

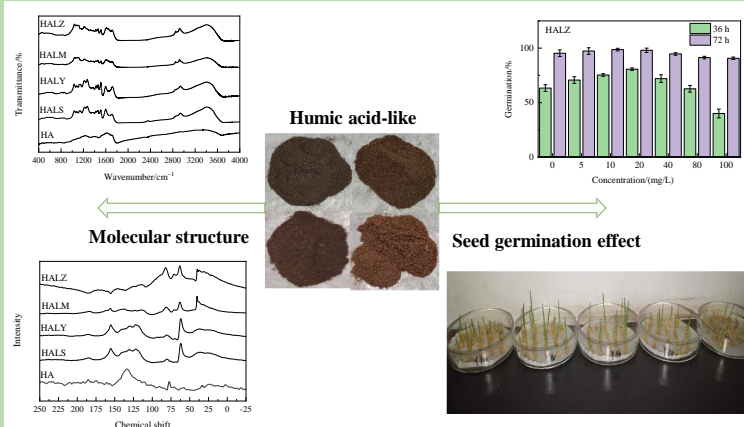
Study on humic acid-like components, molecular structure and physiological activity

Bingkai SHANG^{1,2}, Haitao MO¹, Zhuowang FU¹, Xiaoyong ZHANG^{1,2*}

1. Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

2. School of Chemical Engineering, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: By means of methods of elemental analysis, FT-IR and solid ^{13}C NMR, a comparative study on the component, elemental composition and molecular structure of humic acid-like substances prepared from four different raw materials and humic acids from mineral sources were carried out. Also the physiological activity of four humic acid-like substances was determined by seed germination experiment. The study results showed that the content of fulvic acid in the



humic acid-like materials prepared from herbaceous plants (wheat straw and bamboo) was significantly higher than that from woody plants (pine and poplar). The molecular structure of humic acid-like materials was similar to that of mineral humic acid, because both of them had the characteristic functional groups of humic acid. Compared with mineral humic acids, the structures of humic acid-like materials were more complex, and the types and contents of functional groups were different. They have more aromatic structures and lower oxygen-containing functional groups. Also, humic acid-like materials from herbaceous plants had higher aromatization degree and lower molecular weight than those from woody plants. The results of wheat seed germination experiment showed that, when the concentration of the humic acid-like materials was 20~40 mg/L, it can obviously promote the germination of seeds. However the seed growth will be inhibited if the concentration was too high.

Key words: humic acid; humic acid-like; molecular structure; physiological activity; comparative study

收稿: 2020-09-04, 修回: 2020-09-06, 网络发表: 2020-09-29; Received: 2020-09-04, Revised: 2020-09-06, Published online: 2020-09-29
基金项目: 北京市科技计划项目(编号: Z161100001316002); 四川省战略性新兴产业项目(编号: 2015GZX0006); 企业科研成果转化项目(编号: KFA2019-181)

作者简介: 尚冰凯(1994-), 男, 河南省孟州市人, 硕士研究生, 生物工程专业, E-mail: bkshang@ipe.ac.cn; 张小勇, 通讯联系人, E-mail: xyzhang@ipe.ac.cn.

引用格式: 尚冰凯, 莫海涛, 符卓旺, 等. 类腐植酸的组分、分子结构及其生理活性研究. 过程工程学报, 2021, 21(8): 969-975.
Shang B K, Mo H T, Fu Z W, et al. Study on humic acid-like components, molecular structure and physiological activity (in Chinese). Chin. J. Process Eng., 2021, 21(8): 969-975, DOI: 10.12034/j.issn.1009-606X.220291.

类腐植酸的组分、分子结构及其生理活性研究

尚冰凯^{1,2}, 莫海涛¹, 符卓旺¹, 张小勇^{1,2*}

1. 中国科学院过程工程研究所, 北京 100190

2. 中国科学院大学化学工程学院, 北京 100049

摘要: 采用元素分析、傅立叶变换红外光谱(FT-IR)和固体¹³C核磁共振等方法, 对四种不同原料制备的类腐植酸与矿物源腐植酸在组分、元素组成和分子结构方面进行了研究, 通过种子萌发实验对类腐植酸的生理活性进行了测定。结果表明, 以草本植物(麦草、竹子)为原料制备的类腐植酸中, 黄腐酸的含量明显高于木本植物(松木、杨木)制备的样品。类腐植酸与矿物源腐植酸的分子结构相似, 具有腐植酸的特征官能团。与矿物源腐植酸相比, 类腐植酸结构更复杂, 其中芳香族结构、木质素衍生物及多糖等结构含量更多, 含氧官能团含量较低, 其中草本植物源制备的类腐植酸比木本植物制备的样品的芳香化程度更高, 分子量更小。小麦种子萌发研究结果显示, 类腐植酸浓度为20~40 mg/L时对种子萌发起到明显的促进作用, 但浓度过高反而会抑制其生长。

