

海洋腐植质的研究

II. 海洋沉积物中腐植质的分离及其物理和化学性质*

曹文达 裘香荃 韩丽君 纪明侯

(中国科学院海洋研究所, 青岛)

提要 用 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 和 NaOH 混合液对青岛胶州湾海底沉积物中的腐植质进行了萃取和分级。对分离出的腐植质中各级分, 腐植酸 (HA)、富里酸 (FA) 和乙醇可溶物 (ES), 测定了元素含量、酸性官能团含量、氨基酸含量、分子量范围、可见光吸收、紫外吸收、红外吸收、 $^1\text{H-NMR}$ 光谱等物理和化学性质。

海底沉积物由有机和无机颗粒物组成。沉积物中的有机物主要是海洋中的颗粒有机物 (POM), 或者溶解有机物 (DOM) 吸附到 POM (包括生物排泄物和碎屑) 和粘土悬浮物上, 它们最终沉到海底, 疏松地聚积而逐渐形成的。腐植质是表层沉积物中的主要有机物, 约占总有机物 30—60%^[4], 它含有较多活性官能团。无机阳离子, 如重金属, 能与这些活性基团形成稳定的配价键, 对沉积物中各种金属离子的迁移、再分布和富集等地球化学过程起着极为重要的作用。这些沉积物中的腐植质也影响一系列的成岩过程, 它们本身经历结构的变化而转化成类似于在沉积岩内的石油沥青或油田岩的物质, 然后生成具有经济价值的烃类产品。因此, 随着人们对海洋腐植质认识的逐渐加深, 对它的研究也越来越引起重视, 已成为海洋有机化学工作者的重要研究课题。

本文研究了从海洋沉积物中萃取和分离腐植质的方法, 并对各分级产物进行了物理和化学性质的研究。

一、海洋沉积物中腐植质的萃取和分离

海洋沉积物中含有大量钙、铁和铝等, 采用经典的 0.5mol/L NaOH 溶液萃取腐植质的方法, 收率很低。若在萃取前先用稀无机酸预处理, 可以提高腐植质的收率, 但会造成大量小分子腐植质的溶失。我们采用 $0.1\text{mol/L Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ^[5] 和 0.1mol/L NaOH 混合液作萃取剂, 效果较好。

1. 海洋沉积物中腐植质的萃取和分离方法

将 200g 烘干磨细的沉积物样品置于 2L 锥形瓶中, 加入 $1\text{L } 0.1\text{mol/L Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 和 0.1mol/L NaOH 混合液, 通入氮气驱氧, 容器充满氮气并保持气密。每隔 15 分钟振荡一

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 1277 号。

收稿日期: 1985 年 11 月 20 日。

分钟,在室温萃取 24 小时,用离心法将萃取液分离。沉淀部分再加 1L 混合液重复萃取一次。将二次萃取液合并,加 6mol/L HCl 调节溶液至 pH1,离心分离。沉淀部分为粗腐植酸(HA),将粗 HA 溶于少量 1mol/L NH_4OH 溶液中,再加 6mol/L HCl 调节溶液至 pH1 使 HA 沉淀,离心分离。将 HA 分散于 0.1mol/L HCl 中,转移至透析袋内,用蒸馏水透析至无 Cl^- ,将透析后的 HA 减压浓缩并冻干,则为纯 HA。可溶物溶液通过 GDX-102 树脂,用蒸馏水淋洗至流出液无 Cl^- ,被树脂吸附的富里酸(FA)和疏水性较强有机物——乙醇可溶有机物(ES)分别用 1mol/L NH_4OH 和 95%乙醇进行洗脱,洗脱液在 $< 45^\circ\text{C}$ 减压浓缩至无氨味,分别通过 732 阳离子树脂,流出液再减压浓缩至小体积,冻干,得纯 FA 和 ES(见图 1)。

