

3rd Student Workshop on Ecology and Optics of Coastal Zones

10 - 13 July 2017

Museum of the World Ocean, Kaliningrad, Russia

54°44'N 20°29'E

**SOIL HUMIC ACIDS:
MACROMOLECULS OR
SUPRAMOLECULAR COMPLEX?**

*Trubetskoj O.A. *, Trubetskaya O.E. ***

**Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences,
Pushchino, Moscow region, Russia*

*** Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, Russia*

The content of HS in various ecosystems

Soils	1-12%
Coal, peat, sapropel	65%-95%
Seas and oceans	0,1-3,0 mg/L
Rivers and lakes	2- 20 mg/L
Swamps	Up to 200 mg/L

Hypothetical models of the humic substances structure

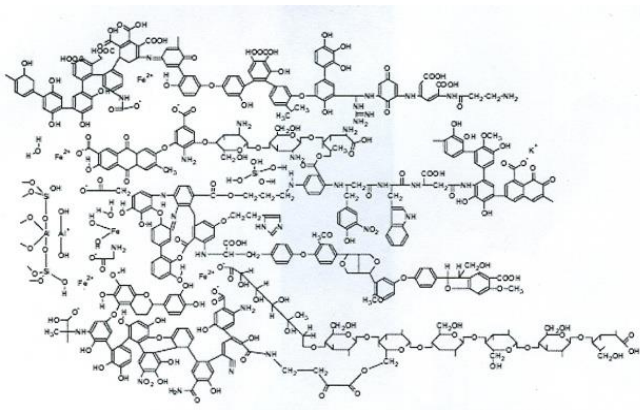
Macromolecular model

Humic substances

Oxidation by KMnO_4 , CuO ,
etc.;
Pyrolysis;
Acid hydrolysis by 6N HCl



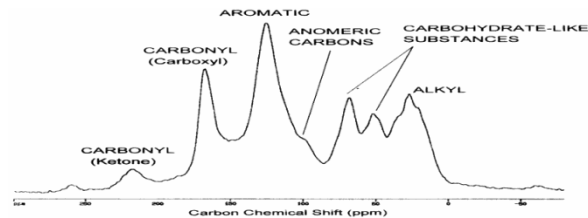
Benzenepolycarboxylic and
phenolpolycarboxylic acids
carbohydrates, amino acids



Supramolecular model

Humic substances

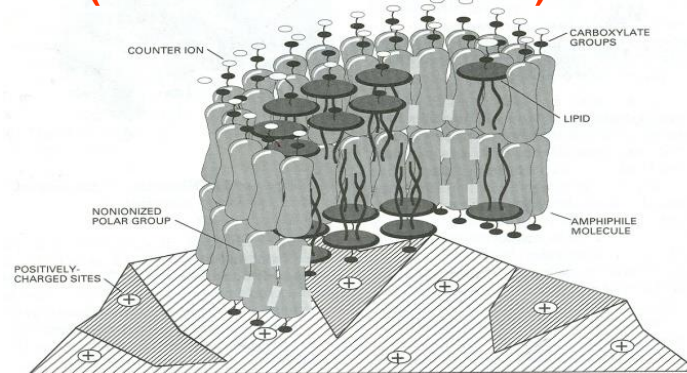
^{13}C -NMR



Benzenepolycarboxylic and
phenolpolycarboxylic acids
carbohydrates, amino acids

+

fatty acids and alkanes
(40-60% of the total mass)



Д. С. ОРЛОВ ХИМИЯ
ПОЧВ

Допущено Министерством высшего и среднего специального образования СССР в качестве учебника для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности «Агрохимия и почвоведение»

ИЗДАТЕЛЬСТВО
МОСКОВСКОГО
УНИВЕРСИТЕТА
1985

воноидами и другими природными соединениями, содержащими ароматические ядра.