关键词: 腐植酸; 类腐植酸; 分子结构; 生理活性; 对比研究

中图分类号: X712

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2021)08-0969-07

1 前言

腐植酸是一类成分复杂的天然有机物^[1], 腐植酸的基本结构是芳环和脂环, 环上连有羧基、羟基、羰基、醌基、甲氧基等活性官能团。对腐植酸分子结构的研究始终是有机地球化学领域的复杂性课题之一。前人对腐植酸结构方面的研究大多集中在矿物源(泥炭、草炭、褐煤等)及土壤水体沉积物中的腐植酸。宋海燕等^[2]发现虽然不同来源腐植酸在化学组成上具有相似之处, 但由于其生物来源和成岩环境不同, 各自的结构特征明显不同。郭瑾等^[3]采用紫外光谱、红外光谱等分析手段研究了松花江水中的天然有机物, 指出该水体中的腐植酸具有较高的不饱和性。田充等^[4]研究了海洋沉积物中腐植酸的紫外光谱特征, 发现在不同pH条件下腐植酸分子结构发生了变化。

随着人们对腐植酸认识的加深, 发现在一些人为加工的产物中也存在着腐植酸物质。Amir等^[5]在活性污泥堆肥实验中, 发现堆肥阶段不同, 腐植酸结构特征存在很大差别。Ma等^[6]发现蒸煮废液中具有与腐植酸相似化学结构的有机物质含量高达54%~60%, 并将其命名为类腐植酸。Yao等^[7]从亚硫酸铵蒸煮废液中提取出了类黄腐酸物质, 并分析了其与泥炭腐植酸的异同点。

本研究选取四种不同的植物原料, 通过蒸煮制备出4种类腐植酸, 并通过元素组成、酸性基团的含量及分子结构等腐植酸常用表征指标系统的研究了这4种类腐植酸与矿物源腐植酸的异同点, 同时使用生物法考察其生

理活性, 了解其组成、分子结构和生理活性的基本特点和规律, 为该种类腐植酸的应用提供理论依据。

2 实验

2.1 材料与试剂

竹子由四川省西龙生物质材料科技有限公司提供, 麦草、杨木、松木由山东华泰纸业股份有限公司提供, 小麦种子购自浙江勿忘农种业股份有限公司, 矿物源腐植酸(Humic acid, HA)购自山东创新腐植酸科技股份有限公司。

氢氧化钾、浓盐酸、过氧化氢(30%)、高锰酸钾、浓硫酸、磷酸二氢钾均为分析纯, 购于北京北化精细化学品有限责任公司, 氢氧化钠(分析纯, 西陇化工股份有限公司), 氯化钡(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 乙酸钙(分析纯, 广东汕头市西陇化工厂), 磷酸氢二钠(分析纯, 北京化学试剂公司)。

2.2 实验设备与分析仪器

ZQS₁ 电热蒸煮锅(陕西科技大学机械厂), TDZ5-WS离心机(长沙湘锐离心机有限公司), LGJ-10E冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂有限公司), 智能光照培养箱(宁波海曙赛福实验仪器厂), UV-2802型紫外可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司], Nicolet iS5 FT-IR光谱仪(Thermo Fisher), AVANCE III HD型500兆固体核磁共振波谱仪(瑞士布鲁克拜厄斯宾有限公司), Vario EL cube型Elementar元素分析仪(德国Elementar

集团)。

2.3 实验方法

2.3.1 类腐植酸(BHA)的制备及含量检测

首先将草本植物原料(麦草和竹子)和木本植物原料(松木和杨木)用氢氧化钾进行蒸煮,通过酸析^[8]的方法,从蒸煮液中提取出类腐植酸,包括竹子源类腐植酸(Humic Acid-Like from Bamboo, HALZ)、麦草源类腐植酸(Humic Acid-Like from Wheatgrass, HALM)、松木源类腐植酸(Humic Acid-Like from Pine, HALS)及杨木源类腐植酸(Humic Acid-Like from Poplar, HALY)。

