

## 토양에서 추출한 흙산의 분자량별 분류에 따른 분광학적 성질 비교

申鉉群 · 文熙正\* · 梁漢範<sup>†</sup> · 尹錫丞<sup>‡</sup>

한국과학기술원 화학과

<sup>†</sup>한국원자력연구소

<sup>‡</sup>충남대학교 자연과학대학 화학과

(1994. 9. 22 접수)

## Spectroscopic Characterization of Soil Humic Acid Fractions by Molecular Weight

Hyun Sang Shin, Hichung Moon\*, Han Beom Yang<sup>†</sup>, and Sock Sung Yun<sup>‡</sup>

Department of Chemistry, Korea Advanced Institute of Science and Technology,  
Taejon 305-701, Korea

<sup>†</sup>Korea Atomic Energy Research Institute, P. O. Box 105, Taejon 353-606, Korea

<sup>‡</sup>Department of Chemistry, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

(Received September 22, 1994)

**요 약.** 토양에서 얻어진 흙산(HA)을 한외 여과법을 이용 분자량에 따라 4개의 소부분(F1: 100,000 dalton 이상; F2: 100,000 dalton 이하; F3: 10,000 dalton 이하; F4: 2,000 dalton 이하)으로 분리한 뒤 적외선 분광법과 핵자기 공명 분광법을 통하여 각 소부분들의 분광학적 특성을 규명하고 상호간에 비교 분석하였다. 4개 소부분들의 <sup>1</sup>H과 <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼은 전체적인 특성에서 모두 흙산 모액 스펙트럼과 유사하게 나타났다. 이 결과는 분자량이 변하더라도 흙산의 전체적 특성이 그대로 유지됨을 제시한다. 차이점으로는 IR 스펙트럼 결과 분자량이 적어지면서 다당류 성분 함량이 다소 감소된 반면 카르복실기 성분 함량은 조금 증가된 것으로 나타났다.

**ABSTRACT.** The soil humic acid was subdivided into four subfractions by molecular weight (F1: >100,000 dalton; F2: >100,000 dalton; F3: >10,000 dalton; F4: >2,000 dalton) using MP-dual hollow fiber ultrafiltration system. The characterization using IR, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy, showed similar spectroscopic features of HA, demonstrating that the bulk properties of HA subfractions are very similar to one another. IR spectral data showed a decrease in polysaccharide contents and increase in carboxylate functionality as molecular weight become smaller.

### 서 론

휴믹물질은 유사한 성질을 가진 많은 자연산 화합물들의 불균질 혼합물로 이루어진 복잡한 물질로서 물질특성의 규명을 어렵게 한다. 이 문제점을 극복하기 위한 방법으로 휴믹물질의 분자 조성과 관련된 성질에 따른 소부분분리(subfractionation) 방법이 널리 이용되어 왔다<sup>1,2</sup>. 또 다른 방법으로는 subspectral editing 기법을 도입한 다펄스-탄소 핵

자기공명(multipulse-<sup>13</sup>C NMR) 방법이 모액 자체의 탄소다중도법 분리를 위해 사용될 수 있다<sup>3</sup>.

특히, 소부분분리 방법 중 분자량에 따른 분리는 휴믹물질의 성질규명 차원에서 용이하게 시도되어 왔다<sup>3</sup>. 예로써 Wershaw는 휴믹물질로부터 산과 염기에서의 용해도 차에 따라 분리하여 얻은 흙산을 Sepadex G-50 column을 사용한 겔 투과 크로마토그래피법을 이용 용출 순서에 따라 4개의 소부분