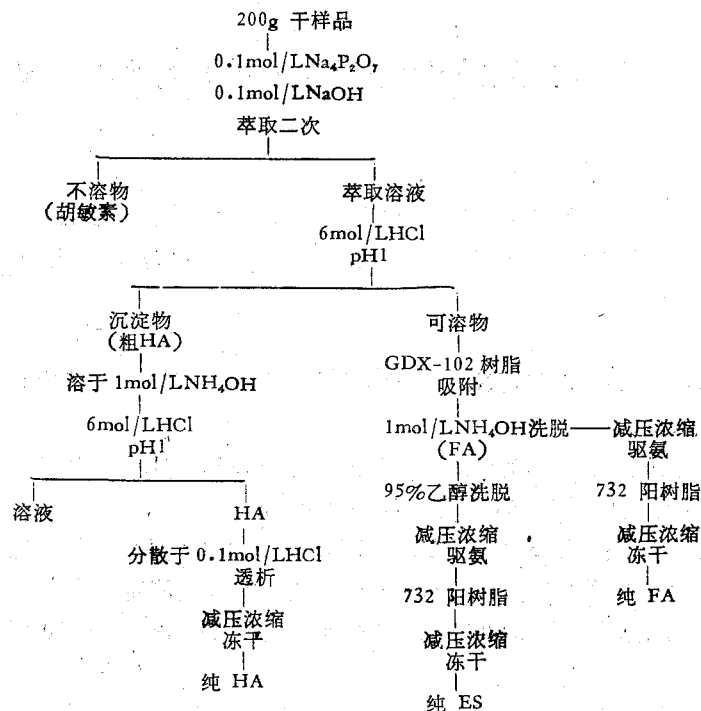


图 1 海洋沉积腐植质的萃取和分级

2. 几种不同萃取剂的比较

按上述的萃取和分离沉积物中腐植质的方法,对四种不同萃取剂的提取量进行了比较,结果见表 1。由表 1 可见,用 0.5mol/L NaOH 作萃取剂,对 HA 和 FA 的提取量都很低,分别为 0.05mg/g 和 0.31mg/g。采用 0.1mol/L $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 和 0.1mol/L NaOH 混合液作萃取剂,显著地提高了 HA 的收率,由 0.05mg/g 提高到 0.725mg/g,相差 14.5 倍;FA 的收率也由 0.31mg/g 提高到 0.65mg/g,增加 2.1 倍。混合萃取液对 ES 提取量只增加 1.6 倍,这主要与 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 本身对 ES 的提取效果较差有关。从萃取物总量来看,混合萃取剂较其它萃取剂的提取量高,达 1.715mg/g,比 0.5mol/L NaOH 的提取量 0.57mg/g 高 3 倍,提取量的增加主要是萃取物中 HA 和 FA 的比例增加。由 HA + FA/ES 比值表明,混合萃取剂为 4.04,而 0.5mol/L NaOH 仅为 1.71。

表 1 不同萃取剂提取量的比较

| 样品来源 | 萃取剂种类 | HA (mg/g) | FA (mg/g) | ES (mg/g) | 萃取物总量 (mg/g) | HA + FA (mg/g) | HA+FA ES |
|-----------------------|---|--------------|--------------|--------------|-----------------|-------------------|-------------|
| 胶州湾中心站 位的表面沉积 物 | 0.1mol/L $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 0.1mol/L NaOH | 0.725 | 0.650 | 0.340 | 1.715 | 1.375 | 4.04 |
| | 0.1mol/L $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ | 0.650 | 0.415 | 0.140 | 1.205 | 1.065 | 7.60 |
| | 0.5mol/L NaOH | 0.050 | 0.310 | 0.210 | 0.570 | 0.360 | 1.71 |
| | 0.1mol/L NaOH | 0.135 | 0.325 | 0.220 | 0.680 | 0.460 | 2.09 |

二、海洋沉积物中腐植质的物理和化学性质

1. 样品

将胶州湾中心站位的表层沉积物,在 105℃ 烘箱内烘干,然后用研钵将样品磨细,全部通过孔径 80 目的分样筛。按本文前述方法萃取腐植质,并分级为 HA, FA 和 ES 三部分。

2. 实验方法

(1) 元素分析: C, H, N 用 Carlo Erba 自动元素分析仪测定; S 用硫酸钡法测定; O 用差减法求得。

(2) 紫外光和可见光吸收光谱: 试样溶于 0.05mol/L NaHCO_3 溶液中,用 Specord UV Vis 分光光度计测定,测量范围 200—800nm。