按照 HG/T 3278-87, Q/S THJ02-2003, GB/T 212-91 三个标准分别测定类腐植酸样品中的水溶性腐植酸含量,黄腐酸含量及含水量。

2.3.2 元素分析

通过 Elementar 元素分析仪测定四种类腐植酸样品中的 C, H, O, N, S 含量。

2.3.3 酸性基团测定

采用离子交换法来测定腐植酸中的总酸性基团、酚羟基及羧基含量。

总酸性基团的测定(氢氧化钡法)^[9]:准确称取 50 mg 样品于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 无二氧化碳的 0.1 mol/L NaOH 标准溶液充分溶解,再加入 25 mL 0.1 mol/L 的氯化钡溶液,用塞子塞住离心管并振动数分钟后离心分离,量取上清液 25 mL,并用 0.1 mol/L 盐酸标准溶液做电位滴定,终点为 pH=8.4,同时做空白实验。

$$\text{总酸性基团含量} = \frac{35(V - V_0)M}{25G} \quad (1)$$

其中, V 为滴定样品时消耗的盐酸标准溶液体积(mL), V_0 为空白试验消耗的盐酸标准溶液体积(mL), M 为盐酸标准溶液的摩尔浓度(mol/L), G 为样品质量(g)。

羧基含量的测定方法选用乙酸钙法,具体方法与总酸性基团的测定方法类似的电位滴定。

酚羟基含量的测定一般使用差减法,即总酸性基团的测定值减去羧基含量的测定值为酚羟基的含量。

2.3.4 结构测定

紫外光谱采用 UV-2802 型的紫外分光光度计进行测定。取 0.5 g 腐植酸溶于 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液中定容至 100 mL,用移液管取 2 mL 溶液于 100 mL 容量瓶中,稀释至刻度线,得到 10 mg/L 腐植酸盐溶液,记录其在 465 和 665 nm 处的吸光值,并做空白实验。红外光谱使用 Nicolet iS5 FT-IR 光谱仪测定;核磁采用 500 M 固体核磁共振波谱仪测定。

2.3.5 种子萌发试验

用 10wt% 过氧化氢浸泡 15 min,对种子进行消毒处

理,然后用蒸馏水冲洗 5 次。在培养皿底部放入一张滤纸,加入 2.5 mL 配好的不同浓度的类腐植酸溶液(CK 为蒸馏水),每个培养皿中放入预处理后的籽粒饱满大小一致的种子 20 粒,再覆盖一张滤纸,加入 2.5 mL 溶液润湿,在黑暗中培养,每隔 12 h 观察并统计萌发数,及时补充溶液,保持滤纸湿润,并计算第三天的发芽势及第七天的发芽率。

种子萌发标准:长粒种子—以幼芽长度达到种子长径的一半为萌发;圆粒种子—以幼芽长度达到种子的直径为萌发;发芽势为第 n 天萌发种子数占种子总数的百分比;发芽率为总发芽数占种子总数的百分比。

2.3.6 过氧化氢酶的活力检测

缓冲液配制:甲液,称取磷酸氢二钠 11.876 g 溶于 1 L 水中;乙液,称取磷酸二氢钾 9.078 g 溶于 1 L 水中;使用时,甲、乙液按体积比 9:1 混合。

过氧化氢酶提取:称取一定量试样(W)放入研钵中,加少量细砂,量取缓冲液 50 mL,先倒出 5~10 mL 于研钵中研磨试样,然后倒入锥形瓶中,用剩余的缓冲液洗净研钵和漏斗,再把洗液倒入锥形瓶内,振摇 2 h 后,4000 r/min 下离心 15 min 获得透明提取液。

酶活力测定:摇匀提取液,吸取 20 mL 注入锥形瓶中,加入 20 mL 水和 3 mL 3% 过氧化氢溶液,在室温下放置 10 min,加入 5 mL 10% 硫酸溶液,摇匀,用 0.02 mol/L 高锰酸钾溶液滴定剩余的过氧化氢,记下用去的高锰酸钾溶液体积 V_1 (mL)。

对照试验:取 20 mL 缓冲液注入锥形瓶中,加 20 mL 水和 3 mL 3% 的过氧化氢溶液于锥形瓶中,室温下放置 20 min,再加入 5 mL 10% 的硫酸,摇匀,用 0.02 mol/L 高锰酸钾溶液滴定,记下用去的体积 V_0 (mL)。

