

黄腐酸提取、分析、分级以及存在问题简述

赵建亮 刘 闫 宫迎春 刘 超 赵新巍 周 平 尹春艳
青岛苏贝尔作物营养有限公司 青岛 266000

摘要: 黄腐酸是一种可溶于酸碱溶液的腐植酸组分, 在农业、工业、医药等领域具有广泛的应用。随着黄腐酸应用范围的日益扩大, 人们对黄腐酸各方面研究也越来越关注。本文从提取、分级、鉴定等方面系统阐述黄腐酸研发现状, 并对目前黄腐酸市场上存在的问题和未来发展趋势进行分析与展望。

关键词: 黄腐酸; 提取; 分级; 鉴定; 问题; 展望

中图分类号: TQ314.1 文章编号: 1671-9212(2024)01-0012-06

文献标识码: A DOI: 10.19451/j.cnki.issn1671-9212.2024.01.002

Sketch on the Extraction, Analysis, Classification of Fulvic Acid and Its Existing Problems

Zhao Jianliang, Liu Yan, Gong Yingchun, Liu Chao, Zhao Xinwei, Zhou Ping, Yin Chunyan

Qingdao SOBEL Crop Nutrition Co. Ltd., Qingdao, 266000

Abstract: Fulvic acid is a kind of humic acid component that is soluble in acid-base solution, and has a wide range of applications in agriculture, industry, medicine and other fields. With the expansion of the application range of fulvic acid, people are paying more and more attention to the research of various aspects of fulvic acid. This paper systematically expounds the current status of fulvic acid research and development from the aspects of extraction, classification and identification, and analyzes and prospects the existing problems and future development trends in the current fulvic acid market.

Key words: fulvic acid; extraction; classification; identification; problem; prospect

黄腐酸含有羧基、羟基等多种含氧官能团, 这使其具备较高的活性^[1, 2]。黄腐酸结构复杂, 因来源不同更是千差万别。人们对黄腐酸的分子结构没有定论, Schnitzer^[3]根据实验结果推测的黄腐酸分子结构如图1所示。但从有机合成角度来看, 此结构并不是一个大分子结构, 只是几个小的、存在强极性氢键的有机分子形成的超分子体系, 仍是混合物。黄腐酸的结构至今无准确的报道。

随着现代技术的发展, 人们对黄腐酸的研究逐渐深入, 已将其广泛应用于农业、工业、环境、医药等方面。基于黄腐酸在各领域的重要作用, 因此对黄腐酸的研究更为有意义。黄腐酸分为从风化煤、褐煤、泥炭等有机矿物中提取的矿物源黄腐酸和以

农林、厨余废弃物、酒精废弃物为原料经微生物发酵制得的生物质黄腐酸^[4]。国内外学者对从泥炭、褐煤和风化煤等低阶煤中提取黄腐酸已做了大量研究, 近年来各行业对矿物源黄腐酸的应用频率大大升高, 因此针对矿物源黄腐酸提取、分级及鉴定也显得尤为重要。

本文主要对矿物源黄腐酸常用的提取方法进行了探讨, 同时进一步总结了提取后的黄腐酸分级和鉴定, 但由于生物质黄腐酸逐步兴起, 其中也穿插了一些对矿物源与生物质黄腐酸的鉴别。最后, 列举了一些目前黄腐酸行业存在的问题及对未来发展进行了展望, 以期对黄腐酸的深入研究与应用提供理论基础和科学依据。

