

施和平,吴瑞凤,张静茹,等. 包头尾矿库区不同分子量和种类腐殖酸的提取及表征[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):451-454.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.130

包头尾矿库区不同分子量和种类腐殖酸的提取及表征

施和平¹, 吴瑞凤², 张静茹², 石磊³, 李金英³

(1. 内蒙古农业大学理学院, 内蒙古呼和浩特, 010018; 2. 内蒙古工业大学化工学院, 内蒙古呼和浩特, 010051;

3. 华润新能源控股有限公司, 广东深圳, 518000)

摘要:采用焦磷酸钠萃取法提取腐殖酸,并分离得到黄腐酸、棕腐酸和黑腐酸,通过膜分离技术分离腐殖酸得到 6 种不同分子量的腐殖酸。对样品用元素分析、红外光谱、紫外分析及荧光光谱法进行了表征。结果表明,各种腐殖酸的化学组成有相似之处,但在结构上有明显不同:(1)元素分析发现不同腐殖酸之间 H/C、C/N 原子比具有明显的差异,不同分子量的腐殖酸,分子量越大芳香度越高;而 3 种不同类型的腐殖酸中,芳香度为黑腐酸 > 棕腐酸 > 黄腐酸。不同分子量腐殖酸中分子量越小的腐殖化程度越高,而不同类型的腐殖酸中黄腐酸腐殖化程度最高。(2)荧光光谱图表明不同腐殖酸中分子量越小荧光强度越强,黑腐酸、棕腐酸明显强于黄腐酸;说明不同腐殖酸的结构存在差异。(3)紫外分析显示,各种腐殖酸均含有芳香官能团,用 E4/E6 解释腐殖酸的芳香缩合程度发现与元素分析所得结论一致。(4)红外光谱也得出不同腐殖酸结构和特性存在相似性和差异性,均含有羧基,除黄腐酸与分子量小于 10 000 的腐殖酸外均含有芳环或酚类。

关键词:腐殖酸;提取;表征;包头尾矿库区

中图分类号: X132;O657 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)10-0451-04

腐殖酸(humic acids, HA)是一种分子结构相似、组成复杂的天然有机化合物,广泛存在于土壤、水体及沉积物中^[1-4]。在土壤中腐殖质约占有机质总量的 85%~90%,是

收稿日期:2015-08-18

基金项目:国家自然科学基金(编号:21167010)。

作者简介:施和平(1970—),男,山西朔州人,博士,副教授,研究方向为环境化学。E-mail:hpshi2002@163.com。

秸秆纤维的转化率,是畜禽生产中重要的蛋白来源。

不同的食用菌品种,选择栽培原料成分不同,其菌糠的营养价值也会有所不同。不同的食用菌品种在相同的栽培基质上,其菌糠的营养成分也会不同^[7],因此本研究原料的成分只有小麦秸秆、麸皮及饼肥,既可以满足选定食用菌品种的生长,其菌糠也能满足羊等反刍动物的营养需求。通过不同品种不同生长阶段对其营养成分的动态监测,红平菇不仅发菌速度较快,而且粗纤维被分解多,粗蛋白和粗脂肪含量高,而本试验的菌丝体饲料是到长满菌丝的阶段为止,并未让其出菇,营养价值保留在培养基质中,并未进一步转化,所以从理论上与出菇后的菌糠成分相比,菌丝体阶段的营养成分会相对较高,更适合于用作反刍动物的饲料。

食用菌培养基经过菌丝体的生物固氮和酶解作用等一系列生物转化过程后,其中的纤维素、半纤维素和木质素等物质均被不同程度地降解,而粗蛋白和粗脂肪的含量则有所提高,且富含氨基酸、多糖及钙、磷、铁、锌等多种矿物元素,同时还产生有机酸和生物活性物质等,这就增加了菌糠中营养成分的含量,并增强了菌糠的菌香味,从而有利于提高菌糠的适口性和消化率^[5]。本试验的结果与前人报道的结果相似。下一步的试验,是将菌丝体饲料开展饲喂试验,证实饲喂效