过氧化氢酶活性按下式计算:

$$X = \frac{(V_0 - V_1) \times C \times 17 \times 50}{20 \times W} \quad (2)$$

式中, X 为每克种子在 10 min 内消耗的过氧化氢毫克数(mg/g), 17 为过氧化氢的当量; C 为高锰酸钾溶液的浓度(mol/L), 50 为酶液总体积(mL), 20 为实验取酶液体积(mL), W 为实验称取种子重量(g)。

3 结果与讨论

3.1 类腐植酸的组分

4 种类腐植酸的组分含量因原料来源不同而存在差异。由表 1 所示, HALS 中水溶性腐植酸含量最高,达 70.48%, 远高于其他类腐植酸;但其黄腐酸含量却显著低于 HALM 和 HALZ。进一步分析发现, 4 种类腐植酸中黄腐酸含量占总腐植酸含量依次为 HALZ>HALM>

HALY>HALS,其中草本来源的类腐植酸中黄腐酸含量差异不大,但均显著高于木本来源的两种类腐植酸。

虽然木本原料制得的类腐植酸中水溶性腐植酸的含量较高,但草本来源的类腐植酸中黄腐酸相对含量显著高于木本原料。水溶性腐植酸含量及黄腐酸含量都是衡量腐植酸生理活性的重要指标,含量越高,所具有的生理活性越高,因此可以推测高水溶性腐植酸含量的HALS及高黄腐酸含量的HALZ可能都具有很好的生理活性。

表 1 类腐植酸的组分
Table 1 Components of HAL

Sample	Water-soluble humic acid/%	Fulvic acid/%	Proportion of fulvic acid in humic acid/%
HALM	56.60	36.65	64.0
HALZ	58.41	37.97	64.8
HALY	62.58	24.32	38.9
HALS	70.48	26.46	37.5

3.2 结构分析及表征

3.2.1 元素分析结果以及酸性基团含量

氢元素与碳元素的原子比H/C是反映腐植酸中芳香族结构含量的标准,数值大小与芳香族结构的含量成反比^[10,11](表2),四种类腐植酸的H/C值远大于矿物源腐植酸,约是矿物源腐植酸的两倍,其中以草本植物为原料的类腐植酸中H/C比值高于木本为原料的类腐植酸,表明以草本植物为原料的类腐植酸中的芳香族结构较少。

同时腐植酸在波长为465及665 nm处的吸光度比值 E_4/E_6 也是一个衡量腐植酸芳香化程度及分子量大小的重要指标^[12], E_4/E_6 与物质芳香化程度及分子量大小成反比,其与腐植酸表观分子量 M 的关系^[13]为

$$\lg M = -0.0893 \frac{E_4}{E_6} + 5.193 \tag{3}$$

因此,这五种物质的表观分子量大小为HA<HALS<HALY<HALZ<HALM。同时分子量的大小也影响着腐植酸的生理活性,Riebel等^[14]在对类腐植酸物质的研究中发现,类腐植酸中小分子结构不仅容易被作物吸收,其作为自由基清除剂还具有一定的抗氧化能力,所以从 E_4/E_6 的角度来看,四种类腐植酸中HALS生物活性可能优于其他三种类腐植酸,但低于矿物源腐植酸。

氧元素与碳元素的原子比O/C是反映腐植酸中含氧官能团含量的重要参数^[15]。四种类腐植酸之间的O/C比值差异不大且小于矿物源腐植酸,说明这四种类腐植酸的结构中含氧官能团的含量较接近,但矿物源腐植酸的含氧官能团含量高于其他几种类腐植酸。

表3是类腐植酸的酸性基团含量的测定结果。类腐植酸与矿物源腐植酸的酸性基团在组成上具有一定的相似性,酚羟基的含量均高于羧基含量。但矿物源腐植酸的总酸性基团的含量及酚羟基含量比类腐植酸高约两倍,与元素分析中O/C的结果一致。

表 2 类腐植酸及矿物源腐植酸的元素组成及 E_4/E_6
Table 2 Elemental composition and E_4/E_6 of HAL and HA

Sample	Elemental composition/%					Atomic ratio		UV E_4/E_6
	C	H	O	N	S	O/C	H/C	
HALM	56.01	6.51	26.77	1.64	0.08	0.36	1.40	4.462
HALZ	53.83	6.39	29.08	1.78	0.05	0.41	1.42	4.559
HALY	59.08	5.68	27.31	0.11	0.00	0.35	1.15	5.555
HALS	56.91	5.27	25.97	0.25	0.02	0.34	1.11	6.642
HA	50.25	2.62	32.00	0.78	0.03	0.48	0.62	7.075

