

第3章 土壤腐植酸の含酸素官能基組成

前章においては腐植酸の元素組成と腐植化度の関係について検討した。そこで水素含量および窒素含量と腐植化度の間には、統計的に有意な、または腐植化過程の進行と対応した関係が認められたが、酸素含量と腐植化度の間にはそのような関係は認められなかった。従って本章では、腐植酸中の酸素の存在形態について検討するため、腐植酸中の各種含酸素官能基含量と腐植化度および土壤の種類との関連について解析する。

試料および方法

1) 腐植酸試料

表1に示した39試料のうち、試料の量的制約によって、33～38点の試料について全酸度、カルボキシル基、カルボニル基、フェノール性水酸基、アルコール性水酸基およびメトキ

シル基含量を定量した。

2) 各官能基定量法

(1) 全酸度

Martinら (18) の方法に若干修正を加えた。ガラス栓付き遠心管 (50 ml 容) 中に、約 50 mg の腐植酸を正確に秤り取り、これに炭酸を含まない 0.1 N NaOH 溶液 10 ml および 0.1 N BaCl₂ 溶液 25 ml をこの順序に加えて密栓し、16 時間振盪した後、遠心分離した。その上澄液 25 ml を採り、ただちに 0.1 N HCl 標準液で滴定した。滴定は自動滴定装置により電位差滴定法で行ない、pH 8.4 を中和点とした。同様に空試験を行ない、次式により全酸度を求めた。

$$\frac{0.1 \times (\text{blank ml} - \text{sample ml}) \times f \times 35}{\text{sample weight mg} \times 25} \quad (\text{me/g})$$

(2) カルボキシル基

Blomら (19) の方法で定量した。100 ml 三

角フラスコ中に 50 ~ 80 mg の腐植酸を正確に秤取り取り、脱炭酸水 50 ml、1 N 酢酸カルシウム 10 ml を加えて密栓し、攪拌しつつ室温で 16 ~ 18 時間反応させた後ろ過し、ろ液を 0.1 N NaOH 標準液によりフェニールフタレインを指示薬として滴定した。同様にして空試験を行ない、次式によりカルボキシル基含量を算出した。

$$\frac{0.1 \times (\text{sample ml} - \text{blank ml}) \times f}{\text{sample weight mg}} \quad (\text{me/g})$$

(3) フェニール性水酸基

A. 間接法 全酸度とカルボキシル基含量の差をフェニール性水酸基含量とした。

B. 比色定量法 Kuwatsuka ら (20) の方法に準じて行なった。25 ml のメスフラスコ中に、腐植酸 - 0.1 N NaOH 溶液 (濃度 30 ~ 150 ppm) 10 ml を秤取り取り、さらにフォリンのフェニール試薬 2 ml、20% 炭酸ナトリウム 10 ml を添加し、水で定容とした後よく混合し、約 1 時間

後に 720 nm の吸光度を測定した。この吸光度から、同量の腐植酸に対してフェノール試薬を添加しなかったものの吸光度を差し引き定量値を求めた。検量線はフェノール (C_6H_5OH) で作成した。

(4) カルボニル基

Schnitzer ら (21) の方法の規模を縮小して行なった。10 ~ 40 mg の試料を 30 ml 容の三角フラスコ中に秤り取り、3.0 ml の 0.25 M N,N-ジメチルアミノエタノールに溶解した後、5 ml の 0.3 M ヒドロキシルアミン塩酸塩溶液を加えた。100 °C に 16 分間加熱した後、内容物を約 10 ml の蒸留水で小びーカー中に洗い込み、0.2 N HClO₄ 標準液で滴定した。滴定は自動滴定装置により電位差滴定法で行ない、中和点は pH 3.5 とした。同様にして空試験を行ない、次式によりカルボニル基含量を算出した。

$$\frac{0.2 \times (\text{blank ml} - \text{sample ml}) \times f \text{ (me/g)}}{\text{sample weight mg}}$$

(5) 全水酸基

Dewalt 等 (22) の方法に従って行なった。ただし、数種の既知化合物で試験した結果、特に糖類に対して、アセチル化の時間は原報の5分間では不十分であったので、2時間に延長した。約 100 mg の試料を 20 ml の試験管中に秤り取り、3 M 無水酢酸 - ピリジン溶液 (5 : 12 v/v) 1.0 g を 0.1 mg の位まで正確に^{秤って添加し}、120 °C で2時間加熱還流した。冷却後、内容物を蒸留水で洗い出し、東洋ろ紙 No. 5C でろ過し、ろ液を 0.13 N NaOH 標準液でフェニールフタレインを指示薬として滴定した。同様にして空試験を行ない、次式により水酸基含量を算出した。

$$\frac{0.13 \times (\beta - T) \times f}{\text{sample weight} + \text{mg}} \quad (\text{me/g})$$

