

УДК 631.4

ЯМР-спектроскопия гуминовых кислот, полученных при механохимической обработке растительного сырья в водно-щелочных средах

Д. В. ДУДКИН, И. М. ФЕДЯЕВА, А. С. ЗМАНОВСКАЯ

Югорский государственный университет,
ул. Чехова, 16, Ханты-Мансийск 628012 (Россия)

E-mail: dvdudkin@rambler.ru

(Поступила 02.07.14; после доработки 18.11.14)

Аннотация

Впервые с применением ^{13}C ЯМР-спектроскопии исследованы гуминовые кислоты (ГК), полученные при механохимической переработке торфа и отходов лесопиления на территории Ханты-Мансийского автономного округа (ХМАО). Выявлены различия в функциональном составе полученных ГК в зависимости от типа используемого основания и химического состава вторичного растительного сырья. Установлены причины повышения физиологической активности ГК, полученных в результате санации вторичного растительного сырья в водно-щелочных средах.

Ключевые слова: гуминовые кислоты, элементный состав, функциональный состав, физиологическая активность, механохимическое воздействие

ВВЕДЕНИЕ

Количественная ^{13}C ЯМР спектроскопия – один из наиболее информативных методов физико-химического исследования химической природы гуминовых кислот (ГК) [1]. Применимость данного метода исследования в изучении функционального состава ГК подтверждена неоднократно [1–4]. На основе анализа численных интегральных интенсивностей уширенных сигналов спектра и результатов элементного анализа можно охарактеризовать функциональный состав химических групп, входящих в состав исследуемых ГК. Благодаря этому с минимальными трудозатратами можно получить достоверные и полные сведения о химическом строении исследуемых веществ.

Цель данной работы – изучение химического строения ГК, полученных в результате механохимического воздействия, методом количественной ЯМР-спектроскопии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектами исследования служили образцы ГК, полученные в результате гидродинамической кавитационной обработки (санации) водно-щелочных растворов торфа и продукта трибохимического окислительного аммонолиза древесины сосны обыкновенной (*Pinus Sylvestris*). Их механохимическая обработка проведена по методам, описанным в работах [5] и [6] соответственно.

В качестве торфяного сырья выбран наиболее распространенный на территории ХМАО и доступный для промышленной переработки слой верхового олиготрофного торфа Обь-Иртышской поймы со степенью разложения $R = 20\%$. Также исследован опил гидролизный сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) – преобладающий вид отходов лесопиления, которые образуются на территории ХМАО и в настоящее время не перерабатываются.

Образцы торфяного сырья подвергали санации, применяя в качестве щелочи растворы различной химической природы. Образец ГК № 2 получен с использованием водного раствора КОН, № 3 – NaOH, № 4 – NH₄OH.

Образец ГК № 5 на растительной основе опила гидролизного сосны обыкновенной получали путем его окислительного аммонолиза под действием (NH₄)₂S₂O₈ в условиях механохимического воздействия в виброцентробежной мельнице ВМ-30. Продукт окислительного аммонолиза высушивали, доводили до постоянной массы, подвергали санации в водном растворе КОН с концентрацией 1 моль/л в течение 10 мин и затем разделяли смесь центрифугированием. Санация продукта окислительного аммонолиза велась с использованием роторного кавитационного аппарата конструкции Петракова [7] с частотой вращения ротора 3000 мин⁻¹. Полученную суспензию разделяли центрифугированием, затем из жидкой фазы осаждали ГК, подкисляя 10 % раствором H₂SO₄ до pH 2. Последующие действия по выделению ГК проводили согласно методике, описанной в [8]. Для сравнительного анализа химического состава ГК исходного торфа, выделенной по методике [8], получен образец № 1 истинной (нативной) ГК.

Полученные образцы ГК исследовались методами элементного анализа и количественной ¹³C ЯМР-спектроскопии.

Элементный состав ГК определен на CHN-анализаторе фирмы EuroVector марки EA 3000 путем сжигания и последующего количественного анализа продуктов сжигания на содержание углерода, водорода и азота в навеске по методике, описанной в работе [9]. Массовую долю кислорода определяли по разности. Доверительный интервал ($a = 0.95$) рассчитан по формуле

$$\bar{x} \pm Z_{a/2} \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (1)$$

где x – среднее значение; $Z_{a/2}$ – коэффициент доверия; a – доверительная вероятность; σ – стандартное отклонение; n – размер выборки.

¹³C ЯМР-спектроскопия ГК проводилась по методике, описанной в [1]. Навеску образца ГК массой 20–50 мг растворяли в 0.5 моль/л NaOH/D₂O и помещали в ампулу с внешним диаметром 5 мм. Спектры ЯМР ¹³C получены на спектрометре Bruker DRX-500 на частоте 125.76 МГц. Для исключения ядерного эффекта Оверхаузера запись спектров ЯМР ¹³C проводилась с подавлением протонов в режиме INGATE. В качестве внешнего стандарта использовался тетраметилсилан (ТМС). Спектры снимались с задержкой между импульсами, равной 1 с.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для количественной оценки спектральных характеристик ГК использовались результаты анализа элементного состава (табл. 1).

