

# 基于<sup>13</sup>C-NMR 偶极去相技术的有机肥料中有机组分特征研究

王林洋<sup>1,2</sup>, 张育维<sup>1,2</sup>, 李亚丽<sup>1,2</sup>, 唐杉<sup>1,3</sup>, 谢丽华<sup>1,2</sup>, 汪洪<sup>1,2\*</sup>

(1 北方干旱半干旱耕地高效利用全国重点实验室 / 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081;  
2 国家化肥质量检验检测中心(北京), 北京 100081; 3 安徽省农业科学院土壤肥料研究所, 安徽合肥 230001)

**摘要:** 【目的】在固体<sup>13</sup>C-NMR 的交叉极化魔角旋转全边带抑制 (cross polarization/magic angle spinning/total suppression of sidebands, CP/MAS/TOSS) 技术得到的谱图中, 质子碳与非质子碳的信号重叠。偶极去相 (dipolar dephasing, DD) 技术利用<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H 异核耦合作用大小的差异, 区分与不同质子结合的<sup>13</sup>C 核基团。本研究基于 DD 技术探讨有机肥料中碳结构特征。【方法】供试有机肥料样品包括 3 种秸秆 (小麦秸秆、玉米秸秆、水稻秸秆)、3 种粪肥 (鸡粪、牛粪、猪粪) 和 3 种腐植酸肥 (腐植酸铵、腐植酸钠、腐植酸钾) 样品, 利用<sup>13</sup>C-NMR 谱的 CP/MAS/TOSS 结合 DD 技术, 测定了不同来源的有机肥料样品图谱, 比较其碳分布比例。【结果】秸秆和粪肥样品中烷氧碳组分较多, 占鉴定出所有碳组分的比例分别为 55% 和 31%~37%, 非质子化的烷氧碳占比不到 3%; 秸秆、猪粪样品中非质子芳香碳占 3%~4%, 鸡粪和牛粪样品中非质子芳香碳分别占 15% 和 11%, 较秸秆和猪粪样品含有更多的非质子化芳香族化合物。粪肥和秸秆样品中甲氧基碳占比低于烷基氮。腐植酸样品以芳香碳、羧基碳和酰胺基碳为主, 羧基碳和酰胺基碳占到 12%~16%, 总芳香族碳占 48%~72%, 非质子芳香碳占 25%~37%, 表明腐植酸芳香骨架上可能存在较多取代。【结论】基于 CP/TOSS 结合 DD 技术 (偶极相移延时时间设置为 40 μs) 分析结果发现, 鸡粪和牛粪中非质子芳香碳占比高于猪粪和秸秆; 腐植酸肥芳香族碳比例高于粪肥和秸秆, 尤其是非质子芳香碳占比较高, 表明腐植酸肥芳香化程度高于粪肥和秸秆。

**关键词:** 有机肥料; <sup>13</sup>C-核磁共振; 交叉极化; 偶极去相

## Structures of components in different organic fertilizers analyzed through <sup>13</sup>C-NMR dipolar dephasing technology

WANG Lin-yang<sup>1,2</sup>, ZHANG Yu-wei<sup>1,2</sup>, LI Ya-li<sup>1,2</sup>, TANG Shan<sup>1,3</sup>, XIE Li-hua<sup>1,2</sup>, WANG Hong<sup>1,2\*</sup>

(1 State Key Laboratory of Efficient Utilization of Arid and Semi-arid Arable Land in Northern China / Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 2 China National Center for Quality Supervision and Test of Chemical Fertilizers (Beijing), Beijing 100081, China; 3 Soil and Fertilizer Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei, Anhui 230001, China)

**Abstract:** 【Objectives】Solid-state <sup>13</sup>C-NMR techniques can be used to qualitatively and quantitatively characterize organic functional groups. Cross polarization / magic angle spinning / total suppression of sidebands (CP/MAS/TOSS) technique provides limited information on carbon functional groups. Dipolar dephasing (DD) is a spectral editing technique of solid <sup>13</sup>C-NMR, which is used to distinguish protonated and non-protonated carbon or mobile and rigid components in organic compounds based on <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H heteronuclear dipole coupling with specific dephasing delay time ( $T_D$ ). The objective of this study is to obtain more information on carbon functional groups in organic fertilizer by DD technique. 【Methods】The organic fertilizer samples included 3 kinds of straw (wheat straw, corn straw, rice straw), 3 kinds of manure (chicken manure, cow manure, pig manure) and 3 kinds of humic acid fertilizer (ammonium humate, sodium humate, potassium humate) samples. The spectra of organic fertilizer samples from different sources were determined by CP/MAS/TOSS combined with DD technology, and

收稿日期: 2024-02-26 接受日期: 2024-06-02

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD1700603, 2018YFD0201203); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(Y2019PT20-04, 1610132019018)。

联系方式: 王林洋 E-mail: [wlyaimk@163.com](mailto:wlyaimk@163.com); \* 通信作者 汪洪 E-mail: [wanghong01@caas.cn](mailto:wanghong01@caas.cn)

the carbon distribution ratios were compared. [ **Results** ] O-alkyl C of cellulose origin are dominant in straw and manure samples, accounting for 55% and 31%–37% of the total organic carbon, respectively, and the proportion of non-protonated O-alkyl carbon did not exceed 3% in either straw or manure. Manure had more non-protonated fatty and aromatic carbon than straws, the proportions of non-protonated aromatic carbon in chicken manure and cow manure were 15% and 11%, respectively, while that in straws and swine manure was as low as 3%–4%. The percentage of methoxycarbon in manures and straws was lower than the percentage of alkyl nitrogen. Aromatic, carboxyl and amide carbon were the highest in humic matter samples, with 48% to 72% of aromatic carbon and no less than 12% of carboxyl or amide carbon, non-protonated aromatic carbons in humic matter samples account for 25% to 37%, indicating that there may be more substitutions of aromatic skeleton in humic matter fertilizers.

[ **Conclusions** ] The DD combined with CP technique with 40  $\mu$ s delay time ( $T_D$ ) can be used to identify protonated and non-protonated carbon or mobile and rigid components in organic fertilizers and to study the characteristics of carbon functional groups in straw, manure and humic matter fertilizers. It is suggested that the aromaticity of humic acid fertilizers is much higher than that of manures and straws.