ただし、 $\beta = T_0 \times (3 \text{ M Ac}_2\text{O-Pyr. 試薬秤取量 g})$

T_0 : 3 M Ac₂O-Pyr. 試薬 1.000 g によ

って消費される 0.13 N NaOH 量 ml

T : 試料の滴定値

(6) アルコール性水酸基

全水酸基とフェノール性水酸基の含量の差をアルコール性水酸基含量とした。本研究では、差し引き法および比色法の二種類のフェノール性水酸基含量を得ているため、アルコール性水酸基含量についても二種類の値が得られた。

(7) メトキシル基

Pregl ら (23) の修正による Vieböck - Brecher 法 (24) に従って定量した。スズはくに包んだ 10 ~ 30 mg の腐植酸を、57% HI によって、その沸点 127 °C で 30 分間分解した。キャリアーガスには CO_2 を用い、ガス洗淨液には、使用直前に混合した 5% CdSO_4 - 5% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 混液 1 ml を、ヨウ化メチルの捕集液には、10 滴のシユウ素を溶解した 10% 酢酸ナトリウム - 酢酸溶液 2 ml を用いた。ヨウ化メチルを吸収させた捕集液は、20% 酢酸ナトリウム水溶液 5 ml を用いて、100 ml 三角フラス

コ中に洗い込み，酢酸数滴を滴下して過剰のシユウ素を分解した。さらに10%ヨウ化カリウム2 mlと2 N硫酸5 mlを添加してヨウ素を遊離させ，1/50 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 標準液で滴定した。次式によりメトキシル基含量を算出した。

$$\frac{(\text{sample ml} - \text{blank ml}) \times 3.33}{\text{sample weight mg}} \quad (\text{me/g})$$

結果および考察

1) カルボキシル基含量

酢酸カルシウムとの陽イオン交換によるカルボキシル基の定量法は， pK に依存した定量法である。従ってこの定量値には，例えばエステルのような非解離性官能基は含まれない。また，高分子電解質中に存在するような，かなり高い pK 値を持つカルボキシル基は定量されない可能性があり，逆に非常に低い pK 値を持つフェニール性水酸基は，カルボキシル基として定量される可能性がある。しかしこの

