

胡敏酸的酒精分级沉淀法分级

卓苏能 文启孝
(中国科学院南京土壤研究所, 210008)

摘 要

本文利用酒精分级沉淀法,将胡敏酸分成12个级分,并对各级分的结构进行了表征。结果表明,随着溶液中乙醇浓度的增大,各级分胡敏酸的腐殖化程度大体上逐渐由强变弱,分子量逐渐变小,全氮,水解性总氮和氨基酸氮的含量逐渐增大,而氨基糖氮和铵态氮逐渐减少。同时还讨论了本法与凝胶分级法所获得的结果不同的可能原因。

关键词 胡敏酸,酒精分级沉淀法,氮素形态分布

腐殖酸是一种高分子聚合物,具有高聚物所共有的多分散性。同时,由于起始物质和形成条件的多样性,它还具有高度的非均质性,后者由于在提取过程中非腐殖物质的进入而更甚。经过精制的胡敏酸和富里酸样品在化学性质和分子量上都是多种分子的混合物。因此,在研究腐殖酸的性质和结构时,获得较为均一的级分就成为首要且重要的问题。现有的腐殖酸的分级方法很多,包括沉淀分级法,溶解分级法,层析分级法,电泳分级法等,但各有其优缺点。应用 Schulz 最早提出的酒精分级沉淀法, Kyuma 曾成功地把土壤胡敏酸分成了不同的级分^[1]。该法操作简便,适宜于制备性分级之用,且可按需要将样品分成更均一的级分。Kumada 和 Kawamura 用此分级法对不同种类的胡敏酸进行分级,发现原胡敏酸的腐殖化程度越高,得到最大沉淀部分所用的乙醇量越少^[2]。但是,根据 Kyuma 的材料,用该法得到的各级分,其 C/N 比值随胡敏酸分子量的变小而变窄^[3]。这和用层析法得到的结果恰恰相反。层析分级法得到的结果表明,分子量较大的级分中通常总是含 N 量较高^[3,4,13,19]。上述不同原理的分级法为何导致了如此不同的结果是一个值得弄清楚的问题。我们设想,研究各级分中氮素的形态和组成或可有助于此问题的解决。

本文利用酒精分级沉淀法,把胡敏酸分成了 12 个级分,对各级分的特性,特别是其含氮组分用化学方法和物理方法进行了研究,并根据所获结果,对各级分胡敏酸的含 N 量随分子量的降低而增多的原因进行了探讨。

一、材料与方 法

(一) 供试样品 供分级用的胡敏酸样品是从长白山暗棕壤中按《土壤有机质研究法》^[21]中的提取和纯化方法制备而得的。

(二) 胡敏酸分级 称取精制胡敏酸 7.5 克溶于 1000 毫升 0.2 mol/L NaOH 溶液中,加无水乙醇于 NaOH 溶液中,使乙醇浓度 (V/V) 从 500 ml/L 逐次增加到 3065 ml/L (乙醇浓度分别为 500、

650、800、1000、1200、1500、1800、2300、2675 和 3065ml/L) 得到 10 个级分。每个级分用离心法,把沉淀从乙醇—NaOH 溶液中分离出来,溶于蒸馏水中,进行电渗析,然后在 50℃ 条件下烘干。级分 11 为分离级分 10 后的溶液放置 8 天后在底部产生的沉淀。将分离上述 11 个级分后的溶液在 50℃ 水浴上蒸干,将此固形物再溶于水,进行电渗析,烘干后即得级分 12。

(三) 分析方法 胡敏酸各级分的氮素形态分布根据 Bremner^[6] 法测定。样品用 6mol/L HCl 回流水解 12 小时。酸解残渣用 330g/L H₂O₂ + 6mol/L HCl 酸解 12 小时。氨基酸组成用日立 835-50 型高速氨基酸分析仪测定。具体方法为吸取一部分上述胡敏酸的水解液,在 50℃ 水浴上反复蒸干以除去盐酸,再溶解于 0.02mol/L HCl 中,离心,取上清液供上机用。胡敏酸各级分的元素组成在 240C 型元素分析仪上测定。光密度在 721 型分光光度计上测定,样品浓度为 0.136mgC/ml,溶剂为 0.02mol/L 的 NaHCO₃。紫外光谱在日立 220A 分光光度计上测定,样品浓度为 0.0136mgC/ml。红外光谱用 IR-440 红外光谱仪测定。取约 200mgKBr 粉末和 2mg 胡敏酸样品,磨细,混匀后压片,扫描时间为 8 分钟,室温下测定一次,150℃ 加热 24 小时后再进行第二次测定。