으로 분리하고 탄소 핵자기 공명( $^{13}\text{C}$  NMR)을 이용하여 각 소부분들의 분석을 통해 흡산에 lignins, carbohydrates 등 주요 선구물질들의 존재를 보고하였다<sup>4</sup>. Reuter와 Perdue는 다양한 크기의 Sephadex column을 이용하여 흡산의 분자량별 분리를 통해 aquatic-흡산의 수 평균 분자량(Mn) 값이 340에서 1231 범위로 분포하고 있음을 보고했다<sup>5</sup>. 특히 이들은 각 소부분에 대해 얻은 적외선 스펙트럼만의 결과를 통해 가장 적은 분자량 소부분에서 조차 적외선 스펙트럼의 복잡한 휴믹 특성이 유지되고 있음을 제시했다. 이러한 흡산의 각 소부분에 관한 성질규명은 흡산과 중금속 이온간의 착물반응과정에 대한 연구에서도 중요한 영향을 미친다. 만일 복잡한 혼합물인 흡산이 분자량에 따라 성질이 변한다면 각 분자량 소부분별로 이들 착물반응이 조사 비교되어야 할 것이다. 또한 반투과성막을 이용 자유 이온과 흡산에 흡착한 이온양을 분리 분석하는 실험과정에서 저 분자량 휴믹물질의 누출로 인한 문제점 보완 차원에서도 분자량별 성질은 중요하다<sup>6</sup>. 따라서 본 연구의 목적은 한국산 토양 흡산을 한의 여과법을 이용 여러 분자량별로 분리한 뒤, 적외선(IR) 스펙트럼 외에도 핵자기공명(NMR) 스펙트럼을 이용 각각의 구조적인 특성을 규명하고, 상호간을 비교하는데 있다.

## 실 험

본 실험에서 사용된 흡산은 충북 옥천계 괴산 지역의 토양을 채취하여 건조한 후 염기 처리(base digestion)하여 얻어졌다. 흡산의 추출 및 정제에 대한 자세한 과정은 이전 문헌에 보고한 바와 같다<sup>7</sup>. 고온 분말 상태로 얻어진 흡산 시료중 6g을 Glove box 안에서 0.1M NaOH 10mL에 완전히 녹이고,  $1 \times 10^{-3}$  M tris 완충제[tris(hydroxymethyl)amino methane, Aldrich Co.]를 포함하는 0.1M  $\text{NaClO}_4$  용액을 이용 1L로 묽힘으로서  $5 \text{g L}^{-1}$  흡산 모액을 얻었다. 이 과정에서 0.1M  $\text{HClO}_4$ 을 사용 모액의 pH는 8.5로 맞추어졌다. 분자량 크기에 따른 분리를 위해 MP-2 Dual Hollow Fiber ultrafiltration system(Spectrum Co.)이 사용됐다. 균질한 상태의 흡산 모액을 3등분으로 나누고, 각 부분을 3종류의 MP-1 Molecular/Por HF Cartridges, 2,000, 10,000,

100,000 MWCO(Spectrum Co.)에 각각 통과시켰다. 각각에 대한 농도는 UV-Vis 분광기(Lambda 5, Perkin Elmer)를 사용 300nm에서의 흡수도를 측정 결정되었다. 이들을 양성자화된 상태로 동결건조하여 고온 분말상태의 최종 고체 시료들을 얻었다<sup>7</sup>.

IR 스펙트럼은 BOMEM mode MB 100 FT-IR 분광기를 사용하였다. 시료는 사용전 충분히 건조한 KBr(FT-IR Grade, Aldrich Co.)과 흡산을 약 100:1의 무게 비율로 섞은 뒤 pellets으로 만들어 측정하였다.  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼은 75.47 MHz에서 작동하는 Bruker AM 300을 사용하였다. 시료는 0.1M NaOD(in  $\text{D}_2\text{O}$ )에서 약  $200 \text{ mg mL}^{-1}$ 의 농도로 녹인 후 10 mm NMR 셀에 담겨졌다. 흡산내 모든 탄소들의 불완전한 이완현상과 서로 다른 NOE(nuclear Overhauser enhancement) 효과로 인한 피크 세기의 변형(distortion) 등으로 생길 수 있는 정량적인 오차를 최소화하기 위해  $45^\circ$  펄스폭(pulse width)에서 0.2 s의 수집시간(acquisition time)과 2.0 s의 이완지연시간(relaxation delay time) 조건으로 Inverse-gated decoupling을 사용하였다<sup>8,9</sup>. 정성적으로도 좋은 신호 대 잡음비(S/N)의 스펙트럼을 얻기 위해 약  $3 \times 10^4$ 번의 주사 신호(FID's : free induction decays)가 더하여졌고, 50 Hz의 선폭 증가 함수가 곱하여졌다.  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼 역시 같은 방식으로 5 mm NMR 셀에 얻어진 시료를 300 MHz에서 작동하는 Bruker AM 300을 사용하여 얻어졌다. 자세한 실험 조건과 방법은 본 연구실에서 앞서 보고한 문헌에 제시되어 있다<sup>7</sup>.