Table 4. Oxygen-containing functional groups in humic acids

Type NO.	Samples	Symbols	ΔlogK	RF	m.e./g on moisture and ash free basis										O/C explained by functional groups		
					Total acidity	Carboxyl	Hydroxyl					Carbonyl	Methoxyl	O/C (E)	O/C (F)		
							Total A	Phenolic D*	C**	Alcoholic A-D	A-C A-C					A-C A	
A	2	Temmondai	.527	144	7.44	4.94	3.84	2.50	1.22	1.34	2.62	68	6.38	0.21	.411	.438	82.5
	3	Nagara P	.555	140	8.25	6.33	1.88	1.92	0.94	-0.04	0.94	50	8.84	0.098	.542	.523	103.6
	4	Inogashira-1	.496	138	6.51	5.68	4.10	0.83	1.12	3.27	2.98	73	6.05	0.25	.443	.433	102.3
	5	Jaana P	.478	132	7.17	4.72	-	2.45	1.19	-	-	-	4.41	0.14	.416	-	-
	6	Inogashira-2	.485	115	6.52	4.71	-	1.81	1.22	-1.19	-	-	11.6	0.18	.430	-	-
	7	Kinshozan P-1	.543	115	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	Shitara Black	.547	114	7.37	4.80	3.56	2.57	1.04	0.99	2.57	72	6.83	0.22	.413	.441	93.7
	9	Nagara F	.620	102	7.91	5.61	3.09	2.30	0.83	0.79	2.26	73	18.15	0.25	.694	.477	146
	10	Fujinomiya-3	.511	97	6.98	4.50	2.52	2.48	0.97	-0.16	1.35	58	5.02	0.30	.354	.487	72.7
	12	Kinshozan p-3	.565	92	8.24	5.50	3.30	2.74	1.10	0.56	2.20	67	6.26	0.30	.454	.519	87.5
	13	Komagahara	.542	89	7.00	4.41	2.80	2.59	1.05	0.21	1.75	63	5.51	0.35	.383	.517	74.1
	14	Nagara OH	.667	89	7.91	5.64	3.10	2.27	1.07	0.83	2.03	65	13.65	0.32	.606	.473	128
	15	Fujinomiya-2	.541	82	7.26	3.92	4.87	3.34	1.25	1.53	3.62	74	4.80	0.34	.375	.449	83.5
	16	Shitara Brown	.605	76	5.50	3.35	5.04	2.15	0.85	2.89	4.19	83	11.20	0.51	.503	.462	108.9
	17	Jaana F	.619	65	5.01	-	-	-	1.13	-	-	-	-	-	.450	-	-
	18	Kuragari-1	.634	61	5.63	3.69	4.66	1.94	1.06	2.72	3.60	77	5.74	0.44	.378	.428	88.3
B	19	Kinshozan F	.731	60	6.48	4.84	4.78	1.64	0.96	3.14	3.82	80	7.04	0.69	.450	.455	98.9
	20	Anjo Black	.642	57	5.53	3.32	5.01	2.21	0.90	2.80	4.11	82	3.75	1.03	.349	.459	76.0
	21	Higashiyama (A)	.664	47	7.12	4.39	6.08	2.73	1.32	3.35	4.76	78	5.40	0.73	.446	.471	94.7
	28	Ishimakisan F	.729	37	6.67	3.31	5.51	3.36	1.18	2.15	4.33	79	3.56	0.45	.373	.485	76.9
	29	Sanage	.711	32	3.94	2.69	4.47	1.25	0.67	3.22	3.80	85	2.39	0.90	.282	.435	64.8
	31	Jaana OH	.714	30	5.24	2.58	-	2.66	0.72	-	-	-	3.79	0.44	.483	-	-
	32	Kinshozan OH-1	.851	29	4.44	3.44	5.40	1.00	0.90	4.40	4.50	83	4.37	1.19	.388	.490	79.2
Rp (1)	34	Ishimakisan OH	.804	22	5.44	2.81	5.13	.263	0.82	2.50	4.31	84	3.07	0.81	.312	.443	70.4
	35	Gifu	.853	22	3.62	2.35	5.04	1.27	0.83	3.77	4.21	84	2.25	1.18	.290	.465	62.4
	36	Anjo	.835	21	4.46	2.43	5.30	2.03	0.76	3.27	4.54	86	2.91	1.67	.321	.470	68.3
	39	Kinshozan OH-3	.897	16	4.02	2.66	5.17	1.36	0.72	3.81	4.45	86	2.22	1.13	.309	.474	65.2
	30	Higashiyama (F-H)	.776	31	5.77	2.95	6.18	2.82	1.30	3.36	4.88	79	4.63	0.80	.374	.468	79.9
Rp (2)	33	Higashiyama (L)	.809	23	5.80	2.49	6.32	3.31	-	3.01	-	-	2.61	0.89	.407	-	-
	37	Yamamomo	.968	21	6.58	2.97	4.35	3.61	0.98	0.74	3.37	77	3.15	2.52	.329	.454	72.5
	38	Kisokama (F)	.806	20	5.79	2.52	6.26	3.27	1.25	2.99	5.01	80	2.64	0.86	.302	.369	81.8
	23	Ishimakisan P	.656	43	6.19	2.95	-	3.24	1.00	-	-	-	3.24	0.43	.405	-	-
Po	24	Kuragari-2	.678	43	6.49	2.83	5.90	3.66	1.37	2.24	4.53	77	4.46	0.56	.340	.391	87.0
	26	Onobaru	.678	39	5.97	3.55	4.89	2.42	0.98	2.47	3.91	80	3.87	0.74	.366	.484	75.6
	27	Sanage-2	.657	38	5.00	2.38	5.35	2.62	0.92	2.73	4.43	83	2.61	0.76	.280	.406	69.0
	1	Tsubame P _G	.272	202	8.47	4.78	3.89	3.69	1.92	0.20	1.97	51	6.37	0.27	.421	.510	82.5
P+	11	Tsubame-4	.469	94	7.56	4.12	4.03	3.44	1.80	0.59	2.23	55	4.89	0.33	.373	.490	76.1
l	22	Tsubame-1	.513	69	5.99	3.33	4.80	2.66	1.00	2.14	3.80	79	3.24	0.46	.322	.450	71.6
+++	25	Shishi	.506	42	4.55	2.63	-	1.92	0.56	-	-	-	2.50	-	-	-	-

* Phenolic hydroxyl group D: difference between total acidity and carboxyl content.

