

水解-氧化法制备甘蔗叶生物质腐植酸

马欣宏, 王磊, 刘金磊, 陈海珊, 李典鹏, 海洪

引用本文:

马欣宏, 王磊, 刘金磊, 陈海珊, 李典鹏, 海洪. 水解-氧化法制备甘蔗叶生物质腐植酸[J]. *农业环境科学学报*, 2024, 43(1): 174-182.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2023-0467>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

AQDS和腐植酸对微生物介导铁还原过程的影响

牛丹妮, 弓晓峰, 李远航, 孙玉恒, 舒瑶, 曾慧卿

农业环境科学学报. 2021, 40(12): 2733-2741 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0502>

冻融循环对猪粪粒径及有机质变化的影响

胡柏杨, 蒋林树, 李艳霞, 陈兴财, 安思羽

农业环境科学学报. 2021, 40(1): 219-226 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0874>

C/M值对腐植酸-高岭土复合体形成机制及吸附特性影响

彭流月, 何江涛, 王菲

农业环境科学学报. 2018, 37(9): 1994-2004 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0028>

利用白腐菌与改性活性炭处置铀富集黑麦草残渣

田甲, 王莉, 陈晓明, 张祥辉, 戚鑫, 肖诗琦, 敬路准, 晏婷婷, 罗学刚

农业环境科学学报. 2018, 37(8): 1775-1784 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0270>

甘蔗渣碳源释放规律及其硫酸盐还原菌利用性试验

狄军贞, 李拓达, 赵微

农业环境科学学报. 2019, 38(5): 1151-1157 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0994>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

马欣宏, 王磊, 刘金磊, 等. 水解-氧化法制备甘蔗叶生物质腐植酸[J]. 农业环境科学学报, 2024, 43(1): 174-182.

MA X H, WANG L, LIU J L, et al. Preparation of humic acid from sugarcane leaf biomass using a hydrolysis-oxidation method[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2024, 43(1): 174-182.



开放科学 OSID

水解-氧化法制备甘蔗叶生物质腐植酸

马欣宏^{1,2}, 王磊^{2*}, 刘金磊², 陈海珊², 李典鹏², 海洪¹

(1. 桂林理工大学化学与生物工程学院, 广西 桂林 541006; 2. 广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西 桂林 541006)

摘要:本研究以甘蔗叶为原料,通过设计模拟矿源腐植酸形成过程中的化学反应,研究将甘蔗叶转化为腐植酸的技术,并将实验室制得的腐植酸与矿源腐植酸和木质素进行比较研究。制备过程:首先进行酸水解反应,将其中的纤维素和半纤维素水解为可溶解的水解糖,将木质素转化为不溶的腐植酸前体,固液分离;然后用氧化剂对腐植酸前体进行氧化反应,重新生成亲水性的羧基基团,完成腐植酸的制备。实验结果表明,水解反应步骤时,在固定 20:50(g:mL)固液比的条件下,最佳的反应条件为:10%的硫酸和1%的硝酸组成的水解液,在150℃的温度下,水解3h;氧化步骤中,腐植酸前体以1:13(g:mL)的固液比与3.5%的硝酸在80℃的温度下反应2h。经元素分析、酸性基团分析、紫外和红外光谱以及核磁共振波谱等一系列分析手段,证实制备的蔗叶生物质腐植酸有较高的腐殖化和芳香化程度,其各项指标均接近于矿源腐植酸。该方法能成功制备腐植酸,同时利用产生的水解糖还具备与多种现有生物质产业相结合的潜在可能,以解决其水解残渣的问题。

关键词:腐植酸;甘蔗叶;秸秆;有机肥;制备;表征

中图分类号:S216.2 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2024)01-0174-09 doi:10.11654/jaes.2023-0467

Preparation of humic acid from sugarcane leaf biomass using a hydrolysis-oxidation method

MA Xinhong^{1,2}, WANG Lei^{2*}, LIU Jinlei², CHEN Haishan², LI Dianpeng², HAI Hong¹

(1. College of Chemistry and Bioengineering, Guilin University of Technology, Guilin 541006, China; 2. Guangxi Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin 541006, China)

Abstract: Humic acid was prepared from sugarcane leaves by simulating the chemical reactions used to form mineral derived humic acid. A study of the comparative efficacy of humic acid preparation from mineral substrates and lignin was performed. Acid hydrolysis, in which cellulose and hemicellulose were hydrolyzed into soluble sugars and lignin was converted into an insoluble humic acid precursor was conducted first, followed by solid-liquid separation. An oxidant was then used to oxidize the humic acid precursor, and the hydrophilic carboxyl group was regenerated to complete the preparation of humic acid. Based on our results, when the solid-liquid ratio was fixed at 20:50 (g:mL) during hydrolysis, the best reaction conditions were: 150 °C for 3 h, 10% sulfuric acid, and 1% nitric acid. The best oxidation step reaction conditions were: humic acid precursor reacted with 3.5% nitric acid at a solid-liquid ratio of 1:13 (g:mL) for 2 h at 80 °C. A series of analytical methods including elemental analysis, acid group analysis, UV, IR, and NMR confirmed that the humic acid prepared from sugarcane leaf exhibited a high degree of humification and aromatization, and its various indicators were close to those of mineral source humic acid. This method can successfully prepare humic acid, and utilizing the generated hydrolyzed sugars also has potential within various existing biomass industries to solve the problem of hydrolyzed residues.

Keywords: humic acid; sugarcane leave; straw; organic fertilizer; preparation; characterization

收稿日期:2023-06-14 录用日期:2023-10-07

作者简介:马欣宏(1997—),男,浙江嘉兴人,硕士研究生,从事生物质利用研究。E-mail:654260245@qq.com

*通信作者:王磊 E-mail:ww8304@126.com

基金项目:广西科技重大专项(桂科AA22117013);桂林市创新平台和人才计划(20210102-3);广西植物研究所基本业务费支持项目(桂植业22009)

Project supported: Guangxi Science and Technology Major Special Project (GuikeAA22117013); Guilin Innovation Platform and Talent Plan (20210102-3); Basic Research Business Foundation of Guangxi Institute of Botany (Guizhiye22009)

甘蔗是禾本科甘蔗属多年生草本植物,是世界上重要的糖料作物,对于我国的制糖业也有举足轻重的地位^[1-2],甘蔗产业在我国主要提供了蔗糖和蔗渣造纸两大主要产品,从资源利用的角度出发甘蔗产业尚难以利用的大宗副产物主要是甘蔗叶。甘蔗在收获时,甘蔗叶被遗弃在农田里,由于冬春季节气温低降解慢再加上禁烧令,导致如何处理甘蔗叶成为了甘蔗收获后棘手的问题。甘蔗叶与我国每年产生的其他7亿t^[3]农作物秸秆一样面临高附加应用缺乏、难以形成有效经济循环的困境,导致企业参与积极性较低,造成违规焚烧秸秆现象屡禁不止。