土壤有机质的主要组成部分。不同来源的腐殖酸,其化学组成、结构和性质有差异性^[5],研究表明腐殖酸的元素组成有 C、H、O、N 及少量的 P、S,在泥炭和煤中,氮含量较低,碳含量较高;而土壤腐殖酸的碳和氮含量都较高,而且不同地区和种类的腐殖酸含有的羟基、羧基、酮基、羰基和甲氧基等活性官能团也不相同,这些性质和结构的差异将明显地影响腐殖酸在环境地球化学和区域碳循环中的作用^[6-7]。腐殖酸可以吸附络合土壤和水体中的重金属、放射性核素等污染物,因此研

果,并进一步采用发酵隧道技术规模化生产菌丝体饲料,并根据菌株和秸秆类型,制定标准化菌丝体饲料的关键技术规程,按照订单式生产菌丝体饲料,充分提高秸秆饲料化价值,对我国畜牧业的可持续发展具有重要的现实意义。

参考文献:

- [1] 窦延燕,于克媛,衣慧静. 农作物秸秆饲料的研究进展[J]. 中国饲料添加剂,2013(10):35-40.
- [2] Waksman S A, Nissen W. On the nutrition of the cultivated mushroom, *Agaricus campestris*, and the chemical changes brought about by their organisms in the manure compost[J]. American Journal of Botany, 1932, 19(6):514-537.
- [3] 刘尚旭,董佳里,张义正. 糙皮侧耳菌木质素降解酶的比较研究[J]. 四川大学学报:自然科学版,2000,37(4):594-598.
- [4] 邢来君. 普通真菌学[M]. 北京:高等教育出版社,1999:270-280.
- [5] 罗佳捷,张彬,王浩,等. 菌糠饲料的研究进展[J]. 饲料研究,2013(2):20-22.
- [6] 侯立娟,姚方杰,高芮,等. 食用菌菌糠再利用研究概述[J]. 中国食用菌,2008,27(3):6-8.
- [7] 张昂. 菌糠的营养价值及其在畜禽生产中的应用[J]. 畜牧与饲料科学,2014,35(7/8):45-47.

究污染物在土壤和水体中的迁移、转化等行为,必须首先明确不同地区土壤和水体中腐殖酸的化学组成、性质和结构,明确其对放射性核素等的吸附络合行为。

本研究提取了包头尾矿地区土壤中的腐殖酸,并对其进行了分类,得到黄腐酸、棕腐酸和黑腐酸,同时利用膜分离技术对提取得到的腐殖酸进行分子量分离,得到 6 种不同分子量的腐殖酸,并分析其化学组成和结构,明确不同种类和不同分子量的腐殖酸的差异性。试验结果将对重金属、放射性核素的迁移转化研究有重要的意义,可明确腐殖酸对重金属、放射性核素的吸附络合作用。

1 材料与方法

1.1 试验试剂和仪器

试剂: $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$, NaOH , KOH , HCl , HF , 无水乙醇。

仪器: 低速离心机: 80-2, 常州国华电器有限公司; 集热式恒温加热磁力搅拌器: DF-101S, 郑州英峪予华仪器有限公司; SCM 杯式超滤器: 上海斯纳普膜分离科技有限公司; 电热鼓风干燥箱: SY101BS-D, 天津三水科学仪器有限公司; 元素分析仪: VARIOEL III 型, 德国 Elementar 公司; 荧光分析仪: Cary Eclipse, 美国瓦里安公司; 紫外光谱仪: UV-1800, 上海光谱达仪器有限公司; 傅立叶红外光谱仪: Nexus670, 美国 Nicolette 公司。

1.2 腐殖酸的提取和分离^[8]