[收稿日期] 2022-11-01

[作者简介] 赵建亮, 男, 1982年生, 工程师, 主要从事特种肥料的开发工作, E-mail: 94482301@qq.com。

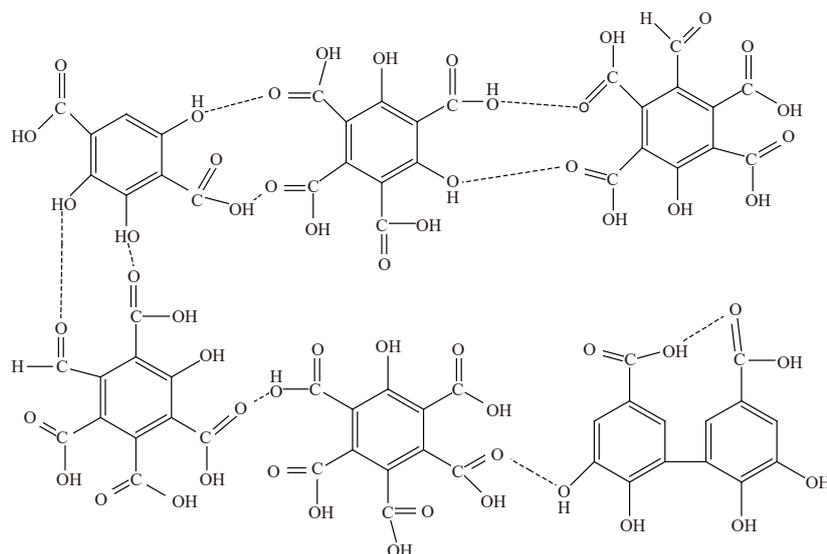


图1 Schnitzer 提出的黄腐酸结构模型

Fig.1 Fulvic acid structure model proposed by Schnitzer

1 黄腐酸提取

1.1 碱溶酸析法

碱溶酸析法是指向样品中加入碱溶液，在加热、搅拌等条件下充分反应，得到腐植酸盐溶液，再用酸溶液调节 pH 到一定范围，离心、过滤即得黄腐酸产品。此过程利用黄腐酸溶于酸性溶液的特性，随着酸的加入，溶液 pH 降低，不溶于酸的棕腐酸和黑腐酸依次析出，最终将黄腐酸提取出来。

马力通等^[5]采用碱溶酸析法，将 8 种碱性萃取剂提取黄腐酸的产率、纯度和结构进行对比，结果表明 Na_2SO_3 提取的黄腐酸浓度最高，达 0.284 g/L。焦元刚^[6]则用 1% 的 NaOH 与稀硫酸提取风化煤中黄腐酸，探究不同终点 pH 对黄腐酸提取率的影响，发现 pH 增大使非黄腐酸物质溶解量增加且提取率升高。

此法提取简单，成本低，适合大批量生产，是提取黄腐酸最常用方法之一。但得到的黄腐酸纯度较低，易含较多非黄腐酸物质，需进一步纯化。实际生产多选用 KOH、NaOH 为碱溶试剂提取黄腐酸。

1.2 化学氧化法

化学氧化法是指利用化学氧化剂将大分子腐

植酸类物质氧化降解成小分子黄腐酸类物质。

Zhang Y 等^[7]以过氧化氢和甲酸为氧化剂并辅以微波提取新疆哈密褐煤中的黄腐酸，研究表明甲酸可以促进过氧化氢从褐煤中提取黄腐酸，其最佳收率可达 9.13%。郑红磊^[8]采用过氧化氢氧化法提取内蒙古呼伦贝尔褐煤中的黄腐酸，发现在过氧化氢浓度为 17.5%、煤与过氧化氢比例为 3.8 : 1、温度 65 °C、时间 60 min 的条件下黄腐酸的收率可达 15.22%。

化学氧化法可以提高黄腐酸产率，增强含氧官能团活性与数量，但氧化剂的选择是关键，硝酸易产生污染环境的副产物，而过氧化氢不稳定。

1.3 硫酸丙酮法

天然黄腐酸多以黄腐酸盐的形式存在，如煤炭中黄腐酸多以钙镁的金属盐形态存在，硫酸中的氢离子取代黄腐酸盐中的金属离子，生成游离状态的黄腐酸溶于丙酮，过滤去除不溶的硫酸盐和杂质得到黄腐酸溶液，蒸发去掉溶剂即为黄腐酸产品。

焦元刚^[6]采用硫酸丙酮法提取风化煤中的黄腐酸，使用的提取液为 10% 的丙酮溶液，在液固比 7.5、时间 1 h、酸煤比 0.05、温度 30 °C 的条件下，黄腐酸的提取率达 41%。但丙酮易挥发，易对人体和环境造成伤害。文鹏丽^[9]采用乙醇替代

丙酮,在液固比为4、反应时间1 h、提取液含水量15%、酸煤比0.1的条件下提取内蒙古风化煤中的黄腐酸,提取率可达32.28%。

1.4 离子交换法

离子交换法与硫酸丙酮法基本类似,利用强酸性离子交换树脂中的氢离子取代可溶性黄腐酸盐中的金属离子,从而去除金属离子,得到黄腐酸。王彩虹等^[10]将DAX-8型树脂与001×7 H⁺型树脂相结合,提取的黄腐酸纯度可达94.49%。

离子交换法方法简单,除可用于提取黄腐酸外,还可对黄腐酸粗品纯化得到更高纯度的黄腐酸,使用的离子交换树脂活化后可重复利用,但离子交换树脂的再生活化工艺复杂,成本比较高,生产上通常不采用。