腐植酸是腐殖质的一种,在自然界中广泛存在,含有羧基、酚羟基、甲氧基、醌基等官能团,而且拥有较大的比表面积,能络合水中的重金属^[4-6]。此外,腐植酸钾、腐植酸铵等腐植酸肥料在补充有机肥的同时相较于传统化肥能有效减少氨气挥发提升化肥利用率^[7-8]。由于来源和生产方式不同,腐植酸的化学结构极其复杂,一般认为其是一类由芳香族、脂肪族及多种官能团组成的无定型有机弱酸混合物^[9]。市面上销售的腐植酸产品主要从泥炭、褐煤等煤炭形成早中期阶段的低级别煤炭中提取^[10-11],即所谓的矿源腐植酸,我国煤中腐植酸资源较为丰富,原生腐植酸含量为10%~80%^[12-13]。常见的另一主要来源是将植物性材料通过生物发酵的方法降解后由其中的木质素转化而来^[14-15],但这种方法制备的腐植酸腐殖化程度较低,通常作为发酵有机肥的一部分而非单独提取使用。

目前以非发酵的方法从植物体直接制备腐植酸的报道较少,例如Wang等^[16]用双氧水氧化生物燃料前处理的碱提取液(主要溶解木质素)制备腐植酸,该方案有工业化潜力但仅能作为特定行业的配套技术。Yang等^[17]用碱水热法将秸秆制备成腐植酸,该方法为腐植酸单一产品,还需要进一步考察产业化模式。Liu等^[18]报道的方法是在分级多孔碳超级电容器材料制备过程中,原料棉秆粉末在氮气氛围下制备前驱体后,在超声条件下用双氧水和氢氧化钾水溶液提取腐植酸钾,该方案将腐植酸和电容碳工艺相结合有可能存在两个产品市场容量不匹配的潜在问题。为了解决甘蔗叶难以处理的棘手问题,也为了探索一种具有潜在应用价值的生物质开发模式,本研究借鉴矿源腐植酸由植物体到腐植酸的形成过程,提出利用酸水解再氧化的方法制备腐植酸。在酸水解的条件下,秸秆纤维中的纤维素和半纤维素均能被水解为可溶的单糖及其降解产物,而木质素会发生一系列的反应,包

括但不限于:木质素上苄醇结构的 α -羟基亚甲基(α -CHOH-)与包括酚的邻、对位在内的其他活性位点的缩合反应;醇羟基的脱水及羧基的脱羧反应;酯基的水解反应;某些烷基醚的断裂、重排;新生成的不饱和和烃的一系列加成、缩合等反应;整体的反应方向趋向于脱氧、脱氢与芳环化,与植物体在自然界中腐殖化的方向大致相同^[19]。水解形成的固体腐植酸前体与纤维素和半纤维素降解的可溶性产物经固液分离后,再由氧化剂适当氧化形成新的羧基基团即可制备出酸性及中性条件不溶而碱性可溶,具备大量芳香基团和羧基的生物质腐植酸。而第一步分离的水解液经电渗析回收酸后,其中的水解糖仍然可以作为进一步生产其他化工产品的原料,工艺稍加改进有可能与氨基酸、苹果酸、木糖、糠醛等多种工业相结合,解决其生产中形成的残渣问题。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

甘蔗叶采集于桂林市农业科学研究中心试验田,市售矿源腐植酸来源于山东绿陇生物科技有限公司,纯水来源于杭州娃哈哈集团有限公司,95%~98%浓硫酸、 $\geq 96\%$ 氢氧化钠、 $\geq 85\%$ 氢氧化钾、36%~38%浓盐酸、65%~68%浓硝酸、85%磷酸、 $\geq 99.5\%$ 乙醇来源于四川西陇科学有限公司,99.9% D_2O 、99.5%NaOD来源于Sigma-Aldrich,99.9%DMSO来源于安诺伦(北京)生物科技有限公司,木聚糖酶AU-PE89来源于山东苏柯汉生物工程股份有限公司。

1.2 甘蔗叶水解

将干燥的甘蔗叶剪成小段后塞入反应釜并加入下文所述的酸液50 mL,由于甘蔗叶蓬松的特质,为提高反应釜利用率和降低单位能耗,所有试验均使用反应釜最大容积(100 mL),采用固定固液比20:50(g: mL)。将反应釜置于恒温中水解,水解3 h后取出反应釜冷却至室温,抽滤水解后的固液混合物并用水洗涤固体至中性,滤渣(腐植酸前体)和滤液分别进行后续操作。其中温度、浓度等变量先大范围粗选确定较优的范围,经过筛选,使用磷酸进行水解时,温度范围为170~200 $^{\circ}C$,每隔10 $^{\circ}C$ 设置一组,磷酸浓度为10%~25%,每隔5%设置一组,再在该范围内每个处理重复3次试验获得试验数据。使用硫酸体系进行水解时,温度范围为140~170 $^{\circ}C$,每隔10 $^{\circ}C$ 设置一组,硫酸浓度分别为5%、10%、15%和17.5%,在对10%的硫酸进行水解试验时,酸液中额外添加1%硝酸进行试

验,上述每个处理重复3次试验获得试验数据。

1.3 腐植酸前体的氧化

上一步获得的腐植酸前体用水分仪测定含水量,根据含水量计算所需浓度和体积的氧化剂,使硝酸或双氧水达到所需浓度,不经干燥直接加入氧化剂水溶液,水浴加热进行氧化。其中浓度、固液比、温度和时间等变量先大范围粗选确定较优的范围,之后该范围内每个处理重复3次试验获得试验数据。在使用双氧水氧化时,温度设置为60~90℃,每隔10℃设置一组,固液比筛选范围为1:11、1:13和1:15(g:mL),时间为2、3、4 h,双氧水浓度控制为2%、5%、10%、20%和30%。使用硝酸进行氧化时,首先对固液比和硝酸浓度进行试验,固液比筛选范围为1:11、1:13和1:15(g:mL),硝酸浓度为1%、2%、3%、3.5%和4%。之后确定最佳温度和反应时间,温度范围为50~90℃,每隔10℃设置一组,反应时间为0.5、1、2、3、4、5 h。

反应完成后,均按照如下步骤继续操作:加入20 g·L⁻¹的NaOH溶液100 mL溶解生成的腐植酸,提高水浴温度至沸腾并保持30 min。待降温后过滤反应液并用水洗涤至中性,合并滤液,滤液滴加盐酸酸化至pH约为1,生成大量沉淀并过滤,清水洗涤至中性后烘干即为腐植酸。