**Key words:** organic fertilizer; <sup>13</sup>C NMR; cross-polarization; dipolar dephasing

我国有机肥料资源丰富, 每年养分总量约为 7519.5 万 t, 原料主要来源于畜禽粪便、秸秆、腐植酸等<sup>[1]</sup>。表征有机肥料官能团组成与组分结构特征, 有助于阐明有机肥料降解机理及有机肥料功能, 对鉴定有机肥料原料来源, 保障产品质量也具有重要意义。

核磁共振技术 (nuclear magnetic resonance, NMR) 是根据外加磁场和射频脉冲作用下, 特定原子的原子核能级跃迁产生的共振现象, 探测物质内部结构和性质。根据谱图上共振峰位置、强度和精细结构研究样品的分子结构<sup>[2-3]</sup>。固体<sup>13</sup>C-核磁共振波谱技术 (solid state <sup>13</sup>C-NMR) 被广泛应用于土壤、沉积物等样品的有机质与腐殖质碳结构测定<sup>[4-10]</sup>。交叉极化/魔角旋转 (cross polarization/magic angle spinning, CP/MAS) 技术克服固体样品化学位移各向异性、偶极耦合作用等<sup>[11]</sup>, 提升了<sup>13</sup>C 核探测灵敏度和信号累积效率<sup>[12]</sup>。普通 CP/MAS 脉冲序列高频去偶时段加入 4 个  $\pi^{13}$ C 脉冲, 利用边带全抑制 (total suppression of sidebands, TOSS) 谱线编辑技术, 解决了固体样品 NMR 分析时的旋转边带干扰问题<sup>[13]</sup>, 但 CP/TOSS 试验得到的谱图中仍然存在质子碳与非质子碳的信号重叠。

偶极去相 (dipolar dephasing, DD) 技术利用<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H 异核耦合作用大小的差异, 区分与不同质子结合的<sup>13</sup>C 核基团。质子碳<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H 耦合作用较强, 当去耦器关闭, 横向弛豫时间  $T_2^H$  较短的质子化碳 (CH、CH<sub>2</sub>) 快速去相位, 而横向弛豫时间  $T_2^H$  较长的非质子碳如季碳 (Cq)、非质子烷氧碳 (OCq)、非质子芳香碳 (aromatic C-C)、芳香碳氧 (aromatic C-O)、

酰基/羧基碳 (N-C=O/COO) 或快速活动性组分 (mobile components) 如甲基碳 (CH<sub>3</sub>)、甲氧基碳 (OCH<sub>3</sub>)、亚甲基碳 [(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>] 去相位较慢, 在去耦器再次打开前得到保留<sup>[14]</sup>。Opella 等<sup>[15]</sup>提出了 DD 的脉冲序列, 在 CP/MAS 基础上加入延时时间 ( $T_D$ ), 即在交叉极化和数据采集之间加入一个短暂  $T_D$ , <sup>1</sup>H 耦器先关闭再打开, 在  $T_D$  期间, 质子化碳受到偶极作用较强, 磁化强度即被弛豫, 共振信号强度衰减, 而非质子碳、快速活动性官能团的信号强度受影响甚微。为解决旋转边带和相位畸变问题, Carduner<sup>[16]</sup>提出了改进 DD 脉冲序列, 在  $T_D$  延时前添加 4 个  $\pi$  脉冲提高了分辨率。 $T_D$  延时时间影响质子碳去除效率与  $T_2^H$  相关, 只有  $T_D$  大于  $T_2^H$  时才能有效去除质子碳信号。秦匡宗等<sup>[17]</sup>指出干酪根的<sup>13</sup>C-NMR 谱中质子碳  $T_2^H$  在 10~15  $\mu$ s, 非质子碳  $T_2^H$  达 200  $\mu$ s。Alemany 等<sup>[18]</sup>利用固体<sup>13</sup>C-NMR 技术研究了对二叔丁基苯等 11 种有机物芳香族及环化物中<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H 偶极相互作用对 CP 和 DD 试验的影响, 结果显示质子碳共振峰强度衰减 75% 所需  $T_D$  分别为 20~30  $\mu$ s 和 25~40  $\mu$ s, 非叔丁基 CH<sub>3</sub> 和叔丁基 CH<sub>3</sub> 共振峰强度衰减 75% 所需的  $T_D$  分别为 80~310  $\mu$ s 和 1300  $\mu$ s, 非质子的 SP<sup>2</sup> 和 SP<sup>3</sup> 杂化碳共振峰强度衰减 75% 所需的  $T_D$  分别在 165 和 1500  $\mu$ s 以上。赵丕裕等<sup>[19]</sup>分析不同延时条件下羟基苯甲酸乙酯样品中各类碳的信号衰减规律, 结果表明, DD 技术可以较有效地抑制质子化碳 (甲基碳除外) 的共振信号, 信号在  $T_D$  40  $\mu$ s 时衰减为零。 $T_D$  40  $\mu$ s 也应用土壤、沉积物等样品的 DD 试验<sup>[20-22]</sup>, 可从固体样品 CP/MAS/TOSS-NMR 谱图中有效区分 CH 和 CH<sub>2</sub> 碳信号。

Liitiä等<sup>[23]</sup>利用 CP+DD 技术研究土壤中木质素的缩合程度。Mao 等<sup>[24]</sup>将 DD 技术结合直接极化魔角旋转、化学位移各向异性过滤等技术, 获得了泥炭腐植酸固体<sup>13</sup>C-NMR 图谱, 结果显示泥炭腐植酸中芳香碳比例为 45%, 非质子芳香碳占芳香碳的 0.64%。Smernik 等<sup>[25]</sup>利用 CP+DD 技术测定了土壤中纤维素、半纤维素、木质素、几丁质、蛋白等组分特征, 通过不同  $T_D$  时间与共振峰面积的关系计算组分中质子碳和非质子碳的  $T_2^H$ , 结果显示, 非质子碳的  $T_2^H$  不低于 167  $\mu$ s, 非甲基化质子碳的  $T_2^H$  不高于 17.26  $\mu$ s, 大多数质子碳核磁信号在  $T_D$  40  $\mu$ s 时消失。Mao 等<sup>[26]</sup>综述了天然有机物的固体 NMR 技术, 当旋转频率 < 10 kHz, 40  $\mu$ s 的  $T_D$  时间可去除大部分天然有机物中质子碳。Huang 等<sup>[10]</sup>设置 40  $\mu$ s 的  $T_D$  时间, 利用 NMR 技术研究了堆肥 70 天的猪粪、鸡粪、牛粪中有机碳结构变化。Almendros 等<sup>[27]</sup>采用 DD 技术揭示了森林火灾后土壤中含碳有机物的分布。利用 DD 技术研究不同原料来源的有机肥料组分特征少见报道。本研究利用<sup>13</sup>C-NMR 谱的 CP/MAS/TOSS 结合 DD 技术, 测定了秸秆、粪肥、腐植酸等 9 个不同来源的有机肥料样品图谱, 比较其碳分布比例, 以期深入阐明不同有机组分的精细结构特征。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试有机肥料样品