除了上述提取黄腐酸的方法外,还有微生物法(主要为发酵法),杨鑫^[11]从混合菌株中筛选出一种对峨山褐煤提取效果最好的菌株,此方法提取的黄腐酸的水溶性和絮凝极限均变好,活性官能团增多。

2 黄腐酸的定性定量分析

黄腐酸含多种官能团,结构复杂。此外,制备黄腐酸的矿物源和生物质源原料有本质上的区别,以及黄腐酸提取方式的多样性,使黄腐酸物质组成差异巨大。目前市场上出现用有机物类非黄腐酸冒充矿物源黄腐酸的案例,因此选取科学有效的分析手段对黄腐酸结构及性质进行定性定量分析以及如何鉴别真假黄腐酸是近年来研究的热点。

2.1 黄腐酸含量检测

根据《黄腐酸钾》(HG/T 5334—2018)和《黄腐酸原料及肥料术语》(GB/T 38072—2019)规定,黄腐酸原料、以黄腐酸为有机原料制成的肥料和以黄腐酸为基础制备的黄腐酸盐类均分为矿物源和生物质源。对于矿物源黄腐酸,中国腐植工业协会腐植酸质量检测中心推荐采用《矿物源游离黄腐酸含量的测定》(GB/T 34765—2017)国家标准^[12],《黄腐酸钾》(HG/T 5334—2018)和《肥料中黄腐酸的测定 容量滴定法》(NY/T 3162—2017)也是常用

的检测矿物源黄腐酸标准。仅有《黄腐酸钾》一个标准既适合矿物源又适合生物质黄腐酸,而殷慧敏^[13]对该标准稍加修改,先用七水硫酸锌和五水硫酸铜沉淀分离黄腐酸后氧化滴定检测,同时引入沉淀系数,可以很好地区分矿物源黄腐酸与生物质黄腐酸。

黄腐酸检测标准大致分为提取、酸化分离、去除金属离子、氧化和滴定5个步骤,即利用重铬酸钾的强氧化性来氧化黄腐酸中碳元素,再用硫酸亚铁铵标准溶液滴定剩余重铬酸钾量间接求得黄腐酸含量,只是不同标准可能会在试剂浓度、碳系数和酸析pH等方面略有差异。

2.2 元素分析

元素分析是对黄腐酸样品中特定元素的定量分析,也是黄腐酸定量的主要方法之一。黄腐酸中所含的C、H、N、S、O 5种元素,前4种常采用元素分析仪测定,氧元素利用差减法亦可得出。黄腐酸中元素的差异可以反映官能团及分子结构的变化,如C/O和C/H比分别反映了黄腐酸含氧官能团数量和芳香程度。李亚军^[14]利用微波辅助过氧化氢氧化呼伦贝尔褐煤,发现煤样中氮元素与硫元素含量分别减少0.73%和0.09%,说明过氧化氢氧化有助于脱氮、脱硫。因此,元素分析可以对黄腐酸提取与纯化后的产物进行初步验证且为后续标准提供理论依据,但此方法受限于结晶水对结构的影响。

2.3 官能团含量的测定

黄腐酸所含的大量含氧官能团(羧基、羟基、羰基等),对其理化性质与生理活性有重要影响。常采用氢氧化钡滴定法测得样品中总酸基含量,醋酸钙测定羧基含量,总酸基减羧基为酚羟基含量^[15]。

2.4 波谱分析

波谱分析法是根据每种原子特有的特征谱线来鉴别物质及确定含量的方法。

2.4.1 紫外-可见光谱

紫外-可见光谱是利用黄腐酸分子对紫外(200~400 nm)和可见光(400~800 nm)的吸收所得。由于黄腐酸结构复杂,各官能团的吸收光谱会发生不同程度的位移或重叠,故其光谱对黄腐酸结构分



析存在局限性。目前,在腐植酸应用研究中普遍认为465 nm和665 nm处吸光度比值(E_4/E_6)反映黄腐酸分子的芳香缩合度,比值越高,芳香缩合度越低;但对此特征常数的讨论也不断,部分学者认为 E_4/E_6 比值与分子量有关而与芳香缩合度无关^[16],关于此比值的界定仍需进一步研究。

