

泥炭土连续碱抽提腐殖酸的分子结构特征

李 丽 冉 勇* 盛国英 傅家谟 彭平安

(中国科学院广州地球化学研究所, 有机地球化学国家重点实验室,
广东省环境资源利用与保护重点实验室, 广州 510640)

黄伟林

(环境科学、工程与政策学院, 美国 Drexel 大学, 费城 19104)

摘 要 从 Pahokee 泥炭土中连续碱抽提分离出 8 个不同的腐殖酸级分, 并对每一级分进行了元素分析、傅里叶变换红外光谱 (FTIR)、固态 ^{13}C 核磁共振 (^{13}C NMR)、高效排阻色谱 (HPSEC) 等一系列定性、定量研究。结果表明: 所分离出的 8 个腐殖酸级分存在明显的结构性质差异, 随提取程度的增加, O/C 原子比由 0.52 减少到 0.36, H/C 原子比由 1.05 增加到 1.52, 相应于结构中含氧基团的减少和脂族基的增加, 表观分子量也由 7.7 K 增加到 22.1 K。同时, ^{13}C NMR 显示长链脂肪碳结构由无定型向晶型转变。此工作表明在所研究的腐殖酸中可能存在分别具有芳香或脂肪特性的两类腐殖酸结构, 每种类型都有不同的分子量分布、元素组成、基团结构和母质来源。在特定的环境因素下, 不同类型的腐殖酸会共存于同一体系中, 增加了腐殖物质的非均匀性和复杂性。

关键词 泥炭土腐殖酸, 连续碱抽提, 傅里叶变换红外光谱, 碳-13 核磁共振, 高效排阻色谱

1 引 言

腐殖物质是自然环境中广泛存在的一类高分子物质, 是动植物残体通过复杂的生物、化学作用形成的, 占土壤和水圈生态体系中总有机质的 50% ~ 80%^[1]。腐殖物质结构中含有羰基、酚羟基等基团, 可与金属离子、氧化物、矿物质和包括有毒有害物质在内的有机物发生相互作用, 严重影响了这些物质的环境化学行为, 而且目前普遍认为腐殖物质是饮用水氯化消毒过程中产生大量致癌副产物的直接原因^[2]。腐殖物质的以上行为都与其结构有密切关系, 充分了解腐殖物质的组成特征及性质将有助于阐明腐殖物质对其它物质尤其是有毒有害降解物质在环境中的迁移、转化及归宿的影响, 对水处理工艺的进一步改进也有非常重要的理论和现实意义。

腐殖物质从溶解性来讲可分为黄腐殖(或富里酸, 可溶于任何 pH 范围)、腐殖酸(或胡敏酸, 仅溶于碱性 pH 范围)和腐殖素(或腐黑物, 不溶于任何 pH 范围), 而腐殖酸由于相对容易获得, 研究较多。但以往主要集中于对不同地质环境或同一地点不同剖面的样品的研究, 表明不同环境下的腐殖酸的组成结构存在很大的差异性, 而对某一确定样品中的腐殖酸是否存在差异及程度如何还未见报道。

2 实验部分

2.1 样品的提取和纯化

研究所用土壤样品为 Pahokee 泥炭(国际腐殖酸协会 IHSS, 参考样品), 取自美国佛罗里达州的沼泽地, 一种高度腐殖化的耕作泥炭土, 碳和灰分含量分别为 45.7% 和 15%。

腐殖酸的提取参照 IHSS 推荐的标准方法^[3], 简述如下: 室温条件下把 1 mol/L HCl 加到土壤中, 使其 pH 为 1~2, 然后用 0.1 mol/L HCl 调节溶液体积, 最终液固比达 10:1 (10 mL 溶液:1 g 土)。振动悬浮液 2 h, 离心(2398 g) 分离去除上清液; 在 N_2 保护下用 1 mol/L NaOH 中和剩余土壤样品到 pH 7, 然后用 0.1 mol/L NaOH 调节最终液固比为 10:1, 室温搅拌 24 h, 离心分离(9397 g), 在不断搅拌下, 将上层溶液用 6 mol/L HCl 调节 pH 为 1, 放置 24 h 后离心(9397 g), 沉淀物为腐殖酸(Humic Acid, HA); 然后用最小量的

2002-02-05 收稿; 2002-07-08 接受

本文系国家自然科学基金资助项目 (No. 40072094 和 No. 40172105)

