

腐殖酸表征方法研究进展

刘新超^{1,2}, 李俊², 谢丽², 何小娟², 栾富波², 周琪²

(1. 同济大学建筑设计研究院, 上海 200092; 2. 同济大学污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海 200092)

摘要 腐殖酸是自然界中结构组成复杂的大分子天然有机物质, 具有较强的络合、整合、吸附和氧化还原能力, 研究腐殖酸的物理化学性质与环境行为具有重要的意义。由于腐殖酸分子组成的不确定性, 一些实验方法, 如可见光吸收法、紫外吸收法、红外光谱法、核磁共振法、体积排阻色谱、在线裂解分析等已应用于实验研究中腐殖酸的表征。文章综述了上述表征方法在腐殖酸结构与性能研究中的应用, 讨论分析了不同方法存在的优缺点。优化或寻求更为准确可靠的腐殖酸表征方法, 将有助于对腐殖酸的深入研究。

关键词 腐殖酸 表征 研究进展

中图分类号: X712 文献标识码: A 文章编号: 1009-0177(2009)03-0006-05

Characterization Methods of Humic Acid: A Review

LIU Xin-chao^{1,2}, LI Jun², XIE Li², HE Xiao-juan², LUAN Fu-bo², ZHOU Qi²

(1. Architectural Design & Research Institute of Tongji University, Shanghai 200092, China;

2. State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract Humic acids are natural organic macromolecules which are ubiquitous and complicated in the environment, having great activation in reaction, and can complex or react with metal ions, oxide, hydroxide minerals, organic matters and toxic pollutants. Thus, many characterization methods are used in researching the relationships among its composition, molecular weight, structure and redox behavior of humic acid, such as Visible Spectrometer, Ultraviolet Spectrometer, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Size Exclusion Chromatography (SEC), Pyrolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry and so on. This paper reviews these characterization methods.

Key words humic acid characterization review

腐殖酸(humic acid)是结构组成复杂的非均一性大分子有机物, 广泛分布于土壤、地表水和地下水中。研究表明, 腐殖酸具有较强的络合、整合、吸附和氧化还原能力, 能与环境中的金属离子、氧化物、氢氧化物、矿化物、有机质、有毒活性污染物等发生复杂的交互作用^[1], 从而对污染物质在地球环境中的迁移、转化、降解和消亡等规律产生重要的影响^[2]。显然, 腐殖酸的这些环境行为与其组成、结构具有密切关系。

然而, 腐殖酸属一类复杂的混合物, 没有确定的分子量, 仅有分子量的分布范围, 其分子组成和化学

结构至今仍不清楚, 这在很大程度上限制了对腐殖酸的深入研究。因此, 寻找准确可靠的腐殖酸表征方法成为了研究腐殖酸结构与性质的重要途径之一。目前, 一些实验方法, 如可见光吸收法、紫外吸收法、红外光谱法、核磁共振法、体积排阻色谱、在线裂解分析等已被应用于腐殖酸结构与性能的表征。这些表征方法的引入与发展对腐殖酸的研究进展产生了极大的推动作用。然而, 由于腐殖酸分子组成的不确定性, 各种方法均存在一定的局限性。因此, 优化或寻求更为准确可靠的腐殖酸表征方法已成为当前研究的热点。本文将对国内外该方面的研究进展展开综述。

1 腐殖酸分子量测定方法

1.1 腐殖酸的组成

腐殖酸的元素组成非常复杂, 研究表明腐殖酸的组成元素有碳、氢、氧、氮、硫及少量的磷。腐殖酸

[收稿日期] 2008-12-29

[基金项目] 国家自然科学基金项目(No.50608056, No.50808120); 同济大学污染控制与资源化研究国家重点实验室开放课题项目(PCRRF06005)。

[作者简介] 刘新超(1971-), 男, 高级工程师, 博士研究生, 研究方向为水污染控制理论与技术。电话: 13501657280; E-mail: sjs65980690@126.com。

[通讯作者] 李俊, 电话: 13611624430; junne1014@126.com。

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

没有固定的分子量,仅有分子量分布范围。目前已测定的河流 HA 的平均分子量为 1 500 到 5 000^[3],而土壤 HA 的分子量分布上限为 50 k 到 500 k。Thurman 等人以小角 X 射线扫描测得水中腐殖质的分子大小为 4.7 Å 到 33 Å,对应分子量为 500 k 到 10 k^[4]。Comel 等^[5]用扩散法测得一种腐殖酸的流体半径随温度和离子强度而变化,范围为 0.8 Å 到 80 Å。并且,较小的腐殖酸分子分子量低,含较多的氧和木质素来源的芳香结构,极性较强,相对容易提取,对疏水性有机物的吸附作用比较弱;较大的腐殖酸分子中的碳含量和来源于生物的聚脂肪结构比较多,分子量高,疏水性比较强,相对难提取,而对低极性和非极性化合物的吸附作用却比较强。

