

УДК 631.631.417.2:631.42

УНИФИЦИРОВАННЫЙ ОБРАЗЕЦ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ЧЕРНОЗЕМА: ИЗГОТОВЛЕНИЕ, ВНУТРИ- И МЕЖЛАБОРАТОРНАЯ МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОСТАВА¹

© 2022 г. А. С. Фрид¹, В. А. Холодов¹, И. В. Перминова², Н. В. Ярославцева¹,
Н. А. Куликова³, Ю. Р. Фарходов^{1,3}, Б. М. Когут^{1,*}

¹Федеральный исследовательский центр “Почвенный институт им. В.В. Докучаева”
119017 Москва, Пыжевский пер., 7, Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет
119991 Москва, Ленинские горы, 1, Россия

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет почвоведения
119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12, Россия

*E-mail: kogutb@mail.ru

Поступила в редакцию 27.04.2022 г.

После доработки 07.05.2022 г.

Принята к публикации 12.08.2022 г.

Для системы контроля качества и безопасности применения гуминовых препаратов необходимы стандартные образцы состава и свойств, извлекаемые из разных почв, торфов, углей и т.п. В данной работе впервые в отечественной практике приготовлен образец гуминовых кислот, извлеченных из пахотного слоя типичного чернозема Курской области РФ, и охарактеризован по содержанию С, Н, N, зола, структурных групп методом ¹³С ЯМР, оптическим характеристикам поглощения в области 200–800 нм при рН 6.8. Медианная межлабораторная оценка содержания С составила 50.8, Н – 3.6, N – 3.3% (на сухое вещество с остаточной гигроскопической влагой). Более 50% структурных групп (по углероду) составили ароматические группы, что свидетельствовало о высокой гидрофобности гуминовых кислот.

Ключевые слова: гуминовые кислоты, чернозем, содержание С, Н, N, структурные группы, ¹³С ЯМР-спектроскопия.

DOI: 10.31857/S0002188122110060

ВВЕДЕНИЕ

В резолюции V съезда Общества почвоведов им. В.В. Докучаева (2008 г.) записано: “... обратить внимание на необходимость срочной разработки системы контроля качества и безопасности применения гуминовых препаратов в растениеводстве, животноводстве, медицине и других отраслях”. Многолетний опыт показывает, что центральной проблемой в этом случае является создание стандартных образцов (СО) гуминовых кислот (ГК), извлекаемых из разных почв, торфов, углей и т.п. Только наличие аттестованных СО ГК может решать проблему качества аналитической информации, в первую очередь ее правильности, проблему использования СО ГК в качестве калибровочных и контрольных образцов. Широкое распространение гуминовых препаратов в биологических целях (сельское хозяйство,

медицина) требует не только идентификации гуминовых препаратов как гуминовых веществ, но и наличия стабильных образцов с известными биологическими эффектами. Такими образцами также могут стать СО ГК.

Международное гуминовое общество (IHSS) имеет к настоящему времени 6 стандартных (standard) и 5 рекомендуемых (reference) образцов ГК [1], выделенных из речных и озерных вод, почвы, торфа и леонардита. Стандартные образцы отличаются от рекомендуемых более строгими условиями изготовления. В табл. 1 приведены характеристики состава этих образцов.

Ввиду отсутствия ошибок для приведенного элементного состава образцов ГК в целом (в расчете на сухое беззольное вещество) можно отметить следующее: 1 – содержание С варьирует в диапазоне 52.6–63.8% (без леонардита – до 59.5%), 2 – суммарное содержание С, N и H варьирует в диапазоне 58.1–68.7% (без леонардита –

¹ Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 14-26-00079 за 2014–2016 гг.

Таблица 1. Химический состав стандартных и рекомендуемых образцов ГК Международного гуминового общества

Источник извлечения ГК	Номер по каталогу	H ₂ O в воздушно-сухом образце, %	Зола в сухом образце, %	Содержание в сухом беззольном веществе, %							
				C	H	N	O	S	P	C+H+N	Сумма 6-ти элементов
Стандартные образцы											
Suwannee River-I	1S101H	10.0	3.10	52.55	4.40	1.19	42.53	0.58	<0.01	58.14	101.25
Suwannee River-II	2S101H	20.4	1.04	52.63	4.28	1.17	42.04	0.54	0.013	58.08	100.67
Elliott Soil	1S102H	8.2	0.88	58.13	3.68	4.14	34.08	0.44	0.24	65.95	100.71
Elliott Soil-IV	4S102H	7.62	0.44	59.51	3.20	3.90	32.16	0.47	—	66.61	99.24
Pahokee Peat	1S103H	11.1	1.12	56.37	3.82	3.69	37.34	0.71	0.03	63.88	101.96
Leonardite	1S104H	7.2	2.58	63.81	3.70	1.23	31.27	0.76	<0.01	68.74	100.77
Рекомендуемые образцы											
Suwannee River	1R101H	9.8	3.46	52.89	4.14	1.17	43.40	0.58	<0.01	58.20	102.18
Pahokee Peat	1R103H	10.4	1.72	56.84	3.60	3.74	36.62	0.70	0.03	64.18	101.53
Nordic Lake	1R105H	9.1	0.31	53.33	3.97	1.16	43.09	0.58	0.01	58.46	102.14
Summit Hill Soil	1R106H	8.1	1.41	54.00	4.84	5.13	37.90	0.64	0.40	63.97	102.91
Waskish Peat	1R107H	6.93	1.60	54.72	4.04	1.47	38.54	0.36	0.31	60.23	99.44

до 66.6%), 3 – сумма всех 6-ти элементов составила от 99.2 до 102.9%, т.е. можно предположить, что ошибка суммы не превышает 3%, 4 – имеется только 2 образца ГК, выделенных собственно из почв.

Помимо калибровочного применения очень важное практическое значение имеет знание реальных ошибок измерения состава гуминовых веществ (в первую очередь углерода и азота), полученных в процессе метрологической оценки и последующей аттестации состава СО ГК. Без знания этих ошибок невозможно статистически достоверно оценить различия в составе ГК в пространстве, во времени, в процессах различных модификаций [2]. Цель работы – получение образца гуминовых кислот из чернозема типичного и оценка его состава с помощью внутри- и межлабораторного эксперимента.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Массу типичного чернозема отбирали на территории многолетнего полевого опыта Почвенного института им. В.В. Докучаева (Курский НИИ АПП), заложенного в 1964 г. на старопаш-

хотном участке, в посеве ячменя в 2014 г. с глубины 0–15 см. Площадка отбора 10 × 10 м с координатами северо-западного угла 51°37.047'N 36°15.626'E, северо-восточного угла 51°37.046'N 36°15.629'E, центра площадки 51°37.046'N 36°15.629'E, где N – северная широта, E – восточная долгота (система позиционирования GPS – Global Position System).