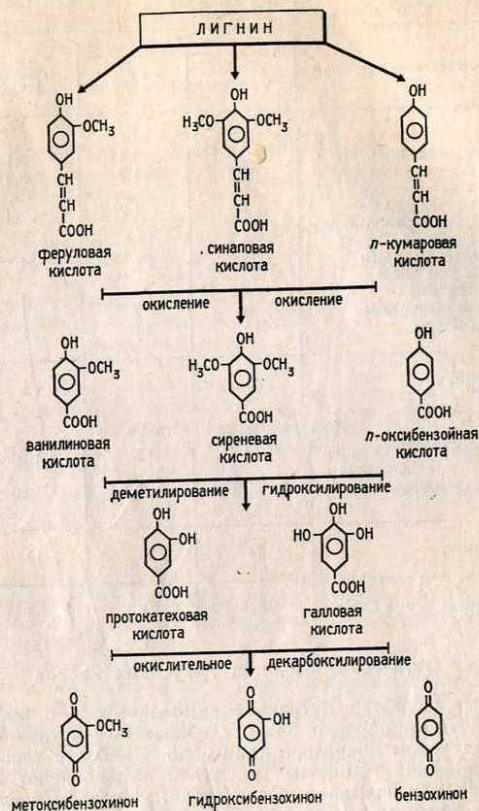


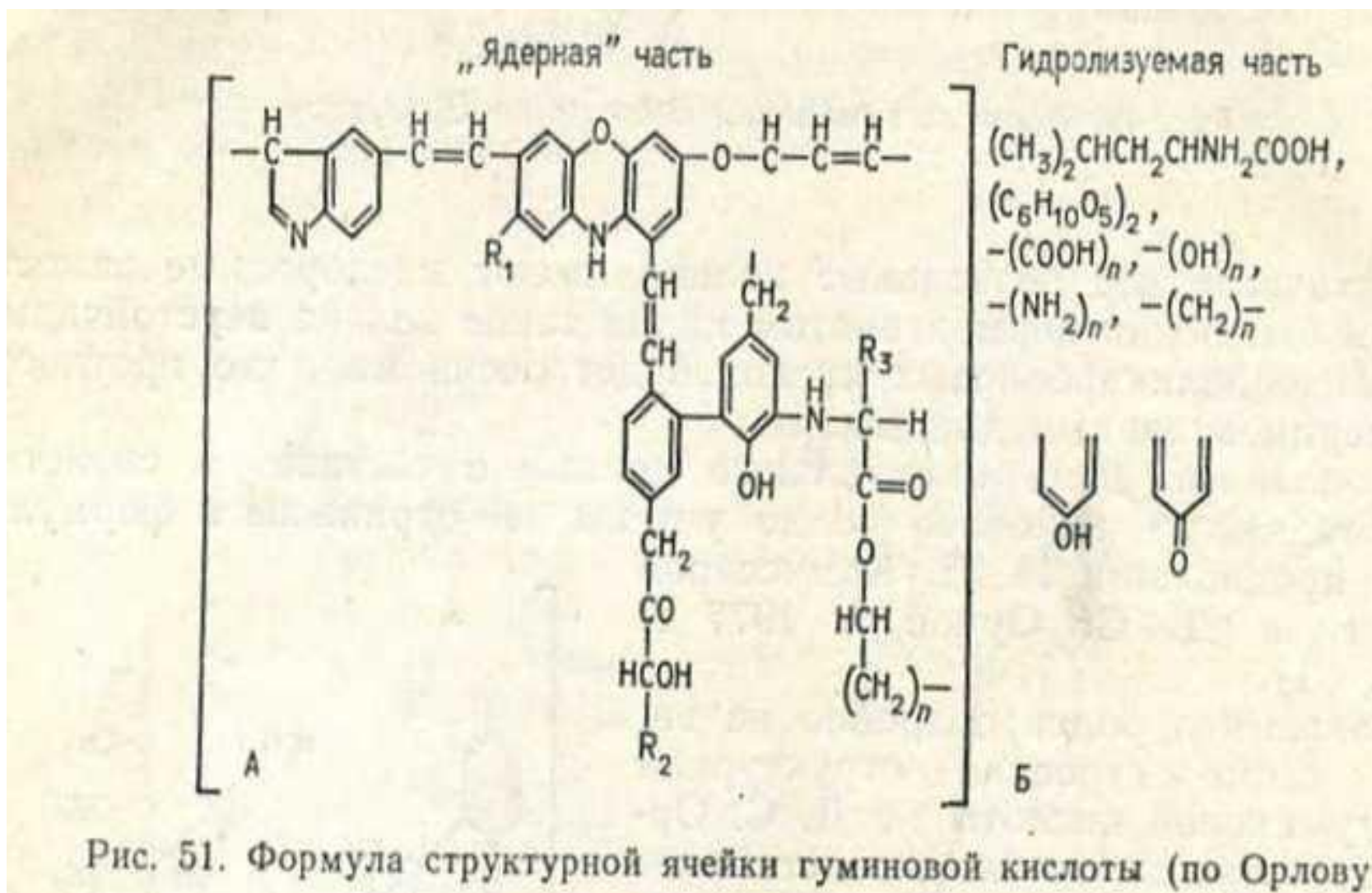
Рис. 42. Этапы распада лигнина (по Фляйгу)

