

# 腐殖酸的数均分子量测定\*

陆长青 朱燕婉

(中国科学院南京土壤研究所)

腐殖酸是广泛存在于土壤、污泥、泥炭、煤和水域中的天然大分子电解质,它对土壤肥力、植物生长、环境中元素的迁移和富集有重要作用,近廿年来日益为人们所重视,但其化学结构和分子量的确切范围目前尚不甚清楚。迄今为止,尚没有一种测定各种腐殖酸分子量的良好方法<sup>[1]</sup>。不同研究者报道的腐殖酸分子量测定结果相差悬殊,自数百一数百万<sup>[1,7-10,12]</sup>。造成这种差异的原因,一方面与腐殖酸的来源和不均匀性有关,有些也是由于测定条件不适所致。例如用沉降法测定腐殖酸分子量时,由于缓冲溶液的 pH 值与离子强度不同,测定值可相差 12—22 倍<sup>[8]</sup>。在水相中,由于腐殖酸胶体的水合作用,分子体积增大,会使某些重均分子量测定值变大。Visser, S. A.<sup>[13]</sup> 报道,用 X 射线衍射法测得一种胡敏酸的分子量为 1393,而它在水中的颗粒量却为 26760,相差约 19 倍。

据报道腐殖酸的数均分子量一般在数百至数千之间<sup>[6,9,11,12]</sup>。在数均分子量的测定方法中,膜渗透压法的测定下限,受到半透膜选择的限制,不适用于分子量不大的非均质体系的测定。某些能溶于水或丁撑砒等溶剂的腐殖酸或其级分,虽可用冰点下降<sup>[10]</sup>、蒸气压渗透计<sup>[9]</sup>等法测定,但绝大多数胡敏酸和部分富里酸不能完全溶于上述溶剂,而仅溶于碱性溶液中。横川等<sup>[6]</sup>曾用电导法通过测定腐殖酸钾溶液的解离度和表观分子量的方法测定腐殖酸的分子量,而腐殖酸钾溶液与氯化钾的电导并不一致。目前钠离子选择性电极的性能日臻完善,用它直接测定腐殖酸钠溶液中游离钠离子的活度,以校正水溶液中的总质点数,再根据范特荷夫原理,计算出腐殖酸的分子量,是一种可行的办法。本文主要介绍这种测定腐殖酸分子量的方法。

## 一、原 理

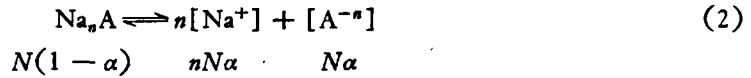
腐殖酸是一类大分子聚电解质。在其水溶液中,由于功能团的解离,溶液的冰点下降、沸点升高和蒸气压降低等数值的大小取决于溶液中离子和分子的总浓度。按照范特荷夫定律,电解质溶液的渗透压、冰点下降值……等与其重量克分子浓度、范特荷夫常数和绝对温度成比例。电解质的分子量 ( $M$ ) 等于表观分子量 ( $M_0$ ) 与范特荷夫常数 ( $i$ ) 之乘积。

$$M = M_0 i \quad (1)$$

腐殖酸 ( $H_nA$ ) 是一类含有羧基、酚羟基等酸性功能团的多元酸。其钠、钾或铵盐可

\* 本文承文启孝同志斧正;实验中承苏渝生和宣家祥同志分别提供低阻 pNa、pH 和全固态参比电极,特此一并致谢。

溶于水,在水溶液中腐殖酸钠 ( $\text{Na}_n\text{A}$ ) 的离子平衡方程式可简列如下:



设最初溶质腐殖酸钠的克分子数为  $N$ , 解离度为  $\alpha$ , 溶质一个分子可解离出  $V$  个粒子; 则解离的分子数为  $\alpha N$ , 未解离分子数为  $N(1-\alpha)$ , 解离的离子总数为  $\alpha NV$ 。当一个分子解离出  $n$  个钠离子时, 则解离的钠离子数为  $nN\alpha$ , 故  $V = n + 1$ ; 溶液中未解离分子数与解离离子数的总和为  $N(1 + n\alpha)$ 。