Индивидуальные образцы массой 1–2 кг были отобраны на площадке случайным образом, общая масса почвы составила ≈200 кг. Из общей массы методом квартования получали средний образец массой ≈50 кг, который был использован для выделения гуминовых кислот.

Методика выделения описана в [3]. Для получения одной порции ГК брали навеску среднего образца почвы в 2 кг, декальцировали добавлением 1М HCl до установления в суспензии pH 1.0–2.0, затем добавляли 0.1 М HCl для достижения соотношения почва : раствор = 1 : 10 по массе. Полученную суспензию периодически перемешивали в течение 6 ч, оставляли на ночь, отделяли супернатант декантацией. Декальцированную почву нейтрализовали добавлением 1 М NaOH до

Таблица 2. Элементный состав проб из неусредненных порций ГК, %

Номер порции	Повторность	С	Н	N	Средние		
					С	Н	N
1	1	53.19	4.3	2.75	53.24	4.11	2.98
	2	53.29	3.92	3.11			
2	1	54.01	3.5	3.32	54.06	3.46	3.26
	2	54.12	3.42	3.2			
3	1	52.77	3.8	3.08	52.62	3.76	3.12
	2	52.46	3.72	3.16			
4	1	52.95	3.8	3.06	52.82	3.8	3.14
	2	52.69	3.8	3.22			
5	1	53.11	3.78	3.2	53.05	3.76	3.21
	2	52.98	3.73	3.22			
6	1	53.53	3.8	3.17	53.34	3.79	3.18
	2	53.15	3.78	3.18			
7	1	53.79	3.41	3.24	54.0	3.45	3.28
	2	54.21	3.49	3.32			
8	1	52.86	3.32	3.29	52.8	3.39	3.25
	2	52.75	3.46	3.24			
9	1	53.82	3.4	3.27	54.04	3.44	3.30
	2	54.25	3.47	3.34			
10	1	54.45	3.47	3.38	54.41	3.52	3.30
	2	54.37	3.57	3.22			
11	1	52.74	3.33	3.06	52.66	3.35	3.12
	2	52.58	3.36	3.17			
12	1	57.82	3.33	3.0	57.75	3.30	2.98
	2	57.69	3.27	2.97			
13	1	54.38	3.43	3.22	54.22	3.43	3.20
	2	54.07	3.43	3.19			
14	1	54.22	3.37	3.22	54.34	3.40	3.21
	2	54.47	3.43	3.2			
Размах варьирования		52.46–57.82	3.27–4.30	2.75–3.38	52.62–57.75	3.30–4.11	2.98–3.30
Доля размаха от среднего, %		9.7	27	21	9.3	22	10

pH 7.0, затем добавляли 0.1 М NaOH для достижения соотношения почва : раствор = 1 : 10 по массе. Суспензию периодически перемешивали в течение 6 ч и оставляли на ночь. Через 24 ч после начала щелочной экстракции супернатант отделяли декантацией и центрифугированием (5 мин при 3000 об./мин).

Гуминовые кислоты щелочной вытяжки отделяли от фульвокислот осаждением, подкисляя раствор 6 М HCl до pH 1.0–2.0 и центрифугируя. Осадок ГК вновь растворяли в минимальном объеме 0.1 М KOH, добавляли KCl (до концентрации калия 0.3 М) для коагуляции тонкодисперсных минеральных частиц, осадок отделяли центрифуги-

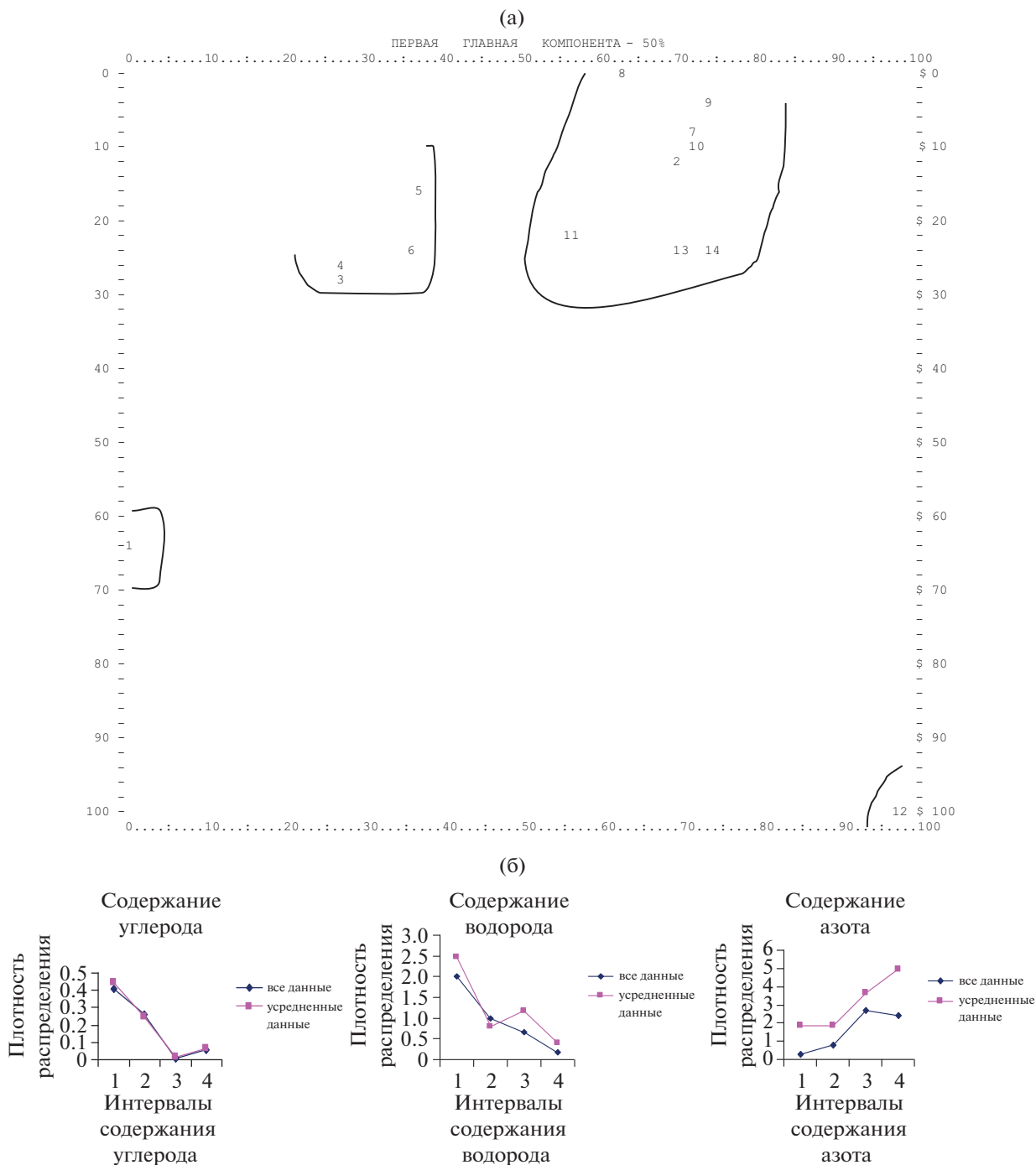


Рис. 1. Расположение 14-ти объектов (табл. 2) (в поле указаны их номера), охарактеризованными средними содержаниями С, Н, N – (а). По вертикали – 2-я главная компонента с долей общего варьирования 41%. Плотности распределения С, Н, N для выборки из 14-ти исходных порций ГК – (б).