Баланс структурных фрагментов. Кроме моносахаридов, аминокислот и БПК в продуктах расщепления гумусовых веществ найдены нормальные алканы, жирные кислоты и некоторые другие соединения, но содержатся они в очень малых количествах и практически не учитываются при подведении баланса.

Общая сумма идентифицируемых веществ составляет 60–70% от массы фульвокислот и 65–90% от массы гуминовых кислот (табл. 54). Компоненты гидролизуемой части идентифицируются почти полностью. Следует иметь в виду, что при любых методах выход продуктов деградации практически никогда не бывает 100%-ным от теоретического, поэтому данные табл. 54 можно считать пригодными для построения общей схемы строения ГК и ФК.

Баланс структурных фрагментов гумусовых кислот,
% к веществу

Структурные фрагменты	ГК		ФК (различные почвы)
	чернозем	дерново-подзолистая почва	
Гидролизуемая часть ГК			
Аминокислоты, всего	5,8	8,4	6,1
в том числе основные	0,8	1,2	0,2
Аминосакхара	1,9	1,9	3,3
Вещества типа фульвокислот	6	7	—
Углеводы, всего	29	27	44
в том числе			
пентозы	6	6	4
метилпентозы	8	7	16
гексозы	15	14	24
Сумма	44	46	55
Негидролизуемая часть ГК			
Ароматические продукты окисления	42	17	10,5
Аминокислоты	1,9	2,8	2,0
Сумма	44	20	13
Общая сумма	88	66	68



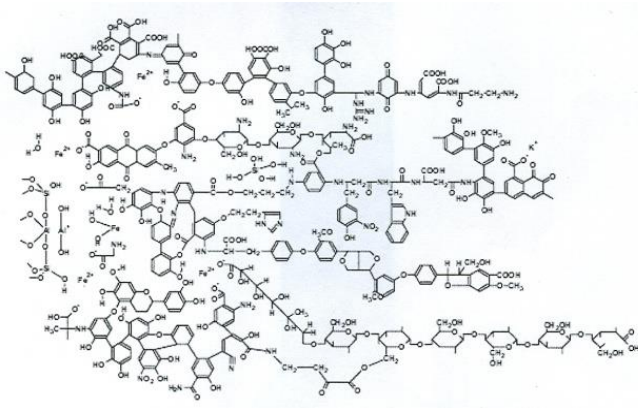
Hypothetical models of the humic substances structure

Macromolecular model

Humic substances

Oxidation by KMnO_4 , CuO , etc.,
pyrolysis,
acid hydrolysis by 6N HCl

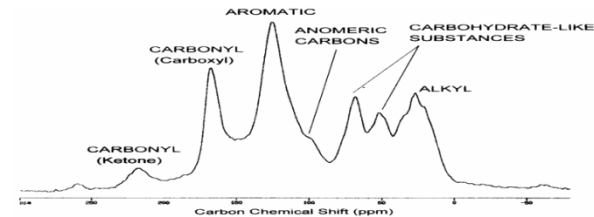
Benzenepolycarboxylic and phenolpolycarboxylic acids
carbohydrates, amino acids



