

第5章 土壤腐植酸のKOH分解生成物

前章では腐植酸の酸加水分解性画分の諸成分について、その概要を明らかにしたが、本章では、酸によって加水分解されない画分の構造を明らかにすることと、特に腐植酸中のフェニール性物質の構造を明らかにすることを目的として行なった、KOH分解による構造研究の結果について述べる。

腐植酸の化学成分組成および化学構造の解明のために、従来から各種の分解的方法が用いられている(2)。そのなかで、酸加水分解のような穏やかな分解方法は、腐植酸の構造の一部分を分解しうるのみであり、他方、過マンガン酸カリ酸化のように、多少激しい分解条件下では、分解生成物からもとの構造を推定することが困難となる。

KOH分解は、従来、フラボン(33)その他天然有機化合物の構造研究に用いられており、多少分解条件を激しくしたアルカリ加水分解

である。アルカリ溶融法は、フルフラールポリマーのように、腐植酸の構造との関連が薄いと推定される物質から、腐植酸と同一の分解生成物を生成するし、糖からも芳香族化合物を生成することから、Cheshireら(34)は、腐植酸の構造研究にアルカリ溶融法を適用するのは適当ではないと述べている。しかしここに述べるKOH分解は、アルカリ溶融と比べて反応温度が低いこと、反応系に水が存在すること等から、はるかに穏やかな分解方法である。またShindoら(35)はこの分解条件を検討し、糖からフェノール性酸等の芳香族化合物は生成せず、またメトキシ基の脱メチル化も起きないと述べている。従って、本研究では、腐植酸の構造研究にKOH分解法を適用した。

試料および方法

1) 試料

(1) 腐植酸およびフルボ酸

前章までの研究に用いた各種腐植酸の中から、A型腐植酸4点、B型腐植酸4点、Rp(1)型腐植酸4点、Rp(2)型腐植酸2点、Po型腐植酸1点、P₊~₊₊₊型腐植酸2点の計17点を供試した。供試腐植酸の、土壤の種類による内訳は、黒ぼく土 (Nos. 2, 4, 13, 36), 褐色森林土 A層 (Nos. 18, 21), 森林土壤 A₀層 (Nos. 33, 38), ポドソル土 Bh層 (No. 40), 水田土壤作土層 (Nos. 29, 35, 36), レンジナ様石灰質土壤 (Nos. 12, 19, 32), 腐植質埋没土壤 (Nos. 1, 11) である。

フルボ酸としては、七宗ポドソル Bh層土壤から得たフルボ酸中の2画分を供試した。ここで、七宗ポドソル Bh層土壤からの、腐植酸、フルボ酸の調製方法および分画方法について簡単に記す。

風乾土壤 (< 2 mm) 4 kg に, 14 l の 0.5 N NaOH を添加し, 窒素ガスを通気させ, 空気を追い出した後, 容器を密栓し, 室温で 24 時間時折振盪しながら静置した。抽出溶媒に対して 3% になるように NaCl を加え, 抽出液を土壤から遠心分離した。抽出液に塩酸 (1:3) を加え, pH を 1.5 としして沈殿を生じさせ, これを遠心分離した。沈殿は 0.1 M ピロリン酸ナトリウムに再溶解した後, 不溶物をろ過して除去した。ろ液を酸性にして再沈殿させた後, 沈殿を 0.1 N 塩酸で繰り返し洗浄した。沈殿は最後に 0.1 N NaOH に溶解後, 強酸性型陽イオン交換樹脂 (ダイヤイオン SK 1 B) で処理し, 減圧濃縮後凍結乾燥し, 腐植酸画分とした。土壤中の全炭素に対する腐植酸炭素の収率は 11% であった。腐植酸の元素組成は, C: 51.6%, H: 4.89%, N: 3.35%, O: 40.2%, C/N: 15.4 であった。RF は 50.7, $\Delta \log K$ は 0.685 であり, B 型に属した。

他方, 酸性にした抽出液の上澄画分は,

Forsyth (36) に従って、活性炭に吸着させた後、アセトン-水 (9:1)、水、0.1 N NaOH で逐次溶出させ、Fr.A (活性炭非吸着画分)、Fr.B、Fr.C、Fr.D を得た。KOH 分解に供試した Fr.B₄ は、Fr.B (アセトン-水で溶出する画分) のなかで、エタノール-エーテル (1:5) に可溶でエーテルに不溶の画分であり、Fr.B の主要画分である。収率は土壌中の全炭素に対し 2.45% であり、元素組成は、C: 48.8%、H: 4.93%、N: 0.8%、O: 45.5%、C/N: 61 であった。Fr.D₁ は Fr.D (0.1 N NaOH で溶出する画分) を、ダイヤイオン SK1B (H 型) で処理し、減圧濃縮したものから、エタノールで再抽出した画分であり、Fr.D の主要画分である。収率は土壌中の全炭素に対して 6.83% であり、元素組成は、C: 46.0%、H: 3.92%、N: 0.51%、O: 49.5%、C/N: 90.3 であった。

