

УДК 662.73+547.992.2+631.811.98

DOI: 10.15372/KhUR20150413

Структурно-групповой состав гуминовых кислот бурых углей и их физиологическая активность

С. И. ЖЕРЕБЦОВ¹, Н. В. МАЛЫШЕНКО¹, О. В. СМОТРИНА¹, С. Ю. ЛЫРЩИКОВ², Л. В. БРЮХОВЕЦКАЯ¹, З. Р. ИСМАГИЛОВ^{1,3}¹Институт углехимии и химического материаловедения Сибирского отделения РАН, проспект Советский, 18, Кемерово 650000 (Россия)

E-mail: sizh@yandex.ru

²Кемеровский научный центр Сибирского отделения РАН, проспект Советский, 18, Кемерово 650000 (Россия)³Кузбасский государственный технический университет, ул. Демьяна Бедного, 4, Кемерово 650000 (Россия)

Аннотация

Исследованы функциональный состав гуминовых кислот (ГК) бурого угля и его естественно-окисленной формы, а также их активность в качестве стимуляторов роста сельскохозяйственных культур. Образцы углей и ГК охарактеризованы инструментальными методами (ЯМР-, ИК-, ЭПР-спектроскопии), проведен элементный и технический анализ. Установлено, что физиологическая активность ГК прямо пропорциональна ряду структурных параметров: степени ароматичности, гидрофильно-гидрофобному параметру и соотношению ароматических и алифатических фрагментов органической массы ГК.

Ключевые слова: бурый уголь, гуминовые кислоты, физиологическая активность

ВВЕДЕНИЕ

Сложность строения гуминовых веществ определяет широкий спектр их применения: в качестве стимуляторов роста, микроудобрений, для борьбы с химическим загрязнением, для улучшения структуры почвы и т. д. Однако по этой же причине результаты их применения противоречивы. Теоретические и прикладные исследования по применению гуминовых кислот (ГК) и созданных на их основе комбинированных препаратов расширяются и углубляются. Для эффективного применения гуминовых препаратов как биостимуляторов необходим прогноз их биологической активности, которая связана с их структурно-групповым составом.

Согласно результатам полевых испытаний [1], для ряда культур, в том числе пшеницы, определяющим фактором в плане их

физиологической активности является соотношение гидрофильных и гидрофобных фрагментов в структуре ГК.

В работе [2] исследован ряд природных и модифицированных гуминовых веществ. С целью модифицирования применялись реакции гидролиза, восстановления, алкилирования метилом, отщепления алкильных фрагментов. Структурные и конформационные изменения этих гуминовых производных оценены с использованием элементного анализа, эксклюзионной хроматографии (HPSEC), методом твердотельного ядерного магнитного резонанса (¹³C CP-MAS-ЯМР). Биологическую активность определяли по изменениям в строении корня и активации “протонного насоса” на примере томата и кукурузы. Все гуминовые производные показали высокую биологическую активность по сравнению с исходным образцом. Обнаружено, что

наиболее эффективны гуминовые вещества, окисленные перманганатом калия и алкилированные метилом. Зависимость между биологической активностью и молекулярной массой гуминовых веществ не выявлена. В то же время, индекс гидрофобности оказался важным параметром, по-видимому, из-за того, что гидрофобный домен гуминового вещества содержит биологически активные молекулы, подобные ауксинам. При контакте с органическими кислотами, поступающими из корня, нарушается гидрофобная оболочка и высвобождаются биологически активные компоненты.

Ранее отмечалось, что ГК, выделенные из алкилированных и дебитуминированных бурого угля и торфа, в больших количествах содержат ароматические и фенольные компоненты и проявляют повышенную биологическую активность к семенам пшеницы [3–6].

С другой стороны, считается [7], что биологическая активность ГК определяется их способностью участвовать в окислительно-восстановительных реакциях в растительной клетке согласно теории Баха – Паладина – Сент-Дьерди и зависит от содержания хиноидных групп и фенольных гидроксидов, а также от содержания свободных радикалов. Метод ЭПР позволяет регистрировать подобные свободные радикалы и парамагнитные центры (ПМЦ) при изучении бурых углей и ГК, извлекаемых из них.

