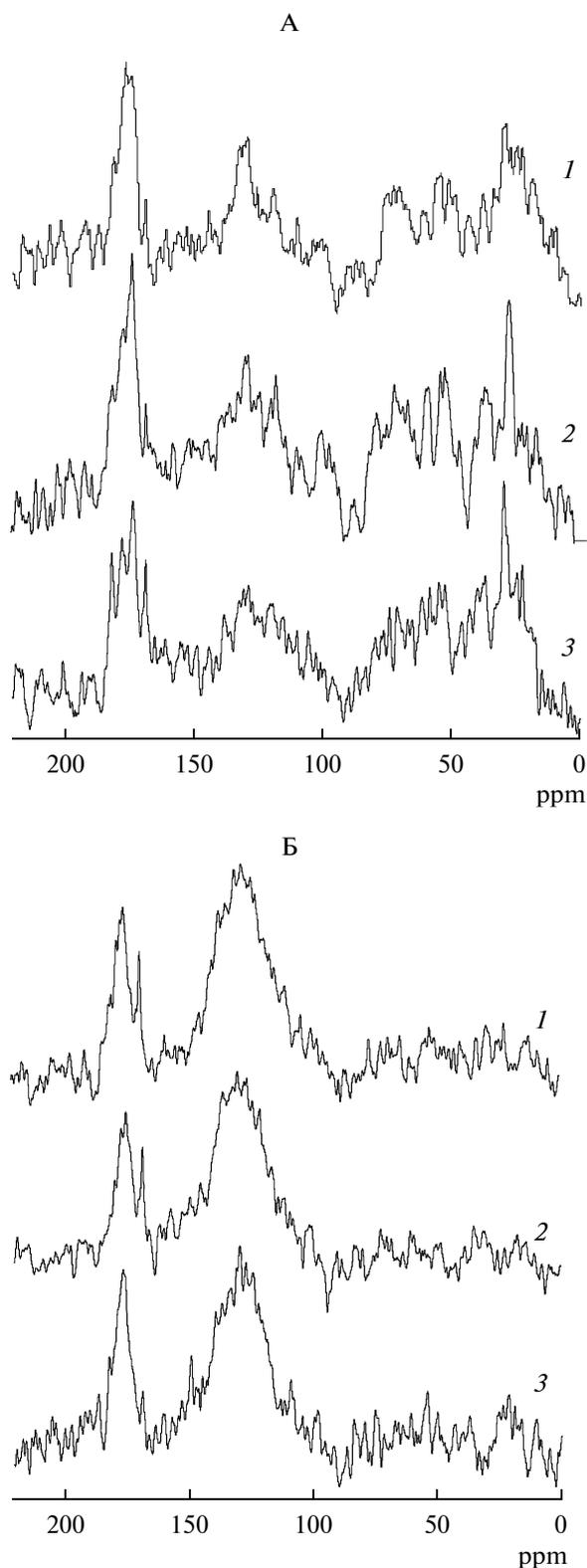
ММР полученных ГК изучали с помощью метода гель-проникающей хроматографии. Гель-хроматограммы препаратов ГК представлены на рис. 1. Хроматограммы всех полученных препаратов имеют мономодальное распределение, что свидетельствует о существенной компенсации неэксклюзионных эффектов [20]. При этом на хроматограммах ГК дерново-подзолистой почвы наблюдался небольшой пик в районе выхода свободного объема, указывающий, скорее всего, на

появление в них высокомолекулярной фракции. В целом можно заключить, что, как в случае дерново-подзолистой почвы, так и чернозема, хроматограммы ГК всех трех последовательных экстракций имеют схожую форму, что указывает на единообразие ММР для ГК, получаемых из одной почвы последовательными экстракциями.