二、结 果

(一) 胡敏酸各级分的收率

表 1 列入了用酒精分级沉淀法得到的 12 个级分胡敏酸的收率。从表可见总回收率为 70%,其中级分 3、级分 4 的量最多,两者之和达原样重的 32%,约占总分离量的一半。在分离过程中观察到,各个级分的颜色依次变浅,从黑褐色-淡棕色。在级分 8 后都有白色晶状物质出现,且随级分数的增加,此类物质的量逐渐增多,而深色物质减少,但白色晶状物质一旦溶于水又变成棕色或淡棕色物质。

表 1 胡敏酸各级分的回收率
Table 1 Yield of humic acid fractions

级 分 Fraction	乙醇/NaOH ml/L Ethanol/NaOH ml/L (V/V)	回收率 (Yield)	
		重量 (mg) Weight	占原样% % of original humic acid
胡敏酸原样		7500	
级分 1	500	10	0.13
级分 2	650	270	3.60
级分 3	850	1260	16.80
级分 4	1000	1130	15.07
级分 5	1200	490	6.53
级分 6	1500	540	7.20
级分 7	1800	340	4.53
级分 8	2300	370	4.93
级分 9	2675	50	0.67
级分 10	3065	150	2.00
级分 11	3065	30	0.40
级分 12		590	7.87
总计		5230	69.73

(二) 胡敏酸各级分的性质

(1) 元素组成 胡敏酸各级分的元素组成和光密度值列于表 2。各级分 C 含量变动在 50.1—56.5% 之间, 级分之间差异较小, 且无一定的变化规律。H、N 含量有依级分 1 到级分 12 序列逐渐增加的趋势。H 含量从级分 3 的 3.8% 增加到级分 12 的 6.2%, N 含量从级分 2 的 2.8% 增到级分 11 的 5.2%, 两者各级分之间的差异都较大。级分 1、2 有些例外。O + S 量变动在 32.3—44.8% 之间, 无规律可循。C/H 和 C/N 比值依级分 1—12 的序列逐渐下降, 而 C/O 比值的变化无规律, 从 C/H 比值的大小可以粗略了解胡敏酸分子中芳香族和脂肪族组分的相对含量, 比值小表明脂肪族组分较多, 比值大意味着芳香族组分含量较高。据此, 可以认为, 随着级分数目的增大, 胡敏酸中芳香族组分含量逐渐减少, 脂肪族组分含量逐渐增加。

表 2 胡敏酸各级分的元素组成(无灰干基), E_i 值和 E_i/E₁ 比值

Table 2 Elemental composition (dry, ash free basis), E_i and E_i/E₁ ratios of humic acid fractions

级分 Fraction	C%	H%	N%	O + S%	C/H	C/N	C/O	E _i	E _i /E ₁
胡敏酸原样	50.82	4.58	3.83	40.77	11.1	13.3	1.3	1.08	5.63
级分 1	51.42	3.97	3.89	40.72	12.9	13.2	1.3	—	—
级分 2	50.29	3.94	2.81	42.96	12.8	17.9	1.2	1.42	4.30
级分 3	48.37	3.83	3.03	44.77	12.6	16.0	1.1	1.40	4.75
级分 4	51.03	4.10	3.36	41.51	14.5	15.2	1.2	1.25	5.39
级分 5	52.13	4.16	3.57	40.14	12.5	14.6	1.3	1.10	6.11
级分 6	52.56	4.52	3.83	39.09	11.6	13.7	1.3	0.94	6.76
级分 7	53.49	4.75	4.46	37.30	11.3	12.0	1.4	0.78	7.80
级分 8	50.14	4.66	4.73	40.47	10.8	10.6	1.2	0.92	8.23
级分 9	52.80	5.23	5.03	36.94	10.1	10.5	1.4	0.40	8.00
级分 10	50.61	5.00	5.00	39.39	10.1	10.1	1.3	0.81	8.02
级分 11	51.13	4.99	5.22	38.66	10.2	9.8	1.3	0.33	7.90
级分 12	56.50	6.24	4.92	32.34	9.1	11.5	1.7	0.19	11.29