гированием. Далее раствор ГК обрабатывали 0.1 М HCl + 0.3 М HF для осаждения и удаления кремнийсодержащих и других примесей. Полученную суспензию ГК очищали диализом, высушивали на роторном вакуумном испарителе при 40°C. Порошок (черного цвета) переносили в стеклянный тигель и сохраняли в темноте. Всего,

таким образом, было получено ≈20 порций ГК. Для сравнения состава порций из каждой из них были отобраны пробы для элементного анализа. Общая масса ГК составила 285 г.

Все процедуры получения образца ГК проведены в отделе биологии и биохимии почв Почвенного института им. В.В. Докучаева.

Таблица 3. Непараметрические характеристики содержаний С, Н, N и зольности (%) в ГК для различных выборок

Выборка	С			Н			N		
	медиана	квартили	68.3%	медиана	квартили	68.3%	медиана	квартили	68.3%
14 исходных порций	<u>53.6</u> 53.4–54.4	53.0–54.5	52.2–54.9	<u>3.52</u> 3.44–3.70	3.38–3.75	3.34–3.86	<u>3.19</u> 3.15–3.28	3.09–3.28	3.04–3.32
Средние для 14-ти порций	<u>53.8</u> 53.2–55.0	53.2–54.6	53.0–55.2	<u>3.51</u> 3.40–3.84	3.40–3.76	3.37–3.85	<u>3.19</u> 3.10–3.28	3.11–3.25	3.07–3.27
21 проба в одной повторности	<u>54.5</u> 54.35–55.0	54.3–54.9	54.2–55.0	<u>3.10</u> 3.01–3.24	2.99–3.23	2.94–3.28	<u>3.23</u> 3.17–3.31	3.13–3.31	3.08–3.35
12 проб в 4-х повторностях	<u>54.6</u> 54.4–54.8	54.3–54.9	54.2–55.0	<u>3.17</u> 3.09–3.26	3.03–3.29	2.98–3.33	<u>3.23</u> 3.20–3.28	3.14–3.32	3.08–3.37
Средние для 12-ти проб	<u>54.6</u> 54.45–54.97	54.4–54.8	54.4–54.8	<u>3.16</u> 3.10–3.25	3.10–3.22	3.09–3.24	<u>3.22</u> 3.185–3.29	3.18–3.27	3.16–3.30
Все измерения в 11-ти лабораториях	<u>50.8</u> 49.9–52.3	49.3–52.6	48.7–53.3	<u>3.76</u> 3.6–4.0	3.36–4.26	3.17–4.52	<u>3.28</u> 3.14–3.66	2.84–3.70	2.63–3.87
То же после отбраковки	–	–	–	<u>3.64</u> 3.47–3.90	3.32–3.94	3.19–4.08	<u>3.32</u> 3.06–3.58	2.94–3.64	2.81–3.83
	Зольность								
3 лаборатории	<u>2.08</u> 1.44–2.95	1.48–2.73	1.38–2.84						

Примечания. 1. 68.3% – квантили, соответствующие интервалу “среднее $\pm 1s$ (выборочное стандартное отклонение нормального распределения)”. 2. Под чертой приведены доверительные интервалы для медианы при уровне значимости 0.05.

Из общей массы ГК квартованием был получен средний образец массой 50 г. Этот образец был повторно усреднен квартованием с получением образца массой 3.5 г. Его гомогенизировали перетиранием в агатовой ступке в течение 30 мин, делили на 20 частей по 150 мг, дополнительно высушивали над CaCl_2 и фасовали в склянки из темного стекла, которые хранили с ограничением доступа воздуха в темноте. Склянки вскрывали непосредственно перед элементным анализом.

Оценку зольности препарата ГК проводили только в 3-х лабораториях, которые могли ее определять в микронавесках (ИНЭОС РАН, Почвенный стационар МГУ, ЦКП РУДН), причем разными методами.

Содержание углерода, азота и водорода в образцах ГК определяли на автоматических анали-

заторах методом сухого сжигания в 11-ти лабораториях разных организаций: Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова (две разные кафедры), Почвенный стационар Факультета почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова, Межвузовский центр коллективного пользования МГУ тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова (МЦКП МТХТ), Центр коллективного пользования РУДН (ЦКП ФХИ), Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН (ИНЭОС), Институт географии РАН (ИГ РАН), Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН (ИОНХ), Российский государственный университет нефти и газа им. И.М. Губкина (РГУ нефти и газа), Институт высокомолекулярных соединений РАН (ИВС), НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА (НИИ ГПЭЧ ФМБА).

Дополнительно на химическом факультете МГУ изучали структурно-групповой состав (методом ЯМР) и оптические свойства ГК. Спектры ^{13}C ЯМР регистрировали на приборе “Avance 400” при рабочей частоте 100 МГц и ширине развертки спектра 425 м.д., применяя импульсную последовательность CPMG со временем регистрации сигнала спада свободной индукции (ССИ) 0.2 с, релаксационной задержкой 7.8 с и шириной первого импульса 90° . Для исключения ядерного эффекта Оверхаузера широкополосная развязка от протонов была включена во время регистрации сигнала и выключена во время релаксационной задержки (импульсная техника INVGATE). Время регистрации спектра порядка 12 ч. Интервал времени релаксации выбран в соответствии с предшествующими исследованиями [4], показавшими, что интервалы между импульсными последовательностями порядка 8 с обеспечивают полную релаксацию четвертичных атомов углерода в гуминовых веществах. Навеску препарата ≈ 40 мг растворяли в 0.6 мл 0.3 М NaOD/D₂O и переносили в 5-мм ампулу для ЯМР.

Умножение сигналов ССИ на спадающую экспоненту с оптимальной для ЯМР-анализа ГК константой времени LB 100 гц, их Фурье-преобразование, фазирование преобразованных спектров и коррекцию базовой линии осуществляли при помощи программного обеспечения “MestRec”. Преобразованные спектры интегрировали по 9-ти интегральным интервалам, соответствующим основным структурным группам ГК [4].