选择 9 个有机肥料样品: 小麦秸秆、玉米秸秆、水稻秸秆、鸡粪、牛粪、猪粪、腐植酸铵、腐植酸钠、腐植酸钾。样品碳氮含量见表 1。样品用

研磨仪研磨粉碎过 0.15 mm 筛后烘干, 装入样品袋中备用。

### 1.2 试验步骤

称取 100 mg 左右试样, 填充装入氧化锆转子中, 将转子放入 CP-MAS 4 mm 探头。固体核磁共振波谱仪 (型号: Bruker Advance III 400, Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany) 设置测定参数为: <sup>13</sup>C 频率为 100 MHz, MAS 旋转转速为 5 kHz,  $T_D$  为 0.8 s, CP 接触时间 (contact time) 为 2 ms, <sup>1</sup>H 90° 脉宽 3.75  $\mu$ s。TOSS 技术的 4 个 180° 脉宽 8.4  $\mu$ s。扫描次数为 4096 次。使用甘氨酸 (glycine) 和金刚烷 (adamantane) 标定化学位移。DD 试验采用 Carduner<sup>[16]</sup>提出的改进偶极去相脉冲序列 (图 1)。

设置  $T_D$  延时 20、40、60、80  $\mu$ s 条件, 测定秸秆 CP/TOSS 和 DD 谱图见图 2。在  $T_D$  延时 40  $\mu$ s

表 1 有机肥料样品的碳氮含量

Table 1 Nitrogen and carbon content of tested organic fertilizer samples

样品 Sample	N (%)	C (%)
小麦秸秆 Wheat stalk	0.43	41.99
玉米秸秆 Corn straw	0.81	41.81
水稻秸秆 Rice straw	1.10	39.07
鸡粪 Chicken manure	2.96	33.91
牛粪 Cow manure	1.72	26.06
猪粪 Swine manure	1.49	19.81
腐植酸铵 Ammonium humate	4.29	43.58
腐植酸钠 Sodium humate	0.73	38.89
腐植酸钾 Potassium humate	0.77	31.30

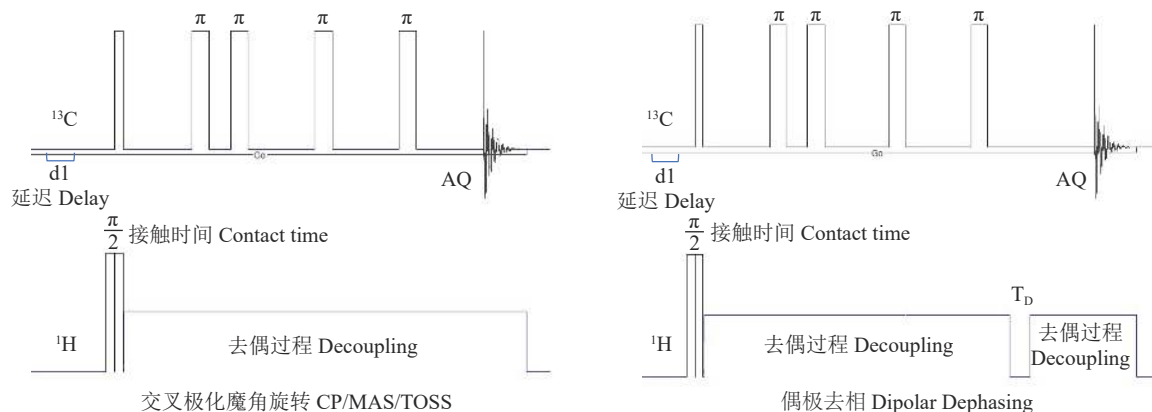


图 1 <sup>13</sup>C 固体核磁共振脉冲序列

Fig. 1 The pulse sequence for solid <sup>13</sup>C-NMR experiment

注: AQ—信号采集;  $T_D$ —延迟时间; d1—循环延迟。

Note: AQ—Acquisition;  $T_D$ —Delay time; d1—Recycle delay.

时, 化学位移范围在 60~93 ppm 的烷氧碳 (O-alkyl C) 和 93~113 ppm 的异头碳 (anomeric C) 的共振峰信号被显著抑制, 而在 174 ppm 处的非质子官能团羧基/酰胺基 (COOH/N-C=O) 的信号保留。图谱在 40、60 和 80  $\mu\text{s}$  的 TD 延时条件下共振峰未见明显变化。 $T_D$  延时为 40  $\mu\text{s}$  条件, DD 试验可筛选出秸秆样品中的非质子碳及快速活性移动组分。

### 1.3 数据分析

核磁共振图谱使用 Bruker Topspin 2.1 和 Mestrec (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany) 调整零级、一级相位, 校正基线, 平滑处理, 对图谱进行积分, 获得不同碳核官能团占谱图总积分面积的相对比例, 根据文献<sup>[10, 26]</sup>, 图谱中含碳官能团与化学位移  $\delta$  对应: 烷基碳 (alkyl C) 0~44 ppm; 甲氧基碳/烷基氮 (methoxyl C/N-alkyl) 44~60 ppm; 烷氧碳 (O-alkyl C) 60~93 ppm; 异头碳 (anomeric C) 93~113 ppm; 芳香碳 (aromatic C) 113~142 ppm; 芳香碳氧 (aromatic C-O) 142~162 ppm; 羧基/酰胺基碳 (carbonyl/amides C) 162~188 ppm; 酮/醛基碳

(ketone/aldehyde C) 188~220 ppm。由于去耦器关闭导致质子碳、非质子碳均产生信号衰减, 将 174 ppm 处非质子官能团羧基/酰胺基 (COOH/N-C=O) 的共振峰作为校正因子校正偶极去相期间的信号损失。CP/MAS/TOSS 图谱与 DD 图谱差减得到质子化碳组分。

