

现代分析技术在土壤腐殖质研究中的应用^①

梁重山 刘丛强

党 志

(中国科学院地球化学研究所环境地球化学国家重点实验室 贵阳 550002) (华南理工大学应用化学系)

摘 要 土壤腐殖质的研究已成为土壤学、环境化学和地球化学等领域的热点方向之一。应用核磁共振光谱(NMR)、红外光谱(IR)、荧光光谱(FS)、电子自旋共振谱(ESR)等现代分析技术,对在土壤腐殖质组成和结构研究中取得的主要成果进行了综述。

关键词 土壤腐殖质;分析技术;组成和结构

由于二氧化碳的温室效应,在全球变化研究中碳循环将处于一个极其重要的核心地位^[1]。全球约有 1500Gt 碳是以有机碳形态储存于土壤中,是大气碳库储量的 2 倍,因此土壤有机碳库储量较小幅度的变化,会直接对大气二氧化碳的固定或释放过程有较大的影响^[2]。另外,土壤有机质的植物所需多种营养元素(如 N、P)的主要来源,是土壤肥力的重要组成部分,使土壤具有通气性、渗透性和缓冲性。土壤有机质含多种疏水基、亲水基和游离基等官能团,是土壤中对污染物的吸附-脱附过程起主要作用的组份^[3,4]。因此,土壤有机质的研究已成为土壤学、环境化学和地球化学等领域的热点方向之一。

腐殖质是土壤有机质的主要部分,是土壤中所特有的一类有机物。按其在酸碱溶液中的溶解度分为胡敏酸、富里酸和胡敏素。目前,对腐殖质的结构存在两种认识^[5]:1)认为胡敏酸、富里酸及胡敏素都包含由一个酚和部分氧化了的木质素单体和双体组成网状结构,其他羧酸类、脂肪类等有机物吸附在这种结构上。因此腐殖质的物理性质受其分子结构形状影响,而化学性质则由表面的酚基和羧基等官能团决定的;2)通过扫描电镜、黏度测定、表面张力测定发现胡敏酸和富里酸胶团的大小和形状受 pH 值的影响极大。由此推测不同结构单位是依靠氢键和范氏力聚合在一起形成腐殖质的弹性海绵状结构。当 pH 值升高时有利于羧基和羧基的离子化,因此胶团会变小。这两种结构模型是在大量实验基础上推测的,还需要做进一步的研究。近年来,现代仪器分析技术的发展为土壤腐殖的研究提供了先进的手段,从而使土壤腐殖质的研究提高到了新的水平。取得了许多研究成果,本文将对此作一概述。

1 腐殖质的降解方法

采用水解、氧化还原和热解方法可以提供腐殖质分子比较直观的信息,是研究腐殖质早期采用的方法。缺点是在极端降解条件下发生的化学反应很复杂,产生的降解产物很多,因此分析结果很困难。有时检测到的主要降解产物不一定是腐殖质分子的基本组成单位,容易导致错误的结论。

1.1 水解方法

① 国家攀登预选项目“95-预-39”5-4 专题资助

有些聚合物如高聚糖、蛋白质和核糖等可以通过水解反应而确定其组成。由于腐殖质内部键合关系很复杂,大多数键通过水解反应很难断裂,因此腐殖质在水解反应中主要释放蛋白质类物质和碳水化合物。Parsons^[6]研究表明在6N HCl条件下,胡敏酸水解过程中会产生CO₂和水溶性分子(单糖、氨基酸、嘌呤和嘧啶等),同时单糖和氨基酸的有机物可能发生缩合反应,最后50%以上的胡敏酸发生了水解反应。

1.2 还原氧化方法

金属单质、氢、金属氢化物等还原剂与腐殖质发生还原降解反应,其中钠汞齐常被作为还原剂。Hayes^[7]用钠汞齐作为还原剂,发现土壤腐殖质的降解产物主要有九种,主要是苯酚(醚)和苯酚(醚)的衍生物,同时还发现降解产物中有少量脂肪类有机物。原因是酚醚和联苯结构上的取代基与苯酚基的键、芳香醚与脂肪基的键在反应中断开了。Cheshire^[8]根据这些实验结果认为腐殖质的网状结构是以多环芳烃类为核心,而其他酚类、金属离子、多肽、羧酸化合物再连接上而构成的。