На основе полученных хроматограмм рассчитаны [20] основные показатели ММР средневесо-

**Таблица 3.** Показатели молекулярно-массового распределения в ГК из последовательных щелочных экстракций

| Номер щелочной экстракции                | $M_w$ | $M_n$ | $M_w/M_n$ |
|--|-------|-------|-----------|
|  | кДа   |       |           |
| Дерново-подзолистая почва под лесом      |       |       |           |
| 1  | 31.6  | 2.9   | 11.1      |
| 2  | 34.9  | 3.2   | 10.9      |
| 3  | 30.0  | 3.8   | 8.0       |
| $M$                                      | 32.3  | 3.0   | 11.0      |
| Чернозем типичный, бессменный чистый пар |       |       |           |
| 1  | 22.1  | 3.0   | 7.4       |
| 2  | 27.4  | 2.4   | 11.6      |
| 3  | 25.2  | 4.1   | 6.2       |
| $M$                                      | 23.3  | 2.9   | 8.2       |



**Рис. 2.**  $^{13}\text{C}$ -ЯМР спектры ГК, полученных из последовательных щелочных экстракций из дерново-подзолистой почвы под лесом (А) и типичного чернозема в опытном варианте “бесменный чистый пар” (Б).

вая ( $M_w$ ) и среднечисловая ( $M_n$ ) молекулярные массы, а также полидисперсность препаратов ( $M_w/M_n$ ). В целом средневесовые молекулярные массы ГК дерново-подзолистой почвы превышали  $M_w$  для ГК типичного чернозема под паром, что согласуется с литературными данными [7, 22].

Для ГК последовательных экстракций из дерново-подзолистой почвы не было выявлено каких-либо тенденций, при этом большинство показателей не сильно отличалось друг от друга. Следует отметить  $M_w$  для ГК второй экстракции из этой почвы, она превышала  $M_w$  ГК первой экстракции на 3.3 кДа, однако  $M_w$  ГК из третьей экстракции меньше первой на 1.6 кДа. Вероятно, ГК, извлекаемые при последовательных экстракциях из дерново-подзолистой почвы под лесом, имеют примерно одинаковое ММР.

ГК, получаемые последовательными экстракциями из чернозема под бесменным чистым паром, также имеют близкие характеристики относительно друг друга. Следует отметить небольшое увеличение  $M_w$  во второй и третьей экстракциях по сравнению с первой.

Средневзвешенные значения параметров ММР практически полностью повторяют величины, полученные для первой экстракции.

Распределение углерода по функциональным группам ГК – “углеродный скелет” – изучали методом  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии. Спектры ГК последовательных экстракций приведены на рис. 2, А – для ГК дерново-подзолистой почвы и рис. 2, Б – для черноземных.

Для спектров ГК трех последовательных вытяжек из дерново-подзолистой почвы, характерно наличие интенсивных сигналов в области незамещенного алифатического углерода (48–5 ppm), много небольших пиков в области 108–48 ppm, где располагаются сигналы гетероатомов (O, N) – замещенного углерода, в частности, углеводных и аминных фрагментов, заметен пик в области ароматического углерода (165–108 ppm) и четко выражен хороший пик, относимый к углероду карбоксильных групп (187–165 ppm).

Для спектра всех ГК типичного чернозема под паром характерно наличие интенсивных сигналов в области ароматического углерода (165–108 ppm), карбоксильных групп (187–165 ppm) и незамещенного алифатического углерода (48–5 ppm). При этом спектральная интенсивность плохо выражена в области 108–48 ppm, где располагаются сигналы гетероатомов (O, N) – замещенного углерода.

При сравнении спектров ГК дерново-подзолистой почвы и чернозема можно выделить ряд характерных отличий. В дерново-подзолистой много относительно небольших пиков алифатического замещенного и незамещенного углерода и ароматического углерода, на спектре выделяет-