表 3 类腐植酸及矿物源腐植酸中酸性基团的分布
Table 3 Distributions of acid groups of HAL and HA

Sample	Total acid group/(mmol/g)	Total carboxyl/(mmol/g)	Total phenolic hydroxyl/(mmol/g)
HALM	3.8356	1.8349	2.0007
HALZ	4.0777	1.8975	2.1802
HALY	4.2217	1.9436	2.2781
HALS	3.8583	1.7413	2.1170
HA	6.8964	1.8862	5.0102

3.2.2 FT-IR 表征

类腐植酸与矿物源腐植酸在傅立叶红外光谱下显示出典型的腐植酸吸收光谱特征,如图1所示。5种物质均在3425 cm⁻¹附近出现宽峰,该峰通常由-O-H键的伸缩振动产生;在2927 cm⁻¹附近出现的吸收峰与脂肪结构上的甲基(-CH₃)或亚甲基(-CH₂-)中的C-H的伸展有关,但矿物源腐植酸在该处的吸收峰不明显;在1720 cm⁻¹处五种物质均存在强信号吸收峰,表明其结构中均存在羧酸和羰基如酮和醛结构^[16];在1600 cm⁻¹处存在芳香碳骨架(苯环结构中的C=C及共轭羰基中C=O骨架)的伸缩振动。

5种物质的光谱差异主要位于1600~1000 cm⁻¹区域。类腐植酸在1500 cm⁻¹附近的高吸收峰是木质素的特征吸收峰,也为苯环中C=C的振动,说明类腐植酸中含大量木质素结构,芳香结构较丰富;在1420 cm⁻¹处的吸收谱带为羧基中O-H的振动;1080~1030 cm⁻¹附近的信号峰^[17-20]说明类腐植酸中有多糖和烯烃、炔烃的存在。类腐植酸在1262 cm⁻¹处的吸收峰为O-H的拉伸或羧基中C-O形变;而木本原料的类腐植酸在1350 cm⁻¹附近的吸收峰为酚羟基中O-H形变和C-O振动。

综合红外光谱分析结果,四种类腐植酸与矿物源腐植酸相似的光谱性质反映出它们具有相似的官能团类

型,但类腐植酸中含较多的碳水化合物、木质素衍生物及多糖等结构,且木本原料的类腐植酸中酚羟基的含量高于另外两类腐植酸。

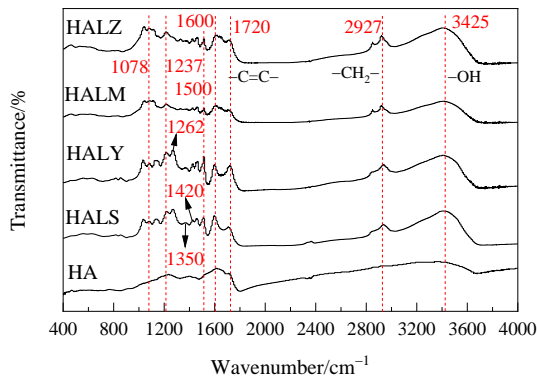


图1 矿物源腐植酸和类腐植酸的傅立叶红外光谱
Fig.1 FT-IR analysis of HA and HAL

3.2.3 固体¹³C NMR表征

在¹³C NMR分析中类腐植酸表现出明显的腐植酸光谱特征,二者具有相同的化学迁移区间,但光谱峰相对大小存在差异,如图2所示。根据官能团分布特征,一般把固体¹³C NMR图谱分为5个区域,即脂肪族区域(0~50)、碳水化合物区域(50~110)、芳香族区域(110~160)、含羧基化合物区域(160~190)、含羰基化合物区域(190~200)。

五种物质在化学位移为25, 35~40, 60, 75~80, 120~130, 150附近均有共振峰,但信号强度有差异,说明其有相似的碳结构,但含量不同。类腐植酸具有比矿物源腐植酸更丰富的脂肪族结构,矿物源腐植酸的芳香族C(110~160)含量比四种类腐植酸高,与前面元素分析的结果一致。对于四种类腐植酸,化学位移为25的附近均出现由脂肪族的甲基碳和亚甲基碳引起的共振峰;化学位移在35~40区间出现的共振峰主要是长链脂肪族化合物中的甲基碳,说明以草本植物制备的类腐植酸中长链结构更多,且含量均高于矿物源腐植酸;在化学位移为50~60区域内的强信号表明其中存在大量的木质素结构,Aguiar等^[21]从蚯蚓粪中提取的腐植酸核磁实验中也发现了类似的结果;在50~60范围内的信号强度和在140~160范围内的信号强度的差异表示了腐植酸中木质素的比,四种类腐植酸样品中化学位移在50~60之间的信号强度明显高于140~160,表明类腐植酸中木质素成分较多;50~110的碳水化合物区域一般是由氧和氮取代的脂族碳产生的共振峰,结合元素分析中氮元素的含量,可以推断出该共振峰是由氧取代的脂族碳产生的,即类腐植酸与矿物源腐植酸中均存在木质素衍生物和

