

土壤腐殖质提取和分组综述

马连刚^{1,2}, 肖保华¹

1. 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

2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049

摘 要:土壤腐殖质的定量提取、分离与纯化是深入研究土壤腐殖质的重要前提。本文详细综述了国内外腐殖质提取和分组的实验手段和研究进展;以国际腐殖质协会提供的标准方法为参考,对比论述了提取剂种类,提取次数、提取剂用量等的选择;对比讨论了两种主要的土壤腐殖质的分组方法。超滤分离和体积排阻色谱是腐殖质物理化学表征研究中的两种新兴技术,笔者认为组合使用两种实验手段对土壤腐殖质进行细致的分离与分组研究有助于深化理解土壤腐殖质的化学性质和分子结构。

关 键 词:腐殖质;提取与分组;超滤;高效排阻色谱

中图分类号:P594+.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-2802(2011)04-0465-07

Review on Extraction and Fractionation of Humic Substances from Soils

MA Lian-gang^{1,2}, XIAO Bao-hua¹

1. State key laboratory of environmental geochemistry, institute of geochemistry Chinese Academy of Science, Guiyang 550002, China; 2. Graduate University of Chinese academy of science, Beijing 100049, China

Abstract: Extraction and fractionation of different humic substances from soil samples are key processes in the comprehensive study of soil humic substances. This paper carefully reviewed worldwide advance in extraction and fractionation of soil humic substances. Under guidance of the reference method recommended by the International Humic Substance Society (IHSS), this paper discussed the experiment conditions, for example, extractant, dosage, and extracting cycles, and evaluated two fractionation techniques we set up in the experiments. It is suggested that high performance size exclusive chromatography (HPSEC) and ultrafiltration are two of the state-of-art analytical methods in fractionating and characterizing humic substances in natural soils, and that, once being combined, they can provide profound information to better understand the chemical attributes and the molecular structures of soil humic substances.

Key words: humic substances; extraction and fraction; ultrafiltration; HPSEC

腐殖质是由一系列具有不同分子量和大量含氧官能团的大分子有机质组成的非均质深色混合物^[1],包括能溶于酸也溶于碱的富里酸(Fulvic Acids, FA),溶于碱但不溶于酸的胡敏酸(Humic Acids, HA)和不溶于酸碱的胡敏素(Humin, 本文对其不做论述)。它是由动物、植物残体和人畜粪便经微生物新陈代谢降解后的二次合成物质;是棕黑

色、非均质、无定形的酸性有机物质,其分子量分布在几百到几十万道尔顿,可能是由取代的芳香环通过脂肪链连接而成的聚合物,其单体可能是比较简单的有机化合物,如水杨酸和邻苯二甲酸^[2]。

腐殖质的分子结构和化学性质一直是困扰国际腐殖质研究者的难题,为了揭示腐殖质的地球化学特性,研究者不断地运用各种先进技术手段对其进

收稿日期:2011-01-28 收到,04-02 改回

基金项目:中国科学院“百人计划”资助项目;贵州省科学技术基金资助项目(2010-2032);中国科学院地球化学研究所领域前沿项目

第一作者简介:马连刚(1983—),男,博士研究生,从事环境地球化学研究。E-mail: mar1810@mails.gyig.ac.cn.

通讯作者:肖保华,研究员,从事环境地球化学研究。E-mail: xiaobaohua@mails.gyig.ac.cn.

行分析,如傅里叶变换红外光谱(FTIR)、裂解-质谱仪(Py-MS)和核磁共振(NMR)等先进技术手段^[3]。土壤中的腐殖质,在进行系统研究之前,需要进行提取、纯化和分组。腐殖质自身的化学属性,平衡离子的组成以及与其它有机分子、无机矿物的相互作用,致使腐殖质在土壤中呈不溶态。土壤腐殖质的提取,就是利用各种方法置换不溶离子,破坏各种分子间与分子内相互作用^[3]。

1 腐殖质研究的意义

腐殖质是自然环境中广泛存在的一类大分子有机混合物,约占水环境溶解有机质的50%,土壤有机质的80%^[4]。其结构复杂,单体中有芳香环结构,芳环上有多种取代基(如含氧功能团和氨基酸功能团等),并连接着多肽或脂肪族侧链,此外,也可能存在杂环态氮的结构^[2]。研究表明,腐殖质的主要元素有碳、氢、氧、氮、硫和磷。对于赋存于同一介质中的腐殖酸,胡敏酸碳含量略高于富里酸,氧含量略低于富里酸,但元素组成没有太大差别^[5]。进一步研究揭示腐殖质的分子结构与元素组成,是人类认识世界的一部分。