** Phenolic hydroxyl group C: determined colorimetrically with Folin's reagent.

方法は簡単で再現性が良く、石炭や腐植物質に対して広く用いられていることから、本研究でもこの方法を採用した。

官能基分析の結果は表4に示した。腐植酸のカルボキシル基含量は2.3から6.3 me/g, カルボキシル基の酸素が全酸素に対して占める割合は18から53%の間に分布した。腐植酸の各型ごとの各種官能基含量の平均値を表5に示す。カルボキシル基含量の平均値は、A > B > P₀ > R_p(1) > R_p(2)の順であった。型による平均値の差は、分散分析により非常に有意であることが示された。

図6に、カルボキシル基の酸素と腐植酸中の全炭素の原子数比の、RFに対する関係を示した。両者の正の相関は、直線回帰において高度に有意であったが ($r = 0.838^{***}$)、対数回帰も同様に高度に有意であった ($r = 0.844^{***}$)。カルボキシル基含量が、このようにRF値に対して対数分布をすることは、腐植化の進行にともなってカルボキシル基の増

加率が減少することを示している。これは、腐植化の進行にともなって、カルボキシル基の前駆的官能基が減少することによるものと推察される。

Table 5 Significance of the difference in functional group composition among the various types of humic acids.

	Average value within each type (me/g)					Mean Square Ratio	Level of Significance
	A	B	Rp(1)	Rp(2)	Po		
Total acidity	7.33	5.88	4.73	5.99	5.91	16	*** 0.1%
Carboxyl	5.06	3.92	2.78	2.73	2.93	27	*** 0.1%
Carbonyl	8.13	6.63	3.07	3.26	3.55	5.1	** 1%
Total hydroxyl (A)	3.04	5.11	5.15	5.78	5.38	16	*** 0.1%
Phenolic hydroxyl (D)	2.32	2.13	1.94	3.25	2.99	4.0	* 1.1%
Phenolic hydroxyl (C)	1.08	1.04	0.83	1.18	1.07	4.4	** 0.7%
Alcoholic hydroxyl (A-D)	0.74	2.99	3.30	2.53	2.48	10	*** 0.1%
Alcoholic hydroxyl (A-C)	2.23	4.10	4.31	4.42	4.43	18	*** 0.1%
Methoxyl	0.25	0.68	0.97	1.29	0.62	8.0	*** 0.1%
O in functional groups/ total C (atomic ratio)	0.468	0.425	0.325	0.335	0.329	4.6	** 0.7%
O in functional groups/ total O (%)	97.4	93.4	69.6	78.1	77.2	3.6	* 1.9%

Notes: Phenolic hydroxyl (D); Difference between total acidity and carboxyl content
Phenolic hydroxyl (C); Determined colorimetrically with Folin's reagent

また図6では、腐植酸のプロットは2つのグループに分割することができた。そのひとつはRp型腐植酸全体と石灰質土壌の腐植酸とからなり、他のひとつはその他の腐植酸全体からなつた。類似したRFを持つ腐植酸の間で