Оптические свойства ГК исследовали методом спектрофотометрии в области поглощения ароматических колец (254 нм) при pH 6.8. Рассчитывали две характеристики: $SUVA_{254}$ (оптическая плотность, нормированная на концентрацию органического углерода и длину оптического пути [5]) и E_4/E_6 (отношение оптических плотностей при длинах волн 465 и 665 нм, что является характеристикой степени гумификации [6]).

Для статистического анализа результатов использовали параметрические и непараметрические методы согласно [7]. Доверительные интервалы для медианы оценивали по [8, 9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Рассмотрим сначала результаты элементного анализа проб из 14-ти исходных порций ГК до их усреднения, выполненного в двукратной повторности в одной лаборатории химического факультета МГУ (табл. 2).

Таблица 4. Результаты определений массовой доли углерода, водорода и азота в пробах усредненных ГК в одной лаборатории

№ пробы	C	H	N
	%		
1	54.19	2.87	3.20
2	54.16	2.93	3.28
3	54.76	3.30	3.21
4	55.16	3.10	3.39
5	54.42	3.04	3.29
6	55.12	3.32	2.93
7	55.11	3.04	3.42
8	54.44	2.99	3.34
9	54.40	3.25	3.40
10	54.64	3.21	3.19
11	54.95	2.92	3.25
12	54.21	2.98	3.15
13	54.66	3.42	2.98
14	53.92	3.11	3.12
15	54.37	3.21	3.25
16	55.12	2.99	3.08
17	54.26	3.11	3.14
18	55.01	3.22	3.31
19	54.44	3.19	3.23
20	54.06	3.01	3.21
21	54.79	3.07	3.24
Размах варьирования	53.92–55.15	2.87–3.42	2.93–3.42
Доля размаха от среднего, %	2.3	17	15

Для получения обобщенной картины были использованы метод построения дендрограмм сходства объектов и метод главных компонент с учетом всех 3-х определяемых элементов. Эти методы показали, что выборка распадается на 2 основные группы порций и 2–3 отстоящих от них порции (и для исходных данных, и для средних из 2-х повторностей) (рис. 1а). Из табл. 2 видно, что одной из наиболее выделяющихся является 12-я порция с максимальным содержанием С. Этот результат многомерного рассмотрения подтвердился и при построении плотностей распределения отдельных показателей (методом прямоугольных вкладов сглаживания гистограмм [10]) (рис. 1б). Показано, что ни по одному элементу нет даже унимодального распределения, не говоря уж о симметричном или нормальном. Поэтому характеризовать эти выборки имеет смысл непа-

Таблица 5. Результаты измерений элементного состава усредненных проб ГК с аналитическими повторностями в одной лаборатории

Номер пробы	Повторность				Среднее
	1	2	3	4	
С, %					
1	54.86	54.96	55.01	54.06	54.72
2	54.40	54.68	54.83	54.74	54.66
3	54.95	53.95	54.64	54.44	54.50
4	53.92	54.28	54.16	54.84	54.30
5	54.81	53.98	54.42	54.76	54.49
6	54.64	54.39	55.16	54.79	54.75
7	55.18	54.86	54.66	54.37	54.77
8	55.12	54.44	54.12	54.32	54.50
9	55.07	55.11	54.88	54.44	54.88
10	54.52	54.91	54.68	54.99	54.78
11	54.16	54.19	54.26	54.18	54.20
12	54.29	55.12	54.21	54.93	54.64
Размах варьирования	53.92–55.18				
Доля размаха от среднего, %	2.3				
Н, %					
1	3.22	3.02	3.22	3.01	3.12
2	3.25	2.89	3.01	3.21	3.09
3	2.92	3.29	3.21	3.14	3.14
4	3.11	3.35	3.37	3.00	3.21
5	3.21	3.32	3.04	3.30	3.22
6	3.10	2.98	3.10	3.07	3.06
7	3.28	3.20	3.42	3.21	3.28
8	2.99	2.99	3.41	3.21	3.15
9	3.26	3.04	3.39	3.19	3.22
10	3.27	2.98	3.39	3.26	3.23
11	2.93	2.87	3.11	3.42	3.08
12	3.15	3.32	2.98	3.04	3.12
Размах варьирования	2.87–3.42				
Доля размаха от среднего, %	17				
N, %					
1	3.36	3.14	3.31	3.21	3.26
2	3.40	3.22	3.41	3.41	3.36
3	3.25	3.23	3.19	3.46	3.28
4	3.12	3.03	3.33	3.23	3.18
5	3.04	3.20	3.29	3.21	3.19
6	3.15	3.36	3.39	3.24	3.29
7	3.20	3.35	2.98	3.25	3.20
8	3.08	3.34	3.14	3.22	3.20
9	3.04	3.42	3.16	3.23	3.21
10	3.21	2.98	3.24	3.10	3.13
11	3.28	3.20	3.14	3.26	3.22
12	3.23	2.93	3.15	3.40	3.18
Размах варьирования	2.93–3.46				
Доля размаха от среднего, %	16				