碳水化合物,研究发现腐殖质也存在相似结构^[21,22]。化学位移在120~130区间附近的共振峰是由取代的芳香碳引起的,化学位移为150的共振峰可能是芳香醚碳、酚醛碳、氮取代芳香碳^[15,23],表明非木原料(麦草、竹子)脂肪族结构的含量高于木质原料,但芳香族碳的含量要比木质原料低。

综上所述,类腐植酸较黄腐酸含有更多的碳水化合物、木质素衍生物及较少的芳香碳和羧基碳。

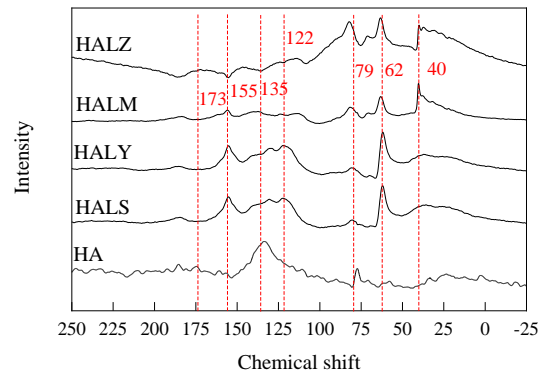


图2 矿物源腐植酸和类腐植酸的固体¹³C CP-MAS NMR

Fig.2 Solid-state ¹³C CP-MAS NMR of HA and HAL

3.3 生理活性

为了进一步探究类腐植酸的生理活性,实验选取了松木及竹子为原料来制备的类腐植酸作为对象,考察其对小麦种子萌发的影响。

通过使用不同浓度(0, 5, 10, 20, 40, 80, 100 mg/L)的类腐植酸对小麦种子进行浸种处理后,发现类腐植酸可以促进小麦种子的萌发,结果如图3所示。36 h时,与对照组相比,HALZ在浓度为5, 10, 20和40 mg/L条件下显著提高了小麦种子发芽率,分别提高了11.59, 18.95, 27.38和13.69个百分点;HALS在浓度为10, 20和40 mg/L条件下显著提高了小麦种子发芽率,分别提高了18.88, 20.00和30.55个百分点。当培养时间达到72 h时,不同HALZ浓度下小麦种子的发芽率差异不显著。因而在正常培养情况下,两种类腐植酸均能有效并且安全的促进小麦种子的提前萌发,但二者提高的效果有所不同,36 h时,最适浓度下的HALS对小麦种子发芽势的提升比HALZ提高了3.17个百分点。与朱辉^[24]发现的黄腐酸含量越高,生理活性越好的结果有所差异,可能的原因是HALZ的表观分子量远高于HALS的表观分子量,Duarte等^[25]的研究中发现类黄腐酸物质中分子量大于一定值后,超过的部分因无法穿透生物体的细胞膜而具有生理惰性,甚至对海洋生物具有致命性,这可能

