

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

子計畫一：土壤及井水中之腐植酸及其錯合砷之分析(2/3)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC94-2745-B-040-003-URD

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

執行單位：中山醫學大學職業安全衛生學系

計畫主持人：陳建良

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 5 月 28 日

子計畫 1 -- 土壤及井水中之腐植酸及其錯合砷之分析

第二年期中報告

一. 工作項目

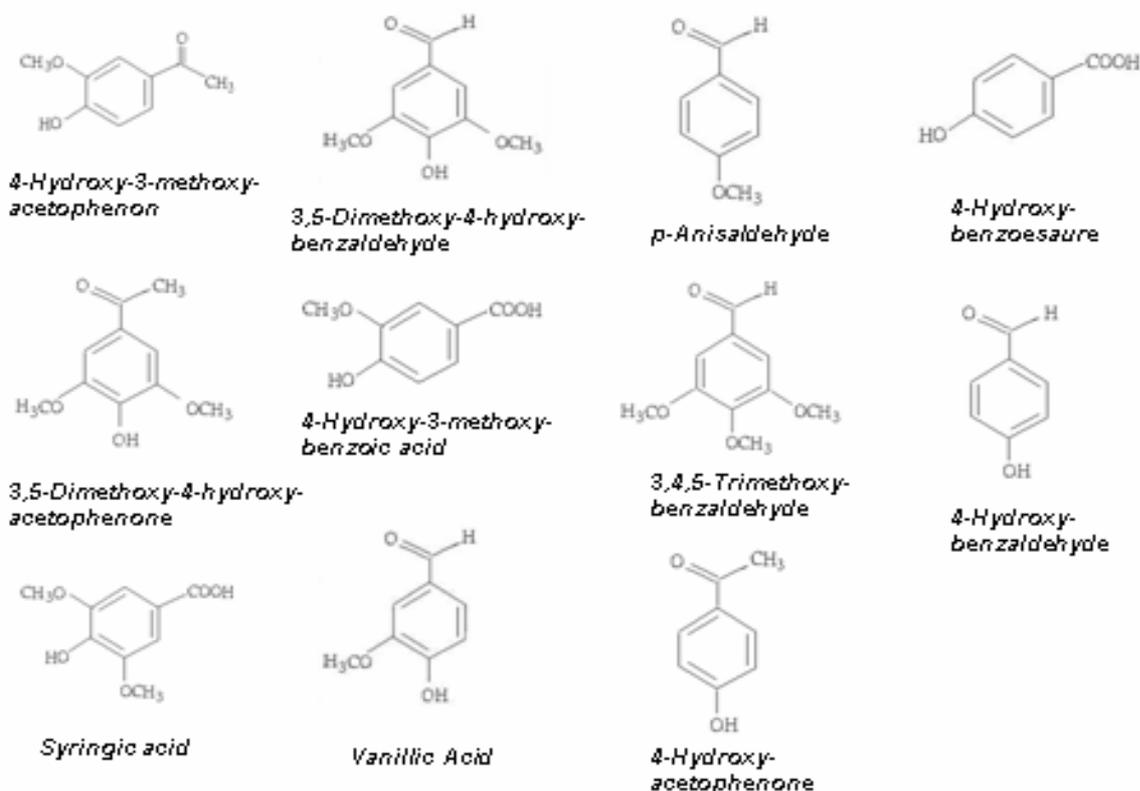
本子計畫第二年完成毛細管電泳法分析腐植酸可能裂解之 11 種單體的最佳化條件，以 3 種腐植酸聚合物為樣品，經消化斧裂解後分析單體組成及含量，並且輔以光譜分析及比較 12 種腐植酸聚合物之可能化學結構。

二. 研究成果

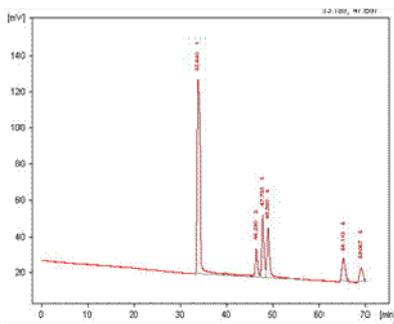
(A) 11 種裂解單體之毛細管電泳分析:

溶於甲醇之 11 種腐植酸單體樣品的化學結構列於下圖一。

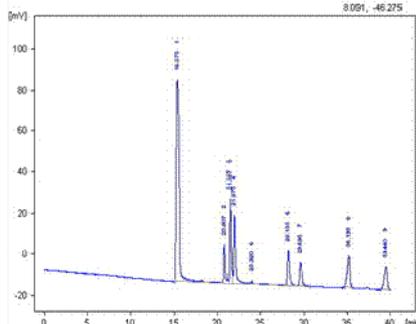
圖一 11 種腐植酸單體的化學結構



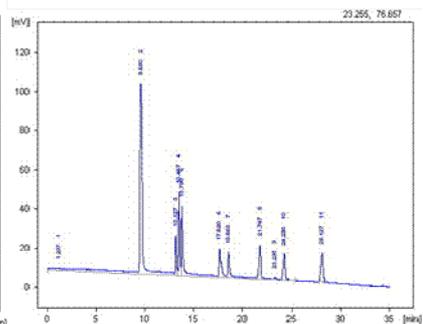
在操作電壓 10、15、20、25 及 30 kV 條件下，嘗試配製沖提液為 115 mM pH 8.08、8.45 及 8.80 的 Tris 緩衝溶液以及 0.75 mM pH 8.08、8.40 及 8.82 的 EDTA 緩衝溶液，其結果皆不如 boric acid 所建立的緩衝溶液系統；下圖是 Boric acid 緩衝溶液 90mM pH7.92 在 10~30 KV 操作電壓下的層析圖，其中以 Volt 20 KV 為最佳。



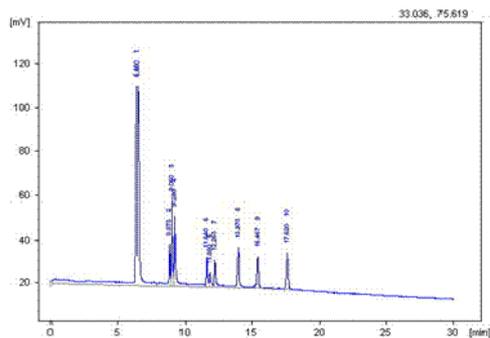
Boric acid 90mM pH7.92 Volt10 KV



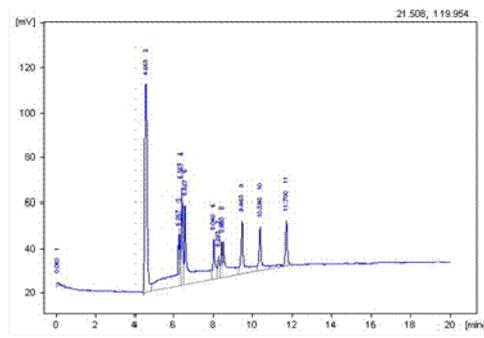
Boric acid 90mM pH7.92 Volt15 KV



Boric acid 90mM pH7.92 Volt20 KV

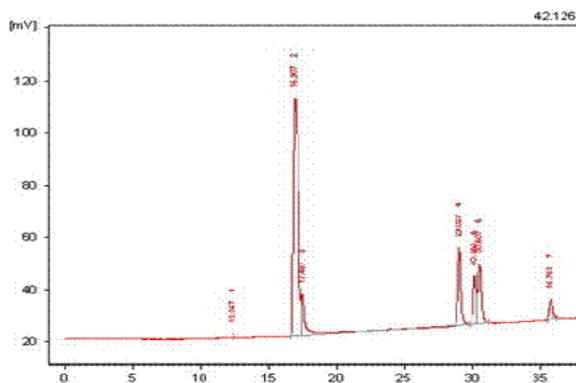


Boric acid 90mM pH7.92 Volt25 KV

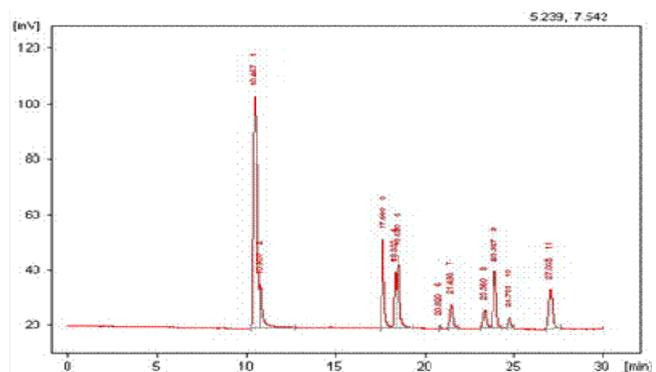


Boric acid 90mM pH7.92 Volt30 KV

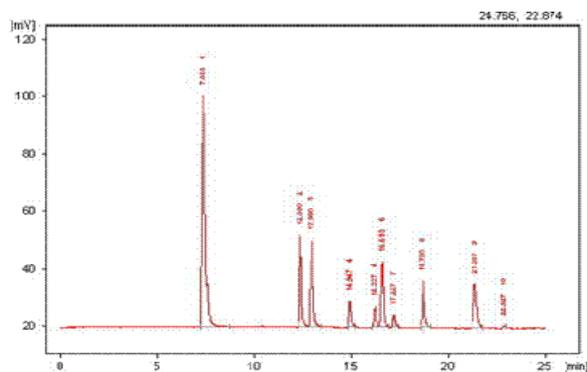
下圖是 Boric acid 緩衝溶液 90mM pH 8.40 在 10~30 KV 操作電壓下的層析圖，其中以 Volt 20 KV 為最佳。