氧化铜、碱性高锰酸钾溶液、氯气、硫化钠、硝酸等氧化剂与腐殖质发生氧化反应。用碱性高锰酸钾和氧化铜氧化时,主要是脂肪羧酸和苯基羧酸类等降解产物,而且在不同的氧化条件下(反应时间、温度、氧化剂浓度等)最后的降解产物会不同。

1.3 热解反应

水解法和氧化还原法往往需要先将腐殖质提纯,这样不但会增加实验步骤,而且可能会改变腐殖质的性质和组成。热解法可以克服这些缺点,样品直接放在真空柱中热解,灰分物质不会干扰实验,最后热解产物用场离子质谱仪检测。热解-场离子质谱(Py-FIMS)提供了腐殖质分子的基本结构信息,各种热解产物在谱图上有特定的分子离子峰,已有332种热解产物被确定^[9]。依据热解方法的结果人们提出了胡敏酸单体的分子式是C₃₁₅H₃₄₉N₅O₉₀和对应的结构式,考虑单体发生脱水反应和脱氢反应,分子内的氢键作用及弱相互作用力(范德华力等)等因素,还提出了胡敏酸的三聚体、十聚体和十五聚体的分子式和结构式^[10]。

热解法也存在一些问题,如受热解腔壁的限制,热解产物的量很少,而腐殖质很复杂,热解产物是否有代表性还很难说;检测到的主要热解主产物不一定是腐殖质的基本结构单位;而且分子中的羧基和羟基会在腐殖质的热解过程中脱去。后来采用烷基化试剂与羧基和羟基发生衍生反应来保护羧基和羟基^[11],但也只能部分地保护羧基和羟基,不能完全避免脱羟基反应的发生。

2 腐殖质的光谱分析

降解法破坏了腐殖质的原有组成,同时会有很多降解产物生成,导致最后实验结果很难解释。光谱法能将腐殖质作为一个整体来研究,对其破坏也很少,是主要的研究手段。表1列出了测定腐殖质性质和组成的一些常用分析方法。

2.1 核磁共振光谱

核磁共振光谱(NMR)用来研究土壤腐殖质及其腐殖化过程已有20年了,开始只能测定液体样品,灵敏度比较差。只有一部分腐殖质是可溶性的,实验结果的可靠性存在很大的问题,这就限制了它的应用。将傅立叶

表1 腐殖质研究中常用分析方法(摘自Gaffney J. S. et al^[12])

| 项 目 | 测 定 方 法 |
|--------|--|
| 测定分子量 | 粘度法、渗透压测定法、超离心法、凝胶过滤法、激光散射法、场解吸质谱法 |
| 鉴定官能团 | 傅立叶变换红外光谱法、 ¹³ C核磁共振光谱法、电子自旋共振谱、热解-气相色谱法、热解质谱法、热解气相色谱-质谱法、热解-傅立叶变换红外光谱法、滴定法 |
| 测定键位关系 | 阳离子交换法、荧光法、光声光谱法、渗析法、电位滴定法 |

变化技术应用到核磁共振光谱后,不但提高了测定有机质的灵敏度,消除了无机离子的干扰,并且能直接测定固体样品。这样可以在不破坏腐殖质的化学组成条件下,真实地反映其结构特征,因此核磁共振光谱已成为腐殖质研究中重要的分析手段。