(2) 関連化合物

リグニン (針葉樹リグノスルホン酸, 半井化学 1 級試薬), タンニン酸 (ガロタンニン, 大日本製薬特級試薬), ルチン (3, 3', 4', 5, 7-ペンタヒドロキシフラボン-3-ルチノサイド, 東京化成特級試薬) 等は市販品を利用した。ワットルタンニンおよびチエスワットタンニンは研究室所蔵の粗製品を用いた。

腐植物質の人工モデルは以下のようにして調製した。

グルコース腐植酸およびグルコースヒューミン: グルコース (50g) を 6N 塩酸 (500 ml) で 4 時間還流した。生成した沈殿を東洋ろ紙 (No. 2) でろ別し, ろ液の pH が 3 ~ 4 になるまで水洗した。続いてこの沈殿を, 0.1 N NaOH によって, ろ液がほとんど無色になるまで洗った。ろ紙上に残ったグルコースヒューミンは, 水でよく洗った後, 80°C で乾燥した。収量は 4.4 g であった。0.1 N NaOH で溶解したろ液中の腐植酸画分は, 塩酸で酸性にして沈殿させ, ろ過して集め, よく水

で洗った後、 80°C で乾燥した。収量は 3.76g 、
 元素組成は、 $\text{C} : 63.5\%$ 、 $\text{H} : 4.36\%$ 、 $\text{N} : 0\%$ 、 $\text{O} : 32.2\%$ であった。RFは 85.2 、
 $\Delta \log K$ は 0.640 であり、A型に属した。

ハイドロキノン腐植酸：ハイドロキノン 50g 、
 水酸化ナトリウム 25g を 50ml の蒸留水に
 溶かし、蒸発皿に入れ、 55°C の恒温器中に、
 時々水を補いつつ 54 時間放置した。これに塩
 酸を加えてpHを 1 とし、腐植酸画分を沈殿さ
 せ、ろ過して集め、ろ液の色がほとんど無く
 なるまで水洗した後、 80°C で乾燥した。収量
 は 4.3g 、元素組成は、 $\text{C} : 58.0\%$ 、 $\text{H} : 2.92\%$ 、 $\text{O} : 39.1\%$ であった。RFは 138 、
 $\Delta \log K$ は 0.468 であり、A型に属した。

ポリマレイン酸（人エフルボ酸）：Braun
 ら（37）の実験番号1の方法によって調製し
 たが、反応温度は 100°C から 113°C （トルイ
 ンの沸点）に変更した。無水マレイン酸 20g 、
 ピリジン 0.92ml を、トルエン 100ml 中で 29 時
 間還流した。生成した暗褐色の沈殿から、ト

ルエンの大部分をデカンテーションで除き、アセトンに溶解し、エーテルを加えて再沈殿させ、ろ過した。沈殿は、エーテルで十分洗浄した後、シリカゲル上で一夜乾燥した。収量は 13.1 g、元素組成は、C : 52.1%、H : 3.9%、N : 0.78%、O : 44.1%、C/N : 65.7 であった。RF は 9.26、 $\Delta \log K$ は 1.067 であった。

2) 腐植酸のエーテル抽出、酸加水分解、KOH 分解逐次処理

土壌腐植酸 3 点、猪之頭 (No. 2, A 型)、闇苧 (No. 18, B 型)、木曾駒 (F) (No. 38, Rp (2) 型)、およびグルコース腐植酸、それぞれ 97, 73, 77, 65 mg を、6 N 塩酸 10 ml に分散させ、エーテルで 3 回抽出した。抽出後の分散液は、蒸留フラスコに移し、100°C で 24 時間加熱した後、再びエーテルで 3 回抽出した。抽出残渣は減圧濃縮乾固し、乾燥し、秤量した後、KOH 分解し、エーテルで 3 回抽出した。