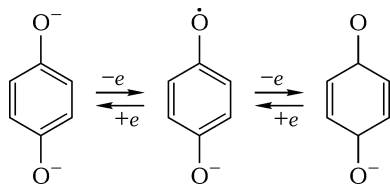


ТАБЛИЦА 1

Данные технического и элементного анализа углей и гуматов, мас. %

Образцы	W ^a	A ^d	V ^{daf}	C ^{daf}	H ^{daf}	O + N + S ^{daf} (по разности)
Тисульский лигнит (ТЛ)	8.04	6.11	48.14	64.34	4.69	30.97
ГК из гумата калия тисульского лигнита (ГумК ТЛ)	4.97	4.01	н/о	60.84	4.18	34.98
ГК Гум Na ТЛ	4.92	9.16	н/о	59.05	4.88	36.07
Естественно-окисленная форма тисульского лигнита (ЕОТЛ)	13.5	46.64	90.84	55.08	2.66	42.26
ГК Гум К ЕОТЛ	4.58	17.01	н/о	46.15	3.21	50.64
ГК Гум Na ЕОТЛ	6.99	15.15	н/о	61.58	5.35	33.07

Примечание. н/о – не определяли.

Гуминовые кислоты в виде водорастворимых форм принимают активное участие в окислительно-восстановительных процессах клетки, будучи, с одной стороны, источником активированного кислорода, с другой – акцептором водорода. Действие гуминовых удобрений обусловлено образованием новых количеств ГК при окислительно-гидролитической деструкции остаточных углей в почве.

Цель работы – определение физико-химических характеристик, группового состава и их связи с биологической активностью ГК в качестве стимуляторов роста сельскохозяйственных культур.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для исследования выбраны лигнит (бурый уголь) Тисульского месторождения Канско-Ачинского бассейна (ТЛ), его естественно-окисленная форма (ЕОТЛ) и полученные из них гуматы натрия (Гум Na) и калия (Гум К) (табл. 1). Гуминовые кислоты получали из гуматов натрия или калия осаждением из раствора при добавлении соляной кислоты [8].

Проведена наработка опытных партий гуматов натрия и калия из бурого угля и его естественно-окисленной формы. Исходные лигниты и гуматы охарактеризованы с использованием элементного и функционального анализа инструментальными методами: ¹H, ¹³C ЯМР-, ЭПР- и ИК-спектроскопией.

ИК-спектры объектов регистрировали на FTIR-спектрометре Bruker TENZOR-27.

Спектры ЭПР исследуемых образцов регистрировали при комнатной температуре на ЭПР-спектрометре Bruker EMX-m40X на частоте 9.86 ГГц. Условия записи ЭПР-спектров для всех образцов идентичны: уровень мощности 1.8–1.9 мВт, частота модуляции 100 кГц.

Спектры ^{13}C ЯМР высокого разрешения в твердом теле регистрировались на частоте 75 МГц с использованием стандартной методики кросс-поляризации и вращением под магическим углом (СРМАС). Химический сдвиг отсчитывался от тетраметилсилана. Спектры регистрировались на приборе Bruker Avance III 300 WB.

С целью съема ^{13}C и ^1H ЯМР-спектров в растворе точные навески ГК (50–55 мг) растворяли в 0.6 мл предварительно приготовленного раствора NaOH в D_2O (~0.5 М). С этой целью их перемешивали с помощью шейкера в течение 2 ч, а затем фильтровали в ЯМР-ампулы.

^{13}C и ^1H ЯМР-спектры в растворе регистрировали на приборе Bruker DRX-500 (рабочие частоты ^1H : 500.13 МГц, ^{13}C : 125.76 МГц).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам ИК-спектроскопии количественным методом сравнения относительных значений оптических плотностей D для частот в максимумах поглощения [9, 10] выявлены отличия в составе образцов ГК и углей (табл. 2). Исходный ТЛ по сравнению с естественно-окисленной формой (ЕОТЛ) характеризуется меньшей ароматичностью: $D_{1600/2920}$ равен 1.92 и 3.33 соответственно, что отражается на характере полученных ГК.