2.4.2 红外光谱

红外光谱中不同的化学键有不同的吸收波长位置。由于黄腐酸结构的复杂性及各基团相互影响,定量分析困难,但可以利用红外光谱确定黄腐酸的特征峰及其归属,对其官能团进行定性分析。赵亚玲^[17]将河南风化石中提取的矿物源黄腐酸、秸秆和苹果渣发酵提取的生物源黄腐酸进行红外光谱分析发现图谱具有相似之处。

2.4.3 核磁共振波谱

核磁共振波谱是根据物质吸收光能量的磁场区或化学位移不同来辨别化合物结构的。黄腐酸结构以C、H、O为主,因此核磁共振氢谱与核磁共振碳谱是研究腐植酸分子结构与官能团的主要波谱。路亚楠等^[18]利用¹H NMR鉴定了不同萃取剂提取褐煤中腐植酸对其结构和官能团的影响;张超^[19]利用核磁共振碳谱和氢谱表征从风化石和造纸黑液中提取的黄腐酸,发现二者结构大体相同,但造纸黑液里的黄腐酸结构更为复杂且含较多芳香结构。但此方法因黄腐酸可以准确积分的烷基氢少,加上其溶解度在非水溶剂中不好或容易吸水问题,以及活性氢(来源COOH, OH或NH, SH)本身的积分易受环境影响而无法标准化等导致定量分析的准确度比较低。

2.4.4 色谱-质谱分析

黄腐酸大分子经化学降解或热降解后变成小分子碎片,进入色谱柱分离,由质谱仪定性定量分析碎片离子的组成,反推测黄腐酸的可能局部结构。目前,气相色谱-质谱联用(GC/MS)是分析黄腐酸物质碎片结构的通用手段。王智^[20]将矿物源黄腐酸与生物源黄腐酸用热裂解-气相色谱-质谱联用法对比其组分,发现生物源黄腐酸含有矿物源黄腐酸所没有的稠环芳香化合物。Qin Y等^[21]对氧化褐煤提取的黄腐酸用透析袋透析为100~500分子

量大小的黄腐酸,采用GC/MS对其研究,共得到47种碎片离子类化合物。

2.4.5 荧光光谱法

利用黄腐酸样品被紫外线照射后发出反映黄腐酸特性的荧光进行鉴定^[14]。在黄腐酸溶液浓度低时,荧光强度与浓度呈正比,可以准确地定性定量分析;若浓度较大,会发生自吸收或自猝灭,荧光强度与浓度非线性关系,对黄腐酸的定量分析产生局限性。

2.4.6 拉曼光谱法

拉曼光谱是根据光散射效应的分析技术,从分子能级的变化来鉴定黄腐酸分子结构,可对黄腐酸样品进行快速、无损检测。但此法在黄腐酸结构分析方面研究不多。

3 黄腐酸分级

尽管目前国内外采用很多先进仪器和方法来表征分析黄腐酸,但黄腐酸是由一系列相对分子量较小的有机分子结合而成的混合物,本身的异质性限制人们对黄腐酸的表征与分析,使得当下仍无明确清晰的黄腐酸组成及作用机理。因此,根据黄腐酸分子量、溶解性对其进行分级,得到不同梯度性质相似的物质,降低黄腐酸异质性,便于更好地研究不同级分黄腐酸的理化性质、结构组成和作用机理。

3.1 梯度淋洗法

此方法采取溶剂梯度和温度梯度相结合的手段对黄腐酸进行分级。将黄腐酸溶于内置玻璃珠的溶剂(乙醇)中,减压蒸馏后去除乙醇,黄腐酸将均匀附着在玻璃珠表面,将其放于玻璃柱中,用不同淋洗液(乙醇与非溶剂复配)和温度梯度对玻璃柱淋洗,依次减压蒸馏即得不同分子量的黄腐酸。张德和^[22]用该法对黄腐酸进行分级得到了12个分子量级别的组分,且回收率高达99.6%,但此方法造成淋洗液的过度浪费。

3.2 分子筛层析法

分子筛采用多孔网状结构的凝胶,分离出不同分子量大小的黄腐酸,因此又叫凝胶过滤法。黄腐

酸分子量较大的物质由于不能流入凝胶孔内,会快速流过凝胶间,流出凝胶柱;而分子量较小的物质会进入凝胶内部,按分子量大小依次流出凝胶柱,分子量越小,流出越晚。若样品浓度过高,会减弱分离效果,导致黄腐酸分级收率较差^[23]。