1.4 木质素的制备

蔗叶用8%的NaOH溶液浸泡24 h后90℃水浴加热2 h,过滤后清水洗涤2次,合并滤液加酸调节pH=3,过滤并水洗沉淀至中性,将沉淀均匀分散于pH为8的H₃PO₄-NaOH缓冲液中,加入木聚糖酶并50℃下保温4 h,再次过滤脱除木糖和低聚木糖,滤渣加入NaOH溶解,25℃下离心(3 265 g 10 min,去除可能包结在木质素内部的少量木聚糖),取上清液加2 mol·L⁻¹盐酸调节pH<3,产生大量沉淀,过滤沉淀并用水水洗至中性,干燥得木质素。

1.5 检测方法

1.5.1 腐植酸含量的测定

取1 g制备得到的腐植酸样品,加入20 g·L⁻¹的NaOH溶液100 mL,100℃水浴加热30 min,降至室温后过滤,用水洗涤至滤液无色,将液体部分加入盐酸酸化析出腐植酸,用烘至质量恒定的定量滤纸过滤,用水洗涤,称量得到腐植酸质量(参考国家标准:农业用腐植酸钾GB/T 33804—2017)。

1.5.2 总酸基的测定

采用氢氧化钡法测定腐植酸中的总酸基^[20]。准

确称量0.25 g腐植酸样品,加入100 mL容量瓶中,加入0.05 mol·L⁻¹的Ba(OH)₂溶液定容,加热搅拌1.5 h后静置至室温。

用移液管量取10 mL上清液置于锥形瓶中,加入15 mL的0.1 mol·L⁻¹盐酸,滴加三滴酚酞试剂,用0.1 mol·L⁻¹的标准NaOH溶液滴定至溶液变粉色。同时做空白实验。

$$\text{总酸基}(\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1})=\frac{(V-V_0)M}{G}F$$

式中: V 为滴定所消耗的氢氧化钠体积,mL; V_0 为空白组滴定所消耗的氢氧化钠体积,mL; M 为氢氧化钠标准液浓度,mol·L⁻¹; G 为样品质量,g; F 为氢氧化钡总体积与提取的体积之比。

1.5.3 总羧基的测定

准确称量0.25 g腐植酸样品,加入100 mL容量瓶中,加入0.25 mol·L⁻¹醋酸钙溶液定容,加热搅拌1.5 h后静置至室温^[21]。用移液管取10 mL上清液置于锥形瓶中,加入三滴酚酞试剂,用0.1 mol·L⁻¹的标准氢氧化钠溶液滴定至溶液变粉色。通过计算滴定终点时消耗氢氧化钠的体积来得到总羧基的含量。

1.5.4 总酚羟基的测定

$$\text{总酚羟基}=\text{总酸基}-\text{总羧基}$$

1.5.5 水解液中单糖的测定

水解液中加入NaOH中和至中性,蒸干溶剂后取样进行分析。样品加一定体积的水溶解,再加入无水乙醇,使乙醇浓度为75%,待样品中的盐充分析出后过滤,用75%乙醇洗涤,滤液合并后再次旋干得到糖类粗提物,取样用水溶解后经高效液相色谱检测其中的葡萄糖和木糖含量^[22]。

色谱条件为:柱压2.7 MPa,柱温60℃,流动相0.005 mol·L⁻¹的硫酸溶液。色谱柱为Carbomix H-NP5:8%(赛分科技有限公司)。

1.6 数据处理

实验数据均重复3组,数据采用Excel整理和计算,Origin2021软件绘图,红外光谱用OMNIC软件分析,核磁共振波谱用MestReNova分析,显著性差异用Graphpad Pism分析。

2 结果与讨论

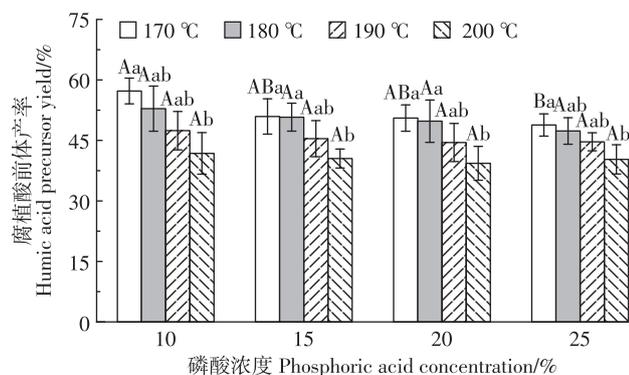
2.1 甘蔗叶制备腐植酸前体

酸水解的目的是将纤维素和半纤维素水解成可溶解的单糖与木质素形成的腐植酸前体分离,主要考察了磷酸、硫酸和硫酸+硝酸组合对水解反应的影响

响,常用强酸中盐酸因为对钢材有较强的腐蚀能力,不作为未来工业应用的候选而被排除。由于木质素在甘蔗叶中占比低于30%^[23],因此酸水解试验的主要考察指标被设定为腐植酸前体的产率越低且越接近30%为好,次要的指标则是水解液中单糖的含量。

图1是以不同浓度和温度的磷酸水溶液对甘蔗叶进行水解后腐植酸前体的产率。在相同的磷酸浓度时,各组都表现出随温度提升而产率下降的趋势,而相同温度下高的磷酸浓度也表现出了更高的水解率,直至190℃和200℃组15%~25%的磷酸浓度差别不再明显。更多的试验表明在25%及以下的磷酸浓度条件下,继续提高温度对水解率的影响已经较小,最优的腐植酸前体产率只能维持在40%~43%。

由于磷酸水解的温度和浓度均较高,故进一步试验了硫酸水解的影响。如图2所示。与磷酸不同,用硫酸水解并未出现随浓度升高而腐植酸前体产率单边下降的趋势,随着硫酸浓度升高到10%水解所剩固体最少,之后随着浓度进一步升高剩余的不溶性固体反而增加。推测这是由于硫酸强烈的脱水能力导致纤维素和半纤维素在水解反应之外大量出现了糖羟基脱水芳环化甚至碳化的反应,从而导致水不溶性固体不减反增。虽然硫酸水解能够降低对温度的要求,但10%硫酸150℃的最优条件腐植酸前体产率也仅为47.5%,与30%的理论值仍相去甚远。鉴于反应产物中仍能看到明显的纤维状残渣,分析在水解反应时由于纤维素的结晶形态导致酸水解难以彻底,因此在酸溶液的基础上添加氧化剂帮助提高水解率。经

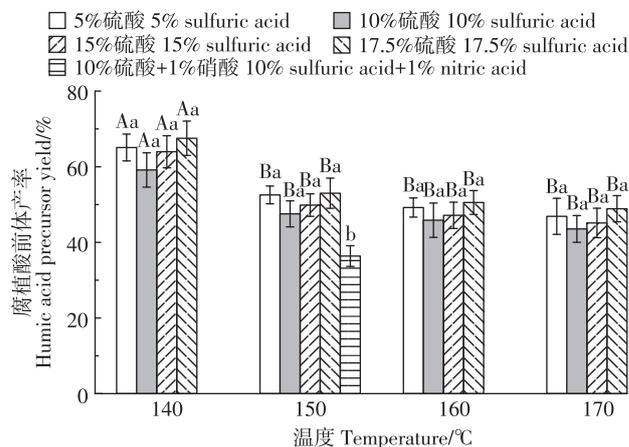


不同大写字母表示相同温度下不同浓度间差异显著($P<0.05$),不同小写字母表示相同浓度下不同温度间差异显著($P<0.05$)。

Different uppercase letters indicate significant differences between different concentrations at the same temperature ($P<0.05$), while different lowercase letters indicate significant differences between temperatures at the same concentration ($P<0.05$).

