

## 苏打盐渍土中有机酸的提取方法\*

周惠民

(中国科学院林业土壤研究所)

土壤中的有机物质,尤其是碳水化合物,在分解过程中,将产生各种低分子的有机酸,视有机物质的组成、土壤条件(好气、嫌气、温度、土壤 pH 等)等的不同,这些低分子有机酸的种类和数量亦将不同,从而它们对土壤肥力和作物生长的影响亦各异<sup>[1,2,3]</sup>。田间试验的结果表明,施用有机肥料,对苏打盐渍土的改良和水稻的增产均有显著的效果。为了探明有机肥料改良苏打盐土的作用实质,我们研究了该类土壤中有有机酸的组成和含量,详细结果将于另处发表<sup>1)</sup>。本文报道我们在上述工作中关于有机酸的两种提取方法的比较研究结果。

### 样品和方法

土样:供试土样采自中度苏打盐渍土的表土层(荒地)。将采集的土样立即阴干,在阴干过程中,挑去土中粗的植物残体。待土样的含水量约为15—20%时,移入瓷研钵中磨细,过1毫米筛孔,然后混匀,移入磨口瓶内,贮存在6—10℃温度下(冰箱)备用。

提取方法:分别用乙醚法和硫酸法提取有机酸。

1. 乙醚提取法——取供试土样10—15克,置100毫升烧杯中。自滴定管中徐徐加入4N(或6N)硫酸(约5—8毫升),并不断搅拌土样直至无CO<sub>2</sub>产生时为止。放置约1小时后(放置期间,须不时搅拌土样,同时土壤的酸度宜维持在pH 1—2间,若室温高于20℃,上述操作均应在冰水浴中进行,以免有机酸损失),徐徐加入一定量的无游离酸的硅胶粉<sup>2)</sup>,以吸收土壤中过多的水分。加硅胶粉时,须不断搅拌,使与土样混匀。然后将此土样(此时呈粉状物)定量的移入滤纸筒内(30×100毫米),置于索氏抽提器中于50±1℃下用乙醚进行提取[在抽提器的接受瓶中,除乙醚外,尚加有准确量度的一定量的(3—5毫升)0.200N NaOH溶液,用以吸收抽提出的有机酸;抽提器与接受瓶及

冷凝管的连接处均用石蜡密封;冷凝管的上端并装有氧化钙干燥管,以免水汽侵入]。

2. 硫酸提取法——取供试土样5—10克,如上述加入适量的4N(或6N)硫酸并经放置约1小时后,按1:5的土浸提液比例加入25.0—50.0毫升的0.50N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,在冰水浴中用搅拌机搅拌半小时,离心,将上清液移入容量瓶中,贮存于6—10℃温度下(冰箱)待测。

分析方法:乙醚法提取出的有机酸总量按下述方法测定。将连续抽取一定时间后所得的抽提液中的乙醚去除净尽,滴加2—4滴混合指示剂<sup>3)</sup>,

\* 本工作在刘期松同志指导下进行,特此致谢。

- 1) 陈恩凤、刘期松等:苏打盐渍土中有机质矿化与脱盐脱碱和保持肥力的关系。1963年。(未刊稿)
- 2) 吸湿性弱的硅胶粉的制备:将国产(上海试剂厂)无色硅酸粉碎,过100孔筛,用中性热蒸馏水反复浸泡,洗涤,直到洗滤液呈中性反应为止,在100℃烘干水分后,再继续于110℃烘8小时左右,取出置于干燥器中冷却,保存备用。这种硅胶粉的吸水能力较差。  
吸湿性强的硅胶粉的制备:将工业用水玻璃(比重约1.4)用水稀释(1:4)后搅匀,静置沉淀4—6天,虹吸取其上清液,搅匀后再静置4—6天,除去绝大部分夹杂物,虹吸取出上清液,加浓盐酸(化学纯)边加边搅拌,待硅胶沉淀完全后,再加适量的浓盐酸,浸没所得沉淀物,搅匀,静置24小时,虹吸除去上层黄色的酸液,用水洗二次,再加入适量的浓盐酸浸泡。如此反复多次,直到无铁离子为止。而后用水洗滤液,至洗滤液呈中性,再用热中性蒸馏水洗6—7次,滤出沉淀物,烘干过80—100孔筛,再在110℃将硅胶粉烘8小时,取出于干燥器中冷却保存备用。此种硅胶粉的吸水能力很强,约能吸收自身重量二倍的水。
- 3) pH4—10混合指示剂配方如下:(甲)称0.32克溴麝香草酚蓝溶于320毫升95%乙醇中。(乙)称0.02克麝香草酚蓝溶于20毫升95%乙醇中。(丙)称取0.1克甲基红溶于100毫升95%乙醇中。(丁)称取0.6克酚酞溶于60毫升95%乙醇中。将分别配制的溶液混合在一起,用0.1N NaOH调节成墨绿色,于棕色瓶中保存备用。