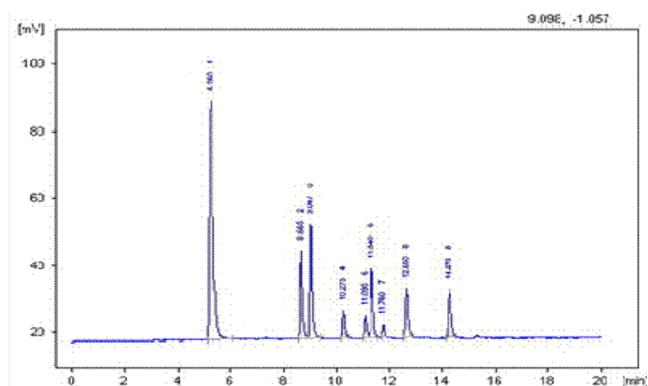
Boric acid 90mM pH8.40 Volt15 KV



Boric acid 90mM pH8.40 Volt20 KV

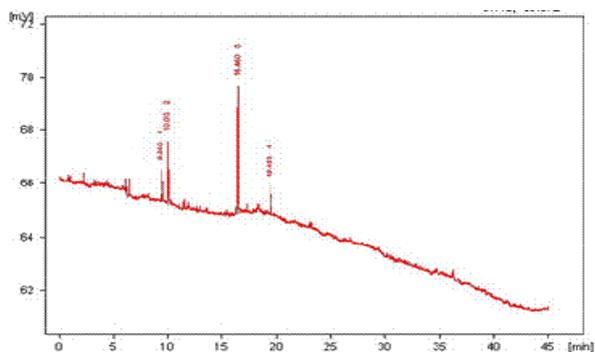


Boric acid 90mM pH8.40 Volt25 KV

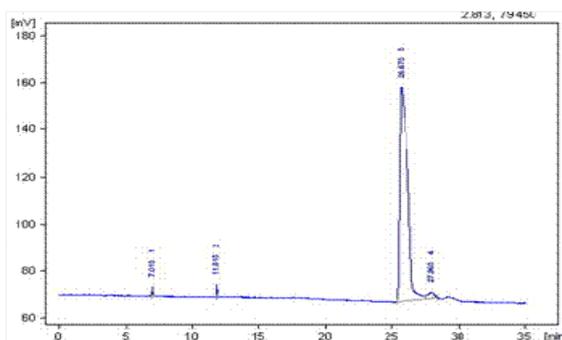


Boric acid 90mM pH8.40 Volt30 KV

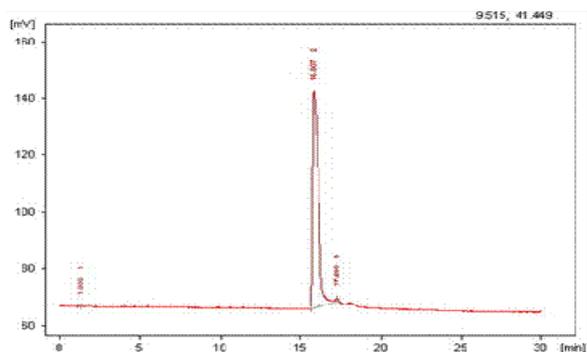
下圖是 Boric acid 緩衝溶液 90mM pH 8.80 在 10~30 KV 操作電壓下的層析圖，其中以 Volt 25 KV 為最佳。