腐殖酸提取采用焦磷酸钠法; 不同种类腐殖酸的分离采用氢氧化钠法得到棕腐酸、黑腐酸和黄腐酸; 不同分子量腐殖酸的分离采用加压超滤法, 使用不同分子量截留的超滤膜进行分离, 得到 6 种不同分子量的腐殖酸, 即分子量 $< 4\,000$ 、 $4\,000 \sim 10\,000$ 、 $> 10\,000 \sim 30\,000$ 、 $> 30\,000 \sim 50\,000$ 、 $> 50\,000 \sim 70\,000$ 、 $> 70\,000$ 的腐殖酸。

1.3 腐殖酸的表征

对得到的 10 种腐殖酸分别用元素分析、荧光分析(实验条件: 发射光波长 295 nm, 扫描范围 350 ~ 570 nm)、紫外分析(扫描范围 800 ~ 200 nm)和红外分析(扫描范围: $4\,000 \sim 400\text{ cm}^{-1}$)进行了表征。

2 结果与讨论

2.1 元素分析

10 种不同种类和不同分子量的腐殖酸元素分析结果见表 1。不同种类腐殖酸 C、H、N 元素含量有很大的差异, 其中黑腐酸含 C、H 量最大, 黄腐酸含 C、H 量最小; 不同分子量中小于 4 000 的含 C 量最小, 含 C 和 H 量基本随分子量的增加而增大, 说明不同种类和不同分子量腐殖酸的组成和结构有差异性。

腐殖酸的 H/C 和 C/N 等原子比可用来鉴别腐殖酸的来源和结构的差异性。H/C 值可用于推测腐殖酸的芳香度和脂肪度^[9-13], H/C 值小表明其芳香度高(不饱和程度高), H/C 值大则表明其脂肪化程度高(饱和程度高)。黄腐酸的 H/C 值最大, 黑腐酸和棕腐酸的值较小, 由此可见芳香度从大到小为黑腐酸 > 棕腐酸 > 黄腐酸, 而脂肪度正好相反; 不同分子量腐殖酸中, 分子量小的 H/C 值最大, 随着分子量的增加 H/C 值逐渐减小, 当分子量超过 30 000, H/C 值变化不大,

说明分子量小的腐殖酸的脂肪化程度高(饱和程度高), 而分子量大的腐殖酸的芳香度大(不饱和程度高)。腐殖酸的 C/N 值可表示腐殖酸的腐殖化度, C/N 值越低, 其腐殖化程度越高^[11]。黄腐殖酸的 C/N 值特别小, 其余 2 种腐殖酸 C/N 值均大于 30, 表明黄腐酸的腐殖化程度最高; 不同分子量腐殖酸中, 分子量小于 4 000 的 C/N 值最低, 说明腐殖化程度最高, 大于 70 000 的 C/N 值最大, 腐殖化程度最低, 其余的 C/N 值相差不大, 腐殖化程度差别不大。

表 1 各种腐殖酸的 C、H、N 元素含量

样品	元素含量(%)			原子比	
	C	H	N	H/C	C/N
分子量 > 70 000	51.58	3.14	1.32	0.06	39.08
分子量 > 50 000 ~ 70 000	45.65	2.83	1.41	0.06	32.38
分子量 > 30 000 ~ 50 000	52.64	3.11	1.53	0.06	34.41
分子量 > 10 000 ~ 30 000	54.58	3.05	1.54	0.06	35.44
分子量 4 000 ~ 10 000	10.15	1.69	0.31	0.17	32.74
分子量 < 4 000	1.27	1.70	0.10	1.34	12.70
棕腐酸	28.23	2.27	0.71	0.08	39.76
黑腐酸	52.64	3.39	1.44	0.06	36.56
黄腐酸	0.44	0.81	0.19	1.84	2.32
提取腐殖酸	31.61	2.75	0.80	0.09	39.32