因此, 
$$i = \frac{N(1 + n\alpha)}{N} = 1 + n\alpha \quad (3)$$

此地  $n$  为分子量 ( $M$ ) 与当量 ( $E_w$ ) 的比值——当量数。将  $n = \frac{M}{E_w}$  代入(3)式, 得:

$$i = 1 + \frac{M}{E_w} \alpha \quad (4)$$

(4)式代入(1)式:

$$M = \frac{M_0 E_w}{E_w - M_0 \alpha} \quad (5)$$

反应式(2)中的钠离子数 ( $nN\alpha$ , 或以浓度  $N_{\text{Na}}$  表示) 可以用钠功能电极测定:

$$nN\alpha = N_{\text{Na}} = 10^{-p\text{Na}} \quad (6)$$

因为  $n = \frac{M}{E_w}$ ,  $N = \frac{C}{M}$ ; 而  $\frac{C}{E_w} = N_{E_w}$  为腐殖酸的克当量浓度。一并代入(6)式, 则解离度为:

$$\alpha = \frac{N_{\text{Na}}}{N_{E_w}} \quad (7)$$

将(7)式代入(5)式, 则:

$$M = \frac{M_0}{1 - M_0 \frac{N_{\text{Na}}}{C}} \quad (8)$$

从(5)和(8)式可见, 如已知  $M_0$ 、 $E_w$  和  $\alpha$ ; 或已知  $M_0$  和  $N_{\text{Na}}$  值, 即可求得腐殖酸的分子量。

表观分子量  $M_0$  可用基于溶液热力学原理的冰点下降、蒸气压渗透计等法测定。用冰点下降法测定时, 表观分子量为:

$$M_0 = K_f C / \Delta T_f \quad (9)$$

真实分子量为:

$$M = \frac{K_f C}{\Delta T_f - K_f \alpha N_{E_w}} = \frac{K_f C}{\Delta T_f - K_f N_{\text{Na}}} \quad (10)$$

式中  $K_f$  为溶剂的冰点下降常数,  $C$  和  $\Delta T_f$  分别为溶质的重量浓度和冰点下降温度。

对非均质物质而言, (10) 式中的  $M$  为数均分子量  $\overline{M}_n$ 。并且, (10) 式在稀溶液中成立。因此,

$$\overline{M}_n = \lim_{C \rightarrow 0} \frac{K_f}{(\Delta T_f / C)_{C \rightarrow 0} - K_f (N_{\text{Na}} / C)_{C \rightarrow 0}} \quad (11)$$

腐殖酸是一种带负电荷的有机胶体。在无低分子电解质存在下,一般腐殖酸的临界胶态离子浓度(CMC, Critical micelle concentration)  $\leq 10$  克/升<sup>[1,3]</sup>。因此,供试腐殖酸溶液的浓度以 10 克/升以下为宜。

用钠功能电极测定腐殖酸钠溶液中钠离子的活度时,电极对钠离子活度的响应遵从 Nernst-Eisenman 公式:

$$E = E_0 + \frac{2.303}{F} RT \log (a_{\text{Na}} + K a_i^{1/n}) \quad (12)$$

式中  $E_0$  为标准电位,  $a_{\text{Na}}$  为钠离子的活度,  $K$  为电极选择性系数,  $a_i$  和  $n$  分别为干扰离子的活度与电价,  $F$  为法拉第常数,  $R$  和  $T$  分别为气体常数和绝对温度。在本研究体系中,腐殖酸为电渗析样品,唯一干扰离子为氢离子,其它阳离子对电极的干扰可以忽略。一般 pNa 电极对于氢离子的  $K$  值小于  $10^3$ 。当待测溶液的钠离子活度值 ( $a_{\text{Na}}$ ) 在  $10^{-1}$ — $10^{-2}$  mol 时,如待测溶液的 pH 值在 6.0 以上,即可以完全满足电极选择系数的要求。当 pH 值在 6.0 左右时,某些腐殖酸可能不能完全溶解。pH 值很高对电极虽无影响,但  $[\text{OH}^-]$  离子增多,将影响冰点等的测定结果。因此,待测溶液的 pH 值在 8.0 左右,即腐殖酸的中和等当点左右为宜。