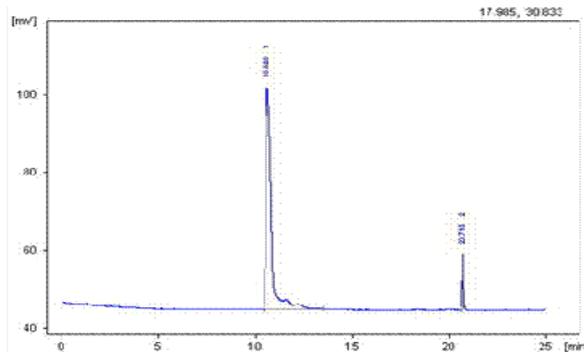
Boric acid 90mM pH8.80 Volt 10 KV



Boric acid 90mM pH8.80 Volt 15 KV

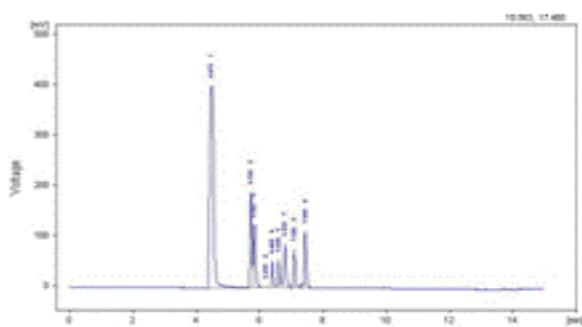


Boric acid 90mM pH8.80 Volt 20 KV

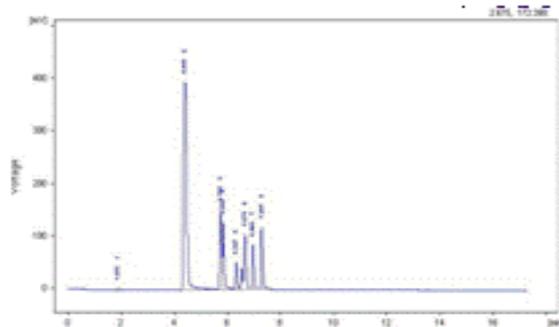


Boric acid 90mM pH8.80 Volt 25 KV

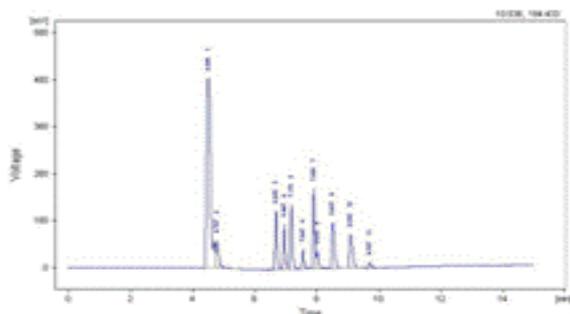
比較以上三組層析圖初步得知 Boric acid 緩衝溶液以 90mM pH 8.40 為最佳，據此再嘗試 90 mM pH 8.0, 9.0 及 10.0，在下圖表示其 20 KV 操作電壓下之層析圖，結果以 pH 9.0 為最佳。



