DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2016.10.2016030703
张雪, 丁鑫, 杨浈,等.腐殖质氧化还原官能团测定新方法[J].环境化学,2016,35(10):2106-2116
ZHANG Xue, DING Xin, YANG Zhen, et al. New methods for the determination of redox functional groups in humic substances[J].Environmental Chemistry,2016,35(10):2106-2116

腐殖质氧化还原官能团测定新方法*

张 雪 丁 鑫 杨 浈 姜 杰**

(北京林业大学环境科学与工程学院, 北京, 100083)

摘 要 腐殖质是一种主要由碳、氢、氧、氮等元素构成的具有氧化还原活性的有机质, 存在丰富的官能团, 其中以酚基和羧基含量最为丰富.腐殖质的氧化还原能力与氧化还原官能团的数目和种类有关.一直以来醌基被认为是腐殖质最重要的氧化还原官能团,对于醌基的测定是研究氧化还原官能团的重点.对于腐殖质氧化还原官能团的研究以化学、电化学和微生物等基本方法为主.本文尝试将这些方法与光谱法(如三维荧光光谱法、红外光谱法、核磁共振光谱法和电子自旋共振波谱法)相结合,不仅可以量化腐殖质氧化还原能力,还能对腐殖质氧化还原官能团具体组成有完整的解释,以便全面了解腐殖质的氧化还原官能团和氧化还原活性.

关键词 腐殖质, 氧化还原官能团, 氧化还原能力, 三维荧光光谱法.

New methods for the determination of redox functional groups in humic substances

*ZHANG Xue DING Xin YANG Zhen JIANG Jie***

(College of Environmental Science and Engineering, Beijing Forestry University, Beijing, 100083, China)

Abstract: Humic substances (HS) are redox active organic matters which are mainly composed of carbon, hydrogen, oxygen, nitrogen and other elements. Reducing capacities of HS relate to the type and number of redox functional groups. HS contain abundant functional groups including phenol and carboxyl groups. Quinone moieties are generally considered as the most important redox functional groups. This study attempts to illustrate chemical, electrochemical and microbial methods to quantify the redox characteristics of humic substances, and combine spectroscopic techniques (three-dimensional extraction-emission matrix technique, Fourier-transform infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance, electron spin resonance) to characterize the redox functional groups. The combination helps to better understand the composition of redox functional groups and the reducing capacities of HS.

Keywords: humic substances, redox functional groups, reducing capacities, 3DEEM.

腐殖质(Humic substances)是结构极为复杂的一类非均相高分子聚合物,广泛存在于土壤、水体、污泥等环境中[1-3].腐殖质在自然界中扮演着很重要的角色,在水环境系统中,它就像一个缓冲剂维持着水中的酸碱平衡,同时又能作为 C、N 等营养物质的来源.腐殖质还可以通过氧化/还原、络合、吸附反应与

2016 年 3 月 7 日收稿(Received: March 7, 2016).

* 国家自然科学基金 (21307004) 资助.

Supported by the National Natural Science Fund (21307004).

* * **通讯联系人**,Tel:01062336615, E-mail:jiangjie@bjfu.edu.cn

Corresponding author, Tel:01062336615,E-mail:jiangjie@bjfu.edu.cn

重金属、有机污染物发生相互作用,从而影响污染物的迁移转化与环境归宿[4].

腐殖质主要由碳、氢、氧、氮等元素构成,其分子结构中有芳香环、杂环和多环化合物.它们由碳链或键桥连接成疏松的网状,具有较强的络合和吸附能力,能与环境中的有机污染物、重金属离子等污染物发生物理化学反应[5].关于腐殖质的结构已提出了多种设想,但缺乏统一性.Stevenson[2]认为影响腐殖质氧化还原特性的主要官能团包括羧基(COOH)、酚羟基(Phenolic OH)、苯醌(Quinone)、羟基醌(Hydroxy quinone)、醇羟基(Alcoholic OH)等.Scott 等[6]的研究认为(苯)醌是腐殖质中最重要的氧化还原官能团.目前,研究人员主要应用化学方法和微生物方法研究腐殖质氧化还原特性,再结合新型的光谱法和电化学方法推测腐殖质官能团的种类、数量及分布.腐殖质作为土壤中原生的最重要电子载体,影响着化学循环过程,与人类迫切要解决的土壤污染问题密切相关.全面地了解腐殖质官能团的种类和分布能提高人们对腐殖质与污染物之间的反应机制的了解,进而提高对有机物和环境污染物在生态系统中的反应行为的预测能力.

本文拟将实验室基础方法与光谱法(如三维荧光光谱法、红外光谱法、核磁共振光谱法和电子自旋共振波谱法)相结合,不仅可以量化腐殖质氧化还原能力,还对腐殖质氧化还原官能团具体组成进行相对完整的解释,全面了解腐殖质的氧化还原官能团和氧化还原活性.

1　化学方法 (Chemical methods)

腐殖质中存在大量的氧化还原官能团.研究人员通过电位滴定法、化学还原法(利用胡敏酸与其他氧化还原剂反应)等方法测定了腐殖质电子转移能力以及氧化还原官能团的含量.

Ritchie 和 Perdue[7]通过电位滴定法量化了 14 种标准腐殖质官能团的含量,结果表明羧基和酚基基团含量最为丰富.他们根据滴定曲线估算了每种样品羧基和酚基的含量.一般来说,羧基含量顺序为陆源富里酸>水源富里酸>Suwannee 河天然有机物(NOM)>水源胡敏酸>陆源胡敏酸.而富里酸和胡敏酸酚基含量基本相同,但水体样品中酚基含量均比陆地样品含量高.Chen 等[8]研究表明,多酚丰富的 NOM 组分比碳氢化合物丰富的组分有更强的电子接受能力,表明酚基是天然有机物主要氧化还原官能团之一.

Nopawan 和 Nanny[9]通过 Pd-H_2还原实验量化了溶解性腐殖质(包括胡敏酸和富里酸)以及多种醌类模型化合物(图 1)的电子转移能力(ECC),并在腐殖质模型化合物研究的基础上提出了 2 种新模型结构,一种是非醌类氧化还原基团(NQ),另一种是醌类氧化还原基团,其中第二种又分为具有供电子取代基的醌类结构(Q_1)和既无取代基也无供电子基团的醌类结构(Q_2).实验发现,非醌类氧化还原基团(NQ)的 EEC 约占总电子转移能力的 21%—56%,而对于 Q_1与 Q_2来说,取代基位置不同,ECC 不同.胡敏酸和富里酸均在电子转移过程中利用不同的官能团,其中一些官能团可能为非醌型结构.这表明,腐殖质参与的电子转移过程中除了通过形成半醌自由基的机制外,还可以通过其他几种途径实现.