Отнесение отдельных диапазонов химических сдвигов в спектрах ¹H и ¹³C ЯМР проведено в соответствии с работой [1]. Результаты количественного анализа препаратов методом ¹H и ¹³C ЯМР представлены в виде относительного содержания: $q_x = I_x/I_{\text{общ}}$ (табл. 2).

Качественный анализ спектров ЯМР ¹H и ¹³C показал, что фрагментный состав ГК различного происхождения представлен ароматическими и алифатическими фрагментами, а также широким набором функциональных групп: карбонильных, карбоксильных, сложноэфирных, фенольных, спиртовых и метоксильных. Основные отличия касаются коли-

ТАБЛИЦА 1

Элементный состав образцов ГК № 1–5

Образцы ГК	Содержание, % на обеззоленное вещество			
	С	Н	Н	О
1	55.27±0.40	5.34±0.08	3.56±0.01	35.53±0.16
2	57.95±0.28	6.42±0.15	1.99±0.21	33.64±0.64
3	57.76±0.08	6.16±0.07	2.25±0.03	33.53±0.06
4	41.50±1.16	5.18±0.12	1.51±0.02	51.51±0.43
5	55.13±0.14	6.20±0.02	3.86±0.10	34.51±0.09

ТАБЛИЦА 2

Параметры фрагментного состава образцов ГК № 1–4, определенные из спектров ^1H ЯМР

Фрагменты	Содержание в образцах, отн. %				Химический сдвиг, м. д.	Отнесение
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4		
$\text{H}_{\text{C}(\text{O})\text{OH}}$	–	–	–	–	14.0–12.0	
$\text{H}_{\text{OH}(\text{фен})}$	–	–	–	–	12.4–8.4	
$\text{H}_{\text{ар}}$	2.59	2.19	1.92	2.36	8.4–6.3	
$\text{H}_{\text{O-ал}}$	88.56	88.89	88.23	92.61	6.3–2.9	Группы CH , CHO , CH_2O , CH_3O , CHO углеводов
$\text{H}_{\alpha,\beta,\gamma}$	8.84	8.92	9.83	5.02	2.9–0.3	Группы CH , CH_2 , CH_3

Примечание. Прочерк – не обнаружено.

чественного содержания этих структурных фрагментов в ГК [2].

В табл. 2 и 3 приведены данные по относительному распределению атомов водорода и углерода в структурных фрагментах фракции ГК.

Детальный анализ данных спектров ^{13}C ЯМР показал, что содержание ароматических фрагментов в большинстве препаратов изменяется от 19 до 37 отн. % (см. табл. 3). По величине общей ароматичности f_a механохимически полученные ГК сопоставимы с гуминоподобными веществами, выделенными из оксиаммонизированных растительных остатков (25 отн. %), техническими лигнинами (25–27 отн. %) и ГК торфа (31–38 отн. %), но значительно отличаются от ГК почв и углей, для которых $f_a = 50$ –60 отн. % [10].

ТАБЛИЦА 3

Параметры фрагментного состава образцов ГК № 1–5 по данным спектров ^{13}C ЯМР

Фрагменты	Содержание в образцах, отн. %				
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
$\text{CO}_{\text{хин}}$	4.7	–	3.8	5.5	7.1
$\text{C}(\text{O})\text{OH}$	1.1	12.6	1.7	1.7	0.9
$\text{C}_{\text{неорг}}$	–	1.1	–	–	–
$\text{C}_{\text{ар}}-\text{O}$, $\text{C}_{\text{ар}}-\text{N}$	2.5	1.0	2.7	2.2	8.8
$\text{C}_{\text{ар}}-\text{C}, \text{H}$	22.0	23.0	22.5	16.2	28.5
$\text{C}_{1\text{угл}}$	8.1	–	11.9	9.4	1.4
$\text{C}_{\alpha,\beta-\text{O}-4}$	–	–	–	–	4.3
CHO , CHN	17.6	11.9	12.6	13.3	9.5
CH_2O	5.14	4.5	3.32	3.6	5.7
CH_3O	8.9	6.6	7.29	7.7	6.4
$\text{C}_{\text{алк}}$	30.3	45.2	34.1	40.3	27.4
f_a	24.5	24.0	25.2	18.4	37.3

Примечания. 1. f_a – общая ароматичность. 2. Прочерк – не обнаружено.