土壤的形成与有机质腐殖化过程密切相关,岩石经过物理化学风化后,风化残积物中的Fe、Al元素的溶解迁移与沉淀固定受腐殖质的控制^[6]。腐殖质在土壤中可呈游离的酸和盐类状态存在,但大部分呈凝胶状与矿质粘粒紧密结合,成为重要的矿物——胶体物质,从而增加土壤团粒的水稳性和持水性^[7]。腐殖质还可通过增加植物根部细胞膜的渗透性、激活土壤呼吸、促进ATP的合成与三羧酸循环以及光和作用等途径来增加作物的生产^[8]。腐殖质能够提高化肥的利用效率,同时减轻化肥对土壤理化性状产生的不良影响^[9]。因此,腐殖质的研究对农业生产和土地利用非常重要。

腐殖质分子结构中含有大量的活性官能团,如羧基、醇羟基、酚羟基等,因而具有很高的反应活性,能与环境中的有毒金属离子发生络合作用,对金属元素在环境中的迁移、转化和生物效应起着十分重要的调控作用。腐殖质络合金属离子的能力受腐殖质的本质属性的影响,即与其所含的官能团的类型和比例有关^[10]。不同分子量大小的腐殖质各官能团的含量和比例可能不同,因此,对不同分子量的腐殖质与金属离子反应机理和结合能力的研究是理解腐殖质对金属离子环境行为的调控作用的基础。

腐殖质与疏水有机污染物(HOC)的相互作用,能够增加土壤中该类物质的溶解性与迁移率,从而

增加地下水被污染的风险。分配系数(K_{oc})被用来定量描述有机污染物在液相与固相时的分配行为。特定体系下某一污染物的分配系数大小与其正辛醇-水分配系数(K_{ow})和体系固相有机质含量相关。虽然分配模型已经成功的解释了一系列有机污染物在水-土相的分配行为,但是很多污染物在不同来源的土壤样品中分配系数存在显著差异。这种差异可能是土壤有机质不同和外在因素^[10]不同所致。Rutherford等^[11]的研究发现有机污染物的分配系数随腐殖质极性官能团含量的增大而减小。因此对于官能团含量不同的腐殖质组分与有机污染物分配系数之间关系,值得做进一步的研究。

统计研究发现,全球碳分布为土壤有机碳高达1500~2000 Gt,被绿色植物固定的有450~650 Gt,大气中有760 Gt^[12]。因而,土壤中各类有机碳的很小变化,将对全球碳平衡和气候变化产生重要影响。土壤固定了碳,其中腐殖质是主要承担者,腐殖质能够与土壤矿物表面的多价金属离子如 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 等产生较强的络合作用,从而增加腐殖质的稳定性。目前,对于腐殖质占土壤有机质的比例以及土壤腐殖质的降解速率还不确定^[13]。因此,有必要对土壤腐殖质各组分比例及其降解速率进行研究,为全球气候变化提供准确的基础参考。

目前,由于缺乏简便的原位分析手段,对土壤腐殖质进行综合研究之前,需要先进行腐殖质的提取、纯化和分组。

2 土壤腐殖质的提取与纯化

由于缺少标准方法,在以往的研究中,土壤腐殖质的提取方法各有不同,提取剂、提取液剂量、提取次数的选择各有特点,使得研究的数据可比性较低。为了使腐殖质的研究数据更具可比性,国际腐殖质协会提出了一个参考方法,基本提取分离流程见图1,详细的提取分离步骤见文献^[3]。

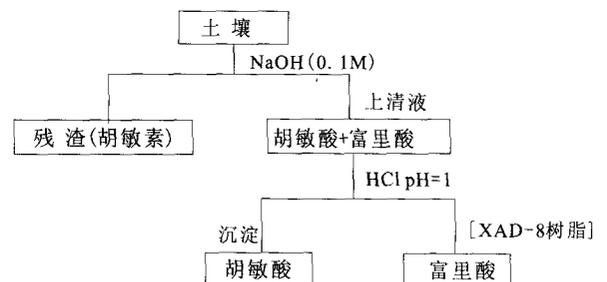


图1 土壤腐殖质提取分离流程

Fig. 1 Extraction and separation scheme for soil humic substances

该方法适合大多数土壤类型但不是标准方法,其所采用的吸附树脂(XAD-8)并不易获得,虽然可以采用透析替代,但是透析效果并不好。鉴于实际研究情况,目前很多土壤提取过程参照了国际腐殖质协会的推荐方法,并做了适当地修改^[14~16]。