## 二、样品与方法

### (一) 样品

1. 芳酸。苯甲酸 (CP) 和水杨酸 (CP) 为上海试剂一厂出品。阿魏酸 (Purum) 为德国 Carl Rath Karlsruhe 出品。

2. 腐殖酸。风化煤富里酸为河南巩县西村腐殖酸肥料厂提供。其它土壤、泥炭和堆肥中的腐殖酸均按科诺诺娃法<sup>[5]</sup>制备。用 0.1N NaOH 提取,上清液经巴氏滤烛除去粘粒后,反复沉淀、溶解二次制得胡敏酸。分离胡敏酸后的溶液,经活性炭吸附,用碱液洗脱得富里酸。胡敏酸与富里酸均用电渗析法脱盐<sup>[6]</sup>,然后在 60°C 以下干燥。

### (二) 方法

冰点下降-pNa 校正法测定腐殖酸数均分子量包括下述步骤:

1. 测定腐殖酸等当点、中和当量——电位法。称取 0.1 克腐殖酸 (准确至 0.1 毫克),用移液管加入标准 0.1N NaOH 溶液 20 毫升,待溶解后用滴定管加入与 NaOH 等当量的 HCl (0.1N HCl 20 毫升),使成胶体,然后用标准 0.1N NaOH 溶液间歇滴定至 pH 12.5 左右(每次加 0.20 毫升)。从一次微分电位滴定曲线上求得其等当点与中和当量 ( $E_w$ )。

2. 制备腐殖酸钠溶液。将定量的腐殖酸溶于过量的稀氢氧化钠溶液中(即加入与腐殖酸总酸度等当量的碱),配制 0.1N <sub>$E_w$</sub>  (以中和当量计)的腐殖酸溶液。藉全固态参比电极和 pH 计,用预先制备好的淋干、无氯离子的阳离子交换树脂,调节溶液酸碱度至中和等当点 pH 值 (pH 8.0  $\pm$  0.2),并迅速分离。除去交换树脂后的溶液,用去离子水稀释成不

1) 在两电极间电位梯度为 8—10 V/cm 下,电析 8 小时后,阴极室仍无酚酞反应为止。

同浓度的溶液供试。

3. 测定表观分子量——冰点下降法。用冰点计<sup>[4]</sup>或伯克曼温度计法测定。前者以标样求得的仪器常数  $K_f$  值 ( $\Delta R \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 计算, 后者以水的  $K_f$  值  $1.858^\circ\text{C} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$  计算。

4. 测定腐殖酸溶液中钠离子活度——pNa 法。在  $0^\circ\text{C}$  的冰水浴中, 以低阻钠功能电极和带有  $0.1\text{M}$  硝酸铵盐桥的甘汞电极, 用离子计或 pHS-3 型 pH 计的毫伏档测定 pNa 1—4 的标准氯化钠溶液的毫伏数, 绘制工作线<sup>[2]</sup>。在同样条件下, 测定供试溶液的电位。从工作线上求得溶液中游离钠离子的浓度  $N_{\text{Na}}$ 。

以样品浓度对单位浓度的冰点下降值  $\Delta R/C$  (或  $\Delta T_f/C$ ) 与  $N_{\text{Na}}/C$  值分别作图, 用外推法求得  $\lim C \rightarrow 0$  的  $(\Delta R/C)_{C \rightarrow 0}$  值与  $(N_{\text{Na}}/C)_{C \rightarrow 0}$  值(图 1), 以  $(\Delta R/C)_{C \rightarrow 0}$  和  $(N_{\text{Na}}/C)_{C \rightarrow 0}$  值代入(11)式求得分子量。