**Таблица 4.** Распределение углерода по функциональным группам в ГК из последовательных щелочных экстракций

| Номер щелочной экстракции               | Спектральные области, ppm |                          |                          |                          |                           |                      |
|---|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------|
|   | 5–48<br>$C_{Alk-H, R}$    | 48–108<br>$C_{Alk-O, N}$ | 108–145<br>$C_{Ar-H, R}$ | 145–165<br>$C_{Ar-O, N}$ | 165–187<br>$C_{COO-H, R}$ | 187–220<br>$C_{C=O}$ |
| Дерново-подзолистая почва под лесом     |                           |                          |                          |                          |                           |                      |
| 1                                       | 24                        | 23                       | 20                       | 7                        | 16                        | 10                   |
| 2                                       | 19                        | 30                       | 19                       | 9                        | 16                        | 6                    |
| 3                                       | 25                        | 25                       | 20                       | 8                        | 15                        | 7                    |
| <i>M</i>                                | 23                        | 25                       | 20                       | 7                        | 16                        | 9                    |
| Чернозем типичный, бесменный чистый пар |                           |                          |                          |                          |                           |                      |
| 1                                       | 9                         | 12                       | 46                       | 7                        | 18                        | 8                    |
| 2                                       | 9                         | 12                       | 45                       | 10                       | 17                        | 8                    |
| 3                                       | 13                        | 12                       | 41                       | 6                        | 16                        | 6                    |
| <i>M</i>                                | 9                         | 12                       | 46                       | 8                        | 17                        | 8                    |

ся только пик карбоксиллов. В черноземе четко виден доминирующий пик ароматического углерода и хорошо выраженный пик углерода карбоксильных групп. При этом трудно выделить отличия в характере спектров для ГК последовательных щелочных вытяжек для каждой из рассматриваемых почв.

В табл. 4 приведены данные по количественной оценке распределения спектральной интенсивности в спектрах  $^{13}C$ -ЯМР для препаратов ГК, выделенных из трех последовательных щелочных вытяжек исследованных почв.

Сопоставление данных  $^{13}C$ -ЯМР ГК лесной дерново-подзолистой почвы и типичного чернозема под бесменным чистым паром позволяет отметить ряд отличий, характерных для ГК этих почв. В ГК дерново-подзолистой почвы по сравнению с черноземом больше алифатического углерода как замещенного, так и незамещенного. В ГК чернозема преобладают ароматические фрагменты. Содержание карбоксильных и карбонильных групп демонстрирует близкие значения для ГК обеих почв. В целом выявленные закономерности соответствуют ранее полученным данным  $^{13}C$ -ЯМР для ГК зональных почв России [12].

Распределение углерода по функциональным группам в ГК последовательных щелочных вытяжках из лесной дерново-подзолистой почвы близко для всех трех экстракций. Во второй экстракции несколько меньше углерода незамещенных алифатических групп и немного больше C-замещенных алканов по сравнению с первой и третьей экстракциями. Рассчитанные средневзвешенные показатели распределения углерода практически полностью повторяют значения, полученные для первой экстракции.

ГК чернозема бесменного чистого пара демонстрировали практически идентичное строе-

ние углеродного скелета для всех последовательных экстракций. Средневзвешенные значения показателей распределения углерода идентичны первой экстракции.

Таким образом, данные  $^{13}C$ -ЯМР-спектроскопии указывают на близость строения ГК, получаемых последовательными щелочными экстракциями как из лесной дерново-подзолистой почвы, так и из типичного чернозема под бесменным чистым паром. При этом ранее для многолетних залежных почв, близких к нативным, типичного чернозема и серой лесной почвы показано отличие строения ГК первой щелочной экстракции от двух последующих: в обоих случаях с каждой экстракцией наблюдали увеличение доли алифатических фрагментов и уменьшение содержания ароматических [11, 13].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Последовательные щелочные экстракции практически не оказывали влияния на состав и структуру ГК почв использованных в работе. При этом ранее [11, 13] отмечены различия между ГК последовательных щелочных экстракций из нарушенных (нативных или залежных) почв: серой лесной и чернозема под ежегодно косимой степью. В случае этих почв отмечали увеличение содержания алифатических фрагментов, уменьшение ароматических и возрастание средневесовых молекулярных масс в ГК второй и третьей вытяжки по сравнению с первой.

Показано, что в ГК последовательных щелочных вытяжек из дерново-подзолистой почвы под лесом практически полностью отсутствовали различия в составе и строении. Вероятно, это объясняется особенностями формирования данного типа почв. Промывной режим и относительно ко-

роткий вегетационный период, с одной стороны, не способствуют накоплению и гумификации органического вещества [7]. С другой стороны, неблагоприятные условия гумусообразования по видимому, способствуют накоплению достаточно единообразных по экстрагируемости ГК в отличие от ГК степной и лесостепной зон, где в условиях непромывного режима формируются более разнообразный молекулярный ансамбль ГК.

Отсутствие различий в ГК последовательных щелочных вытяжек из чернозема бессменного чистого пара, вероятно, объясняется особенностями многолетнего полевого опыта для этой почвы. С 1964 г. в почву не поступают растительные остатки. За прошедшее время все бывшие в почве остатки растений были гумифицированы, малоустойчивые гуминовые вещества либо разложены, либо преобразованы в более устойчивые. Эти изменения привели к относительно единообразию в составе и строении ГК этой почвы. Поэтому нет существенных различий между ГК последовательных щелочных экстракций из этой почвы.

Вероятно, наблюдаемые закономерности можно объяснить разнообразием органического вещества в почве. Чем оно шире, тем более заметна разница в составе и строении ГК разных экстракций, и наоборот, чем гомогеннее органическое вещество, тем меньше различий можно найти в ГК из последовательных вытяжек почвы.

Разнообразие органического вещества в почвах определяется как зональными особенностями формирования, так и видом их использования. Согласно общей теории формирования гуминовых веществ, предложенной Орловым [8], при гумусообразовании в почве идет отбор квазиустойчивых соединений для данных условий. Соответственно, при благоприятных для гумусообразования факторах (например, в черноземах), будет накапливаться больше гумуса. Вероятно, благоприятные условия для гумусообразования способствуют и большему физико-химическому разнообразию накапливаемых веществ. С другой стороны, при зональных, относительно неблагоприятных, условиях гумусонакопления, например, в дерново-подзолистых почвах, идет не только меньшее накопление гуминовых веществ, но и для образующегося гумуса характерно меньшее физико-химическое разнообразие. Схожим образом на разнообразие молекулярного ансамбля гуминовых веществ должен оказывать и вид использования почв. Благоприятный для гумусонакопления вид использования, направленный на сохранение и накопление органического вещества, будет способствовать увеличению физико-химического разнообразия гуминовых веществ. Неблагоприятный, приводящий к уменьшению запасов гумуса и ограничивающий

поступление свежих остатков вид землепользования, вероятно, будет способствовать относительному снижению разнообразия гуминовых веществ.

Высказанные предположения объясняют, почему практически не было обнаружено серьезных отличий в составе и структуре ГК из последовательных щелочных экстракций, в то время как ранее для нативных (залежных) серой лесной почвы и чернозема отмечали отличия ГК первой экстракции от ГК из последующих.

Данная работа, а также предыдущие, посвященные этой проблематике [11, 13], демонстрируют значительное уменьшение выхода ГК с каждой последующей экстракцией. Во второй экстракции выход ГК меньше по сравнению с первой не менее чем в 3 раза, а в третьей — не менее чем в 10 раз. В связи с этим, основной вклад в свойства интегрального препарата ГК, получаемого несколькими экстракциями, вносит первая щелочная вытяжка.

Резюмируя все вышеизложенное, на основе проведенных исследований можно рекомендовать при выделении препаратов ГК ограничиваться одной щелочной экстракцией. При этом в случае особо ценного образца почвы, имеющегося в небольшом количестве, имеет смысл проводить две экстракции. Кроме того, при изучении минорных фракций ГК и для оценки их физико-химического разнообразия, возможно, стоит отдельно изучать последовательные щелочные вытяжки, оптимально — первую и вторую.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Аринушкина Е.В.* Руководство по химическому анализу почв. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1970. 488 с.
2. *Беленький Б.Г., Виленчик Л.З.* Хроматография полимеров. М.: Химия, 1978. 290 с.
3. Классификация и диагностика почв СССР. М.: Колос, 1977. 223 с.
4. *Ковалевский Д.В., Пермин А.Б., Перминова И.В., Петросян В.С.* Выбор условий регистрации количественных <sup>13</sup>C-ЯМР-спектров гумусовых кислот // Вестн. Моск. ун-та. 2000. Сер. 2, химия. Т. 41. № 1. С. 39–42.
5. *Когут Б.М., Сысуев С.А., Холодов В.А.* Водопрочность и лабильные гумусовые вещества типичного чернозема при разном землепользовании // Почвоведение. 2012. № 5. С. 555–561.
6. *Кононова М.М.* Органическое вещество почвы. М.: Изд-во АН СССР, 1963. 315 с.
7. *Орлов Д.С.* Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1990. 325 с.
8. *Орлов Д.С., Гришина Л.А.* Практикум по химии гумуса. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1981. 272 с.

9. *Перминова И.В.* Анализ, классификация и прогноз свойств гуминовых кислот. Дис. ... докт. хим. н. М., 2000. 359 с.
10. Почвоведение. Типы почв, их география и использование / Под ред. В.А. Ковды, Б.Г. Розанова. М.: Высшая школа, 1988. Ч. 2. 368 с.
11. *Холодов В.А., Константинов А.И., Беляева Е.Ю., Куликова Н.А., Кирюшин А.В., Перминова И.В.* Строение гуминовых кислот, извлекаемых в ходе последовательной щелочной экстракции из типичного чернозема // Почвоведение. 2009. № 10. С. 1177–1183.
12. *Холодов В.А., Константинов А.И., Кудрявцев А.В., Перминова И.В.* Строение гуминовых кислот почв зонального ряда по данным спектроскопии ЯМР  $^{13}\text{C}$  // Почвоведение. 2011. № 9. С. 1064–1073.
13. *Холодов В.А., Константинов А.И., Перминова И.В.* Распределение углерода по функциональным группам в гуминовых кислотах при последовательных щелочных экстракциях из серой лесной почвы // Почвоведение. 2009. № 11. С. 1320–1324.
14. *Чуков С.Н.* Изучение гумусовых кислот антропогенно-нарушенных почв методом  $^{13}\text{C}$ -ЯМР // Почвоведение. 1998. № 9. С. 1085–1093.
15. *Чуков С.Н.* Исследование физико-химических параметров органического вещества почв. Автореф. дис. ... докт. биол. н. М., 1998. 49 с.
16. *Чуков С.Н., Талашкина В.Д., Надпорожная М.А.* Физиологическая активность ростовых стимуляторов и гуминовых кислот почв // Почвоведение. 1995. № 2. С. 169–174.
17. *Hertkorn N., Permin A.B., Perminova I.V., Kovalevskii .V., Yudov M.V., Kettrup 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.
18. *Janos P.* Separation methods in the chemistry of humic substances // J. Chromatography A. 2003. V. 983. P. 1–18.
19. *Konstantinov A.I., Vladimirov G.N., Grigoryev A.S., Kudryavtsev A.V., Perminova I.V., Nikolaev E.N.* Molecular composition study of mumijo from different geographic areas using size-exclusion chromatography, nmr spectroscopy, and high-resolution mass-spectrometry // Functions of natural organic matter in changing environment. Springer, 2013. Part I. P. 283–287. DOI 10.1007/978-94-007-5634-2\_52.
20. *Kudryavtsev A.V., Perminova I.V., Petrosyan V.S.* Size-exclusion chromatographic descriptors of humic substances // Anal. Chim. Acta. 2000. V. 407. P. 193–202.
21. *Perminova I.V., Frimmel F.H., Kovalevskii D.V., Abbt-Braun G., Kudryavtsev A.V., Hesse S.* Development of a predictive model for calculation of molecular weight of humic substances // Wat. Res. 1998. V. 32. P. 872–881.
22. *Perminova I.V., Frimmel F.H., Kudryavtsev A.V., Kulikova N.A., Abbt-Braun G., Hesse S., Petrosyan V.S.* Molecular weight characteristics of aquatic, soil, and peat humic substances as determined by size exclusion chromatography and their statistical evaluation // Environ. Sci. Technol. 2003. V. 37. P. 2477–2485.
23. *Preston C.M.* Applications of NMR to soil organic matter analysis: History and prospects // Soil Sci. 1996. V. 161. P. 144–166.
24. *Swift R.S.* Organic matter characterization (chap 35) // Methods of Soil Analysis. Madison, WI: Soil Science Society of America, 1996. Part 3. P. 1018–1020.