2.1 提取剂

碱性提取剂有 NaOH 和 KOH,络合剂有碱性 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 和 EDTA,有机提取剂有丙酮、Sulpholane 和二甲亚砜(DMSO)等。这几种提取剂提取效率及所提取的腐殖质性质见表 1^[17]。利用 NaOH 溶液提取土壤腐殖质是最古老、常用而有效的方法。 Na^+ 能够取代腐殖质的负电点位上的多价离子(如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+}),以及高 pH 值促使腐殖质的很多酸性官能团解离,从而大大改变腐殖质的溶解状态,同时多价金属阳离子与 OH^- 结合生成不溶氢氧化物沉淀而被除去^[18]。

Hayes 等^[17] 的研究(表 1)指出,无机试剂 NaOH 从酸化土壤中提取的腐殖质量是偶极非质子溶剂 Sulpholane、DMSO 和有机溶剂 Pyridine 提取量的两倍左右,且 Pyridine 和偶极非质子溶剂与腐殖质很难完全分离,分别使得提取腐殖质中 N 和 S 含量增加;为了降低提取过程中土壤腐殖质结构改变的可能性,常用较温和的 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 和 Na-EDTA 溶液替代强碱溶液作为提取剂,腐殖质酸性官能团上的多价金属离子(如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+})被 Na^+ 取代后,与 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 和 EDTA 作用形成沉淀或者络合物,有机酸转化为水溶性钠盐而被提取,虽然降低了腐殖质结构改变的可能性,但它们提取的腐殖质量少,且由 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 提取的腐殖质灰分含量很高,这些灰分可能主要来源于腐殖质-矿物络合物^[17]。

表 1 不同提取剂提取率与腐殖质的元素组成

Table 1 Yields and compositions of HA and FA extracted with different solvents from an acidic soil

提取剂	HA+FA 产率 (TOM%)	元素组成 (%) ^①				灰分 (%)	
		C	H	N	S	HA	(FA)
0.5 M NaOH	60.0	51.7	5.9	2.8	—	2.0 ^②	(2.5) ^③
0.1 M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$	14.5	48.9	3.3	3.0	—	2.7	(22.5)
1 M EDTA	16.3	49.6	4.0	—	—	3.2	(5.6)
DMSO	23.0	52.9	4.1	2.9	1.7	3.7	(6.5)
Sulpholane	22.0	52.8	4.5	3.2	2.0	2.1	(3.3)
Pyridine	36.0	53.1	5.0	4.4	—	2.3	(3.8)

注:①为腐殖质(HA+FA)元素组成平均值;②为胡敏酸(HA)的灰分含量;③为富里酸(FA)的灰分含量

同年,Elloff 等^[19] 比较了 NaOH、丙酮、二氧杂环己烷等六种试剂提取效率表明,NaOH 溶液从四种非洲细沙土中提取的腐殖质含量是丙酮等有机试剂提取量的几十倍,是 EDTA 与硼酸混合液提取量的两倍多。通过凝胶色谱研究表明,NaOH 溶液提取的腐殖质分子量最大, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 提取物次之,偶极非质子溶剂(DMSO、DMF、acetone)提取的腐殖质分子量最小,而且腐殖化程度较低^[20]。有研究还对比了 NaOH 与 KOH 的提取效率^[21],采用 KOH 溶液提取腐殖质也能获得较高的效率,可是 KOH 来源少,成本高,且离子半径大,但其渗透能力较之低,因此在研究中运用很少见。

总的来说,由于 NaOH 溶液提取腐殖质的效率比较高,其作为提取剂提取腐殖质的研究也越来越普遍。当然,该提取剂也有一定缺点,在碱性溶液中腐殖质会与溶解的氧气发生反应,从而改变腐殖质的原始结构与化学组成^[3, 22]。另有研究证实,腐殖质在碱性溶液中长期与氧气接触后,腐殖质的分子量降低,分子中羰基与羧基含量增加,从而含氧量增

加。腐殖质的自氧化,这是必须尽量避免发生的^[23]。可向碱溶液中添加抗氧化剂 SnCl_2 ,降低溶液中自由氧含量,减少腐殖质的氧化^[19];国际腐殖质协会推荐采用氮气来减少氧化^[3]。

2.2 提取液剂量与提取次数

在国际腐殖质协会推出参考方法之前,采用 NaOH 溶液浸提腐殖质,其浓度没有统一。2000 年,Rosa 等^[21] 的研究指出,不同碱液提取的腐殖质量的大小顺序为:0.1 mol/L NaOH > 0.5 mol/L NaOH > 1.0 mol/L NaOH,且经过 240 min 后,腐殖质提取量已经达到最大值^[21]。与之相反,我们的模拟实验结果为:等量碱液一次提取的有机质量的大小顺序为:0.1 mol/L NaOH << 0.5 mol/L NaOH \approx 1.0 mol/L NaOH,且 0.1 mol/L NaOH 溶液与土壤作用 240 min 后,泥水混溶,无分层现象,经过 24 h 静置,才出现薄层上清液。这可能与土壤性质有关,Rosa 等所用泥炭土的有机质含量高,而我们所用的黄壤是一种高度脱硅富铝土,其有机质含量较低(约 4%~5%),而铁铝含量高,在碱性条件下