## 결과 및 고찰

**분자량별 분리.**  $5 \text{g L}^{-1}$ (pH 8.5, 이온강도 0.1M  $\text{NaClO}_4$ )의 높은 흡산 용질 농도를 사용하여 분리 과정 동안의 pH 변화(보통  $\pm 1$  unit)나 이온강도 변화에 대해 재현성 있는 분리 결과를 얻을 수 있었다<sup>7</sup>. 위 방법으로 흡산 모액을 분자량별로 나누어 얻은 4개 소부분들과 함량은 다음과 같다: 흡산 모액을 100,000 MWCO Cartridge를 이용하여 먼저 100,000 dalton 이상(F1)이 15%, 100,000 dalton 이하(F2)가 85%인 두 소부분으로 분리하였고, 같은 방법으로 나머지 흡산 모액에서 각각 10,000 dalton

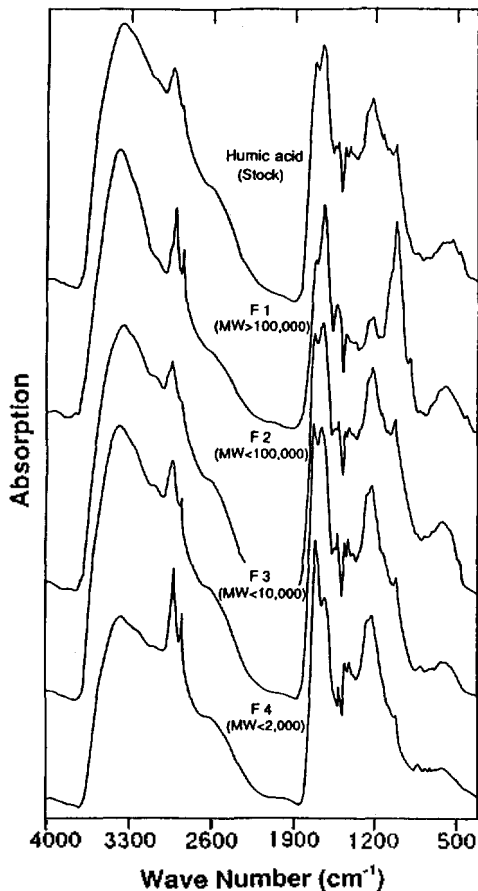


Fig. 1. Infrared spectra of the humic acid and subfractions of humic acid by molecular weight.

이하(F3)가 25%, 2,000 dalton 이하(F4)가 8%인 두 소부분이 얻어졌다.

**적외선 스펙트럼.** 4개 소부분들과 총산 모액의 IR 스펙트럼을 Fig. 1에 나타내었다. 모든 스펙트럼에서  $3400\text{ cm}^{-1}$ (H-bonded O-H 신축),  $2900\text{ cm}^{-1}$ (aliphatic C-H 신축),  $1720\text{ cm}^{-1}$ (COOH의 C=O 또는 ketonic C=O 신축),  $1650\text{ cm}^{-1}$ (aromatic C=C와 H-bonded C=O 신축),  $1540\text{ cm}^{-1}$ (N-H deformation과 C=N 신축(amide II band)),  $1420\text{ cm}^{-1}$ (aliphatic C-H 굽힘),  $1240\text{ cm}^{-1}$ (C-O 신축과 COOH의 OH deformation),  $1040\text{ cm}^{-1}$ (polysaccharide의 C-O 신축)등 총산의 전형적인 특성 흡수띠들이 관찰됐다<sup>10,11</sup>. 따라서 4개 소부분들과 총산 모액의 전체적인 작용기 기본특성이 서로 유사함을

