HAL
open science

Mild hydrolysis and alcohol compounds of humic acids

Dou Sen, Eric Lichtfouse, André A. Mariotti

To cite this version:

Dou Sen, Eric Lichtfouse, André A. Mariotti. Mild hydrolysis and alcohol compounds of humic acids. Chinese Journal of Soil Science, 2002, 33, pp.17-20. hal-00264070

HAL Id: hal-00264070

https://hal.science/hal-00264070

Submitted on 14 Mar 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Revised version
Mild hydrolysis and alcohol compounds of humic acids. II. Alcohols in hydrolysed products of humic acids.
Dou Sen[1], Eric Lichtfouse[2], André Mariotti
Chinese Journal of Soil Science 33, 17-20, 2002.

1. Dou sen, Ph.D., Professor, Associate Dean, College of Natural Resources and Environmental Sciences,
Jilin Agricultural University. Add：2888 Av Xincheng, Changchun, Jilin Prov., CHINA P.C.：130118
Email：dousen1959@126.com; dousen@public.cc.ji.cn; dousen@tom.com

2. Dr. Eric Lichtfouse, Editor-in-Chief, Agronomy for Sustainable Development, http://www.agronomy-journal.org
Editor-in-Chief, Environmental Chemistry Letters, http://www.springerlink.com/content/110367
INRA-CMSE-PME, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France
Eric.Lichtfouse@dijon.inra.fr

Mild hydrolysis and alcohol compounds of humic acids

Dou Sen (Jilin Agricultural University)

Eric Lichtfouse and André Mariotti (Université Pierre et Marie Curie)

Abstract

Alcohol compounds of humic acid (HA) hydrolyzed products were studied by using alkaline mild hydrolysis, thin layer chromatography (TLC) and GC—MC in this paper. The results showed that the alcohols content in HA hydrolyzed products were saturated alcohol > sterol > unsaturated linear alcohol. Saturated alcohols were mainly even-number carbon of $C_{20\sim30}$ and C_{15}; Unsaturated linear alcohols were mainly $C_{20-1\pi}$, $C_{20-2\pi}$and $C_{19-4\pi}$. HAs from soils under C_3 and C_4 plant cultivation were different in some aspects. C_3-HA contained more unsaturated alcohol, whereas C_4-HA contained more saturated alcohol (especially C_{12} and C_{26}).

Key Words: Humic acid, Hydrolysis, Alcohol

土壤胡敏酸的温和水解及分组研究
II.胡敏酸水解产物中的醇类化合物*

窦森　　Eric Lichtfouse 和 André Mariotti
（吉林农业大学）　　（法国巴黎第六大学）

土壤腐殖物质的结构极其复杂，人们对此了解不够。近年来，应用核磁共振技术，对腐殖物质结构特征进行了许多研究，但也仅限于对C、H化学环境的粗分，达不到分子水平。人们早就知道胡敏酸（HA）存在着以酯键相连的醇类化合物，但到底含有哪些种类的醇，却不清楚[1]。本文采用温和水解及柱层析(CC)和薄层层析(TLC)等分组方法[2]，并应用气-质联机技术对土壤胡敏酸水解产物中的醇类化合物进行了初步的研究，为研究土壤腐殖物质的化学结构、起源和转化提供新的资料。

一、材料和方法

（一）土壤样品

土壤样品采自法国爱松省的Boigneville 试验地，采样时间为1993年5月。土壤类型为弱淋溶土（faible Lessivé）。采样深度为0～30cm，风干过1mm筛。共选两个处理，分别为在C_3植物条件下的土壤种植23年玉米和种植23年小麦，前者代表C_4植物条件下的土壤，后者代表C_3植物条件下的土壤。土壤样品的基本性质同前文[2]。

