نشریه علمی ترویجی مدیریت اراضی/ جلد ۷ / شماره ۱ / ۱۳۹۸
10.22092/lmj.2019.122299.134

بررسی روش‌های اندازه‌گیری هیومیک اسید و فولویک اسید در مواد کودی

کریم شهبازی[۱]، مصطفی مارزی و شیدا طباخیان

دانشیار موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. **kshahabazi@swri.ir**

دانشجوی دکتری گروه علوم و مهندسی خاک، دانشگاه تهران. **mostafamarzi@ut.ac.ir**

کارشناس ارشد موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. **shidatabbakhian@yahoo.com**

دریافت: آبان ۱۳۹۷ و پذیرش: تیر ۱۳۹۸

چکیده

مواد هیومیک مخلوط‌های پیچیده و غیرهمگون با اندازه‌های مختلف می‌باشند که بوسیله واکنش‌های بیوشیمیایی و شیمیایی در طول فرآیند پوسیدن و تغییر شکل بقایای گیاهی و میکروبی تشکیل می‌گردند. افزایش استفاده از مواد هیومیک در کشاورزی باعث ایجاد علاقه‌مندی فزاینده در بین تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان و قانون‌گذاران برای یافتن روش دقیق و قابل کاربرد برای کمی‌سازی هیومیک و فولویک اسید در محصولات تجاری و مواد خام شده است. بدلیل اینکه هیومیک اسید دارای یک تعریف مشخص و ساختار شیمیایی ثابتی نمی‌باشد، پیدا کردن یک روش آنالیز برای کمی‌سازی دقیق آن بسیار مشکل می‌باشد. لکن، در حال حاضر چهار روش توسط آزمایشگاه‌های تجاری برای تخمین مقدار هیومیک و فولویک اسید، هومات‌ها و مشتقات هیومیک اسید (برای مثال عصاره هومات‌ها) استفاده می‌شود. اساس هر چهار روش بر پایه حلالیت مواد هیومیک در محلول‌های قلیایی رقیق استوار می‌باشد. این روش‌ها شامل یک روش رنگ‌سنجی کمی که بر اساس روش مهلیچ (۱۹۸۴) توسعه یافته است، روش حجم‌سنجی ISO 5073 که در حال حاضر بعنوان استاندارد ملی شماره ۱۱۰۹۴ منتشر شده است و دو روش وزن‌سنجی که یکی از آنها روش توسعه یافته بوسیله دپارتمان غذا و کشاورزی کالیفرنیا (CDFA) بوده و دیگری روشی کمی است که بعنوان "روش استاندارد جدید (NSM)" نام برده می‌شود. در روش رنگ‌سنجی و حجم‌سنجی، فولویک اسید و دیگر ترکیبات محلول در آب و قلیا شامل آمینواسیدها، پروتئین‌ها، قندها، اسیدهای چرب و دیگر مواد هیومیکی نیز استخراج خواهند شد، و در نتیجه در این دو روش مقدار هیومیک اسید به تنهایی تخمین زده نخواهد شد و هر چه مقدار این ترکیبات در نمونه بیشتر باشد میزان بیش برآورد مقدار هیومیک اسید نیز بیشتر خواهد بود. روش NSM بر اساس روش استخراج هیومیک و فولویک اسید از مواد طبیعی می‌باشد که از اصلاح روش کلاسیک بدست آمده است. در این روش متمایز کردن فولویک اسید از ترکیباتی مانند پلی‌ساکاریدها، قندها، آمینواسیدها، پروتئینها، اسیدهای چرب، کربوهیدراتها، لیپیدها و غیره که ممکن است توسط یک محلول قلیایی قوی همراه با مواد هیومیکی استخراج گردند، امکان‌پذیر می‌باشد. این روش توسط انجمن بین المللی مواد هیومیک (IHSS) و انجمن تجارت مواد هیومیک (HPTA) پذیرفته شده و مبنای استاندارد ISO 19822 است. بنابراین روش NSM در حال حاضر بعنوان یک روش مرجع توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: هیومیک اسید، فولویک اسید، روشهای اندازه گیری، کودها تجار

---

[۱]- آدرس نویسنده مسئول: سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، موسسه تحقیقات خاک و آب.

مقدمه

مواد هیومیک[1] (HS) از اجزاء اصلی مواد آلی طبیعی[2] (NOM) در خاک، آب و همچنین ته نشست‌های آلی زمین‌شناسی از قبیل رسوبات دریاچه، پیت، زغال قهوه ای و شیل‌ها می‌باشند. رنگ قهوه‌ای بقایای گیاهی پوسیده بدلیل حضور مواد هیومیکی بوده و آنها در ایجاد رنگ قهوه ای یا سیاه در خاک سطحی مشارکت دارند. آنها از اجزاء اصلی مواد آلی طبیعی در آبهای سطحی بوده و در غلظت-های بالاتر می‌توانند باعث رنگ سیاه بخصوص در تالاب-های آب شیرین قهوه‌ای، دریاچه‌ها و نهرها گردند. مواد هیومیک از ترکیبات بسیار مهم خاک می‌باشند که بر روی خصوصیات شیمیایی و فیزیکی آن تأثیر داشته و باعث بهبود حاصلخیزی خاک می‌شوند. در سیستم‌های خاکی و آبی مواد هیومیک شیمی، چرخه و قابلیت دسترسی عناصر و همچنین انتقال و تخریب مواد سمی و مواد شیمیایی آلی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. مواد هیومیک مخلوط‌های پیچیده و غیرهمگون با اندازه‌های مختلف می‌باشند که بوسیله واکنش‌های بیوشیمیایی و شیمیایی در طول فرآیند پوسیدن و تغییر شکل بقایای گیاهی و میکروبی تشکیل می‌گردند. به این فرآیند هوموسی[3] شدن گویند. لیگنین گیاهی و محصولات حاصل از تغییر و تبدیلات آن و همچنین پلی ساکاریدها، ملانین، کاتین، پروتئین، لیپیدها، اسیدهای نوکلئیک، ذرات ریز زغال ترکیبات مهم مشارکت کننده در این فرآیند هستند (انجمن بین المللی مواد هیومیک، ۲۰۱۸).

بازار استفاده از مواد هیومیک در حال گسترش بوده و بعنوان طلای سیاه کشاورزی شناخته می‌شود. این مواد به‌طور روزافزونی برای استفاده در کشاورزی محبوبیت پیدا کرده‌اند (آسینگ و همکاران، ۲۰۰۹). مواد هیومیک بر اساس حلالیت‌شان درمحلول‌های استخراج کننده اسیدی یا قلیایی به سه جزء اصلی تقسیم می‌شوند که شامل: هیومیک اسیدها که در بر گیرنده جزء محلول در قلیا و غیر محلول در اسید، فولویک اسید، جزء محلول در قلیا و محلول در اسید و جزء هیومین که با اسید و قلیای رقیق استخراج نمی‌شود و در این محیط‌ها نامحلول می‌باشد. اجزاءمختلف موادهیومیک (هیومیک اسید، فولویک اسید و هیومین) به لحاظ بسیاری از خصوصیات شیمیایی نظیر ترکیب عنصری (برای مثال کربن (C)، هیدروژن (H)، نیتروژن (N)، اکسیژن (O))، تنوع گروه‌های عاملی و همچنین منبع تولید یکسان هستند، اما چیزی که باعث تفاوت بین بخش‌های مختلف مواد هیومیکی می‌شود اندازه ذرات در هر بخش، ساختمان مواد هیومیک (درجه آروماتیکی و آلیفاتیکی)، نسبت عناصر و کمیت گروه‌های عاملی است.

فولویک اسید ترکیبی با وزن مولکولی پایین (با وزن مولکولی کمتر از ۲۰۰۰ دالتون ومیانگین طول و قطر ماکرومولکول‌ها به ترتیب ۶۰ و ۲ نانومتر) و فعال از نظر کمیت گروه‌های عاملی می‌باشد؛ اما در مقابل هیومین شامل ترکیباتی با وزن مولکولی بالا (وزن مولکولی بیش از ۵۰۰۰ دالتون) نسبتاً با فعالیت کم از نظر گروه‌های عاملی است. هیومین غالباً آمیخته با مواد معدنی نظیر رس‌ها می‌باشد که این باعث بلوکه کردن گروه‌های عاملی این مواد می‌شود. این عوامل باعث می‌شود که هیومین در اکثر محلول‌ها غیرمحلول باشد. هیومیک اسید خصوصیاتی بینابین این دو گروه را دارد. گروه‌های عاملی فعال آن نسبت به فولویک اسید کمتر و نسبت به هیومین بیشتر است و از نظر وزن مولوکلی نیز بین ایندو قرار دارد (با وزن مولکولی بین ۲۰۰۰ تا ۵۰۰۰ دالتون)(استیونسون، ۱۹۸۲). هیومیک و فولویک اسید در مقادیر زیاد از هومات‌ها استخراج می‌شوند که بطور طبیعی درانواع سنگ‌های آلی با مواد هیومیک بالا یافت می-شوند (سیمندل و همکاران، ۲۰۰۱). این مواد شامل لئوناردیت[4] (لیگنیت[5] اکسید شده از رسوبات زمین‌شناسی

[1]Humic substances
[2]Natural organic matter
[3]Humification
[4]Leonardite
[5]Lignite

خاص در داکوتای جنوبی)، لیگنیت هوادیده[1] (برای مثال اکسید شده)، زغال سنگ نیمه بیتومینه[2] و انواع سنگ‌های کربن‌دار از قبیل گل‌سنگ[3]، شیل[4] و سنگ رسی[5] می‌باشند (هافمن و همکاران ۱۹۹۳؛ کوهانسکی، ۱۹۷۰). هومات‌ها بعنوان مواد خام بوده و عصاره آنها (برای مثال هیومیک و فولویک اسید) به بازار عرضه شده و به عنوان کود و بهساز خاک به جوامع کشاورزی و باغبانی فروخته می‌شود. نکته قابل توجه این است که هیومیک و فولویک اسیدهای متعلق به منابع مختلف و حتی انواع متعلق به یک منبع یکسان، می‌توانند از نظر ساختار بطور قابل توجهی با هم اختلاف داشته باشند (بطور مثال در درجه آروماتیکی[6]/آلیفاتیکی[7]) (ویلسن، ۱۹۸۷).