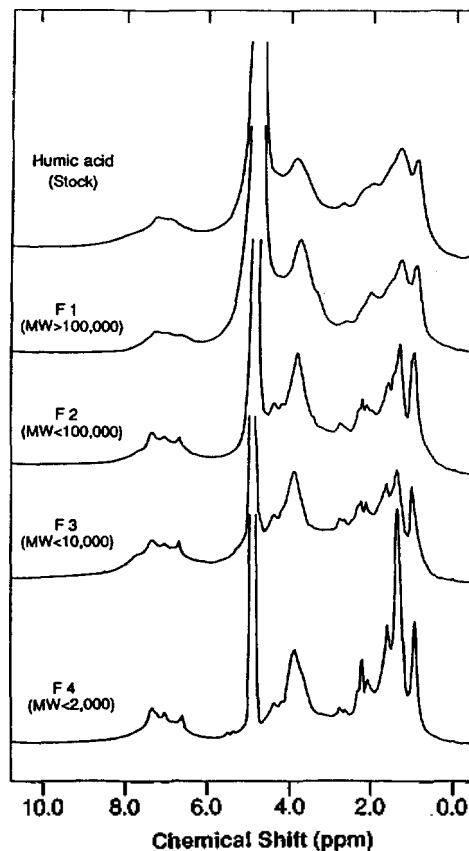


Fig. 2.  $^1\text{H}$  NMR spectra of the humic acid and subfractions of humic acid by molecular weight.

알 수 있었다. 그러나 각 작용기 함량의 상대적인 분포차를 제시해 주는 띠 세기에서 다소간의 차이점이 발견되었다. F1 스펙트럼은 다른 소부분들의 스펙트럼에 비해  $1040\text{ cm}^{-1}$ 에서 비교적 강한 흡수띠가 나타난 반면,  $1220\text{ cm}^{-1}$ 과  $1720\text{ cm}^{-1}$ 의 두 흡수띠의 세기는 상대적으로 다소 감소되었다. 이는 F1에 다당류(polysaccharide) 성분이 비교적 높게 함유되어 있는 반면 카르복실기 성분함량은 다소 낮음을 제시한 것으로서 전형적인 휴민(Humin)의 IR 스펙트럼과 유사하였다<sup>12</sup>. 또한 F4 스펙트럼은  $1720\text{ cm}^{-1}$ 에서 강한 흡수띠가 나타난 반면  $1040\text{ cm}^{-1}$ 의 띠 세기는 상대적으로 매우 감소된 특징을 보여주었다.

**수소 및 탄소 핵자기공명 스펙트럼.** 총산 모액과 소부분들의  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼을 Fig. 2에 나타내었

다. 4개 소부분들의 스펙트럼은 분자량이 적어지면서 전 영역에서 피크들이 좀더 예리해지고 분해능이 좋아지는 경향성을 나타냈다. 특히 F1 스펙트럼은 흙산 모액 스펙트럼과 아주 유사한 피크 선폴 증가 모양을 보여주었다. 그러나 이들을 포함한 모든 스펙트럼은 6.0~9.5 ppm(aromatic H)에 걸친 폭이 넓은 피크, 3.8 ppm(carbohydrate H)에서의 강한 피크 그리고 2.3, 1.2, 0.8 ppm(aliphatic CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>)의 특징 피크들로 이루어진 전체적인 피크 특성이 상호간에 유사하였다<sup>13</sup>.

4개 소부분들의 기본구조에 대한 정보를 얻기 위해 <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼을 얻었고, 흙산 모액 스펙트럼과 함께 Fig. 3에 나타냈다. 흙산 모액 스펙트럼의 각 영역과 피크동정에 대한 자세한 설명은 이전 논문에서 보고된 바 있다<sup>7,14</sup>. 모든 소부분들의 스펙트럼은 특징 피크 위치(20, 25, 27, 31, 40 ppm(aliphatic C); 58 ppm(methoxyl group(-OCH<sub>3</sub>)); 62, 74 ppm(carbohydrate C); 120, 131, 154 ppm(aromatic C); 176 ppm(carboxyl C)) 및 전체적인 피크 모양에서 흙산 모액 스펙트럼과 유사하게 나타났다. 단지 <sup>1</sup>H 스펙트럼에서와 같이 F1 스펙트럼의 피크들이 다른 소부분들의 스펙트럼에 비해 선폴이 좀더 넓고 분해능이 떨어진 것을 볼 수 있었다. 이는 가능한 요인들중 용액내에서 F1의 매우 커다란 분자들의 느린 분자 회전운동으로 인해 작은 분자들에 비해 상대적으로 더 짧아진 스핀-스핀 이완시간(T<sub>2</sub> time) 때문으로 사려된다<sup>15</sup>. 이와 같이 앞서 4개 소부분들 및 흙산 모액의 IR 스펙트럼에서 보여진 작용기 함량에서의 다소간 차이에도 불구하고 모든 <sup>1</sup>H과 <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼에서 나타난 전체적인 피크 특성의 유사성은 4개 소부분들의 기본구조(basic structure)