表 3 胡敏酸各级分的氮素形态分布(占全 N%)

Table 3 Nitrogen distribution in humic acid fractions (percentage of total N)

级分 Fraction	水解性氮 Hydrolyzable N				非水解性氮 Nonhydrolyzable-N	
	总氮 Total N	NH ₄ ⁺ -N	α-氨基酸 N α-amino acid-N	氨基糖 N Amino sugar-N		未知态 N Unidentified-N
胡敏酸原样	75.8	12.1	36.1	4.7	22.9	24.2
级分 2	71.1	18.7	25.1	3.8	23.5	28.9
级分 3	70.7	14.1	27.4	4.9	24.4	29.3
级分 4	72.3	14.3	31.3	5.1	21.7	27.7
级分 6	79.9	14.2	34.8	4.4	26.6	20.1
级分 8	79.8	13.1	38.4	3.0	25.3	20.2
级分 10	84.9	13.6	37.5	2.2	31.5	15.1
级分 12	89.2	12.2	46.5	1.1	29.4	10.8

表 4 胡敏酸各级分及其酸解残渣的氨基酸组成 (α -氨基酸 N \times 100/总氨基酸 N)Table 4 Distribution of amino acids in humic acid fractions and their nonhydrolyzable residues (α -amino acid N \times 100/Total amino acid N)

级分 Fraction		胡敏酸各级分 Humic acid fraction			胡敏酸各级分的酸解残渣 Nonhydrolyzable residue of humic acid fraction		
		胡敏酸原样 Original humic acid	级分 3 Fraction 3	级分 12 Fraction 12	胡敏酸原样 Original humic acid	级分 3 Fraction 3	级分 12 Fraction 12
		酸性氨基酸	天门冬氨酸	17.48	19.29	15.79	12.61
	谷氨酸	10.97	12.43	10.32	7.30	4.59	8.75
	总量	28.45	31.72	26.11	19.91	14.28	22.09
中性氨基酸	苏氨酸	6.97	5.12	6.91	3.33	2.22	4.34
	丝氨酸	6.84	5.42	5.41	1.76	2.72	3.59
	脯氨酸	7.85	6.91	8.76	3.84	—	6.38
	甘氨酸	15.69	16.21	13.65	17.39	26.91	12.74
	丙氨酸	11.42	10.91	11.32	7.32	8.32	8.87
	缬氨酸	7.12	6.82	8.25	12.26	7.90	12.12
	异亮氨酸	7.91	4.01	3.84	2.46	2.24	5.28
	亮氨酸	3.99	4.18	8.22	3.60	3.16	9.87
	酪氨酸	—	—	—	—	—	1.03
	苯丙氨酸	0.34	0.47	3.03	2.07	5.38	0.43
	总量	63.13	60.05	69.39	54.03	58.85	64.65
含硫氨基酸	胱氨酸	0.24	—	0.26	0.46	0.83	0.36
	甲硫氨酸	—	—	0.21	—	—	—
	总量	0.24	0.00	0.47	0.46	0.83	0.36
碱性氨基酸	赖氨酸	4.25	3.54	2.51	21.21	22.21	10.53
	组氨酸	1.83	2.11	—	2.31	1.41	0.35
	精氨酸	2.10	2.58	1.52	2.07	2.42	2.04
	总量	8.18	8.23	4.03	25.59	26.04	12.92

(2) 氮素形态分布 部分级分的氮素形态分布结果列于表 3。由表 3 可见,从级分 2 到级分 12,水解性总氮和氨基酸氮含量逐渐增加,且各级分间差异较明显,前者从级分 2 的 71.1% 增加到级分 12 的 89.2%,后者从 25.1% 增加到 46.5%。铵态氮和氨基糖氮则呈现减小的趋势。