图1 不同温度/浓度磷酸水解后腐植酸前体的产率

Figure 1 Yield of humic acid precursors after phosphoric acid hydrolysis at different temperatures/concentrations



不同大写字母表示相同浓度下不同温度间差异显著($P<0.05$),不同小写字母表示相同温度下不同浓度间差异显著($P<0.05$)。

Different uppercase letters indicate significant differences between different temperatures at the same concentration ($P<0.05$), while different lowercase letters indicate significant differences between different concentrations at the same temperature ($P<0.05$).

图2 硫酸水解体系腐植酸前体的产率

Figure 2 Yield of humic acid precursors in sulfuric acid hydrolysis system

试验发现,150℃的温度下在10%的硫酸基础上添加1%的硝酸能够有效地提高水解效率,腐植酸前体的产率能够稳定在35%左右。在前述的磷酸水解方案中添加硝酸同样可以达到继续提升水解率的效果,但由于磷酸方案最优的温度高达200℃,添加硝酸后产生的气体会对反应釜耐压性能提出更高的要求,综合考虑选用硫酸/硝酸混酸更优。

考虑到技术的实用性,水解液中单糖的含量同样需要考察,理论上纤维素水解为葡萄糖,半纤维素水解为木糖,但是由于水解温度较高单糖难以保留。150℃、10%硫酸/1%硝酸条件下水解液经中和、脱盐、干燥后测试,其中葡萄糖含量为20.45%,没有检测到木糖,而温度上升至160℃,葡萄糖含量锐减到2.63%。经实测,酸水解条件下木糖能够大量保留的临界温度约在120~130℃。显然制备水解糖和腐植酸前体所需的水解温度存在较大差异,这点可以通过分批次水解解决,本文不再详述。

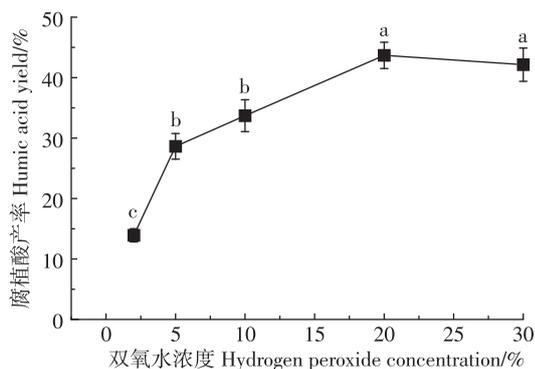
另外,水解时间由于反应釜的大小导致传热时间不同,100 mL聚四氟乙烯内胆的钢制反应釜2.5 h与500 mL同样反应釜3 h时均能达到较好的效果,再延长对腐植酸前体的产率影响较小。

综上,甘蔗叶制备腐植酸前体的最佳水解条件为:温度150℃,反应时间3 h,水解液选用10%的硫酸和1%硝酸组成的混合酸。

2.2 氧化制备腐植酸

腐植酸最主要的用途是农业肥料,因此在选择氧化剂时既需要考虑产率、反应条件、成本等因素,还需要考虑对农业应用的潜在影响,因此,从残留化学成分不影响土壤生态的角度能够候选的氧化剂数量较少,主要考察了双氧水和硝酸两种氧化剂对制备腐植酸的影响。

在 90 °C、固液比 1:12(g:mL),反应 3 h 的条件下,不同浓度双氧水对制备腐植酸的影响见图 3,其最大产率在 50% 以下,即使调整温度、时间和固液比等因素双氧水作为氧化剂的腐植酸产率也难以继续提高。



不同小写字母表示不同双氧水浓度间差异显著 ($P < 0.05$).
Different lowercase letters indicate significant differences between different concentrations of hydrogen peroxide ($P < 0.05$).

图3 双氧水浓度对腐植酸产率的影响

Figure 3 Effects of hydrogen peroxide concentration on humic acid yield

换用氧化能力更强的硝酸后产率大幅度提高,试验首先确定了硝酸反应的浓度和固液比,图4为在 1:11~1:15(g:mL)固液比范围内不同硝酸浓度对反应的影响。随着硝酸浓度的提升腐植酸的产率逐渐提高,当达到 3.5% 时出现最大值,之后继续增加浓度产率反而下降。腐植酸前体有较强的疏水性,与水混合长时间无法浸润而浮于水面,随着氧化剂加入以及温度升高,可观察到固体逐渐被浸润形成悬浊液。基于以上试验现象,推测由于腐植酸前体与硝酸的反应主要是发生在界面的两相反应,腐植酸前体被氧化后产生大量的亲水性羧基基团,导致固液反应的界面亲和力大幅提升而更容易与水中的硝酸接触,使已经生成的腐植酸比未反应的前体更易反应,因此当硝酸浓度超过临界值后反而导致腐植酸分子量下降而产生大量水溶性小分子,从而降低产率。因此最佳的反应条件被设定为 3.5% 的硝酸和 1:13(g:mL)的固液比。

确定了最佳的固液比和硝酸浓度后,在该条件下

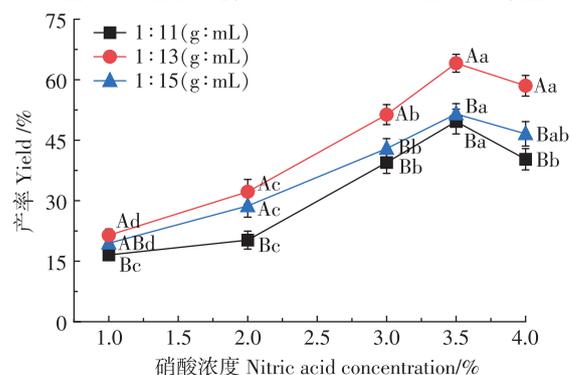
我们继续考察了不同温度和反应时间这对联动因素对反应产率的影响,如图5所示,在 50~90 °C 时该反应的最佳时间分别为 5、4、3、2、2 h,显然随着温度的升高反应的速度逐渐提升,且各组腐植酸的最大产率均能达到 70% 左右,而在 80 °C 时达到了最大 77.8% 的产率。说明即使是较低的温度下也可以通过延长反应时间提升反应产率。

综上,通过双氧水和硝酸两种氧化剂的比较,发现硝酸是更适合用于制备腐植酸的氧化剂,它的最佳反应条件被确定为:腐植酸前体以 1:13(g:mL)的固液比与 3.5% 的硝酸在 80 °C 的温度下反应 2 h。