0.1 mol/L KOH 溶解 HA, 并添加固态 KCl 使 $[K^+]$ 为 0.3 mol/L, 该处理将使悬浮的胶体物质絮凝, 高速离心去除悬浮絮凝物, 然后如上再用 6 mol/L HCl 沉淀, 随后在塑料容器中用 0.1 mol/L HCl/0.3 mol/L HF 混合溶液浸泡 HA 去除矿物质, 在室温下震荡过夜。离心去除悬浮液, 透析交换 Cl^- (0.1 mol/L $AgNO_3$ 检测), 冷却干燥, 研磨后置于干燥器中备用。上述过程连续重复处理直至原始土壤的溶液为淡黄色, 共 8 次, 所得 8 个腐殖酸级分子分别命名为 Fr1, Fr2, …, Fr8。

2.2 主要仪器和设备

2.2.1 元素分析 所有级分的 C、H、N 及 O 元素分析采用 Heraeus (CHN-O-RAPID) 型元素分析仪测定。

2.2.2 傅里叶变换红外分析 红外光谱通过将 1 mg 研磨的腐殖酸样品与 60 mg 光谱纯 KBr 压片, Perkin-Elmer 1725 X 型傅里叶变换红外光谱仪上测定, 分辨率 4 cm^{-1} 。

2.2.3 交叉极化-魔角旋转固态 ^{13}C 核磁共振分析 将约 60 mg 固体样品装入直径 4 mm 具 Kel-F 塞子的 ZrO_2 转子中, 在 Bruker DRX-400 型核磁共振仪测定 8 个腐殖酸级分的 ^{13}C NMR。 ^{13}C 的频率为 100.63 MHz, 魔角自旋频率 6.0 kHz, 测定过程中样品的循环时间为 1.2 s, 接触时间为 1 ms, 每个光谱包括 2400 个数据点。谱图的化学位移用外标甘氨酸 (176.03) 校正。

2.2.4 表观分子量测定 表观分子量的测定在配有二极管阵列检测器的 HP1100 高效液相色谱上完成。研究所用色谱柱为 Biosep-Sec-S2000 (300 × 7.8 mm, Phenomenex, USA) 及同系列的保护柱 (30 × 7.8 mm)。流动相为 2 mmol/L 的磷酸缓冲溶液, 调节 pH 为 6.8, 离子强度为 0.1 mol/L NaCl, 流速为 1.0 mL/min。色谱柱用一系列的聚苯乙烯磺酸钠标定 (分子量: 5K, 8K, 15K, 50K, 60K Da, Scientific Polymer Inc., USA), 同时用蓝葡聚糖 (2000K Da, Sigma) 和丙酮 (58 Da, HPLC 级, Fisher) 检测空体积 (V_0) 和满体积 (V_i)。所有的标样和腐殖酸样品都溶解在与流动相相同的缓冲溶液中 (100 mg/L), 检测波长分别为 224 nm 和 254 nm。

3 结果与讨论

3.1 元素分析

所测样品为高腐殖酸含量的泥炭, 腐殖酸含量约 49.5%。由表 1 可见看出 3 次处理所得腐殖酸占总量的 84%, 4 次达 92%, 可见腐殖酸主要来自前 4 次的处理。从元素组成可看出所提取的 8 个级分的组成存在明显差异。元素 C、H 的含量由 Fr1 的 54% 和 4.8% 增加到 Fr8 的 60% 和 7.6%, 而 O 含量由 37.5% 减少到 28.9%。H/C 原子比由 1.05 增加到 1.52, O/C 原子由 0.52 减少到 0.36 (图 1), 表明随提取次数的增加, 腐殖酸的芳香性和含氧官能团如羰基、酚羟基、醇羟基及醚键等在逐渐减少。

表 1 8 种腐殖酸级分的产率和组成特征

Table 1 Yield, compositional characterization of the eight HA fractions

样品 Samples	产率 Yield (wt %)	元素组成 Elemental composition ^a (wt %)				芳香度 ^b Aromaticity (%)
		C	H	N	O	
Fr1	28.95	54.09	4.75	3.65	37.52	18.9
Fr2	33.43	56.21	4.67	3.86	36.35	21.8
Fr3	21.77	56.85	5.38	4.37	34.89	17.1
Fr4	8.08	57.46	6.12	4.03	29.79	15.3
Fr5	3.27	57.61	6.57	3.90	29.48	13.1
Fr6	1.92	59.66	7.24	3.97	28.47	14.5
Fr7	1.37	59.68	7.93	4.22	27.97	13.6
Fr8	1.21	60.12	7.61	4.24	28.89	13.8

a. 无灰无水重量 (ash and water-free), b. 用 ^{13}C NMR 计算 (calculated by ^{13}C NMR)