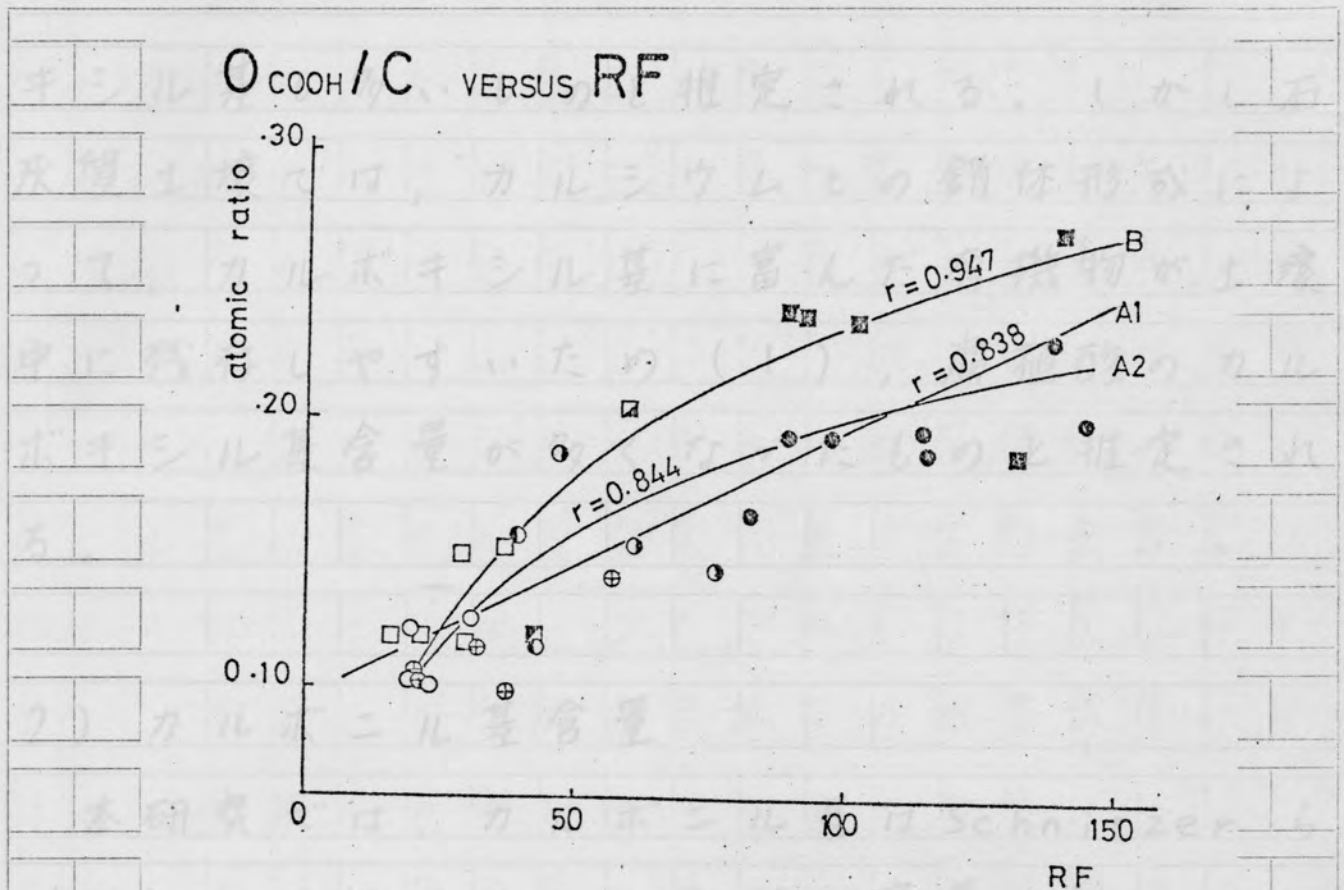


Fig. 6. Relationship between the atomic ratio of carboxyl oxygen to the total carbon and RF value.

A1 : A regression line for all the plots

A2 : A logarithmic regression curve for the all plots

B : A logarithmic regression curve for Rp type humic acids

比較すると、前者のグループの腐植酸は後者よりもカルボキシル基含量が高かった。また前者においては、カルボキシル基含量とRFの間に非常に高い対数相関が認められた ($r = 0.947^{**}$)。

腐植化過程においては、一旦生成しても、さらに酸化を受けて速やかに消失するカルボ

キシル基も多いものと推定される。しかし石灰質土壌では、カルシウムとの錯体形成によって、カルボキシル基に富んだ有機物が土壌中に残存しやすいため(1)、腐植酸のカルボキシル基含量が多くなったものと推定される。

2) カルボニル基含量

本研究では、カルボニル基は Schnitzer ら(21)によるオキシム化法で定量した。ヒドロキシルアミンはカルボニル基をオキシム化するだけでなく、アミド、エステル等と反応して、ヒドロキサム酸を生成することが知られている(25)。ただし遊離のカルボキシル基とは反応しない。アミド、エステル等は腐植酸の構造中にも存在するものと推察され、従って定量法自体の信頼度の検討が行なわれなくてはならない。しかしこの方法は従来から一般にカルボニル基の定量法として用いられており、定量値は一応の近似値を与えるも

のと考えて、本定量法を採用した。

腐植酸中のカルボニル基の定量値は 2.2 から 18 me/g の間に分布した (表 4)。これらの値のうち 4 点 (Nos. 6, 9, 14, 16) は異常に大きい値を示した。これらの腐植酸のカルボニル基に含まれる酸素含量は全酸素含量の 50 から 80% に及び、またこれらの値を採用すると、測定した全酸素官能基の酸素含量の合計が、全酸素含量を越すことになる。

カルボニル基含量の各型ごとの平均値は、 $A > B > P_0 > R_p(2) \approx R_p(1)$ 型の順であった (表 5)。平均値の差は分散分析により有意であった。カルボニル基含量は $R_p(2)$ 型と $R_p(1)$ 型では異ならず、 $R_p(1)$ 型から B または P_0 型を経て A 型に達する腐植化過程では、腐植化の進行とともに増加した。

カルボニル基酸素 / 全炭素と RF の関係を図 7 に示した。先に述べた 4 点の腐植酸を除けば、プロットの分布はカルボキシル基含量と RF の関係 (図 6) とよく類似した。また図 8

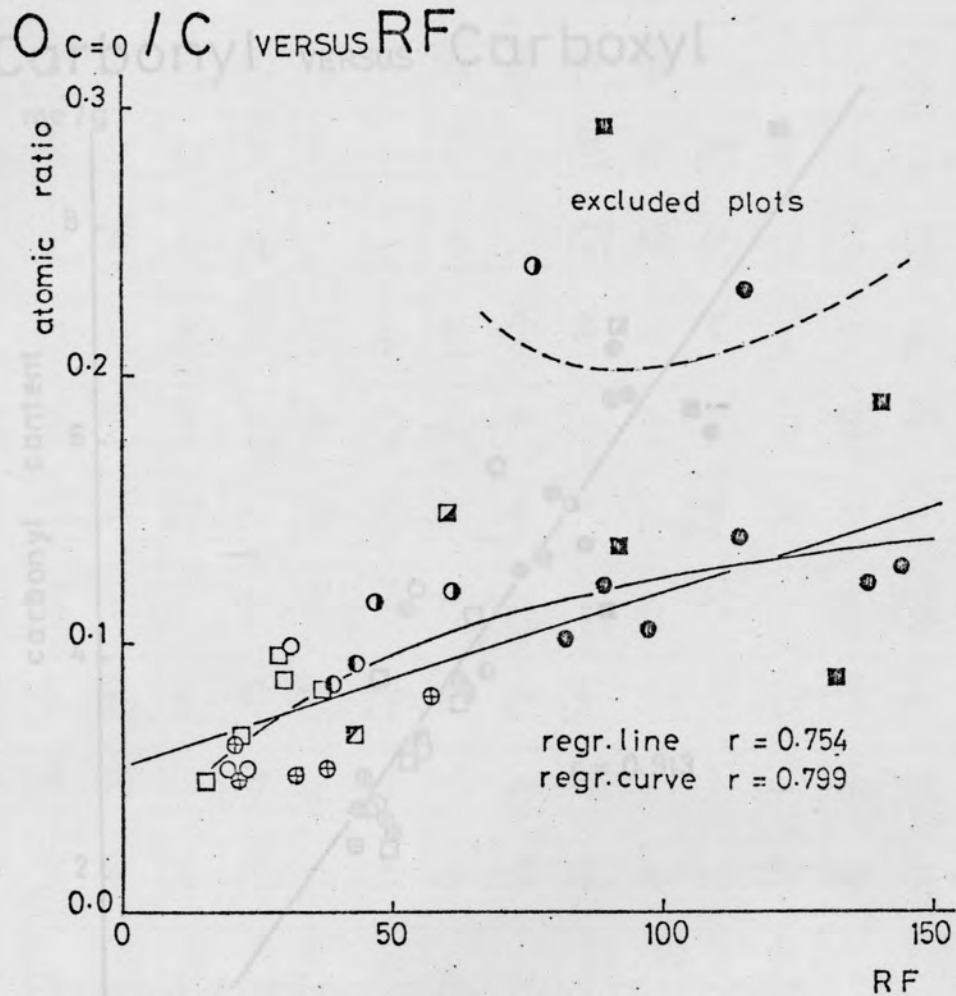


Fig. 7. Relationship between the atomic ratio of carbonyl oxygen to the total carbon and RF value. Plots of No. 6, No. 9, No. 14, and No. 16 humic acids were excluded because of their extraordinarily high carbonyl contents.