(3) 氨基酸组成 表 4 中列入了胡敏酸原样,级分 3 和级分 12 的酸解液及其酸解残渣氧化酸解后的酸解液的氨基酸组成。胡敏酸原样及级分 3 的氨基酸组成与一些文献中报道的非常相似^[4]。级分 12 与它们相比,氨基酸组成有所不同,前者中的中性氨基酸含量较高,碱性氨基酸则显著较少,还不到胡敏酸原样和级分 3 的一半。另外,中性氨基酸中的亮氨酸、苯丙氨酸等的相对含量彼此间也明显不同。酸解残渣的氧化酸解液中的氨基酸组成二者间也呈现大体上与此相似的差别。

(4) 紫外光谱 紫外光谱结果表明,各级分在 280nm 处的肩峰随级分数的增大而越益明显(图 1)。Kononova 和 Alexandrova 认为,在 280nm 处的吸收峰是木素来源的芳香化合物的反映^[9]。这表明,级分数较大的级分中芳环的缩合程度较级分数较小的级

分为低, 结构较简单。

(5) 可见光谱 大量的材料表明, 胡敏酸的光密度值 (E_4 和 E_4/E_6) 在一定程度上可以反映其腐殖化程度和分子量大小^[7,10]。 E_4 值较小或 E_4/E_6 值较大, 表明其腐殖化程度较高, 分子量较大; 反之 E_4 值较大或 E_4/E_6 值较小则表明其腐殖化程度较低, 分子量较小。从表 1 可知, E_4 值随着级分数的增加而逐渐减小, 只有级分 8 和 10 有些例外; E_4/E_6 比值的变化刚好与 E_4 相反, 大体上依级分 2 到级分 12 的序列逐次增大。这说明, 随着级分 2 到级分 12 的序列, 胡敏酸的腐殖化程度逐渐减弱, 分子量逐渐降低。

(6) 红外光谱 胡敏酸原样及其各级分在室温和 150℃ 加热处理后的红外光谱分别示于图 2, 图 3。胡敏酸各级分的红外光谱很相似, 也和其它土壤胡敏酸相似^[11,14], 它们均有以下一些吸收带: 3400 cm^{-1} (各种带氢键的羟基), 2900 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} (脂肪族 C—H 的伸缩振动), 2600 cm^{-1} (分子中位置相近的羧基以氢键缔合引起的), 1720—1700 cm^{-1} (羧基和酮基中的 C=O 的伸缩振动), 1650 cm^{-1} (羧酸盐的 C=O, 酰胺 I、芳香族的 C=C), 1600 cm^{-1} (芳香族 C=C 及 C=O, 苯环), 1510 cm^{-1} (酰胺 II), 1400—1390 cm^{-1} (酚类化合物的 C—O 键振动、酚羟基的变形振动, —COO⁻ 的不对称振动), 1380 cm^{-1} (脂肪族末端的 CH₃), 1250—1220 cm^{-1} (羧基中 C=O 键伸缩振动和 OH 的变形振动), 1030 cm^{-1} (多糖或多糖类似物的 C—O 键以及硅酸盐杂质的 Si—O 键的伸缩振动)。

从图 2 可知, 依级分 1 到级分 12 的序列, 2900 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} 处的吸收强度逐渐增加, 1600 cm^{-1} 处吸收强度逐渐减小, 说明随着级分数目的增大, 脂肪族结构所占比重有所增加, 而芳香族结构所占的比重有所下降, 这与各级分的 C/H 比值变化所得到的结论相一致。从级分 2 到级分 12, 在 1650 cm^{-1} 及 1510 cm^{-1} 处的吸收强度增加, 说明越是后面的级分, 其酰胺态氮的含量也越高, 这与各级分的元素组成和氮素形态分布的结果相吻合。级分 1、2 在 1720 cm^{-1} 和 1400—1390 cm^{-1} 处吸收强度比其它级分强, 说明这两个级分中含有较高的羧基和酚羟基。

和加热前的样品相比, 在胡敏酸各级分加热处理后的红外光谱图上, 除了由于加热消除了吸湿水的干扰, 原有的 3400 cm^{-1} 处的最大吸收峰移至 3200 cm^{-1} 处, 且强度显著减弱, 成了一个宽平峰外, 胡敏酸原样及各级分在 2300 cm^{-1} 处的吸收均增强, 在 650 cm^{-1} 处均出现了新的吸收峰, 这些都是由于 CO₂ 吸收所引起, 表明在加热过程中胡敏酸各级分发生了脱羧反应。级分 12 无这两个峰的出现, 其原因不详。此外, 胡敏酸各级分在 1840