（二）HA样品的制备和分组

用0.1mol/LNaOH在25℃、N_2条件下提取土壤，将提取液酸化至pH1.5得到粗HA。用Spectra/Por^{R}半透膜透析袋对粗HA纯化得到分子量≥2000的HA。经40℃旋转蒸发浓缩至适当体积后，冻干得到HA粉末备用。HA的产率为1.5～2.1g・Kg^{-1}（无灰分和水分）。HA的基本性质同前文[2]。

HA水解前，先用乙醚（Et_2O）在超声波作用下除去吸附形式存在的小分子。将提取残渣自然干燥用于HA的水解。HA的水解用5mol/LKOH-MeOH在N_2，70℃和磁搅拌条件下回馏16小时。中性组分和酸性组分的分离用CC-Et_2O-H_2O柱层析法；中性组分的分组用TLC-CH_2Cl_2法。具体方法同前文[2]。我们首先对得到的四类化合物（烃-脂类、酮类、醇类和极性化合物类）中的醇性组分进行了研究。

（三）醇性组分乙酰化及纯化

1 醇性组分乙酰化

用醋酸酐（Ac_2O）和吡啶（Py）进行乙酰化。第一组参考化合物为胆甾醇（Cholesterol），十六烷醇（Hexadecanol），麦角甾醇（Ergosterol,），用于乙酰化共注射参考化合物和乙酰化HA醇性组分的TLC纯化； 第二组参考化合物也是胆甾醇，十六烷醇，麦角甾醇；再加上胆甾烷醇（5α-Cholestan-3β-ol），谷甾醇（β-Sitosterol），豆甾醇+菜油甾醇（Stigmasterol+Campesterol），α+β香树素（α+βAmyrine），用于GC或GC-MS与样品一起共注射。

乙酰化的具体方法：用500μl注射器向装有参考化合物（用于TLC纯化的，约12mg；用于共注射的，约2mg）或HA醇性组分（0.5-0.8mg）的2ml小瓶中加入适量的Py(100-500μl),以溶解醇性组分和催化乙酰化反应。然后用500μl注射器加入过量的Ac_2O（100-300μl)。将2ml小瓶放入干燥器（50℃）1小时，取出在20℃挥发15小时，以除去多余的Py。如果不连续操作，可将2ml小瓶放入-18℃冰箱保存。

*国家自然科学基金(49971052),教育部优秀年轻教师基金(1995-503),吉林省杰出青年基金(1999-55-17;963504-2)资助。
作者简介:窦　森,男,1959年9月生,汉族,吉林省东丰县人,1989年2月毕业于沈阳农业大学,获农学博士学位。现任吉林农业大学资源与环境学院副院长,教授,兼任腐殖物质研究室主任。从事土壤有机质研究。地址:长春市吉林农大资环学院(130118),电话:0431 4531602。

为了除去所有多余的Ac_2O，要进行H_2O-CH_2Cl_2萃取。将装有乙酰化参考化合物或HA醇性组分的2ml小瓶从冰箱中取出，加入1mlH_2O和1mlCH_2Cl_2（3次），转入125ml分液漏斗中，然后往分液漏斗中加入15-25ml的CH_2Cl_2和H_2O，摇动，放气，静置5分钟，多余的Ac_2O将溶解于水相（弃去）。而乙酰化组分将溶于CH_2Cl_2相，放入25ml烧杯。重复上述萃取3次，最后将CH_2Cl_2相放入250ml爱伦美氏磨口瓶中，加入越10g$CaCl_2$放置24小时以除去残余的水。将CH_2Cl_2相直接到入3×13cm的柱子（含硅凝胶60、石英砂和脱脂棉），过滤（除去$CaCl_2$）于250ml蒸发瓶中，用CH_2Cl_2洗3次，使总体积达40ml左右，用旋转蒸发仪，20-28℃真空浓缩，并用CH_2Cl_2洗到预先称重2ml小瓶中，自然干燥后称重，这就是所谓的乙酰化醇性组分（ALAc）。