### 三、结果和讨论

三种微溶或不溶于水的芳酸(苯甲酸、水杨酸和阿魏酸), 用冰点下降-pNa 校正法测得的分子量结果分别列于表 1 和表 2。结果表明, 当各有机酸钠溶液的浓度降低时, 虽然由于钠离子的解离, 其  $\Delta R/C$  值随溶液浓度降低而增加, 致使表观分子量降低。但当以溶液中游离钠离子浓度的理论冰点下降值校正以后, 三种芳酸分子量的实测值与理论值很接近, 误差在 3% 以下(图 1, 表 1, 2)。

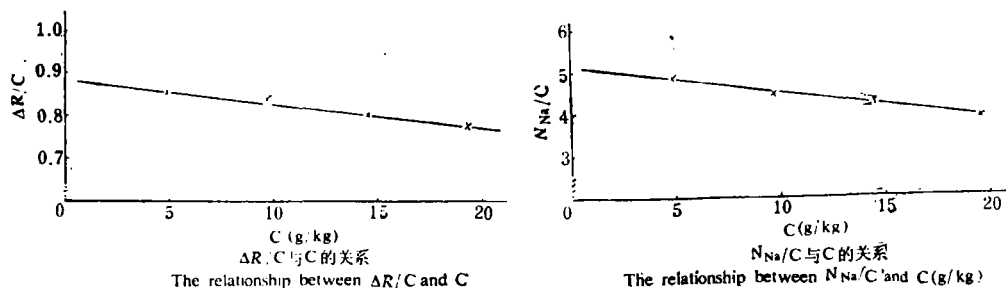


图 1 阿魏酸的冰点和 pNa 测定结果

Fig. 1 Molecular weight of ferulic acid (measured by cryoscopy-pNa corrected method)

- 注: 1.  $C$  为样品浓度  
 2.  $\Delta R$  为冰点计测值(欧姆)  
 3.  $N_{\text{Na}}$  为钠离子浓度  
 4.  $N_{\text{Na}}/C$  的值为图中值  $\times 10^{-3}$

Note: 1 Concentration of sample  
 2 Ohm measured by cryoscope  
 3 Sodium ion concentration

河南巩县风化煤富里酸是以羧酸为主的水溶性腐殖酸。其数均分子量既可用本法测定, 也可用 pH 校正法<sup>[9]</sup>测定。用这两种方法所得到的测定值分别为 1300 与 1290 (表 3, 4)。

曾以膜渗透压法(以  $\mu = 0.075$ 、pH 8.3 的 Barbitone 缓冲溶液, 用改制的 Bull 渗透压计)<sup>[3]</sup>, 测定了从黑土分离出的几个腐殖酸样品的数均分子量  $\overline{M}_n$ , 测定结果列于表 5。

表 1 阿魏酸的分子量

Table 1 Molecular weight of ferulic acid

$C$ (g/kg)	$N_{EW}$	$N_{Na}$	$N_{Na}/C$ ( $\times 10^{-3}$ )	$\alpha$	$\Delta R$ ( $\Omega$ )	$\Delta R/C$	$M_0$	$\overline{Mn}$
19.3340	0.0996	0.074	3.83	0.743	15.08	0.78	109	
14.5005	0.0747	0.061	4.28	0.817	11.54	0.80	107	
9.6670	0.0498	0.043	4.45	0.864	8.08	0.84	102	
4.8335	0.0248	0.0234	4.84	0.944	4.13	0.85	101	
lim $C \rightarrow 0$			5.10	0.990		0.88	97.4	194

表 2 三种芳酸的分子量

Table 2 Molecular weights of three phenolic acids

样品 Sample	$N_{Na}/C$ ( $\times 10^{-3}$ )	$\alpha$	$M_0$	$M$	与理论值相差(%) Deviation from the theor. value
苯甲酸 Benzoic acid	7.95	0.975	61.0	119	-2.55
水杨酸 Salicylic acid	6.85	0.947	70.0	135	-2.26
阿魏酸 Ferulic acid	5.10	0.990	97.4	194	-0.10

表 3 风化煤富里酸的数均分子量(冰点下降-pNa 校正法)

Table 3 The  $\overline{Mn}$  of fulvic acid extracted from weathered coal (by cryoscopy-pNa corrected method)