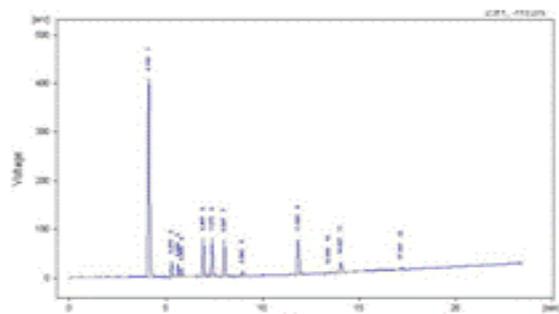
Boric acid 90mM pH8.0 Volt 20 KV



Boric acid 90mM pH8.4 Volt 20KV

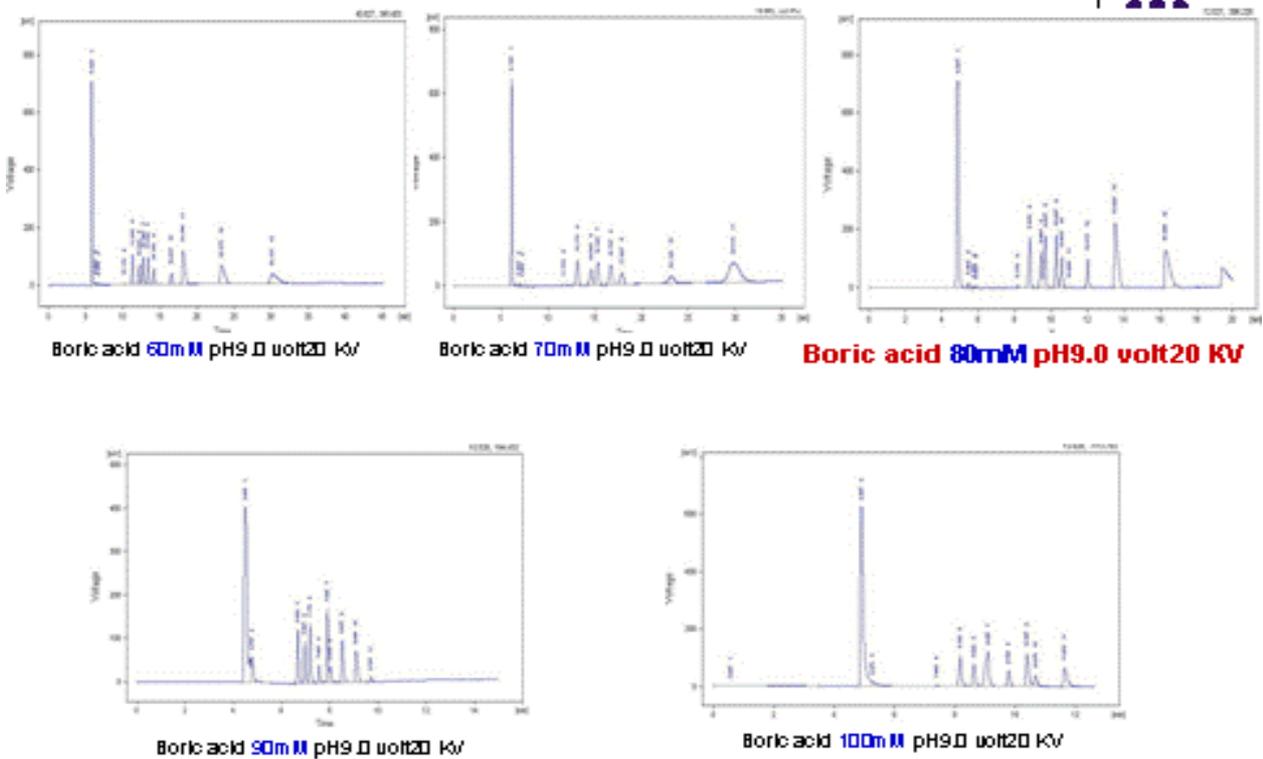


Boric acid 90mM pH9.0 Volt 20 KV

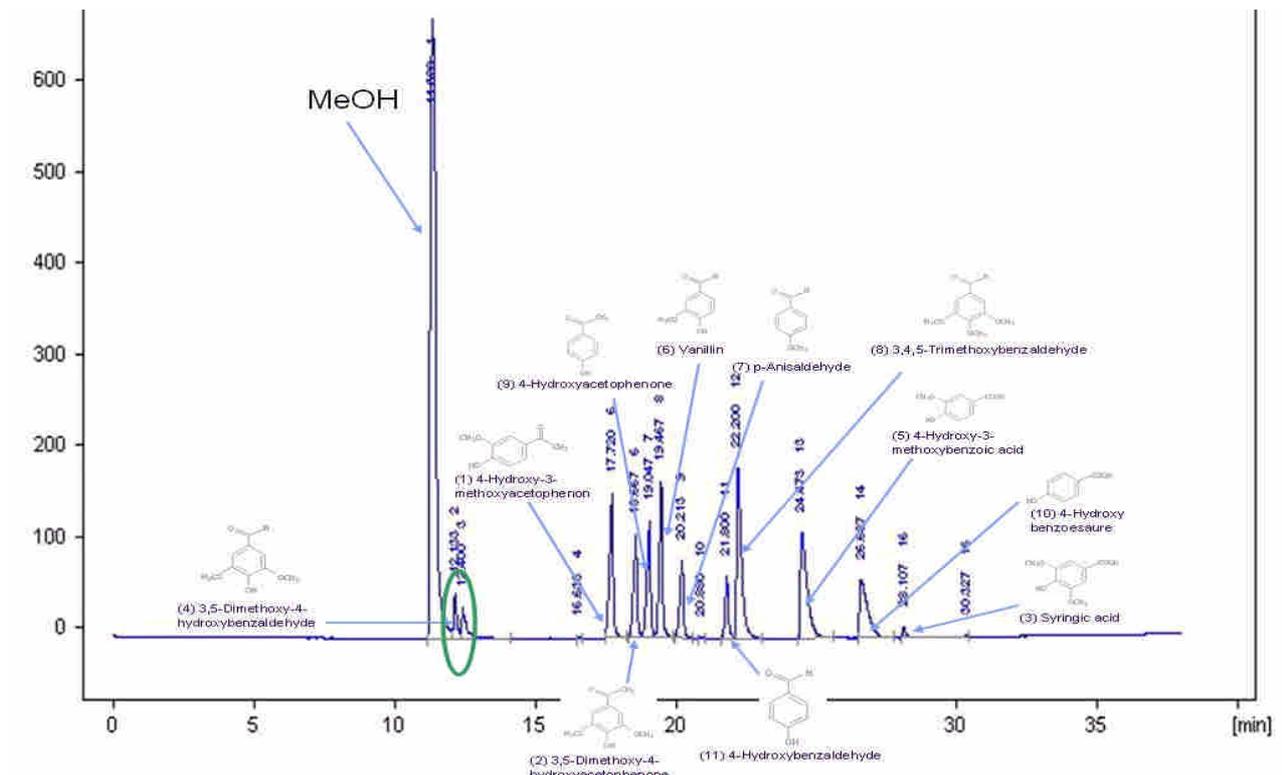


Boric acid 90mM pH10.0 Volt 20 KV

再嘗試 pH 9.0 濃度範圍 60~100 mM 的 Boric acid 緩衝溶液，在下圖表示其 20 KV 操作電壓下之層析圖，結果以 80 mM 為最佳。