2.3 甘蔗叶生物质腐植酸的表征

通过检测制备的甘蔗叶腐植酸的元素组成,酸性基团含量,紫外、红外光谱以及核磁共振谱分析,并与商业销售的矿源腐植酸(矿源 HA)和原料中转化为腐植酸的主要化学成分木质素的对比分析制备的甘蔗叶生物质腐植酸(甘蔗叶 HA)的结构变化、腐殖化程度等信息。

通过元素分析(表1)可以发现三个样品的碳含量均为 55%~57%,氧含量均为 32%~34%,非常接近,氢元素则呈现矿源腐植酸<甘蔗叶腐植酸<木质素的趋势,分别为 2.8%、4.2% 和 5.3%。甘蔗叶腐植酸相对木质素氢含量降低从侧面说明芳香环的占比提升,进而说明第一步的水解反应确实能够达到脱氢和提升芳香度的目的。而甘蔗叶腐植酸和木质素虽然氧含量接近,但反映出的结构构成却并不相同,结合后续酸性基团含量发现,两者虽然氧含量相当,但总酸

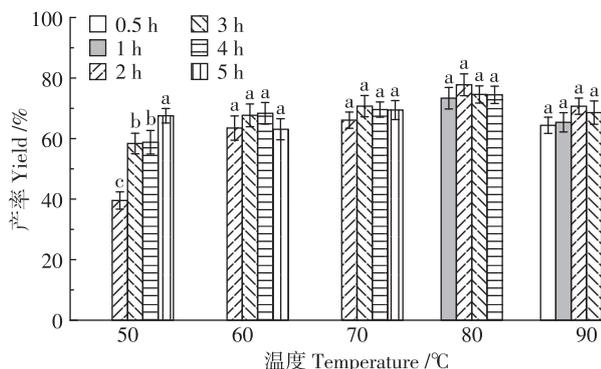


不同大写字母表示相同硝酸浓度下不同固液比间差异显著 ($P < 0.05$), 不同小写字母表示相同固液比下不同硝酸浓度间差异显著 ($P < 0.05$).

Different uppercase letters indicate significant differences between different solid-liquid ratios under the same nitric acid concentration ($P < 0.05$), while different lowercase letters indicate significant differences between different nitric acid concentrations under the same solid-liquid ratio ($P < 0.05$).

图4 硝酸浓度/固液比对腐植酸产率的影响

Figure 4 Effects of nitric acid concentration/solid-liquid ratio on humic acid yield



不同小写字母表示相同温度下不同反应时间间差异显著($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant differences between different reaction time at the same temperature ($P<0.05$).

图5 不同温度/时间对腐植酸产率的影响

Figure 5 Effects of different temperature/time on humic acid yield

性基团含量却是甘蔗叶腐植酸明显领先,说明木质素的氧含量很大一部分是由醇羟基和甲氧基提供。还可以推测木质素向腐植酸转变的过程中,在第一步酸水解过程中由于酸的催化作用容易导致这些含氧基团发生消除反应丢失氧元素,而经历第二步氧化反应后重新生成羧基而再次在结构中引入大量的含氧基团。另外甘蔗叶腐植酸元素组成中氮的含量相较于木质素也明显提升,分析原因是第二步使用硝酸氧化时可能导致芳香基团少量硝基化。

采用氢氧化钡和醋酸钙法,分别测定了甘蔗叶腐植酸的总酸性基团、羧基和酚羟基的含量,结果见表1。甘蔗叶腐植酸总酸性基团和羧基含量相较于木质素分别由 $5.20 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $0.43 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 大幅提升至 $7.60 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $3.81 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$,已经与矿源腐植酸的 $7.76 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $4.32 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 相接近。而酚羟基的含量则由木质素的 $4.77 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 下降为 $3.79 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$,略高于矿源腐植酸的 $3.44 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。羧基酚羟基之比正好为 1:1 略低于矿源腐植酸的 1.26:1,明显高于木质素的 0.09:1。这证明制备腐植酸的两步法达到了最初设计方案的预期,通过一系列的复杂化学反应使木质素快速腐植化,使制备的甘蔗叶腐植酸在官能团结构和含量上接近于通过地壳亿万年才能形成的矿源腐植酸。

表1 元素分析和酸性基团含量

Table 1 Element analysis and acid group content

样品 Sample	C/%	H/%	O/%	N/%	总酸性基 Total acidic group/ ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$)	羧基 Carboxyl group/ ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$)	酚羟基 Phenolic hydroxyl group/ ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$)
甘蔗叶 HA	55.3 ± 2.13	4.2 ± 0.12	34.5 ± 1.09	2.8 ± 0.44	7.60 ± 0.92	3.81 ± 0.05	3.79 ± 0.44
矿源 HA	57.0 ± 1.35	2.8 ± 0.07	33.6 ± 0.97	1.0 ± 0.01	7.76 ± 0.04	4.32 ± 0.20	3.44 ± 0.16
木质素	56.6 ± 4.56	5.3 ± 0.94	32.2 ± 1.34	0.4 ± 0.01	5.20 ± 0.11	0.43 ± 0.01	4.77 ± 0.10

核磁共振波谱能够很好地反映有机物的官能团,但矿源腐植酸钠溶解在重水中几乎没有核磁信号,这与文献报道一致^[24],应该是由于其溶液实际上是胶体溶液而非真正的溶解^[25],而本研究制备的甘蔗叶腐植酸钠在重水中(图6)同样几乎没有信号,其碳谱中仅有化学位移 170~180 ppm 的羧基碳信号能够辨认。但与矿源腐植酸在氘代 DMSO 中同样几乎没有信号不同,当用氘代 DMSO 作为溶剂时,甘蔗叶腐植酸的碳谱中出现了明显核磁信号。与木质素的氘代 DMSO 碳谱相比,甘蔗叶腐植酸在 50~90 ppm 的烷氧基信号几乎全部消失,取而代之的是在 0~40 ppm 的烷基区出现了多个信号,而在大于 100 ppm 的不饱和信号区,可以观测到甘蔗叶腐植酸一系列宽而弱的连续谱峰,与木质素强而锐利的信号相比,这说明甘蔗叶腐植酸芳香基团的类型和复杂程度增加,芳香化程度提高。虽然在 DMSO 中甘蔗叶腐植酸的溶解度也较低,核磁数据并不代表全部的样品,但能够溶解的这部分已经证明了从木质素到腐植酸的系列变化是符合设计预期的。