$C$ (g/kg)	$N_{EW}$	$N_{Na}$	$\alpha$	$N_{Na}/C$ ( $\times 10^{-3}$ )	$\Delta R$ ( $\Omega$ )	$\Delta R/C$	$M_0$	$\overline{Mn}$
9.0602	0.0899	0.030	0.333	3.31	4.00	0.44	195	
4.5031	0.0449	0.018	0.400	3.97	1.99	0.44	195	
3.0200	0.0300	0.013	0.434	4.31	1.38	0.45	191	
2.2650	0.0225	0.010	0.445	4.42	1.03	0.46	188	
lim $C \rightarrow 0$			0.475	4.71		0.47	183	$13.0 \times 10^2$

表 4 风化煤富里酸的数均分子量(冰点下降-pH 校正法)

Table 4 The  $\overline{Mn}$  of fulvic acid extracted from weathered coal (by cryoscopy-pH corrected method)

$C$ (g/kg)	$\log C$	pH	$H^+/C$ ( $\times 10^{-3}$ )	$\Delta R$ ( $\Omega$ )	$\Delta R/C$	$M_0$	$\overline{Mn}$
9.7394	0.989	2.10	0.82	1.82	0.19	461	
4.8694	0.688	2.22	1.24	0.98	0.20	427	
3.2465	0.512	2.33	1.44	0.69	0.21	402	
2.4349	0.385	2.43	1.53	0.53	0.22	396	
lim $C \rightarrow 0$		2.72	1.9		0.23	373	$12.9 \times 10^2$

与本法比较(表 6),用膜渗透压法测得的胡敏酸的分子量比本法约大 9—14%,测得的富里酸的分子量比本法高达 34%。二种方法测值的相对误差随分子量减小而增大,看来膜渗透压法测值偏高,是由于部分小分子量级分经半透膜扩散外逸所致。

表 5 黑土腐殖酸的渗透压

Table 5 Osmotic pressure of humic acids extracted from black soil

腐殖酸 Humic substances	浓度, C (g/l.) Conc	渗透压, $P_{H_2O}$ (cm) Osmotic pressure	P/C	$\overline{Mn}$	平均值 Mean
胡敏酸(除去乙醇可溶物后的级分) Humic acid (After removal of alc. -soluble fraction)	0.887	7.50	8.45	3030	3010
	1.714	14.87	8.33	2990	
胡敏酸 Humic acid	0.6376	5.69	8.92	2880	2840
	0.650	5.80	8.92	2830	
	1.300	11.68	8.98	2810	
	1.950	17.31	8.88	2850	
富里酸 Fulvic acid	0.413	5.70	13.80	1830	1940
	0.519	6.30	12.15	2080	
	0.620	8.32	13.42	1880	
	0.778	9.93	12.76	1980	
	1.240	16.26	13.11	1930	

表 6 不同来源腐殖酸的数均分子量

Table 6 The  $\overline{Mn}$  of humic acids from different origins

类型 Type		地点 Locality	腐殖酸 Humic acids	中和当量 Equiv. of ne- utralization	数均分子量 $\overline{Mn}$ ( $\times 10^3$ )
泥炭 Peat	泥炭 1 Peat 1	广东, 湛江 Zhanjiang, Guangdong	胡敏酸 Humic acid	127	36.0
	泥炭 2 Peat 2	北京, 海甸 Haidian, Beijing	胡敏酸 Humic acid	170	27.7
土壤 Soil	黑土 Black soil	黑龙江, 双山 Shuangshan, Heilongjiang	胡敏酸 Humic acid	156	25.5
			胡敏酸 (除去乙醇可溶物后的级分) Humic acid (After removal of alc. -soluble fraction)	181	27.7
			富里酸 Fulvic acid	136	14.5
	砖红壤 Laterite	广东, 海南岛 Hainan Dao, Guangdong	胡敏酸 Humic acid	179	22.0
			富里酸 Fulvic acid	125	7.1
堆肥 Compost	堆肥 1 Compost 1		胡敏酸 Humic acid	280	9.85
	堆肥 2 Compost 2		胡敏酸 Humic acid	261	6.20