Наличие интенсивных сигналов с химическими сдвигами (ХС) 138 и 130–128 м. д. в диапазоне сигналов ароматических атомов углерода спектра свидетельствует о том, что полученные в условиях механохимического воздействия ГК содержат незамещенные (неокисленные) ароматические фрагменты.

Учитывая данные табл. 3 и специфику строения макромолекул лигнина травянистых и древесных растений, можно оценить содержание “лигнинной” компоненты в составе ГК. Ее наличие в ГК, полученных из древесины сосны (образец ГК № 5), подтверждается сигналами в диапазоне 93–80 м. д., которые соответствуют атомам углерода в связях α -O-4 и β -O-4 (Ca, β -O-4), а также сигналом групп CH_3O (~58 м. д.). За основу расчетов принято относительное содержание атомов углерода в спектре ^{13}C ЯМР, принадлежащих группам CH_3O . Оно соответствует числу атомов углерода метоксильных групп, приходящихся на одно ароматическое кольцо лигнинов травянистых растений ($n = 1, 2$) [2].

Долю ароматических атомов углерода, принадлежащих лигнину ($q_{\text{C}_{\text{ар}}}$), рассчитывали по формуле

$$q_{\text{C}_{\text{ар}}} = q_{\text{CH}_3\text{O}}(6/n) \quad (2)$$

Полученное значение $q_{\text{C}_{\text{ар}}} = 32$ –38.55 отн. % свидетельствует о том, что ароматическая часть молекул ГК представлена в основном продуктами окислительной конденсации фрагментов лигнина. При этом вовлеченность лигнинных фрагментов с наибольшим сохранением числа лигнин-лигнинных связей характерна для “молодых” ГК, полученных из древесины сосны.

Долю атомов углерода в связях α -O-4 и β -O-4 ($q_{\alpha,\beta-\text{O}-4}$), как и содержание атомов углерода метоксильных групп ($q_{\text{CH}_3\text{O}}$), опреде-

ТАБЛИЦА 4

Содержание функциональных групп в образцах ГК № 1–5

Функциональные группы	Содержание в образцах, %				
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
CO _{кет, альд}	–	–	–	–	–
CO _{хин}	6.17	–	5.16	7.12	6.89
COOH	2.39	12.6	3.72	3.42	1.43
C(O)OR	–	–	–	–	–
OH _{фен}	3.64	–	10.88	2.96	8.82
ОСН ₃	12.89	9.94	10.88	11.00	6.87

Примечание. Прочерк – не обнаружено.

ляли непосредственно из спектров ¹³C ЯМР (диапазон ХС 93–80 и 58–54 м. д.; см. табл. 3). Параметр q для лигнина ($q_{л}$) определяли как сумму долей атомов углерода, соответствующих фрагментам макромолекул лигнина:

$$q_{л} = q_{C_{ар}} + q_{CH_3O} + q_{\alpha,\beta-O-4} \quad (3)$$

Рассчитанное содержание лигнинной компоненты в ГК, полученных из древесины сосны, составило 34 отн. %. Для ГК, полученных в результате химической гумификации торфа, лигнин-лигнинные связи $\alpha,\beta-O-4$ не обнаружены, что указывает на отсутствие в структуре этих ГК лигнинных фрагментов.

Судя по соотношению ароматических и алифатических атомов углерода, рассчитанному как $C_{ар}/C_{ал} = f_a / (C_{алк} + CНО + CН_2O + CН_3O)$ в составе ГК преобладают алифатические структурные фрагменты: их содержание в 1.5–2 раза превышает содержание ароматических фрагментов. Так, для образца ГК № 1 $C_{ар}/C_{ал} = 0.46$, № 2 – 0.44, № 3 – 0.45, № 4 – 0.49, № 5 – 0.99. Образец ГК № 5, полученный с применением КОН, характеризуется большей ароматичностью. По-видимому, это связано с особенностями химического состава вторичного растительного сырья, использованного для его получения.

Анализ распределения углеродных атомов по различным типам в области ХС 103–96 м. д. (аномерные атомы углеводов) и 80–65 м. д. (фрагменты CНО и CН₂O) спектра ¹³C ЯМР ГК показывает, что в препаратах содержится значительное количество углеводных фрагментов. Содержание углеводов в препарате $C_{угл}$ можно определить как

$$C_{угл} = q_{угл}[C] - M_{угл}/12 \quad (4)$$

где $q_{угл}$ – доля аномерных атомов углерода в углеводных фрагментах, сигналы которых

находятся в области 103–94 м. д. спектра ¹³C ЯМР; $M_{угл}$ – молекулярная масса углеводных колец ($M_{угл}$ ксилозы = 150). Если принять за основу расчета относительное содержание аномерных атомов углерода в углеводных фрагментах спектра ¹³C ЯМР ($C1_{угл}$, см. табл. 3), то в пересчете на ксиланы и маннаны для образцов ГК № 2 и 5 количество углеводных фрагментов в ГК из древесины сосны равно 8.6 отн. %, а для ГК, полученных из торфа [2], оно составляет 64.7–85.9 отн. %.