## 2 结果与分析

### 2.1 CP/MAS/TOSS 谱图解析

有机肥料的 CP/MAS/TOSS 谱图见图 3, 各类碳官能团所占相对比例见表 2。秸秆样品在 0~188 ppm 范围内存在共振峰, 以烷氧碳、异头碳、烷基碳官能团为主。烷氧碳 (60~93 ppm) 占比 55% 左右, 归属为碳水化合物如醇类、纤维素、半纤维素糖苷特征。异头碳 (93~113 ppm) 占比约 14% 左右, 系纤维素半纤维素中的  $\beta$ -1,4 糖苷键中的  $C_1$ 、 $C_4$  特征。烷基碳 (0~44 ppm) 占比在 7%~11%, 该区域存在双峰, 21 ppm 共振峰由  $\text{CH}_3$  及少量  $\text{CH}_2$  引起, 30 ppm 共振峰由  $\text{CH}_2$  引起。甲氧基碳/烷基氮 (44~

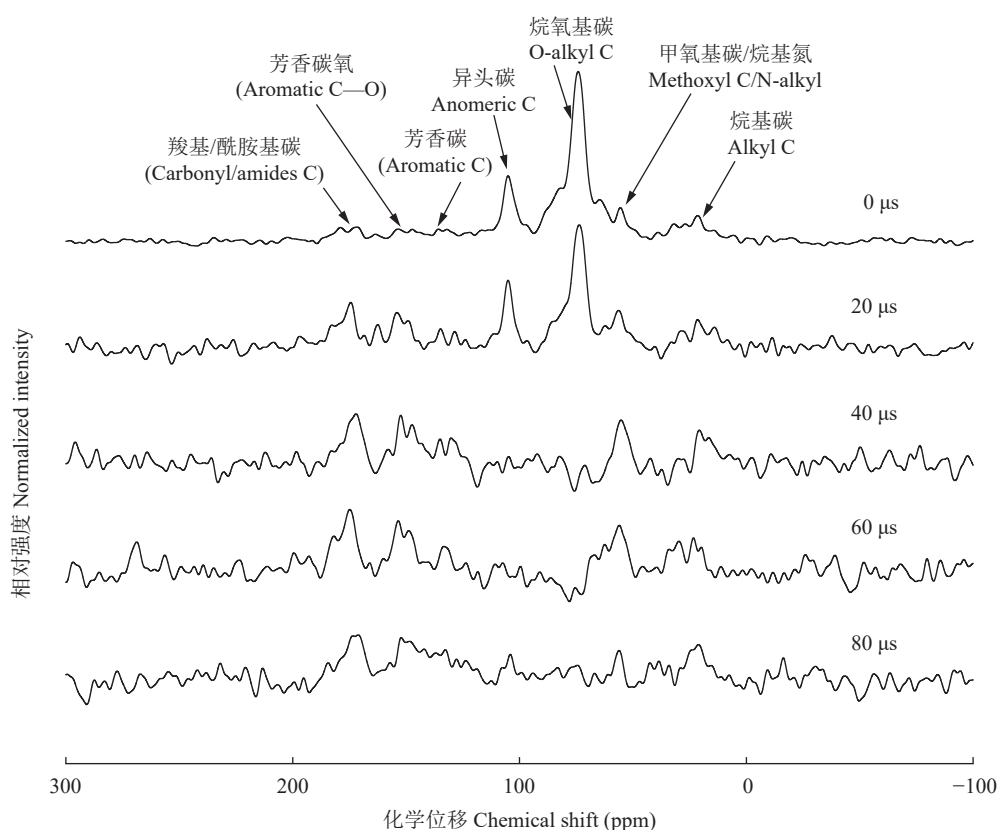
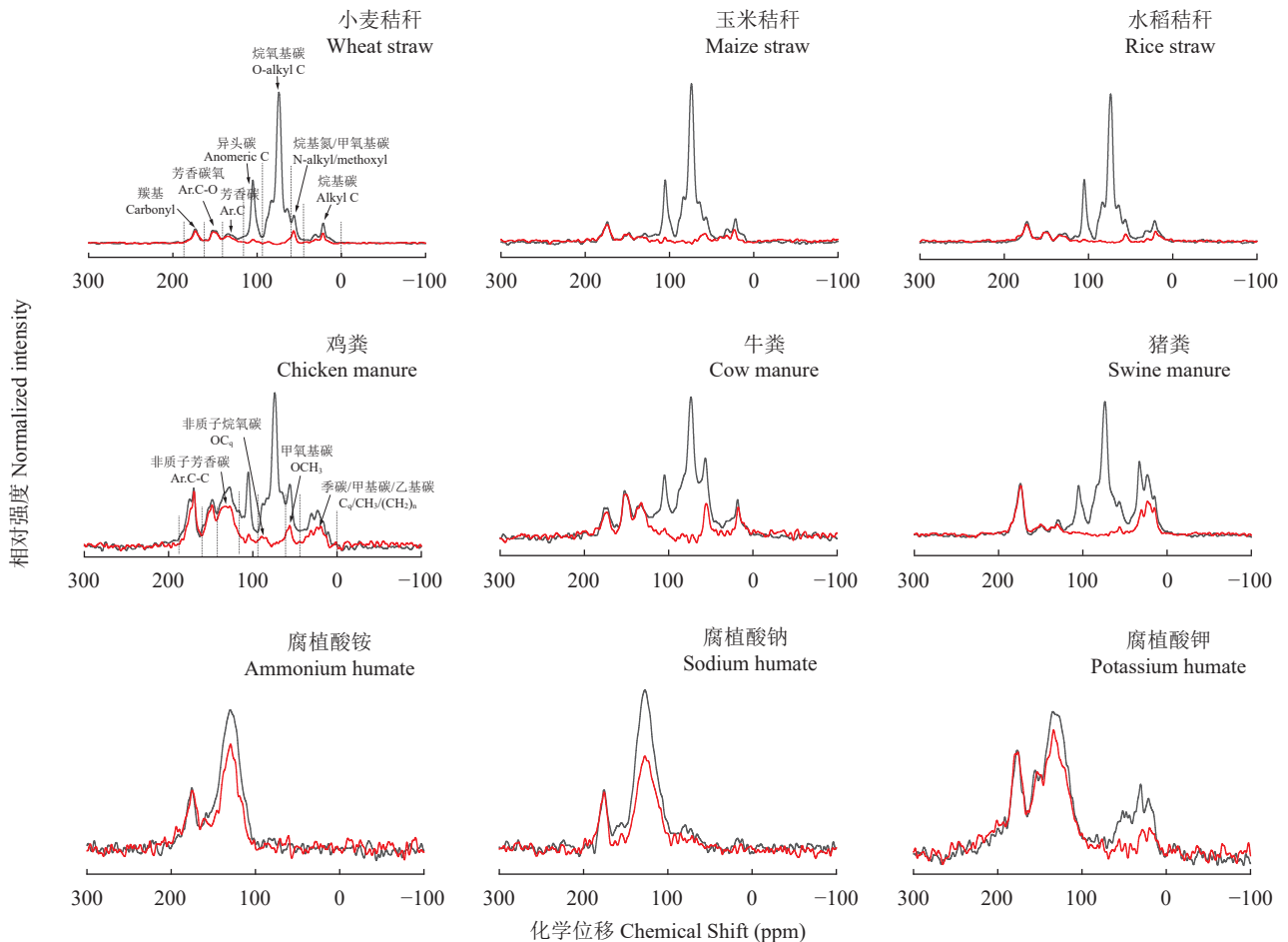