用本法测得的从几种土壤、堆肥和泥炭等中分离的腐殖酸的数均分子量结果列于表 6。各腐殖酸的数均分子量的变动在 620—3600 之间, 与文献上报道的数值相近或略低。不同来源的胡敏酸比较, 大体上有如下的趋势: 泥炭 > 土壤 > 堆肥。同一土壤中不同腐殖酸的比较, 胡敏酸的  $\overline{Mn}$  恒大于富里酸。

## 四、小 结

介绍了一种测定腐殖酸数均分子量的冰点下降法。供试腐殖酸用稀碱液溶解，然后用阳离子交换树脂调节溶液 pH 值至中和等当点。用钠离子电极测定溶液中游离的钠离子浓度用以校正表观分子量。

本法的精度在 1—3% 间。对水溶性腐殖酸来说，本法与汉逊、斯尼茨尔法的测定结果相同。用本法测定了几种不同来源腐殖酸的数均分子量，它们变动在 600—3600 间。

## 参 考 文 献

- [1] 井ノ子 昭夫, 玉井 理., 1976: 土壤腐殖の高分子科学的研究。日本農業技術研究所報告。B 第 28 号, 119—182。
- [2] 苏渝生, 1964: 钠功能 (pNa) 玻璃电极的试制。化学通报。No: 4, 620—625。
- [3] 陆长青, 1965: 腐殖物质的某些物理化学性质。土壤学报。13(4), 442—448。
- [4] 陆长青、朱熿焄, 1981: 冰点计及其在土壤学中的应用。土壤, 13(2), 60—66。
- [5] 科诺诺娃, M. M., 1959: 土壤有机质。117—118 页, 科学出版社。
- [6] 横川、渡都、梶上、武上., 1961: 石炭的化学構造論に関するもの第三報. 再生フシン酸の分子量。燃料協會會誌(日) 40 卷 38 页。
- [7] Cameron, R. S. and Posner, A. M., 1974: Molecular weight distributions of humic acid from density gradient ultracentrifugation profiles corrected for diffusion. Trans. 10th Intern. Congr. Soil Sci. (Moscow), 2: 325—331.
- [8] Flaig, W. and Beutelspacher, H., 1968: Investigations of humic acids with the analytical ultracentrifuge. In: Isotopes and Radiation in Soil Organic-Matter Studies. IAEA. (Vienna) 23—30.
- [9] Hansen, E. H. and Schnitzer, M., 1969: Molecular weight measurements of polycarboxylic acids in water by vapour pressure osmometry. Anal. Chem. Acta. 46: 247—254.
- [10] Schnitzer, M. and Desjardins, J. G., 1962: Molecular and equivalent weights of the organic matter of a podzol. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26: 362—365.
- [11] Schnitzer, M. and Khan, S. V., 1972: Humic Substances in the Environment. Marcel Dekker, New York.
- [12] Theng, B. K. G., Wake, J. R. H. and Posner, A. M., 1968: The fractional precipitation of soil humic acid by ammonium sulphate. Plant and Soil. 29: 305—314.
- [13] Visser, S. A. and Mendel, H., 1971: X-ray diffraction studies on the crystallinity and molecular weight of humic acids. Soil Biol Biochem. 3: 259—265.

## THE DETERMINATION OF NUMBER-AVERAGE MOLECULAR WEIGHT OF HUMIC ACIDS

Lu Chang-qing and Zhu Yan-wan

*(Institute of Soil Science, Academia Sinica, Nanjing)*

### Summary

A cryoscopic method has been used for the determination of number-average molecular weight of humic substances. Samples were dissolved in dilute alkali solution and then the pH of the sample solution was adjusted to that of the equivalent point of neutralization with the aid of cation exchange resin. Apparent molecular weight was corrected by determining the concentration of  $\text{Na}^+$  in the sample solution by means of the sodium ion electrode.

The accuracy of this method is about 1—3%. For water soluble humic substance, it gave identical value as that obtained by Hansen and Schnitzers method. The  $\overline{M}_n$  of humic substances from different origins examined by this method ranged from 600 to 3600.