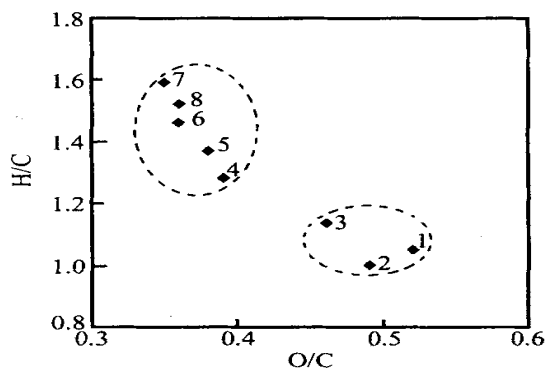


图 1 8 个腐殖酸级分的范氏图

Fig. 1 Van Krevelen plot of the eight humic acid (HA) fractions

3.2 红外光谱分析

8 个腐殖酸级分的红外光谱如图 2 所示。有非常相似的红外结构特征:3500 ~ 2500 cm^{-1} 强而宽的缔合 —OH 伸缩振动吸收;3000 ~ 2800 cm^{-1} 的 C—H 伸缩振动吸收;1710 cm^{-1} 处的 C=O 伸缩振动吸收以及 1630 cm^{-1} 处包括共轭 C=C 吸收, H 键缔合 C=O 吸收和酰胺键等相互叠加的各类吸收峰^[2]。进一步观察可发现在 2980 ~ 2850 cm^{-1} 的 CH_2 、 CH_3 的伸缩振动由 Fr1 ~ Fr8 逐渐增强,此基团对应的变形振动的吸收强度也呈增强趋势(1450 cm^{-1}),表明结构中脂肪成分明显增强。相反 1710 cm^{-1} 的 C=O 伸缩振动明显减弱,表明随提取次数的增加,腐殖酸中的羧基在不断减少。

3.3 CP-MAS¹³C NMR 分析

8 个腐殖酸级分的 CP-MAS¹³C NMR 谱图如图 3 所示。可分为 5 个结构带:脂肪碳(0 ~ 46);与氧相连的脂肪碳(56 ~ 108);芳香碳(108 ~ 160);羧基碳(160 ~ 185)以及羰基碳(185 ~ 220)^[4]。

由图 3 可见在 0 ~ 46 范围内的脂肪碳存在显著性差异。在 Fr1 中各种类型的脂肪碳相互重叠难以区分,表现为 30 为主峰的宽峰,而后面提取的几个腐殖酸级分(Fr5 ~ Fr8 在此区域为 5 个清楚的尖峰:21、26、30、33 和 44,分别归属为与芳环相连的 CH_3 、 CH_2 、无定型(CH_2)_n 长链碳、晶型(CH_2)_n 长链碳以及支链烷基碳^[4-7]。不同级分中的峰强度的变化表明不同脂肪碳含量的差异。位于 21 的 CH_3 、26 的 CH_2 及 44 的支链碳从 Fr1 到 Fr8 逐渐增强,而且 CH_2 峰成为 Fr6 ~ Fr8 中的最强峰,说明结构中的脂肪碳在不断增加,尤其是支链碳。不同类型的长链(CH_2)_n 也呈现出一定的变化规律,位于 30 的无定型碳链由 Fr1 ~ Fr3 逐渐削弱,33 的晶型碳链逐渐增强,并在以后级分中基本保持稳定但始终高于无定型碳链,说明结构中的长链碳由无定型向晶型渐变。