各々のエーテル抽出液は、硫酸ナトリウムで脱水し、減圧で濃縮乾固し、10 mlのアセトンに溶解した。このうちの一部は重クロム酸カリ-硫酸での比色法による炭素含量の定量に供試し、他の一部はガスクロマトグラフィーによる分解生成物の検索に供試した。

3) KOH分解および分解生成物の同定・定量

硬質ガラス試験管中に試料 (10 ~ 100 mg) を秤り取り、水 0.4 ml と粒状 KOH 2.0 g を添加した。寒剤として食塩を加えた氷水中で、ポンプによる吸引と窒素ガスのフラッシュを3回繰り返して窒素置換し、封管した。これを180 °Cで2時間加熱し、放冷後開管した。氷水中で冷却しつつ、3.5 mlの塩酸 (35%) を添加し、内容物を酸性にした。これを、少量の水およびエーテルで洗いつつ、共栓付きのガラス遠沈管に移し、エーテルで3回 (30, 20, 20 ml) よく振盪して抽出した。エーテル抽出液は、硫酸ナトリウム 2 g で脱水した後

減圧で濃縮乾固した。乾固物をアセトンに再溶解し、液量をメスフラスコで10 mlとした。これから0.5 mlをとり、内部標準として0.01%アジピン酸アセトン溶液0.5 mlを添加し、ロータリーエバポレーターでアセトンを除去後、N,O-ビストリメチルシリルアセトアミド0.1 mlを添加し、ガラス栓で密栓し、室温で20分間放置後、5 μ lをガスクロマトグラフィ-に供試した。

ガスクロマトグラフィ-の条件は以下の通りである。日立063型ガスクロマトグラフ、FID検出器、2000 \times 3 mmステンレスカラム、充填剤：1.5% SE 30 on Chromosorb W 60-80 mesh、キャリアーガス：窒素、流速：50 ml/min、5 $^{\circ}$ C/minにて100 $^{\circ}$ Cから250 $^{\circ}$ Cまで昇温。

トリメチルシリル化した試料のうちのいくつかは、ガスクロマトグラフ-マススペクトロメトリ- (GC-MS) システム (JGC-20K-JMS-D100) によっても分析した。

GC-MSシステムにおけるガスクロマトグラフィーの条件は以下の通りである。JEOL-JGC-20Kガスクロマトグラフ, 1000×3 mmガラスカラム, 充填剤: 1.5% OV-1 on Shimadlite W 80~100 mesh, キャリヤーガス: ヘリウム, 流速: 30 ml/min, 5°C/minにて100°Cから250°Cまで昇温分析。

ピークの同定は, 合成化合物とのマススペクトルの対照, およびコクロマトグラフィーによって行なった。

エーテル抽出画分の全炭素含量は, 重クロム酸カリ-硫酸法(29)で比色定量した。すなわち, エーテル抽出画分のアセトン溶液(10 ml)から一定量(0.3~1.0 ml)を採り, アセトンを蒸発させ, 完全に除去した後, 0.1 N NaOH 2 mlを加えて溶解し, 0.5 N 重クロム酸カリ-濃硫酸溶液 4 mlを加えて, 30分放置後, 645 nmの吸光度を測定した。検量線はグルコースによって作成した。

結果および考察

1) 6 N 塩酸加水分解および KOH 分解の逐次処理によるエーテル抽出画分の収率 (表 10)

未処理腐植酸を直接 KOH 分解することにより、腐植酸重量の 12 ~ 38 % がエーテルにより抽出可能となった。収率は Rp 型, B 型, A 型の順に減少した。グルコース腐植酸からの収率も 26 % であり、土壌腐植酸と同じ範囲内であった。

Table 10. Yields of ether-extracts before and after acid hydrolysis, after successive KOH degradation, and after the direct KOH degradation of humic acids.

No.	Sample	Type	Yields (mg/g) of ether extracts			
			(1)	(2)	(3)	(4)
2	Temmondai	A	23.0	33.7	77.0	120
18	Kuragari	B	62.3	49.9	113	224
38	Kisokoma (F)	Rp(2)	117	56.1	171	375
	Glucose HA		28.8	34.6	167	255

Notes.

- (1) Yields of total ether-extracts from the humic acid suspensions in 6 N HCl.
- (2) Yields from the successive 6 N HCl hydrolysates of humic acids.
- (3) Yields from the successive KOH degradation products of humic acids.
- (4) Yields from the direct KOH degradation products of humic acids.