图 2 不同偶极相移延时 (20~80  $\mu\text{s}$ ) 条件下小麦秸秆的 $^{13}\text{C}$  固体核磁共振图谱  
Fig. 2 NMR spectra of wheat straw under different delay time of dipolar dephasing

注: 20~80  $\mu\text{s}$  为偶极相移延迟时间。

Note: 20~80  $\mu\text{s}$  were the delay time.

图3 有机肥料<sup>13</sup>C核磁共振图谱Fig. 3 <sup>13</sup>C NMR spectrum of organic fertilizer

注：图上黑线显示交叉极化魔角旋转 CP/MAS/TOSS 图谱，红线显示偶极去相图谱。

Note: The black line on the graph shows the CP/MAS/TOSS spectrum of cross polarization magic angle rotation, and the red line displays the dipolar dephasing pattern.

60 ppm) 占比 6%，归属为木质素中甲氧基特征或氮取代的烷基碳。羧基/酰胺基碳 (162~188) 占比 5%~7%。芳香碳 (113~142 ppm) 占比 5%~6% 左右，共振峰集中在 128、134 ppm 附近，为木质素中芳香碳 C-H 或 C-N、C-C。芳香碳氧 (142~162 ppm) 占比 3%~5%，为木质素特征，由木质素结构单元香豆醇、松柏醇或芥子醇中被氧取代的酚基引起。酮基碳、醛基碳及醌基区域 (188~220 ppm) 信号与基线持平。

鸡粪、牛粪和猪粪图谱在 0~220 ppm 范围内存在共振峰。3 个粪肥样品烷氧碳占比 31%~37%。鸡粪和牛粪中芳香碳占比分别为 18% 和 11%，归属木质素特征，鸡粪样品共振峰在 127、148 ppm，牛粪共振峰在 133、152 ppm；猪粪芳香碳占比 5%，共振峰在 130 和 148 ppm。烷基碳在鸡粪和牛粪中贡献占比分别为 12% 和 11%，猪粪为 28%，牛粪在 18 ppm

处有明显单峰，鸡粪、猪粪在 14、23、32 ppm 处为多重峰，0~25 ppm 由 CH<sub>3</sub> 和少量 CH<sub>2</sub> 引起，25~44 ppm 由长链 CH<sub>2</sub> 引起。甲氧基碳/烷基氮位移在 57 ppm，鸡粪、牛粪、猪粪中占比分别为 8%、15%、6%，为木质素中 OCH<sub>3</sub> 结构或氨基酸蛋白质成分。异头碳在 3 个粪肥中占比为 10%~12%，位移集中在 105 ppm。羧基/酰胺基碳位移集中在 173 ppm，鸡粪、牛粪、猪粪中占比分别为 10%、7%、11%。粪肥样品中酮/醛基碳占比不超过 1%。

腐植酸铵和腐植酸钠谱图相近，主要在 60~188 ppm 范围内存在共振峰，腐植酸钾在 0~60 ppm 范围内还存在共振峰。3 个腐植酸样品有机碳归属以芳香碳为主，腐植酸铵、腐植酸钠和腐植酸钾芳香碳占比分别为 72%、67%、48%，共振峰在 130 和 156 ppm 附近，为木质素来源的芳香碳和芳香碳氧特征。异头碳在腐植酸铵、腐植酸钠、腐植酸钾占比

表 2 应用交叉极化/旋转边带全抑制技术和偶极去相技术 (CP/TOSS+DD) 测定有机肥料不同碳官能团相对比例 (%)  
**Table 2 Assignment of functional groups in the different chemical shift regions and their relative proportions (%) determined by CP/TOSS and DD techniques in organic fertilizers**

碳结构 Carbon structure	化学位移 (ppm) Chemical shift range	官能团 Functional groups	粪肥 Manure				腐植酸 Humic acid				
			秸秆 Straw		猪粪 Swine manure		腐植酸钠 Sodium humate	腐植酸铵 Ammonium humate	腐植酸钾 Potassium humate		
			小麦 Wheat	玉米 Corn	水稻 Rice	鸡粪 Chicken manure				牛粪 Cow manure	
烷基碳 Alkyl C	0~44	CH/CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> /(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> /Cq <sup>a</sup> 总计 Total	4 3 7	5 5 10	7 4 11	5 7 12	3 8 11	16 12 28	0 1 1	1 0 1	9 5 14
甲基碳/烷基氮 Methoxyl C/N-alkyl	44~60	NCH OCH <sub>3</sub> <sup>a</sup> 总计 Total	4 2 6	4 2 6	5 1 15	5 3 8	9 6 15	9 1 6	5 0 0	0 1 1	5 1 6
烷氧碳 O-alkyl C	60~93	OCH Ocq <sup>a</sup> 总计 Total	55 1 56	53 1 54	54 0 54	28 3 31	34 0 34	37 0 37	1 2 3	3 5 8	2 2 4
异头碳 Anomeric C	93~113	O-CH-O O-Cq-O <sup>a</sup> 总计 Total	14 1 15	14 1 15	13 0 13	7 2 9	10 1 11	9 1 10	9 1 10	4 2 6	1 5 6
芳香碳 Aromatic C	113~142	C-H C-C <sup>a</sup> 总计 Total	2 4 6	3 3 6	2 3 5	3 15 18	1 11 12	2 3 5	1 3 5	2 37 57	8 25 33
芳香碳氧 Aromatic C-O	142~162	Ar.C-O	5	3	4	9	9	2	15	9	15
羧基/酰胺基 Carboxyl/Amides C	162~188	COOH/N-C=O	5	6	7	10	7	11	16	12	16
酮/醛 Ketone/Aldehyde C	188~220	C=O/CHO	0	1	0	1	1	1	2	0	6
总脂肪碳 Total fatty carbon	0~113		84	85	84	60	71	81	10	22	30
总芳香碳 Total aromatic carbon	113~162		11	9	9	27	21	7	72	67	48