مواد هیومیکی با وجود اینکه نسبت به تخریب بیولوژیکی بسیار مقاوم هستند ولی از نظر شیمیایی بسیار فعال می‌باشند. بسیاری از داده‌ها بر روی هیومیک و فولولیک اسید و هیومین به خصوصیات متوسط و یک مجموعه بزرگ ترکیبات با ساختار و وزن مولکولی متنوع بر می‌گردد. ساختار و خصوصیات دقیق یک نمونه ماده هیومیک بستگی به منبع آب یا خاک و شرایط خاص استخراج دارد. با وجود این خصوصیات میانگین، هیومیک اسید، فولویک اسید و هیومین از منابع مختلف بطور قابل توجهی مشابه می‌باشند (انجمن بین المللی مواد هیومیک، ۲۰۱۸).

افزایش استفاده از مواد هیومیکی در کشاورزی باعث ایجاد علاقه‌مندی فزاینده در بین تولید کنندگان، مصرف کنندگان و قانون‌گذاران برای یافتن روش دقیق و قابل کاربرد برای کمی‌سازی هیومیک و فولویک اسید در محصولات و مواد خام شده است؛ بنابراین با توجه به اهمیت این مسئله، در این بررسی روش‌های مختلف اندازه-گیری هیومیک و فولویک اسید با تکیه بر مبانی روش‌ها و نقاط ضعف و قوت آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. امید است این تحقیق بتواند در افزایش دانش افرادی که با مواد هیومیکی سرکار دارند، بخصوص تولید کنندگان مواد کودی و کارشناسان آزمایشگاه که مسئولیت تجزیه این مواد را بر عهده دارند، مفید واقع شود.

استخراج، جداسازی و خالص سازی مواد هیومیک

برای اینکه بتوانیم مواد هیومیکی واقعی را اندازه-گیری نماییم نیازمند یک روش تجزیه مناسب می‌باشیم. روش تجزیه هیومیک شامل سه بخش استخراج، جداسازی و خالص‌سازی می‌باشد که جداسازی و خالص‌سازی برخلاف تصورعمومی، به عنوان بخش‌های جدایی ناپذیر روش‌های استخراج می‌باشند که هدف آن بدست آوردن ترکیبات هیومیکی واقعی است که از یکدیگر جدا شده و عاری از مواد ناخالص همراه یا آلاینده‌ها می‌باشند. واقعیت این است که هنگامی که از یک محلول قلیایی رقیق برای استخراج هیومیک اسید استفاده می‌شود، علاوه بر هیومیک اسید، فولویک اسید و برخی دیگر از ترکیبات محلول در قلیا نظیر پروتئین‌ها، اسیدهای چرب، لیگنوسولفونات‌ها و برخی از انواع کربوهیدرات‌ها استخراج می‌شوند؛ بنابراین درصورتیکه هیومیک اسید از فولویک اسید و سایر ترکیبات محلول جداسازی نشده و بوسیله روش مناسب خالص-سازی نشود، نمی‌توان مخلوط حاصله را هیومیک اسید تلقی نمود. همانطور که در صنایع شیمیایی نیز به مخلوط فرمیک اسید و دیگر اسیدهای آلی، فرمیک اسید نمی‌گویند مگر آنکه این اسید از دیگر اسیدها، جداسازی شده و به قدر کافی خالص گردد. موفقیت روش استخراج وابسته به استفاده از محلول عصاره‌گیر صحیح می‌باشد (تن، ۲۰۱٤).

عصاره‌گیرها[8]

در روش‌های اولیه استخراج مواد هیومیک از NaOH که بعنوان استخراج کننده‌ای ایده‌آل برای مواد

[1] Weathered lignite
[2] Subbituminous coal
[3] Mudstone
[4] Shale
[5] Claystone
[6] Aromaticity
[7] Aliphalicity
[8] Extractants

هیومیک پذیرفته شده بود، استفاده می‌شد. لاکن با پیشرفت شیمی هیومیک اسید در قرن بیستم، مناسب بودن این روش‌ها توسط تعدادی از دانشمندان به چالش کشیده شد (فلیگ و همکارن، ۱۹۷۵؛ دباخ و همکاران، ۱۹۶۳؛ برمنر، ۱۹۵۰؛ چامیناد، ۱۹٤۰). نگرانی‌هایی که در مورد ایجاد تغییرات مصنوعی توسط عصاره‌گیر NaOH وجود داشت باعث شد تا یک جستجوی جهانی برای یک عصاره‌گیر جدید که احتمالاً برای استخراج مواد هیومیک مناسبتر باشد، شروع شود. براساس نظر وایتد و تینزلی (۱۹٦٤) برای یک حلال مناسب مواد هیومیک ویژگی‌های زیر را می‌توان در نظر گرفت. نخست اینکه قطبیت وثابت دی‌الکتریک بالایی داشته باشد تا در پراکندگی مولکولهای باردار کمک کننده باشد. دوم اینکه اندازه مولکول یا اجزاء آن کوچک باشد تا اجزاء حلال بتوانند به ساختار موادهیومیک نفوذ نمایند. بعلاوه توانایی شکستن پیوندهای هیدروژنی موجود و ایجاد گروه‌های جایگزین برای تشکیل پیوندهای هیدروژنی هیومیک–حلال را داشته باشند. در نهایت باید توانایی غیرمتحرک کردن کاتیونهای فلزی را نیز داشته باشند؛ زیرا این کاتیون‌ها اگر به مقدار کافی در نمونه وجودداشته باشند از پراکندگی ذرات جامد جلوگیری می‌کنند (هیز، ۱۹۸۵). استفاده از حلال مناسب به استخراج کامل کمک خواهدکرد. استیونسون (۱۹۹٤) عقیده داشت که یک روش استخراج ایده‌آل بایستی شرایط زیرراداشته باشد.

۱. بایستی منجر به جداسازی مواد بدون تغییر در آنها گردد.

۲. مواد هیومیک استخراج شده عاری از ناخالصی-های معدنی از قبیل رس و کاتیون‌های چند ظرفیتی باشند.

۳. استخراج کامل یا نزدیک به آن باشد تا ما مطمئن شویم که مواد هیومیک استخراج شده شامل جزءهای مختلف از تمام دامنه وزن ملکولی می‌باشد.

٤. روش قابل کاربرد برای تمام خاک‌ها باشد.

اجتناب از استخراج ناخالصی‌های آلی و معدنی تقریباً غیر ممکن است. لاکن این موضوع در خالص‌سازی بایستی حل گردد و موضوع استخراج نمی‌باشد. سه معیار دیگر را می-توان بصورت زیر خلاصه نمود (فلیگ و همکارن، ۱۹۷۵؛ برمنر، ۱۹٥٤):

۱. واکنشگر نبایستی بر ماهیت فیزیکی و شیمیایی مواد هیومیک استخراج شده تاثیری داشته باشد.

۲. واکنشگر بایستی قادر باشد بطور کمی مواد هیومیکی را از خاک خارج یا جداسازی نماید.

در طی سال‌ها، تعداد زیادی حلال‌های معدنی، انواع حلال‌های آلی و چند عامل کمپلکس‌کننده آزمایش شده‌اند و چندین روش توسعه یافته است که در حال حاضر برای استخراج و جداسازی مواد هیومیک از خاک و سایر بسترهای این مواد استفاده می‌شود. از جمله این روش‌ها می‌توان به روش تجزیه‌ای توسعه یافته توسط انجمن بین المللی مواد هیومیک[1] (هیز و همکاران، ۱۹۹۷)، انجمن علوم خاک آمریکا[2] (اشنیتز، ۱۹۸۲b)، استیونسون (۱۹۹٤)، تن (۱۹۹٦) و تعداد زیادی روش دیگر اشاره کرد. اگر تغییراتی که روش‌های مختلف برای افزایش مهارت در آنالیز انجام گرفته، نادیده بگیریم، عنصر کلیدی در تمام روش‌های فوق هنوز NaOH می‌باشد. مطالعاتی وجود دارند که نشان می‌دهند روش استفاده از NaOH در حد معینی قابل اعتماد برای هدف مورد نظر می باشد (تن و همکارن، ۱۹۹٤). این مشاهدات توسط اورلو (۱۹۸٥) که معتقد است که استخراج با NaOH محصولات هومیکی را تولید می‌کند که هم از جبنه کمی و هم از جنبه‌های کیفی قابل باز تولید است، تأیید شده است.

واکنشگرهای معدنی[3]

در طول سال‌های متمادی حلال‌های معدنی زیادی برای اثربخشی‌شان در استخراج ترکیبات هیومیک مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند (اشنیتز و همکاران ۱۹٥۹؛ استیونسون، ۱۹٦٥) و معمولا نتایج آنها در برآورده کردن

[1] International Humic Substances Society (IHSS)
[2] Soil Science Society of America (SSSA)
[3] Inorganic Reagents