下圖即是在此最佳條件下 11 種腐質酸單體的滯留順序，未來也將以此為條件對裂解後之腐植酸進行單體分析。

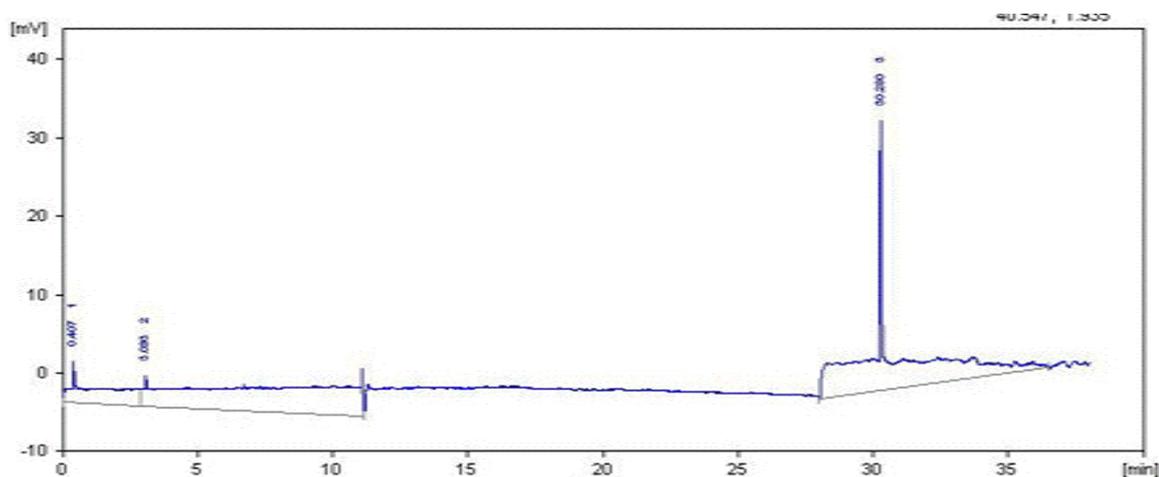


(B) 3 種腐植酸聚合物之裂解

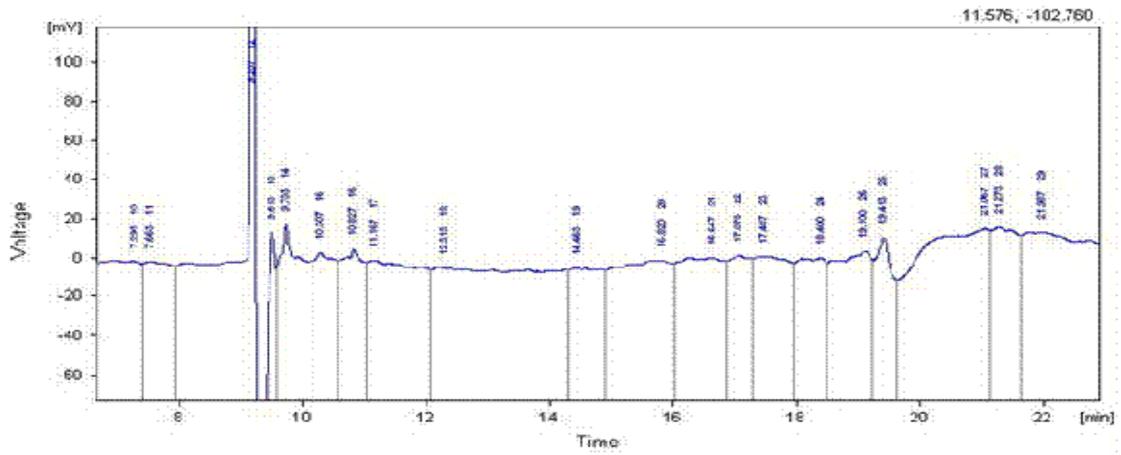
腐植酸樣品可經以下反應裂解成寡聚合或單體，再由已最佳化之毛細管電泳系統分析。

- (1) 25 mg 土壤或井水樣品置於密封的鐵氟龍小瓶，再以鋼製的 bomb 保護。
 - (2) 將 1 克 CuO、ammonium iron(II) sulfate hexahydrate $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ 75 mg、8% hydroxide sodium 7ml 等加入樣品中，以氮氣壓力密封。
 - (3) 將 bomb 置於攝氏 150 度烤箱 4 小時，此時，CuO 的氧化作用便開始。
 - (4) 經冷卻後，將反應產物及以 4% NaOH 30ml 清洗 bomb 後一齊置入 50ml 的離心管內。
 - (5) 離心之後的上澄清液要保留下來，下沉澱物以 4% NaOH 10ml 清洗。
 - (6) 上澄清液和清洗沉澱物後之萃取液混合，以 6M HC 使其酸性化至 pH 值為 1。
 - (7) 減壓濃縮後之固體，經乙醚萃取溶解。乙醚蒸發後，其固體殘渣以 5ml 甲醇溶解之。
 - (8) 甲醇溶液以 22um 的濾紙過濾，放入密封小瓶中，置於氮氣壓下、攝氏 4°C 黑暗中。
- (a) 購自 Aldrich 再酸鹼純化後樣品：