逐次処理においては、未処理腐植酸を6N塩酸に分散させるだけで、腐植酸重量の2~12%がエーテル可溶となり、続く6N塩酸加水分解(100℃, 24時間)では3~6%, さらにこれに続くKOH分解では8~17%がエーテル可溶となった。これらの逐次処理によるエーテル抽出画分の収量の合計は、いずれの腐植酸についても未処理試料を直接KOH分解した場合の収量とほぼ等しかった。

KOH分解生成物のうち同定された化合物の収量は、エーテル抽出画分の約10%であり、腐植酸全重量の約1~3%であった。腐植酸の6N塩酸懸濁液および6N塩酸加水分解液からエーテルで抽出した画分のトリメチルシリル化物は、ガスクロマトグラムにピークが検出されなかった。

腐植酸の6N塩酸懸濁液からのエーテル抽出画分中に低分子化合物が検出されなかったことは、このガスクロマトグラフィの条件下で検出しうるような低分子化合物が、腐植

酸中に遊離形または加水分解されやすい形で存在していないことを示している。

腐植酸の6N塩酸加水分解液中には、他の研究者ら(38, 39)によって、例えばレブリン酸、コハク酸、フマル酸(38)、p-ヒドロキシ安息香酸、バニリン酸、プロトカテキユ酸(38, 39)、バニリン等が検出されている。

ここで用いた実験条件下で、6N塩酸加水分解液から低分子化合物が検出されなかったことは、前処理によって、かなり多量の脂溶性画分が腐植酸から除かれていることと、酸加水分解はKOH分解ほど強力ではないことによるものと思われる。

前処理をした腐植酸のKOH分解による同定化合物の収量は、表IIに示すように、未処理腐植酸からの収量の約1/2であった。このことは、KOH分解生成物の由来するもとの構造が、腐植酸中でかなり強固に結合していることを示唆している。

Table II Yields of KOH degradation products from the pretreated humic acids¹⁾ and from the original humic acids.

	Yields (mg/g) of products ²⁾									Eter	
	Succi.	Glutar.	p-H.b.	Phlo.	Vanil.	Proto.	Dih.m.	Gallic.	Total	extracts	
Pre-treated preparations ¹⁾											
Temmondai	3.10	0.93	0.41	0.095	0.42	0.96	tr.	tr.	5.92	77.0	
Kuragari	4.74	0.93	1.30	1.21	0.43	1.17	tr.	tr.	9.78	113	
Kisokoma (F)	5.25	0.86	1.26	3.42	0.49	5.03	tr.	tr.	16.31	171	
Glucose HA	5.12	1.23	0	0	0	0	0	0	6.35	167	
Original preparations											
Temmondai	4.72	1.02	0.74	0.22	0.56	1.44	tr.	tr.	8.70	120	
Kuragari	11.42	1.74	2.19	2.36	0.79	5.60	0.38	0.15	24.63	224	
Kisokoma (F)	8.57	1.78	1.99	3.92	1.23	7.28	1.03	0.27	26.1	375	
Glucose HA	9.25	1.04	0	0	0	0	0	0	10.3	255	

1) Humic acid preparations which were extracted with ether, hydrolyzed with 6 N HCl, and extracted again with ether, successively, before KOH degradation.

2) Succi: Succinic acid; Glutar: Glutaric acid, p-H.b.: p-Hydroxybenzoic acid, Phlo: Phloroglucin, Vanil: Vanillic acid, Proto: Protocatechuic acid, Dih.m.: 3,4-Dihydroxy-5-methoxybenzoic acid, Gallic: Gallic acid.

2) KOH分解生成物の同定と定量

土壤腐植酸の KOH 分解生成物のガスフロマトグラムの一例 (闇苳, No. 21, B 型) を、図 25 に示した。主要なピークはすべて同定した。コハク酸 (図 25, ピーク 1) およびプロトカテキユ酸 (ピーク 6) が多量に生成した。グルタル酸 (ピーク 2), p-ヒドロキシ安息香酸 (ピーク 3), フロログルシン (ピーク 4), バニリン酸 (ピーク 5) も、かなりの