دو شرط ذکر شده برای یک عصاره‌گیر ایده‌آل متفاوت بوده است. بعضی از واکنشگرها، برای مثال بازهای رقیق می توانند شرط استخراج کمی جزء هیومیک را بر آورده سازند. لیکن همه این بازها مشکوک به تغییر خواص فیزیکی و شیمیایی مواد هیومیک استخراج شده می‌باشند (فلیگ و همکارن، ۱۹۷۵). در حال حاضر نیز یکی از موضوعات مهم تحقیقات، احتمال ایجاد تغییرات مصنوعی توسط استخراج کننده‌ها می‌باشد. تعدادی از واکنشگرهای معدنی که برای استخراج استفاده می‌شوند در جدول ۱ آورده شده است. عقیده دانشمندان بر این است که از میان واکنشگرهای لیست شده، NaOH برای برآورده کردن دو شرط ذکر شده برای یک عصاره‌گیر ایده ال نسبت دیگر مواد شیمیایی لیست شده مناسبتر می‌باشد. استفاده از NaOH را می‌توان تا اولین تلاش‌ها برای استخراج هیومیک اسید بوسیله دوبرنیر، آچارد، مولدر و برزیلیوس و دیگر پیشگامان دانش مواد هیومیک دنبال نمود. استخراج کننده NaOH سالهاست که بعنوان یک روش استخراج بطور گسترده پذیرفته شده و استفاده می‌شود (تن، ۲۰۱٤). مکانیسم عمل عصاره‌گیرهای لیست شده در استخراج مواد هیومیک را می‌توان به دو شکل توضیح داد. دسته‌ای از عصاره‌گیرها که قلیایی بوده و pH بالا دارند، از طریق افزایش بارهای منفی سطح ذرات باعث ایجاد دافعه بین ذرات شده و موجب پراکندگی می‌شوند (مواد آلی خاک و در درجات بسیار بالاتر مواد هیومیک دارای مقادیر بسیار بالایی بارهای وابسته به pH هستند و افزایش pH بار سطحی این مواد را ممکن است تا چندین برابر افزایش دهد). غلیظ‌تر کردن محلول قلیایی برای این منظور کمک کننده خواهد بود اما ممکن است خطای حاصل از واکنش‌های اکسیداسیونی در این رابطه مسئله مهمی باشد که باید مورد توجه قرار گیرد. بعلاوه وجود سدیم در این عصاره‌گیرها موجب افزایش ESP شده و وقتی که مقدار آن به بیش از ۱۵ افزایش می‌یابد به کمک خواهد کرد. بایستی دقت نمود که افزایش غلظت عصاره‌گیر ممکن است اثر عکس بر داشته باشد. افزایش غلظت عصاره‌گیر موجب افزایش EC محلول عصاره‌گیر می‌شود و این افزایش باعث انعقاد محلول می‌شود (ESP بالا و EC پایین بهترین شرایط برای دیسپرس کردن یک سیستم کلوئیدی انعقاد یافته است). مکانیسم عمل سایر عصاره‌گیرها مثل انواع کیلیت‌کننده‌ها تشکیل کمپلکس با کاتیون‌های چند ظرفیتی است که بارهای مواد هیومیک را خنثی می‌کنند و آنها را به کلوئیدهای غیر آلی نظیر رس‌ها پیوند می‌دهند. واضح است هنگامی که عصاره‌گیر این کاتیون‌ها را بلوکه کند، مواد هیومیک آزاد شده و در محلول معلق می‌شوند.

جدول ۱- واکنشگرهای معدنی استفاده شده برای استخراج مواد هیومیک

بازها و نمک ها	اسیدها
0.1 N NaOH	0.025 N HF
0.5 N NaOH	1% H_3BO_3
0.1 M Na_2CO_3	
0.5 M Na_2CO_3, pH 10.5	
0.2 M Na citrate, pH 7.0	
0.1 M NaF	
0.1 M $Na_4P_2O_7$, pH 7.0	
0.1 M $Na_4P_2O_7$, pH 9–10	
0.2 M Na_2-EDTA	
0.1 M $Na_2B_4O_7$	
Urea	

امروزه اگرچه برخی اصلاحات مطابق با استانداردهای جدید در روش اولیه استخراج اتفاق افتاده است ولی مبانی بدون تغییر مانده است. عقیده بر این است که NaOH موثرترین واکنشگر در جداسازی کمی مواد هیومیکی از خاک‌ها و سایر مواد دیگر می‌باشد. جداسازی آسان NaOH در طول فرآیند خالص‌سازی یکی دیگر از

مزیت‌های آن می‌باشد. لاکن استفاده از این واکنشگر مشکوک به ایجاد اکسیداسیون خودکار مواد هیومیکی می‌باشد و هیومیک اسید استخراج شده بوسیله NaOH از نظرمحتوای C، N و O با هیومیک اسید استخراج شده بوسیله دیگر واکنشگرها متفاوت است (هیز، ۱۹۸۵). برای غلبه بر این مشکل، معمولا توصیه می‌شود استخراج تحت اتمسفر گاز N_2 انجام گیرد (هیز، ۱۹۸۵؛ اشنیتزر، ۱۹۸۲b؛ چودری و استیونسون، ۱۹۵۷). تلاش‌های صورت گرفته توسط انجمن بین المللی مواد هیومیک برای استاندارد کردن روش‌های استخراج مفید بوده است. در روش استفاده از NaOH، استفاده از یک محلول 0.1 M NaOH توصیه شده است زیرا این محلول نسبت به 0.5 M NaOH ضعیفتر بوده (تن، ۱۹۹۶؛ پرس و فلبک، ۱۹۷۵) و به این ترتیب احتمال ایجاد تغییرات مضر را کاهش می‌دهد. برای بررسی‌های کیفی استفاده از محلول‌های خیلی ضعیف ۰/۰۱ تا ۰/۰۰۱ مولار نسبت به 0.1 M NaOH بهتر می‌باشد. بعنوان یک قاعده شناخته شده، هرچه محلول NaOH قوی‌تر باشد، مواد هیومیک بیشتری استخراج می شود، اما احتمال ایجاد تغییرات شیمیایی در ماده هیومیک استخراج شده بیشتر خواهد شد.

سدیم پیروفسفات ($Na_4P_2O_7$) اگر چه به اندازه NaOH در استخراج مواد هیومیکی کارایی ندارد، ولی غالباً برای استخراج مواد هیومیک از خاک‌هایی که محتوای سزکوئی‌اکسیدهای آنها بالاست استفاده می‌شود. عقیده بر این است که کلیت‌شدن فسفات با Al، Fe و دیگر یونهای سزکوئی‌اکسیدی فلزی انحلال مواد هیومیک را تحریک کرده و از این رو استخراج آنها را افزایش می‌دهند (کونونووا، ۱۹۶۱). همچنین دیگر عامل‌های کیلیت‌کننده مانند EDTA برای منظورهای مشابه در استخراج مواد هیومیک استفاده می‌شوند. برای افزایش کارایی عصاره‌گیر پیروفسفات، محلولی با pH حدود ۹ تا ۱۰ پیشنهاد شده است. با وجود این مقدار استخراج معمولاً به‌طور قابل ملاحظه‌ای کمتر از مقداری است که با NaOH بدست می‌آید. استفاده از پیروفسفات اغلب نیاز به حذف ترکیبات کلسیمی[1] در خاکهای آهکی ندارد، در صورتیکه این تیمار اولیه پیش‌فرآیندی لازم در استخراج به روش NaOH است. یکی از عیوب روش استخراج با $Na_4P_2O_7$ این است که خالص‌سازی ماده هیومیک استخراج شده بسیار دشوار است. مشخص شده است که فسفات با قدرت زیادی با مواد هیومیک تشکیل کیلیت می‌دهد. در یک مطالعه مقایسه‌ای کارایی NaOH و $Na_4P_2O_7$ در استخراج هیومیک اسید بوسیله اوریولی و کوروتو (۱۹۸۰) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که روش پیرو فسفات ظاهراً سه جزء با وزن مولکولی بالا که NaOH قادر به استخراج آن است را نمی تواند عصاره‌گیری نماید. استخراج با اسید برای مثال HCl که بوسیله اشنیتزر و همکارن[2] (۱۹۵۹) بکاربرده شده است، بطور تکنیکی فقط فولویک اسید را استخراج می‌کند؛ زیرا تنها جزء مواد هیومیک است که در اسید محلول است. طبق تعریف، هیومیک اسید در اسید نامحلول بوده و هیومیک اسیدی که توسط اشنیتزر و همکاران در بالا تشخیص داده شده‌اند احتمالاً محصولات تخریب بدلیل هیدرولیز بوسیله واکنشگر اسیدی می‌باشد.

واکنشگرهای آلی[3]

تمایل به اجتناب از ایجاد تغییرات شیمیایی در مواد استخراج شده، باعث روی آوردن به واکنشگرهای آلی در استخراج و جداسازی موادهیومیک شده است. انواع حلال‌های آلی آزمایش شده‌اند که برخی از آنها در جدول ۲ آمده است. این مواد به تنهایی یا بصورت مخلوط در غلظت‌های مختلف استفاده شده‌اند. تا کنون هیچ کدام از آنها رضایت بخش نبوده است. به نظر می‌رسد استفاده از حلال‌های آلی مشکلات بیشتری نسبت به حلال‌های معدنی ایجاد می‌کند. اشنیتزر و خان (۱۹۷۲) نه تنها ثابت کرده‌اند

[1] Decalcifying
[2] Schnitzer et al.
[3] Organic Reagents

که حلال‌های آلی عصاره‌گیرهای ضعیفی هستند بلکه در مقایسه با واکنشگرهای معدنی مانند NaOH که حذفشان ساده می‌باشد، حذف واکنشگرهای آلی در فرآیند خالص-سازی بسیار مشکل می‌باشد. احتمال برهم کنش آنها با مواد هیومیک، خالص سازی جزء هیومیک استخراج شده را بسیار مشکل می‌سازد. علاوه بر این، نه تنها احتمال ایجاد تغییرات شیمیایی افزایش می‌یابد بلکه احتمال تولید مصنوعات بدلیل اتصال واکنشگرهای آلی در ساختار مولکولی مولکول هیومیک نیز افزایش می‌یابد. هیز (۱۹۸۵) گزارش کرد که واکنشگرهای آلی مقادیر کمتری مواد هیومیک نسبت به حلال‌های معدنی استخراج می‌کنند. او نشان داد که اتیلن‌دی‌آمین[1] (EDA) یک حلال ضعیف می-باشد و تنها موقعی که استخراج بطور متوالی با EDA تکرار شده و مواد هیومیک استخراج شده با هم ترکیب گردند قابل مقایسه با ماده هیومیک استخراج شده با 0.5 M NaOH خواهد بود. همچنین داده‌های او نشان داد که حتی متیل سولفواکساید و دی‌میتیل فرمامید[2] (DMF) بطور قابل توجهی مواد هیومیک کمتری نسبت به EDA استخراج می‌کند. دلایل استخراج کمتر عصاره‌گیرهای آلی نسبت به انواع معدنی را می‌توان اینگونه تشریح نمود. این محلول‌ها ماهیتاً عصاره‌گیرهای ضعیفی هستند و برهمکنش بین حلال- حل‌شونده در این سیستم‌ها به اندازه‌ای قوی و پرانرژی نیست که بر پیوندهای هیدروژنی بین ماکرومولکول‌های مواد هیومیک غلبه نماید. در این حالت بخش‌های آبگریز مواد هیومیک به سمت لبه‌های بیرونی جهت‌دار شده و منجر به منقبض شدن ذره طی فرایند خشک شدن می‌شود. این ضعف ممکن است به خاطر پایین بودن خاصیت قطبی و ثابت دی‌الکتریک آنها باشد. ترکیب این محلول‌ها با محلول‌های دیگر باعث افزایش قدرت استخراج آنها می‌شود. بعلاوه اندازه بزرگ مولکول‌های این حلال‌ها نفوذ آنها به ساختار داخلی مواد هیومیک که با پیوندهای هیدروژنی پیوند یافته‌اند را محدود می‌نماید (هیز، ۱۹۸۵). بطور کلی معایب واکنشگرهای آلی شامل موارد زیر می باشد:

۱. تغییرات شیمیایی در ماده هیومیک استخراج شده.
۲. اسیدهای آلی همانند اسیدهای معدنی، شانس کمتری بعنوان واکنشگر استخراج‌کننده دارند زیرا هیومیک اسید در محیط‌های اسیدی محلول نیست.
۳. عصاره‌گیرهای ضعیفی هستند.
٤. در مقایسه با واکنشگرهای معدنی مانند NaOH که حذفشان ساده می‌باشد، حذف واکنشگرهای آلی در فرآیند خالص‌سازی بسیار مشکل می‌باشد.