注: <sup>a</sup> 表示依据偶极去相技术获取。

Note: <sup>a</sup> represents the data based on CP/TOSS spectrum with dipolar dephasing.

分别为 6%、12%、6%，共振峰不明显，与芳香区域重叠。腐植酸铵、腐植酸钠、腐植酸钾样品中羧基/酰胺基碳 (176 ppm) 占比分别为 16%、12%、16%。腐植酸钾中烷基碳占比为 14%，共振峰在 21 和 30 ppm，甲氧基碳/烷基氮 (49 ppm) 占比 6%。3 个腐植酸在酮/醛基碳区域信号与基线持平。

## 2.2 DD 谱图解析

DD 谱图 (图 3) 可筛选出有机肥料中的非质子碳和快速活动性组分，相比 CP 谱图，0~142 ppm 位移范围内信号出现明显衰减，而 142~220 ppm 范围内的信号损失较少，与 CP 图谱相近，表明该化学位移范围内的多是非质子碳，C-H 耦合作用较弱，40  $\mu$ s 的去耦时间不足使其失相。将 CP 和 DD 谱图由校正因子校正后差减，得到去质子碳等相应官能团的比例 (表 2)。

秸秆样品中，烷基碳 ( $C_q$ ) 和快速活动性组分占比 3%~5%， $OCH_3$  占比 1%~2%；烷氧碳中非质子  $OC_q$  和非质子异头碳  $O-C_q-O$  占比很少，不超过 1%；非质子芳香碳占比 3%~4%。说明秸秆样品主要以纤维素来源的质子碳  $OCH$ 、 $O-CH-O$  基团为主。秸秆样品中  $NCH$  略高于木质素来源的  $OCH_3$ 。存在超过一半芳香碳为非质子芳香碳，说明芳环上存在较多取代基。

3 种粪肥样品烷基碳 ( $C_q$ ) 和快速活动性组分占比 7%~12%；鸡粪非质子烷氧碳  $OC_q$  占比 3%，牛粪与猪粪无  $OC_q$  信号；粪肥样品非质子异头碳  $O-C_q-O$  占比不到 2%。鸡粪、牛粪与猪粪  $OCH_3$  占比分别为 3%、6% 和 1%；非质子芳香碳占比 15%、11% 和 3%。粪肥样品烷基碳和快速活动性组分、非质子芳香碳占比明显高于秸秆样品。鸡粪、牛粪芳香碳中非质子化比例分别为 15% 和 11%，高于猪粪 (3%)，猪粪与秸秆样品类似。

腐植酸样品中，非质子烷氧碳  $OC_q$  占比 2%~5%，异头碳  $O-C_q-O$  占比 2%~8%。矿源腐植酸钾中  $NCH$  和  $OCH_3$  分别占比 5% 和 1%，质子化烷基碳和非质子烷基碳占比分别为 9% 和 5%。腐植酸样品主要以芳香族化合物为主，非质子芳香碳占比 25%~37%，明显高于粪肥与秸秆样品，说明芳香碳存在较多的取代基团。

## 3 讨论

DD 技术通过有机物中  $^{13}C-^1H$  耦合作用强弱来区分质子碳与非质子碳、刚性组分和快速活动性组

分，与  $^1H$  直接相接的质子碳相比于非质子碳有较短的横向弛豫时间，因此在一定  $T_D$  时间内，质子碳快速失相，例如脂肪长链的  $CH_2$ 、芳香族的  $CH$ ，而非质子碳如  $C_q$ 、 $O-C_q$ 、芳香碳等以及快速活动性组分信号保留下来，这是由于甲基快速旋转减少了  $^{13}C-^1H$  偶极耦联<sup>[26]</sup>。因此 DD 图谱相比于 CP 图谱可获得更多的有机碳官能团结构信息。

农作物秸秆化学成分以纤维素、半纤维素、木质素为主。Bhattacharyya 等<sup>[28]</sup>测定了印度东部 18 个不同品种水稻秸秆化学组成，发现纤维素、半纤维素、木质素、二氧化硅平均占比分别为 36.29%、20.67%、9.42%、6.67%。Cogle 等<sup>[29]</sup>利用  $^{13}C$  固体 NMR 技术测定了小麦秸秆的 CP/TOSS 图谱，小麦秸秆碳官能团归属位移多在 60~108 ppm 范围，以碳水化合物为主，占比为 72%，其次是 108~160 ppm (芳香碳) 和 0~50 ppm (烷基碳)，占比为 9%。Xiao 等<sup>[30]</sup>提取了玉米、黑麦、水稻秸秆中的纤维素、半纤维素、木质素，并获得  $^{13}C$ -NMR 图谱，结果显示 3 种农作物秸秆中木质素为非缩合愈创木基和紫丁香基单元，而对羟基苯基单元较少。玉米和黑麦秸秆的半纤维素以葡萄糖醛酸阿拉伯木聚糖为主，而水稻秸秆中半纤维素主要是  $\alpha$ -葡聚糖和 4-O-甲基-D-葡萄糖醛酸。本研究 3 个秸秆的  $^{13}C$ -NMR 图谱，显示以纤维素来源的烷氧碳为主，纤维素是由 D-葡萄糖以  $\beta$ -1,4 糖苷键组成的大分子多糖，糖环上的碳基本为质子碳，DD 技术可明显区分开。由于禾本科植物木质素的芳香结构以愈创木基-紫丁香基为主，存在  $OCH_3$ 、酚基取代，DD 技术的  $T_D$  延时后，少部分的芳香碳氢信号损失。秸秆样品表皮上角质和软木脂存在大量的含快速活动性组分的脂肪长链，在偶极去相后信号消失。烷氧碳占比 55% 左右，归属为碳水化合物如醇类、纤维素、半纤维素糖苷特征。异头碳占比约 14% 左右，系纤维素半纤维素中的  $\beta$ -1,4 糖苷键中的  $C_1$ 、 $C_4$  特征。烷基碳占比在 7%~11%，该区域存在双峰。