1.2 腐殖酸分子量测定方法

分子量是物质的最基本参数之一。目前对腐殖酸分级和分子量测定的方法有多种,各种方法的原理和测得的分子量类型各不相同。常用的如体积排阻色谱法(Size Exclusion Chromatography)。它是一种利用多孔凝胶固定相的独特特性,纯粹按照溶质分子在流动相溶液中的体积大小分离的色谱方法,又可称作空间排阻色谱(Steric Exclusion Chromatography)。体积排阻色谱的分离过程是使具有不同分子大小的样品,通过多孔性凝胶(软性凝胶或刚性凝胶)固定相,通过精确控制凝胶孔径的大小,使样品中的大分子不能进入凝胶孔而完全被排阻,只能沿多孔凝胶粒子之间的空隙通过色谱柱,首先从柱中被流动相洗脱出来;中等大小的分子能进入凝胶中的一些适当的孔洞中,但不能进入更小的微孔,在柱中受到滞留,较迟的从柱中洗脱出来;小分子可进入凝胶的绝大部分孔洞,在柱中受到更强的滞留,洗脱出来的时间会更加延迟;溶解样品的溶剂分子,其分子量最小,可进入凝胶的所有空洞中,而最后从柱中流出,最终物质随流动相按分子尺寸由大到小的次序依次由柱中流出,从而实现具有不同分子大小样品的完全分离。

由于操作简单,又能提供重要的信息,体积排阻色谱法已在腐殖质的研究中有了广泛的应用。其应用从分子尺寸分布的测定、预分级、定量监测腐殖化过程到与金属离子的反应都有涉及。然而传统的体积排阻色谱方法测得的腐殖物质分子量与其他方法相比有两个数量级的差别,已受到异议。随着对腐殖物质的聚电解质性质的不断了解,应用聚合物化学中的一些概念解释体积排阻色谱分析过程中腐殖物质的流出行为,使得体积排阻色谱的测定结果更加

可信。

其它常用的方法还有超滤(Ultrafiltration)、超速离心法 C Ultracentrifugation)、粘度法(Viscometry)、小角 X 射线扫描(Low angle X-ray scattering)、场流分级法(Field Flow Fractionation)及依数性方法,如蒸汽压渗透法(Vapor Pressure Osmometry)等。然而各种方法也都有一定局限性。见表 1。

表 1 各种腐殖酸分子量测定方法的缺点
Tab.1 Characterization of various molecular weight measurement methods

方法	缺点
体积排阻色谱法	存在固定相与腐殖酸分子间的作用和标定问题
超滤	膜与腐殖酸分子间存在相互作用
超速离心法	仪器设备昂贵,且存在电荷效应和水合效应
粘度法	没有确定的方程式计算腐殖酸的分子量
光散射法	腐殖酸有荧光,且样品中灰含量产生干扰
场流分级法	存在固定相与腐殖酸分子间的吸附和标定问题
依数性方法	蒸汽压渗透法易受基质影响,且需要的样品量较大

2 腐殖酸的结构及表征方法

2.1 腐殖酸的结构

由于腐殖质的化学组成非常复杂,关于腐殖质的化学结构至今仍不清楚。各国科学工作者在大量研究所积累的资料、数据的基础上,对腐殖质的结构提出了很多设想和模型。Haworth 在 1971 年提出腐殖质大分子化合物一般由两部分组成:一部分是外壳,包括吸附的各种化合物和这些化合物形成的稳定的腐殖质;另一部分是内核^[6]。骨架是由一个或数个不太大的芳核通过醚键、亚胺键、羧基、较短的烷烃桥键随机连接起来组成的。在这些芳核和桥键上,随机分布着羧基、羟基、羰基等官能团。芳核通常由二至五个环缩合而成,其中可能包括五元或六元的芳杂环,少量的肽键残片、糖基残片、烷基基、金属离子等通过共价键或配位键连接在芳核或官能团上,几个相似的这种单元结构之间可以通过氢键、金属离子桥、电荷转移络合等缔合成巨大的复合体。