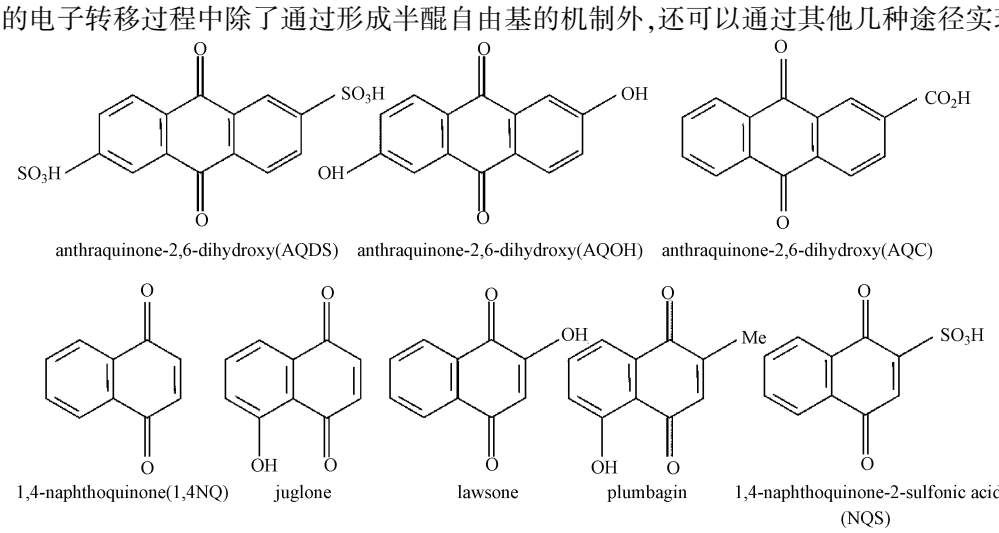

图 1　醌类模式物的化学结构[14]

Fig.1　Chemical structures of model quinone compounds[14]

姜杰等[10]测定了胡敏酸与 3 种不同氧化还原电位(E_h)的铁矿物(水铁矿、赤铁矿、磁铁矿)的氧化还原反应,并分析了腐殖质分子氧化还原官能团的分布规律.实验结果表明,还原态胡敏酸 E_h(E_h = −620 mV)比原态(E_h = 245 mV)低,原态胡敏酸的氧化还原 E_h 分布比较均匀,还原态胡敏酸在 E_h>0 的范围内存在易被氢气还原的官能团.此外,胡敏酸的氧化还原 E_h 是不同种类和数量的氧化还原官能团 E_h 的叠加值.

微生物方法常和化学方法结合起来研究腐殖质氧化还原官能团.Lovley 等[11]首次发现金属还原地杆菌 *Geobacter metallireducens* 能厌氧还原腐殖质及其模型物,如蒽醌 2,6-二磺酸 (Anthraquinone-2,6-disulphonate,AQDS).同时许多研究者也发现了数量颇多的微生物能从有机物和氢气转移电子到腐殖质,腐殖质接受电子被还原,成为一种还原剂进一步还原金属,从而帮助加速有机质还原金属的过程.这一加速效果对陆地和水环境中的污染物迁移有很大影响[2,12].大多数学者都认为是腐殖质中的醌基团对加快铁还原速率起到了主要的作用.Scott 等[6]通过 *Geobacter metallireducens* 还原实验发现,腐殖质的微生物还原产生了半醌自由基,使得腐殖质接受电子能力增强,且陆源胡敏酸的电子接受能力比水源胡敏酸要强.这些结果表明,(苯)醌是腐殖质中最重要的氧化还原官能团,还原态醌基团是胡敏酸还原能力的主要来源.Jiang 等[12-13]发现微生物腐殖质还原转移电子数和化学还原转移相同的电子数,结果表明氧化还原活性官能团在电位是−418 mV 时也能被微生物还原.并且还发现在胡敏酸和微生物的还原作用下产生具有强氧化性质的半醌自由基.半醌自由基将亚砷酸盐氧化为砷酸盐进而降低砷的毒性和迁移性,反应过程中 pH 对砷的氧化还原影响较大.

微生物方法还可以从基因、蛋白质等方面进行研究,辅助化学方法推测官能团的类型.研究表明 *Shewanella oneidensis* MR-1 的铁呼吸可能的电子传递途径为:脱氢酶→*CymA*→*MtrA*→*MtrB*→*OmcA*/*MtrC*→Fe^{3+}[14].*CymA*(一种四血红素细胞色素 C)、*MtrA*(周质空间中的一种十血红素细胞色素 C)、*MtrB*(一种不带血红素的外膜蛋白)、*OmcA*(外膜上的一种十血红素细胞色素 C)和 *MtrC*(外膜上的一种十血红素细胞色素 C)是位于细胞膜或周质空间中重要的细胞色素 C,细胞色素 C 是多种能够传递电子的含铁蛋白质的总称,在铁呼吸中起电子传递或作为末端还原酶的作用[15-18].

Lies 等[19]研究发现,*CymA* 和甲萘醌类是 *Shewanella oneidensis* MR-1 直接和间接还原矿物所必须的.缺少 *menF* 基因的突变体可以通过加入甲基萘醌进行铁还原,这是因为 *menF* 基因编码的第一个关键步骤是甲基萘醌的生物合成.呼吸醌广泛存在于微生物的细胞膜中,是细胞膜组成部分,在电子传递链中起重要作用.呼吸醌主要有两类:泛醌(Ubiquinone,UQ)即辅酶 Q 和甲基萘醌(Menaquinone,MK)即维生素 K,二者结构如图 2 所示.

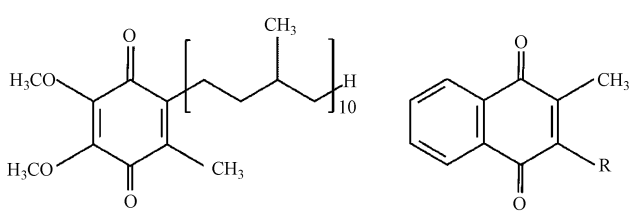

图 2 泛醌和甲基萘醌 (MK)的化学结构, R 为取代基

Fig.2 Chemical structures of ubiquinone (UQ) and menaquinone (MK), where R is substituent

2 光谱法 (Spectral analysis)

随着分析化学的发展,目前有很多光谱技术可以分析腐殖质的结构以及其中的官能团,尤其是紫外可见吸收光谱法(Ultraviolet-visible spectroscopy, UV-Vis)、红外光谱法(Fourier transform infrared spectroscopy,FTIR)、三维荧光光谱法(Three-dimensional excitation-emission matrix,3DEEM)、核磁共振光谱法(Nuclear magnetic resonance,NMR)和电子自旋共振波谱法(Electron spin resonance,ESR).光谱法具有需样量少、不破坏样品、测试简单的特点,适于有机物的物理结构和化学性质的研究[20].