在腐植酸的研究中紫外-可见吸收光谱占据着很重要的地位,它能够在一定程度上说明腐植酸的腐

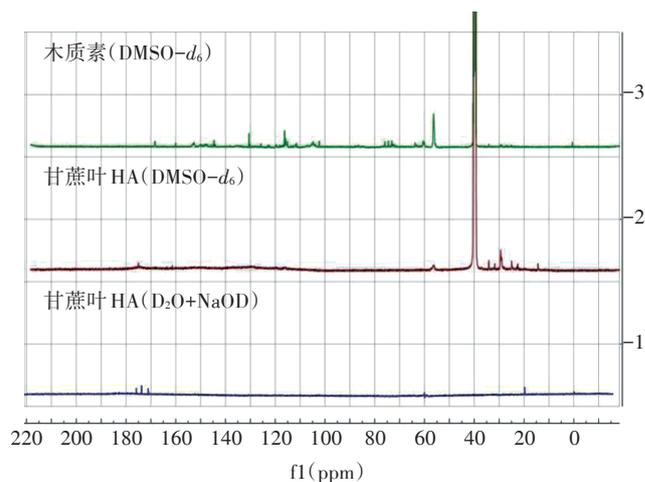


图6 木质素(DMSO- d_6)、甘蔗叶 HA(DMSO- d_6)、甘蔗叶 HA(D₂O+NaOD)的核磁碳谱

Figure 6 ^{13}C NMR spectra of lignin (DMSO- d_6), sugarcane leaf HA (DMSO- d_6) and sugarcane leaf HA (D₂O+NaOD)

殖化程度,图7分别展示了矿源腐植酸、甘蔗叶腐植酸和木质素200~800 nm波长的吸收光谱。

与文献^[26]报道的类似,矿源腐植酸和甘蔗叶腐植酸的吸收光谱均随波长增加而降低,而木质素则在280 nm附近出现了明显的肩峰。通过对特定波长的吸光度进行处理能够更好地衡量腐植酸的腐殖化程度,E2/E3是在250 nm与365 nm处的吸光度之比,通常用作腐殖物质的腐殖化和分子量的指标^[27-29]。E4/E6是在465 nm处与在665 nm处的吸光度之比^[30-31],即所谓的腐殖化指数,也与腐植酸的平均分子量和大小以及含氧量有关。 $\Delta \lg K$ 系数与腐殖化程度相关^[32],即腐植酸溶液在400 nm(A_{400})和600 nm(A_{600})下的吸光度并做对数的差值: $\Delta \lg K = \lg A_{400} - \lg A_{600}$,其腐殖化程度被划分为A(<0.6)、B(0.6~0.8)、Rp(0.8~1.1)和P(>1.1)四级,数值越小表示腐殖化程度越高。

由表2可知,E2/E3、E4/E6、 $\Delta \lg K$ 三个参数均为矿源HA<甘蔗叶HA<木质素,反映出矿源腐植酸表现出较高的芳香缩合度,较低的脂肪支链,以及高度的腐殖化程度,而甘蔗叶腐植酸的腐殖化程度则略低于矿源腐植酸而远高于木质素。虽然甘蔗叶腐植酸的腐殖化程度没有完全达到矿源腐植酸的水平,但多个指标共同证明其仍然具备很高的腐殖化程度,说明两步法的制备方案基本达到了设计的预期。

虽然腐植酸结构复杂容易导致红外谱图吸收峰重叠而不易解读细节,但仍然能够从三者的红外谱图中获得关于结构的细节信息。如图8所示,3300~3400 cm^{-1} 左右的宽而强的吸收峰是羟基O—H的伸缩振动峰,前面的试验已经证实矿源和甘蔗叶腐植酸都含有大量的羟基和羧基,那么通过红外光谱确认1230 cm^{-1} 附近为羧基和酚的C—O伸缩振动峰,在1100 cm^{-1} 附近没有明显的吸收峰证明其醇羟基含量较低,而相对应的木质素在1124 cm^{-1} 有明显吸收说明木质素中醇羟基含量较高,这也与核磁结果相符。2922 cm^{-1} 附近代表的是脂肪族烷烃的C—H伸缩振动,两种腐植酸在此处出峰很弱说明它们的脂肪族烷烃比例很低,而木质素中则存在较多的脂肪族烷烃。两个腐植酸样品中1700 cm^{-1} 左右是羧基C=O的伸缩振动^[33],而木质素在这个位置的吸收明显较弱,1620 cm^{-1} 处是羧基共轭芳环或者共轭双键以及COO—的吸收峰^[34-35],1540 cm^{-1} 和1400 cm^{-1} 附近的弱吸收有可能是COO—的对称伸缩振动峰和反对称伸缩振动峰,说明样品中还有未洗净的盐,1030 cm^{-1} 波数处是醚或糖的—C—O—C—伸缩振动,两个

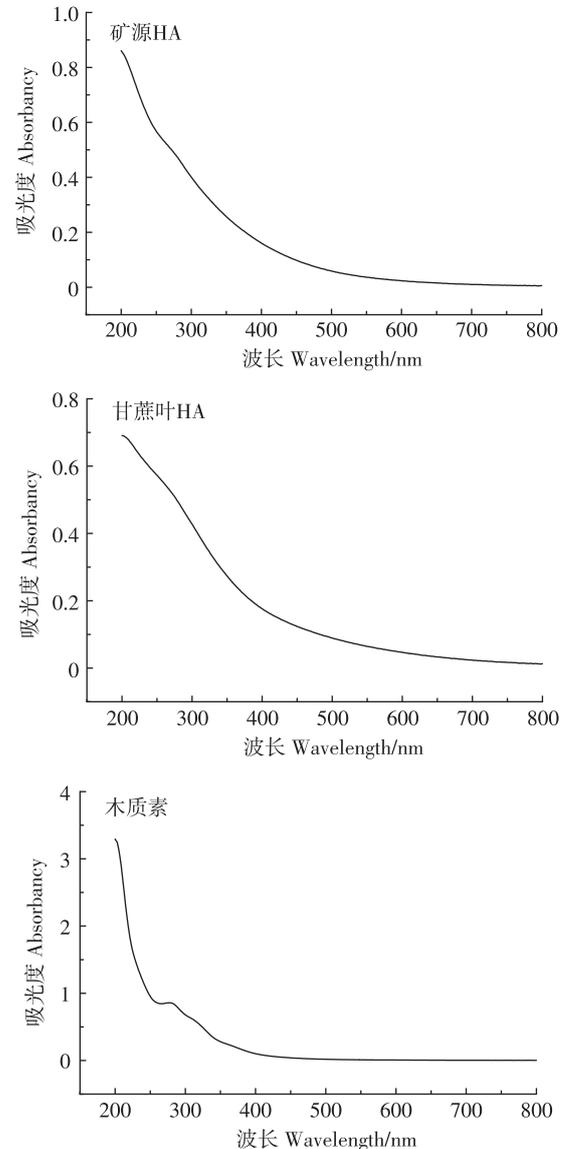


图7 紫外-可见吸收光谱图

Figure 7 Ultraviolet visible absorption spectrogram

表2 腐殖化系数比较

Table 2 Comparison of humification coefficients

样品 Sample	E2/E3	E4/E6	$\Delta \lg K$
矿源 HA	1.10	5.76	0.73
甘蔗叶 HA	1.17	6.91	0.82
木质素	2.86	17.60	1.39