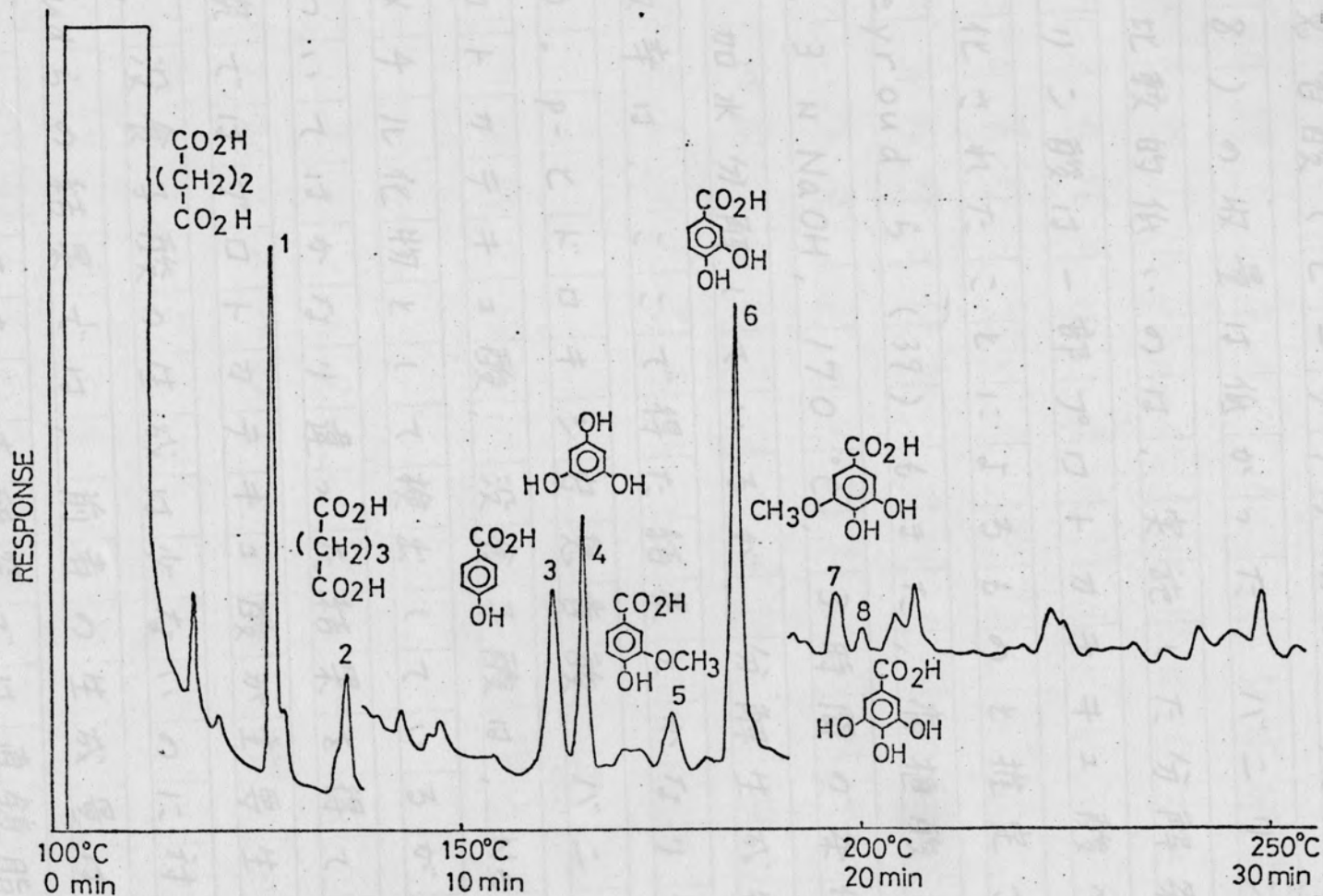


Fig. 25. GC analysis of the KOH degradation products of Kuragari (No. 18) humic acid.

量で生成した。3,4-ジヒドロキシ-5-メトキシ安息香酸(ピ-77)および没食子酸(ピ-78)の収量は低かった。バニリン酸の収量が比較的低いのは、実施した分解条件ではバニリン酸は一部プロトカテキユ酸へと脱メチル化されたことによるものと推定される。

Neyroudら(39)もまた、腐植酸とフルボ酸を3N NaOH, 170°C, 3時間の条件でアルカリ加水分解しているが、分解生成物の種類と収率は、ここで得た結果とかなり異なっている。p-ヒドロキシ安息香酸, バニリン酸, プロトカテキユ酸, 没食子酸は、Neyroudらもメチル化物として検出しているが、収量比についてはかなり違った結果を得ている。本研究ではプロトカテキユ酸が主要生成物であり、没食子酸の生成は少ないのに対し、Neyroudらの結果では、前者の生成量は後者よりも少ない。また、本研究では直鎖脂肪酸は検出されなかった。本実験のガスクロマトグラフィ-の条件でも直鎖脂肪酸は検出可能であ