2.1 紫外-可见吸收光谱法

对于腐殖质结构和官能团的简单分析,一般利用通过全波段扫描或测定一个或几个特定波长下腐

殖质的吸光度,并计算比值.表 1 总结了腐殖质紫外吸收峰的位置与官能团的关系.通过紫外吸收特征峰可以简单判断官能团的种类,比如醌类化合物的测定波长分别为:1,4-苯醌的测定波长为 242 nm(281 nm和 434 nm 也可测定);1,2-萘醌的测定波长为 250 nm(330 nm 和 405 nm 也可测定),1,4-萘醌的测定波长是 347 nm(390 nm 也可测定).其中"括号中的值"表示可以用另一种波长进行测定,而这种波长是有机化合物另一个吸收峰的波长或干扰较少的波长[21].

表 1　腐殖质紫外吸收峰的位置与官能团的关系[26]

Table 1　Relationship between the wavelength of UV absorption peaks of humic substance and functional groups[26]

波长 Wavelength/nm	官能团 Functional groups
200—220	烷基取代苯环结构
220—240	单取代及双取代的苯羧基和酚基结构的 π-π* 跃迁
240—270	多取代的苯羧基和酚基结构的 π-π* 跃迁
270—320	各种取代结构的苯羧基和酚基结构的 n-π* 跃迁
>320	稠环结构的苯羧基和酚基结构的 n-π* 跃迁

目前常用指标有 A_{253}/A_{203}、E_{465}等.E_{465}也叫色值(即波长在 465 nm 处的吸光度值),一般认为 E_{465}与以下几个因素有关:①腐殖质的 C/H 比;②全 C 量;③相对分子质量;④芳香 C/脂族 C 比.因此,E_{465}的大小可以反映腐殖物质的芳化程度、分子复杂程度和腐殖质颗粒相对分子质量的大小,E_{465}越低,说明芳香化度越低,颗粒相对分子质量越小,结构越简单[22].

张军政等[23]采用紫外-可见吸收光谱法对不同填埋年限垃圾渗滤液溶解性有机质(Dissolved organic matter, DOM)进行研究,结果表明 DOM 组分中疏水酸性组分(Hydrophobic acids,HOA)、疏水中性组分(Hydrophobic neutrals,HON)芳环上的取代基均以碳基、羧基、羟基为主,且 HOA>HON.而亲水性组分(Hydrophilic matter,HIM)芳香环上的取代基以脂肪链为主.刘新超等[24]发现腐殖质的芳香度可以用 280 nm 处的紫外吸光度值表征,若光谱在 280 nm 附近出现明显的台阶则表明腐殖质存在芳香环结构.

丁鑫等[25]以国际标准风化褐煤胡敏酸(LHA)为研究对象,通过 E_{465}、E_{465}/E_{665}值发现 LHA 还原态 E_{465}较原态略有下降,这意味着原态 LHA 的芳香族化合物含量比还原态高,说明了 LHA 分子在 H_2还原过程中芳香族化合物发生了碳骨架的断裂,使得还原后胡敏酸中芳香族化合物含量降低.此外,还通过紫外全波段扫描鉴定了 LHA 的发色团和共轭体系,结果表明在 200—700 nm 范围内还原前后不同浓度 LHA 都有紫外吸收,说明 LHA 分子中含有含氧、含氮官能团和共轭双键,如羧基、醌型羰基、芳香共轭双键等官能团.

为研究 DOM 结构和官能团对氧化还原能力的贡献,本实验室对原态、还原态的 DOM 进行紫外全波段扫描.实验方法和参数设置与丁鑫等[25]一致.从图 3 中可以看出,DOM 在 190—700 nm 范围内都有明显吸收,说明 DOM 结构中含有共轭双键和含氧、含氮官能团,如羰基、羧基和芳香共轭双键等.

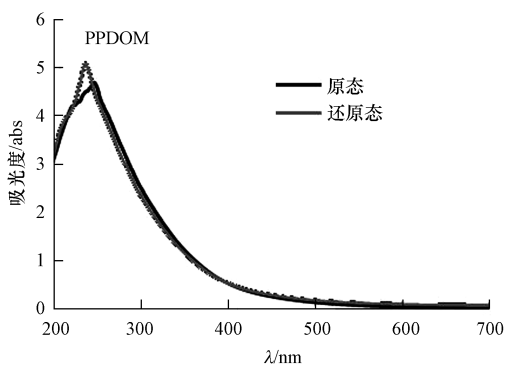

图 3　Pahokee peat DOM(PPDOM)在原态及还原态下的紫外光谱

Fig.3　UV-Vis spectra of Pahokee peat DOM (PPDOM) in native and reduced state

DOM 还原前后的紫外吸收强度随波长的增加呈先增大后减小趋势.原态 DOM 在 215—246 nm 范围内吸收曲线有一定程度波动,246 nm 处出现强吸收峰,且最大吸光值为 4.7;还原态 DOM 在 236 nm 处出现强吸收峰,且最大吸光值为 5.1.对比还原前后 DOM 的紫外光谱,发现还原后 DOM 最大吸收峰位置发生蓝移.此外,在 190 nm 至最大吸收峰范围内,还原前后吸收曲线均随波长增加而上升.在 190—215 nm范围内,还原前后吸收曲线形状差别不大,还原后 DOM 吸光值略高于原态.而 215 nm 至最大吸收峰范围内,还原后 DOM 吸收曲线较原态抬升明显.最大吸收峰处至 700 nm 范围内吸收曲线随波长增加而下降.最大吸收峰处至 400 nm 范围内原态吸收曲线高于还原态,而 400—700 nm 内还原态吸收曲线高于原态.