固相 ^{13}C -NMR方法加深了人们对腐殖质的认识,取得了许多重要的研究成果^[12~14]。①腐殖质的性质和组成。腐殖质主要有羧基、醇羟基、酚羟基、醌型羟基和酮型羟基等官能团。其中富里酸含羧基、醇羟基、酚羟基和酮型羟基的量要比胡敏酸多,而胡敏酸含醌型羟基的量要比富里酸高。各种官能团的含量,对不同土壤差异较大。Krosshavn等^[15]研究表明土壤腐殖质结构受到有机质的腐殖化度和地理环境的影响,随着腐殖化度的提高,土壤的脂肪族C增加,羟基减少,羧基增加,而芳香C变化没有规律。Wershaw和Pinckney^[16]研究也发现腐殖质包含有植物组织的降解产物,因而地理环境和植被的不同会影响腐殖质的组成。②腐殖质的各种组份的差异。表层土中胡敏酸的酚基含量较高,随着降解过程加剧含量会下降;芳化度随土壤深度和降解过程会升高,原因是芳香基不易被降解,或土壤微生物会合成出芳香化合物加入到腐殖质中。Saiz-Jimenez et al^[17]通过核磁共振光谱法测定了不同地点土壤样品中腐殖质,表明不同土壤中胡敏酸、富里酸和胡敏酸素的结构特征相似。胡敏酸与胡敏酸的芳化度接近,富里酸比胡敏酸的芳化度要低。研究表明胡敏酸和富里酸是两种类型的有机质,富里酸不是胡敏酸的降解产物。腐殖质中有木质素的降解产物,因此腐殖质中的芳香结构可能来自木质素的降解,而腐殖质中链烷结构可能是角质和软木脂等生物聚合物的后期加入;③腐殖质的网状结构模型。通过NMR波谱的定量分析,结合其他分析方法和计算化学;构造出了胡敏酸的三维结构模型。Schulten^[18]通过 ^{13}C -NMR数据和热解方法提出一个胡敏酸分子的化学结构模型。胡敏酸分子的核心结构是烷基芳香基。Zhang^[19]也有相同的结论。Hatcher^[20]实验发现热解过程中含氧产物比例很高,而模型缺少含氧官能团,因此这一模型需要进行修改,也可能根本就不对。Cool和Langford^[21]通过参差极化魔角样品自旋(CP-MAS) ^{13}C -NMR技术分析土壤中的腐殖质结构特征。指出富里酸分子结构特点是:结构骨架由脂肪烃组成,其中芳香基是主要变化的组份,而变化的含官能团化合物是糖类化合物。而胡敏酸分子由绝大部分固定组份与很少的变化组份(芳香基)构成;④环境科学中的应用。土壤有机质吸附污染物机理的研究是环境科学中重要的课题之一^[22~25]。用 ^{13}C -NMR测定出土壤的有机质的极性碳含量,发现它与吸附量有直接的关系,而不是原先笼统的认为有机质含量与吸附量有直接关系^[26]。Thorn^[27]用 ^{15}N 羟胺标记物研究了腐殖质中羰基的衍生化反应机理,探讨了含氮有机污染物在土壤中的吸附、固定和降解过程。由于核磁共振光谱的应用,使在污染物吸附机理方面的研究达到了分子水平的微观世界;⑤地球化学意义。由于气候、地理位置、植被的不同,腐殖质的组成存在很大的差异,通过对腐殖质的研究可以了解一个地区的气候和环境的变化过程。如研究表明沉积物中的腐殖质是藻类生物的降解产物,而不是原先人们认为的主要来自陆地植物。

^{15}N 和 ^1H 核磁共振光谱法也被采用,只是应用很受限制。 ^1H 核磁共振光谱图的直观性很差,分辨率低。样品残留水会严重干扰测定,需要进行前处理过程^[28]。目前,对含氮有机物的测定存在一定困难, ^{15}N -NMR将成为测定含氮有机物的有效方法。缺点是测定时间较长, ^{15}N 的丰度低(0.37%),磁旋比小,因此灵敏度比 ^{13}C 低50倍左右。

2.2 红外光谱

红外光谱(IR)是定性分析有机物官能团的主要手段之一,根据红外吸收曲线的峰位、峰强以及峰形来判断化合物是否存在某些官能团。Schnitzer和Schuppli^[29]用红外光谱分

析表明腐殖质的主要官能团有羧基、羟基和羰基等,用不同提取剂提取的腐殖质在分子量、芳化度、主要官能团方面存在一些差异。Wang^[30]等发现不同分子量富里酸的红外光谱图很相似,但也存在一些明显的差别。认为富里酸分子量较小时其芳化度较小,并且羧基含量也较高。由于红外光谱非常复杂,并受腐殖质提取剂的影响,因此对其完全解析还很困难,只能部分地反映腐殖质的结构组成。