2 乙酰化醇性组分的纯化

用TLC- CH_2Cl_2方法纯化。分别将6个乙酰化共注射参考化合物用CH_2Cl_2溶解，在Kicsgel 60F-254硅凝胶板(20cmX20cmX0.25mm)进行TLC-CH_2Cl_2。用少量CH_2Cl_2溶解2ml小瓶中的ALAc，用毛细管在硅凝胶板底部2.5cm线上点样（全部点完）。乙酰化胆甾醇和乙酰化十六烷醇点在两侧（1.25cm处），用CH_2Cl_2展开，展开距离15cm。然后在UV254nm和365nm直接观察，并将两侧沿2.5cm线用玻璃刀割下，沾5%H_2SO_4-C_2H_5OH后在电热板上加热后观察。结果是两个标样（乙酰化胆甾醇和乙酰化十六烷醇）出现在相同高度（3.5cm，Rf0.236，加热后粉色）。以标样为中心，向上下各延伸1.5cm，用铅笔划出，铲下硅凝胶粉，直接到入3×13cm的柱子过滤（同前），用CH_2Cl_2洗柱子，滤液接于250ml蒸发瓶中，20-28℃真空浓缩，转移到预先称重2ml小瓶中，自然干燥后称重，这就是所谓的纯化了的乙酰化醇性组分，可直接用于GC, GC-MS分析。2个乙酰化HA醇性组分, 只用乙酰化十六烷醇为参考化合物标准，纯化方法同上。

（四）乙酰化醇性组分的GC,GC-MS分析

GC仪器型号为HEWLETT PACKARD 5890 SERIES II，装有柱头注射器和FID检测器，样品经过毛管柱（30mX0.32mm），固定相为100%的聚亚甲基硅烷（0.53μm，N=1.3X10^5理论塔板）。柱中载气（氦气）流速为1.49ml/min，FID中氦气+助气（氢气和空气）流速为7.69ml/min。柱温程序升温速度为15℃/min（50-100℃）；3℃/min（100-310℃）；在310℃恒温60min。FID温度为250℃。采用计算机中50M1方法测定。对于天然样品要稀释，1ml无水样品一般加100μl n-己烷为溶剂，进样量0.5μl左右。

GC-MS仪器型号为HEWLETT PACKARD 5890 A, 四极分析仪温度为100℃，FID温度为250℃。程序炉升温速同GC。采用计算机中程序50M1（此处1为阿拉伯数字）方法测定。

二、结果与讨论

（一）胡敏酸水解产物中醇的总量和分布

表1 胡敏酸水解产物中醇的总量和分布

Table 1 Total amount and distribution of the alcohol in hydrolyzed products from soil HA

HA	占HA (mg/g)	占水解产物 (mg/g)	占中性组分 (mg/g)	饱和醇 Saturated(%)	非饱和线性醇 Unsaturated (%)	甾醇 Sterol(%)
BM	3.3	144.3	211	57.5	9.2	32.5
BB	3.5	93.2	294	43.5	18.9	34.0
平均	3.4	119	253	50.5	14.0	33.3

在胡敏酸水解产物中，醇的总量和分布见表1。由表1可见，胡敏酸水解产物中醇占胡敏酸的3.3-3.5‰，平均3.4‰。BM和BB两种胡敏酸无差异。但由于水解产物和中性组分在两种胡敏酸中存

在着差异[2]，醇占水解产物的比例在两种胡敏酸中明显不同，BM>BB；而醇占中性组分的比例是BB>BM。在醇类的分布上，主要是饱和醇（50%），其次是甾醇（33%），非饱和线性醇比较少，但BB明显高于BM，分别为19%和9%。

（二）饱和醇类

共检测出14种饱和醇，它们的链长，保留时间和质荷比（m/e）及相对含量见表2。由表2可见，两种胡敏酸各相应碳数饱和醇的保留时间几乎相同，质荷比完全相同，保留时间随分子量的增大而延长；质荷比随分子量的增大而提高，说明检测的可靠性。在土壤胡敏酸中，主要是偶数碳的饱和醇类，从C12到C30，占90%；奇数碳，主要是C15，占8%。这与烷烯烃类的分布是一致的[3]，与植物叶中的饱和醇类分布也基本一致（窦森等，1995，未发表资料），说明胡敏酸主要来源于植物。