腐植酸在此处都没有明显的吸收峰,而木质素则出现了中等强度吸收。红外吸收光谱的结果与之前试验结果一致,证明了甘蔗叶腐植酸在经过了一系列的处理后脂肪族下降而芳香族基团大幅上升,且形成了大量新的羧基。

综上所述,通过工艺研究和结构表征的数据表明

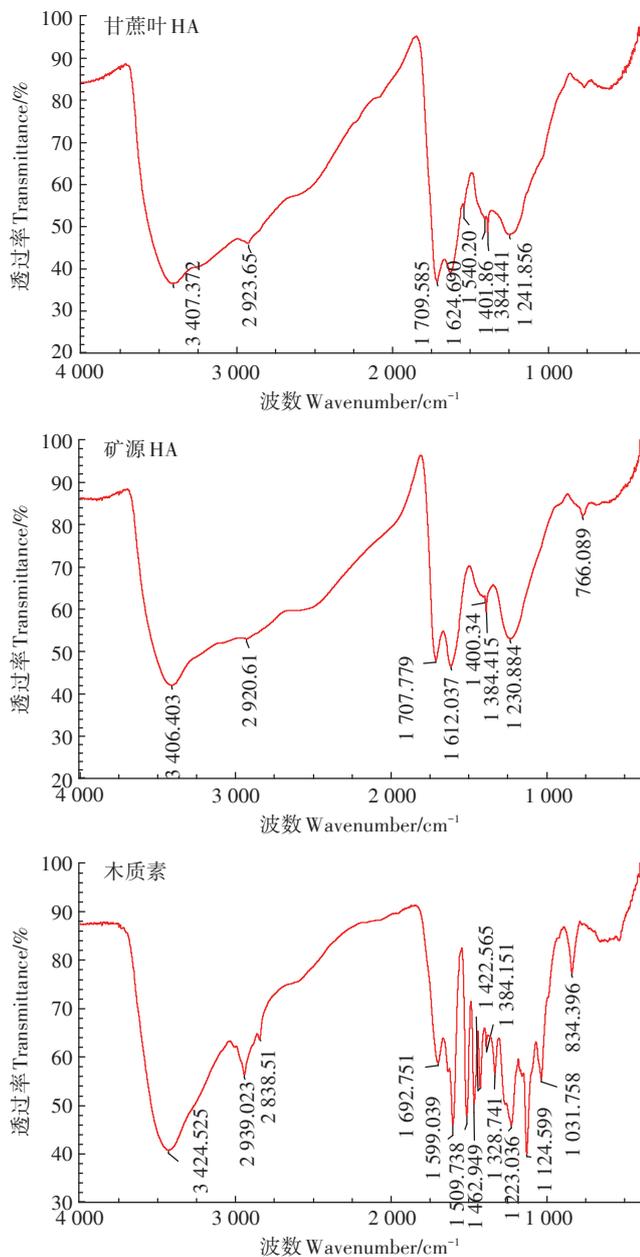


图8 甘蔗叶 HA、矿源 HA、木质素的红外光谱

Figure 8 IR spectra of sugarcane leaf HA, mineral HA, and lignin

酸水解再氧化的方案能够由甘蔗叶制备出结构接近于传统矿源腐植酸的生物质腐植酸。由于电渗析技术的发展和突破,工业上酸、碱及高盐废水的回收成本已大幅下降,因此奠定了本项技术得以开展和继续放大的基础,该方案可以解决生物质酸水解后残渣利用的问题,但还需要在考虑产业和经济模式构建的基础上完成水解糖与其他高附加值产品工艺的衔接。

3 结论

(1)以甘蔗叶为原料制备腐植酸共需经过两个过

程,即酸水解和氧化,水解过程将纤维素和半纤维素水解成单糖,使木质素生成的腐植酸前体能够更容易被随后的氧化步骤所氧化,提高原料的利用率。经条件优化后,在固定 20:50(g:mL)固液比的条件下,最优的水解条件为:10%硫酸和1%硝酸组成的混酸作为水解液,150℃下反应3h;而氧化步骤的最佳反应条件则为:水解制备的腐植酸前体以固液比为1:13(g:mL)的比例在3.5%的硝酸中80℃反应2h。

(2)经核磁、红外、紫外等一系列表征手段一致证实制备的甘蔗叶腐植酸有类似于矿源腐植酸的基团结构,虽然腐殖化程度仍略低于市售矿源腐植酸,但差距较小。

(3)该制备方法证实通过模拟矿源腐植酸形成过程中的化学反应,可以利用植物材料直接进行腐植酸的制备。而且原料不局限于甘蔗叶,各种农林副产物均可采用这一思路进行开发,为农林副产物的高值化利用提供了新的途径。

参考文献:

- [1] 罗含敏,周慧文,闫海峰,等.甘蔗产量形成的要素及其化控措施[J].广西糖业,2020(4):8-14. LUO H M, ZHOU H W, YAN H F, et al. The key factors of affecting the sugarcane yield formation and its chemical control strategies[J]. *Guangxi Sugar Industry*, 2020(4):8-14.
- [2] 周一帆,杨林生,孟博,等.中国甘蔗主产区产量差及影响因素分析[J].中国农业科学,2021,54(11):2377-2388. ZHOU Y F, YANG L S, MENG B, et al. Analysis of yield gaps and limiting factors in China's main sugarcane production areas[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, 54(11):2377-2388.
- [3] 霍丽丽,赵立欣,姚宗路,等.秸秆热解炭化多联产技术应用模式及效益分析[J].农业工程学报,2017,33(3):227-232. HUO L L, ZHAO L X, YAO Z L, et al. Utilization model and its efficiency analysis of biochar-gas-oil polygeneration by straw pyrolysis[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2017, 33(3):227-232.
- [4] KE T, LI L, RAJAVEL K, et al. A multi-method analysis of the interaction between humic acids and heavy metal ions[J]. *Journal of Environmental Science and Health*, 2018, 53(7/8):740-751.
- [5] 杨猛,姚静,李文波,等.新型腐植酸水溶肥料对秋延迟黄瓜产量和品质的影响[J].现代农业科技,2011,13:263-265. YANG M, YAO J, LI W B, et al. Effects of new humic acid water-soluble fertilizer on yield and quality of autumn delayed cucumber[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2011, 13:263-265.
- [6] 钟桐生,胡立纯,胡赛纯,等.红壤腐殖酸及其与重金属离子作用的荧光特性研究[J].湖南城市学院学报:自然科学版,2009,18(4):39-44. ZHONG T S, HU L C, HU S C, et al. Study on the fluorescence characteristics of red soil humic acid and its complexation with heavy metal ion[J]. *Journal of Hunan City University: Natural Science Edition*, 2009, 18(4):39-44.
- [7] SUSIC M. Replenishing humic acids in agricultural soils[J]. *Agronomy*,