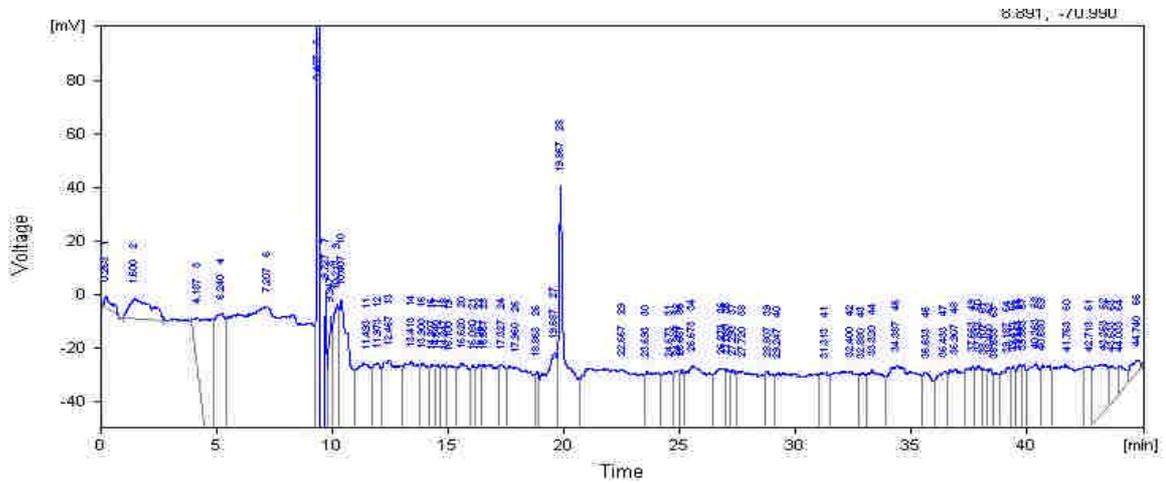
腐植酸經裂解後注入電泳系統分析，計算得到約有 67.2% (w/w) 的單體組成，此單體有可能只是 3,4,5-Trimethoxybenzaldehyde，也有可能是其它單體經裂解步驟後轉成單一單體，但這方面疑慮經確認實驗 (d) 證實並沒有因裂解步驟轉成單一單體的現象。



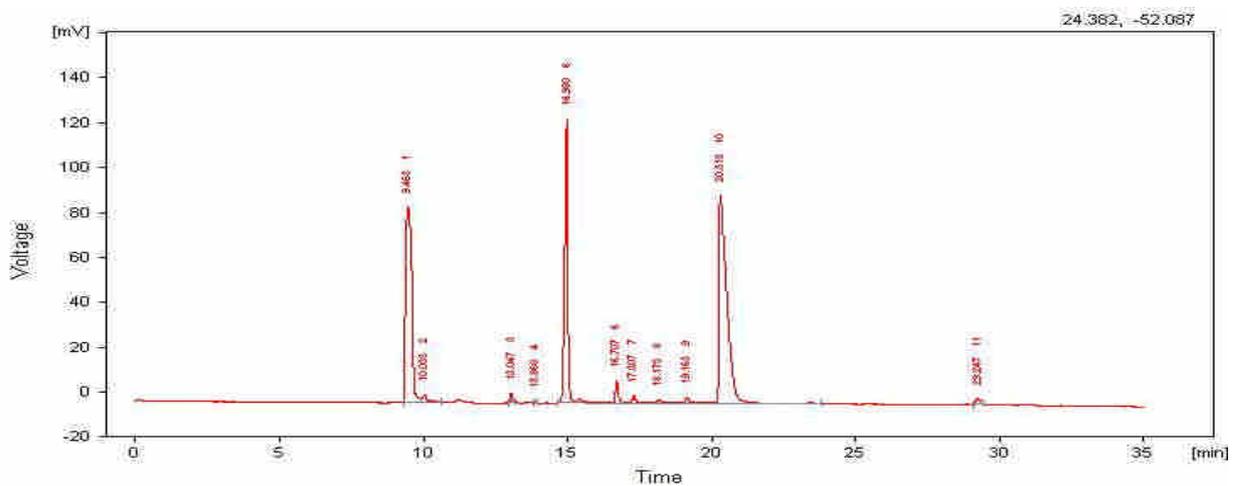
- (b) 台灣西南沿海土壤樣品酸化沈澱，再以苯及乙酸乙酯萃取後，減壓乾燥至固體：
- 計算得到約有 3,5-Dimethoxy-4-hydroxybenzaldehyde (42.3%) 以及 4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid (39.6%)。



(c) 美洲土壤樣品，經酸化沈澱後，再以苯及乙酸乙酯萃取後，減壓乾燥至固體：
經計算得到約有 78.9 % (w/w) 的單體組成，此單體可能 4-Hydroxy-3-methoxy-
benzoic acid 255.583。



(d) 三種添加腐質酸單體樣品：
4-Hydroxy-3-methoxyacetophenon; p-Anisaldehyde; 4-Hydroxybenzoesaure 三種單體標準液
添加於消化槽內，經消化萃取後的回收率分別是 90, 86, 94%。



(C) 12 種腐質酸之光譜分析

取 5 毫克腐植酸樣品，加入 180 μL 1M 的氫氧化鈉溶液溶解之，再以水稀釋至 100 毫升，即可以 UV-VIS 分光光譜儀分析之，下表一是 12 種腐植酸樣品的來源，表二是其在 250, 272, 365, 465 及 665 nm 的吸收度值以及相互間比值。