能够产生大量胶体分散于泥水混合体系中,有机无机胶体混合在一起难以分离。因此,从不同的土壤或沉积物中提取腐殖质,NaOH 的浓度还是一个必须考虑的因素。正如腐殖质协会在申明中说的那样,0.1 mol/L NaOH 溶液并不适合所有研究对象。

不同腐殖质组分与土壤矿物质结合的程度不同,一次提取往往只能获得土壤中腐殖质的一部分,用这部分物质来说明整个土壤腐殖质的情况显然有失偏颇。因此,近年研究者常采用多次提取替代一次提取^[14, 16, 24]。通过观察上清液颜色以确定提取的次数^[14]。这一判断方法比较简便,但似乎很难让人信服。通过测定每次提取液中有机质含量来判断是否提取完毕^[24],该方法比较精确,但有机质含量的分析过程比较繁琐。因此,在具体的提取实验之前,有必要对所研究的土壤样品进行模拟,估计所需提取次数与提取液的用量^[24]。

2.3 腐殖质的纯化

按照图 1 所示流程提取的胡敏酸还存在大量的干扰物质,包括非腐殖质有机组分,如多糖、蛋白质以及无机胶体等(主要是铁铝的氧化物和氢氧化物)或离子^[3]。用乙醚和苯可以去除胡敏酸中的烷烃、脂肪酸和脂类等非腐殖质类有机质^[18]。去除胡敏酸中的无机胶体,可将其溶解于碱液中,调节溶液离子强度,压缩胶体双电层,使胶体絮凝沉淀,离心去除;无机金属阳离子可利用胡敏酸反复沉淀的方法除去,而无机阴离子(主要是 Cl^-)可利用去离子水透析去除^[3]。

富里酸的纯化一般采用疏水树脂(XAD-8)进行处理,即以适当的流速将酸化的富里酸溶液引入树脂柱,丢弃流出液;疏水有机酸吸附于树脂表面,用 NaOH 溶液反向洗涤树脂柱,接着用蒸馏水洗脱,洗脱液经 H^+ -离子交换树脂饱和、浓缩后冻干^[3, 25, 26]。该过程能够有效去除富里酸组分中杂质,但也损失了亲水富里酸^[26],有研究指出这部分物质是暗色土(Ando soil)富里酸的主要成分^[27],收集这部分物质主要用沉淀法(PPT),该方法能有效回收亲水和疏水富里酸^[28]。

在腐殖酸提取过程中,粘土矿物可能以胶体形式混入,从而增加灰分含量,为了降低灰分含量,透析之前,常用混合酸(HCl/HF)进行处理,经过两次混合酸处理后,灰分含量可达到可接受水平^[29]。混合酸会导致腐殖质分子间的聚合及有机质损失,混合酸处理过程需谨慎,应该尽量减少腐殖酸与混合酸接触的时间及处理次数^[30]。由于干扰物质的复杂性,至今还没有一个可普遍接受的分析过程来纯

化腐殖酸。

3 腐殖质分组

纯化去除了大量的杂质,但是所获得物质本身的性质差异还很大^[2]。就分子量而论,腐殖质组分本身的差异是非常巨大的,水体富里酸的平均分子量范围在 600~2000,胡敏酸分子量稍大(1500~5000)^[31],来源于土壤、沉积物的腐殖质平均分子量较大,不均匀分布在几百到几十万之间^[32~34]。据腐殖质分子量大小差异将腐殖质做进一步的划分也非常有意义,分子量大小不同,其很多性质,诸如溶解度、吸附特性及络合能力等可能也不相同。因此,为了获得比较均质的腐殖质组分,在排除无机离子与非腐殖质类有机质的干扰之外,还需要对腐殖质进行更细致的分组。

目前,腐殖质的分组分离并不意味着要得到纯粹同质的化合物,而是要获得某些物理化学属性取值比较狭窄的混合物^[3]。腐殖质进一步分组的技术有沉淀、电泳、排阻色谱和超滤。但是一个独特的、通用的分组方法仍然在探寻中^[33],下面就目前在腐殖质研究中用的比较多的排阻色谱与超滤分别进行阐述。

3.1 高效排阻色谱(High Performance Size Exclusion Chromatography)