Supramolecular model

Humic substances

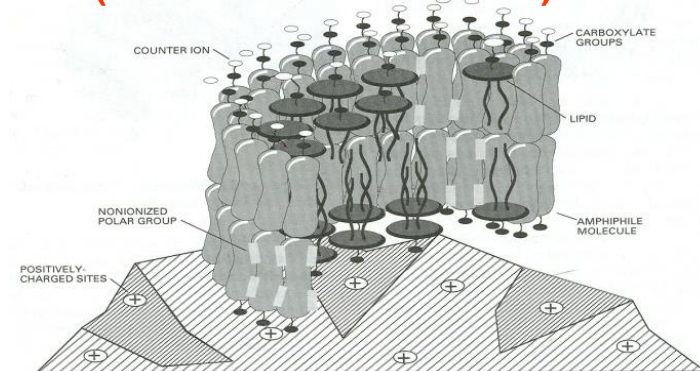
^{13}C -NMR



Benzenepolycarboxylic and phenolpolycarboxylic acids
carbohydrates, amino acids

+

fatty acids and alkanes
(40-60% of the total mass)



The term "supramolecular chemistry" was introduced in 1978 by Nobel Prize winner Jean-Marie Len and is defined as "chemistry describing complex formations that are the result of the association of two (or more) chemical particles bound together by intermolecular non-covalent bonds".

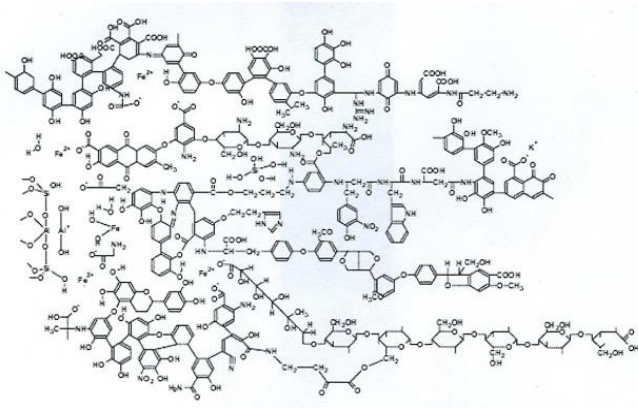
Hypothetical models of the humic substances structure

Macromolecular model

Humic substances

Oxidation by KMnO_4 , CuO , etc.,
pyrolysis,
acid hydrolysis by 6N HCl

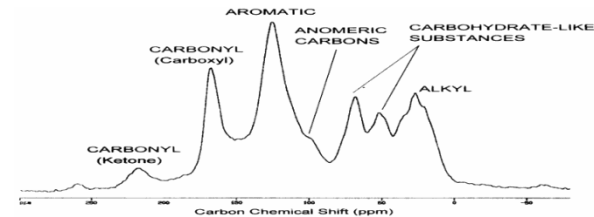
Benzenepolycarboxylic and phenolpolycarboxylic acids
carbohydrates, amino acids