是导致最终HALS的生理活性高于HALZ的原因。小麦种子中过氧化氢酶活性的结果(图4),也印证了这一

推测,当HALZ的浓度超过40 mg/L时,对小麦种子的过氧化氢酶活性产生了明显的抑制作用。

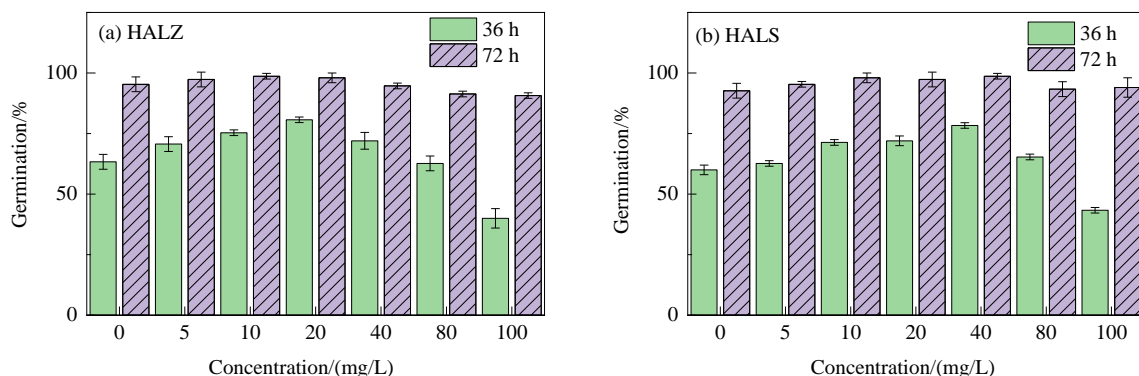


图3 HALZ和HALS处理36和72 h时小麦种子的发芽率

Fig.3 Germination rate of wheat seeds treated with HALZ and HALS at 36 and 72 h

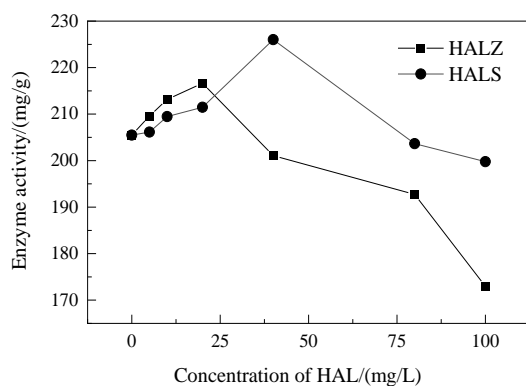


图4 过氧化氢酶活性

Fig.4 Catalase activity of H_2O_2

4 结论

通过对四种类腐植酸的化学组分、元素组成及分子结构进行测定,并与矿物源腐植酸的相应指标进行比较,最后采用种子萌发实验来考察类腐植酸的生理活性。得到以下结论:

(1) 组分分析表明,以非木质材料为原料制备得到的类腐植酸中,黄腐酸的含量要高于木质材料制备的类腐植酸。

(2) 通过类腐植酸与矿物源腐植酸的元素分析及 E_4/E_6 对比,结果说明类腐植酸的芳香化程度比矿物源腐植酸高,其中非木原料(麦草、竹子)样品的芳香化程度最高,分子量更小。

(3) 红外光谱和固体核磁测定结果表明,类腐植酸与矿物源腐植酸均具有腐植酸特征官能团,且分子结构非常相似,但类腐植酸中的芳香族结构、木质素衍生物

以及多糖等结构更多,含氧官能团含量较低。

(4) 小麦种子萌发实验结果显示,HALS和HALZ在浓度20~40 mg/L区间内显示出良好的促进种子萌发的能力,但在高浓度下会抑制种子生长。

参考文献

- [1] Skokanova M, Dercova K. Origin and structure of humic acids [J]. *Chemicke Listy*, 2008, 102(4): 262–268.
- [2] 宋海燕, 尹友谊, 宋建中. 不同来源腐植酸的化学组成与结构研究 [J]. *华南师范大学学报(自然科学版)*, 2009, (1): 61–66.
Song H Y, Yin Y Y, Song J Z. The chemical composition and structure of humic acids from different environments [J]. *Journal of South China Normal University (Natural Science Edition)*, 2009, (1): 61–66.
- [3] 郭瑾, 马军. 松花江水中天然有机物的提取分离与特性表征 [J]. *环境科学*, 2005, (5): 77–84.
Guo J, Ma J. Characterization of isolated fractions of NOM from songhua river [J]. *Environmental Science*, 2005, (5): 77–84.
- [4] 田充, 王江涛, 袁秀堂, 等. 海洋沉积物中腐植酸的提取与紫外吸收光谱特征 [J]. *海洋环境科学*, 2012, 31(6): 821–823, 829.
Tian C, Wang J T, Yuan X T, et al. Extraction and ultraviolet absorption spectra of humic acid in marine sediment [J]. *Marine Environmental Science*, 2012, 31(6): 821–823, 829.
- [5] Amir S, Jouraiphy A, Meddich A, et al. Structural study of humic acids during composting of activated sludge–green waste: elemental analysis, FTIR and ^{13}C NMR [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 177(1/2/3): 524–529.
- [6] Ma H Z, Allen H E, Yin Y J. Characterization of isolated fractions of dissolved organic matter from natural waters and a wastewater effluent [J]. *Water Research*, 2001, 35(4): 985–996.
- [7] Yao Y Y, Wang X Q, Yang Y C, et al. Molecular composition of size-fractionated fulvic acid-like substances extracted from spent cooking liquor and its relationship with biological activity [J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(24): 14752–14760.
- [8] 冯静静, 许英梅, 何德民, 等. 腐植酸的提取方法及其应用性能