DOM 还原前后的吸收峰位置出现不同,且部分同一位置吸收峰形状有一定差异.DOM 还原前后吸收峰的形状、位置和峰值均发生变化,说明经过 H_2 还原后 DOM 分子的结构和官能团均发生了变化.220—240 nm 处的吸收峰表明 DOM 含有单取代及双取代的苯羧基和酚基结构的 π-π^* 跃迁;240—270 nm处的吸收峰表明含有多取代的苯羧基和酚基结构的 π-π^* 跃迁[26].DOM 在 240 nm 附近的吸收峰可能是由含有 π-π^* 共轭结构的分子(如芳香族)中,因 π-π^* 跃迁所产生的强吸收谱带,或者是苯环上的 E2 带产生的.DOM 被 H_2 还原后吸收峰由 246 nm 处蓝移至 236 nm,说明在 DOM 还原的过程中苯羧基结构及数量发生了变化:还原后多取代的苯羧基稍有减少,并生成了一些单取代及双取代的苯羧基.DOM 被 H_2 还原后吸收峰峰值增加,表明低能量 π-π^* 增多,这说明 DOM 还原的过程中有 π-π^* 的断裂,产生了更多的氧化还原官能团.这一结论与本课题组实验测得还原态 DOM 氧化还原能力大于其原氧化还原能力相一致.

2.2 红外光谱法

在有机物中,组成化学键或官能团的原子一直处于不断振动的状态,其振动频率与红外光的振动频率相当.因此,用红外光照射有机物时,分子中的官能团或化学键会发生振动吸收,不同的官能团或化学键吸收频率不同.腐殖质红外光谱吸收峰的位置与官能团的关系如表 2 所示.Tesar 等[27]与 Tintner 等[28]采用 FTIR 光谱研究了填埋垃圾及渗滤液中有机物中的官能团有芳香结构、羧基、羰基及酰胺基,在填埋过程中这些官能团均发了变化.王波等[22]采用 FTIR 对标准胡敏酸、市售胡敏酸、辽宁泥炭土等 5 种物质进行表征,实验发现 5 种样品中均存在着酚羟基、脂肪族烷烃结构、羧基和羧酸根.胡学斌等[29]采集三峡库区土壤样品分别提取腐殖质,联合红外和拉曼的分子振动光谱技术,表征了腐殖质分子结构.实验结果显示,土壤腐殖质中以酚、醚、酯基团中 C—O 和 C—C 的伸缩、弯曲振动以及芳环上 C ═C 伸缩和碳链骨架振动为主.易芬[30]采集了北京市周边 5 种土壤类型(森林土、林地土、人工湿地、天然湿地及耕地)共 17 个土样,并分别提取胡敏酸进行红外实验,实验结果发现不同土壤胡敏酸的红外光谱图形基本一致,即每种土样所含官能团种类相似,但官能团含量差异很大.胡敏酸均含有较多不饱和键,主要有 1600 cm^{-1}附近 C ═O 的伸缩振动和 2400 cm^{-1}附近的 C ≡ C 的伸缩振动.

表 2 腐殖质红外光谱吸收峰的位置与官能团的关系[31]

Table 2 Relationship between the wave number of FTIR absorption peaks of humic substance and functional groups[31]

波数 Wave number/cm^{-1}	官能团振动 Vibration of functional groups
1050	O—H 伸缩振动
1250	羧基的 C—O 的伸缩振动和 O—H 的变形振动
1400	酚类化合物的 C—O 的振动,酚羟基的变形振动,C—O 的对称伸缩振动
1630	芳环的骨架振动、C ═C 吸收、H 键缔合的 C ═O 吸收和酰胺键等相互叠加
1710	羧基和羰基官能团的 C ═O 伸缩振动
2400	C ≡ C 的伸缩振动
3400	(酚)羟基伸缩振动
3000—2800	脂肪 C—H 伸缩振动

2.3 三维荧光光谱法

由于腐殖质结构中含有大量未饱和脂肪链和带有各种官能团的芳香环结构,近些年来,应用 3DEEM 技术分析胡敏酸的结构以及其反应前后结构的变化较为频繁.3DEEM 技术能够获得激发波长和

发射波长同时发射时所得的荧光峰强,而且将荧光强度表示为激发波长-发射波长或者是波长-时间等两个变量的函数,这样能够更好地分析物质的结构以及其官能团的变化[32-33].利用 DOM 的荧光峰位置可以判断其主要官能团的种类(表 3).

表 3　天然环境中各种溶解有机质的荧光峰位置的总结

Table 3　Summary of the fluorescence peak positions of various dissolved organic matter (DOM) in natural environment

荧光团 Fluorophores	最大激发(Ex)/发射(Em) Maximum Ex/Em/nm	官能团推测 Indication of functional groups
类蛋白(Protein-like)	Ex:270—280, < 240 Em:300—370	芳香族氨基酸及其降解产物或结构类似物;结合在腐殖质物质上的氨基酸残基[40-42]
类腐殖酸 (Humic-like)	Ex:300—440,Em: 410—510	醌基[35]
可见区类富里酸 (Visible fulvic-like)	Ex:310—360, Em:370—450	与腐殖质结构中的羰基和羧基有关[32,43-44];可见区类富里酸荧光团代表样品多芳香性,紫外区类富里酸荧光团代表样品少芳香性[42]
紫外区类富里酸 (UV fulvic-like)	Ex:230—270, Em: 410—450	

早在 1971 年初,Datta 等[34]试图应用荧光方法获取腐殖质的结构信息.研究结果表明,尽管腐殖质的来源不同,但都表现出电子供体基团——芳香基团特征荧光光谱.Klapper 等[35]发现,富里酸的电子接受能力与荧光强度呈负相关,并且与 AQDS 和 AHDS 的三维荧光结果结合分析可知,醌基是导致原态与还原态腐殖质荧光变化的原因之一.腐殖质的氧化还原活性主要归因于醌-氢醌(对苯二酚)基团(在还原条件下).Cory 等[36]利用 3DEEM 及平行因子分析法(PARAFAC)测定了 379 中不同的溶解性有机物,实验检测到两种荧光团,分别为类醌荧光发色团(Quinone-like)、类蛋白质荧光发色团(Protein-like,包括色氨酸荧光发色团、酪氨酸荧光发色团),有荧光特性的官能团有 50%的是醌类荧光发色团,不同的氧化还原态和共轭程度导致这些醌类荧光发色团也不尽相同,并发现不同深度的溶解性有机物的结构特性也不尽相同.Macalady 和 Walton-day[37]利用平行因子分析法以及 3DEEM 分析了 54 种自然有机物,发现具有荧光特性的官能团有 64%—78%的是醌类基团,所占比例高于 Cory 等[36]研究.

姜杰等[38]分别研究了实验室提纯胡敏酸和国际腐殖质协会胡敏酸,发现 H_2 还原前后胡敏酸的三维荧光光谱有明显差异,但变化趋势相同:原态胡敏酸荧光强度明显高于还原态胡敏酸,说明胡敏酸还原过程有类似 π-π^* 化学键断开的结构变化.将对苯醌(对苯醌是胡敏酸氧化还原醌基官能团的代表化合物)还原前后与胡敏酸还原前后的荧光光谱对比,发现两组变化趋势一致,这为利用荧光特性量化腐殖质氧化还原官能团提供了基础.