Supramolecular model

Humic substances

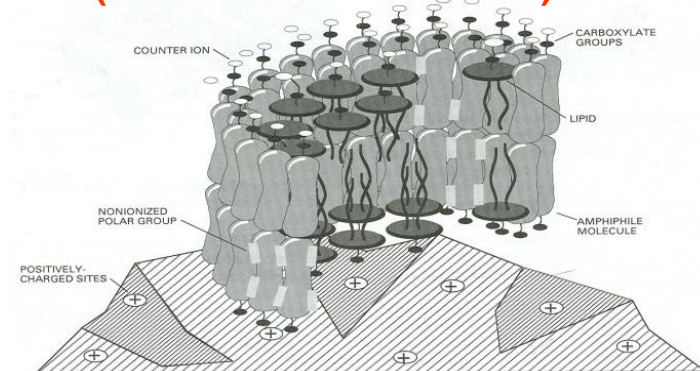
^{13}C -NMR



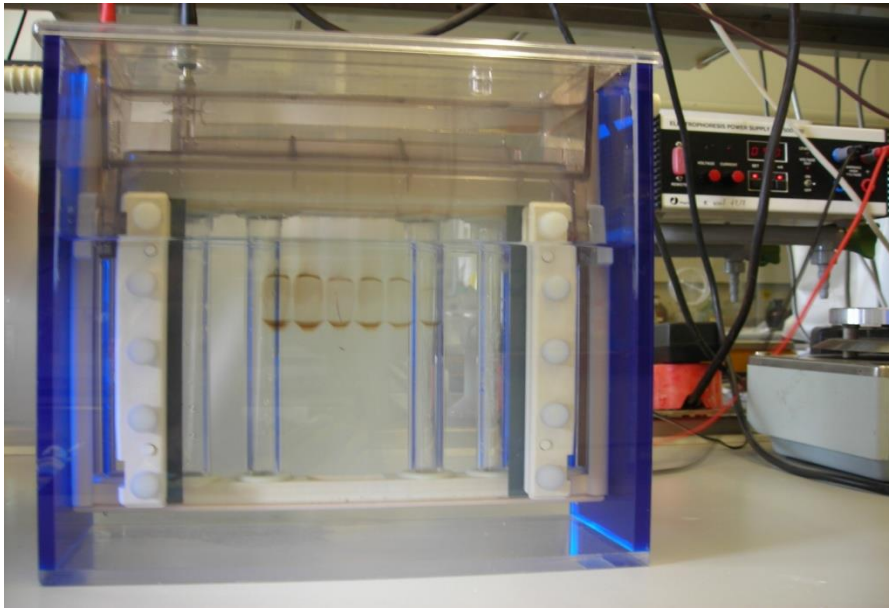
Benzenepolycarboxylic and phenolpolycarboxylic acids
carbohydrates, amino acids

+

fatty acids and alkanes
(40-60% of the total mass)



Electrophoresis of chernozem HA in 10% PAG with detection in visible and UV light