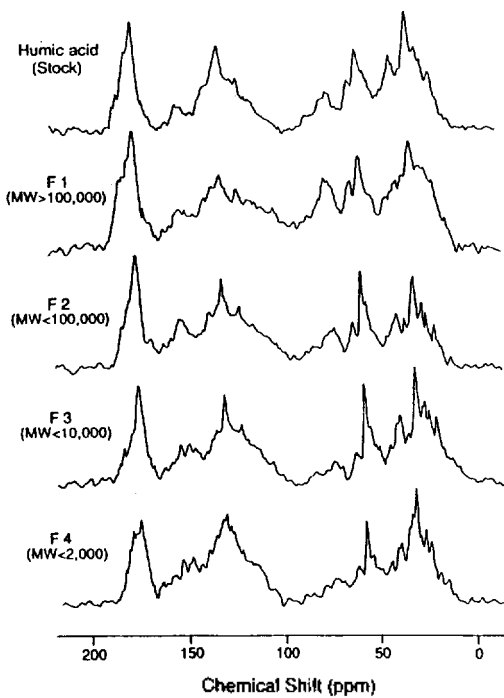


Fig. 3. <sup>13</sup>C NMR spectra of the humic acid and subfractions of humic acid by molecular weight.

4개 소부분들의 기본구조에 대한 정보를 얻기 위해 <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼을 얻었고, 흙산 모액 스펙트럼과 함께 Fig. 3에 나타냈다. 흙산 모액 스펙트럼의 각 영역과 피크동정에 대한 자세한 설명은 이전 논문에서 보고된 바 있다<sup>7,14</sup>. 모든 소부분들의 스펙트럼은 특징 피크 위치(20, 25, 27, 31, 40 ppm(aliphatic C); 58 ppm(methoxyl group(-OCH<sub>3</sub>)); 62, 74 ppm(carbohydrate C); 120, 131, 154 ppm(aromatic C); 176 ppm(carboxyl C)) 및 전체적인 피크 모양에서 흙산 모액 스펙트럼과 유사하게 나타났다. 단지 <sup>1</sup>H 스펙트럼에서와 같이 F1 스펙트럼의 피크들이 다른 소부분들의 스펙트럼에 비해 선폴이 좀더 넓고 분해능이 떨어진 것을 볼 수 있었다. 이는 가능한 요인들중 용액내에서 F1의 매우 커다란 분자들의 느린 분자 회전운동으로 인해 작은 분자들에 비해 상대적으로 더 짧아진 스핀-스핀 이완시간(T<sub>2</sub> time) 때문으로 사려된다<sup>15</sup>. 이와 같이 앞서 4개 소부분들 및 흙산 모액의 IR 스펙트럼에서 보여진 작용기 함량에서의 다소간 차이에도 불구하고 모든 <sup>1</sup>H과 <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼에서 나타난 전체적인 피크 특성의 유사성은 4개 소부분들의 기본구조(basic structure)

Table 1. Relative intensities of various carbons in humic acid subfractions determined by solution <sup>13</sup>C NMR spectra

Chemical shift regions (δ ppm)	Assignments	Humic acid (Stock)	Relative intensities (%)			
			F1 MW>100.000	F2 MW<100.000	F3 MW<10.000	F4 MW<>2.000
I (0~48)	Aliphatic carbons	31±2	32±2	29±2	32±2	32±2
II (48~105)	Carbohydrates, Amines, Alcohols, Acetals	25±1	29±2	24±1	21±1	17±1
III (105~145)	Aromatic carbons	23±1	20±1	24±1	25±1	28±1
IV (145~154)	Phenolic carbons	6±1	4±1	8±1	8±1	9±1
IV (165~190)	Carboxyl carbons	15±1	15±1	15±1	14±1	14±1

Iteration of the peak areas was based on the assumption of straight baselines existing in areas of spectral intensity. Five areas divided (defined above) were measured with an area meter using a video screen and normalized at 100%.