畜禽粪便是畜禽粪尿与垫材、动物毛发皮屑、饲料残渣和水等混合物<sup>[2]</sup>。Luo 等<sup>[31]</sup>通过固体  $^{13}C$ -NMR 技术测定了鸡粪中的总有机质、碱提取有机质、水提有机质，DD 图谱显示烷氧碳和异头碳共振峰信号被显著抑制，部分烷基碳和芳香碳共振峰信号保留，这与我们的研究结果相符。Schnitzer 等<sup>[32]</sup>利用固体  $^{13}C$ -NMR 测定了新鲜鸡粪的 CP 图谱，鸡粪中总脂肪碳含量占比 87.2%，总芳香物质占比 6.3%。本试验收集的粪肥样品中鸡粪、牛粪经过发酵堆肥腐熟

过程<sup>[33]</sup>, 脂肪族碳尤其烷氧碳占比较秸秆少, 芳香碳含量增加, 非质子芳香碳占比也较秸秆样品高, 说明样品中碳明显趋向稳定。本次试验采集的猪粪样品, 可能未经过长时间的发酵堆肥腐熟, 与鸡粪牛粪相比, 猪粪样品含有较高比例的质子化烷基碳, 芳香碳尤其是非质子的芳香碳组分比例相对较低。

腐植酸类物质是高分子聚合物, 结构复杂, 普遍认为其是多元酚和醌作为结构单元的聚合物<sup>[34]</sup>。根据 Schulten 等<sup>[35]</sup>提出腐植酸经典模型, 芳香酸和甲基化酚是腐植酸的主要官能团。腐植酸具备脂肪-芳香族基本结构单元及多种官能团如羧基、羰基、醌基、酚羟基、醇羟基、胺基等<sup>[36]</sup>。本研究选择的 3 个腐植酸样品, 以芳香物质和羧基酰胺基为主, 在  $T_D$  延时后芳香环碳氢信号仅损失了一小部分, 这可能是由于腐植酸具备芳香环及周围侧链, 存在羧基、酰胺基或杂原子取代基, 与 Mao 等<sup>[24]</sup> 和阳虹等<sup>[37]</sup> 的研究结果相符。3 个腐植酸中存在 12%~16% 芳香碳氧, 表明了其具备大量的酚类结构。与腐植酸钾相比, 腐植酸铵和腐植酸钠拥有较多的脂肪碳, 且脂肪碳以质子碳 CH、CH<sub>2</sub> 为主, 推测其芳香环上存在脂肪长链。

## 4 结论

研究结果显示在偶极相移  $T_D$  时间 40  $\mu$ s 下, 利用 DD 图谱可筛选出有机肥料中非质子碳和快速活动性组分。秸秆和粪肥样品以纤维素来源的烷氧碳为主, 秸秆中烷氧碳占比 55%, 粪肥中占比 31%~37%, 非质子的烷氧碳含量均不超过 3%。鸡粪、牛粪较秸秆样品存在更多的非质子脂肪族化合物和芳香化合物, 粪肥和秸秆中甲氧基碳占比低于烷基氮。芳香碳、羧基碳和酰胺基碳在腐植酸样品中含量最高, 芳香族碳占比 48%~72%, 羧基酰胺碳占比不高于 12%, 腐植酸钾相比于腐植酸铵和腐植酸钠含有较多的脂肪碳, 样品芳香物质上存在较多的取代基, 非质子芳香碳组分占总芳香碳比例 50% 左右。利用 CP/MAS/TOSS+DD 技术更加精细地研究有机肥料组分结构特征, 可获取有机肥料的质子碳和非质子碳官能团信息。

## 参 考 文 献:

[1] 杜为研, 唐杉, 汪洪. 我国有机肥资源及产业发展现状[J]. *中国土壤与肥料*, 2020, (3): 210-219.  
Du W Y, Tang S, Wang H. The status of organic fertilizer industry and organic fertilizer resources in China[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2020, (3): 210-219.

[2] He Z Q. Environmental chemistry of animal manure[M]. New York: Nova Science Publishers, 2011.  
[3] 高汉宾, 张振芳. 核磁共振原理与试验方法[M]. 湖北武汉: 武汉大学出版社, 2008.  
Gao H B, Zhang Z F. Principles and experimental methods of nuclear magnetic resonance[M]. Wuhan, Hubei: Wuhan University Press, 2008.  
[4] Wilson M A. Chapter 8 - humic substances in NMR techniques and applications in geochemistry and soil chemistry[M]. Oxford: Pergamon, 1987.  
[5] Baldock J A, Oades J M, Waters A G, *et al.* Aspects of the chemical structure of soil organic materials as revealed by solid-state<sup>13</sup>C NMR spectroscopy[J]. *Biogeochemistry*, 1992, 16: 1-42.  
[6] Preston C M. Application of NMR to soil organic matter analysis: History and prospects[J]. *Soil Science*, 1996, 161(3): 144-166.  
[7] Sun R C, Lawther J M, Banks W B. Fractional and structural characterization of wheat straw hemicelluloses[J]. *Carbohydrate Polymers*, 1996, 29(4): 325-331.  
[8] Tang J C, Maie N, Tada Y, Katayama A. Characterization of the maturing process of cattle manure compost[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(2): 380-389.  
[9] Mao J D, Chen N, Cao X Y. Characterization of humic substances by advanced solid state NMR spectroscopy: Demonstration of a systematic approach[J]. *Organic Geochemistry*, 2011, 42(8): 891-902.  
[10] Huang J Y, Yu Z X, Gao H J, *et al.* Chemical structures and characteristics of animal manures and composts during composting and assessment of maturity indices[J]. *PLoS ONE*, 2017, 12(6): e0178110.  
[11] Andrew E R, Bradbury A, Eades R G. Removal of dipolar broadening of nuclear magnetic resonance spectra of solids by specimen rotation [J]. *Nature*, 1959, 183: 1802-1803.  
[12] Stejskal E O, Schaefer J, Waugh J S. Magic-angle spinning and polarization transfer in proton-enhanced NMR[J]. *Journal of Magnetic Resonance*, 1977, 28(1): 105-112.  
[13] Dixon W T. Spinning-sideband-free and spinning-sideband-only NMR spectra in spinning samples[J]. *Journal of Chemical Physics*, 1982, 77(4): 1800-1809.  
[14] Keeler C, Maciel G E. <sup>13</sup>C NMR spectral editing of humic material [J]. *Journal of Molecular Structure*, 2000, 550(4): 297-305.  
[15] Opella S J, Frey M H. Selection of nonprotonated carbon resonances in solid-state nuclear magnetic resonance[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1979, 101(19): 5854-5856.  
[16] Carduner K R. A method for the implementation of protonated carbon suppression with the total suppression of spinning sidebands (TOSS)[J]. *Journal of Magnetic Resonance*, 1987, 72(1): 173-176.  
[17] 秦匡宗, 李振广, Бодоев Н. 干酪根的<sup>13</sup>C NMR研究—偶极相移技术的应用[J]. *科学通报*, 1992, 37(8): 721-723.  
Qin K Z, Li Z G, Бодоев Н. Application of the dipole dephasing technique for <sup>13</sup>C NMR study of kerogen[J]. *Chinese Science Bulletin*, 1992, 37(8): 721-723.  
[18] Alemany L B, Grant D M, Alger T D, Pugmire R J. Cross polarization and magic angle sample spinning NMR spectra of model