(3) 红外光谱: 用 KBr 压片,在 Unicam SP1100 型红外分光光度计上测定。

(4) 酸性官能团含量: 用 Borggaard^[3] 提出的电位滴定法测定。

(5) 分子量范围: 用 A806 凝胶渗透色谱柱在 Hitachi 638-50 型液相色谱仪上测定。

(6) 氨基酸分析: 试样用 6mol/L 盐酸 105℃ 密闭水解 48 小时,用 Hitachi 835-30 型氨基酸分析仪测定。

(7) $^1\text{H-NMR}$: 样品溶解在 DMSO-d_6 中,用 5mm 样品管,在美国 Varian 公司的 FT-80A 核磁共振仪上记录其 $^1\text{H-NMR}$ 谱图。

3. 结果与讨论

(1) 元素组成: 表 2 表明,两种不同萃取剂提取的腐植质的元素组成基本相似,它们的 C 含量都是 HA 高于 FA,而 O 含量则反之; ES 的 C, H 含量则都高于 FA 的。所不同的是用 0.5mol/L NaOH 提取的腐植质含 N 量较高,含 S 量极低(未测出)。这说明 NaOH 萃取液对含 N 腐植质的萃取效果较高,对含 S 者则很差。

(2) 紫外光和可见光吸收光谱: 海洋沉积物中腐植质的紫外和可见光谱无明显特征,与大多数的陆地和海水腐植质一样,在短波处光密度较高,随着波长增加,光密度逐渐降低(见图 2)。

表 2 海洋沉积物中腐植质的元素组成

| 元素种类 | | C(%) | H(%) | N(%) | S(%) | O(%) |
|--|----|-------|------|------|------|-------|
| 萃取剂种类 | 级分 | | | | | |
| 0.1mol/L Na ₄ P ₂ O ₇ | FA | 42.20 | 5.07 | 5.11 | 2.27 | 45.35 |
| | HA | 53.79 | 4.85 | 4.94 | 1.63 | 34.79 |
| 0.1mol/L NaOH | ES | 46.69 | 6.28 | 5.29 | 2.39 | 39.35 |
| 0.5mol/L NaOH | FA | 44.13 | 5.44 | 6.23 | 0 | 44.20 |
| | HA | 54.04 | 6.27 | 7.31 | — | 32.38 |
| | ES | 50.37 | 6.50 | 7.20 | 0 | 35.93 |

(3) 红外吸收光谱: 图 3 表明, 0.1 mol/L Na₄P₂O₇ 和 0.1 mol/L NaOH 混合液萃取的腐植质与用 0.5 mol/L NaOH 萃取的腐植质相比较, 它们的红外光谱图很相似, 说明混合液萃取率增高部分的化学结构无明显差异, 所不同的是后者含有较多的蛋白质肽键(1520cm⁻¹), 与元素分析含 N 量较高的结果相吻合。海洋沉积物中腐植质各分级产物的红外光谱特征与土壤、海水腐植质的基本一致^[1]。

HA 与 FA 的两个光谱的最明显差别是在 2900—2800cm⁻¹ 区域和 1720cm⁻¹ 处吸收带的强度, HA 比 FA 含有较多的脂肪族 C—H 基(2900—2800cm⁻¹), 而 FA 的光谱中 1720cm⁻¹ 处吸收带较强, 高于紧靠的 1630cm⁻¹ 处(芳烃 C=C)的吸收峰, 表明了 FA 中含有较多的 COOH(其中的 C=O), 与元素分析结果 (HA 含有较多 C, H; FA 含有较多 O)一致。ES 的光谱图显示了在 2900cm⁻¹ (脂肪酸 C—H 基) 和 1630 cm⁻¹ (芳烃 C=C) 处有很强的吸收峰, 所以疏水性较强。

(4) 酸性官能团的含量: 表 3 中 [COOH]^I 表示第一类羧基即强羧基, pK 值 < 4; [COOH]^{II} 表示第二类羧基即较弱羧基, pK 值在 4—9 之间。海洋沉积物中 FA 的强羧基较多, 含量为 1.49meq/g, 而 HA 和 ES 则含较多的 Phe—OH, 含