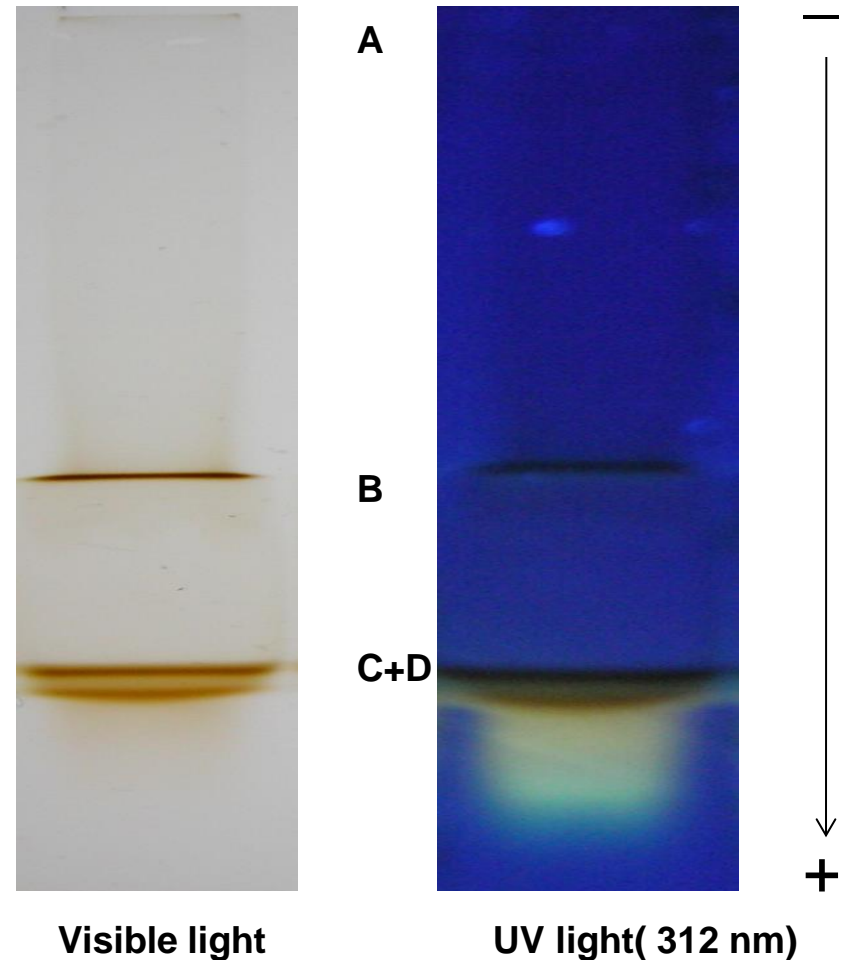


Trubetskoj et al., 1992, *Soil Biol.Biochem* 24, 893-896

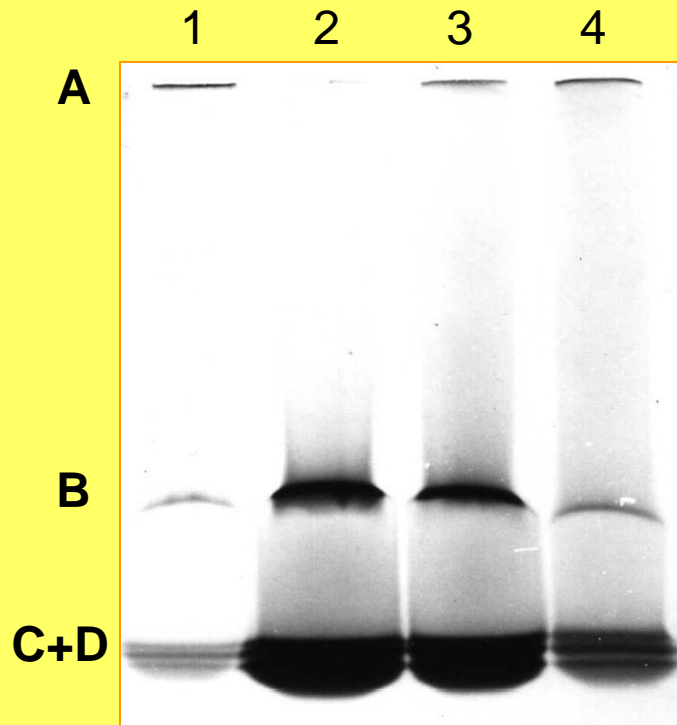
Trubetskoj et al., 1997, *J. Chromatography A* 767, 285-292

Trubetskaya O. et al., 2011, *Analytica Chimica Acta*, v. 690, 263-268

Chernozem humic acids



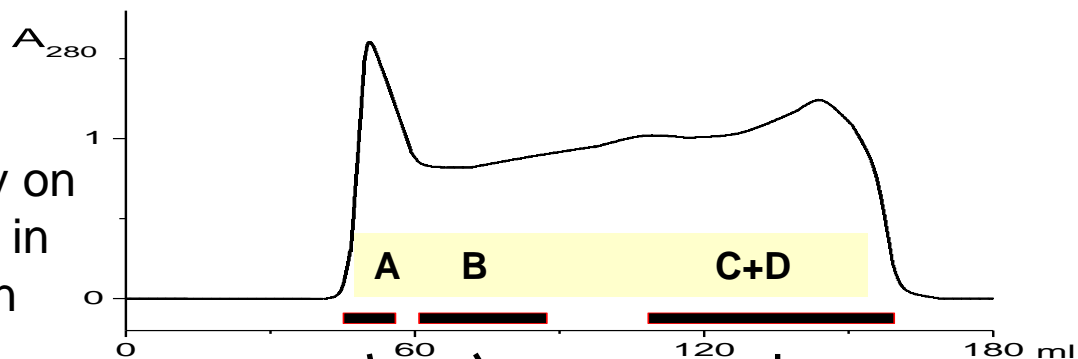
Electrophoresis of several soil HAs of different genesis in 10% PAG with electropherogram detection in visible light