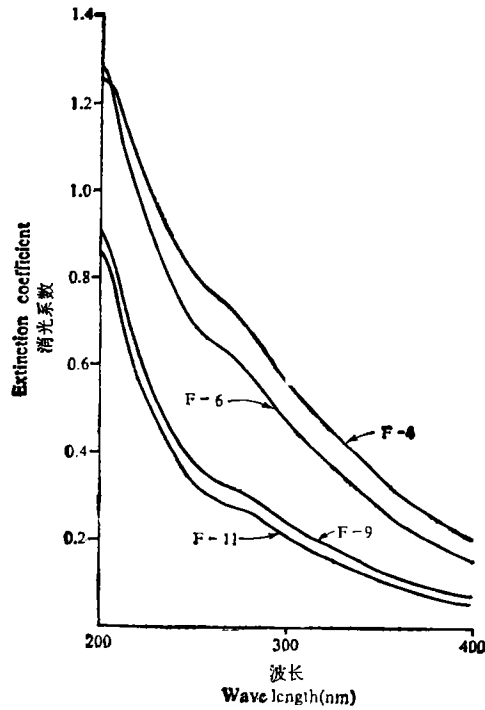


图 1 胡敏酸各级分的紫外光谱

Fig. 1 UV spectra of humic acid fractions

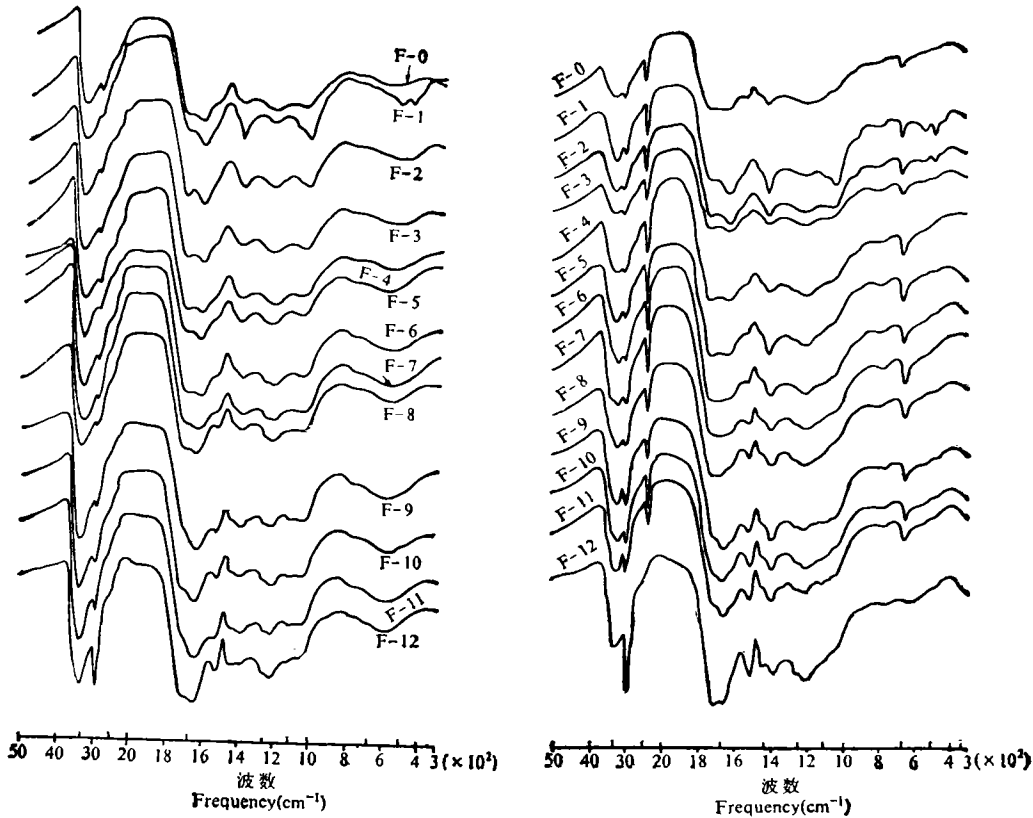


图2 胡敏酸各级分的红外光谱图(室温)
Fig. 2 IR spectra of humic acid fractions
(room temperature)