然而,Brian 通过实验研究了腐殖质中的一些物质,结果表明土壤中的腐殖质并不具有明显的化学结构,它们是微生物、植物及其降解产物的复杂混合物^[7]。Jansen 研究了腐殖质在臭氧氧化时分子大小分布的变化:在臭氧氧化时腐殖质分子的大小减少很缓慢,只有少量被强氧化的物质从腐殖酸大分子上分离下来,包括丙酮酸、甲酸、丙酮醛、乙醛以及少量乙酮酸和乙二醛。实验结果说明腐殖质具有稳定的网状骨架结构,而且分子的降解遵循着由外到内的

微调机理^[8]。Pascal 通过实验研究了腐殖酸被赤铁矿吸附引起的分级现象^[9]。腐殖酸被赤铁矿吸附时分级为低分子量、中分子量和高分子量物质,低分子量的物质首先被吸附,并且由于吸附会进一步分级。相比中分子量物质,高分子量物质更容易被吸附,这是因为中分子量物质含有较多的 O、N 和烷基 C 结构,而含有较少的芳香结构,更具有亲水性。

当代研究者则倾向于腐殖酸是一种典型分子,由聚合性胶包所组成,其基础结构是二或三羟基酚类型的芳香环,由—O—, —CH₂—, —N=, —HN—, —S—和其它基团桥接,并含有游离羟基和醌的双键。

2.2 腐殖酸的表征方法

2.2.1 可见光吸收法

腐殖酸是棕黑至黑色的物质,所以在可见光区有吸收。在一定的浓度范围内,腐殖酸溶液的可见光吸收服从 Lambert-Beer 定律,可以用作腐殖酸的定量分析。实验研究中,通常选用 465 nm 测定吸光度,采用外标法进行定量分析,但由于不同来源的腐殖酸同一浓度的溶液在 465 nm 处的吸光度并不相同,所以没有比较普遍的浓度-吸光度线性对应关系。因此,可见光吸收法只适用于对同一来源、用同一方法提取的腐殖酸做粗略的估测。

2.2.2 紫外吸收法

由于有机化合物的紫外吸收光谱的产生与其结构密切相关,因此紫外吸收法常被用作有机化合物结构分析的依据。例如,煤炭腐殖酸的紫外光谱虽然单调无特征性,但其走势可以显示芳香结构的存在。在 280 nm 邻近的强吸收是芳香结构的一个证据,有的谱图在 280 nm 附近还出现明显的台阶,更暗示存在缔合的芳环结构。

E4/E6 是腐殖酸的重要特征参数之一,是指腐殖酸碱溶液在波长 465 nm 和 665 nm 处吸光度的比值,一般作为腐殖酸芳香缩合程度的特征函数,其比值越低,表示芳香化程度越高。E4/E6 的测定方法是将溶液溶在 0.05 mol/L 的 NaHCO₃ 溶液中,浓度为 40~200 mg/L,在可见分光光度计上分别测量 465 nm(E4)和 665 nm(E6)处的吸光度,并求其比值。腐殖酸溶液在可见光范围内(400~700 nm)的吸收光谱是没有特征峰的,其吸收从高频到低频单调地减少,但在一定的浓度范围和相同的测量条件下,对每一腐殖酸来说,E4/E6 值是一个特征性的常数。

2.2.3 红外光谱法

红外光谱分析(FTIR)是一种非破坏性的微量

快速分析方法,由于不同的化合物都有自己独特的红外光谱图,因而是鉴定化合物、研究化合物的结构、性质等的一种有效方法。对于结构组成复杂的腐殖质来说,红外光谱不失为一个比较有效的表征手段,它在腐殖酸的提取分级、结构以及金属离子的相互作用等研究中获得了广泛的应用。

对于各种腐殖酸,其红外光谱的主要吸收带均为 3 400、2 925、1 720、1 620、1 450、1 400、1 230 cm⁻¹ 等。因此,可以利用红外光谱分析法来研究提取剂的种类、浓度和提取条件对腐殖酸的影响。在腐殖酸的精制或分级过程中,根据红外图谱,可以粗略地判断样品的纯度或各级分组成、性质的异同。红外光谱还可以用于腐殖酸分类的研究。例如,可以根据芳香族和脂肪族原子团的吸收强度及两者的比值将腐殖酸分类^[10],或根据 1 720、1 600 cm⁻¹ 和 1 650 cm⁻¹ 吸收峰的强弱和有无对腐殖酸进行分类^[11]。

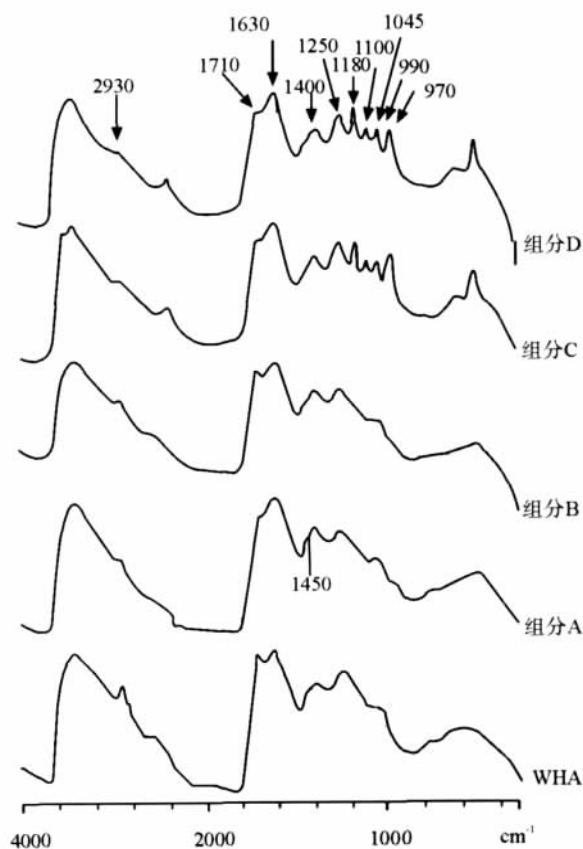


图1 腐殖酸及其各分级组分的 FTIR 光谱图^[12]

Fig.1 FTIR spectra of the whole humic acid and its fraction

2.2.4 核磁共振法

核磁共振技术(NMR)可谓近代发展起来的研究物质结构的最有效手段之一,与其它方法相比,NMR 技术具有以下优点:不破坏样品的结构;可直接用于固态物质;可定性、定量。目前,NMR 已在土

壤有机质、水体、泥炭和煤炭等的有机物的组成、结构和转化等研究中得到了普遍应用。碳是组成腐殖物质最重要的元素,因此 ^{13}C 核磁共振研究对了解腐殖物质的结构组成具有重要意义。

核磁共振波谱法包括 ^1H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 波谱,其中 ^1H 和 ^{15}N 的应用较少。 ^1H 核磁共振波谱图的直观性较差,分辨率较低,只能测定液体样品;另外样品残留水会严重干扰测定,需要进行预处理。 ^{15}N 核磁共振波谱由于 ^{15}N 的丰度低,磁旋比小,因此灵敏度相对 ^{13}C 低50倍左右,且测定时间较长。最常用的 ^{13}C -NMR最初只能测定液体样品,且灵敏度不高,在一定程度上限制了其对部分可溶的腐殖质的应用。通过研究者的不断改进,采用固体参差极化魔角样品自旋核磁共振波谱CPMAS ^{13}C -NMR对不同的样品进行测定,可提高测定腐殖质的灵敏度,并且能直接测定土壤样品,从而可以真实的反映腐殖酸的结构特征。因此, ^{13}C 核磁共振波谱已成为腐殖质研究中主要的分析手段之一。如图2为腐殖酸及其各超滤级分的CP/MAS ^{13}C NMR光谱图。

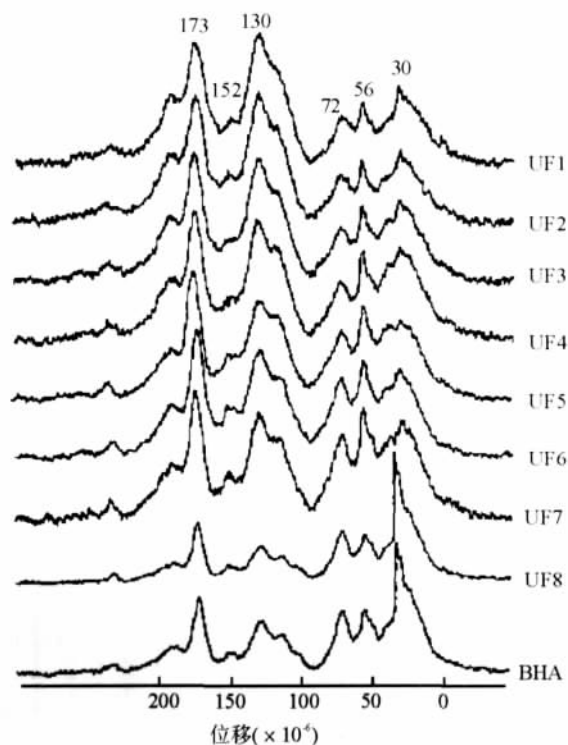


图2 腐殖酸及其各超滤级分的CP/MAS ^{13}C NMR光谱图^[13]
Fig.2 CP/MAS ^{13}C NMR spectra of the bulk humic acid and its size fractions

在腐殖质的分子体系中,由于各种碳核所处的化学环境不同,所以它们具有不同的共振频率,即产生化学位移现象。根据这种现象,利用核磁共振波谱可获得许多关于腐殖质的结构信息。从组峰的数目

可以知道分子中不同种类的氢核数目;从化学位移值可推测碳核所处的官能团;从各种峰的积分高度比可求得对应的碳核个数比。

李丽等^[13]用 ^{13}C 核磁共振研究了腐殖酸的结构,方法为:将约60 mg的固体样品装入直径4 mm、配有Kel-F塞子的 ZrO_2 转子中,在BrukerDRX-400型核磁共振仪上测定。 ^{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1.2 ms,每个光谱包括2 400个数据点。谱图的化学位移用甘氨酸的羧基碳的化学位移(176.03 mg/L)校正。

2.2.5 在线裂解分析

用元素分析和各种光谱手段对腐殖酸进行研究只能对腐殖物质的结构提供部分信息,这在腐殖物质的研究中还远远不够。通过水解、氯化、氧化、还原等化学降解或高温裂解的方法,将腐殖酸大分子转化为可以分析的小分子物质能帮助我们更好地了解腐殖物质的内部结构组成和来源。与化学方法相比,裂解技术简单,分析时所用的样品量极少(一般为几个毫克)。目前该方法作为一种分子水平表征手段,已被广泛应用于复杂的生物和地球化学大分子物质的结构研究中,如木质素、腐殖物质、干酪根、沥青质等。

Saiz-Jimenez和De Leeuw用裂解技术研究了不同来源的腐殖酸,报道了322种裂解产物,如酚、脂肪酸、烷烃等^[14]。这些不同的裂解碎片反映了腐殖物质结构的多样性。

以往采用裂解技术对于腐殖物质的研究中,由于与裂解相连的气相色谱不能提供理想的条件检测极性碎片,很多裂解产物无法进行定性分析。Challinor^[15]通过将裂解产物烷基化改善了极性产物不利于气相色谱分析的缺点。四甲基羟胺(Tetramethylammonium hydroxide),四丁基羟胺(Tetrabutylammonium hydroxide)以及三甲基苯基羟胺(Phenyltrimethylammonium hydroxide)等都曾作为烷基化试剂运用于裂解产物的衍生化。其中四甲基羟胺是最常用的烷基化试剂。使用该试剂后,已检测到一系列的甲基醚类和甲基酯类裂解产物。毫无疑问,甲基化改善了这些极性裂解产物的挥发性,更有利于气相色谱的分析。

3 前景展望

在地球生态环境中,腐殖酸是分布最为广泛的

(下转第22页)

不如单独用高岭土助凝。此外,经高锰酸钾或硫酸铜预处理后,用高岭土助凝除藻的效果下降,不宜将这两种预处理技术联合使用。从保证饮用水安全角度考虑,用高岭土助凝是优于用高锰酸钾或硫酸铜进行化学预处理的可利用技术。

参考文献

- [1] 王付林,王晓昌,黄廷林,等. 高锰酸钾和氯对高藻水的氧化助凝作用[J]. 中国给水排水, 2004, (20): 9-11.
- [2] 张广中. 巧施硫酸铜来杀微囊藻[J]. 渔业致富指南, 2003, (21): 50-51.
- [3] Graham N J D, Wardlaw V E, Perry R, et al. The significance of algae as trihalomethane precursors [J]. Water Science Technology, 1998, 37(2): 83-89.
- [4] Lahti K, Rapala J, Kivimäki A L, et al. Occurrence of microcystins in raw water sources and treated drinking water of finish waterworks [J]. Water Science Technology, 2001, 43(12): 225-

- 228.
- [5] 罗岳平,施周,王仕汇. 用粘土作助凝剂提高聚合氯化铝除藻效果的研究[J]. 中国给水排水, 2007, 23(17): 61-65.
- [6] 施周,王仕汇,罗岳平. 联用聚合氯化铝和高岭土去除小球藻的试验研究[J]. 净水技术, 2007, 26(3): 32-36.
- [7] 国家环境保护总局. 水和废水检测分析方法(第四版)[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [8] 马军,李圭白,李晓东. 高锰酸钾除微污染效能-GC/MS 分析[J]. 中国给水排水, 1999, 15(5): 13-17.
- [9] Jen-Jeng Chen, Hsuan-Hsien Yeh. The mechanisms of potassium permanganate on algae removal [J]. Water Research, 2005, 39(18): 4420-4428.
- [10] Tomoko Takaara, Daisuke Sano, Hiroshi Konno, et al. Cellular proteins of Microcystis aeruginosa inhibiting coagulation with polyaluminum chloride [J]. Water Research, 2007, 41(8): 1653-1658.
- [11] 刘红涛,李杰,席宇,等. 铜离子对铜绿微囊藻生长及生理的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2004, 39(1): 57-60.

(上接第 9 页)

天然有机物质,几乎所有的环境如土壤、水体(包括河流、湖泊和海洋)和沉积物中均有分布。由于腐殖酸对有机和无机污染物的吸附、迁移、转化、归宿以及土壤肥力均有着重要的影响,因此研究腐殖酸的分子结构组成与性质具有深远的意义。目前对于腐殖酸表征的各种方法均有一定的局限性,不能给出详细的分子结构组成信息,缺少分子鉴定也成为了这些方法在腐殖酸研究中的最主要弱点和限制性因素。随着科学技术的日新月异,将一些相关技术引入到传统的腐殖酸表征方法中,深入研究腐殖酸的化学结构与活性官能团或许会成为未来研究的重点与热点。

参考文献

- [1] Gordon E, Brown J R. Sorption of trace elements on mineral surfaces: Modern perspectives from spectroscopic studies, and comments on sorption in the marine environment[J]. International Geology Review, 2001, 43(11), 963-1073.
- [2] 蒋展鹏,廖孟钧. 腐殖质及其在环境污染控制中的作用[J]. 环境污染与防治, 1990, 12(3): 24.
- [3] Chin Yu-p, Ailen G, O'Loughlin E. Molecular weight, polydispersity and spectroscopic properties of aquatic humic substances [J]. Environmental Science & Technology, 1994, 28: 1852-1858.
- [4] Thurman E M, Wershaw R L, Malcolm R L, et al. Molecular size of aquatic humic substances[J]. Organic Geochemistry, 1982, 2: 27.
- [5] Cornel P K, Summers R S, Roberts P V. Diffusion of humic acid in dilute aqueous solution [J]. Journal of Colloid and Interface

- [6] Haworth R D. The chemical nature of humic acids[J]. Soil Science and plant nutrition, 1971, 111: 71-79.
- [7] Kelleher, B P and A J Simpson. Humic substances in soils: Are they really chemically distinct? [J]. Environmental Science & Technology, 2006. 40(15): 4605-4611.
- [8] Jansen, R H S, et al., Outside-in trimming of humic substances during ozonation in a membrane contactor[J]. Environmental Science & Technology, 2006. 40(20): 6460-6465
- [9] Reiller P, B Amekraz, and C Moulin, Sorption of Aldrich humic acid onto hematite: Insights into fractionation phenomena by electrospray ionization with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Environmental Science & Technology, 2006. 40 (7): 2235-2241.
- [10] K Kumada, O Sato, S Ohta. Humus composition of mountain soils in central Japan with special reference to the distribution of p type humic acid[J]. Soil science and plant nutrition, 1967, 13(5): 151-158.
- [11] Stevenson F J. ED. Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reaction, Wiley, New York, 1994, 236-257.
- [12] 曲凤臣. 土壤腐殖酸分级、表征及其光化学作用研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2006. 55.
- [13] 李丽,冉勇,傅家谟,等. 超滤分级研究腐殖酸的结构组成[J]. 地球化学, 2004, 33(4): 387-394.
- [14] C Saiz-Jimenez, J W De Leeuw. Chemical characterization of soil organic matter fractions by analytical pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis 1986, 9, 99-119.
- [15] JM Challinor. A rapid simple pyrolysis derivatisation gas chromatography-mass spectrometry method for profiling of fatty acids in trace quantities of lipids[J]. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 1996, 37(2): 185-197.