Yang 等[39]量化了污泥腐殖质与不同氧化还原电位铁化合物反应的得失电子数及电子转移方向,发现还原态污泥腐殖质相较于原态电子转移数更少,这意味着在污泥胡敏酸还原过程中有氧化还原官能团的生成,例如醌基.半醌/氢醌对的氧化还原电位远高于醌/氢醌对,进一步 3DEEM 技术显示了腐殖质中醌基团还原生成半醌自由基.

除上述内容外,本实验室研究了土壤提纯 $DOMH_2$ 还原前后的三维荧光光谱.化学还原方法与三维荧光实验参数与 Yang[39]一致.标准土壤 Elliott Soil 和 Pahokee Peat Soil 提纯 DOM 原态和还原态三维荧光光谱如图 4 所示.已有研究表明,利用 3DEEM 对各种醌类化合物(如蒽醌、苯醌、萘醌)、AQDS 和 AHDS 进行扫描,确定了官能团的特征峰位置:激发波长在 200—250 nm 以及 330—400 nm 范围内代表了苯型 π-π^*,激发波长在 250—330 nm 范围内代表了醌型 π-π^*,激发波长在 400—450 nm 范围内为醌型 n-π^*.原态 ESDOM 主要 Ex/Em 出现在两个位置,分别为 270.0/435.0 nm,荧光强度为 3436;310.0/430.0 nm,荧光强度为 3391.原态 ESDOM 的荧光光谱表明醌型 π-π^* 中醌类基团的变化是影响 ESDOM 氧化还原特性的主要原因.而 H_2 还原后 ESDOM 主要的 Ex/Em 出现在 255.0/430.0 nm,荧光强度为 4052;310.0/420.0 nm,荧光强度为 4320.ESDOM 的还原态荧光光谱表明醌型 π-π^* 中醌类基团是 ESDOM 还原态的主要氧化还原官能团.与原态 ESDOM 相比,激发波长发生轻微蓝移,且荧光强度增强,这是由于醌基团还原后会导致荧光强度的增加[36].高荧光强度意味着还原态 ESDOM 中含有更多的 π-π^* 键.

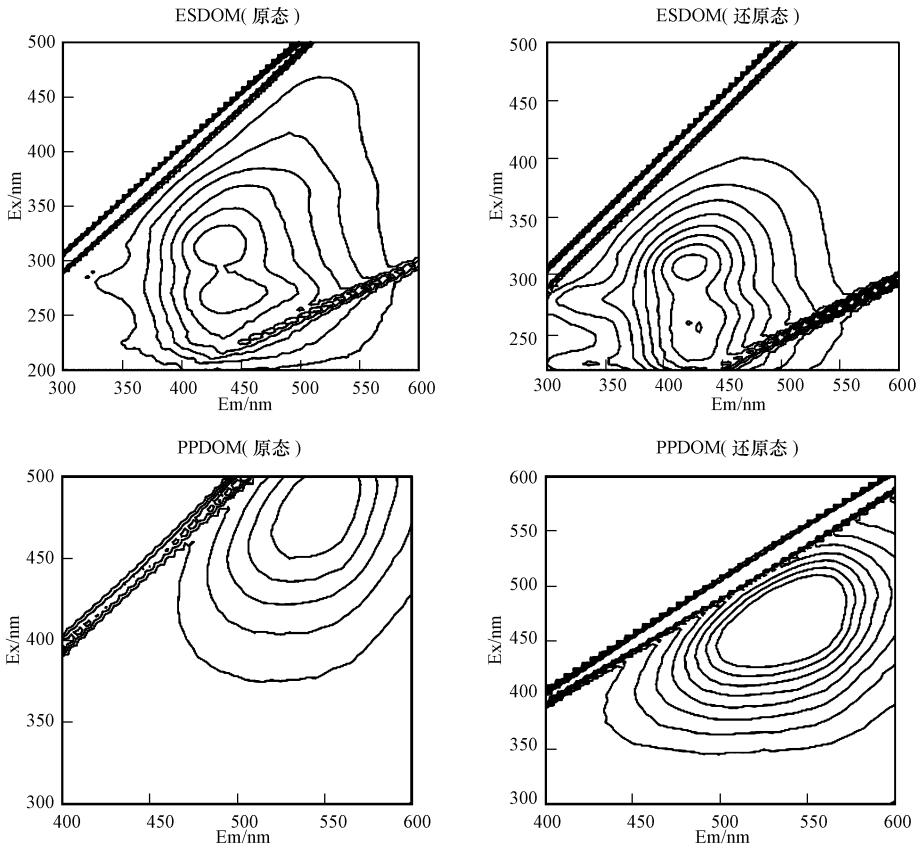

图 4 H_2还原前后土壤提纯溶解性有机物(DOM)的三维荧光光谱

Fig.4 3DEEM of dissolved organic matter (DOM) extracted from soil before and after H_2 reduction

原态 PPDOM 荧光光谱最大的 Ex/Em 出现在 485.0/550.0 nm,荧光强度为 610.8;而 H_2还原后 PPDOM 还原态 3DEEM 最大的 Ex/Em 出现在 465.0/535.0 nm,荧光强度为 572.7.这说明,原态和还原态 PPDOM 的主要氧化还原官能团均是醌型 n-π*.还原态 PPDOM 的最大激发波长出现蓝移,且荧光强度降低.这说明经过还原后 PPDOM 中官能团数量和比例发生了一定的变化.样品的荧光强度越高表明其含有越多的 π-π* 键,还原后的 PPDOM 荧光强度低于原态 PPDOM,这意味着在 PPDOM 还原过程中伴随着 π-π* 键的断裂.

2.4 核磁共振光谱法和电子自旋共振波谱法

核磁共振光谱法可直接对腐殖质的组成和结构进行分析.碳是组成腐殖质最重要的元素,因此^{13}C核磁共振谱已成为腐殖质研究中主要分析手段之一[45].腐殖质的 CP-MAS^{13}C NMR 谱图峰主要含有4 个结构带:包括脂肪碳(δ=0—45,δ 为化学位移);含氧脂肪碳(δ=45—110);芳香碳(δ=110—160);羧基碳/羰基碳(δ=160—220)[32].腐殖质具有结构特征与来源有关,存在于胡敏酸中的碳主要包括脂肪族和芳香族[46].^{13}C核磁共振光谱法发现腐殖质主要含有醌型羟基和酮型羟基、羧基、醇羟基、酚羟基等官能团[45].核磁共振应用虽广,但难以深入研究其化学基团之间的相互关系,所以核磁共振波谱的应用还有待于进一步提高.