가 흡산 모액과 유사함을 나타낸다.

각 소부분 스펙트럼들의 좀더 효과적인 비교 분석을 위해 4개 소부분들과 흡산 모액 스펙트럼을 문헌에 보고된 방법에 따라 정량적으로 분석하였고, Table 1에 나타내었다<sup>15</sup>. Carbohydrate, amine 탄소 등에 해당하는 영역 II의 상대적인 피크 세기가 F1에서 높게 나타났고 분자량이 적어지면서 F4에서는 낮게 나타났다. 이는 앞서 IR 스펙트럼에서 분자량 감소에 따라 보여진 다당류 성분에 해당하는 1040  $\text{cm}^{-1}$ 의 띠 세기 감소 결과와 같은 경향성을 나타낸다. 따라서 토양속에서 입자들 사이에 고분자 가교를 통한 집합체(aggregate) 형성과 그들의 안정화에 주요 역할을 하고 있는 다당류 성분이 저분자량 흡산들 사이를 연결시켜 커다란 분자량의 흡산을 형성하는 것으로 생각된다<sup>16,17</sup>.

이상의 결과에서 4개 소부분들은 비록 IR 스펙트럼과  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼 일부에서 보여진 것처럼 작용기 성분 함량에서 다소간의 차를 가지나 전체적으로는 유사한 기본구조와 전체적 특성을 가지고 있음이 확인되었다. 이를 토대로 다양한 분자량들의 혼합물로 이루어진 흡산 모액중 커다란 분자량 물질들로 인해 발생하는 실험적인 어려움들이나 금속 이온과의 착물반응 실험시 반투과성막을 통한 일부 저분자량 물질의 누출로 인한 오차를 극복하기 위해 이들 분자량 부분이 제거된 나머지 부분들이 흡산 모액을 대표하여 사용될 수 있음을 제시한다.

본 연구는 한국과학기술원 기본연구비의 지원과 한국학술진흥재단(BSRI 94-3410)의 부분적인 지원으로(윤석승, 양한범) 이루어진 바 이에 감사드립니다.

## 인 용 문 헌

1. Swift, R. S. *Humic Substances in Soil, Sediment,*

- and Water*; Aiken, G. R.; McKnight, D. M.; Wershaw, R. L.; MacCarty, P., Eds.; Wiley: New York, U. S. A., 1985; p 387.
2. Buddrus, J.; Burba, P.; Herzog, H.; Lambert, J. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 628.
3. Stevenson, F. J. *Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reactions*; Wiley: New York, U. S. A., 1982; p 443.
4. Wershaw, R. L.; Pinckney, D. J. *Anal. Chim. Acta* **1990**, *232*, 42.
5. Reuter, J. H.; Perdue, E. M. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1981**, *45*, 2017.
6. Trutter, R. E.; Weber, J. H. *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 337.
7. Shin, H. S.; Moon, H. C.; Yang, H. B.; Yun, S. S. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1994**, *15*, 777.
8. Freeman, R.; Hill, H. D. W.; Kaptein, R. J. *Magn. Reson.* **1972**, *7*, 327.
9. Preston, C. M.; Schnitzer, M. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1984**, *48*, 305.
10. Stevenson, F. J. *Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reactions*; Wiley: New York, U. S. A., 1982; p 265.
11. Theng, B. J. G.; Wake, J. R. H.; Posner, A. M. *Soil Sci.* **1966**, *102*, 70.
12. Skemstad, J. O.; Dalal, R. C.; Barron, P. F. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1986**, *50*, 354.
13. Willson, M. A. *J. Soil Sci.* **1981**, *32*, 167.
14. Preston, C. M.; Schnitzer, M. *J. Soil Sci.* **1987**, *38*, 667.
15. Preston, C. M. *NMR of Humic Substances and Coal*; Wershaw, R. L.; Mikita, M. A., Eds.; Lewis Publishers, Inc.: Chelsea, MI., 1987; p 3.
16. Martin, J. P. *Soil Biol. Biochem.* **1971**, *3*, 33.
17. Aly, S. M.; Letey, J. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1989**, *53*, 225.