用标准 0.1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 滴定剩余的碱(滴定终点为草绿色), 根据消耗的酸量, 计算出土样中有机酸的总量。

乙醚提取液中各别有机酸的含量用柱层析法分离测定。将测定有机酸总量的有机酸钠盐溶液用定量滤纸过滤入 50 毫升烧杯中, 滴加 1N NaOH 使溶液呈碱性 (pH 10 左右), 然后置真空干燥器中于 35℃ 以下进行减压浓缩, 直至溶液浓缩近糊状时为止。然后取出, 用 0.5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 酸化样品 (pH 1—2), 立即加入一定量的层析用硅胶粉, 将硅胶粉与样品混匀呈略潮湿的粉状物 (在低温下进行)。将此粉状物完全地移入已准备好的硅胶层析的上端。移入毕, 用一薄层脱脂棉盖在样品上, 随后用不同比例的正丁醇-苯溶液 (0、2、4、10、15、20 及 30%) 各 50 毫升依次洗脱。于收集的各洗脱液中分别加入一定量的重蒸水后, 用标准 (0.05N) 碱液直接滴定或用水提取出洗脱液中的有机酸后 (借助于分液漏斗), 用标准碱液滴定。根据碱液的消耗量, 计算各有机酸的含量。

硫酸法提取出的有机酸量用柱层析法分离测定: 吸取提取液 (上清液) 25 毫升置 50 毫升烧杯中, 用 4N NaOH 调节溶液 pH 至 10 左右 (上述操作在冰水浴中进行), 然后如上述进行低温减压浓缩、酸化与与硅胶粉混匀后, 移到柱上进行柱层析分离和测定。如提取液中有有机酸含量较多, 亦可不经过浓缩, 而直接将一定量的提取液 (上清液 3—5 毫升) 与硅胶粉混匀后, 如上述进行柱层析分离和测定。

## 结果和讨论

为了确定苏打盐土中有机酸的提取条件, 我们进行了乙醚提取法和硫酸提取法的提取条件试验。

1. 挥发性脂肪酸的提取: 乙醚不同抽提时间的试验结果列于表 1。由表 1 可见, 连续抽提 34 小时, 各挥发性脂肪酸的收率均在 92% 以上。随着抽提时间的增加收率亦略有提高; 抽提 72 小时, 可以将挥发性脂肪酸相当完全的提取出来。

考虑到苏打盐土中一般有机酸含量较低, 进行该项测定时, 必须取较多量的土样, 因此, 我们曾将一定量的各种有机酸, 分别加入不同量的土样中, 然后按上法测定其收率。试验结果表明, 只要在提取前已使有机酸自土壤及其盐类中充分游离出来以及将土样装入滤纸筒后, 使滤纸筒仍留

表 1 乙醚抽提时间对收率的影响\*(%)

抽提时间(小时)	甲酸	乙酸	丙酸	丁酸	戊酸
34	97.2	94.8	91.8	101.8	103.6
60	98.5	101.7	92.6	—	—
72	107.0	100.4	97.6	102.6	101.1

\* 土样 5 克, 土样中原有 0.06 毫当量有机酸, 加入的有机酸量分别为: 甲酸—0.386 毫当量; 乙酸—0.402 毫当量; 丙酸—0.392 毫当量; 丁酸—0.455 毫当量; 戊酸—0.387 毫当量。

有 1—1.5 厘米的空处, 以利在抽提过程中经常保持一定数量的乙醚层浸渍土样, 则取用的土样量虽增多, 仍能提取完全。

用硫酸法提取时, 各有机酸的收率常较乙醚法为低, 一般仅在 89—97% 之间。看来, 收率较低, 并非由于硫酸法提取不完全, 而是由于其他原因所致。例如, 在用硫酸法提取的过程中, 需要机械搅拌 30 分钟, 而此时浸取液又呈强酸性, 这样就为这些酸的挥发提供了方便的条件, 从而收率较低。这种损失以在室温高于 25℃ 时较为明显, 但即使在冰水浴上操作也难以避免。此外, 挥发性脂肪酸的硫酸提取液调节至 pH 约为 10 后, 在低温减压浓缩过程中, 有机酸的损失较为显著 (乙醚提取液在同样的浓缩过程中, 有机酸的损失较不明显, 通常用柱层析法测得的收率与用总酸度法测得的很接近), 浓缩的程度愈甚, 损失也愈多 (表 2)。这是用硫酸法浓缩液进行测定时收率较低的另一原因。