电子自旋共振波谱应用于测定自由基和顺磁性金属离子(大多数过渡金属离子和稀土离子)及其化合物.因此电子自旋共振波谱可用于对腐殖质分子中自由基以及顺磁性金属离子的研究[47].腐殖质中其主要的氧化还原官能团为醌基,在氧化还原过程中产生丰富的自由基[48-49],在微生物电子转移过程中扮演重要的作用.已有的研究表明,腐殖质的微生物还原过程产生半醌自由基,改变氧化还原电位进而促进腐殖质氧化还原能力增大[6].Jiang 等[13]利用 AQDS 在与砷氧化物发生氧化还原过程监测到氧化还原电位改变,进一步检测到半醌自由基的生成. 特定的化学计量学方法可量化腐殖质的氧化还原能力并结合电子自旋共振波谱捕捉并量化在还原过程中生成的醌自由基量可建立腐殖质分子结构和化学反应

之间的关系.

3　电化学法 (Electrochemical methods)

电化学法测定胡敏酸官能团是近年新兴研究方法.在电化学研究中,评估腐殖质的电子转移能力和官能团的电化学方法包括循环伏安法、直接电化学还原与介导电势测定法等方法.电化学方法以电极作为电子供体或受体来替代化学方法中的氧化剂或还原剂.

3.1　循环伏安法 (Cyclic voltammetry, CV)

Nurmi 和 Tratnyek[50] 采用循环伏安法研究了 NOM 和 6 种醌类模型化合物的氧化还原性质.实验发现 Georgetown NOM 含有大量的酚基,并且醌类模型化合物与 NOM 循环伏安曲线形状相似,这与醌类化合物是 NOM 主要氧化还原活性基团的观点一致.且腐殖质的电子接受能力与醌基含量呈正相关关系.Fimmen 等[51] 通过直接扫描伏安法发现,陆源富里酸和微生物来源富里酸具有非常相似的电化学性能.此外,酚羟基基团在所有 DOM 样品中均被检测到,证明了酚羟基是 DOM 氧化还原活性基团,它们中包含一些氮和硫基团.实验观察到的氧化还原电位与胡桃醌类似,这与具有重叠还原氧化电位的羟基取代芳香族化合物异构体混合物为 DOM 氧化还原活性官能团概念模型一致.

3.2　直接电化学还原法(Direct electrochemical reduction, DER)

直接电化学还原是以玻碳电极等为工作电极(Working electrode),在恒定电位下,通过计时库仑法测量电极与腐殖质间的电子转移量.Kappler 等[52] 通过电化学还原对比了合成胡敏酸、水源胡敏酸、商业胡敏酸和陆源胡敏酸氧化还原特性,结果表明商业胡敏酸还原能力最差,合成胡敏酸最强,这是因为商业胡敏酸含有较少的氧化还原官能团,合成胡敏酸含有较多的氢醌.此外,还发现在好氧环境中存在的胡敏酸仍具有明显的还原能力.Aeschbacher 等[5] 采用直接电化学还原和介导电势法两种电化学方法评估腐殖质氧化还原特性.实验结果表明,逐渐降低的 LHA E_h 表明 LHA 含有氧化还原活性官能团,具有广阔的氧化还原电位分布,并落在苯醌、萘醌、蒽醌等氧化还原电位范围内,这与假设在 LHA 中,醌类化合物作为 LHA 主要氧化还原活性官能团相一致.

3.3　介导电势测定法(Mediated potentiometry, MP)

介导电势测定法包括介导的电化学还原(Mediated electrochemical reduction, MER)和电化学氧化(Mediated electrochemical oxidation, MEO),是指在恒定电位下,通过加入电子穿梭体来间接测定腐殖质接受或供给电子的容量.Aeschbacher 等[53] 通过介导电势测定法等电化学方法证明,胡敏酸中质子平衡减少部分与还原电位的变化支持醌基作为胡敏酸中主要电子受体这一理论.同时,陆源腐殖质中还原基团具有较大的氧化还原电位(E_h)范围,比水陆混合腐殖质达到的 E_h 值更低.随后,Aeschbacher 等[54] 选取 2,2′-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)作为电子传递介质,继续应用 CV 和 MEO 等电化学方法量化了陆源和水生腐殖质的供电子能力.实验结果表明,与陆源腐殖质相比,水生腐殖质供电子能力较强且得电子能力较弱.此外,腐殖质含有大量氧化后释放质子并发生不可逆后续反应的基团.在给定的 pH 和 E_h 范围内,腐殖质的供电子能力与酚含量有密切关系,而且具有抗氧化性的酚基会减缓腐殖质和 NOM 其他基团的氧化转化,这表明了酚基是腐殖质主要供电子基团.此外,他们认为酚基转移到醌基的供电子率可以某种程度上代表腐殖质在环境中的氧化转化.Klüpfel 等[55] 用介导电势测定法测量了不同的腐殖质的电子转移能力,发现腐殖质的电子转移能力与其芳香性呈正相关.

4　结论(Conclusion)

腐殖质结构复杂,目前对于腐殖质官能团的探究主要关注于其含量及种类的确定,但对于腐殖质的分子结构与官能团的量化及其化学性质(如氧化还原能力)之间的联系仍需进一步研究.腐殖质是非均质的有机物,其分子结构的不同影响氧化还原官能团的分布,氧化还原电位范围进而导致其表现不同的氧化还原能力大小.腐殖质周围环境(如温度、pH 等)及自身(腐殖质分子量的不同)的变化也会造成腐殖质分子氧化还原官能团种类和数量的变化,因此氧化还原官能团的研究要考虑其存在的土壤环境并与其化学性质结合深入探究对于全面了解腐殖质的结构具有现实意义.此外,目前腐殖质氧化还原官能团的测定方法都存在一定的弊端,每种检测方法存在一定的差异,缺乏对比性.实验室测定包括微生物

还原、化学还原、电化学还原能够准确量化腐殖质的氧化还原能力,全面了解特定腐殖质的氧化还原电位分布范围,借助光谱学技术分析腐殖质的氧化还原官能团可以完善对其氧化还原官能(基)团的研究.如红外 3400 cm^{-1}附近代表酚羟基,紫外光区 240 cm^{-1}及可见光区 280 cm^{-1}的强吸收代表苯羧基和酚基结构的不同电子跃迁形式三维荧光检测还原过程中的醌类 π 类荧光跃迁完善特征氧化还原官能团的变动;电子自旋光谱可捕捉和量化还原过程中产生的半醌自由基,明确还原过程中的氧化还原电位的改变.将光谱法与实验室测定方法结合有利于建立氧化还原能力及氧化还原官能团之间的关系,及全面了解氧化还原过程机制,是未来探究腐殖质氧化还原活性及官能团的发展方向.