عوامل کیلیت کننده آلی مانند استیل استن[3] برای استخراج ماده هیومیک کمتر مناسب می‌باشند؛ زیرا برای استخراج ماده هیومیک از خاک کارایی کمتری دارند (استیونسون، ۱۹۹٤). آب تمام شرایط لازم برای یک استخراج کننده مناسب را دارد ولی متاسفانه یک حلال و استخراج کننده بسیار ضعیف برای مواد هیومیک می‌باشد (استیونسون، ۱۹۹٤).

جدول ۲- واکنشگرهای آلی استفاده شده برای استخراج مواد هیومیک

اسیدها	غیر اسیدها	
Formic acid	Acetylacetone	Acetonitrile
Oxalic acid	Chloroform	Benzene
	Dimethylformamide (DMF)	Dichloromethane
	Dioxane	Dimethylsulfoxide (DMSO)
	Ethanol	Dodecylsulfate
	Ethylenediamine	Ether
	Hexamethylenetetramine	Formamide
	Phenol	Methylisobutyl ketone
	Tetrahydrofuran	Pyridine

[1]Ethylenediamine
[2]Dimethylformamide (DMF)
[3]Acetylacetone

خالص سازی هیومیک و فولویک اسید

پس از استخراج هیومیک و فولویک اسید با استفاده از عصاره‌گیرهای ذکر شده، ترکیبات نامحلول در قلیا دور ریخته شده و محلول شفاف تیره رویی که حاوی هیومیک و فولویک اسید می‌باشد جمع‌آوری می‌گردد. سپس این محلول برای جدا کردن هیومیک اسید با اضافه کردن HCl اسیدی می‌گردد. محلول رویی حاوی فولویک اسید بوده که از رسوب (که همان هیومیک اسید است) با سانتریفیوژ کردن جدا می‌گردد. هم فولویک اسید و هم هیومیک اسید نیازمند خالص‌سازی می‌باشند.

رسوب هیومیک اسید با مخلوط خیلی رقیق HCl+HF برای کاهش محتوای خاکستر و سیلیس به آرامی تکان داده و سانتریفیوژ می‌شود. بعد از سانتریفیوژ، محلول رویی دور ریخته ولی رسوب هیومیک اسید حفظ می‌گردد. سپس این رسوب بطور کامل با آب مقطر شسته شده و آب شستشو دور ریخته می‌شود. برای مرحله نهایی خالص-سازی، تن (۱۹۹٦) پیشنهاد نموده است که رسوب هیومیک اسید دوباره در محلول NaOH حل شده و محلول از ستون رزین تبادل کاتیونی اشباع با H^+ عبور داده شود. محلول نهایی هیومیک اسید pH بین دو و سه خواهد داشت زیرا بشدت پروتونه می‌باشد. این هیومیک اسید به همین صورت می‌تواند برای تجزیه مورد استفاده قرار گیرد یا انجماد خشک[1] گردیده و در یک ظرف قهوه‌ای برای استفاده‌های بعدی ذخیره گردد. بعنوان یک روش جایگزین خالص-سازی بدون استفاده از ستون تبادل کننده کاتیونی، می توان بعد از تیمار هیومیک اسید با HF+HCl، آنرا به لوله‌های دیالیز انتقال و سه یا چهار شب در مقابل آب مقطر دیالیز نمود. باید توجه کرد که هر ٦ تا ۱۲ ساعت بایستی آب تعویض گردد (سویفت، ۱۹۹٦). این روش بسیار وقت‌گیر می‌باشد.

برای خالص‌سازی فولویک اسید، محلول رنگی رویی که حاوی فولویک اسید می‌باشد از ستون DAX-8 آمبرلایت عبور داده می‌شود. این روش توسط انجمن بین المللی مواد هیومیک (IHSS) توصیه شده است. فولویک اسید توسط رزین DAX-8 نگهداشته می‌شود. سپس فولویک اسید نگه داشته شده دو باره بوسیله تزریق آب مقطر برای خارج کردن ناخالصی‌هایی مانند کربوهیدراتها و ناخالصیهای همراه فولویک اسید شسته می‌شود. فولویک اسید شسته شده با استفاده از تزریق محلول NaOH در جهت عکس از ستون خارج می‌گردد. این محلول برای خالص‌سازی نهایی از ستون تبادل کاتیونی اشباع با H^+ عبور داده می‌شود. فولویک اسید خالص شده به همین صورت می‌تواند برای انواع تجزیه‌ها مورد استفاده قرار گرفته یا انجماد خشک گردیده، وزن شده و در ظروف تیره رنگ برای استفاده‌های بعدی نگهداری گردد (لامار و همکاران، ۲۰۱٤).

البته بایستی توجه داشت که در اندازه‌گیری هیومیک و فولویک اسید در مواد کودی، تعیین مقدار کمی آن مد نظر بوده و بدست آوردن خالص آن برای مطالعات کیفی یا استفاده‌های بعدی مد نظر نمی‌باشد؛ بنابراین روش-هایی که بتوانند مقدار کمی هیومیک و فولویک اسید خالص را بطور دقیق برآورد نمایند می‌توانند جایگزین هرکدام از مراحل ذکر شده گردند. برای مثال بجای عبور هیومیک اسید از ستون تبادل کاتیونی برای حذف ناخالصی‌های کاتیونی می‌توان با سوزاندن نمونه در کوره و بدست آوردن میزان خاکستر، مقدار خالص هیومیک اسیدرا محاسبه نمود.

روشهای تجزیه

بدلیل اینکه هیومیک اسید دارای یک تعریف واضح و ساختار شیمیایی ثابتی نمی‌باشد، پیدا کردن یک روش آنالیز برای کمی‌سازی دقیق آن بسیار مشکل می‌باشد. لکن، در حال حاضر چهار روش توسط آزمایشگاه‌های تجاری برای تخمین مقدار هیومیک و فولویک اسید، هومات‌ها و مشتقات هیومیک اسید (برای مثال عصاره

[1] Freeze-dry

هومات‌ها) پیشنهاد شده است. اساس هر چهار روش حلالیت هیومیک اسید در محلول‌های قلیایی رقیق می باشد. این روشها شامل:

- روش رنگ‌سنجی که یک روش کمی بوده و بر اساس روش مهلیچ (۱۹۸٤) توسعه داده شده است.
- روش حجم سنجی ISO 5073(۲۰۱۳) که در حال حاضر بعنوان استاندارد ملی شماره ۱۱۰۹٤ (۱۳۹۲) منتشر شده است.
- روش وزن‌سنجی که بوسیله دپارتمان غذا و کشاورزی کالیفرنیا[1] (CDFA) (۲۰۰۹) توسعه یافته است.
- یک روش کمی که در این مقاله بعنوان " روش استاندارد جدید (NSM)[2]"نام برده می‌شود که براساس اصلاح روشی می‌باشد که سویفت[3] (۱۹۹٦) تشریح کرده است.

روش رنگ‌سنجی

روش رنگ‌سنجی مستلزم یک استخراج قلیایی با محلول مرکب از ۰/۲ مولار سدیم هیدروکسید،۰/۰۰۲ مولار دی‌اتیلن‌تری‌آمین‌پنتااستیک‌اسید (DTPA) و ۲٪ الکل می‌باشد. این محلول برای استخراج مواد هیومیکی از هومات‌ها یا مشتقات آنها استفاده می‌گردد. این روش تلاش دارد مقدار مواد هیومیکی را بوسیله مقایسه شدت رنگ تولید شده بوسیله عصاره با مقدار استاندارد هیومیک اسید آلدریچ[4] تخمین بزند. بطور خلاصه در این روش به ۰/۵ الی ۲ گرم نمونه (بسته به میزان هیومیک اسید) در یک بالن ۲۰۰ میلی‌لیتری، ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول استخراج کننده اضافه و کاملاً هم‌زده و به مدت ۱٦ الی ۱۸ ساعت به حال خود باقی گذاشته می‌شود. سپس بدون آنکه نمونه بهم بخورد، ۱۰ میلی‌لیتر از محلول روئی به بالن ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و با آب مقطر به حجم رسانیده می‌شود. برای تهیه منحنی استاندارد مقادیر ۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ٤۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم از هیومیک اسید آلدریچ وزن کرده (محلول‌های با غلظت پایین از طریق رقیق‌سازی نیز قابل تهیه می‌باشند) و در لوله سانتریفیوژ ۵۰ میلی‌لیتری درب‌دار منتقل، ۲۰ میلی‌لیتر محلول استخراج‌کننده در هر لوله ریخته و به مدت ۱۰ ثانیه بشدت تکان داده می‌شود، بعد از یک ساعت، ۲۰ میلی‌لیتر دیگر محلول استخراج‌کننده به آن اضافه کرده و مخلوط را تکان داده و سپس به مدت یک شب به حال خود رها می‌گردد. پنج میلی لیتر از محلول روئی بدون بهم خوردن برداشته و به ۳۰ میلی لیتر آب مقطر در یک لوله پلی اتیلنی تمیز اضافه و با دست کاملا بهم زده و مخلوط می‌گردد. بعد از تکان دادن میزان جذب برای هر کدام از محلول‌های استاندارد در طول موج ٦۵۰ نانومتر با استفاده از اسپکترو فتومتر اندازه‌گیری می‌شود. برای بدست آوردن منحنی استاندارد، وزن اولیه هیومیک اسید آلدریچ در مقابل جذب در ٦۵۰ نانومتر رسم می‌گردد (لامار و تالبوت، ۲۰۰۹؛ شهبازی و همکاران، ۲۰۱۹). در این روش فولویک اسید و دیگر ترکیبات محلول در آب و باز شامل آمینو اسیدها، پروتئین‌ها، قندها، اسیدهای چرب، مواد هیومیک (هیز و گراهام، ۲۰۰۰) نیز استخراج خواهند شد و در نتیجه در این روش مقدار هیومیک اسید به تنهایی تخمین زده نخواهد شد و هیومیک اسید، فولویک اسید و ترکیبات محلول در باز که از نظر طیفی در طول موج بکار رفته برای آزمایش فعال هستند اندازه گیری خواهند شد (لامار و تالبوت، ۲۰۰۹).