从上世纪 60 年代开始^[35],高效排阻色谱(HPSEC)就被不断地用于土壤和水体腐殖质分子量的测定和分组分离研究^[36~38]。HPSEC 测定分子量分布是基于分离柱固定相对分子的排阻效应,比较小的分子能够深深地穿透到固定相的空隙之中,其从柱子的顶端到尾端所经过的路径较长,结果是增加保留时间,而大分子很难渗透到固定相的空隙之中,路径短而先流出色谱柱。这种分子分离是基于分子大小差异而不是分子量差异,对于规则的球形蛋白质分子,这种差别并不显著,而对于结构复杂而构象易变的腐殖质来说,这种差异不可小视,因此,利用 HPSEC 技术获得的腐殖质分子量被称为表观分子量(Apparent Molecular Masses)^[39]。理想状态下,被分离的物质在色谱柱中是惰性的,进入柱子后,只凭借排阻效应分离。在实际的操作条件下,除了排阻效应外,有的分子与流动相存在着相互作用,如络合作用,这些分子以较快的速度先于标准分子流出色谱柱,而有的分子由于固定相的吸附和静电作用而产生延迟,从而使得分子量测定发生偏移^[37, 38],在实际运用中,为了减小这种影响,需要慎重的选择流动相^[36]。要准确测定腐殖质的表观分子量,最好使用已知分子量且分子量分布范围窄的

腐殖质替代球形蛋白质和多糖作为分离柱的校准物质^[32]。通常实验室色谱柱分离效率非常高,并在线完成分离物质分子量的测定,是比较好的大分子分子量测定的技术,但实验室色谱柱柱子容量较小,难于担当制备分离的重任,所以,在实验室的小型研究中,腐殖质的制备分离目前比较好的方法是超滤。

3.2 超滤(Ultrafiltration)

超滤技术(UF)是饮用水处理过程中用来去除致病微生物与部分溶解有机质的关键技术之一,同时在生物科技和奶制品工业中也有得到广泛的运用^[40]。近些年,很多研究采用该技术分离不同分子量大小的腐殖质,并在此基础之上探讨不同组分之间性质的差异与联系^[41~43]。超滤作为一种有机质分组方法具有通用、简便、无需化学试剂以及对所分离物质无破坏性等优点^[44]。目前常用的超滤膜有YM(再生纤维素膜,带负电)和PB(聚酰胺膜,带负电)系列,由于所用材料不同,各种膜具有不同膜孔性能,分子截留量也就不同(MWCO)^[40]。MWCO是表征膜的分离属性的一个参数,表示在超滤过程中,溶液中分子量大于该值的分子至少有90%不能通过该膜而被截留在溶液体系中。

普通超滤系统流程如图2^[34]。在一定的压力(55psi)或重力的驱动下,过滤池中小于膜孔的分子以平流扩散的方式随溶剂一起通过膜孔,大分子被截留于超滤池中,超滤池中安装的搅拌器用于减少膜表面的物质积累从而消除浓度积化效应。超滤开始之前,先测定样品中有机物的浓度(C_T),超滤过程中定时收集渗透液,测定其有机物的浓度(C_p),然后根据关系式(1)作图,计算样品中小于膜截留量的分子浓度 C_{r0} ,最后根据关系式(2)得到大于膜分子截留量的分子浓度(C)。

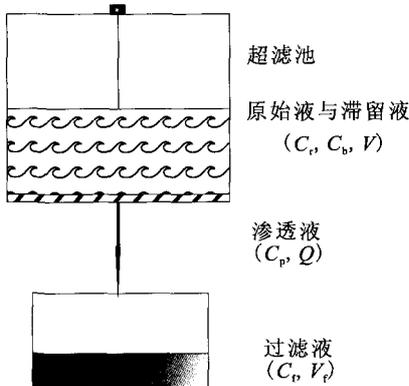


图2 平流超滤流程及相关术语(引自文献[34])
Fig.2 Schematic of ultrafiltration cell with associated nomenclature (cited from ref. [34])

$$\ln C_p = \ln(PC_{r0}) + (p-1)\ln F \quad (1)$$

$$C_T = C_{r0} + C \quad (2)$$

式中, $F = 1 - (V_f/V_0)$,表示在取样时刻初始液体体积的减小比率,即浓缩因子; V_f 为取样时刻已经过膜的液体总体积; p 为常数,即分子渗透系数。依次采用不同分子截留量的膜进行过滤,从而得到初始液有机质的分子量分布^[34]。