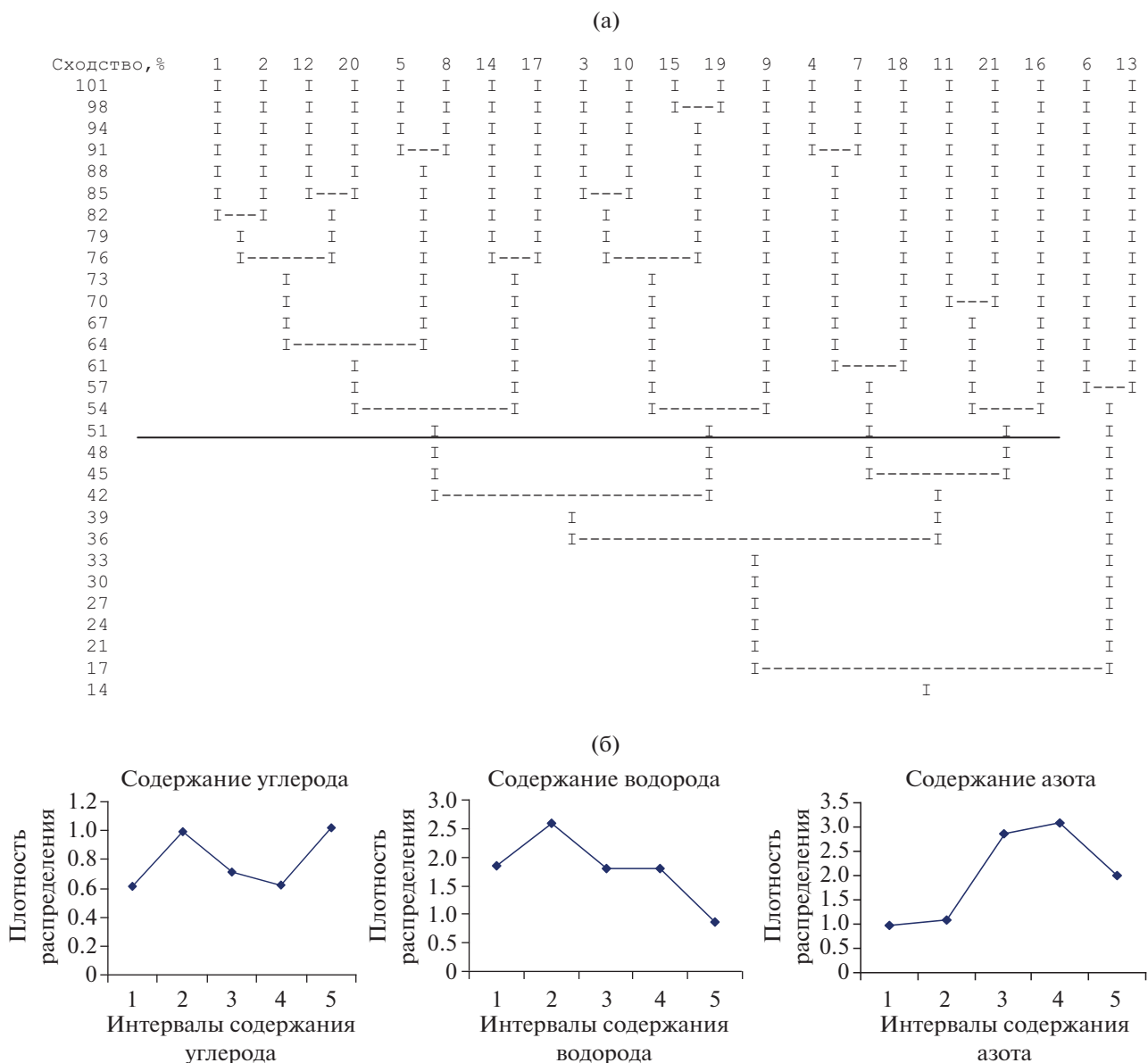


Рис. 2. Дендрограмма сходства проб ГК (табл. 4) по совокупности содержания С, Н, N – (а). Горизонтальная линия проведена на уровне сходства 50%. Номера проб сверху соответствуют табл. 4. Плотности распределения С, Н, N для выборки из 21-й пробы усредненных ГК в одной повторности – (б).

раметрически, через медианы и квантили (табл. 3). Однофакторный дисперсионный анализ также показал различия между собой порций ГК в целом при уровнях значимости 0.01 для С и Н и 0.05 – для N.

Исследование элементного состава усредненного образца ГК сначала было проведено также в одной лаборатории химфака МГУ в 2-х вариантах: 1 – от всей массы отбирали 21 пробу по 1 мг, которые анализировали один раз, 2 – от всей массы отбирали 12 проб по 1 мг и каждую анализировали 4 раза. Результаты первого варианта представлены в табл. 4, второго – в табл. 5.

Анализ табл. 4 методами построения дендрограммы сходства и главных компонент показал, что близость измерений по совокупности 3-х элементов невысока (на уровне сходства 50% выявилось 5 групп проб, рис. 2а), но отбраковать какую-то конкретную пробу не представлялось возможным, т.к. выпадающие крайние показатели содержаний С и Н принадлежат разным пробам. Такую сложную ситуацию подтвердило и построение графиков плотности распределения (рис. 2б), из которых видно, что только для N получено унимодальное распределение, а для С и Н выборка распадается на две части. Поэтому и ее охарак-

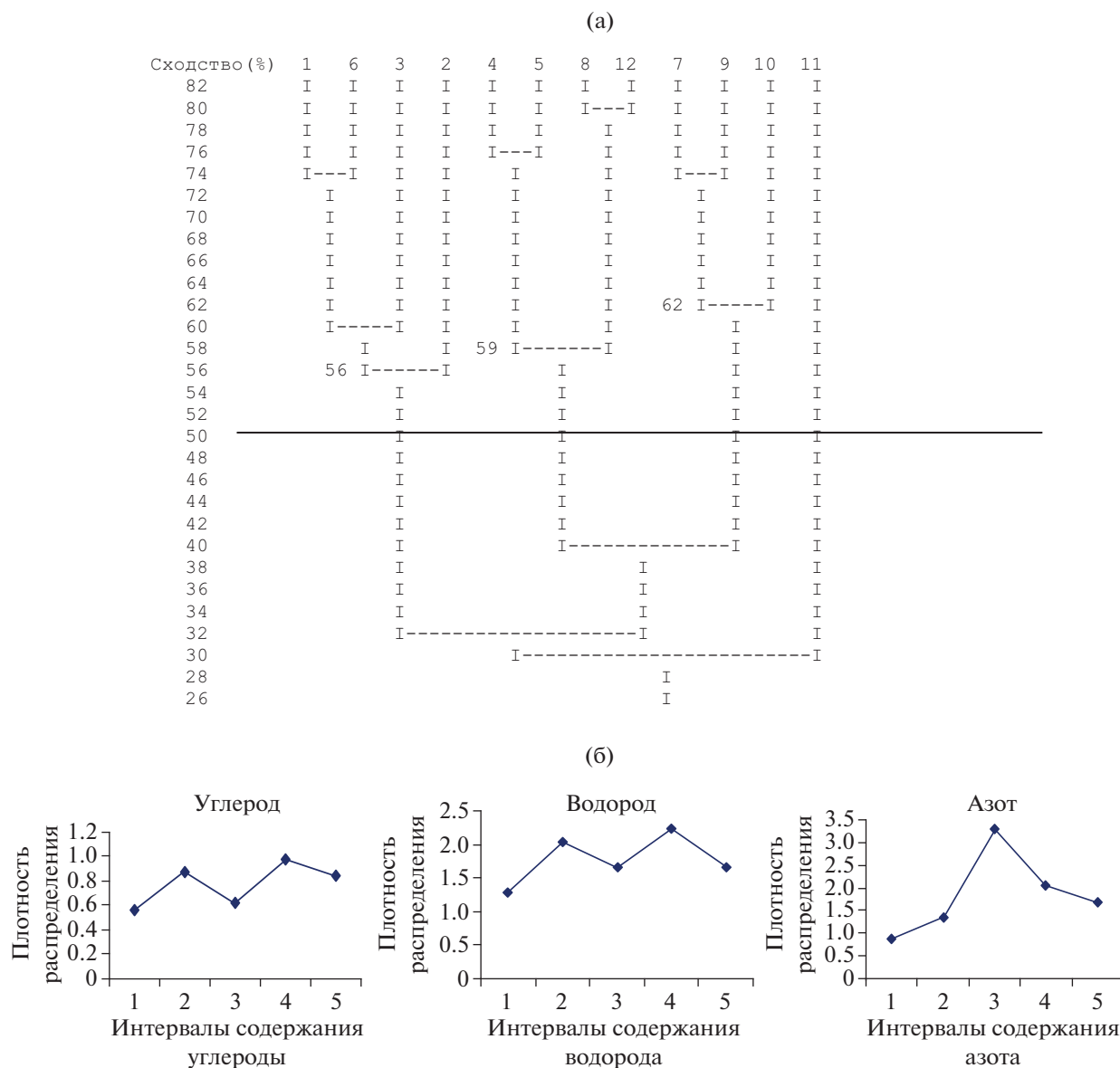


Рис. 3. Дендрограмма сходства 12-ти проб ГК для средних С, Н, N – (а). Горизонтальная линия соответствует уровню сходства 50%. Сверху указаны номера проб в табл. 5. Плотности распределения С, Н, N для выборки из 12-ти проб усредненных ГК в четырехкратной повторности – (б).