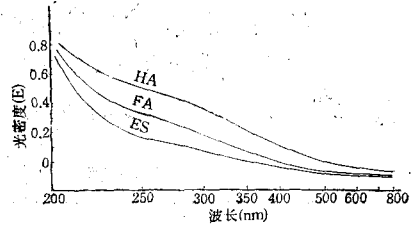


图 2 海洋沉积物中腐植质的紫外和可见光吸收光谱图

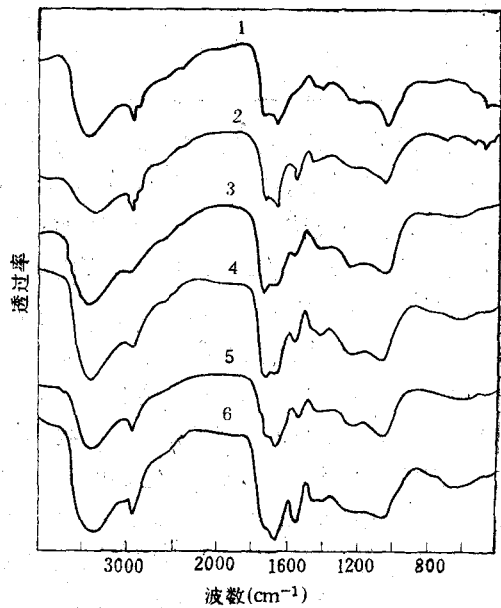


图 3 海洋沉积物中腐植质的红外光谱图
1. 0.1mol/LNa₄P₂O₇ + 0.1mol/LNaOH 混合液提取的 HA; 2. 0.5mol/LNaOH 溶液提取的 HA; 3. 0.1mol/LNa₄P₂O₇ + 0.1mol/LNaOH 混合液提取的 FA; 4. 0.5mol/LNaOH 溶液提取的 FA; 5. 0.1mol/LNa₄P₂O₇ + 0.1mol/LNaOH 混合液提取的 ES; 6. 0.5mol/LNaOH 溶液提取的 ES。

量分别为 1.98meq/g 和 2.38meq/g。这些测定结果与 Rashid^[7] 多次测定的沉积物中腐植质官能团数据相比较,都在其范围之内(见表 3)。

表 3 沉积物中腐植质酸性官能团的含量 (meq/g)

| 样品名称 | | [COOH] ^I | [COOH] ^{II} | 总 [COOH] | Phe—OH | 总酸度 |
|---------------------------------|----|---------------------|----------------------|-------------|---------|---------|
| 胶州湾海洋沉积腐植质 | HA | 0.198 | 3.27 | 3.47 | 1.98 | 5.45 |
| | FA | 1.49 | 1.58 | 3.07 | 0.99 | 4.06 |
| | ES | 0.69 | 1.68 | 2.37 | 2.38 | 4.75 |
| Rashid ^[7] 的沉积腐植质测定值 | HA | | | 2.0—5.0 | 0.0—2.5 | 2.0—7.0 |
| | FA | | | 1.0—4.0 | 0.0—1.0 | 2.0—5.5 |

(5) 分子量范围: 用凝胶渗透色谱法测得海洋沉积物中 HA 的分子量主要分布于 1000 左右, 沉积物中 FA 的分子量, 其中 72% 为 1000, 28% 为 533。与海水腐植质相比, 沉积物中腐植质的分子量较大(见表 4)。

表 4 腐植质分级产物的分子量分布

| 样 别 | 沉积物中 HA | 沉积物中 FA | 海 水 HA | 海 水 FA |
|-------|------------|-----------------------|-----------|-----------|
| 分子量范围 | 1000 | 1000(72%) 533(28%) | 756 | 705 |

(6) 氨基酸组成: 在海洋沉积物的腐植质酸水解物中用氨基酸自动分析仪鉴别出 18 种不同的氨基酸, 总量为每克腐植质含 53.4—70.0mg 氨基酸, 按重量计算约占腐植质的 5.3—7.0%。腐植质中存在这样大量的氨基酸, 表明氨基酸是其主要的表面结构单元。用混合液和用 0.1mol/L NaOH 萃取的腐植质, 它们的氨基酸组成的种类和比例基本一致, 其 FA 的酸性氨基酸比例大于 HA, 而中性和碱性氨基酸的比例都小于 HA。本文测定结果与 Rashid^[6] 测定的沉积物中腐植质的资料相比较, 氨基酸的种类和比例也很相似(见表 5)。两者测得的中性氨基酸比例都在 59.1—63.9% 之间, 酸性氨基酸和碱性氨基酸分别占 22.8—32.3% 和 8.0—15.5%。沉积物腐植质的氨基酸组成与海水腐植质的相比, 虽然鉴别出的氨基酸种类相同, 但它们的分布比例差异较大。海水 FA 中的酸性氨基酸比例小于 HA, 而中性氨基酸比例则大于 HA, 与沉积腐植质的正好相反, 而且海水腐植质的碱性氨基酸占的比例较小。这些结果说明表层的海水腐植质在向海底沉降过程中或者沉到海底后, 继续进行复杂的生物化学氧化、还原过程, 其中氨基酸继续进行分解和转化, 改变了原来海水腐植质的氨基酸组成。