在两个胡敏酸中，平均相对含量>10%的饱和醇有6个，它们是C12，C16，C18，C22，C26和C28，占70%以上；中等含量（4-9%）的饱和醇有3个，它们是C15，C20和C24，占20%以上；低含量（<2%）的饱和醇有5个，它们是C14，C19，C21，C23和C30，不到10%。在两种胡敏酸之间，饱和醇相对含量存在着差异。在BM中，含量达10%以上的饱和醇有6个：C12、C16、C18、 C22、C26 和C28，其中C12和C16是BB的1.5—2倍。在BB中，含量达10%以上的饱和醇有5个：C16、C18、 C22、C26 和C28，其中C16、C18和C28均高于BM，幅度为18-45%。C16？和C20在BB中也较高，是BM的1.5—2倍。另外，BB中没有C30。C19和C23不仅含量低，而且没有在两个胡敏酸中同时出现，也可能是污染信号。

表2 胡敏酸水解产物中饱和醇*
Table 2 Saturated alcohol in hydrolyzed products from soil HA

No	饱和醇	RT (min,BM,BB)	m/e	BM (%)	BB (%)	平均 (%)
1	C12	28.12,28.13	55,97,168	14.96	6.91	10.9
2	C14	35.26,35.29	55,97,196	1.33	1.52	1.4
3	C15	37.44,37.47	55,97,210	7.53	8.10	7.8
4	C16	41.85,41.87	55,97,224	9.81	12.70	11.3
5	C16?	37.66,37.65	55,83,125,196,224	4.72	9.32	7.0
6	C18	47.89,47.93	55,97,252	10.76	12.49	11.6
7	C19	50.69,--	55,97,267	<0.5	--	
8	C20	53.44,53.47	55,97,280	3.51	5.11	4.3
9	C21	--,56.09	57,97,294	--	0.95	
10	C22	58.59,58.62	57,97,308	11.97	11.62	11.8
11	C23	--,61.04	57,97,322	--	<0.5	
12	C24	63.27,63.40	57,97,337	8.76	7.69	8.2
13	C26	67.83,67.87	57,97,365	13.65	9.74	11.7
14	C28	72.01,72.06	57,97,393	9.53	13.84	11.7
15	C30	76.21,--	57,97,421	3.45	--	

*<0.5%的未包括在计算内。

（三）非饱和线性醇类

非饱和线性醇主要有C18，C19，C20和C21四类13种，非饱和双键（π键）为1-6个。它们的链长，保留时间和质荷比（m/e）及相对含量见表3。由表3可见，两种胡敏酸中，BB比BM含有更多和更复杂的非饱和线性醇，含量>0.2%的在BB中为11种；在BM中仅为3种。从数量上看，BM中占绝对优势的是C20Ac1π和C20Ac3π？，相对含量分别为59%和32%；BB中是C20Ac1π，C19Ac4π和C20Ac3

π？，相对含量分别为40%，22%和19%。H.Dinel等（1999）[4]报道，用二乙醚和氯仿提取土壤得到从C11到C34的烷烯烃或脂肪酸，其中包括C20和C19不饱和碳，其他不饱和碳有C15，C16，C18，C22，C23，C24，C25，C26，C28和C30。