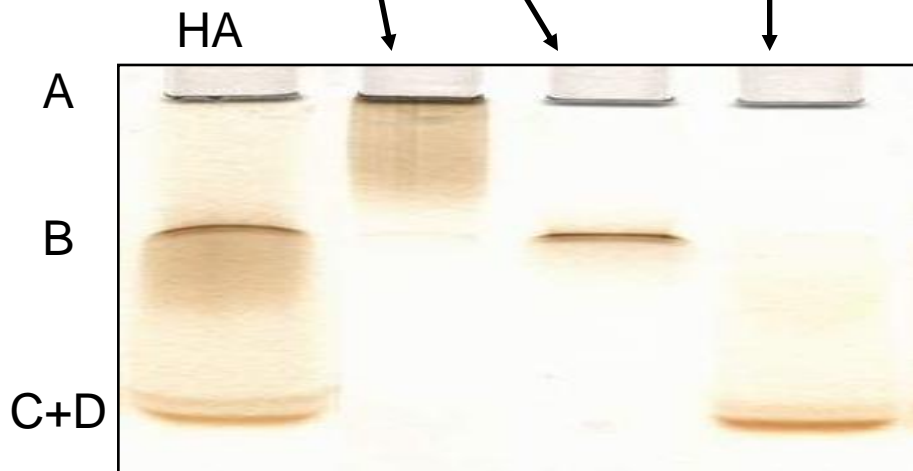
- 1 Podzolic soil HA (Russia)
- 2 Grey forest soil HA (Russia)
- 3 Chernozem HA (Russia)
- 4 Red soil HA (Georgia, former USSR)

Combination of preparative exclusive chromatography with analytical electrophoresis for obtaining of stable electrophoretic fractions from chernozem HA

Preparative chromatography on Sephadex G-75 in 7M urea solution



Analytical electrophoresis in 10% PAG



$MS_A > MS_B > MS_{C+D}$

—
↓
+

Analytical methods used for complex structural analysis of electrophoretic fractions A, B and C+D

Chernozem HA

Fraction A
Large MS
Low EM

Fraction B
Medium MS
Medium EM

Fraction C+D
Low MS
High EM



Destructive methods:

- 1). Acid hydrolysis by 6M HCl
- 2). Pyrolysis/gaz-chromatography/
mass-spectrometry

10). Photochemical activity

Non-invasive methods:

- 3). Ultrafiltration
- 4). UV-visible absorbance spectra
- 5). 2D- and 3D-fluorescence
- 6). ^{13}C - и ^1H -NMR
- 7). RP-HPLC
- 8). HPSEC
- 9). High-resolution mass-spectrometry

MS – molecular size; EM – electrophoretic mobility

The fractions A, B and C + D obtained were significantly different in terms of:

- а) electrophoretic mobility (*Trubetskoj O., et al., 1991. Soil Biology & Biochem., v.23, p. 1181-1183;*
Trubetskoj O., et al., 1992. Soil Biology & Biochem., v.24, p. 893-896)
- б) molecular size (*Trubetskoj O., Trubetskaya O. et al., 1997. Journal of Chromatography A, v.767, p. 285-292*)
- в) amino acids content (*Trubetskaya O., Trubetskoj O., et al., 1998. Environment International, v.24, p. 573-581*)
- г) conformational characteristics (*Тимченко А.А., Трубецкой О.А. и др. 1999, Поверхность, №4, с.23-30*)
- д) fatty acid content (*Hermosin B., Trubetskoj O. et al., 2001 J. Anal. Appl. Pyrolysis, v.58, p.341-347;*
Saiz-Jimenez C., Trubetskoj O. et al., Geoderma, 2006. v.131, p.22-32)
- е) optical properties (*Trubetskaya O., Trubetskoj O. et al., 2002. Organic Geochemistry. v.33/3, p.213-220*)
- ж) photochemical activity (*Aguer J.-P., Trubetskoj O. et al., 2002. Chemosphere. v.49, p.257-261;*
Trubetskoj O. et al., 2007. J. Photochem. Photobiol. A, v.189, p. 247-252)
- з) fluorescent properties (*Richard C., Trubetskoj O. et al., 2004. Environ. Sci. & Technol., v.38, 2052 –2057;*
Sanchez-Cortes S., Trubetskoj O. et al., Applied Spectroscopy, 2006. v. 60, p.48-53;
Trubetskaya O., Trubetskoj O. et al., 2011, Analytica Chimica Acta, v. 690, 263-268)
- и) phytohormonal activity (*Сердюк О.П., Трубецкой О. и др. 1999. Доклады РАН. т. 365, с.430-432*)
- к) ratio of aliphatic and aromatic components (*Trubetskoj O., Hatcher P.G., Trubetskaya O. 2010. Chemistry and Ecology. v.26, p.315-325*)
- м) hydrophobicity (*Trubetskoj O., Trubetskaya O. et al., 2012. Journal of Chromatography A, v. 1243, 62-68*)

Some physical-chemical characteristics of chernozem HA sample and its electrophoretic fractions A, B and C + D

Sample	LPSEC , ultrafiltration, HPSEC	RP-HPLC	¹³ C-NMR	Pyrolysis/methylation gas chromatography/mass spectrometry
	Nominal MS	Relative hydrophobicity (%)	Relative aromaticity C_{arom}/C_{aliph}	Long-chain fatty acids (C16-C22)
HAs	-	29	1.9	Identified
A	>100kDa	73	0.7	the highest content
B	100-30 kDa	33	1.3	trace amounts
C+D	30-10 kDa	0	3.2	absent
Publicatiions	J.Chrom.A (1997) 767:285. Geoderma (1999) 93: 277. EST (2004) 38: 2052.	J.Chrom.A (2012) 1243:62. J.Geoch. Expliration (2013) 132: 84. J.Soil & Sedediments (2014) 14 : 285.	Chemistry and Ecology (2010) 26: 315.	J. Anal. Applied Pyrolysis (2001) 58-59:341. Geoderma (2006) 131: 22.

Conclusions

- If soil humic acids would be macromolecules then their electrophoretic zones would differ only in size, but not in composition, physical-chemical properties and photochemical activity.
- The detection in soil humic acids of the largest molecular size fraction A, consisting mainly of amphiphilic fatty acids, suggests the possibility of forming on its basis the main structure-forming components of soil humic acids.
- The summary of the data obtained is a direct experimental confirmation of the existence of soil humic substances in a form of supramolecular complex.

The work has been supported by:

- **Russian Foundation for Basic Research (2001-2017 years)**
 - **International projects on INTAS programs, CNRS (France) - RAS, CSIC (Spain) – RAS, Fulbright (USA)**

азота.

Для уверенного отнесения органических соединений к классу гумусовых веществ необходимо и достаточно сочетание пяти важнейших признаков:

1. Содержание углерода в пределах 46—61% для гуминовых кислот и от 36—44% для фульвокислот при обязательном содержании азота от 3 до 6%. Это обязательный признак, хотя только элементный состав не может быть достаточным для отнесения получаемых препаратов к гумусовым веществам.
2. Обязательное присутствие не окисляемых щелочным раствором перманганата калия бензол(пиридин)-карбоновых кислот; характерная особенность этих продуктов — наличие в них 3—6% азота, условно называемого гетероциклическим.
3. Наличие «негидролизуемого», или гуминового, азота в количестве 25—55% от общего, часть которого представлена упомянутым выше гетероциклическим азотом.
4. Характер электронных спектров поглощения при значениях $E_{1\text{ см}, 465\text{ нм}}^{0,001\%}$ порядка 0,01—0,1.
5. Характер инфракрасных спектров поглощения. В хорошо изученном интервале от 2 до 10 мкм ИК-спектры могут служить подтверждением принадлежности вещества к гумусовым кислотам.

Встречаются случаи, когда этих признаков недостаточно для уверенной идентификации соединений, но при изучении веществ почвенного происхождения их можно считать вполне надежными. Более того, при исследовании почвенных органических веществ часто можно ограничиться сочетанием 1-, 3- и 4-го признаков. Совершенно непригодны для диагностики гумусовых веществ их окраска (по визуальной оценке), содержание отдельных групп легкогидролизуемых соединений, число функциональных групп, а также растворимость, которая зависит от зольности препаратов, их окисленности, рН и ионной силы раствора.