参考文献(Reference)

[1] BRADLEY P M, CHAPELLE F H, LOVLEY D R. Humic acids as electron acceptors for anaerobic microbial oxidation of vinyl chloride and dichloroethene[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(8): 3102-3105.

[2] STEVENSON F J. Humus chemistry: Genesis, composition, reactions[M]. 2nd Edition. New York: Wiley, 1994:17.

[3] 窦森. 土壤有机质[M]. 北京:高等教育出版社, 2010: 149-151.
DOU S. Soil organic matter[M]. Beijing: Higher Education Press, 2010: 149-151 (in Chinese).

[4] SERUDO R L, OLIVEIRA L C, ROCHA J C, et al. Reduction capability of soil humic substances from the rio negro basin, brazil, towards Hg(Ⅱ) studied by a multimethod approach and principal component analysis (PCA)[J]. Geoderma, 2007, 138(3-4): 229-236.

[5] AESCHBACHER M, SANDER M, SCHWARZENBACH R P. Novel Electrochemical approach to assess the redox properties of humic substances[J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44(1): 87-93.

[6] SCOTT D T, MCKNIGHT D M, BLUNT-HARRIS E L, et al. Quinone moieties act as electron acceptors in the reduction of humic substances by humics-reducing microorganisms[J]. Environmental Science & Technology, 1998, 32(19): 2984-2989.

[7] RITCHIE J D, PERDUE E M. Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter[J]. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 2003, 67(1):85-96.

[8] CHEN J, GU B H, ROYER R A, et al. The roles of natural organic matter in chemical and microbial reduction of ferric iron[J]. Science of the Total Environment, 2003, 307(1-3): 167-178.

[9] NOPAWAN R, NANNY M A. Characterization and quantification of reversible redox sites in humic substances[J]. Environmental Science & Technology, 2007, 41(22): 7844-7850.

[10] 姜杰, 杨浈, 任谦, 等. 土壤腐殖质氧化还原电位及其相应电子转移能力分布[J]. 环境化学, 2015, 34(2):219-224.
JIANG J, YANG Z, REN Q, et al. Distribution of soil humic acids redox potentials and corresponding electron transfer amounts[J]. Environmental Chemistry, 2015, 34(2): 219-224 (in Chinese).

[11] LOVLEY D R, COATES J D, BLUNT-HARRIS E L, et al. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration[J]. Nature, 1996, 382(6590): 445-448.

[12] JIANG J AND KAPPLER A. Kinetics of microbial and chemical reduction of humic substances: Implications for electron shuttling[J]. Environmental Science & Technology, 2008, 42(10): 3563-3569.

[13] JIANG J, BAUER I, PAUL A, et al. Arsenic redox changes by microbially and chemically formed semiquinone radicals and hydroquinones in a humic substance model quinone[J]. Environmental Science & Technology, 2009, 43(10): 3639-3645.

[14] FREDRICKSON J K, ROMINE M F, BELIAEV A S, et al. Towards environmental systems biology of *Shewanella* [J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(8): 592-603.

[15] BELIAEV A S, SAFFARINI D A. *Shewanella putrefaciens mtrB* encodes an outer membrane protein required for Fe (Ⅲ) and Mn (Ⅳ) reduction [J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(23): 6292-6297.

[16] YANG Y, CHEN J, QIU D, et al. Roles of *UndA* and *MtrC* of *Shewanella putrefaciens* W3-18-1 in iron reduction[J]. Bmc Microbiology, 2013, 13(1): 496-498.

[17] MYERS J M, MYERS C R. Role of the tetraheme cytochrome *CymA* in anaerobic electron transport in cells of *Shewanella putrefaciens* MR-1 with normal levels of menaquinone [J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(1): 67-75.

[18] RODEN E, KAPPLER A, BAUER L, et al. Extracellular electron transfer through microbial reduction of solid-phase humic substances [J]. Nature Geoscience, 2010, 74(12): 417-421.

[19] LIES D P, HERNANDEZ M E, KAPPLER A, et al. *Shewanella oneidensis* MR-1 uses overlapping pathways for iron reduction at a distance and by direct contact under conditions relevant for biofilms[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(8): 4414-4426.

[20] SUYAMA A, SERA N, IWAKIRI R, et al. Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy[J]. Soil Science, 1991, 152(4):259-271.

[21] 夏玉宇. 化验员实用手册(第 2 版) [M]. 北京:化学工业出版社, 2010: 678-679.

[22] 王波, 刘德军, 姚军, 等. 泥炭土中腐殖酸的提纯和表征研究[J]. 辐射防护, 2009, 29(3): 172-179.
WANG B, LIU D J, YAO J, et al. Isolation and characterization of humic acids from peat soil[J]. Radiation Protection, 2009, 29(3):

172-179 (in Chinese).

[23] 张军政,杨谦,席北斗,等. 垃圾填埋渗滤液溶解性有机物组分的光谱学特性研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(11): 2583-2587.
ZHANG J Z, YANG Q, XI B D, et al. Study on spectral characteristic of dissolved organic matter fractions extracted from municipal solid waste landfill leachate[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2008, 28(11): 2583-2587 (in Chinese).

[24] 刘新超, 李俊, 谢丽,等. 腐殖酸表征方法研究进展[J]. 净水技术, 2009, 28(3):6-9.
LIU X C, LI J, XIE L, et al. Characterization methods of humic acid: A review[J]. Water Purification Technology, 2009, 28(3):6-9 (in Chinese).

[25] 丁鑫, 杨浈, 姜杰. 风化褐煤腐殖酸氧化还原能力与紫外吸收光谱研究[EB/OL]. [2015-12-18]. 北京:中国科技论文在线, 2015, http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201512-982.
DING X, YANG Z, JIANG J. Study on redox property and ultraviolet absorption spectra of Leonardite Standard Humic Acid [EB/OL]. [2015-12-18]. Beijing: Sciencepaper Online, 2015 (in Chinese). http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201512-982 (in Chinese).

[26] 何海军, 瞿文川, 钱君龙. 湖泊沉积物中腐殖酸的紫外-可见分光光度法测定[J]. 分析测试技术与仪器, 1996, 2(1): 14-18.
HE H J, QU W C, QIAN J L. Determination of humic acid in lake sediment by UV-VIS absorbance spectrophotometer[J]. Analysis and Testing Technology and Instruments, 1996, 2(1): 14-18 (in Chinese).

[27] TESAR M, PRANTL R, LECHNER P. Application of FTIR for assessment of the biological stability of landfilled municipal solid waste (MSW) during in situ aeration[J]. Journal of Environmental Monitoring, 2007, 9(1):111-120.