に示したように、先述の4点の腐植酸を除けば、カルボキシル基とカルボニル基の両含量の間に極めて高い正の相関が認められた。またカルボキシル基とカルボニル基の合計で説明される酸素含量は腐植化の進行とともに増加し、A型腐植酸では約80%に達した。

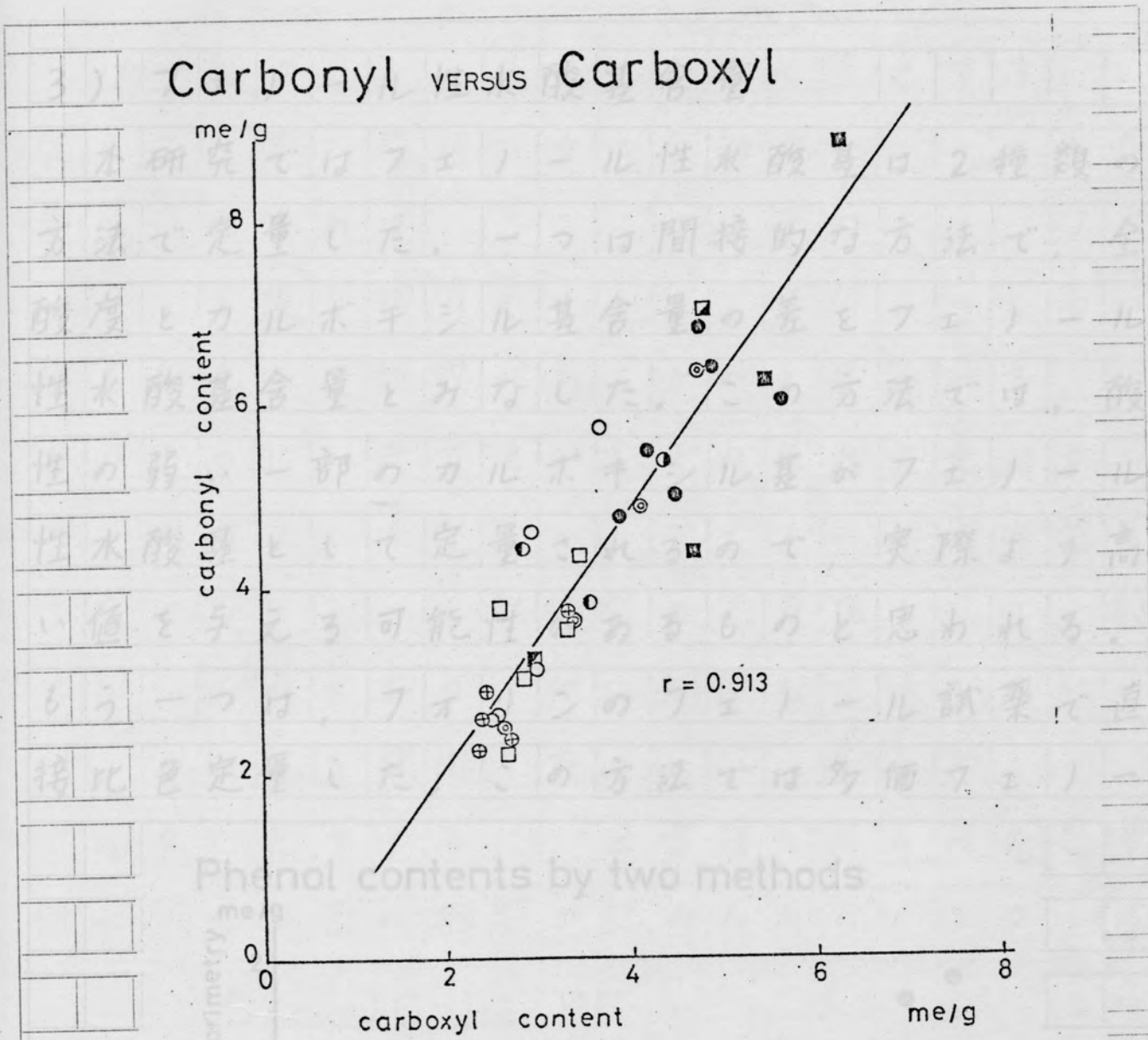


Fig. 8. Relationship between carbonyl and carboxyl contents of humic acids.