为减小膜表面的分子积累,在腐殖质分离过程中用得更多的是切向流超滤系统(TFUF)^[43, 45~46]。见图3。TFUF有两种不同的超作模式,即渗析模式和浓缩模式^[44],都由一个储液池、蠕动泵、螺旋膜具及附属管道组成。分离时,储液池中的液体被蠕动泵提升进入螺旋膜具内,液体流过超滤膜表面,部分小于膜孔的分子和缓冲液通过膜孔,转向通过收集管道流入收集器,被截留的液体循环回储液池。所不同的是,渗析模式需要不断地向储液池内补充缓冲液以保持液体体积恒定,能够更有效避免浓度极化现象的出现,但其需要添加大量的缓冲溶液,大大的增加了后续浓缩的工作量。在浓缩模式条件下,其所得有机物分子量分布仍然可根据关系式(1)和(2)得出,而渗析模式有机物分子量分布则要根据关系式(2)和(3)计算得出^[44]。

$$\ln(C_p/C_{r0}) = \ln P - P(V_f/V_0) \quad (3)$$

式中, C_p, C_{r0}, V_0, V_f, P 与关系式(1)中意义相同。

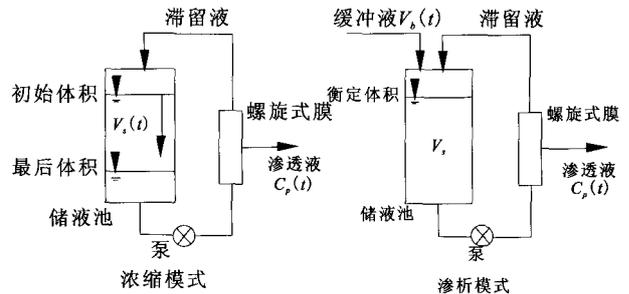


图3 切向超滤系统的不同超作模式及流程(引自文献[44])
Fig.3 Two different operation modes of the Tangential ultrafiltration systems (after ref. [44])

在实际的分离测定过程中,TFUF往往会遇到很多难题。首先,并不是所有分子量大于截留量的分子都被截留;其次,膜自身对有机质的吸附,造成溶解有机质的损失;溶解有机质,特别是腐殖质,其分子构象易变。因此,实际的操作条件对有机质分子量分布测定有很大的影响^[46]。采用超滤获得的分子量分组相对粗糙,况且其分子量分布的计算过程非常繁琐,目前还缺少合理而简洁的测定方法。与渗透压测定、场流分组和超速离心比较,HPSEC是测定腐殖质分子量分布的一种合理方法,目前被

很多学者采用^[41-43, 46]。

4 问题与展望

两百多年来,经过研究者的不懈努力,对腐殖质有一定的了解,由于其本身的复杂性,研究仍然存在有很多问题:①腐殖质是高分子混合物还是超分子体系,研究者至今还没有统一的看法;②腐殖质的分子结构,尽管研究者提出各种各样的理论模型,但如今仍然是一个谜;③腐殖质的提取方法难以统一,不同提取方法所获得的物质或多或少存在差异,使得研究数据可比性较低,据此得出的结论争议性较大。

要充分揭示腐殖质的分子结构和化学属性,关键在于如何对不同来源的腐殖质进行有效提取、纯化与分组,使得研究对象尽量简单而均一。现有的土壤腐殖质分离提纯方法,基于腐殖质溶解特性的不同,只能将腐殖质分为胡敏酸、富里酸及胡敏素三类。然而,这三类物质本身并不是均质的高分子化合物,而是成分复杂的有机混合物。尽管这一分类方法简化了腐殖质的研究,但研究结果仍然是一个非常概括性的描述。要获取更加精确的信息,需对三类物质进行再分组,特别是按照分子量对 HA、FA 进行再分组,获得分子量分布范围比较狭窄的亚组。目前,排阻色谱和超滤技术作为腐殖质化学与物理分离的两种代表性新技术,色谱分离测定精度高,而超滤具有操作简便、分离量大和对分离物质无破坏等优点,在腐殖质研究中,两者的结合将有助于深化理解土壤腐殖质的化学性质和分子结构,即利用超滤对腐殖质进行初步分子量分组,接着用排阻色谱对各组分分子量进行准确测定。随着膜技术的不断发展,可将分子进一步的分离,最终将会获得成分均一的腐殖质。

参考文献 (References):

[1] Hayes M H B, Maccarthy P, Malcolm R L, Swift R S. Humic substances II: In search of structure [M]. New York: John Wiley & Sons, 1989.

[2] Wood S A. The role of humic substances in the transport and fixation of metals of economic interest (Au, Pt, Pd, U, V) [J]. Ore Geology Reviews, 1996, 11(1-3): 1-31.

[3] Swift R S. Organic matter characterization[A]. Spark D L, Page A L, Helmke P A, Sumner. Methods of soil analysis. Part 3. Chemical Methods[M]. Madison, WI: Soil Sci. Soc. Am 1996, 1018-1020.