- 2016, 6(4):45-51.
- [8] 白志浩, 雷治兵, 张智敏, 等. 腐殖酸复合肥料在农作物中的应用研究进展[J]. 山东化工, 2020, 49(19):56-58. BAI Z H, LEI Z B, ZHANG Z M, et al. Application and research progress of humic acid compound fertilizer in agricultural production[J]. *Shandong Chemical Industry*, 2020, 49(19):56-58.
- [9] BEZUGLOVA O. Molecular structure of humus acids in soils[J]. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2019, 182(4):1-7.
- [10] ZARA M, AHMAD Z, AKHTAR J, et al. Extraction and characterization of humic acid from pakistani lignite coals[J]. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 2017, 39(11):1159-1166.
- [11] SARLAKI E, SHARIF PAGHALEH A, KIANMEHR M H, et al. Extraction and purification of humic acids from lignite wastes using alkaline treatment and membrane ultrafiltration[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2019, 235:712-723.
- [12] NASIR S, SARFARAZ T B, VERHEYEN T V, et al. Structural elucidation of humic acids extracted from pakistani lignite using spectroscopic and thermal degradative techniques[J]. *Fuel Processing Technology*, 2011, 92(5):983-991.
- [13] 衡曦彤, 程娟, 何环, 等. 微生物降解煤产腐植酸及应用研究进展[J]. 洁净煤技术, 2019, 25(6):88-95. HENG X T, CHENG J, HE H, et al. Research progress and application in microbial degradation of coal to produce humic acid[J]. *Clean Coal Technology*, 2019, 25(6):88-95.
- [14] JEONG H J, CHA J Y, CHOI J H, et al. One-pot transformation of technical lignins into humic-like plant stimulants through fenton-based advanced oxidation: accelerating natural fungus-driven humification[J]. *ACS Omega*, 2018, 3(7):7441-7453.
- [15] SABAR M A, ALI M I, FATIMA N, et al. Evaluation of humic acids produced from Pakistani subbituminous coal by chemical and fungal treatments[J]. *Fuel*, 2020, 278:1-7.
- [16] WANG X, MUHMOOD A, DONG R, et al. Synthesis of humic-like acid from biomass pretreatment liquor: quantitative appraisal of electron transferring capacity and metal-binding potential[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 255:120243-120254.
- [17] YANG F, ZHANG S, CHENG K, et al. A hydrothermal process to turn waste biomass into artificial fulvic and humic acids for soil remediation[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 686:1140-1151.
- [18] LIU T, ZHOU H, LAN Y, et al. Preparation of high-performance, three-dimensional, hierarchical porous carbon supercapacitor materials and high-value-added potassium humate from cotton stalks[J]. *Diamond and Related Materials*, 2021, 116:108375-108384.
- [19] KONONOVA M M, ALEXANDROVA I V. Formation of humic acids during plant residue humification and their nature[J]. *Geoderma*, 1973, 9(3):157-164.
- [20] 李传华, 钱光人, 洪瑞金, 等. 生物质垃圾转化为生态肥料的水热技术试验研究[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(6):1119-1123. LI C H, QIAN G R, HONG R J, et al. Experimental research on converting biomass waste into bio-fertilizer by hydrothermal treatment[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2004, 23(6):1119-1123.
- [21] 秦谊, 龚加顺, 张惠芬, 等. BaCl₂和Ca(CH₃COO)₂沉淀法定量分析普洱茶茶褐素官能团[J]. 林产化学与工业, 2010, 30(6):107-112. QIN Y, GONG J S, ZHANG H F, et al. Quantitative determination of functional groups in the abrownine from Pu-erh Tea based on BaCl₂ and Ca(CH₃COO)₂ precipitation methods[J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2010, 30(6):107-112.
- [22] 雷光鸿, 崔素芬, 李辰, 等. 甘蔗叶水解液提取木糖纯化工艺的研究[J]. 食品工业, 2015, 36(10):67-70. LEI G H, CUI S F, LI C, et al. The research of sugarcane leaves hydrolyzate purification process[J]. *Food Industry*, 2015, 36(10):67-70.
- [23] 李忠正, 孙润仓, 金永灿. 植物纤维资源化学[M]. 北京:中国轻工出版社, 2012:431. LI Z Z, SUN R C, JIN Y C. Plant fiber resource chemistry[M]. Beijing:China Light Industry Press, 2012:431.
- [24] KULKOWSKA D, GUSIATIN Z M, BULKOWSKA K, et al. Feasibility of using humic substances from compost to remove heavy metals (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) from contaminated soil aged for different periods of time[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 300:882-891.
- [25] KLUCAKOVA M. Characterization of pH-fractionated humic acids with respect to their dissociation behaviour[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2016, 23(8):7722-7731.
- [26] RICHARD C, GUYOT G, AGUER J P. Role of fractionation in studying the photochemical properties of humic substances[J]. *Russian Journal of General Chemistry*, 2008, 78(11):2265-2272.
- [27] PEURAVUORI J, PIHLAJA K. Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances[J]. *Analchim Acta*, 1997, 337(2):133-149.
- [28] DUARTE RMBO, SANTOS EBH, DUARTE A C. Spectroscopic characteristics of ultrafiltration fractions of fulvic and humic acids isolated from an eucalyptus bleached kraft pulp mill effluent[J]. *Water Research*, 2003, 37(17):4073-4080.
- [29] CEYDA, SENEM, UYGUNER, et al. Evaluation of humic acid photocatalytic degradation by uv-vis and fluorescence spectroscopy[J]. *Catalysis Today*, 2005, 101:267-274.
- [30] CHEN Y, SENESI N, SCHNITZER M. Information provided on humic substances by E4/E6 ratios[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1977, 41(2):352-358.
- [31] HELAL A A, MURAD G A, HELAL A A. Characterization of different humic materials by various analytical techniques[J]. *Arabian Journal of Chemistry*, 2011, 4(1):51-54.
- [32] SIONG F S, SENG L, NAN C W, et al. Characterization of the coal derived humic acids from mukah, sarawak as soil conditioner[J]. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2006, 17(3):582-587.
- [33] SILVA R, LUCENA G N, MACHADO N F, et al. Spectroscopic and elementary characterization of humic substances in organic substrates[J]. *Comunicata Scientiae*, 2018, 9(2):264-274.
- [34] JIMÉNEZ-GONZÁLEZ M A, ÁLVAREZ A M, CARRAL P, et al. Chemometric assessment of soil organic matter storage and quality from humic acid infrared spectra[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 685:1160-1168.
- [35] SENESI N, D'ORAZIO V, RICCA G. Humic acids in the first generation of eurosols[J]. *Geoderma*, 2003, 116(3/4):325-344.

(责任编辑:叶飞)