ТАБЛИЦА 2

Результаты ИК-спектроскопических исследований углей и гуматов

Образцы	$D_{1600/2920}$	$D_{1690/2920}$	$D_{3400/1690}$
	$\text{C}-\text{C}_{\text{ar}}/\text{C}-\text{H}_{\text{alk}}$	$-\text{C}=\text{O}/\text{C}-\text{H}_{\text{alk}}$	$-\text{OH} / -\text{C}=\text{O}$
ТЛ	1.92	н. д.	2.27
ГК Гум К ТЛ	0.83	0.45	1.49
ГК Гум Na ТЛ	0.83	1.45	2.33
ЕОТЛ	3.33	н. д.	н. д.
ГК Гум К ЕОТЛ	4.76	1.67	9.09
ГК Гум Na ЕОТЛ	2.86	6.67	3.85

Примечание. н. д. – нет данных.

Гуминовые кислоты из Гум К ЕОТЛ более ароматичны (4.76), чем ГК Гум К ТЛ (0.83). Кроме того, образцы ГК Гум К ЕОТЛ и ГК Гум Na ЕОТЛ более окислены ($D_{1690/2920} = 1.67$ и 6.67 соответственно), а отношение содержания гидроксильных групп к карбонильным у них выше. На основании этого можно сделать вывод, что в структурах образцов серии ЕОТЛ преобладают ароматические группировки и фенолы и в меньшем количестве содержатся окисленные алифатические соединения.

Данные ^{13}C ЯМР-спектроскопии [11, 12] в твердом теле подтверждают общую картину: ЕОТЛ и ГК из него имеют более ароматический характер (C_{ar}), больше содержат фенольных гидроксидов ($\text{C}_{\text{ar}-\text{O}}$), кислородсодержащих соединений ($\text{C}_{\text{O-alk-O}}$; $\text{C}_{\text{alk-O}}$) и меньше – алифатических соединений (C_{alk}) (табл. 3).

По данным ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии в растворе проведен сравнительный анализ

ТАБЛИЦА 3

Интегральные интенсивности характеристических спектральных областей и структурные параметры образцов углей и гуминовых кислот по данным ^{13}C ЯМР-спектроскопии

Образцы	Интегральные интенсивности, %, в спектральной области, м. д.							Структурные параметры		
	220–187	187–165	165–145	145–108	108–90	90–48	48–5	f_a	$f_{h/h}$	$f_{ar/al}$
	$\text{C}=\text{O}$	$\text{COOH}(\text{R})$	$\text{C}_{\text{ar}-\text{OH}}$	C_{ar}	$\text{C}_{\text{O-alk-O}}$	$\text{C}_{\text{alk-O}}$	C_{alk}			
ТЛ	4.40	4.70	4.20	19.10	3.50	7.50	55.60	23.30	0.33	0.35
ГК Гум К ТЛ	4.40	6.10	5.00	15.10	4.20	8.00	55.20	20.10	0.39	0.30
ГК Гум Na ТЛ	4.40	7.30	5.40	17.90	3.60	10.80	50.70	23.30	0.46	0.36
ЕОТЛ	2.60	6.00	8.90	31.90	5.40	12.70	30.30	40.80	0.57	0.84
ГК Гум К ЕОТЛ	3.80	6.70	9.50	33.10	6.30	14.00	25.40	42.60	0.69	0.93
ГК Гум Na ЕОТЛ	3.50	7.40	8.20	31.70	6.30	14.80	26.80	39.90	0.69	0.83

ТАБЛИЦА 4

Относительные интегральные интенсивности спектральных областей в ^{13}C и ^1H ЯМР-спектрах

Образцы	^{13}C ЯМР			^1H ЯМР
	C_{alk} (0–50 м. д.)	C_{ar} (100–150 м. д.)	COOH (190–170 м. д.)	$H_{\text{ar}}/H_{\text{alk}}$
ГК Гум К ТЛ	1.00	1.20	0.11	0.31
ГК Гум Na ТЛ	1.00	1.07	0.11	0.30
ГК Гум К ЕОТЛ	1.00	4.02	0.90	0.72
ГК Гум Na ЕОТЛ	1.00	2.38	0.93	0.63

функциональных групп по характеристичным областям химических сдвигов.