اساس روش رنگ‌سنجی بر اساس قانون بیر- لامبرت[5] می باشد:

$$Log(I_0/I)=kcd \quad (۱)$$

که در آن:

I_0 شدت نور تابشی، I شدت نور عبوری، k ضریب جذب یا ضریب جذب کنندگی ماده مورد آنالیز (هیومیک اسید)، c غلظت ماده در محلول و d طول نمونه (طولی که نور از میان ماده در محلول عبور می‌کند) می‌باشد. ضریب جذب (k)، وقتی که طول سلول مورد استفاده (کوئت مورد استفاده

[1]California Department of Food andAgriculture
[2]New Standardized Method (NSM)
[3]Swift
[4]Aldrich
[5]Beer-Lambert's Law

در اسپکتروفتومتری) یک سانتی‌متر و غلظت ماده یک مول در لیتر باشد، مساوی با چگالی نوری یا جذب می‌باشد ($\log I_0/I$). برای غلظت‌های معادل، ضریب جذب مواد هیومیکی با افزایش در وزن مولکولی، درصد کربن (C)، درجه تراکم و نسبت کربن در حلقه های آروماتیک به کربن در ساختار آلفاتیک افزایش می‌یابد (استیونسون، ۱۹۸۲). بدین ترتیب، اگر تمام ترکیبات هیومیکی دارای وزن مولکولی و ساختار مشخصی بودند، روش رنگ‌سنجی می‌توانست برای تخمین دقیق غلظت هیومیک اسید در مواد هیومیکی بکار برده شود. لکن، مواد هیومیکی استخراج شده از منابع مختلف، یا حتی از یک منبع یکسان، می‌توانند از نظر توزیع وزن مولکولی، درجه تراکم، مقدار کربن و نسبت درجه آروماتیکی به آلیفاتیکی بشدت متفاوت باشند (استیونسون، ۱۹۸۲). بعلاوه، استاندارد استفاده شده در روش رنگ‌سنجی هیومیک اسید آلدریچ می‌باشد[1]. بر طبق آلدریچ، هیومیک اسید آنها از معدنی در آلمان بدست آمده و مخلوطی از قسمت‌های در حال تجزیه گیاهان، پیت و زغال نرم می‌باشد. به احتمال زیاد هیومیک اسید آلدریچ از یک بچ به بچ دیگر از نقطه نظر کیفی ثابت نمی‌باشد (برای مثال از نظر توزیع وزن مولکولی) و نماینده هیومیک اسیدهای استخراج شده از ته نشست‌های مختلف نیست؛ بنابراین یک استاندارد ضعیف می‌باشد.

برای تعیین دقیق غلظت (c) یک ماده، قانون بیر-لامبرت متکی به این می‌باشد که ضریب جذب (جذب مولکولی) نمونه مساوی مقدار آن در استاندارد باشد. بدین ترتیب، صحت روش رنگ‌سنجی ممکن است با تولید استاندارد برای هر منبع هومات خام تا حدودی اصلاح گردد. همچنین اگر فولویک اسید و دیگر ترکیبات فعال از نظر طیفی در طول موج مورد استفاده، پیش از تجزیه حذف گردند بطوریکه تنها هیومیک اسید در محلول عصاره باقی بماند این روش ممکن است دقیق‌تر گردد. این عمل می‌تواند به راحتی با اسیدی کردن محلول عصاره به $pH<2$، جداسازی رسوب هیومیک اسید با سانتریفیوژ کردن و حل کردن دوباره آن انجام گیرد.

روش حجم‌سنجی ISO 5073

در روش حجم‌سنجی (ISO 5073) ابتدا استخراج نمونه توسط محلول قلیایی سدیم پیروفسفات (هیومیک اسید کل) یا سدیم هیدروکسید (هیومیک اسید آزاد) صورت می‌گیرد، سپس کربن در عصاره‌های استخراج شده باپتاسیم دی‌کرومات اکسید می‌شود و در ادامه دی کرومات اضافی بامحلول استاندارد آمونیوم فروسولفات حجم سنجی می‌شود. پس از اندازه‌گیری کربن برای بدست آوردن مقدار هیومیک اسید، مقدار کربن در نسبت هیومیک اسید به کربن آلی ضرب می‌گردد (این ضریب بایستی قبلاً با استفاده از روش مناسب تعیین شده باشد).

در این روش ۰/۲ گرم از نمونه توزین و به ارلن منتقل و ۱۵۰ میلی‌لیتر از محلول عصاره‌گیر (محلول سدیم پیروفسفات قلیایی جهت اندازه‌گیری هیومیک اسید کل یا محلول سدیم هیدروکسید جهت اندازه‌گیری هیومیک اسید آزاد) به آن اضافه و مخلوط می‌گردد. سپس یک قیف شیشه‌ای روی ارلن گذاشته شده و در حمام آب جوش به مدت دو ساعت حرارت داده می شود. در طول این مدت ارلن مایر مرتب تکان داده شده و پس از خنک شدن، محتویات ارلن به بالن حجمی ۲۰۰ میلی‌لیتری منتقل و با آب مقطر به حجم رسانده می‌شود. سپس محلول صاف شده و پنج میلی‌لیتر از محلول صاف شده همراه پنج میلی‌لیتر محلول ۰/٤ مولار دی‌کرومات پتاسیم به ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری منتقل می گردد. ۱۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به ارلن اضافه شده و در حمام آب جوش برای ۳۰ دقیقه حرارت داده شده و پس از خنک شدن، با آب به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتررسانده می‌شود. محتویات ارلن با محلول آمونیوم فروسولفات ۰/۱ مولار (که قبلاً توسط محلول دی‌کرومات پتاسیم ۰/۱ مولار استاندارد شده است) در حضور شناساگر ۱-۱۰ ارتوفنانترولین تا رسیدن به رنگ

[1]Aldrich Chemical Company, Milwaukee, Wisc.

قرمز آجری تیتر می‌گردد. مراحل فوق برای محلول شاهد نیز انجام می شود(ISO, 2013).

همانطور که مشاهده می‌شود در این روش نیز فولویک اسید و دیگر ترکیبات محلول در آب و باز شامل آمینو اسیدها، پروتئین‌ها، قندها، اسیدهای چرب و سایر مواد هیومیکی استخراج خواهند شد و در نتیجه مقدار هیومیک اسید به تنهایی تخمین زده نمی‌شود. هر چه مقدار این ترکیبات در نمونه بیشتر باشد میزان بیش برآورد مقدار هیومیک اسید نیز بیشتر خواهد بود. البته دامنه کاربرد این استاندارد تنها زغال‌های قهوه‌ای و لیگنیت‌ها تعیین شده است و قابل کاربرد برای محصولات تجاری که ممکن است حاوی ترکیباتی آلی محلول در آب و باز همانند آمینو اسیدها، پروتئین ها، قندها، اسیدهای چرب باشند نیست (لامار و تالبوت، ۲۰۰۹). ولی با این حال بعضی از آزمایشگاه های تجاری بخصوص در کشورهای اروپایی از این روش برای تعیین هیومیک اسید در مواد کودی استفاده می‌کنند

روش CDFA

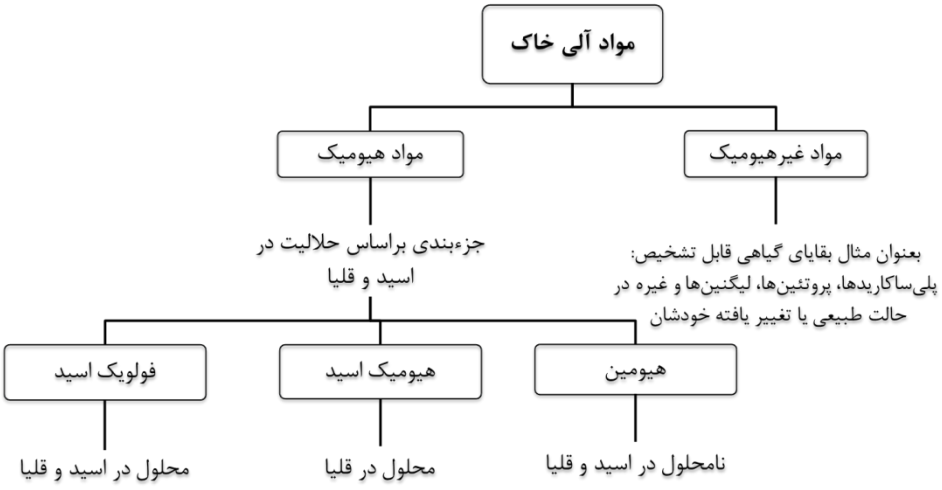
در این روش وزن مشخصی از نمونه (تقریباً حاوی ۰/۵ گرم هیومیک اسید) به لوله سانتریفیوژ ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل و ۵۰ میلی‌لیتر ۰/۵N NaOH به آن اضافه می‌گردد. درب آن محکم بسته شده و به مدت ۱/۵ ساعت برای نمونه‌های جامد و ۳۰ دقیقه برای نمونه‌های مایع بر روی شیکر مکانیکی تکان داده می‌شود. سپس سوسپانسیون به مدت ۲۰ دقیقه در دور۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ و محلول رویی به لوله سانتریفیوژ از پیش توزین شده دیگری منتقل می‌گردد. در مرحله بعد ۱۰ میلی‌لیتر محلول NaOH یک درصد به لوله سانتریفیوژ اول اضافه و با دست به شدت هم زده و سانتریفیوژ می‌شود. محلول رویی به لوله سانتریفیوژ دوم منتقل و به مقدار کافی اسید کلریدریک غلیظ اضافه تا pH≤۱ تنظیم گردد. سپس سوسپانسیون برای مدت ۲۰ دقیقه با سرعت۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ می‌گردد. محلول زرد شفاف رویی به دقت خالی می‌شود. برای شستشوی املاح اضافی به رسوب باقیمانده ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر اسیدی pH≤۱ (با HCl) اضافه و با تکان دادن شدید رسوب از ته لوله جدا شده و سپس سانتریفیوژ می‌گردد. این مرحله یک بار دیگر تکرار و در نهایت لوله سانتریفیوژ حاوی هیومیک اسید در آون با دمای ۱۱۰-۱۰۰ درجه سانتی گراد برای یک شب قرار داده می شود (در صورت نیاز زمان‌های بیشتری برای خشک کردن نمونه قابل استفاده است). سپس لوله‌ها در دسیکاتور خنک شده و توزین می گردد و با استفاده از وزن اولیه نمونه و وزن هیومیک اسید نهایی درصد هیومیک اسید محاسبه می‌شود(CDFA, 2009).