теризовали непараметрически (табл. 3). В случае азота можно дать приближенную оценку стандартного отклонения как половины размаха квантилей при вероятности 68.3% – получается 0.14% (это совпадает с доверительным интервалом для медианы).

Выборка табл. 5 еще более представительна, т.к. содержит повторные измерения проб. Однако полученная при комплексном анализе картина принципиально не отличалась от предыдущей (рис. 3а), на уровне сходства 50% выявили 3 группы проб. И это несмотря на то что однофакторный дисперсионный анализ не показал различий

между пробами (при уровне значимости 0.05) для каждого из 3-х элементов, т.е. разброс данных в целом соответствовал разбросу, связанному с повторностями – стандартные отклонения были равны 0.35% (С), 0.16% (Н), 0.13% (N). Последняя величина практически совпадает с указанной выше для выборки табл. 4. Однако более тонкое сопоставление с помощью величины HSP_{05} и попарных сравнений средних по t -критерию показало, что имеется ≈ 10 случаев (особенно для С и N), когда средние из повторений различались. Это объясняет распадение распределений выборки на 2 части для углерода и водорода (рис. 3б) и

Таблица 6. Результаты межлабораторного эксперимента по определению элементного состава усредненной массы ГК

Лаборатория	Повторность	Навеска, мг	С	Н	N
			%		
Химический факультет МГУ – 1	1		53.19	4.30	2.75
	2		53.29	3.92	3.11
	Среднее		53.24	4.11	2.93
ИОНХ РАН	1	0.767	52.38	5.22	3.71
	2	0.7	51.40	5.50	3.93
	3	0.924	50.64	4.65	3.93
	4	0.699	50.96	5.40	3.43
	Среднее		51.35	5.19	3.75
ИНЭОС РАН	1		49.73	4.02	3.00
	2		49.79	4.22	2.88
	3		50.07	4.27	2.92
	Среднее		49.86	4.17	2.93
МИТХТ	1	2.344	49.38	3.64	3.04
	2	3.026	49.19	3.56	3.00
	3	2.81	49.25	3.72	3.06
	Среднее		49.27	3.64	3.03
Почвенный стационар МГУ	1	2.081	47.78	3.36	3.53
	2	1.97	47.80	3.38	3.51
	3	2.139	47.68	3.35	3.52
	4	1.727	47.94	3.32	3.54
	Среднее		47.80	3.35	3.53
ЦКП РУДН	1		50.79	4.10	3.79
	2		48.61	3.84	2.12
	3		49.88	3.76	2.86
	4		50.19	3.55	2.40
	5		50.71	4.04	3.24
	Среднее		50.04	3.86	2.88
РГУ нефти и газа	1		53.803	3.313	3.57
	2		54.01	3.449	3.49
	Среднее		53.91	3.38	3.53
НИИ ГПЭЧ	1		52.07	2.995	3.748
	2		53.286	2.585	4.128
	3		52.069	3.16	3.84
	Среднее		52.48	2.91	3.91
Химический факультет МГУ – 2	1	0.888	54.38	3.77	3.47
	2	1.29	53.28	3.8	3.25
	3	1.85	53.04	3.69	3.25
	Среднее		53.67	3.75	3.32
Институт географии РАН	1	1.92	51.54	–	3.27
	2	2.125	48.26	–	3.04
	3	1.83	51.28	–	3.27
	Среднее		50.36	–	3.19
ИВС РАН	1		51.34	3.45	1.143
Размах варьирования			47.68–54.38	2.585–5.50	1.143–4.128
Доля размаха от среднего, %			13	78	90