图3 胡敏酸各级分的红外光谱图(150°C, 24 小时)
Fig. 3 IR spectra of humic acid fractions
(150°C, 24hrs)

cm^{-1} 和 1780cm^{-1} 处出现了两个新的肩峰,前者较弱,后者较强,它们分别是羧酸酐的反对称耦合和对称耦合引起的,表明在加热过程中邻位羧基脱水形成了环酐。 2600cm^{-1} 处肩峰显著减弱证实了这一点。加热后级分数大的级分在 1650cm^{-1} 和 1510cm^{-1} 处吸收强度明显增强,特别是级分 9、10、11 和 12。根据 Goulden 和 Jenkinson^[8],此处主要是由于肽键中的酰胺吸收引起的,说明随着级分数目增大,氨基酸态氮量明显增大,这和各级分的氮素形态分布的结果是一致的。

三、讨 论

本工作的结果表明,随着溶液中乙醇浓度的增加,胡敏酸各级分的分子量(颗粒量)和芳香族组分的相对含量逐渐减小,腐殖化程度逐渐降低,而其全氮量,水解性总氮、氨基酸氮及脂肪族组分的相对含量逐渐增大。这说明,酒精分级沉淀法是一种能将胡敏酸样品按其分子量、腐殖化程度和氮素形态分布分成较均一的不同级分的较有效的方法。

一般根据凝胶分级法得到的不同分子量大小的级分中,分子量大的级分不仅全氮量

高,而且酸解性氮、氨基酸氮的相对含量也高^[4]。但用酒精分级沉淀法得到的各级分中,除级分 1 外,分子量大的级分不仅其全氮量低,而且其水解性氮、氨基酸氮的相对含量也低。同为分子量大的级分,为何其含氮量及氮素形态分布却截然不同。对此,我们认为这可能是由于通常的胡敏酸制品是两种不同的缩聚物的同系物之混合物,因而当用两种不同原理的分级方法时得到了不同的结果。已经知道,用酚、蚁酸等可以从胡敏酸中分离出富含蛋白质的部分;另外,胡敏酸通过氢型阳离子交换树脂时,其氮含量将显著减少。这说明,通常的胡敏酸制品中除胡敏酸本身外,还含有较富含氨基酸氮的组分,它们可能系通过氢键与胡敏酸相结合^[5,14]。

凝胶分级法是根据分子的大小、形状进行分级的。蛋白质或多肽为长链化合物,它们或者以氢键与胡敏酸结合,或者少量单独存在,这些都为大分子,因此分子量较大的级分中全氮量、氨基酸态氮含量都高;而分子量小的级分中,与胡敏酸结合的只是一些较短的肽链,因此分子量小的级分中不仅全氮量低,而且氨基酸态氮含量也低,而未知态氮的相对含量较高。酒精分级沉淀法是根据同一聚合物中不同分子量部分加入沉淀剂后临界沉淀点不同进行分级。由于胡敏酸的碱溶液中加入无水乙醇,使氢键遭到破坏,因而通过氢键相连的多肽同真正的胡敏酸部分分离。胡敏酸的碱-醇体系是多种物质的混合体系,在有乙醇存在的情况下,由于乙醇的脱水作用及根据相似相溶的原理,颗粒量大,芳环缩合度高,结构复杂的真正胡敏酸部分以及少量长链多肽,在碱-醇的水溶液体系中的溶解度将变小或发生了凝聚作用而优先沉淀。随着乙醇浓度增大,分子量较小,含脂肪族组分较多,链较短的多肽及含有孤立苯环的多肽也逐渐沉淀出来。脂肪族组分含量高及少量与孤立苯环相连的多肽由于其在乙醇中溶解度大,最后仍留在溶于乙醇的部分中。级分 12 的氨基酸组成与胡敏酸原样和级分 3 存在着差异的事实也支持这一点。因此,用酒精分级沉淀法得到的胡敏酸各级分,分子量较大的级分中氮含量较低,而分子量较小的级分,氮含量较高。