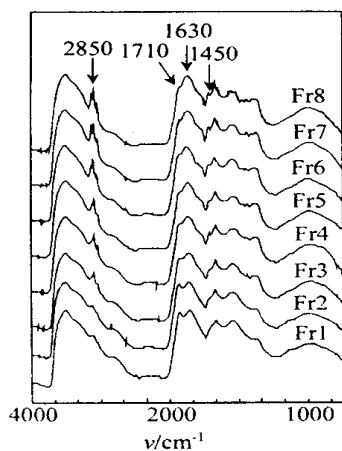


图 2 8 个腐殖酸级分的红外光谱图

Fig. 2 Infrared spectra of the eight HA fractions

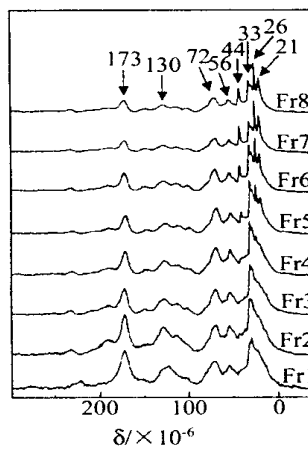


图 3 8 个腐殖酸级分的 CP-MAS¹³C NMR 谱图

Fig. 3 CP-MAS¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) spectra of the eight HA fractions

这种晶型或非流动碳链结构对无定型或流动碳链结构也曾在以往的腐殖酸¹³C NMR 研究中提出^[5,6,8,9]。Hatcher^[9]研究表明各种不同的脂链碳相互混合将呈现出难以区分的、相互交叠图形形状,而有确定分子构型的脂链碳将表现为高分辨的尖峰。Kogel-Knabner 等^[8]在对不同埋藏深度样品中腐殖酸的研究中曾区分出位于 30 附近的两类不同的碳结构并表明非流动构型相对于流动构型随埋藏深度而不断增加。Hu^[6]等认为与无定型构型相比,晶型构型相对惰性,不易受环境影响,因而在土壤中有较长的滞留。不断增加的脂链碳结构可能是藻类或微生物经过复杂的生物地球化学作用形成的^[9]。

与氧相连的脂肪碳区域(46 ~ 108)中 56、72 和 104 处的峰分别为甲氧基、与一个氧相连的烷基碳(如 —CH(OH)— 或 $\text{—CH}_2\text{—O—C}$ 以及与两个氧相连的烷基碳(如缩醛、缩酮)^[5,6]。尽管对 95 ~ 108 范围的碳的归属存在一定的争议,一些研究者将其归为非质子化的芳碳,但根据 Mao 等^[5]对腐殖酸的 1D 和 2D NMR 研究,确定为与两个氧相连的缩醛、缩酮结构。一般认为甲氧基主要来源于木质结构,后

两个官能团主要来源于碳水化合物。108~160 芳碳范围内 3 个峰(115、130 和 150)分别为质子化的、取代的和含氧的芳碳。全部芳碳的积分与 0~185 范围内的有机碳的积分比值,即所谓的芳香度,由 23.6% 减少到 15.8%(表 1),呈现下降趋势,与前述元素分析中 H/C 原子比的变化规律及 IR 中脂肪结构增强相一致。

低场 160~185 的峰主要为羰基碳,包括自由酸、酯、酞或醌。该峰的强度由 Fr1~Fr8 逐渐减弱,与 FTIR 中不断递减的 1710 cm^{-1} 峰相一致。表明结构中的极性官能团的减少是造成腐殖酸萃取程度降低的主要原因。

3.4 分子量分布特征

在图 4 分子量分布图中 8 个腐殖酸级分的分子量从 7.7 K 增加到 22.1 K,结合以上对各级分分子结构的讨论可知,高分子量分子的腐殖酸结构中含有相对低的芳香结构和高的脂肪结构。与 Fr5、Fr6 相比,Fr7、Fr8 的分子量偏低,可能与结构中长的碳链的形状有一定关系,说明除分子结构以外分子的构型对腐殖酸分子的体积大小也有一定影响。

以上信息表明:在所研究的泥碳土腐殖酸分子中可能存在两种类型的腐殖酸分子。一类具有芳香特性,含有较多的氧,较高的 O/C、C/H 原子比,较低的分子量($<15\text{ K}$),在所提腐殖酸中占主体。另一类结构上有脂肪特性,含有较少的氧,较低的 O/C、C/H 原子比,较高的分子量($>22\text{ K}$),在所提腐殖酸中所占份额较少。以上这两类腐殖酸可能来源不同的母体物质,经历了不同腐殖化过程。芳香特性的腐殖酸可能来源于本质素,相对容易被萃取;脂肪特性的腐殖酸可能来源于藻类或微生物,相对难以被萃取,并随萃取程度增加在所提腐殖酸中的比例不断增加。尽管此类具有脂肪特性的腐殖酸在腐殖酸总体中所占比例不大,但由于该类结构具有相对疏水的特性可能对低极性和非极性化合物有较强的结合能力,因而研究整体腐殖酸中不同类型腐殖酸的含量及其结构特征将有助于阐明腐殖物质与各类有机、无机化合物的相互作用机理,特别是对污染地点的环境修复有重要意义。

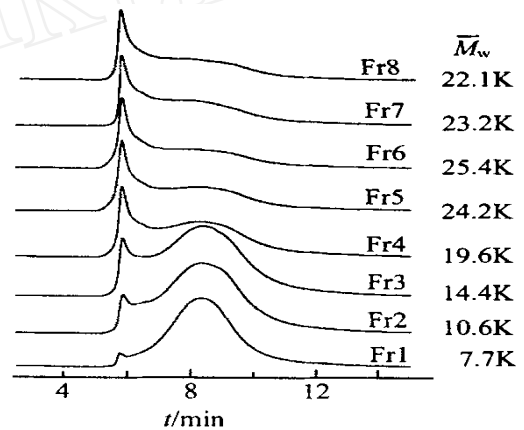


图 4 8 个腐殖酸级分的分子量分布图

Fig. 4 Molecular weight distribution spectra of the eight HA fractions

References

- 1 Thurman E M. *Organic Geochemistry of Natural Waters*, Martinus Nijhof/Dr. Junk W. Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1985
- 2 Stenvenson F J. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*, 2nd, Wiley, New York, 1994
- 3 Swift R S. in *Organic Matter Characterization* (Sparks D L. ed). Soil Sci. Soc. Am. Book Series: 5. Soil Sci. Soc. Am. Madison, WI, 1996: 1018~1020
- 4 Schnitzer M. *Soil Sci.*, 1991, 151(1):41~58
- 5 Mao J-D, Mao J, Xing B, Schmidt-Rohr K. *Environ. Sci. Technol.*, 2001, 35(10):1928~1934
- 6 Hu W-G, Mao J, Xing B, Schmidt-Rohr K. *Environ. Sci. Technol.*, 2000, 34(3):530~534
- 7 Wilson M A, Pugmire R J, Grant D M. *Org. Geochem.*, 1983, 5(3):121~129
- 8 Kögel-Knabner I, Hatcher P G, Tegelaar E W, de Leeuw J W. *Sci. Total Environ.*, 1992, 113:89~106
- 9 Hatcher P G, Maciel G E, Dennis L W. *Org. Geochem.*, 1981, 3(1-2):43~48

Molecular Structure Characterization of Humic Acids Progressively Extracted from a Peat Soil

Li Li, Ran Yong*, Sheng Guoying, Fu Jiamo, Peng Ping an

(Guangdong Key Laboratory of Environmental Protection & Resource Utilization, State Key Laboratory of Organic Geochemistry, Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640)

Huang Weilin

(School of Environmental Science, Engineering and Policy, Drexel University, Philadelphia, Pennsylvania, 19104)

Abstract Eight humic acid fractions were progressively extracted from a Pahokee peat soil and were characterized by terms of qualitative and quantitative techniques including elemental analysis fourier transform infrared spectrometry (TFIR), solid state ^{13}C nuclear magnetic resonance (^{13}C NMR), high performance size exclusion chromatography (HPSEC). This study demonstrated distinct compositional and structural differences existed in the eight humic acid fractions. The O/C atomic ratio decreased from 0.52 to 0.36 whereas the H/C atomic ratio increased from 1.05 to 1.52 as a function of extraction. This trend corresponded to the decreasing contents of oxygen-containing groups and the increasing contents of aliphatic groups. The apparent molecular weight increased from 7.7 K to 22.1 K. Moreover, the structure of the aliphatic chain varied from amorphism to regularity indicated by ^{13}C NMR. The study suggested that there might be two types of humic acid structure associated in the peat, exhibition, element composition, group structure and source material. Under special environments, humic acids with different types can coexist in a system, which increases the heterogeneity of humic substances.

Key words Peat soil humic acid, progressive extraction, Fourier transform infrared spectrometry, ^{13}C nuclear magnetic resonance, high performance size exclusion chromatography

(Received 5 February 2002; accepted 8 July 2002)