2.2 紫外分析

各种腐殖酸的紫外吸收谱图见图 1、图 2。由图 1、图 2 可知, 各种腐殖酸有较强的紫外吸收强度, 说明均含有芳香族 C=C 键及其他生色团, 其吸收随波长的增加而逐渐减少, 是一个混合紫外吸收光谱, 且不同分子量的腐殖酸紫外吸收强度随分子量增加而增加, 说明分子量越大其缩合度也越大。除分子量小于 4 000、大于 70 000 的和黄腐酸外, 其余的腐殖酸均在 230 nm 处有 1 个吸收峰, 说明含有取代的芳烃羧基或酚基结构^[14-16]。分子量越大的腐殖酸吸收强度越大, 且在可见区域也有吸收, 这可能是由于大分子物质在可见区域产生的吸收所致。腐殖酸在 285 nm 处的紫外特征吸收峰可用来表征芳香度, 285 nm 处的紫外吸收值越高表明腐殖酸的芳香度越大, 芳香族基团含量越高^[17-18], 不同分子量的 285 nm 处的紫外吸收值随分子量的增大而增加, 说明芳香度随分子量的增加而增大; 不同种类腐殖酸中黑腐酸的 285 nm 处的紫外吸收值大于棕腐酸, 棕腐酸大于黄腐酸, 说明其芳香度从大到小为黑腐酸 > 棕腐酸 > 黄腐酸, 这与元素分析得到的结论完全一致。

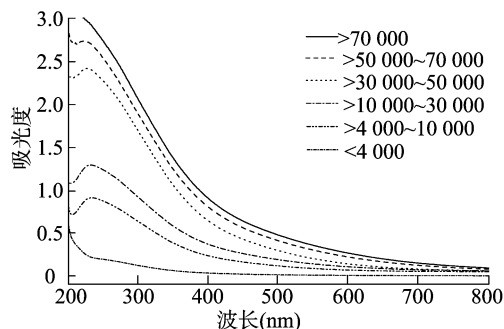


图 1 不同分子量腐殖酸紫外吸收光谱

特定波长的 E_4/E_6 (E_{465}/E_{665}) 是腐殖酸的一个特征常数, 其值可以反映分子中芳香环的缩合度和芳构化度。由表

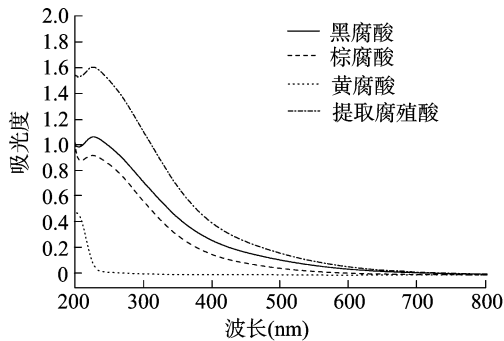


图2 不同腐殖酸紫外吸收光谱

2 中数据可知,分子量越大的腐殖酸 E_4/E_6 值越小,说明其芳香度越高;不同种类腐殖酸中黑腐酸的芳香度最高,这与前面元素分析得到的结论完全一致。

表 2 各种腐殖酸的 E_4/E_6 值

腐殖酸	E_4	E_6	E_4/E_6
分子量 < 4 000	0.014	—	—
分子量 4 000 ~ 10 000	0.064	0.004	16.00
分子量 > 10 000 ~ 30 000	0.125	0.020	6.25
分子量 > 30 000 ~ 50 000	0.224	0.029	7.72
分子量 > 50 000 ~ 70 000	0.309	0.066	4.68
分子量 < 70 000	0.360	0.088	4.09
棕腐酸	0.074	0.004	18.50
黑腐酸	0.152	0.021	7.24
黄腐酸	—	—	—
提取腐殖酸	0.224	0.030	7.47