应当指出,由于混杂物的存在,上述无论哪一种分级方法得到的结果均不能反映真实胡敏酸各级分中氮素分布状况的实际情况,包括氮素的含量及其变异规律。张德和和刘登良曾报道,利用溶剂梯度淋洗法得到的不同级分的风化煤富里酸中,其含氮量大体上随级分分子量的增大而增多^[3]。该富里酸在分级前已经过甲基化处理,即已排除其它含氮化合物与富里酸通过氢键相结合的可能性。土壤真正胡敏酸分子量不同的各级分中氮素的分布规律如何还有待于进一步研究。

参 考 文 献

1. 文启孝、彭福泉、林心雄,1988: 土壤有机质,中国土壤,390—399 页,科学出版社。
2. 文启孝等,1984: 土壤有机质研究法。农业出版社。
3. 张德和、刘登良,1981: 吐鲁番风化煤黄腐酸的结构表征。燃料化学学报,第 10 卷 2 期,121—128 页。
4. Anderson, H. A., and Hepburn, A., 1977: Fractionation of humic acid by gel permeation chromatography. *J. Soil Sci.* 28: 634—644.
5. Biederbeck, V. O. and Paul, E. A., 1973: Fractionation of soil humate with phenolic solvents and purification of the nitrogen rich portion with polyvinylpyrrolidone. *Soil Sci.* 115(5):357—366.

1) 彭福泉等,1984: 全国第三次腐殖酸化学学术讨论会论文集。

6. Bremner, J. M., 1965: The forms of organic nitrogen, in "Methods of Soil Analysis" (Black, C. A. ed.), Am. Soc. of Agro, pp. 1228--1255, Wisconsin, USA.
7. Chen, Y., Senesi, N., and Schnitzer, M., 1977: Information provided on humic substances by E_4/E_6 ratios. *Soil Sci. Soc. Am J.*, 41(2):352--358.
8. Goulden, J. D. S. and Jenkinson, D. S., 1959: Studies on the organic matter extracted from soils and compost. *J. Soil Sci.* 10:264--270.
9. Kononova, M. M. and Alexandrova, I. V. 1973: Formation of humic acids during plant residue humification and their nature. *Geoderma*. 9:157--164.
10. Kumada, K., 1965: Studies on the colour of humic acids. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 11(4): 11--16.
11. Kumada, K. and Kawamura, Y., 1968: On the fractionation of humic acids by a fractional precipitation technique. 14(5):198--200.
12. Kyuma, K., 1964: A fractional precipitation technique applied to soil humic substances. *Soil Sci. Plant Nutr.* 10:33--35.
13. Schnitzer, M. and Skinner, S. I. M., 1968: Gel filtration of fulvic acid, a soil humic compound. In "Isotopes and Radiation in Soil Organic Matter" Studies. pp. 41--55. International Atomic Energy Agency, Vienna.
14. Stevenson, F. J., 1982: Organic forms of soil nitrogen. "In Humus Chemistry." pp. 55--89. New York.
15. Swift, R. S. and Posner, A. M., 1972: Nitrogen, phosphorus and sulphur contents of humic acids fractionated with respect to molecular weight. *J. Soil Sci.* 23:50--57.

FRACTIONATION OF HUMIC ACID BY FRACTIONAL PRECIPITATION TECHNIQUE

Zhuo Suneng and Wen Qixiao

(Institute of Soil Science, Academia Sinica, Nanjing, 210008)

Summary

A humic acid extracted from dark brown soil was fractionated by the fractional precipitation technique into 12 fractions which were characterized by various methods. Results showed that with the increase of alcohol concentration, the degree of humification and molecular weight of humic acid fractions thus obtained showed a tendency to decrease gradually, total N, the relative contents of total hydrolyzable N and amino acid N increased progressively but the amino sugar N and $\text{NH}_4^+\text{-N}$ decreased. The possible reason for causing the difference between the results got by this method and the gel filtration method is discussed.

Key words Humic acid, Fractional precipitation technique, Nitrogen distribution