3.3 膜分离法

膜分离法分为透析袋分级和加压超滤。透析袋分级是将装有黄腐酸溶液的特定相对分子量的透析袋置于缓冲溶液中,利用半透膜内外不同的浓度差,比半透膜分子量小的物质被透析出来为透析液,分子量大的物质留在袋内为保留液。通过不同分子量透析袋透析所得的透析液减压蒸馏即得黄腐酸的不同级分^[21]。此法操作便捷,透析袋可循环使用。梁媛媛等^[24]采用透析膜将黄腐酸分为<3000、3000~10000和>10000 Da 3个分子量等级,发现分子量越小的黄腐酸亲水性与活性越高,低施用量效果显著。

加压超滤与透析袋分级原理类似,同样利用特定超滤膜来分级,不同点在于加压超滤利用仪器对超滤膜加压来对黄腐酸分级。不同分子量的物质在压力作用下通过不同孔径的超滤膜被分离出来^[25]。超滤膜越小,所需压力越大,分离速度越慢。

4 存在问题

黄腐酸蕴含丰富的含氧官能团决定其具备诸多的特性,这使得它在农业、工业、环境、医药领域得以广泛应用。越来越多的学者对黄腐酸展开研究,但由于其复杂的结构使得对黄腐酸研究仍面临许多问题:(1)低阶煤种类丰富,提取方法繁多,都会导致提取到的黄腐酸结构(官能团种类、数量)差异化。因此,对不同来源、不同提取方式所得的黄腐酸结构及作用机理的研究十分重要;(2)目前来看,我国低阶煤资源丰富,但随着工业化进程加快,势必面临能源短缺问题,如何高效地从低阶煤中提取黄腐酸或寻找新的来源值得思考;(3)黄腐酸检测主要为容量法,此方法受碳系数影响较大,常出现同一个产品不同单位检测黄腐酸含量不同,甚至差距较大的现象,

这些都与黄腐酸碳系数不统一或不合理有关^[26];

(4)近年来关于生物质黄腐酸的研究增多,相比类黄腐酸、发酵有机酸等,生物质黄腐酸逐渐被大家认可^[27],但不同来源黄腐酸所含羧基、羟基等活性官能团数量、位置不同,与其他原料可能发生的反应及其作用于土壤中的机理也不同,在此基础上制得的黄腐酸肥料难以保证良好的稳定性是目前肥料行业普遍出现的问题;(5)如何更好地鉴定矿物源黄腐酸与生物质黄腐酸也是目前存在的主要问题,黄腐酸肥料生产成本较高、而原料的质量检测标准匮乏,针对生物质黄腐酸检测标准也只有《黄腐酸钾》标准,很难做到很好地区分两种黄腐酸,容易导致黄腐酸类肥料生产以假乱真、粗制滥造。

5 展望

黄腐酸在多领域有很大应用潜力,如医药和畜牧领域,对人体及动物多种疾病预防与治疗效果显著,为以后提高药效和长期安全性还需进一步摸清其在人体和动物中的起效机理。黄腐酸在农业上的应用仍是主流,其良好的水溶性使其在肥料复配中极具优势,添加氨基酸、海藻酸等天然活性物质与黄腐酸配伍,开发新型黄腐酸肥料,是实现农业可持续发展的一个思路。

黄腐酸虽应用广泛,还是更要注重其结构与组成的基础研究,为后续黄腐酸肥料标准的制定和黄腐酸类新产品的推出奠定基础;本文概述的黄腐酸提取、鉴定及其分级部分虽主要以矿物源黄腐酸为主,在定性定量及分级部分也只是粗略列举了关于矿物源黄腐酸与生物质黄腐酸测定和结构方面的差异,如何快速清晰的对二者进行鉴别和检测也是一直以来许多行业关注的问题;其次,表征黄腐酸结构的仪器与方法很多,科学搭配,整理和完善不同来源、不同提取方法制得的黄腐酸的结构数据,更加合理的应用黄腐酸,提高黄腐酸利用率,让用黄腐酸制成的产品更加稳定,减少因质量问题而被市场淘汰的概率;在黄腐酸肥料产业,含矿物源黄腐酸的肥料产品一直占市场较大比例,生物质黄腐酸虽然备受争议,但也逐渐被认可,针对不同种类