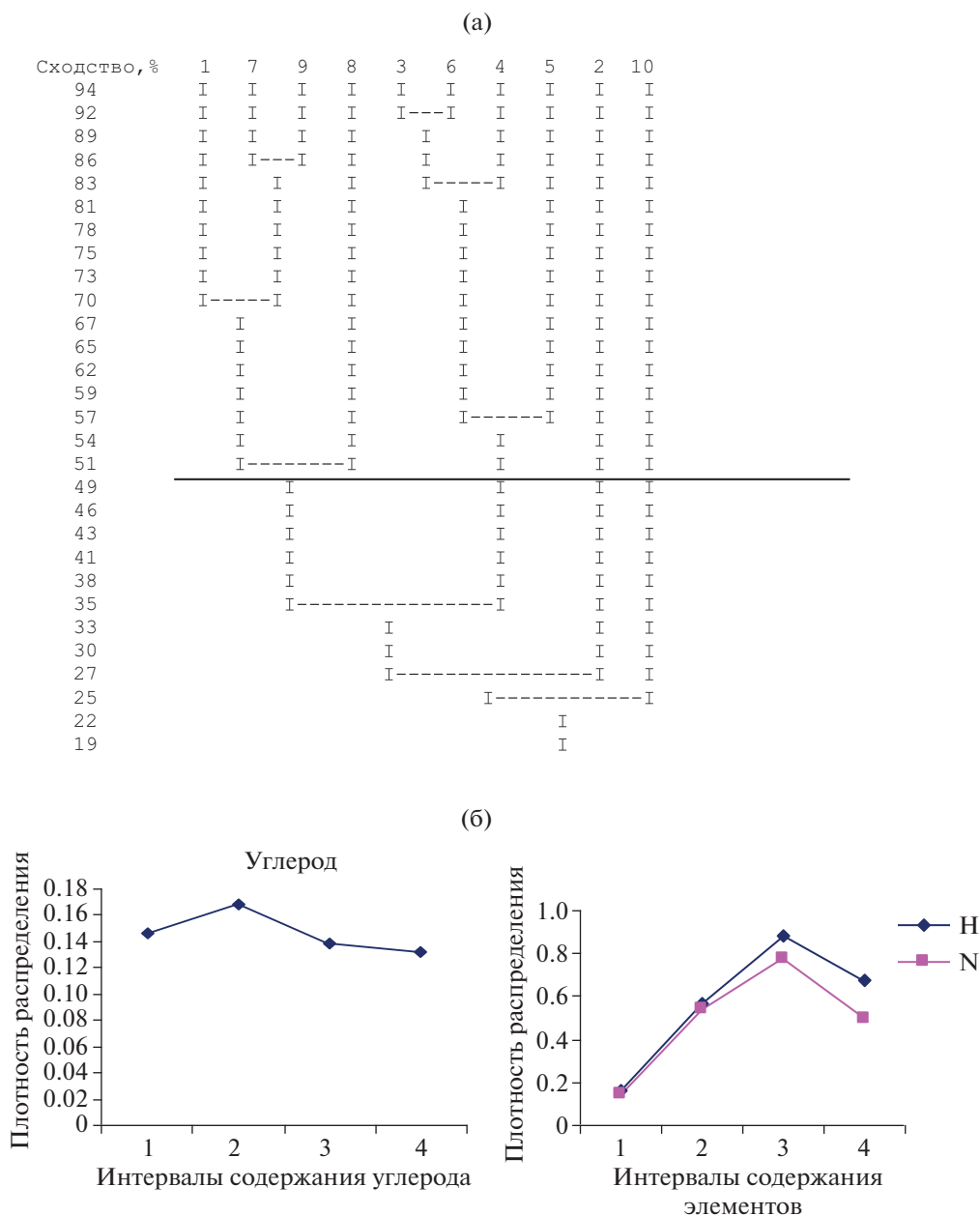


Рис. 4. Дендрограмма сходства средних С, Н, N по лабораториям межлабораторного эксперимента – (а). Горизонтальная линия обозначает уровень сходства 50%. Наверху указаны номера лабораторий. Плотности распределения С, Н, N для выборки усредненных проб ГК (Н и N после отбраковки по одной лаборатории) из 11-ти лабораторий – (б).

на несколько групп по совокупности 3-х элементов (рис. 3а). Непараметрические характеристики этой выборки представлены в табл. 3. Оценка стандартного отклонения для N дала величину 0.145%, что близко вышеуказанным оценкам.

Напомним, что все вышеприведенные измерения элементного состава ГК были проведены в одной лаборатории химфака МГУ на одном анализаторе. Могло быть 2 причины полученной бимодальности плотностей распределения и разде-

лений выборок проб ГК на группы: недостаточное усреднение массы ГК и неоднородность условий самого элементного анализа на автоматическом анализаторе. Из рисунков 1а–3а и табл. 3 следует, что после усреднения исходных порций ГК характеристики распределения стабилизируются, и размах варьирования уменьшается (кроме азота), варьирование имеет место во второй–третьей значащей цифре. Отсюда можно предположить, что сохраняющаяся при усредне-

Таблица 7. Результаты измерений зольности усредненного образца ГК чернозема

Лаборатория	Повторность	Зольность, %
ИНЭОС РАН	1	3.00
	2	2.88
	3	2.92
	Среднее	2.93
Почвенный стационар МГУ	1	1.22
	2	1.24
	3	1.23
	4	1.25
	5	1.24
	Среднее	1.24
ЦКП РУДН	1	2.65
	2	2.72
	Среднее	2.69

Таблица 8. Спектральные интервалы структурных групп гуминовых веществ

Структурная группа	Спектральный интервал, млн ⁻¹
Алкильный углерод –CH _n	0–48
Углерод метоксигрупп –CH ₃ O	48–58
Углерод в группах CH ₂ O	58–65
Углерод в группах CHO	65–90
“Аномерный” углерод –OCO	90–108
Ароматический углерод –C _{AR}	108–145
Ароматический кислород-замещенный углерод –C _{AR} O	145–165
Углерод карбоксильных и сложноэфирных групп –COO	165–187
Углерод карбонильных групп –C=O	187–220

нии массы ГК бимодальность связана скорее всего с неоднородностью условий элементного анализа.

Теперь рассмотрим межлабораторный эксперимент по элементному анализу усредненной массы ГК в 11-ти разных лабораториях (табл. 6). Многомерный взгляд (С, Н, N совместно) на полученный массив данных (дендрограмма сходства и метод главных компонент) (рис. 4а) показал (как по отдельным измерениям, так и после усреднения повторностей), что данные расположены довольно рыхло (доли от среднего для размахов показателей составили 13% для С, 78% – для Н, 90% – для N), результаты разных лабора-

торий почти не пересекаются, но и нет явных показаний к тому, чтобы отбраковать результаты какой-то лаборатории.

Однофакторный дисперсионный анализ показал (в отличие от предыдущих экспериментов) очень значимые различия средних содержаний элементов между лабораториями. Правда, этот вывод недостаточно надежен, т.к. тут явно не выполнена предпосылка дисперсионного анализа о равенстве дисперсий в лабораториях (последние различались на порядок и более). В то же время можно отметить, что несмотря на большой разброс данных, все распределения были унимодальными (в отличие от описанной выше ситуации). Непараметрические оценки характеристик распределений для элементов показаны в табл. 3.

Более подробное рассмотрение разброса средних для лабораторий показало, что для содержания С нет оснований браковать какую-либо лабораторию, для содержания Н можно отбраковать данные ИОНХ РАН (очень большие величины), а для содержания N – данные ИВС РАН (очень маленькие величины). После такой отбраковки средние для лабораторий для Н и N продолжали значительно различаться (дисперсионный анализ), хотя и слабее, а характеристики разброса данных сузились (табл. 3). На рис. 4б показаны графики соответствующих плотностей распределений (для Н и N после отбраковки).

Проанализируем полученные результаты оценок содержания С, Н, N в усредненном образце ГК, предназначенном для того, чтобы стать стандартным образцом. В такой ситуации на первое место выходит характеристика правильности (“степень близости между полученным результатом и истинным значением” [11]), так как характеристики варьирования могут быть уменьшены увеличением числа повторных измерений. Для характеристики стандартных образцов наиболее предпочтительно использовать несколько методов, а также привлечение нескольких лабораторий [12], поэтому будем далее опираться на результаты межлабораторного эксперимента.

Для содержания углерода межлабораторная оценка медианы почти на 4% абсолютных меньше внутрилабораторной, причем меньше и квантильные интервалы. Для содержания водорода, наоборот, межлабораторные оценки больше примерно на 0.5% абсолютных. Лучше ситуация с содержанием азота – межлабораторная оценка медианы больше всего на 0.1% абсолютных, но все внутрилабораторные квантильные интервалы лежат внутри межлабораторных. Напомним, что

Таблица 9. Структурно-групповой состав ГК чернозема (по данным ^{13}C ЯМР)

Спектральный интервал, млн ⁻¹										
0–48	48–58	58–65	65–90	90–108	110–145	145–165	165–187	187–220	108–165	58–108
Содержание углерода структурных групп, %										
CH_n	CH_3O	CH_2O	CHO	OCO	C_{AR}	$\text{C}_{\text{AR}}\text{O}$	COO	$\text{C}=\text{O}$	$\Sigma\text{C}_{\text{AR}}$	$\Sigma\text{C}_{\text{Carb}}$
7.0	2.9	1.3	7.7	5.4	45.6	10.0	13.8	6.3	55.6	14.4

только для азота распределения для усредненного образца ГК во всех случаях были унимодальными.