表3 胡敏酸水解产物中的非饱和线性醇*

Table 3 Unsaturated linear alcohol in hydrolyzed products from soil HA

No	非饱和线性醇	RT (min,BM,BB)	m/e	BM (%)	BB (%)	平均 (%)
1	C18Ac1π	43.26,43.32	55,82,96,124,250	<0.2	1.99	
2	C18Ac1π？	47.10,--	55,82,96,124,250	<0.2	--	
3	C18Ac3π	--,40.73	196,224,247	--	2.65	
4	C18Ac4π	60.99,--	57,97,125,247	<0.2	--	
5	C18Ac4π？	36.93,--	57,83,126,196,243*,293	<0.2	--	
6	C19Ac1π？	--,38.64	55,83,125,182,210,265,304	--	1.60	
7	C19Ac1π	55.4,55.4	55,97,125,265,357	<0.2	<0.2	
8	C19Ac4π/C16Ac5π	54.62,54.65	57,99,127,171,214,230,258,292	<0.2	22.38	
9	C19Ac5π	40.13,40.19	60,73,129,171,213,256	<0.2	4.49	
10	C20Ac1π	48.12,48.22	63,95,123,179,278	58.55	40.10	49.3
11	C20Ac1π？	52.60,52.64	55,82,96,124,*250***,278,308	<0.2	1.91	
12	C20Ac1π？	56.07,--	57,97,125,278	<0.2	--	
13	C20Ac2π？	44.90,--	55,83,125,210,276	<0.2	--	
14	C20Ac3π？	45.52,--	55,97,125,224,252	9.62	--	
15	C20Ac3π？	44.13,44.16	55,83,125,224,252	31.83	18.5	25.1
16	C21Ac1π	--,52.50	55,97,125,202,252,280,292	--	1.33	
17	C21Ac4π?/C18Ac4π	35.55，--	57,85,141,179,198,213,254	<0.2	--	
18	C21Ac5π	46.31,46.35	60,73,97,129,185,241,284,378	<0.2	1.97	
19	C21Ac6π？	65.61,--	57,97,125,225,283	<0.2	--	
20	C21Ac6π？	--,65.99	57,98,132,180,236,250,*322*,336,393	--	3.07	

<0.2%的未包括在计算内；243 强；*250*** 更强。

三、小结

1 胡敏酸水解产物中的醇类的含量顺序是饱和醇>甾醇>非饱和线性醇。

2 胡敏酸饱和醇中，主要是偶数碳，从C12到C30，占90%以上；奇数碳，主要是C15，不到10%。非饱和线性醇主要是C20Ac1π，C20Ac3π和C19Ac4π。

3 C_3和C_4植物条件下形成的HA有一定的差异，玉米连作土壤上的胡敏酸中含有更少的非饱和线性醇；但总饱和醇量特别是C12和C26含量较高。

参考文献

[1] Stevenson F J.Humus chemistry[M]. New York. A Willey-Interscience Publication. 1982. 264-263

[2] 窦森；E. Lichtfouse; A. Mariotti.土壤胡敏酸的温和水解及分组研究。I.土壤胡敏酸的水解和分组方法[J].土壤通报，1998, 29（5）：206～208.

[3] 窦森；E. Lichtfouse; A. Mariotti.土壤胡敏酸水解、热解及其产物的分组和$\delta^{13}C$、$\delta^{15}N$和GC-MS鉴定研究[J].土壤通报，1995, 26（6）：271～273.

[4] H. Dinel, M. Schnitzer, T. Pare et al. Effects of direct land application of calcitic lime and lime- and cement kiln dust-sanitized biosolids on the chemical and spectroscopic characteristics of soil lipids[J]. Soil Science, 1999,164(5):322-330.

摘要

本文采用温和水解及薄层层析等分组方法，并应用气—质联机技术对土壤胡敏酸(HA)水解产物

中的醇类化合物进行了初步研究。结果表明：HA水解产物中醇类含量顺序是饱和醇＞甾醇＞非饱和线性醇。饱和醇中主要是$C_{12\sim30}$中的偶数碳和C_{15}，非饱和线性醇主要是$C_{20\text{-}1\pi}$、$C_{20\text{-}2\pi}$和$C_{19\text{-}4\pi}$。C_3和C_4植物条件下形成的HA有一定的差异，C_3-HA含有较多的非饱和醇，而C_4-HA含有更多的饱和醇特别是C_{12}和C_{26}。

关键词: 胡敏酸 水解 醇类