これらの結果は、カルボキシル基とカルボニル基が腐植酸中のいわゆる腐植物質画分の重要な構造要因であることを示し、これらの官能基の生成が腐植化過程において並行的に進行していることを示唆する。

3) フェノール性水酸基含量

本研究ではフェノール性水酸基は2種類の方法で定量した。一つは間接的な方法で、全酸度とカルボキシル基含量の差をフェノール性水酸基含量とみなした。この方法では、酸性の弱い一部のカルボキシル基がフェノール性水酸基として定量されるので、実際より高い値を与える可能性があるものと思われる。もう一つは、フオリンのフェノール試薬で直接比色定量した。この方法では多価フェノー

Phenol contents by two methods

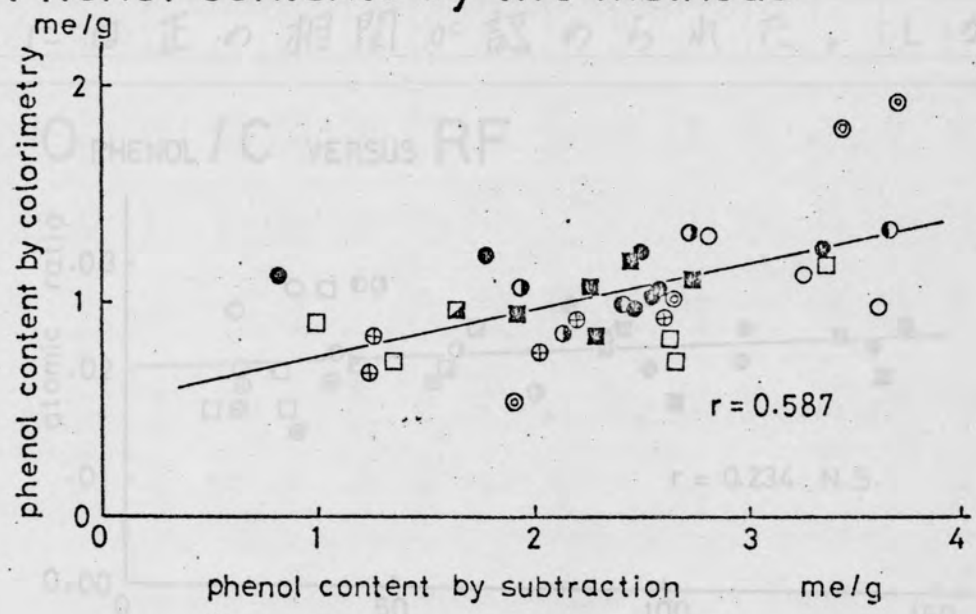


Fig. 9. Relationship between the phenol content determined by colorimetry and that by subtracting carboxyl content from total acidity

ルは一価フェノールよりも強く呈色する(26)。従って、もし腐植酸中に多価フェノールが大量に存在すれば、ここでの方法のようにフェノールを標準物質とすると、実際よりも高い値を与える可能性があるものと思われる。以上のように、両方法ともそれぞれ欠点はあるが、両方法とも従来からフェノール性水酸基またはフェノール性物質の定量法として一般に用いられており、他に簡便な方法がないので、これらを採用した。

図9に示すように、両方法で得られた定量値の間には正の相関が認められた。しかし比

O PHENOL / C VERSUS RF

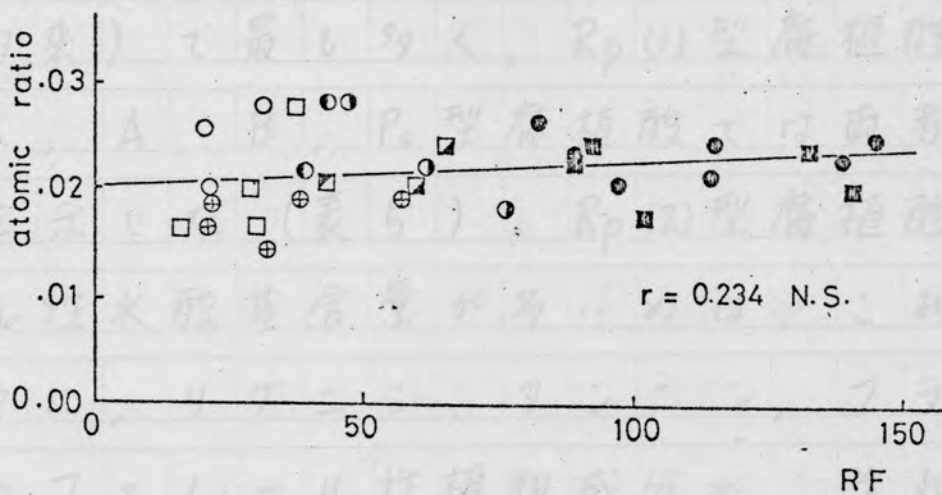


Fig. 10. Relationship between the atomic ratio of phenol oxygen to the total carbon and RF value