بدین ترتیب در روش CDFA عمدتاً مقدار ناخالص هیومیک اسید اندازه‌گیری می‌گردد (خاکستر حذف نمی شود)؛ و فرض بر این است که شستشو به مقدار زیادی از املاح موجود در نمونه را خارج می‌نماید (شهبازی و همکاران، ۲۰۱۹). لکن، مقدار خاکستر هومات‌ها از منابع مختلف بطور قابل توجهی متفاوت می‌باشد (اوزدبا و همکاران، ۲۰۰۱). در تحقیقی مقدار خاکستر (جزء معدنی کمپلکس شده بوسیله هیومیک و فولویک اسید) هومات-های خام از شش منطقه جغرافیایی متفاوت شامل هومالیت از آلبرتای کانادا، لئوناردیت از جنوب شرقی ساسکاچوان کانادا و داکوتای شمالی؛ زغال گلسنگ هوازده و شیل‌های کربنی از وایومینگ و نیومکزیکو؛ و شیل های کربنی از ایداهو ارزیابی شدند (اوزدبا و همکاران، ۲۰۰۱). مقدار خاکستر از ۱۱/۱٪ برای هومالیت آلبرتا تا ۸٤/۷٪ برای شیل کربنی آیداهو تغییر کرد. بدین ترتیب، بدلیل اینکه در روش CDFA خاکستر حذف نمی‌شود، مقدار هیومیک اسید هومات‌ها و مشتقات هیومات را بالاتر تخیمین خواهد زد.

روش NSM

لامار و همکاران (۲۰۱٤) روش استاندارد جدیدی برای تعیین مقدار هیومیک اسید و فولویک اسید در محصولات هیومیکی تجاری جامد و مایع، پیت، خاک و ته نشست‌های زمین‌شناسی حاوی هیومات ارائه نمودند. این روش بر اساس روش استخراج هیومیک و فولویک

اسید از مواد طبیعی استوار می‌باشد. این روش همانند روش سویفت، از اصلاح روش کلاسیک که جزئیات آن توسط استیونسون (۱۹۹٤) توضیح داده شده بدست آمده است. روش کلاسیک برای استخراج هیومیک اسید و فولویک اسید (مواد محلول در قلیا) از هوموس خاک، یک باز قوی بکار می‌برد و بعد از جدا کردن ترکیبات نامحلول، سوسپانسیون قلیایی حاصل اسیدی می‌گردد تا هیومیک اسید رسوب نماید (شکل ۱). واکسمن (۱۹۳٦) مواد باقیمانده در محلول بعد از تیمار قلیایی و اسیدی را فولویک اسید نامید. سویفت برای جداسازی فولویک اسید (بعنوان ترکیبی با آبگریزی بالا) از مولکول‌های بیولوژیکی (ترکیباتی با آبدوستی بالا) در عصاره فولویک اسید، مرحله جذب در ستون را به روش کلاسیک اضافه نمود (سویفت، ۱۹۹٦). روش کلاسیک و سویفت هر دو بعنوان یک روش مقدماتی برای جزءبندی مواد آلی خاک توسعه یافته‌اند و برای استفاده بعنوان روش‌های تجزیه کمی برای اهداف تجاری در نظر گرفته نمی‌شوند.



شکل ۱- جزء بندی مواد آلی خاک و مواد هیومیک

محصولاتی که اخیراً بعنوان فولویک اسید در بهبود دهنده‌های کشاورزی فروخته می‌شوند اغلب حاوی جزء فولویک همراه با ترکیبات آب‌دوست می‌باشند. در روش NSM همانند روش سویفت، فولویک اسید بعنوان ماده‌ای که با رزین غیریونی اکریلیک استر ماکرپور[1] با قطبیت متوسط در pH پایین (مانند DAX-8) پیوند می‌شود، تعریف می‌گردد (لینهر و کرو، ۲۰۰۳؛ تومان و مالکولم ۱۹۸۱). این تعریف سختگیرانه‌تر جایگزین تعریف کلاسیک فولویک اسید می‌شود که تمام مواد آلی استخراج شده با باز قوی که هم در اسید و هم در باز محلول می‌باشد را فولویک اسید می‌داند. این تعریف سخت‌گیرانه‌تر فولویک اسید، تمایز فولویک اسید آبگریز را از ترکیبات آبدوست در جزء فولویک اسید کلاسیک (مانند پلی ساکارید ها، آمینو قندها، آمینو اسیدها، پروتئینها، اسیدهای چرب، کربوهیدراتها، لیپیدها و غیره) که ممکن است بوسیله باز قوی همراه با مواد هیومیکی استخراج گردند را تسهیل می‌نماید (هیز و گراهام، ۲۰۰۰؛ استیونسون، ۱۹۹٤).

این روش، تکنیک کلاسیک را به این صورت تغییر داده است: ۱) انجام عصاره گیری اولیه تحت اتمسفر N_2. ۲) تعیین کمی مواد هیومیکی بر اساس حذف خاکستر. ۳) جذب فولویک اسید بر رزین غیریونی. بعلاوه، این روش یک پروتوکل برای متمایز کردن فولویک اسید از مواد غیر هیومیکی معین که ظاهراً بعنوان ترکیبات هیومیکی واقعی به بازار عرضه می‌گردد، ایجاد می‌نماید. براساس این روش

[1]Nonionic macroporous acrylic ester resin

مقداری از نمونه کود (که دارای ۲/۵ گرم هیومیک اسید برای نمونه‌های جامد و ۰/۲–۰/٦ گرم برای نمونه‌های مایع باشد) را توزین و به ارلن‌مایر یک لیتری منتقل نموده و با محلول ۰/۱N NaOH به حجم یک لیتر رسانده می‌شود. به منظور به حداقل رساندن واکنش‌های اکسیداسیونی، اتمسفر بالای محلول داخل ارلن که با پارافیلم پوشیده شده است با گاز N_2 جایگزین خواهد شد. این محلول به کمک همزن مغناطیسی، به مدت ١٦ الی ١٨ ساعت برای نمونه‌های جامد و یک ساعت برای نمونه‌های مایع هم‌زده می‌شود. سوسپانسیون به منظور جدا کردن مواد غیر محلول، در ×g ۳۹۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیده و محلول رویی به ارلن‌مایر دیگری منتقل،pH آن با ٦HCl مولار روی ۰/۰۵ ± ۱ تنظیم می‌شود. درب ارلن را با پارافیلم پوشانده و به مدت یک ساعت دیگر هم‌زده و مجدداً pH محلول کنترل می‌شود و در صورت نیاز با استفاده از HCl غلیظ یا NaOH ۰/۱ نرمال، در ۰/۰۵ ± ۱ تنظیم شده و به مدت پنج دقیقه برای اطمینان از ثبات pH، الکترود در داخل محلول نگهداشته خواهد شد. پس از ثابت شدن pH سوسپانسیون برای مدت چهار ساعت بدون هم خوردن به حال خود گذاشته تا هیومیک اسید رسوب نماید.

محلول رویی را با دقت خالی کرده و مخلوط باقیمانده در لوله‌های سانتریفیوژ ۵۰ میلی‌لیتری از قبل توزین شده ریخته و با دور ×g۳۹۰۰ به مدت نیم ساعت سانتریفیوژ می‌شود تا رسوب هیومیک اسید جدا گردد. در صورت نیاز سرعت‌ها و زمان‌های بیشتر قابل استفاده است. محلول رویی را با دقت خالی کرده ولوله‌های سانتریفیوژ حاوی رسوب هیومیک اسید در آون در دمای°C۹۰ قرار داده می‌شوند تا هیومیک اسید خشک شده و به وزن ثابت برسد (معمولا ٢٤ ساعت). سپس لوله‌های سانتریفیوژ در دسیکاتور خنک شده و توزین می‌گردند و از تفاضل وزن لوله از وزن لوله +رسوب، وزن رسوب هیومیک اسید استخراج شده بدست خواهد آمد. همچنین در مورد نمونه-های جامد، درصد رطوبت نمونه به روش استاندارد تعیین گردیده و با تاثیر درصد رطوبت بر روی وزن اولیه، وزن خشک نمونه را محاسبه کرده تا مقدار هیومیک اسید در وزن خشک نمونه قابل محاسبه باشد (لامار و همکاران ٢٠١٤). برای تعیین مقدار خاکستر، هیومیک اسید بوسیله اسپاتول[1] (کاردک) از کناره‌ها و انتهای لوله سانتریفیوژ کاملاً خارج و در یک ظرف سرامیکی قرار داده می‌شود. این ظرف را قبل از استفاده در دمای°C ۵۰۰ به مدت دو ساعت در آون خشک کرده و پس از خنک شدن تا دمای اتاق در دسیکاتور، وزن می‌شود. پس از یادداشت وزن ظرف همراه با هیومیک اسید خشک، برای تعیین مقدار خاکستر، آن را در آون مافل[2] به مدت هشت ساعت در دمای ۵۰۰ درجه سلسیوس قرار می دهیم. زمانیکه هنوز گرم است، ظرف سرامیکی را از کوره خارج کرده و در دسیکاتور قرار می-دهیم تا خنک شود. پس از خنک شدن، ظرف و خاکستر را توزین کرده و درصد خاکستر را تعیین می کنیم. وزن نهایی هیومیک اسید خالص را با کم کردن درصد خاکستر از هیومیک اسید استخراج شده تعیین می‌کنیم (لامار و همکاران ٢٠١٤؛ شهبازی و همکاران، ۲۰۱۹).