2.3 红外分析

10 种不同腐殖酸的红外图谱见图 3 和图 4。由图 3、图 4 可见,各种腐殖酸均在 $3\,500 \sim 2\,500\text{ cm}^{-1}$ 处出现强而宽的缔合 $-\text{OH}$ 吸收峰, $3\,000 \sim 2\,800\text{ cm}^{-1}$ 处出现脂肪 $\text{C}-\text{H}$ 伸缩振动吸收峰, $1\,720\text{ cm}^{-1}$ 附近出现羧基及羰基 $\text{C}=\text{O}$ 的振动吸收峰, $1\,620\text{ cm}^{-1}$ 附近出现芳环骨架 $-\text{C}=\text{C}$ 振动吸收峰,氢键缔合 $\text{C}=\text{O}$ 吸收和酰胺键等相互叠加吸收峰; $1\,400\text{ cm}^{-1}$ 处出现羧酸或醇类的 $\text{O}-\text{H}$ 弯曲振动及酚类的 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动峰, $1\,250\text{ cm}^{-1}$ 处出现羧基的 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动和 $\text{O}-\text{H}$ 的变形振动, $1\,040\text{ cm}^{-1}$ 处有 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 的含氧结构特征吸收峰,表明不同种类和不同分子量腐殖酸中都有类似的结构^[19-20]。但分子量大于 10 000 的腐殖酸和黑腐酸在 $700 \sim 900\text{ cm}^{-1}$ 处有苯环吸收峰;分子量小于 4 000 和 4 000 ~ 10 000 的腐殖酸以及黄腐酸在 970 cm^{-1} 附近出现 1 个强峰,可认为是与烯烃相连的 $\text{C}-\text{H}$ 面外变形振动峰,另外在 500 cm^{-1} 处出现 1 个

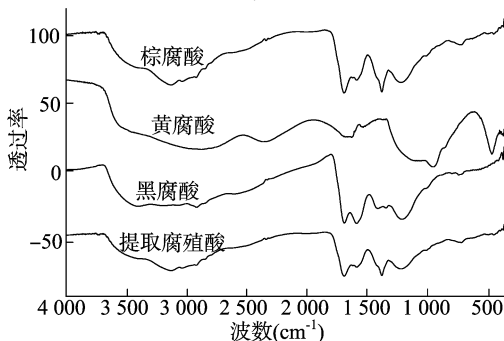


图3 不同分子量腐殖酸红外光谱

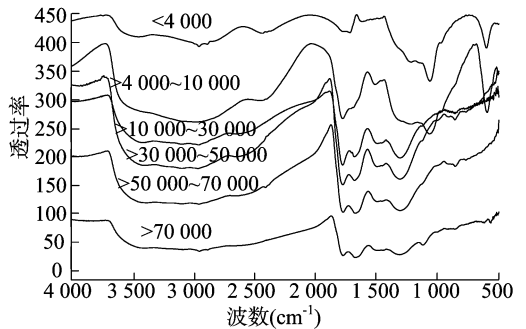


图4 不同腐殖酸红外光谱

强的吸收峰,可能是卤族元素 $\text{C}-\text{X}$ 伸缩振动峰,与其他腐殖酸的结构存在差异性。

2.4 荧光分析

10 种不同种类腐殖酸的荧光光谱图见图 5、图 6。不同分子量的荧光强度与腐殖酸的分子量组成和芳香度等密切相关,是描述腐殖酸结构的特征参数,由图 5 可见,在相同波长下,不同分子量腐殖酸均在 $350 \sim 550\text{ nm}$ 有强烈吸收峰,表明其结构组成具有相似性,由于腐殖酸是含有许多荧光基团的复杂混合物,所以得到宽而无特征的荧光峰。3 种不同腐殖酸中,棕腐酸吸收强度最大,黑腐酸次之,黄腐酸最弱(图 6)。Sierra 等认为腐殖酸中,在低激发波长小于 250 nm 处荧光峰应由芳环酚类物质所贡献^[21]。不同分子量腐殖酸荧光吸收强度随分子量的增加而逐渐减小,且最大峰值逐渐右移, Mi-ano 等研究表明,分子量小、芳香度低的有机质组分荧光强度高于分子量大、芳香度高的有机质组分^[22-23],本试验结果与之完全一致,元素分析和紫外分析得到的结果也与之相对应。