[4] Woodwell G M, Whittaker R H, Reiners W A, Likens G E, Delwiche C C, Botkin D B. Biota and world carbon budget[J]. Science, 1978, 199(4325): 141-146.

[5] 李学垣. 土壤化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001, 26.

Li Xueyuan. Soil chemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 2001, 26. (in Chinese)

[6] Lundstrom U S, Breemen N V, Bain D. The podzolization process: A review[J]. Geoderma, 2000, 94(2-4): 91-107.

[7] De Jong R, Campbell C A, Nicholaichuk W. Water retention equations and their relationship to soil organic matter and their particle size distributions for disturbed samples[J]. Can. J. Soil Sci., 1983, 63: 291-302.

[8] Vaughan D, Malcolm R E. Influence of humic substances on growth and physiological processes[A]. Vaughan D, Malcolm R E. Soil organic matter and biological activity[M]. Boston: Martinus-Nijhoff Publ., 1985, 37-75.

[9] 牛育华, 李仲谨, 郝明德, 余丽丽, 朱雷. 腐殖酸的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(11): 4638-4639, 4651. Niu Yuhua, Li Zhongjin, Hao Mingde, Yu Lili, Zhu Lei. Research development of humic acids [J]. Journal of Anhui Agriculture Science, 2008, 36(11): 4638-4639, 4651. (in Chinese with English abstract)

[10] Kordel W, Dassenakis M, Lintelmann J, Padberg S. The importance of natural organic material for environmental processes in waters and soils[J]. Pure and Applied Chemistry, 1997, 69(7): 1571-1600.

[11] Rutherford D W, Chiou C T, Kile D E. Influence of soil organic-matter composition on the partition of organic-compounds[J]. Environ. Sci. Tech., 1992, 26(2): 336-340.

[12] Post W M, Peng T H, Emanuel W R, King A W, Dale V H, Deangelis D L. The global carbon-cycle[J]. American Scientist, 1990, 78(4): 310-326.

[13] Aiken G, Mcknight D, Wershaw R, Maccarthy P. An introduction to humic substances in soil, sediment, and water [A]. Humic substances in soil, sediment, and water: Geochemistry, isolation, and characterization[M]. New York: John Wiley & Sons, 1985, 1-9.

[14] Li L, Huang W L, Peng P, Sheng G Y, Fu J M. Chemical and molecular heterogeneity of humic acids repetitively extracted from a peat[J]. Soil Science Society of America Journal, 2003, 67(3): 740-746.

[15] Rosa A H, De Oliveira L C, Bellin I C, Rocha J C, Romao L P C, Dias N L. Influence of alkaline extraction on the characteristics of humic substances in Brazilian soils[J]. Thermo-chimica Acta, 2005, 433(1-2): 77-82.

[16] 李丽, 冉勇, 盛国英, 傅家谟. 泥炭土连续碱抽提腐殖酸的分子结构特征[J]. 分析化学, 2002, 30(11): 1303-1307. Li Li, Ran Yong, Sheng Guoying, Fu Jiamo. Molecular structure characterization of Humic acids progressively extracted from a peat soil[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2002, 30(11): 1303-1307. (in Chinese with English abstract)

[17] Hayes M H B, Swift R S, Wardle R E, Brown J K. Humic materials from an organic soil-comparison of extractants and of properties of extracts[J]. Geoderma, 1975, 13(3): 231-245.