В ^{13}C ЯМР-спектрах присутствуют три основные области: “алифатическая” (C_{alk} ; 0–50 м. д.), “ароматическая” (C_{ar} ; 100–150 м. д.) и “карбоксильная” (COOH; 190–170 м. д.) (табл. 4). Образцы ГК Гум К ТЛ и ГК Гум Na ТЛ схожи между собой: соотношение интегральных интенсивностей в областях составило 1.00, 1.20, 0.11 и 1.00, 1.07, 0.11 соответственно. Образцы серии ЕОТЛ заметно отличаются от них: соотношение интегральных интенсивностей для ГК Гум К ЕОТЛ равно 1.00, 4.02, 0.90, а для ГК Гум Na ЕОТЛ – 1.00, 2.38, 0.93 соответственно.

В ^1H ЯМР-спектрах отношение “ароматической” (6–10 м. д.) к “алифатической” части (0–4 м. д.) равно 0.31–0.30 для образцов серии ТЛ и 0.72–0.63 для образцов серии ЕОТЛ.

Таким образом, по данным ЯМР- и ИК-спектроскопии, исходные угли и полученные из них ГК характеризуются различным структурно-групповым составом. Естественно-окисленная форма угля и извлеченные из нее ГК имеют более ароматический характер и содержат больше фенольных гидроксидов, что подтверждается и данными ЭПР-спектроско-

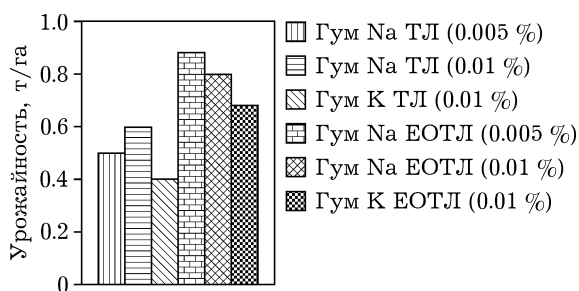


Рис. 1. Превышение урожайности голозерного овса сорта “Тайдон” над контролем при различных концентрациях гуматов натрия и калия, извлеченных из ТЛ и ЕОТЛ.

пии. Сигнал ЭПР органического синглета ЕОТЛ более узкий, его ширина равна $\Delta H_{\text{pp}} = 2.5\text{--}3.6$ Гс, что указывает на повышенное содержание ароматических фрагментов и кислородосодержащих функциональных групп. Уменьшение g -фактора в ряду ЕОТЛ (2.00316) < ТЛ (2.00334) связано с увеличением степени конденсированности ароматических фрагментов [13, 14].

С целью определения влияния ГК на продуктивность ряда сельскохозяйственных культур в 2011–2013 гг. проведены серии деляночных опытов на Атамановском стационаре ИПА СО РАН. В вегетационные периоды 2011–2013 гг. на опытных полях ГНУ Кемеровский НИИСХ в условиях черноземов Западной Сибири (Кемеровская обл.) испытание гуматов выявило стимуляцию роста и урожайности голозерного овса сорта “Тайдон”. Обработка

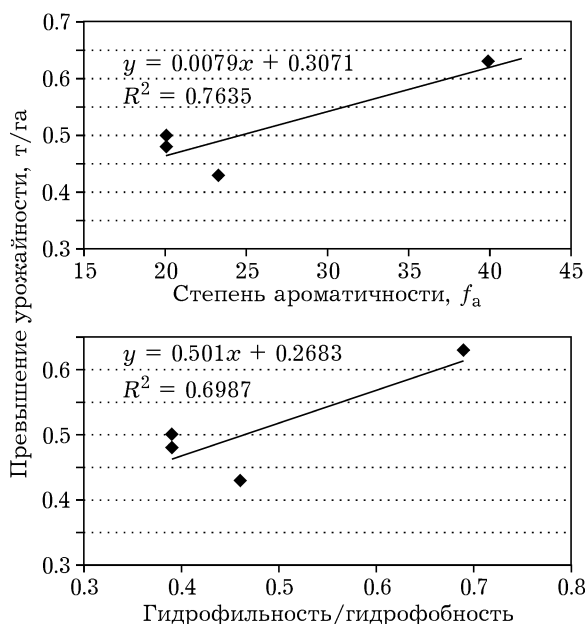


Рис. 2. Связь структурных параметров ^{13}C ЯМР и физиологической активности гуматов на примере голозерного овса сорта “Тайдон” (обработка семян).