- 研究进展 [J]. 辽宁化工, 2018, 47(11): 1131–1133, 1137.
- Feng J J, Xu Y M, He D M, et al. Research progress in extraction methods and application performance of humic acid [J]. Liaoning Chemical Industry, 2018, 47(11): 1131–1133, 1137.
- [9] 赵励军. 不同来源腐植酸促进植物生长活性及作用机理研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨理工大学, 2005: 15.
- Zhao L J. A research on that the humic acid of different sources accelerates the growth activity of plants and it's mechanism of action [D]. Harbin: Harbin University of Science and Technology, 2005: 15.
- [10] 张常书, 左文. 黄腐酸的生物活性及应用研究 [J]. 磷肥与复肥, 2018, 33(3): 21–23.
- Zhang C S, Zuo W. Research on biological activity and application of fulvic acid [J]. Phosphate & Compound Fertilizer, 2018, 33(3): 21–23.
- [11] Beyer L, Sieling K, Pingpank K. The impact of a low humus level in arable soils on microbial properties, soil organic matter quality and crop yield [J]. Biology and Fertility of Soils, 1999, 28(2): 156–161.
- [12] Dai J Y, Wei R, Xing B S, et al. Characterization of fulvic acid fractions obtained by sequential extractions with pH buffers, water, and ethanol from paddy soils [J]. Geoderma, 2006, 135: 284–295.
- [13] 张静静. 城市污泥中腐植酸的提取工艺及其性能研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2016: 10.
- Zhang J J. Study on the extraction and properties of humic acid from municipal sludge [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2016: 10.
- [14] Riebel M, Sabel A, Claus H, et al. Antioxidant capacity of phenolic compounds on human cell lines as affected by grape-tyrosinase and botrytis-laccase oxidation [J]. Food Chemistry, 2017, 229(15): 779–789.
- [15] Feng L, Xu J, Kang S, et al. Chemical composition of microbe-derived dissolved organic matter in cryoconite in tibetan plateau glaciers: insights from fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry analysis [J]. Environmental Science & Technology, 2016, 50(24): 13215–13223.
- [16] 张水花, 李宝才, 张惠芬, 等. 年青褐煤 H_2O_2 降解生产黄腐酸工艺及产物性质 [J]. 化学工程, 2010, 38(4): 85–88.
- Zhang S H, Li B C, Zhang H F, et al. Oxidation degradation technology with H_2O_2 for producing fulvic acids from brown coal and properties of products [J]. Chemical Engineering (China), 2010, 38(4): 85–88.
- [17] 焦元刚. 从风化煤中提取黄腐酸 [D]. 北京: 北京交通大学, 2006: 22.
- Jiao Y G. Study of the extraction of fulvic acid from weathered coal [D]. Beijing: Beijing Jiaotong University, 2006: 22.
- [18] Baddi G A, Albuquerque J A, Gonzalez J, et al. Chemical and spectroscopic analyses of organic matter transformations during composting of olive mill wastes [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2003, 54(1): 33–44.
- [19] Filcheva E, Hristova M, Nikolova P, et al. Quantitative and qualitative characterisation of humic products with spectral parameters [J]. Journal of Soils & Sediments, 2018, 18(8): 2863–2867.
- [20] Zhang J M, Chi F Q, Wei D, et al. Impacts of long-term fertilization on the molecular structure of humic acid and organic carbon content in soil aggregates in black soil [J]. Pubmed, 2019, 9 (1): 11908.
- [21] Aguiar N O, Olivares F L, Etelvino H, et al. Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages [J]. Plant and Soil, 2013, 362(1/2): 161–174.
- [22] Santos E B H, Duarte A C. The influence of pulp and paper mill effluents on the composition of the humic fraction of aquatic organic matter [J]. Water Research, 1998, 32(3): 597–608.
- [23] Adani F, Genevini P, Tambone F, et al. Compost effect on soil humic acid: a NMR study [J]. Pubmed, 2006, 65(8): 1414–1418.
- [24] 朱辉. 黄腐酸类物质化学组成分析及其对小麦种子萌发的影响 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2015: 32.
- Zhu H. Research on the chemical components of fulvic acid materials and the effect of wheat germination [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2015: 32.
- [25] Duarte R M B O, Santos E B H, 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.