- [18] Schnitzer M, Shahamat U K. Soil organic matter[M]. Amsterdam; Elsevier Scientific Pub. Co., 1978, 1-58.
- [19] Eloff J N, Pauli F W. Extraction and electrophoretic fractionation of soil humic substances[J]. *Plant and Soil*, 1975, 42(2): 413-422.
- [20] Piccolo A, Mirabella A. Molecular-weight distribution of peat humic substances extracted with different inorganic and organic solutions[J]. *Science of the Total Environment*, 1987, 62: 39-46.
- [21] Rosa A H, Rocha J C, Furlan M. Humic substances of peat: Study of the parameters that influence on the process of alkaline extraction[J]. *Quimica Nova*, 2000, 23(4): 472-476.
- [22] Bremner J M. Some observations on the oxidation of soil organic matter in the presence of alkali[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 1950, 1: 198-204.
- [23] Swift R S, Posner A M. Autoxidation of humic acid under alkaline conditions[J]. *J. Soil Sci.*, 1972, 23(4): 381-393.
- [24] 张晋京, 宋祥云, 窦森. 连续提取对土壤腐殖质组分数量与特征的影响[J]. *土壤通报*, 2007, 38(3): 452-456.
Zhang Jinjing, Song Xiangyun, Dou Sen. Effect of continuous NaOH/NaOH + Na₄P₂O₇ extraction on the content and characteristic of soil humus fractions[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2007, 38(3): 452-456. (in Chinese with English abstract)
- [25] Thurman E M, Malcolm R L. Preparative isolation of aquatic humic substances[J]. *Environ. Sci. Tech.*, 1981, 15(4): 463-466.
- [26] Hiradate S, Yonezawa T, Takesako H. Fine fractionation and purification of the fulvic acid fraction using adsorption and precipitation procedures[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2007, 53(4): 413-419.
- [27] Kuwatsuka S, Watanabe A, Itoh K, Arai S. Comparison of two methods of preparation of humic and fulvic-acids, IHSS method and NAGOYA method[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 1992, 38(1): 23-30.
- [28] Hiradate S, Yonezawa T, Takesako H. Isolation and purification of hydrophilic fulvic acids by precipitation[J]. *Geoderma*, 2006, 132(1-2): 196-205.
- [29] Velthorst E, Nakken-Brameijer N, Mulder J. Fractionation of soil organic matter[J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1999, 73(3): 237-251.
- [30] Goh K M, Reid M R. Molecular-weight distribution of soil organic-matter as affected by acid pretreatment and fractionation into humic and fulvic acids [J]. *Journal of Soil Science*, 1975, 26(3): 207-222.
- [31] Chin Y P, Aiken G, Oloughlin E. Molecular-weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances[J]. *Environ. Sci. Tech.*, 1994, 28(11): 1853-1858.
- [32] Cameron R S, Thornton B K, Swift R S, Posner A M. Calibration of gel permeation chromatography materials for use with humic acid[J]. *European Journal of Soil Science*, 1972, 23(3): 342-349.
- [33] Senesi N, Sipes S. Molecular-weight distribution, analytical and spectroscopic characterization of humic fractions sequentially isolated by organic-solvents from a brown coal humic acid[J]. *Organic Geochemistry*, 1985, 8(2): 157-162.
- [34] Logan B E, Qing J. Molecular-size distributions of dissolved organic-matter[J]. *Journal of Environmental Engineering-Asce*, 1990, 116(6): 1046-1062
- [35] Posner A M. Importance of electrolyte in the determination of molecular weights by 'sephadex' gel filtration, with especial reference to humic acid[J]. *Nature*, 1963, 198: 1161-1163.
- [36] Swift R S, Posner A M. Gel chromatography of humic acid[J]. *European Journal of Soil Science*, 1971, 22(2): 237-249.
- [37] Miles C J, Brezonik P L. High-performance size exclusion chromatography of aquatic humic substances[J]. *Journal of Chromatography*, 1983, 259(3): 499-503.
- [38] Knuutinen J, Virkki L, Mannila P, Mikkelsen P, Herve S. High-performance liquid chromatographic study of dissolved organic-matter in natural-waters[J]. *Water Research*, 1988, 22(8): 985-990.
- [39] Janos P. Separation methods in the chemistry of humic substances [J]. *J. Chromatography A*, 2003, 983(1-2): 1-18.
- [40] Revchuk A D, Suffet I H. Ultrafiltration separation of aquatic natural organic matter; Chemical probes for quality assurance[J]. *Water Research*, 2009, 43(15): 3685-3692.
- [41] Tonelli D, Seeber R, Ciavatta C, Gessa C. Extraction of humic acids from a natural matrix by alkaline pyrophosphate. Evaluation of the molecular weight of fractions obtained by ultrafiltration[J]. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 1997, 359(7-8): 555-560.
- [42] Francioso O, Sanchez-Cortes S, Casarini D, Garcia-Ramos J V, Ciavatta C, Gessa C. Spectroscopic study of humic acids fractionated by means of tangential ultrafiltration[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2002, 609(1-3): 137-147.
- [43] Li L, Zhao Z Y, Huang W L, Peng P, Sheng G Y, Fu J M. Characterization of humic acids fractionated by ultrafiltration[J]. *Organic Geochemistry*, 2004, 35(9): 1025-1037.
- [44] Kilduff J, Weber W J. Transport and separation of organic macromolecules in ultrafiltration processes[J]. *Environ. Sci. Tech.*, 1992, 26(3): 569-577.
- [45] Benner R, Biddanda B, Black B, McCarthy M. Abundance, size distribution, and stable carbon and nitrogen isotopic compositions of marine organic matter isolated by tangential-flow ultrafiltration [J]. *Mar. Chem.*, 1997, 57(3-4): 243-263.
- [46] Everett C R, Chin Y P, Aiken G R. High-pressure size exclusion chromatography analysis of dissolved organic matter isolated by tangential-flow ultrafiltration[J]. *Limnology and Oceanography*, 1999, 44(5): 1316-1322.