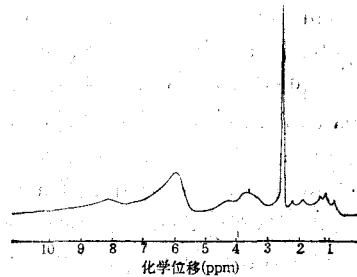
(7) ¹H-NMR 谱: 由于腐植酸结构复杂又是多相分布, 因而得到的谱图并不那么清晰(图 4)。海洋沉积 FA 在 0.85ppm 和 1.2ppm 处的两个吸收信号是—CH₃ 和—CH₂ 上的两种质子, 属于很少分支的脂肪链; 1.85ppm 处的信号属于带双键的脂肪链; 2.2ppm 处有一个较小的信号应属 (CH₃CO)₂O 或芳香侧链上的 α—CH₃ 和 α—CH₂; 3.3—3.9ppm

处的信号较大,是醇、酚和羧基中的—OH; 5.5—6.7ppm 处的较大吸收信号是溶剂中的水(因样品溶于 DMSO- d_6 中后,加入 D_2O 以交换排除残余的水,此信号即消失)。在 7.8—8.8ppm 处有一宽而小的吸收信号属于芳香环质子。

表 5 海洋沉积腐植质中氨基酸组成(相对克分子%)

| 氨基酸名称 | 0.1mol/L NaOH 萃取 | | 0.1mol/L $Na_4P_2O_7$ 萃取 0.1mol/L NaOH | | 海洋沉积物 ¹⁾ | | 海水 ²⁾ | |
|---------|------------------|-------|---|-------|---------------------|-------|------------------|-------|
| | FA | HA | FA | HA | FA | HA | FA | HA |
| Asp | 16.97 | 12.80 | 21.87 | 13.54 | 20.77 | 13.80 | 13.43 | 14.78 |
| Glu | 12.11 | 10.44 | 10.44 | 9.27 | 9.79 | 9.30 | 8.47 | 12.50 |
| 总的酸性氨基酸 | 29.08 | 23.24 | 32.31 | 22.81 | 30.56 | 23.10 | 21.90 | 27.28 |
| Gly | 15.36 | 14.83 | 18.07 | 17.43 | 15.38 | 15.35 | 16.70 | 15.57 |
| Ala | 9.82 | 9.68 | 8.77 | 10.20 | 9.79 | 8.73 | 11.62 | 10.00 |
| Thr | 4.74 | 5.05 | 5.96 | 6.44 | 5.39 | 3.95 | 7.78 | 6.55 |
| Pro | 5.60 | 8.47 | 4.01 | 6.28 | 4.19 | 5.92 | 4.85 | 6.31 |
| Val | 5.67 | 6.78 | 4.26 | 5.95 | 5.19 | 5.21 | 4.72 | 5.90 |
| Ser | 3.51 | 4.19 | 4.96 | 5.52 | 4.19 | 4.22 | 6.74 | 6.11 |
| Leu | 4.75 | 7.14 | 4.17 | 6.24 | 2.40 | 5.07 | 4.03 | 4.68 |
| Ile | 3.98 | 4.98 | 3.11 | 4.40 | 2.00 | 3.24 | 3.99 | 3.61 |
| Phe | 1.83 | 0.93 | 1.68 | 0.99 | 8.99 | 6.20 | 3.68 | 1.66 |
| Tyr | 1.92 | 0.20 | 1.50 | 0.42 | 0.40 | 1.13 | 3.12 | 1.26 |
| Met | 1.63 | 1.35 | — | — | 1.00 | 0.99 | 2.80 | 1.32 |
| Cys | 0.33 | 0.27 | 0.41 | 0.22 | 2.53 | 1.39 | 0.48 | 0.80 |
| 总的中性氨基酸 | 59.14 | 63.87 | 56.90 | 64.09 | 61.45 | 61.40 | 70.51 | 63.77 |
| Lys | 3.35 | 4.46 | 3.04 | 4.49 | 5.19 | 9.02 | 3.01 | 4.43 |
| Arg | 4.41 | 3.06 | 3.61 | 4.32 | 2.00 | 5.07 | 1.58 | 1.87 |
| His | 0.90 | 1.33 | 1.14 | 1.44 | 0.80 | 1.41 | 1.23 | 1.53 |
| Orn | 3.11 | 4.04 | 3.00 | 2.83 | — | — | 1.77 | 1.14 |
| 总的碱性氨基酸 | 11.77 | 12.89 | 10.79 | 13.08 | 7.99 | 15.50 | 7.59 | 8.97 |