表一：

編號	樣品來源及處置
1	購自 Aldrich，並經酸鹼再純化。
2	Protocatechuic acid 單體合成
3	台灣鹽水鎮井水經 XAD7 吸附後，以 MeOH 進行 Soxhlet 萃取
4	台灣鹽水鎮井水經 XAD7 吸附，NaOH 沖洗脫附，酸化離心後，取澄清液。
5	美洲土壤樣品，經酸化沈澱後，再以苯及乙酸乙酯萃取後，減壓乾燥至固體
6	台灣西南沿海土壤樣品，經酸化沈澱後，再以苯及乙酸乙酯萃取，減壓乾燥至固體
7	同 5
8	同 6
9	Gallic acid 單體合成
10	台中農試所液狀腐植土
11	台中農試所粒狀腐植土
12	台中農試所粉狀腐植土

表二：吸收度值

樣品	$A_{465 \text{ nm}} / A_{665 \text{ nm}}$	$A_{250 \text{ nm}} / A_{365 \text{ nm}}$	$A_{272 \text{ nm}}$
1	$-0.0166 / -0.0839 = 0.1979$	$0.3651 / 0.0909 = 4.0165$	0.3067
2	$-0.0211 / -0.0862 = 0.24477$	$0.5614 / 0.1082 = 5.2134$	0.4837
3	$-0.0731 / -0.0930 = 0.7860$	$0.0097 / -0.0527 = -0.1840$	-0.0110
4	$-0.0696 / -0.0936 = 0.7435$	$0.1391 / -0.0352 = -3.9517$	0.0779
5	$0.1512 / -0.0575 = -2.6295$	$1.2702 / 0.5142 = 2.3470$	1.1365
6	$0.0244 / -0.0776 = -0.3144$	$0.4811 / 0.1692 = 2.8433$	0.4187

7	$0.1426/-0.0597 = -2.3886$	$1.2790/0.5023 = 2.5462$	1.1292
8	$0.0281/-0.0768 = -0.3658$	$0.5346/0.1790 = 2.9865$	0.4521
9	$0.0066/-0.0805 = -0.0819$	$0.5120/0.1425 = 3.5929$	0.4464
10	$-0.0590/-0.0913 = 0.6462$	$0.0576/-0.0259 = -2.2239$	0.0326
11	$0.1427/-0.0282 = -5.0602$	$1.0211/0.3964 = 2.5784$	0.9205
12	$0.0914/-0.0518 = -1.7644$	$0.8812/0.3340 = 2.6383$	0.8165

比值 $A_{465\text{ nm}} / A_{665\text{ nm}}$ 是與平均分子量以及氧原子在分子中比例有關，此值若較高，表示此分子量較小以及較高比例的氧含量。由表二觀之， $A_{465\text{ nm}}$ 與 $A_{665\text{ nm}}$ 皆為負值的有 1~4 及 10 號樣品，比值趨勢應為樣品 $3 < 4 < 10 < 2 < 1$ ，其餘樣品的 $A_{465\text{ nm}}$ 為正值而 $A_{665\text{ nm}}$ 為負值，無法以 $A_{465\text{ nm}} / A_{665\text{ nm}}$ 比較出趨勢，所以忽略 $A_{665\text{ nm}}$ 只以 $A_{465\text{ nm}}$ 大小排列出：樣品 $5 > 7 = 11 > 12 > 8 > 6 > 9$ ，故綜合觀之：高分子量及小含氧量的趨勢為鹽水鎮井水 > 台中農試所液狀腐植土 > Aldrich 商業樣品 > protocatechuic acid 合成樣品 > gallic acid 合成樣品 > 台灣西南沿海土壤樣品 > 台中農試所固狀腐植土 > 美洲土壤樣品。

比值 $A_{250\text{ nm}} / A_{365\text{ nm}}$ 是與芳香族團比例有關，此值越大芳香族團比例越小，即長鏈脂肪族比例越大，由表二得知，除了樣品 2, 3 及 10 號的 $A_{365\text{ nm}}$ 為負值不予比較外，其餘樣品的芳香族團比例由大排至小為：美洲土壤樣品 > 台中農試所固狀腐植土 > 台灣西南沿海土壤樣品 > gallic acid 合成樣品 > Aldrich 商業樣品 > protocatechuic acid 合成樣品。

以上兩比值之結果似乎透露出，低分子量、高含氧量的腐質酸樣品，其芳香族團的比例也越高，這是否表示苯環上取代基被氧化越嚴重，斷鏈成低分子量的寡聚合機率也越高；反之，高分子量的多聚合體，其苯環上取代基可能是長鏈烷基或短鏈多取代。

另外， $A_{272\text{ nm}}$ 也是與芳香族團比例有關，此值越大芳香族團比例越大，即長鏈脂肪族比例越小，由表二得知，芳香族團比例由大排至小為：美洲土壤樣品 > 台中農試所固狀腐植土 > 台灣西南沿海土壤樣品 > protocatechuic acid 合成樣品 > gallic acid 合成樣品 > Aldrich 商業樣品 > 井水樣品 > 台中農試所液狀腐植土。此趨勢大致也與上述相同。