فولویک اسید بوسیله جذب انتخابی آن بر رزین آبگریز (مانند Supelite DAX-8) از دیگر ترکیبات محلول در اسید جدا می‌گردد. بدلیل اینکه دیگر اجزاء آبگریز در محلول اسیدی جذب نمی‌شوند، می‌توانند حذف گردند. این عمل با استفاده از یک ستون شیشه‌ای ۲۵۰×٤۰ میلی‌متر حاوی رزین DAX-8 که طبق دستورالعمل‌های کارخانه سازنده آماده شده‌است انجام می‌گیرد. محلول حاوی فولویک اسید را از بالای ستون با استفاده از یک پمپ پریستالتیک، تحت فشار پائین از میان ستون عبور می-دهند. سپس ستون را با آب مقطر شسته و عمل شستشو را تا زمانیکه میزان جذب در محلول خروجی از ستون در طول موج ۳۵۰ نانومتر، مساوی مقدار جذب در آب مقطر بکار رفته برای شستشو شود، ادامه می‌یابد. آب مقطر از طرف بالای ستون با استفاده از پمپ پریستالتیک تحت فشار کم

[1]Spatula

[2]Muffle oven

از میان ستون عبور داده و محلول خروجی دور ریخته می‌شود. از آب مقطر به عنوان شاهد (برای صفر کردن) دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده می گردد. فولویک اسید بوسیله شستشوی برگشتی با 0.1N NaOH واجذب می‌گردد (محلول ورودی از طرف پایین وارد ستون می‌شود). این محلول توسط پمپ پریستالتیک به داخل ستون پمپ می‌شود. زمانیکه میزان جذب محلول خروجی مساوی با میزان جذب محلول ورودی گردید، تمام فولویک اسید واجذب شده است. از آنجا که محلول 0.1N NaOH برای شستشو استفاده می‌شود، از این محلول بعنوان شاهد (برای صفر کردن) دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده می گردد. سپس فولویک اسید پروتونه می‌شود یا بعبارتی کاتیون‌های موجود در آن با یون هیدروژن جایگزین می‌شود (خاکستر زدایی[1]). برای این کار آن را از میان یک ستون تبادل پروتون (به ابعاد ۵×۵۰ سانتی‌متر) حاوی رزین تبادلی Amberlite IR120 hydrogen عبور می دهند. این عمل راتا زمانیکه هدایت الکتریکی کمتر از ۱۲۰ میکروزیمنس بر متر گردد، با استفاده از نیروی جاذبه تکرار می شود ($EC< 120\ \mu S\ m^{-1}$). پس از آخرین عبور، ستون با آب مقطر تا زمانیکه مقدار جذب محلول خروجی در ۳۵۰ نانومتر مساوی مقدار جذب برای آب گردد، شستشو داده می‌شود. آب شستشوی خروجی به محلول خالص شده فولویک اسید اضافه می‌شود. شستشو با آب مقطر برای این منظور انجام می‌شود که مطمئن شویم تمام فولویک اسید از رزین خارج شده است.

آب مقطر بعنوان شاهد برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده می‌شود. برای کمک به خروج تمام فولویک اسید، رزین می‌تواند بوسیله یک میله شیشه‌ای بلند چندین مرتبه بهم زده شود. فولویک اسید بوسیله تبخیر آرام[2] تحت فشار پایین در ۵۵ درجه سلسیوس تا حجم تقریبی ۱۵±۲ml تغلیظ می‌گردد. فولویک اسید تغلیظ شده به یک لوله سانتریفیوژ ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و در دمای ٦٥ درجه سلسیوس در آون خشک کن خشک می گردد تا به وزن ثابتی برسد. همچنین فولویک اسید می‌تواند از طریق انجماد خشک[3] خشک شود. پس از خشک شدن (همانطور که در بالا برای هیومیک اسید توضیح داده شد)، لوله در یک دسیکاتور قرار داده تا خنک شود. وزن لوله به اضافه فولویک اسید خشک یاداشت گردیده و وزن فولویک اسید خشک بدست می‌آید. این فولویک اسید استخراج شده می‌باشد. برای اندازه‌گیری مقدار خاکستر در محلول استخراج شده رسوب فولویک اسید بوسیله اسپاتول از کناره‌ها و انتهای لوله سانتریفیوژ کاملاً خارج می‌شود. مقدار خاکستر باقیمانده فولویک اسید به روشی که برای هیومیک اسید توضیح داده شده تعیین شده و با استفاده از وزن خاکستر درصد فولویک اسید خالص محاسبه می‌گردد (لامار و همکاران، ۲۰۱٤).

روش‌های متنوع اندازه‌گیری هیومیک اسید در موسسه تحقیقات خاک و آب مورد تحقیق و ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که نسبت به روش NSM روش‌های CDFA و ISO 5073 در اندازه‌گیری هیومک اسید کم‌برآورد (۱۳/۸ و ۱/۵ درصد) داشتند ولی روش رنگ‌سنجی ٦٤ درصد هیومیک اسید را کمتر برآورد نمود. وجود مواد آلی محلول از قبیل کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها باعث بیش برآورد در روش‌های رنگ‌سنجی و ISO 5073 می‌شود (شهبازی و همکاران، ۲۰۱۹). روش ISO 5073 روشی سریع بوده و مناسب برای اندازه‌گیری هیومیک اسید در منابع معدنی از قبیل لئوناردایت می‌باشد که این اطمینان وجود دارد که وجود مواد آلی محلول در آنها ناچیز است. روش NSM روشی دقیق و تکرارپذیر است اما روشی وقت‌گیر می باشد. روش CDFA روشی نسبتا سریع بوده و از دقت بالایی برخودار است اما در بعضی از نمونه‌ها کم برآورد دارد. این نمونه‌ها عمدتا شامل نمونه‌های با درصد بالای هیومیک اسید بودند. در این مواد بالاتر بردن نسبت عصاره‌گیر به نمونه و زمان همزدن باعث افزایش مقدار هیومیک اسید اندازه‌گیری شده می‌گردد (شهبازی و همکاران، ۲۰۱۹). اندازه‌گیری فولویک اسید نسبت هیومیک اسید پیچیده‌تر بوده و دارای منابع خطای بیشتری می‌باشد؛

[1] De-ashed
[2] Rotovapping
[3] Freeze dry

زیرا مواد آلی محلول از قبیل کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و لیگنوسولفونات‌ها رفتاری مشابه فولویک داشته و عدم جداسازی صحیح آنها ممکن است منجر به خطایی قابل توجه در اندازه‌گیری آن شود. از مکانیسم‌های متفاوتی مانند برای جدسازی فولویک اسید از این مواد مختلف از جمله هیومین و هیومیک اسید (رسوب دادن با استفاده از قابلیت انحلال در محیط‌های اسیدی و قلیایی)، لیگنوسوفونات‌ها و بقیه مواد آلی محلول (عبور از ستون DAX 8 که خاصیت جذب انتخابی نسبت به فولویک اسید دارد) و مواد معدنی محلول (عبور از ستون تبادل کاتیونی) استفاده می‌شود.

نتیجه‌گیری

مواد هیومیک یک گروه با وزن مولکولی نسبتاً بالا، رنگ قهوه‌ای روشن تا سیاه، پلیمرهای آلی غیرهمگن و کمپلکس تشکیل شده بوسیله واکنشهای سنتزی ثانویه می‌باشند. این مواد بر اساس حلالیتشان درمحلول‌های استخراج‌کننده اسیدی یا قلیایی به سه جزء اصلی تقسیم می شوند که شامل: هیومیک اسیدها که در بر گیرنده جزء محلول در قلیا و غیرمحلول در اسید، فولویک اسیدها، جزء محلول در هم قلیا و هم در اسید و جزء هیومین که با اسید و قلیای رقیق استخراج نمی‌شود. استفاده از مواد هیومیک بعنوان کود، بهبود دهنده رشد و بهساز خاک در بخش کشاورزی بسرعت در حال گسترش می‌باشد و با توجه به امکان عرضه محصولات تقلبی یا محصولات با کیفیت پایین، لزوم وجود یک روش دقیق و کاربردی که بتواند بصورت کمی مقدار هیومیک و فولویک اسید را در محصولات تجاری تعیین نماید هر روز بیشتر احساس می-شود. در حال حاضر چهار روش شامل روش رنگ‌سنجی کمی که بر اساس روش مهلیچ (۱۹۸٤) توسعه داده شده است، روش حجم سنجی ISO 5073 که در حال حاضر بعنوان استاندارد ملی شماره ۱۱۰۹٤ منتشر شده است و دو روش وزن‌سنجی که یکی از آنها توسعه یافته بوسیله دپارتمان غذا و کشاورزی کالیفرنیا[1] (CDFA) بوده و یک روش کمی بعنوان روش " روش استاندارد جدید (NSM)"، بطور عمده توسط آزمایشگاه‌های تجاری برای تعیین هیومیک اسید در محصولات و مواد خام بکار می‌رود. با توجه به مبانی روشهای رنگ‌سنجی و حجم‌سنجی این روش‌ها قادر به تمایز محصولات تقلبی نبوده و مقدار تعیین شده توسط این روش‌ها بیشتر از مقدار واقعی خواهد بود. روش NSM که توسط لامار و همکاران در سال ۲۰۱٤ ارائه گردید، بر اساس مبانی روش کلاسیک بوده و طوری اصلاح گردیده تا بتواند مقدار واقعی هیومیک اسید و فولویک اسید را در محصولات تجاری و مواد خام تعیین نماید. این روش بلافاصله بعد از ارائه، توسط انجمن بین المللی مواد هیومیک (IHSS) و انجمن تجارت مواد هیومیک[2] (HPTA) مورد پذیرش قرار گرفت. این روش مبنای ارائه روش استاندارد در سازمان بین المللی استانداردسازی (ISO 19822) گردید. از سال ۱۳۹٤ آزمایشگاه خاک و آب موسسه تحقیقات خاک و آب از این روش برای ارزیابی مواد کودی حاوی هیومیک اسید و فولویک اسید استفاده می‌نماید.

فهرست منابع

۱. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۹۲). زغاله قهوه‌ای و لیگنیت‌ها- اندازه‌گیری هیومیک اسیدها. استاندارد ملی ۱۱۰۹٤. تهران، ایران.

2. Asing., J., N. C., Wong, and S., Lau. 2009. Optimization of extraction method and characterization of humic acid derived from coals and composts. J. Trop. Agric. and Fd. Sc. 37(2): 211– 223.