表 2 硫酸法提取液的浓缩程度对收率的影响\*(%)

浓缩程度	甲酸	乙酸	丙酸	丁酸	戊酸
未浓缩	93.7	96.6	91.7	89.1	89.8
糊状	81.5	90.8	85.9	89.0	82.2
干涸	77.8	55.3	83.5	55.5	76.5

\* 土壤中有机酸的加入量分别为: 甲酸—0.773 毫当量; 乙酸—0.805 毫当量; 丙酸—0.809 毫当量; 丁酸—1.05 毫当量; 戊酸—0.862 毫当量。

由上述可见, 无论乙醚法或硫酸法都能将土壤中的挥发性脂肪酸提取完全。乙醚法抽提时是在一个密封系统中进行, 提取出的有机酸较快地被碱液吸收而以盐的状态固定下来, 因而防止了它们挥发损失的机会; 它的抽提时间虽较长 (约需 60—72 小时), 但其提取液的浓缩过程较短, 所以它具有显著的优点。硫酸法虽然提取省时 (约半天左右), 但提取过程中易导致酸的挥发损失。另

外, 由于它的提取液中某些金属离子(如铁离子)较多, 这些金属离子的存在, 不但为下一步中和后的浓缩过程增加了困难(中和后即有较多量的胶状物质出现), 浓缩费时很多, 但亦易导致酸的损失。因此, 总的看来, 我们认为在提取苏打盐土中的挥发性脂肪酸时, 以采用乙醚法较为适宜。当然, 在某些条件下, 例如在土壤中挥发性脂肪酸量较多的情况下, 可以不经浓缩而直接取 3—5 毫升提取液进行柱层析时, 硫酸法也有其优点, 但是在

一般情况下, 土样中挥发性脂肪酸含量不多, 如不经浓缩, 则或因试液取量有限, 致使测定不准确, 甚至有漏检的可能, 或者试样取量在 5 毫升以上, 又将给柱层析带来一定困难。

2. 不挥发性脂肪酸的提取: 10 种常见的不挥发性脂肪酸的回收试验表明, 用乙醚法提取时, 各种酸的收率虽均随抽提时间的增加而增大, 但总的来说, 它们比挥发性脂肪酸的收率要低一些(表 3)。例如, 抽提时间仅为 34 小时, 5 种挥发

表 3 用乙醚法提取苏打盐土中的不挥发性脂肪酸 (5 克土样)

项 目	草酸	酒石酸	柠檬酸	苹果酸	琥珀酸	乌头酸	乳酸	延胡索酸	丙酮酸	$\alpha$ 酮戊二酸
提 取 48 小 时										
加入酸量(毫当量)	0.468	0.431	0.453	0.394	0.434	0.431	0.635	—	—	—
测得量(毫当量)	0.020	0.180	0.240	0.346	0.414	0.395	0.490	—	—	—
收率(%)	4.3	41.7	55.2	87.6	95.6	91.6	77.3	—	—	—
提 取 72 小 时										
加入酸量(毫当量)	0.900	0.831	0.911	0.795	0.840	0.830	0.873	0.440	0.697	0.293
测得量(毫当量)	0.265	0.553	0.513	0.722	0.863	0.844	0.890	0.443	0.627	0.306
收率(%)	29.5	66.5	56.0	90.7	102.6	101.6	101.9	100.5	90.1	104.4

性脂肪酸的收率即已高达 92% 以上, 而 7 种不挥发性脂肪酸的收率, 即使在抽提时间为 48 小时的条件下, 亦仅在 4.3—95.6% 间。这种差异, 显然和它们在乙醚中的溶解度(不挥发性脂肪酸的溶解度)较之挥发性脂肪酸为小不同有关。抽提时间增为 72 小时时, 7 种不挥发性脂肪酸的收率可达 90% 以上, 但草酸、酒石酸和柠檬酸的收率仍很低(29.5—66.5%)。后一现象看来主要是由于这三种酸具有很强的络合金属离子的能力, 因而不易被提取所致。这一点可以用我们在操作过程中的观察到的下述现象来证实: 我们注意到, 将草酸、酒石酸或柠檬酸加入苏打盐土中后, 在用硫

酸酸化使之游离出来以前, 其间若相隔的时间愈久, 则它们的收率也将愈低(表 4)。

表 4 有机酸与土壤作用时间对收率的影响(%)