2.3 荧光光谱

同步荧光光谱法具有谱图简单、谱带窄、干扰物影响小、选择性和灵敏度高的优点,是一种敏感、无破坏性的分析方法。土壤腐殖质的荧光强度不但与其结构(有色官能团和非饱和键)有关,还与腐殖质的来源、分子量、溶液浓度、pH值、离子强度、温度和氧化还原电势等因素有关^[31]。腐殖质是一个复杂的多组分体系,其荧光光谱是胶团中各种荧光团的综合表现,因此只能推测出腐殖中可能存在的官能团。土壤中许多重金属离子(顺磁性)具有荧光熄灭作用,荧光法能反映出无机-有机复合体之间的键位关系。Esteves^[32]等研究了不同来源的腐殖质与 Cu^{2+} 的相互关系。表明土壤中的胡敏酸和富里酸皆有两个结合点与 Cu^{2+} 复合,而水相中的胡敏酸和富里酸则有2~3个结合点。由于腐殖质的组成和来源决定其荧光光谱的最大峰和强度,因此荧光法能作为鉴定胡敏酸和富里酸是否同一来源的标准方法^[33]。荧光光谱的峰较宽并且强度小说明腐殖质的芳化度和不饱和键较高,带有较多的亲电子官能团(羰基、羧基),并且分子量较大;荧光光谱的峰较窄并且强度大说明腐殖质的结构简单、分子量小、芳化度小、生色团少,带有较多的给电子官能团(羟基、甲氧基、氨基)。

2.4 电子自旋共振谱

电子自旋共振谱具有不破坏样品分子,对化学反应过程无影响,灵敏度高等优点,特别适合于研究化学活性高、寿命短的自由基及过渡金属化合物和配合物。土壤有机质中相对富含半醌类型的自由基(永久性自由基和暂时性自由基)。测定暂时性自由基时,通过改变土壤的pH值、发生还原反应和进行辐射等方法来提高它们的寿命。这些自由基在与其他有机、无机物质发生反应(如聚合-解聚合反应,植物的生理活性和氧化还原反应)时有重要的作用。

土壤腐殖质中自由基的电子自旋共振谱图中得不到超精细结构,因此提供关于自由基化学结构方面的信息较少。波谱分裂因子 g 是很重要的参数,每一个固定的样品均有它本身的 g 因子,取决于样品的电子结构。从土壤和沉积物中提取的富里酸,其自由基的 g 因子在2.0031~2.0050之间,表明这些自由基是半醌基连接芳香环的结构。腐殖质的自由基的谱图有不同的线形和峰宽,反映了其内部结构中孤对电子离域位置的不同,另外自由基的浓度、溶剂-溶质的相互作用、温度等因素也有影响。通过谱图可以测定自由基的浓度,其大小与腐殖的腐殖化程度、芳香度和酚基含量有关^[34]。Neto^[35]等研究表明土壤的C/N比值越小(即腐殖化程度高),其半醌自由基含量越高。

3 小 结

目前,土壤腐殖质研究中还存在许多有待解决的问题。首先是土壤腐殖质的分离。腐殖质是一个多组份体系,要对其进行准确的分析,需要在分离方法方面有突破性进展,即提取出单一组份的腐殖质;其次是加强对胡敏素的研究。胡敏素组成复杂,分离纯化困难和酸碱不溶性等原因,有关胡敏素的分析资料是十分有限的。二甲亚砜-盐酸溶解它们后,发现这些有机质的性质与胡敏酸和富里酸类似,只是其羧基较多。有人认为土壤胡敏素只不

过是一种粘粒和胡敏酸的复合体。近年来通过对胡敏酸和胡敏素的¹³C-NMR 光谱的研究证实,它们在结构上存在明显差异,说明胡敏素和胡敏酸并不是同一类物^[36],这些观点还需进一步的确认;最后是了解土壤腐殖质的环境作用。土壤腐殖质与有机污染物结合后,有利于它们进一步的降解,与重金属离子紧密配合,从而消除对动植物的危害,这些从环境保护的角度来看是非常有意义的。