的黄腐酸肥料, 应定向细化标准, 做到每类含黄腐酸产品均有检测标准可循, 让黄腐酸行业健康稳定地发展。

参考文献

- [1] Sugiyama Y, Anegawa A, Inokuchi H, et al. Distribution of dissolved organic carbon and dissolved fulvic acid in mesotrophic Lake Biwa, Japan[J]. *Limnology*, 2005, 6(3): 161 ~ 168.
- [2] 杨建新, 王如松. 产业生态学的回顾与展望[J]. *应用生态学报*, 1998(5): 108 ~ 114.
- [3] Schnitzer M. Reactions between fulvic acid, a soil humic compound, and inorganic soil constituents[J]. *Soil Sci. soc. am. proc*, 1969, 33(1): 75.
- [4] 全国肥料和土壤调理剂标准化技术委员会. 黄腐酸原料及肥料术语: GB/T 38072-2019[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019.
- [5] 马力通, 李丽萍, 路亚楠, 等. 碱液对提取褐煤黄腐酸的影响[J]. *煤炭转化*, 2023, 4(5): 83 ~ 89.
- [6] 焦元刚. 从风化煤中提取黄腐酸[D]. 北京交通大学硕士学位论文, 2006.
- [7] Zhang Y, Liu W, Hu X, et al. Extraction and functional group characterization of fulvic acid from Hami lignite[J]. *Chemistry Select*, 2019, 4(4): 1448 ~ 1455.
- [8] 郑红磊. 微波辅助过氧化氢氧化褐煤提取黄腐酸的研究[D]. 中国矿业大学硕士学位论文, 2016.
- [9] 文鹏丽. 风化煤中黄腐酸提取关键技术的研究[D]. 山西大学硕士学位论文, 2012.
- [10] 王彩虹, 张文博, 王岳俊, 等. DAX-8与001×7H+型树脂提纯黄腐酸的效果研究[J]. *腐植酸*, 2020(5): 27 ~ 32.
- [11] 杨鑫. 褐煤的微生物降解及其黄腐酸特性的研究[D]. 昆明理工大学硕士学位论文, 2015.
- [12] 张彩凤. 关于腐植酸检测标准的研讨[J]. *腐植酸*, 2022(6): 83 ~ 84.
- [13] 殷慧敏, 刘学涛, 杜建光, 等. 大量元素水溶肥料中矿物源黄腐酸含量的检测方法研究[J]. *肥料与健康*, 2022, 49(3): 73 ~ 76.
- [14] 李亚军. 呼伦贝尔褐煤再生黄腐酸结构表征及分子模型构建[D]. 中国矿业大学硕士学位论文, 2017.
- [15] 周霞萍. 腐植酸应用中的化学基础[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [16] 李善祥. 腐植酸产品分析及标准[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [17] 赵亚玲. 黄腐酸(FA)发酵生产及分离提取的研究[D]. 西北大学硕士学位论文, 2004.
- [18] 路亚楠, 韩茂华, 巩冠群, 等. 萃取剂对褐煤腐植酸提取的影响[J]. *应用化工*, 2023, 52(1): 58 ~ 62, 67.
- [19] 张超. 风化煤、造纸黑液中黄腐酸类物质的提取和对玉米促生作用的研究[D]. 山东农业大学硕士学位论文, 2018.
- [20] 王智, 张惠芬, 秦谊, 等. 矿源黄腐酸与生化黄腐酸热裂解组分的对比研究[J]. *腐植酸*, 2020(5): 20 ~ 26.
- [21] Qin Y, Zhu H, Zhang M, et al. GC-MS analysis of membrane-graded fulvic acid and its activity on promoting wheat seed germination[J]. *Molecules*, 2016, 21(10): 1363.
- [22] 张德和, 刘登良. 吐鲁番风化煤黄腐酸的结构表征[J]. *燃料化学学报*, 1982(2): 121 ~ 128.
- [23] Specht C H, Frimmel F H. Specific interactions of organic substances in size-exclusion chromatography[J]. *Environmental Science & Technology*, 2000, 34(34): 2361 ~ 2366.
- [24] 梁媛媛, 王泽平, 史秋泽, 等. 不同分子量黄腐酸对冬小麦生长和养分吸收利用的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2023, 29(2): 308 ~ 322.
- [25] Jing L, Huijuan L, Xu Z, et al. Effect of preozonation on the characteristic transformation of fulvic acid and its subsequent trichloromethane formation potential: presence or absence of bicarbonate[J]. *Chemosphere*, 2008, 71(9): 1639 ~ 1645.
- [26] 邹德乙. 腐植酸产品标准化工作的几点意见与建议[J]. *腐植酸*, 2013(3): 44 ~ 48.
- [27] 李善祥. 关于腐植酸标准化工作若干问题的思考[C]. 第六届全国绿色环保肥料新技术、新产品交流会论文集, 2006.