1) 根据 Rashid^[6] 资料,1972; 2) 根据曹文达等^[2]资料换算,1981。

图4 海洋沉积物中 FA 的 1H -NMR 谱图

从以上 1H -NMR 的谱图分析来看,很明显,海洋沉积物中的 FA 具有高脂肪和低芳香特性。海洋沉积物的 HA 因不溶于 DMSO- d_6 中,未进行 1H -NMR 谱的测定。

参 考 文 献

- [1] 纪明侯、曹文达、韩丽君, 1982. 海洋腐植质的研究 I. 用GDX-102. 吸附树脂分离海水腐植质. 海洋与湖沼 13(4): 370—379.
- [2] 曹文达、纪明侯、韩丽君, 1981. 海水腐植质的氨基酸组成. 全国第二次腐植酸化学学术讨论会论文集, 中国化学会, 太原, 169—170 页.
- [3] Borggaard, Ole K., 1974. Titrimetric determination of acidity and pK values of humic acid. *Acta Chem. Scand. A* 28(1): 121—122.
- [4] Degens, E. T., J. H. Reuter and K. N. F. Shaw, 1964. Biochemical compounds in offshore California sediments and sea waters. *Geochim. Cosmochim. Acta* 28: 45—66.
- [5] Pierce Jr, R. H. and G. T. Felbeck Jr, 1972. A comparison of three methods of extracting organic matter from soils and marine sediments. Proc. Int. Meet. Humic Substances, Nieuwersluis, 1972. Pudoc. Wageningen.
- [6] Rashid, M. A., 1972. Amino acid associated with marine sediments and humic compounds and their role in solubility and complexing of metals. 24th IGC, Section 10, 346—353.
- [7] Rashid, M. A., 1974. Humic compounds of the sedimentary environment: their chemical nature and geochemical significance, *Geol. Surv. Can., Paper 1*: 123—132.

STUDIES ON MARINE HUMIC SUBSTANCES

II. ISOLATION OF HUMIC SUBSTANCES FROM MARINE SEDIMENTS
AND THEIR PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES*

Cao Wenda, Qiu Xiangquan, Han Lijun and Ji Minghou

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao)

ABSTRACT

A method for extraction and isolation of humic substances (HS) from marine sediments is described, and the physical and chemical properties of each humic fraction isolated are also summarized.

1. The yield of humic substances from sediments using 0.5 mol/L NaOH solution was rather low, because there were a large quantities of calcium, magnesium, iron, aluminium etc in them. When the 0.5 mol/L NaOH solution was substituted by 0.1 mol/L $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ and 0.1 mol/L NaOH mixed solution, the extraction yield of fulvic acid (FA) increased more than two times and humic acid (HA) more than ten times.

2. The HA, FA and ethanol-soluble matter of marine sediments fractionated by the methods mentioned in this paper were physically characterized by IR-absorption spectra, UV-absorption spectra and ^1H -NMR spectra and chemically by elementary analysis, amino acid analysis, gel permeation chromatography and the analysis of oxygen-containing functional groups. The results indicated that notwithstanding the origins of humic substances in marine sediments were different from those in soil and seawater, their chemical composition and some properties were similar, only their contents of oxygen-containing functional groups and distributions of molecular weight show some obvious difference.

* Contribution No. 1277 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.