参 考 文 献

- 1 Lawler A. *Science*, 1998, 280:1682-1684
- 2 金峰,杨浩,赵其国.土壤有机碳储量及影响因素研究进展. *土壤*, 2000, 32(1):11-17
- 3 刘维屏,季瑾.农药在土壤-水环境中归宿的主要支配因素——吸附和脱附. *中国环境科学*, 1996, 16(1): 25-30
- 4 党志,黄伟林,肖保华.环境有机地球化学:有机污染物-土壤/沉积物吸附作用研究的回顾. *岩石矿物地球化学通报*, 1999, 18(3):194-200
- 5 Schnizer M. *Soil Sci.*, 1991, 151(1):41-58
- 6 Parsons J W. In humic substances II. In search of structure. Eds. Hayes M H B, MacCarthy P, Malcolm et al. Wiley, Chichester, 1989, chap. 5, 121
- 7 Hayes M H B and Swift R S. In soil collids and their associations in aggregates. Eds. Deboodt M F, Hayes M H N, and Herbillon A. Plenum, New York. 1990, 245
- 8 Cheshire M V, Cranwell P A, Haworth R D. *Tetrahedron*, 1968, 24:51-55
- 9 Saiz - Jimenez C. *Environ. Sci. Technol.*, 1994, 28:1773-1780
- 10 Gaffney J S, Marley N A, Clark S B. Humic and fulvic acids Isolation, structure, and environmental role. American chemical society, Washington, 1996, 42-56
- 11 Saiz - Jimenez C. *Environ. Sci. Technol.*, 1994, 28:197-200
- 12 Gaffney J S, Marley NA, Clark S B. Humic and fulvic acids Isolation, structure, and environmental role. American chemical society, Washington. 1996
- 13 Beck A J, Jones K C, Hayes M H B, et al. Organic substances in soil and water: natural constituents and their influences on contaminant behaviour. The royal society of chemistry, Cambridge. 1993
- 14 Wilson M A. N. M. R. techniques and allications in geochemistry and soil chemistry. Pergamon press, 1987
- 15 Kosshavn M, Southon T E, Steinnes E. *J. Soil Sci.*, 1992, 43:485-493
- 16 Wershaw R L. and Pinckney D L. *Anal. Chimica Acta.*, 1990, 232:31-42
- 17 Saiz - Jimenez C, Hawkins B L, Macifl G E. *Org. Geochem.* 1996, 9(6):227-284
- 18 Schulten H R, Schnizer M. *Org. Geochem.*, 1993, 20:17-25
- 19 Zhang J, Zhai J J, Zhao F Z, Tao Z Y, *Anal. Chimica Acta.*, 1999, 378:177-182
- 20 Hatcher P G, Faulon J L, Clifford D A, et al. In humic substances in global environment and implications on human health. Senesi N, Miano T M, Eds, Elsevier, Amsterdam. 1994, 133-138
- 21 Cook RL, Langford C H. *Environ. Sci. Technol.*, 1998, 32:719-725
- 22 Weber W J Jr, McGinley P M, Katz L E. *Environ. Sci. Technol.*, 1992, 26:1956-1962
- 23 Pignatello J J and King B. *Environ. Sci. Technol.*, 1996, 30:1-11
- 24 Huang W and Weber W J Jr. *Environ. Sci. Technol.*, 1997, 31:2562-2569
- 25 Xia G and Ball W P. *Environ. Sci. Technol.*, 1999, 33:262-269
- 26 Kile D E, Wershaw R L, Chiou C T. *Environ. Sci. Technol.*, 1999, 33:2053-2056
- 27 Thorn K A, Arterburn J B, Milkita M A. *Environ. Sci. Technol.*, 1992, 26: 107-116
- 28 Lee G D H, Wilson M A, Young B R. *Org. Geochem.*, 1998, 28:549-559
- 29 Schnizer M, Schuppli P. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 1989, 53:1418-1424
- 30 Wang Z D, Pant B C, Langford C H. *Anal. Chimica Acta.*, 1990, 232:43-49
- 31 Senesi N. *Anal. Chimica Acta.*, 1990, 232:77-106
- 32 Esteves D S, Joaquim C G. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 1995, 27(1):115-128
- 33 Senesi N, Maria T M, Provenzano M R, et al. *Soil Sci.*, 1991, 152(4):259-271
- 34 Senesi N, *Anal. Chimica Acta.*, 1990, 232:51-75
- 35 Neto M L, Andriulo A E, Traghtta D G. *Soil Sci.*, 1994, 157(6):365-372
- 36 李云峰,王兴理.腐殖质-金属离子的络合稳定性及土壤胡敏素的研究.贵阳:贵州科技出版社, 1999