Чтобы сопоставить наши результаты с составом ГК Международного гуминового общества (табл. 1), понадобились дополнительные пересчеты их результатов от сухого беззольного вещества на вещество с золой и гигроскопической влагой. Тогда получаем для нашего образца ГК сумму $(\text{C} + \text{H} + \text{N}) = 57.8\%$, в стандартных образцах из почв Elliot – 60.0–61.2%, в рекомендуемом образце из почвы Summit Hill – 58.0%. С учетом ошибок пересчета и измерения эти величины близки; для остальных образцов ГК из табл. 1 (из рек, озер, торфов) эта величина меньше.

Зольность ГК определяли только в 3-х лабораториях (табл. 7), что связано с техническими причинами – возможностью определять зольность в микронавесках. Из табл. 7 видно, что 2 лаборатории получили сравнительно близкие результаты, а одна – значительно и значимо меньше. Из-за малого числа лабораторий вопрос об отбраковке не стоял, и были использованы непараметрические оценки с ожидаемо большой ошибкой для медианы (табл. 3).

Определение структурно-группового состава ГК провели методом спектроскопии ^{13}C ЯМР. Интегрирование спектров осуществляли при помощи программного обеспечения “Geltreat”, разработанного А.В. Кудрявцевым. Спектры интегрировали по 9-ти интервалам, соответствующим основным структурным группам согласно табл. 8 [13]. Полученные нами результаты представлены в табл. 9.

Из табл. 9 можно видеть очень высокую долю ароматического углерода (свыше 50% от общего). Такой структурно-групповой состав характерен для ГК чернозема [3] и свидетельствует о высокой гидрофобности образца ГК, что важно с позиций структурообразующей роли гуминовых веществ в почве.

Спектр оптического поглощения раствора из образца ГК, снятый в диапазоне 200–800 нм при рН 6.8, характеризовался плавным снижением оптической плотности с ростом длины волны и

отсутствием выраженных пиков, что типично для спектров поглощения гуминовых веществ. При концентрации ГК в растворе 6.4 мг/л (53.2% С) получено: SUVA_{254} 0.122 л/(мг см), E_4/E_6 3.89. Величина SUVA_{254} была близкой к верхней границе исследованных ранее ГК [13].

ВЫВОДЫ

1. Из пахотного чернозема типичного Курской обл. выделен образец гуминовых кислот (ГК), предназначенный для аттестации его в качестве стандартного образца.

2. Оценено содержание углерода, водорода, азота на автоматических анализаторах методом сухого сжигания. Медианы межлабораторной оценки составили для С 50.8%, Н – 3.6%, N – 3.3% (на сухое вещество с гигроскопической влагой).

3. Определены зольность образца ГК (медиана 2.1%), содержание структурных групп методом ^{13}C ЯМР (ароматического углерода >50%), оптические характеристики поглощения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сайт: <http://www.humicsubstances.org/sources.html>
2. *Большаков В.А., Фрид А.С.* К вопросу об интерпретации химико-аналитических измерений в почвоведении // Почвоведение. 2002. № 6. С. 693–696.
3. *Холодов В.А., Ярославцева Н.В., Константинов А.И., Перминова И.В.* Препаративный выход и свойства гуминовых кислот при последовательных щелочных экстракциях // Почвоведение. 2015. № 10. С. 1222–1231.
4. *Ковалевский Д.В., Пермин А.Б., Перминова И.В., Петросян В.С.* Выбор условий регистрации количественных ^{13}C ЯМР-спектров гумусовых кислот // Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия. 2000. № 41. С. 39–42.
5. *Traina, S.J., Spontak D.A., Logan T.J.* Effects of cations on complexation of naphthalene by water-soluble organic carbon // J. Environ Qual. 1989. V. 18. С. 221–227.
6. *Кононова М.М.* Органическое вещество почв. М.: Изд-во АН СССР, 1963. 314 с.

7. Метрологическое обеспечение аналитических работ в почвоведении: методические рекомендации / Сост. В.А. Большаков, А.С. Фрид, С.Е. Сорокин. М.: Почв. ин-т им. В.В. Докучаева, 1988. 112 с.
8. Ликеш И., Ляга Й. Основные таблицы математической статистики. М.: Финансы и статистика, 1985. 358 с.
9. Благовещенский Ю.Н., Самсонова В.П., Дмитриев Е.А. Непараметрические методы в почвенных исследованиях / Под ред. Карпачевского Л.О. М.: Наука, 1987. 94 с.
10. Алгоритмы и программы для ЭВМ СМ-4 / Под ред. Фрида А.С. М.: Почв. ин-т им. В.В. Докучаева, 1985. 108 с.
11. Рекомендации и номенклатурные правила ИЮПАК по химии. М.: Наука, 2004. 158 с.
12. ГОСТ ISO Guide 35-2015. Стандартные образцы. Общие и статистические принципы сертификации (аттестации).
13. Перминова И.В. Анализ, классификация и прогноз свойств гумусовых кислот: Дис. ... д-ра хим. наук. М., 2000. 359 с.

Unified Sample of Humic Acids of Chernozem: Production, Intra- and Inter-Laboratory Metrological Characteristics of the Composition

A. S. Frid^a, V. A. Kholodov^a, I. V. Perminova^b, N. V. Yaroslavtseva^a,
N. A. Kulikova^c, Yu. R. Farkhodov^{a,c}, and B. M. Kogut^{a,#}

^a*Federal Research Center "V.V. Dokuchaev Soil Institute"
Pyzhevsky p. 7, Moscow 119017, Russia*

^b*M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry
Leninskie Gory 1, p. 3, Moscow 119991, Russia*

^c*M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Soil Science
Leninskie gory 1, p. 12, Moscow 119991, Russia*

[#]*E-mail: kogutb@mail.ru*

For the system of quality control and safety of the use of humic preparations, standard samples of composition and properties extracted from different soils, peat, coal, etc. are required. In this work, for the first time in domestic practice, a sample of humic acids extracted from the arable layer of typical chernozem of the Kursk region of the Russian Federation is prepared and characterized by the content of C, H, N, ash, structural groups by ¹³C NMR, optical absorption characteristics in the region of 200–800 nm at pH 6.8. The median interlaboratory assessment of the C content was 50.8, H – 3.6, N – 3.3% (for dry matter with residual hygroscopic moisture). More than 50% of the structural groups (by carbon) were aromatic groups, which indicated the high hydrophobicity of humic acids.

Key words: humic acids, chernozem, C, H, N content, structural groups, ¹³C NMR spectroscopy.