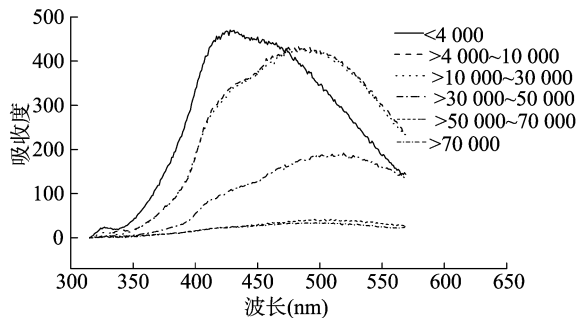


图5 不同分子量腐殖酸荧光光谱

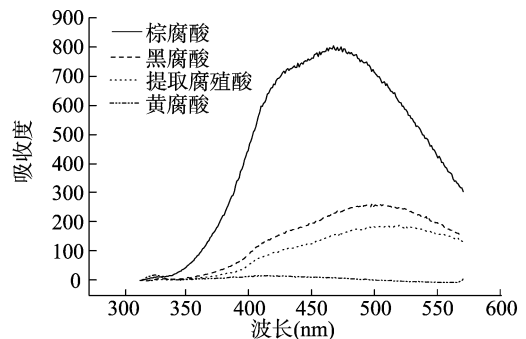


图6 不同腐殖酸荧光光谱

3 结论

包头尾矿库区提取得到的腐殖酸中黑腐酸占 42.13%,

棕腐酸占 12.46%, 黄腐酸占 45.41%; 不同分子量的腐殖酸中, 分子量 < 4 000 的占 4%, 4 000 ~ 10 000 的占 4.7%, > 10 000 ~ 30 000 的占 1.3%, > 30 000 ~ 50 000 的占 9%, > 50 000 ~ 70 000 的占 20%, > 70 000 的占 61%, 说明该地区腐殖酸主要以黑腐酸和黄腐酸为主, 而从分子量分布来看, 主要是分子量大于 50 000 的腐殖酸。元素分析发现黑腐酸的含 C、H 量最大, 黄腐酸的含 C、H 量最小; 不同分子量腐殖酸中小于 4 000 的含 C 量最小, 含 C 和 H 量基本随分子量的增加而增大, 说明不同种类和不同分子量腐殖酸的组成和结构有差异性。

对得到的各种腐殖酸表征发现不同种类腐殖酸的芳香度为黑腐酸 > 棕腐酸 > 黄腐酸, 不同分子量的腐殖酸的芳香度随分子量的增大而增加; 而不同种类腐殖酸中黄腐酸的腐殖化程度最高, 不同分子量腐殖酸中分子量小于 4 000 的腐殖化度最高。

对各种腐殖酸表征发现具有相似的结构特征, 所有的腐殖酸均含有羧基, 除黄腐酸和分子量小于 10 000 的腐殖酸外, 其余的均含有芳环或酚类结构官能团; 各种腐殖酸的紫外和荧光吸收均是一个混合吸收峰, 随分子量的增加而逐渐变小并右移, 说明它们的结构具有一定的差异性。而结构的差异性对于其在环境中吸附络合重金属等污染物的行为有着巨大的影响, 有待于进一步研究腐殖酸结构和吸附络合重金属的相关性。

参考文献:

- [1] Kang K H, Shin H S, Park H. Characterization of humic substances present in landfill leachates with different landfill ages and its implications[J]. *Water Research*, 2002, 36(16): 4023 - 4032.
- [2] Klavins M, Apsite E. Sedimentary humic substances from lakes in Latvia[J]. *Environment International*, 1997, 23(6): 783 - 790.
- [3] Fooker U, Liebezeit G. Distinction of marine and terrestrial origin of humic acids in North Sea surface sediments by absorption spectroscopy[J]. *Marine Geology*, 2000, 164(3): 173 - 181.
- [4] Alborzfar M, Jonsson G, Gran C. Removal of natural organic matter from two types of humic ground waters by nanofiltration[J]. *Water Research*, 1998, 32(10): 2983 - 2994.
- [5] 张盛华, 郑凯琪, 薛红波, 等. 城市污泥堆肥过程中腐殖酸及重金属形态的变化[J]. *江苏农业学报*, 2014, 30(6): 1350 - 1354.
- [6] 国家环境保护总局. 水和废水检测分析方法[M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [7] Göbbels F J, Püttmann W. Structural investigation of isolated aquatic fulvic and humic acids in seepage water of waste deposits by pyrolysis - gas chromatography/mass spectrometry[J]. *Water Research*, 1997, 31(7): 1609 - 1618.
- [8] 李善祥. 腐殖酸产品分析及标准[M]. 北京: 北京工业出版社, 2007.
- [9] Rice J A, MacCarthy P. Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances[J]. *Organic Geochemistry*, 1991, 17(5): 635 - 648.
- [10] Gonzalez - Vila F J, Martin F, Del Rio J C, et al. Structural characteristics and geochemical significance of humic acids isolated from three Spanish lignite deposits[J]. *Science of the Total Environment*, 1992, 117: 335 - 343.
- [11] Aiken G R, McKnight D M, Wershaw R L, et al. Humic substances in soil, sediment, and water: geochemistry, isolation and characterization[M]. New York: Wiley, 1985.
- [12] Hargitai L. Biochemical of elemental characteristics of humic substances during humification related to their environmental functions[J]. *Environmental International*, 1994(20): 43 - 48.
- [13] Kim J I, Buckau G, Li G H, et al. Characterization of humic and fulvic acids from Gorleben groundwater[J]. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1990, 338(3): 245 - 252.
- [14] 何海军, 翟文川, 钱君龙, 等. 湖泊沉积物中腐殖酸的紫外 - 可见分光光度法测定[J]. *分析测试技术与仪器*, 1996, 2(1): 14 - 18.
- [15] Thomsen M, Lassen P, Dobel S, et al. Characterisation of humic materials of different origin: a multivariate approach for quantifying the latent properties of dissolved organic matter[J]. *Chemosphere*, 2002, 49(10): 1327 - 1337.
- [16] Chen J, Gu B, LeBoeuf E J, et al. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions[J]. *Chemosphere*, 2002, 48(1): 59 - 68.
- [17] Veeken A, Nierop K, De Wilde V, et al. Characterisation of NaOH - extracted humic acids during composting of a biowaste[J]. *Bioresource Technology*, 2000, 72(1): 33 - 41.
- [18] Kalbitz K, Geyer S, Geyer W. A comparative characterization of dissolved organic matter by means of original aqueous samples and isolated humic substances[J]. *Chemosphere*, 2000, 40(12): 1305 - 1312.
- [19] 张玉兰, 孙彩霞, 陈振华, 等. 红外光谱法测定肥料施用 26 年土壤的腐殖质组成特征[J]. *光谱学与光谱分析*, 2010, 30(5): 1210 - 1213.
- [20] 傅平青, 吴丰昌, 刘丛强, 等. 高原湖泊溶解有机质的三维荧光光谱特性[J]. *海洋与湖沼*, 2007, 38(6): 512 - 520.
- [21] Sierra M M D, Giovanela M, Parlanti E, et al. Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single - scan and excitation/emission matrix techniques[J]. *Chemosphere*, 2005, 58(6): 715 - 733.
- [22] Miano T M, Martin J P, Sposito G. Fluorescence spectroscopy of humic substances[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1988, 52(4): 1016 - 1019.
- [23] Senesi N. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals: Part II. The fluorescence spectroscopy approach[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1990, 232: 77 - 106.