[28] TINTNER J, SMIDT E, BOHMB K, et al. Risk assessment of an old landfill regarding the potential of gaseous emissions-A case study based on bioindication, FT-IR spectroscopy and thermal analysis[J]. Waste Management, 2012, 32(12):2418-2425.

[29] 胡学斌,吉芳英,黎司,等. 三峡库区土壤腐殖质的振动光谱研究[J].光谱学与光谱分析,2010,30(5):1376-1380.
HU X B, JI F Y, LI S, et al. Study of vibrational spectra of humic substance in soils from the Gorges Reservoir Area[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2010, 30(5):1376-1380 (in Chinese).

[30] 易芬. 土壤腐殖酸促进电子转移参数研究及其官能团探讨[D]. 北京:中国地质大学(北京), 2015.
YI F. Investigation on soil humic acids electron transfer coefficient and their functional groups [D]. Beijing: China University of Geosciences (Beijing), 2015 (in Chinese).

[31] COBLE P G. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy [J]. Marine Chemistry,1996, 51(4): 325-346.

[32] 张彩华. 光谱法在腐殖质研究中的应用进展[J]. 光谱实验室, 2011, 28(2): 693-696.
ZHANG C H. Advance of application of spectroscopy in humic substance[J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 2011, 28(2): 693-696 (in Chinese).

[33] BEALE D J, PORTER N A, RODDICK F A. The interaction between natural organic matter in raw waters and pesticide residues: A three dimensional excitation-emission matrix (3DEEM) fluorescence investigation[J].Water Science & Technology,2013,67(11):2428-2436.

[34] DATTA C, GHOSH K, MUKHERJEE S K. Fluorescence excitation spectra of different fractions of humus[J]. Journal- Indian Chemical Society, 1971, 48: 279-287.

[35] KLAPPER L, MCKNIGHT D M, FULTON J R, et al. Fulvic acid oxidation state detection using fluorescence spectroscopy [J]. Environmental Science & Technology, 2002, 36(14):3170-3175.

[36] CORY R M, MCKNIGHT D M. Fluorescence spectroscopy reveals ubiquitous presence of oxidized and reduced quinones in dissolved organic matter[J].Environmental Science & Technology, 2005, 39(21):8142-8149.

[37] MACALADY D L, WALTON-DAY K. New light on a aark subject: On the use of fluorescence data to deduce redox states of natural organic matter (NOM)[J]. Aquatic Sciences, 2009, 71(2):135-143.

[38] 姜杰, 李黎, 孙国新. 基于三维荧光光谱特征研究土壤腐殖质氧化还原特性[J].环境化学, 2012, 31(12):2002-2007.
JIANG J, LI L, SUN G X. Investigation of redox activities of soil humic acids using 3D excitation emission matrix fluorescence spectroscopy [J]. Environmental Chemistry, 2012, 31(12):2002-2007 (in Chinese).

[39] YANG Z, DU M C, JIANG J. Reducing capacities and redox potentials of humic substances extracted from sewage sludge [J]. Chemosphere, 2015, 144: 902-908.

[40] 席北斗, 魏自民, 赵越, 等. 垃圾渗滤液水溶性有机物荧光谱特性研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(11):2605-2608.
XI B D, WEI Z M, ZHAO Y, et al. Study on fluorescence characteristic of dissolved organic matter from municipal solid waste landfill leachate. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2008, 28(11): 2605-2608.

[41] HUDSON N, BAKER A, WARDB D, et al. Can fluorescence spectrometry be used as a surrogate for the Biochemical Oxygen Demand (BOD) test in water quality assessment? An example from South West England[J]. Science of The Total Environment, 2008, 391(1): 149-158.

[42] BAKER A, CURRY M. Fluorescence of leachates from three contrasting landfills[J]. Water Research, 2004, 38(10): 2605-2613.

[43] MCKNIGHT D M, BOYER E W, WESTERHOFF P K, et al. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication

of precursor organic materi-als and aromaticity[J]. Limnology & Oceanography, 2001, 46(1): 38-48.

[44] WU F, TANOUE E. Isolation and partial characterization of dissolved copper-complexing ligands in streamwaters[J]. Environmental Science & Technology,2001, 35(18): 3646-3652.

[45] 李文芳,卜晓英,黄美娥,等. 土壤腐殖质的降解及其结构[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(3): 494-495.
LI W F, BU X Y, HUANG M E, et al. Elementary exploration of separation, extraction and structural analysis of soil humus[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2005, 33(3): 494-495 (in Chinese).

[46] THORN K A, ARTERBURN J B, MIKITA M A. Nitrogen-15 and carbon-13 NMR investigation of hydroxylamine-derivatized humic substances[J]. Environmental Science & Technology, 1992, 26(1): 107-116.

[47] SENESI N. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals: Part Ⅱ. The fluorescence spectroscopy approach [J]. Analytica Chimica Acta, 1990, 232: 77-106.

[48] WILSON S A, WEBER J H. Electron spin resonance analysis of semiquinone free radicals of aquatic and soil fulvic and humic acids[J]. Analytical Letters, 1977, 10(1): 75-84.

[49] SENESI N, SCHNITZER M. Effects of pH, reaction time, chemical reduction and irradiation on ESR spectra of fulvic acid[J]. Soil Science, 1977, 123(4): 224-234.

[50] NURMI J T, TRATNYEK P G. Electrochemical properties of natural organic matter (NOM), fractions of NOM, and model biogeochemical electron shuttles[J]. Environmental Science & Technology, 2002, 36(4):617-624.

[51] FIMMEN R L, CORY R M, CHIN Y P, et al. Probing the oxidation-reduction properties of terrestrially and microbially derived dissolved organic matter[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2007, 71(12):3003-3015.

[52] KAPPLER A, HADERLEIN S B. Natural organic matter as reductant for chlorinated aliphatic pollutants[J]. Environmental Science & Technology, 2003, 37(12): 2714-2719.

[53] AESCHBACHER M, VERGARI D, SCHWARZENBACH R P, et al. Electrochemical analysis of proton and electron transfer equilibria of the reducible moieties in humic acids[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(19):8385-8394.

[54] AESCHBACHER M, GRAF C, SCHWARZENBACH R P, et al. Electrochemical analysis of proton and electron transfer equilibria of the reducible moieties in humic acids[J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(9):4916-4925.

[55] KLÜPFEL L, PIEPENBROCK A, KAPPLER A, et al. Humic substances as fully regenerable electron acceptors in recurrently anoxic environments [J]. Nature Geoscience, 2014, 7 (3): 195-200.