放置时间(分钟)	草 酸	酒石酸	柠 檬 酸
10—15	64.4	65.9	101.3
90—120	29.4	62.7	52.4

和挥发性脂肪酸不同, 硫酸法用于苏打盐土中不挥发性脂肪酸的提取时, 其效果显著较乙醚法为优, 除了草酸的收率较低(65%)外, 其余 9 种酸的收率都可以认为是令人满意的(表 5)。草酸的收率较低与其在冷水中的溶解度较小有关, 如

表 5 用硫酸法提取苏打盐土中的不挥发性脂肪酸 (10 克土样)

项 目	草酸	酒石酸	柠檬酸	苹果酸	琥珀酸	乌头酸	乳酸	延胡索酸	丙酮酸	$\alpha$ 酮戊二酸
加入酸量(毫当量)	0.937	0.879	0.911	0.795	0.869	0.830	1.27	0.440	0.697	0.293
测得量(毫当量)	0.610	0.777	0.875	0.838	0.870	0.799	1.33	0.432	0.690	0.303
收率(%)	65.1	88.4	96.3	105.4	100.1	96.3	104.7	98.2	99.0	103.5

果增加抽提次数, 每次按 1:1.25 或 1:2.5 的土与浸提取的比例, 抽提 2—3 次, 则其收率可提高到 85—91%。

不挥发性脂肪酸的挥发性虽较弱, 但其硫酸法提取液(pH—10)在低温减压浓缩过程中, 仍因

酸本身及浓缩程度的不同, 而有不同程度的损失(表 6)。可见, 硫酸法的提取液, 即使是不挥发性脂肪酸, 也不能浓缩过甚。一般来说, 为了便于进行定量柱层析, 提取液的浓缩是必不可少的, 我们建议, 在这种情况下, 可以将提取液浓缩到 3—5

表 6 硫酸法提取液的浓缩程度对收率(%)的影响

项 目	草酸	酒石酸	柠檬酸	苹果酸	琥珀酸	乌头酸	乳酸	延胡索酸	丙酮酸	$\alpha$ 酮戊二酸
未浓缩	65.1	88.4	96.3	105.4	100.1	96.3	104.7	98.2	99.7	103.5
浓缩到 2—3 毫升	61.1	69.1	93.5	95.4	91.8	94.0	100.2	93.8	86.1	100.1
浓缩到干涸	52.3	55.7	63.4	87.8	59.7	91.6	89.9	84.3	59.0	99.4

毫升,以尽可能降低在此过程中酸的损失。

### 摘 要

1. 比较了乙醚法和硫酸法提取苏打盐土中有机酸的效能。乙醚法提取挥发性脂肪酸( $C_1-C_5$ )的效能较之提取不挥发性脂肪酸的效能为高,连续抽提 72 小时( $50 \pm 1^\circ C$ ),各挥发性脂肪酸的收率在 95—107% 间;而在同样提取条件下,供试的大多数不挥发性脂肪酸(苹果酸、琥珀酸、乌头酸、乳酸、延胡索酸、丙酮酸、 $\alpha$ 酮戊二酸)的收率虽然也还是满意的(在 90—104% 间),但草酸、酒石酸、柠檬酸的收率仅在 30—67% 间。

2. 在硫酸法提取挥发性脂肪酸的过程中,少量酸挥发损失,因此其收率仅在 89—96% 间;硫酸法提取不挥发性脂肪酸的效能较乙醚法高,除草酸的收率较低外,对于其他的不挥发性脂肪酸,用该法提取可以得到满意的结果。

3. 提取土壤中的挥发性脂肪酸以用乙醚法为

宜。至于不挥发性脂肪酸,则以采用硫酸法为宜。

### 参 考 文 献

- [1] Schwartz, S. M. et al.: Separation of organic acids from several dormant and incubated Ohio soils. Soil Sci. Soc. Amer., Proc., 18: 174, 1954.
- [2] Takijima, Y.: Metabolism of organic acids in soils of paddy fields and their inhibitory effects on rice plant growth (Part 5): Growth inhibition of rice seedlings in waterlogged soil and organic acid concentration in the leachate. J. Science of Soil and Manure, Japan, 32: 386—389, 1961.
- [3] Takijima, Y.: Metabolism of organic acids in soils of paddy fields and their inhibitory effects on rice plant growth (Part 3): Absorption of organic acids by soils, and quantitative method of determining soil organic acids J. Science of Soil and Manure, Japan, 32: 130, 1961.