- organic compounds. 3. Effect of the carbon-13-proton dipolar interaction on cross polarization and carbon-proton dephasing[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1983, 105(22): 6697–6704.
- [19] 赵丕裕, 吴泰琉, 孙尧俊, 王力平. 边带全抑制和偶极相移技术在 $^{13}\text{C}$ 固体高分辨核磁共振中的应用[J]. *复旦学报(自然科学版)*, 1990, 29(2): 208–213.
- Zhao P Y, Wu T L, Sun Y J, Wang L P. Application of toss and dipolar dephasing techniques to solid-state high resolution NMR[J]. *Journal of Fudan University( Natural Science)*, 1990, 29(2): 208–213.
- [20] Mao J D, Cory R M, Mcknight D M, Schmidt-Rohr K. Characterization of a nitrogen-rich fulvic acid and its precursor algae from solid state NMR[J]. *Organic Geochemistry*, 2007, 38(8): 1277–1292.
- [21] Mao J D, Ajakaiye A, Lan Y Q, *et al.* Chemical structures of manure from conventional and phytase transgenic pigs investigated by advanced solid-state NMR spectroscopy[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(6): 2131–2138.
- [22] Zhang Y L, Yao S H, Mao J D, *et al.* Chemical composition of organic matter in a deep soil changed with a positive priming effect due to glucose addition as investigated by  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2015, 85: 137–144.
- [23] Liitiä T, Maunu S L, Sipilä J, Hortling B. Application of solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy and dipolar dephasing technique to determine the extent of condensation in technical lignins[J]. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 2002, 21(3/4): 171–186.
- [24] Mao J D, Schmidt-Rohr K. Accurate quantification of aromaticity and nonprotonated aromatic carbon fraction in natural organic matter by  $^{13}\text{C}$  solid-state nuclear magnetic resonance[J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(9): 2680–2684.
- [25] Smernik R J, Oades J M. Solid-state  $^{13}\text{C}$ -NMR dipolar dephasing experiments for quantifying protonated and non-protonated carbon in soil organic matter and model systems[J]. *European Journal of Soil Science*, 2001, 52(1): 103–120.
- [26] Mao J D, Cao X Y, Oik D C, *et al.* Advanced solid-state NMR spectroscopy of natural organic matter[J]. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 2017, 100: 17–51.
- [27] Almendros G, Tinoco P, De la Rosa J M, *et al.* Selective effects of forest fires on the structural domains of soil humic acids as shown by dipolar dephasing  $^{13}\text{C}$  NMR and graphical-statistical analysis of pyrolysis compounds[J]. *Journal of Soils & Sediments*, 2018, 18: 1303–1313.
- [28] Bhattacharyya P, Bhaduri D, Adak T, *et al.* Characterization of rice straw from major cultivars for best alternative industrial uses to cutoff the menace of straw burning[J]. *Industrial Crops and Products*, 2020, 143: 111919.
- [29] Cogle A L, Saffigna P G, Barron P F. The use of  $^{13}\text{C}$ -NMR for studies of wheat straw decomposition[J]. *Plant & Soil*, 1989, 113(1): 125–128.
- [30] Xiao B, Sun X F, Sun R C. Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw[J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2001, 74(2): 307–319.
- [31] Luo Y H, Zhang D Q, Yu G H, Shen Q R. Aromatic moieties from matured chicken manure and agriculture residues compost suppress growth of *Lepidium sativum* L. and *Trichoderma harzianum*[J]. *Pedosphere*, 2013, 23(6): 826–834.
- [32] Schnitzer M I, Monreal C M, Facey G A, Fransham P B. The conversion of chicken manure to biooil by fast pyrolysis I. Analyses of chicken manure, biooils and char by  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR and FTIR spectrophotometry[J]. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 2007, 42(1): 71–77.
- [33] Gómez X, Diaz M C, Cooper M, *et al.* Study of biological stabilization processes of cattle and poultry manure by thermogravimetric analysis and  $^{13}\text{C}$  NMR[J]. *Chemosphere*, 2007, 68(10): 1889–1897.
- [34] Jansen S A, Malaty M, Nwabara S, *et al.* Structural modeling in humic acids[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 1996, 4(3): 175–179.
- [35] Schulten H, Schnitzer M. A state of the art structural concept for humic substances[J]. *Naturwissenschaften*, 1993, 80(1): 29–30.
- [36] Stevenson F J. Humus chemistry: Genesis, composition, reactions [M]. New York: Wiley, 1994.
- [37] 阳虹, 李永生, 张玉贵. 红外光谱和核磁共振对腐植酸分子结构的表征[J]. *煤炭转化*, 2013, 36(4): 72–76.
- Yang H, Li Y S, Zhang Y G. Characterization of humic acid molecular structure by method of infrared spectrum and nuclear magnetic resonance[J]. *Coal Conversion*, 2013, 36(4): 72–76.