

УДК 631.82:547.992.2:631.445.4

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА ГУМУСОВЫХ ВЕЩЕСТВ МЕТОДОМ УФ-СПЕКТРОСКОПИИ

**К.Е. Стекольников, В.В. Котов, Е.С. Гасанова, Д.В. Ненахов,
Воронежский государственный аграрный университет им. К.Д. Глинки**

Установление химического состава и строения гумусовых кислот — одна из фундаментальных задач почвоведения. Сведения об этих показателях позволяют прогнозировать различные физические и физико-химические свойства почвы. В ряду методов исследования гумусовых кислот информативными являются оптические, основанные на данных светопоглощения в широком интервале длин волн. Известно, что в ультрафиолетовой (УФ) области спектра наблюдаются лишь монотонно убывающие зависимости оптической плотности растворов с увеличением длины волны [2]. Трудность расшифровки таких спектров связана со сложным строением молекул гумусовых кислот, содержащих различные хромофорные и ауксохромные группировки [3]. Представляется, что особенности строения гумусовых кислот могут быть найдены обработкой типичных УФ-спектрограмм с использованием математических приемов.

Цель работы — выявление особенностей строения гумусовых веществ почв, извлекаемых методом последовательной экстракции при различных значениях pH.

Исследовали гумусовые вещества (ГВ), выделенные из образцов почв пахотного слоя контрольного варианта (без использования удобрений и мелиорантов) чернозема выщелоченного среднемогучего среднегумусного тяжелосуглинистого стационара кафедры агрохимии ВГАУ. Гумусовые вещества выделяли из почвы последовательной экстракцией водой, раствором 0,1 М пирофосфата и 0,1 М гидроксида натрия при pH равном 7, 10 и 13. Электронные спектры экстрактов снимали на спектрофотометре СФ 26 в диапазоне длин волн 200—350 нм с шагом 5 нм.

В структурах молекул ГК и ФК могут быть выделены отдельные фрагменты — ароматические, углеводные и белковые [5]. Алифатические фрагменты в основном имеют максимумы поглощения в дальней УФ-области (100—200 нм), поэтому их собственное поглощение должно проявляться слабо в ближней УФ-области спектра (200—400 нм) [3]. Ароматическая часть структуры гумусовых кислот непосредственно связана с ауксохромными группировками, основными из которых являются —ОН и —СООН. Поэтому в качестве исходных моделей фрагментов структур гумусовых кислот нами взяты фенол, бензойная и салициловая кислоты.

На рис. 1А показаны УФ-спектры водных растворов этих соединений. Спектр фенола содержит два максимума при длинах волн 212 и 275 нм, что согласуется с литературными данными [3]. Замена гидроксогруппы на карбоксильную, как более сильную ауксохромную, при ароматическом ядре (бензойная кислота) приводит к смещению первого максимума в батохромную область ($\lambda=230$ нм) и сопровождается увеличением высоты максимума (гиперхромный эффект). При этом высота второго максимума уменьшается (гипохромный эффект), но батохромного сдвига не наблюдается. Одновременное присутствие у ароматического ядра карбоксильной и гидроксо-групп (салициловая кислота) не изменяет положение первого максимума, наблюдаемого в спектре фенола ($\lambda=212$ нм), однако вызывает резкий гиперхромный эффект, приводит к появлению еще двух полос. Первая наблюдается при 242 нм, а вторая резко сдвинута в область длин волн 305 нм. Расчет молярных коэффициентов светопоглощения (ϵ) по первому интенсивному максимуму на всех спектрах

0,1 М растворов фенола, бензойной и салициловой кислот показал соответственно $5,28 \times 10^3$, $8,3 \times 10^3$ и $17,5 \times 10^3$. Большие значения коэффициентов ($\epsilon > 10^3$) характеризуют переходы $\pi - \pi^*$, типичные для конъюгированных систем (К-полосы) [3].

Представляет интерес исследование УФ-спектров смесей индивидуальных веществ как ступени к изучению сложных молекул. На рис. 3Б показаны УФ-спектры смесей фенола и бензойной кислоты, взятых в различных молярных соотношениях. Сравнение рис. 1Б и 1А показывает, что первый максимум для фенола имеет батохромный, а для бензойной кислоты — гипохромный сдвиг, образуя при эквимолярном соотношении компонентов общий пик при 220 нм. Характерным является вырождение этого максимума в пологие «плечи» на ниспадающей ветви края спектра, сдвинутые в гипохромную область тем сильнее, чем больше молярные соотношения фенол — бензойная кислота. Положение второго максимума ($\lambda=275$ нм) при этом не меняется. Интересным и неожиданным результатом являются незначительные различия высоты максимумов при довольно большом изменении молярных соотношений компонентов. Это, по-видимому, объясняется кооперативными взаимодействиями в исследуемой системе с образованием большого количества водородных связей, в результате чего смесь ведет себя как единое целое [1]. Это предположение подтверждается данными рис. 1В и 1Г, где введение в систему салициловой кислоты, с одной стороны, приводит к появлению четкого интенсивного максимума при 212 нм, высота которого практически не зависит от соотношения компонентов, а с другой — к появлению слабо выраженного «плеча» при 235—245 нм, сохранению и близости по высоте полос при 275 и 305 нм. Следует ожидать, что подобные явления должны проявляться также на спектрах макромолекул.

Точное положение максимумов поглощения в таких системах может быть определено из зависимости первой производной оптической плотности от длины волны при условии $dD/d\lambda=0$. При отсутствии четких максимумов их значения маскируются, и они присутствуют на спектральных характеристиках в виде «плечей». Имея в виду, что «плечи» имеют точки перегиба, положение таких полос можно найти из условия $d^2D/d\lambda^2=0$. Например, скрытые максимумы на рис. 1В и 1Г, полученные таким образом, соответствуют значениям λ 230 нм, 235, 260, 270, 290, 320, 325, 335 нм.

Этот прием использован нами при расшифровке спектров гумусовых кислот. На рис. 2 приведены спектральные характеристики вытяжек, выделенных из почвы методом последовательной экстракции. На зависимости для водной вытяжки (рис. 2, кривая 1) проявляется максимум при 208 нм, что указывает на присутствие в экстракте ароматических соединений. Это обстоятельство позволяет предположить наличие в растворе фенолкарбоновых кислот. В более длинноволновой области спектральной характеристики имеется ряд слабо выраженных полос, что согласуется с результатами, приведенными на рис. 1 для смеси веществ, и указывает на кооперативные взаимодействия в исследуемой системе.

УФ-спектр экстракта, полученного обработкой почвы пирофосфатом натрия в нейтральной среде (рис. 2, кривая 2), не имеет максимумов в исследуемой области длин

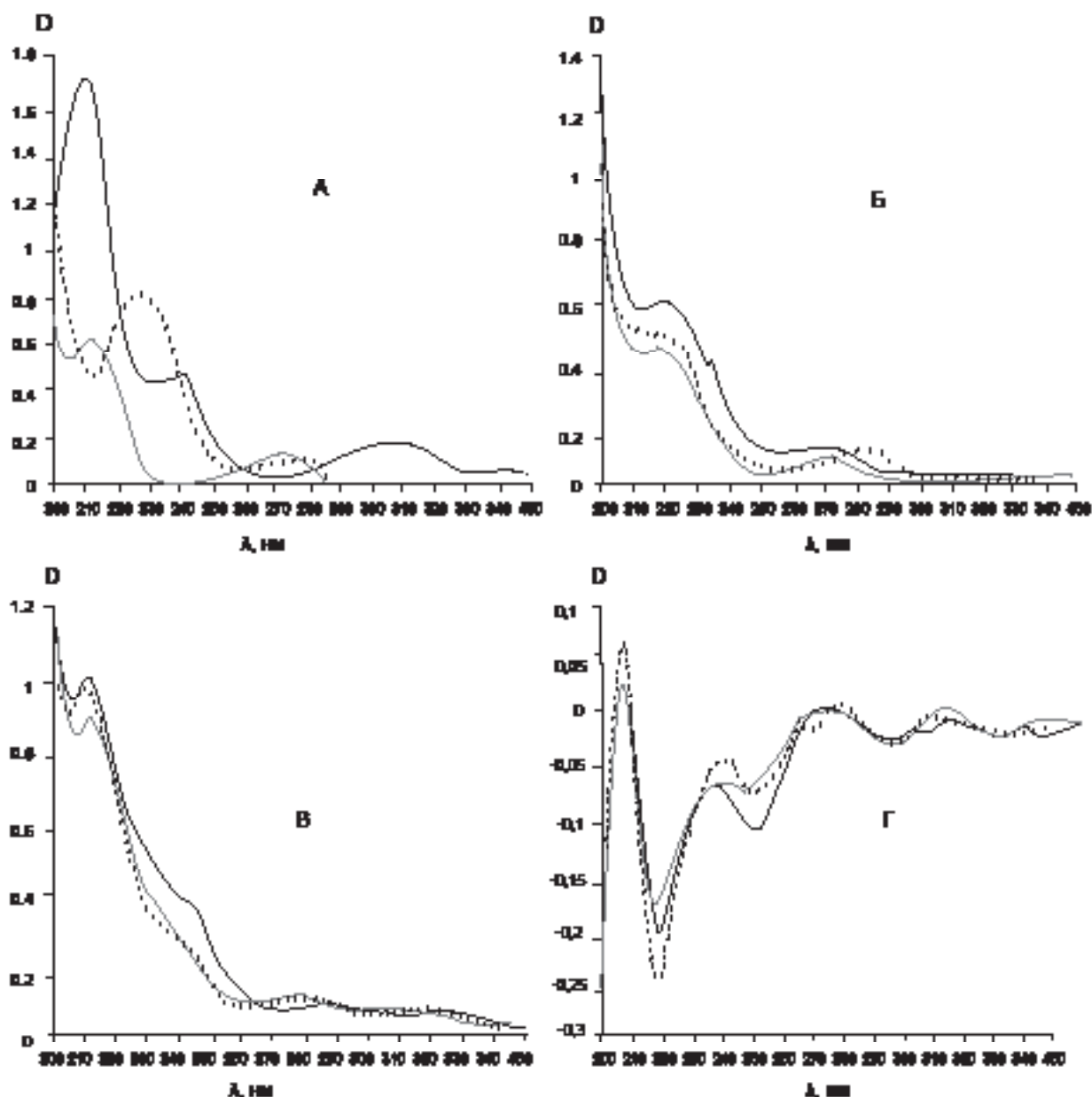


Рис. 1. А — спектральные характеристики растворов салициловой (1), бензойной (2) кислот и фенола (3); Б — смеси фенола и бензойной кислоты в молярных соотношениях 1:1 (4), 2:1(5), 4:1(6); В, Г — смеси фенола, салициловой и бензойной кислот в соотношениях 1:1:1(7), 1:2:1(8), 1:2:2(9); В — интегральная, Г — дифференциальная ($dD/d\lambda$) спектральные характеристики

волн. Постепенное возрастание оптической плотности с уменьшением длины волны указывает на то, что максимум светопоглощения раствора смещен в дальнюю ультрафиолетовую область. Это характерно для изолированных хромофоров — веществ с одной кратной связью алифатического строения, а также простых эфиров и аминов [3]. В области ближнего ультрафиолета наблюдается лишь слабо выраженный максимум (рис. 2, кривая 2).

Полученные данные позволяют предположить, что водой из почв экстрагируются только слабо связанные органические соединения негумусовой природы. Обработка почвы нейтральным раствором пирофосфата, по-видимому, вызывает связывание ионов поливалентных металлов в комплексы и, как следствие, повышает растворимость низкомолекулярных алифатических соединений, а возможно, и отщепление некоторой части боковых цепей ГК и ФК, имеющих также алифатический характер [5].

Увеличение pH до 10 при последующей экстракции (рис. 2, кривая 3) вызывает появление максимума при 207 нм и ряда слабых при более высоких длинах волн

(238, 247, 270, 307 нм) (рис. 2, кривая 3). По-видимому, в этих условиях начинается процесс извлечения собственно гумусовых кислот из почв. Интенсивное извлечение имеет место при pH 13 (рис. 2, кривая 4). Следует подчеркнуть, что эти кривые характеризуют экстракты, разбавленные в 10 раз. При этом основной максимум поглощения сдвинут в bathochromную область (217 нм), что характерно для ионных форм органических соединений [3] и указывает на присутствие в растворе гуматов и фульватов.

Представляет интерес выявление соотношения между количеством органического вещества, извлекаемого из почв на каждом этапе последовательной экстракции. Это, хотя и не с полной достоверностью, может быть проведено сравнением высоты пиков на спектральных характеристиках. В качестве таковых выбраны ярко выраженные максимумы при 207—217 нм. В случае экстракции нейтральным раствором пирофосфата в этой области максимум отсутствует и поэтому при расчете данный вариант не учитывался.

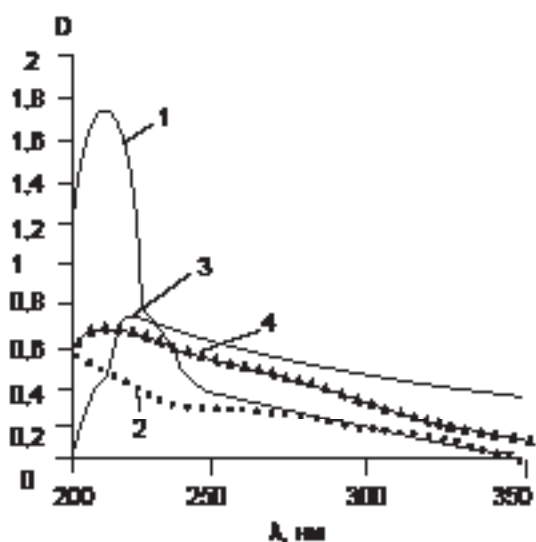


Рис. 2. Спектральные характеристики экстрактов ГВ: 1 — водная вытяжка; 2 — pH=7; 3 — pH=10; 4 — pH=13

Оптические плотности составляли соответственно для водной, пирофосфатных (pH 10 и pH 13) вытяжек 1,9; 0,54 и 0,74 (разбавление в 10 раз). Пересчет с учетом разбавления при pH 13 показывает соотношения 1:0,28:3,89. Это указывает на то, что основная масса органического вещества из почвы извлекается при pH 13, а подвижные низкомолекулярные фракции составляют примерно четвертую часть от высокомолекулярных.

Поскольку основное количество гумусовых кислот при последовательной экстракции извлекается раствором пирофосфата натрия с pH 13, то для выявления различия в спектрах ГК и ФК дальнейшему исследованию подвергался этот экстракт. Щелочная вытяжка обрабатывалась кислотой до pH 1,5, в результате чего образовывался раствор ФК и осадок ГК [4]. Далее осадок растворяли в 0,05 М растворе гидроксида натрия, и оба полученных раствора после соответствующего разбавления фотометрировали.

На рис. 3 показаны спектральные характеристики исследуемых растворов. Спектры ГК (рис. 3, кривая 1) и ФК (рис. 3, кривая 2) имеют принципиальные отличия. В спектре ГК имеется максимум при 215 нм, указывающий на присутствие в растворе ароматических соединений, причем в более длинноволновой области наблюдаются перегибы, отвечающие скрытым максимумам и расположенные в интервале 222—332 нм (рис. 3, кривая 1).

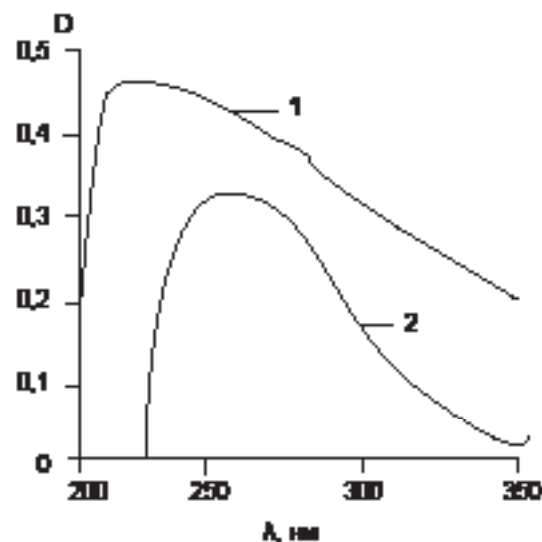



Рис. 3. Электронные спектры; кривая 1 — ГК (разбавление 1:1000), кривая 2 — ФК (разбавление 1:1)

Последнее обстоятельство подтверждает сложность строения молекул ГК. В спектре ФК (рис. 3, кривая 2) основной максимум (242 нм) и скрытые (287—335 нм) (рис. 3, кривая 2) резко сдвинуты в батохромную область, а количество скрытых максимумов гораздо меньше, чем в спектре ГК. Сдвиг максимумов в длинноволновую область указывает на более высокую степень окисленности ФК и присутствие в их молекулах большего, чем в ГК, количества карбоксильных групп, являющихся сильными ауксохромами.

Таким образом, исследованием смесей индивидуальных органических ароматических соединений методом УФ-спектроскопии выявлен кооперативный характер взаимодействий в системе. Показано, что подобное явление характерно и для органического вещества почв. Методом последовательной экстракции органического вещества почв и УФ-спектроскопии показано, что водные вытяжки содержат низкомолекулярные органические вещества ароматической природы. Нейтральным раствором пирофосфата натрия извлекаются низкомолекулярные алифатические соединения. Основная масса гумусовых веществ экстрагируется раствором пирофосфата натрия при pH=13. Показано принципиальное различие в спектрах ГК и ФК. Выявлено, что максимумы в спектрах ФК относительно ГК сдвинуты в батохромную область. 

Литература

1. Доломатов М.Ю. Пределы науки и фрагменты теории многокомпонентных природных систем / М.Ю. Доломатов - Уфа.: Уфимский Технологический Ин-ститут Сервиса, 1998. - 121с.
2. Зырин Н.Г. Физико-химические методы исследования почв / Н.Г. Зырин, Д.С. Орлов. - М.: Изд-во МГУ, 1980. - 382 с.
3. Методы спектрального анализа / В.Л. Левшин; под ред. В.Л. Левшина. - М.: Изд-во МГУ, 1962. - 508 с.
4. Орлов Д.С. Практикум по химии гумуса. / Д.С. Орлов, Л.А. Гришина. - М.: Изд-во МГУ, 1981. - 227 с.
5. Орлов Д.С. Химия почв / Д.С. Орлов. - М.: Изд-во МГУ, 1992 - 400с.