В диапазоне алкильных атомов углерода спектра ¹³C ЯМР наблюдается интенсивный сигнал с ХС 29–30 м. д., что указывает на присутствие в составе ГК алифатических цепей с длиной цепи более 7 атомов углерода [10]. Следовательно, в формировании структуры ГК участвуют воскоподобные вещества торфа.

Многие свойства ГК и гуминоподобных веществ определяются типом и количеством функциональных групп в их составе. В табл. 4 приведены данные о содержании различных функциональных групп в полученных ГК.

В работе [11] на примере ГК, выделенных из различных природных объектов и гуминоподобных веществ вторичного органического сырья, выявлена тесная взаимосвязь между показателями физиологической активности и отношением количества активных функциональных групп и $C_{алк}O$ -фрагментов (гидрофильные фрагменты) к ароматической составляющей (гидрофобные фрагменты) в ГК. Увеличение общего количества полярных групп вследствие механохимического воздействия, наряду с близким количеством ароматических фрагментов, может указывать на возрастающую физиологическую активность полученных веществ в сравнении с ГК исходного торфа.

Благодаря этому полученные ГК могут оказывать хорошее ростостимулирующее действие при выращивании широкого спектра сельскохозяйственных культур [12]. Так, урожайность культур яровой и озимой пшеницы повысилась в среднем на 30–40 % при использовании полученных в результате санации ГК [13, 14].

Таким образом, сравнительный анализ фрагментного состава образцов ГК № 2–5 показал, что по составу полученные вещества наиболее близки к ГК верховых торфов с низкой степенью разложения [2]. От образца ГК № 1 они отличаются меньшим содержанием ароматических фрагментов и большим содержанием алкоксифрагментов. В них также определено очень высокое содержание гидрофильных фрагментов, что определяет их более высокую биологическую активность в сравнении с нативными торфяными ГК.

ВЫВОДЫ

1. Методом количественной ЯМР-спектроскопии выявлены особенности строения ГК, полученных в результате механохимической обработки растительного сырья в водно-щелочных средах. Установлено, что по химическому составу они схожи с нативными ГК верховых торфов Обь-Ирышской поймы, которые характеризуются низкой степенью разложения.

2. На основе результатов количественной ЯМР-спектроскопии исследованных ГК показано, что их высокая биологическая активность обусловлена увеличением общего количества полярных групп, наряду с практиче-

ски неизменным соотношением ароматических и алифатических атомов углерода в составе ГК, полученных различными способами.

3. Увеличение практического выхода ГК из растительного сырья в водно-щелочных средах при его механохимической обработке, вероятно, связано с трансформацией компонентов клеточной стенки растительных остатков посредством сложного набора сопряженных реакций окисления и конденсации, близких к процессу гумификации, который реализуется в природных условиях.

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. 407 с.
- 2 Федорова Т. Е. Количественная спектроскопия ЯМР ^{13}C , ^{17}O и физиологическая активность гуминовых кислот: Автореф. дис. ... канд. хим. наук. Иркутск, 2000. 24 с.
- 3 Ковалевский Д. В. Исследование структуры гуминовых кислот методами спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C : Дис. ... канд. хим. наук. М., 1998.
- 4 Сартаков М. П. // Химия раст. сырья. 2008. № 3. С. 135–139.
- 5 Пат. 2429214 РФ, 2011.
- 6 Пат. 2442763 РФ, 2012.
- 7 Пат. 2159901 РФ, 2000.
- 8 Орлов Д. С., Гришина Л. А. Практикум по биохимии гумуса. М.: Изд-во МГУ, 1969. 57 с.
- 9 Фадеева В. П., Тихова В. Д., Никуличева О. Н. // Журн. аналит. химии. 2008. Т. 63, № 11. С. 1197–1210.
- 10 Федорова Т. Е., Дудкин Д. В., Рохин А. В., Першина Л. А., Бабкин В. А. // Химия раст. сырья. 2003. № 4. С. 25–29.
- 11 Чернышева Н. И. Химическая модификация бурого торфяных гуминовых кислот: Автореф. дис. ... канд. хим. наук. Новомосковск, 2001. 24 с.
- 12 Шумейко М. В. // Горн. информ.-аналит. бюлл. 2008. № 10. С. 373–390.
- 13 Дудкин Д. В., Змановская А. С., Литвинцев П. А. // Вестн. Югор. гос. ун-та. 2013. № 3. С. 19–24.
- 14 Дудкин Д. В., Литвинцев П. А. // Изв. Оренбург. гос. аграр. ун-та. 2013. № 6(44). С. 47–50.