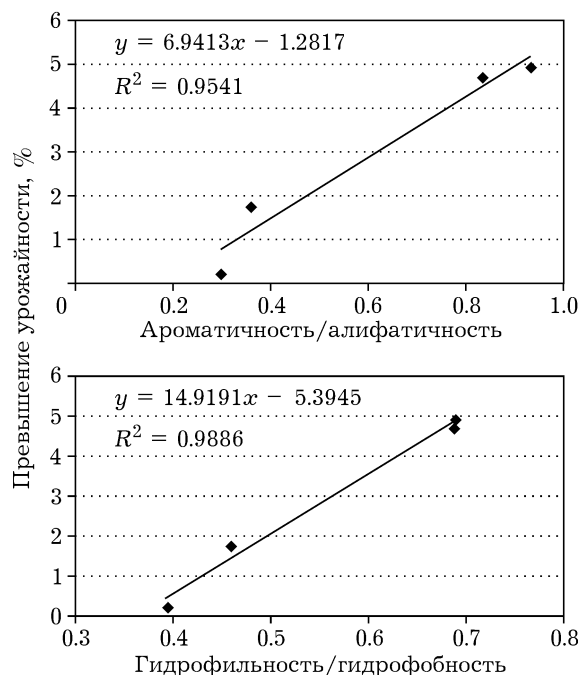


Рис. 3. Связь структурных параметров ^{13}C ЯМР и физиологической активности гуматов на примере пшеницы сорта “Новосибирская 89” (внесение с поливом).

гуматами производилась в двух независимых сериях: в первой серии семена перед посевом замачивали раствором гуматов на 1 сут, во второй серии гуматы вносили с поливом в почву после посева семян. Концентрация водных растворов гуматов в обеих сериях составляла 0.02 %. При тестировании биологической активности установлено [15–18], что гуматы натрия и калия, полученные из естественно-окисленного угля, на 13–17 % эффективнее их аналогов, полученных из обычного угля (рис. 1).

Отличия в физиологической активности ГК обусловлены в большой степени различиями в параметрах их функционального состава, что подтверждают результаты ^{13}C ЯМР-спектроскопии (см. табл. 3). На основании анализа литературных данных [1, 2, 7, 19] для обнаружения связи структурно-группового состава ГК с их физиологической активностью нами выбраны три параметра:

- 1) степень ароматичности $f_a = C_{\text{ar-OH}} + C_{\text{ar}}$;
- 2) гидрофильно-гидрофобный параметр $f_{h/h} = (C=O + \text{COOH(R)} + C_{\text{ar-OH}} + C_{\text{O-alk-O}} + C_{\text{alk-O}})/(C_{\text{ar}} + C_{\text{alk}})$;
- 3) ароматичность/алифатичность $f_{\text{ar/al}} = (C_{\text{ar-OH}} + C_{\text{ar}})/(C_{\text{O-alk-O}} + C_{\text{alk-O}} + C_{\text{alk}})$.

Физиологическая активность ГК, выявленная по увеличению урожайности зерновых культур (овса сорта “Тайдон” и пшеницы “Новосибирская 89”) прямо пропорциональна выбранным структурным параметрам [16, 20]. Получены графики зависимостей физиологической активности от структурных параметров и регрессионные уравнения (рис. 2, 3).

Установлено, что физиологическая активность ГК по отношению к испытанным зерновым культурам (овсу и пшенице) зависит от их функционального состава.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходные угли и полученные из них ГК обладают различным структурно-групповым составом. Естественно-окисленная форма угля и полученные из нее ГК имеют более ароматический характер и содержат больше фенольных гидроксильных групп. Образцы ГК из ЕОТЛ на 13–17 % эффективнее ГК из ТЛ. Установлено, что физиологическая активность ГК прямо пропорциональна следующим структурным параметрам: степени ароматичности f_a , гидрофильно-гидрофобному параметру $f_{h/h}$ и параметру, отражающему соотношение ароматических и алифатических фрагментов органической массы ГК (ароматичность/алифатичность) $f_{\text{ar/al}}$. Полученные результаты могут быть использованы для прогноза физиологической активности ГК.

В работе использовано аналитическое оборудование Центра коллективного пользования КемНЦ СО РАН. Авторы выражают глубокую признательность сотрудникам НИОХ СО РАН В. И. Маматюку и А. А. Нефедову за съемку и интерпретацию ^{13}C и ^1H ЯМР-спектров в растворах и Д. А. Соколову (ИПА СО РАН) и О. А. Исачковой (КемНИИСХ СО РАН за предоставление результатов полевых тестов).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Калабин Г. А., Каницкая Л. В., Кушнарев Д. Ф. Количественная спектроскопия ЯМР природного органического сырья и продуктов его переработки. М.: Химия, 2000. 408 с.
- 2 Dobbs L. B., Canellas L. P., Olivares F. L., Aguiar N. O., Peres L. E., Azevedo M., Spaccini R., Piccolo A., Facanha A. R. // J. Agricult. and Food Chem. 2010. Vol. 58, No. 6. P. 3681–3688.
- 3 Жеребцов С. И., Исмагилов З. Р. // Химия тв. топлива. 2012. № 6. С. 7–19.

- 4 Сивакова Л. Г., Жеребцов С. И., Смотрина О. В. // *Химия тв. топлива*. 2005. № 5. С. 24–30.
- 5 Жеребцов С. И., Моисеев А. И. // *Химия тв. топлива*. 2009. № 2. С. 12–21.
- 6 Жеребцов С. И., Мусин Ю. В., Моисеев А. И. // *Химия раст. сырья*. 2009. № 2. С. 125–130.
- 7 Кухаренко Т. А. // *Химия тв. топлива*. 1976. № 2. С. 24–31.
- 8 Орлов Д. С., Гришина Л. А., Ерошичева Н. Л. *Практикум по биохимии гумуса*. М.: Изд-во МГУ, 1969. 156 с.
- 9 Тер-Акопянц Л. Д., Половникова И. А. // *Химия тв. топлива*. 1980. № 1. С. 49–53.
- 10 Silverstein R. M., Webster F. X., Kiemle D. J. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 7th ed. NJ: John Wiley & Sons. Inc., 2005. 502 p.
- 11 Kalaitzidis S., Georgakopoulos A., Christanis K., Iordanidis A. // *Geochem. Cosmochim. Acta*. 2006. Vol. 70. P. 947–959.
- 12 Mao J.-D., Schimmelmann A., Mastalerz M., Hatcher P. G., Li Y. // *Energy and Fuels*. 2010. Vol. 24. P. 2536–2544.
- 13 Агапов А. И., Катунина Е. Е. // *Изв. Самар. научного центра РАН*. 2010. Т. 12, № 1(8). С. 2007.
- 14 Русьянова Н. Д. *Углекислоты*. М.: Наука, 2000. 316 с.
- 15 Zherebtsov S. I., Ismagilov Z. R. // *Turkey I National Humic Substance Congress*. Turkey, Sakarya. 2012. P. 719–724.
- 16 Соколов Д. А., Быкова С. Л., Нечаева Т. В., Жеребцов С. И., Исмагилов З. Р. // *Вестн. НГАУ*. 2012. № 3 (24). С. 25–30.
- 17 Быкова С. Л., Соколов Д. А., Нечаева Т. В., Жеребцов С. И., Исмагилов З. Р. // *Вестн. КузГТУ*. 2013. № 5. С. 58–61.
- 18 Жеребцов С. И., Мальшенко Н. В., Лыршиков С. Ю., Исмагилов З. Р., Неверова О. А., Соколов Д. А., Быкова С. Л., Исачкова О. А., Пакуль В. Н., Лапшинов Н. А. // *Вестн. КузГТУ*. 2014. № 5. С. 102–106.
- 19 Батуев Б. Ц., Золтоев Е. В., Бодоев Н. В., Быков И. П., Дашицыренова А. Д. // *Химия уст. разв.* 2005. Т. 13, № 4. С. 501–505.
- 20 Isachkova O. A., Ganichev B. L., Lapshinov N. A., Pakul V. N., Zherebtsov S. I., Ismagilov Z. R. // *Eastern Europ. Sci. J.* 2014. No. 3. P. 20–27.