[1]California Department of Food and Agriculture
[2]Humic Products Trade Association

3. Bremner, J. M. 1950. Some observations on the oxidation of soil organic matter in the presence of alkali. J. Soil Sci. 1: 198–204.
4. Bremner, J. M. 1954. A review of recent work on soil organic matter. II. J. Soil Sci. 5: 214–232.
5. California Department of Food and Agriculture (CDFA). 1999. Humic acid method. Available from CDFA Fertilizing Materials Inspection Program: 916–445–0444.
6. Chaminade, R. 1946. Sur unemethode de dosage de la fraction humifique de la matièreorganique des sols. C. R. Acad. Agric. 32: 131–134.
7. Choudri, M. B., and F. J. Stevenson. 1957. Chemical and physicochemical properties of soil colloids. III. Extraction of organic matter from soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 21: 508–513.
8. Dubach, P., N. C. Mehta, and H. Deuel. 1963. SchonendeExtraktion von Huminstoffen und Isolierung der Fulvosäure-FraktionausverschiedenenBodentypen. Z. Pflanzenernähr. Dung. Bodenk. 102: 1–7.
9. Flaig, W., H. Beutelspacher, and E. Rietz. 1975. Chemical composition and physical properties of humic substances. In: Soil Components, Vol. 1. Inorganic.
10. Hayes, M. H. B. 1985. Extraction of humic substances from soil. In: Humic Substances in Soil, Sediment, and Water. Geochemistry, Isolation, and Characterization, G. R. Aiken, D. M. McKnight, R. L. Wershaw, and P. MacCarthy (eds.). Wiley-Interscience, New York, pp. 329–362.
11. Hayes, M. H. B., and C. L., Graham. 2000. Procedures for the isolation and fractionation of humic substances. In Humic substances: Versatile components of plants, soils, and water, ed. E. A. Ghabbour and G. Davies. Cambridge, U.K.: Royal Society of Chemistry.
12. Hayes, M. H. B., and C. L., Graham. 2000. Procedures for the isolation and fractionation of humic substances. In Humic substances: Versatile components of plants, soils, and water, ed. E. A. Ghabbour and G. Davies. Cambridge, U.K.: Royal Society of Chemistry.
13. Hayes, T. M., M. H. B. Hayes, J. O. Skjemstad, R. S. Swift, and R. L. Malcolm. 1997. Isolation of humic substances from soil using aqueous extractants of different pH and XAD resins, and their characterization by 13C-NMR. In: Humic Substances and Organic Matter in Soil and Water Environments: Characteristics, Transformation, and Interactions, C. E. Clapp, M. H. B. Hayes, N. Senesi, and S. M. Griffith (eds.). Proc. 7th Conf. Intern. Humic Substances Soc., Univ. West Indies, St. Augustine, Trinidad and Tobago, July 3–8, 1994. Published by International Humic Substances Soc. Inc., Dept. Soil, Water, and Climate, Univ. Minnesota, St. Paul, MN, pp. 13–24.
14. Hoffman, G. L., D. J. Nikols, S. Stuhec, and R. A. Wilson. 1993. Evaluation ofleonardite (humalite) resources of Alberta(Open File Report 1993-18). Alberta,Canada: Energy, Mines and Resources Canada, Alberta Research Council.
15. International Humic Substance Society. 2007. What are humic substance. Retrieve from URL:http://www.http://www.humicsubstances.org/whatarehs.html. on May. 12, 2018.
16. International Oganization for Standardization (ISO). 2013. Brown coals and lignites - Determination of humic acids. ISO 5073. Geneva, Switzerland.
17. International Oganization for Standardization (ISO). 2018. Fertilizers and soil conditioners — Determination of humic and hydrophobic fulvic acids concentrations in fertilizer materials. ISO 19822. Geneva, Switzerland.
18. Kohanowski, N. N. 1970. Leonardite in North Dakota.North Dakota Quarterly3:36–42.
19. Kononova, M. M. 1961. Soil Organic Matter. Translated by T. Z. Nowakowski, and G. A. Greenwood. Pergamon Press, Oxford.
20. Lamar, R. T., and K. H. Talbot. 2009. Critical Comparison of Humic Acid Test Methods. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 40: 2309–2322.
21. Lamar, R. T. L., D. C. Olk, L. Mathew, and P. R. Bloom. 2014. A New Standardized Method for Quantification of Humic and Fulvic Acids in Humic Ores and Commercial Products. J. of AOAC Int. 97(3):721-730.
22. Leenheer, J. A., and J. P. Croúe. 2003. Terpenoids as Major Precursors of Dissolved Organic Matter in Landfill Leachates, Surface Water, and Groundwater. Environ. Sci. Technol. 37, 19A–26A.

23. Mehlich, A. 1984. Photometric determination of humic matter in soils: A proposed method. Commun. Soil Sci. Plant Anal.15 (12): 1417–1422.
24. Orioli, G. A., and N. R. Curvetto. 1980. Evaluation of extractants for soil humic substances. I. Isotachophoretic studies. Plant Soil 55: 353–361.
25. Orlov, D. S. 1985. Humus Acids of Soils. Moscow University Press. Translated from Russian (K. H. Tan, ed.) Amerind Publ., New Delhi, India.
26. Ozdoba, D. M., J. C. Blyth, R. F. Engler, H. Dinel, and M. Schnitzer. 2001. Leonardite and humified organic matter. InHumic substances: Structures, models, and functions, ed. E. A. Ghabbour and G. Davies, 309–314. Cambridge,U.K.: Royal Society of Chemistry.
27. Pierce, R. H., Jr., and G. T. Felbeck. 1975. A comparison of three methods of extracting organic matter from soils and marine sediments. In: Humic Substances. Their Structure and Function in the Biosphere, D. Povoledo, and H. L. Golterman (eds.). Proc. Intern. Meeting, Nieuwersluis, the Netherlands, May 29–31, 1972. Centre for Agric. Publishing and Documentation, Wageningen, the Netherlands, pp. 217–232.
28. Schnitzer, M. 1982b. Organic matter characterization. In: Methods of Soil Analysis, Part 2, A. L. Page, R. H. Miller, and D. R. Keeney (eds.). Agronomy Series No. 9. Am. Soc. Agronomy and Soil Sci. Soc. Am. Inc., Madison, WI, pp. 581–594.
29. Schnitzer, M., and S. U. Khan. 1972. Humic Substances in the Environment. Marcel Dekker New York.
30. Schnitzer, M., D. A. Shearer, and J. R. Wright. 1959. A study in the infrared of high molecular-weight organic matter extracted by various reagents from a podzolic B horizon. Soil Sci. 87: 252–257.
31. Shabazi, K., M. Marzi, and S. Tabakhian. 2019. The comparative evaluation of humic acid determining methods in humic-based commercial fertilizers. Archives of Agronomy and Soil Science. (just-accepted).
32. Simandl, G. J., J. Simandl, and P. B. Aylen. 2001. Leonardite-type material at RedLake Diatomite Deposit, Kamloops Area, British Columbia. Geological Field work 2000: 371–378.
33. Stevenson, F. J. 1982. Humus chemistry: Genesis, composition, reactions. NewYork: John Wiley and Sons.
34. Stevenson, F. J. 1965. Gross chemical fractionation of organic matter. In: Methods of Soil Analysis, Part I, C. A. Black, D. D. Evans, J. L. White, L. E. Ensminger, and F. Clark (eds.). Agronomy Series No. 9. Am. Soc. Agronomy, Madison, WI, pp. 1409–1421.
35. Stevenson, F. J. 1994. Humus Chemistry. Genesis, Composition, Reactions, Second Edition. John Wiley & Sons, New York.
36. Swift, R. S. 1996. Organic matter characterization. In Methods of soil analysis, part 3: Chemical methods, ed. D. L. Sparks, 1011–1069. Madison, Wisc. Soil Science Society of America.
37. Tan, K. H. 1996. Soil Sampling, Preparation, and Analysis. Marcel Dekker, New York.
38. Tan, K. H. 2014. Humic Matter in Soil and the Environment: Principles and Controversies. CRC Press, Taylor & Francis Group.
39. Tan, K. H., D. S. Himmelsbach, J. C. Lobartini, and G. R. Gamble. 1994. The issue of artifacts in NaOH extraction of humic matter. In: Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health, N. Senesi, and T. M. Miano (eds.). Proc. 6th Intern. Meeting of the Intern. Humic Substances Soc., Monopoli, Bari, Italy, September 20–25, 1992. Elsevier, Amsterdam, pp. 109–114.
40. Thurman, E. M., and R. L. Malcolm 1981. Preparative isolation of aquatic humic substances. Environ. Sci. Technol. 15, 463–466.
41. Wilson, M. A. 1987. Humic substances. In NMR techniques and applications in geochemistry and soil chemistry. New York: Pergamon Press.

The Evaluation of Methods for Determination of Humic and Fulvic acids in Fertilizer Materials

K.Shahbazi [1], M. Marzi, and Sh.Tabakhian

Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO).
kshahabazi@swri.ir
Department of Soil Science, University of Tehran.**mostafamarzi@ut.ac.ir**
Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO).
shidatabbakhian@yahoo.com

Received: October 2018 and Accepted: July 2019

Abstract

Humic substances (HS) are complex and heterogeneous materials with different sizes produced through decomposition and transformation of plant and microbial residues by chemical and biochemical processes. HS producers, consumers and also regulators have a great interest to find a precise and accurate method for quantification of HS due to increasing use of them in agriculture. Since there is no distinct definition and consistent chemical structure for HA, an accurate quantification method has not been developed. There are four laboratory methods for determination of HA, FA, humates, and HA derivations (e.g. humate extracts) in commercial fertilizers. These methods include; ISO 5073 titrimetric method that has been published as national standard 11094, a colorimetric method that has been developed according to Mehlich method (1984), and two gravimetric methods that one of them has been developed by California Department of Food and Agriculture (CDFA) and other one is called New Standardized Method (NSM). All of these methods are based on the solubility of HS in dilute alkali solutions. Moreover, FA and other alkali soluble materials e. g. amino acids, proteins, sugars and fatty acids are extracted and measured in colorimetric and titrimetric methods as HA, hence these methods overestimate HA content. The NSM method has obtained by modification of classical method and is based on extraction of HA and FA from natural substances. In this method the separation of FA from other strong base extractable substances such as polysaccharides, amino acids, proteins, and lipids is possible. Also, the NSM method has been accepted by International Humic Substances Society (IHSS) and Humic Products Trade Association (HPTA) and it is the base of standard method that has been developed by International Organization for Standardization (ISO 19822). Therefore, the NSM method is recommended as a reference method.

Keywords: Humic acid, Fulvic acid, Determination methods, Commercial fertilizers

[1]- Corresponding author: Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO).