

第6章 土壌腐植酸の吸光度 - pH曲線

前章までに、腐植酸の構造にはリグニン、多糖類およびその福変重合体、タンパク質、フラボノイド等がかなり含まれるが、それらは腐植化の進行とともに減少することを示した。これらに代って、暗色無定形の安定な高分子重合体が、腐植化の進行とともに腐植酸中に増加する。腐植酸の可視部吸収は、腐植酸中のこの暗色無定形高分子によるところが非常に大きい。以後の章では、腐植酸の暗色高分子の化学構造に関する知見を得ることを主要な目的として、腐植酸の紫外および可視部吸収と化学構造の関係について検討を行なう。本章では、腐植酸の吸光度 - pH曲線から、腐植酸中の解離基の pK の分布、解離様式等について考察する。

試料および方法

1) 供試腐植酸

表15に、使用した腐植酸の、型、土壌の種類、カルボキシル基含量、フェノール性水酸基含量を示した。使用した腐植酸は、A型3点、B型3点、Rp(1)型2点、Rp(2)型1点と、燕腐植酸のPg画分である。

Table 15 Humic acid samples

type	No.	sample	original soil	COOH me/g	Phenolic OH me/g
A	2	Temmondai	Kuroboku (humic volcanic ash) soil	4.94	2.50
A	4	Inogashira	ditto	5.68	0.83
A	14	Nagara OH	rendzina-like calcareous soil	5.64	2.27
B	18	Kuragari	brown forest soil	3.69	1.94
B	19	Kinshozan F	rendzina-like calcareous soil	4.84	1.64
B	21	Higashiyama(A)	brown forest soil	4.39	2.73
Rp(2)	30	Higashiyama(FH)	F-H layer of brown forest soil	2.95	2.82
Rp(1)	32	Kinshozan OH	rendzina-like calcareous soil	3.44	1.00
Rp(1)	34	Ishimakisan OH	ditto	2.81	2.63
P ₊₊₊	1	Tsubame Pg	humic buried soil	4.78	3.69

Carboxyl group content was determined by calcium acetate method and phenolic OH group content was obtained by subtracting carboxyl group content from total acidity.

2) 吸光度 - pH 曲線

0.5 N NaOH に溶解した腐植酸溶液 25 ml (濃度は, A 型腐植酸および燕 P_g は炭素換算 30 mg / 100 ml, B 型および R_p 型腐植酸は炭素換算 60 mg / 100 ml) を 250 ml のメスフラスコ 2 個に採り, それぞれに混合緩衝液 25 ml を添加し, 水で定容にした。混合緩衝液は, Na₂HPO₄ · 12 H₂O 40.2 g, Na₂B₄O₇ 14.3 g, クイーン酸ナトリウム · 2 H₂O 22.0 g を 800 ml の水に溶かし, 濃 NaOH 水で pH を 13 にし, 水で 1 l にした。2 個のメスフラスコ中の一方の全溶液をとり, Hiranuma RAT 11 型自動滴定装置を用い, 2 N 塩酸で電位差滴定した。他のメスフラスコ中には, 同じく 2 N 塩酸を添加しつつ, 0.2 ~ 0.3 ml 添加ごとに少量の溶液をとり出し, 300, 400, 500, 600 nm の吸光度を日立 124 型分光光度計で測定した。ただし燕 P_g の吸光度は, P_g 色素に特有の吸収帯である 280, 410, 460, 570, 620 nm で測定した。溶液は吸光度測定の後, メスフラスコ中に戻した。

吸光度は2N塩酸添加による希釈を補正した値を算出した。ただし滴定に要した2N塩酸は10ml以下であった。このようにして得た吸光度 - 滴定値, pH - 滴定値の両曲線を対照し、吸光度 - pH曲線を作成した。

結果および考察

図26, 27, 28にA, B, Rp型腐植酸の吸光度 - pH曲線を示す。いずれの波長においても土壌腐植酸の吸光度 - pH曲線には, pH13からpH3付近にかけて多数の変曲点が存在した。特にRp型腐植酸の吸光度 - pH曲線には多数の変曲点があった。ただし, 図28の曲線34 - 300のpH8.9からpH10.2にかけての区間, 曲線30 - 400および曲線30 - 500のpH8.0付近のように, Rp型腐植酸の吸光度 - pH曲線のなかには, 一定のpH領域で不規則な挙動を示すものも存在した。これらの不規則な挙動には, 実験的に再現性があった。この不規則な吸光度

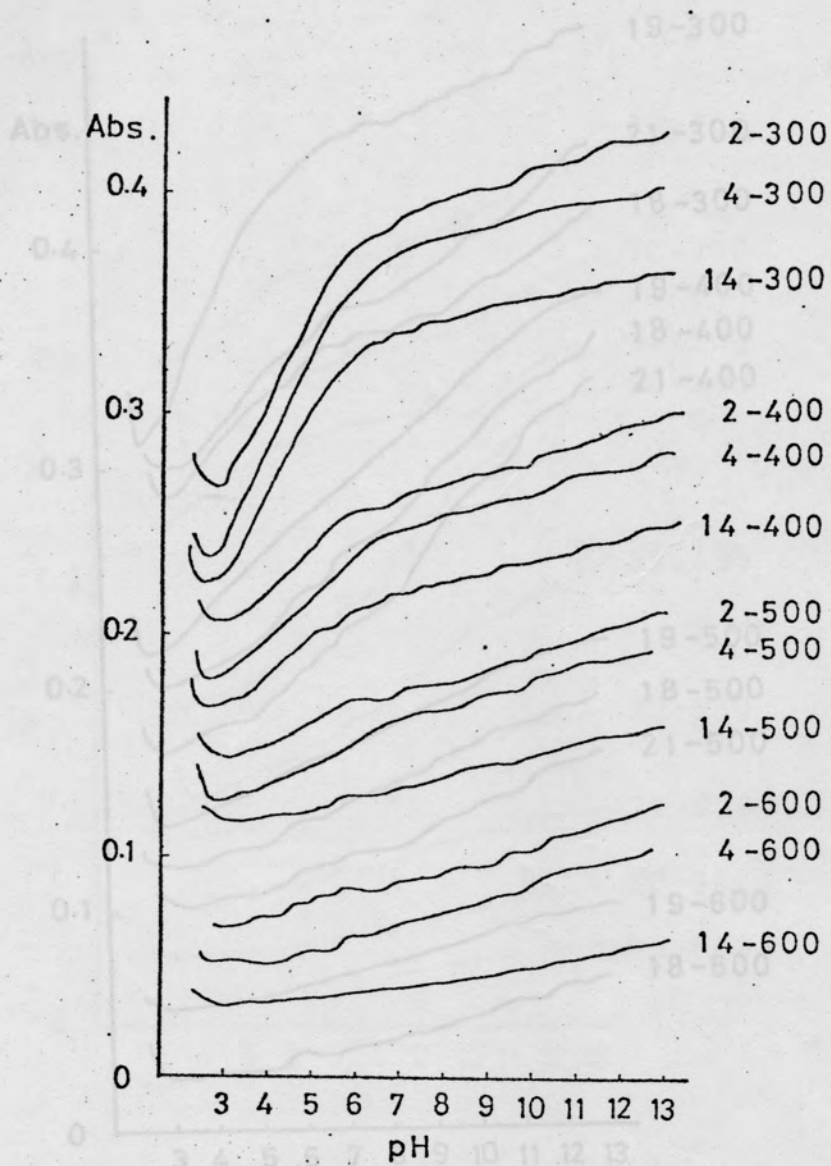


Fig. 26. Absorbance-pH curves of A type humic acids.

Numbers 2, 4, and 14 denote the sample numbers of Temmondai, Inogashira, and Nagara OH respectively. 300, 400, 500, and 600 denote the wavelengths (nm). Concentrations of the solutions are fixed at 30 mg carbon / l. The curves are shifted to the axis of the ordinates by arbitrary distance.

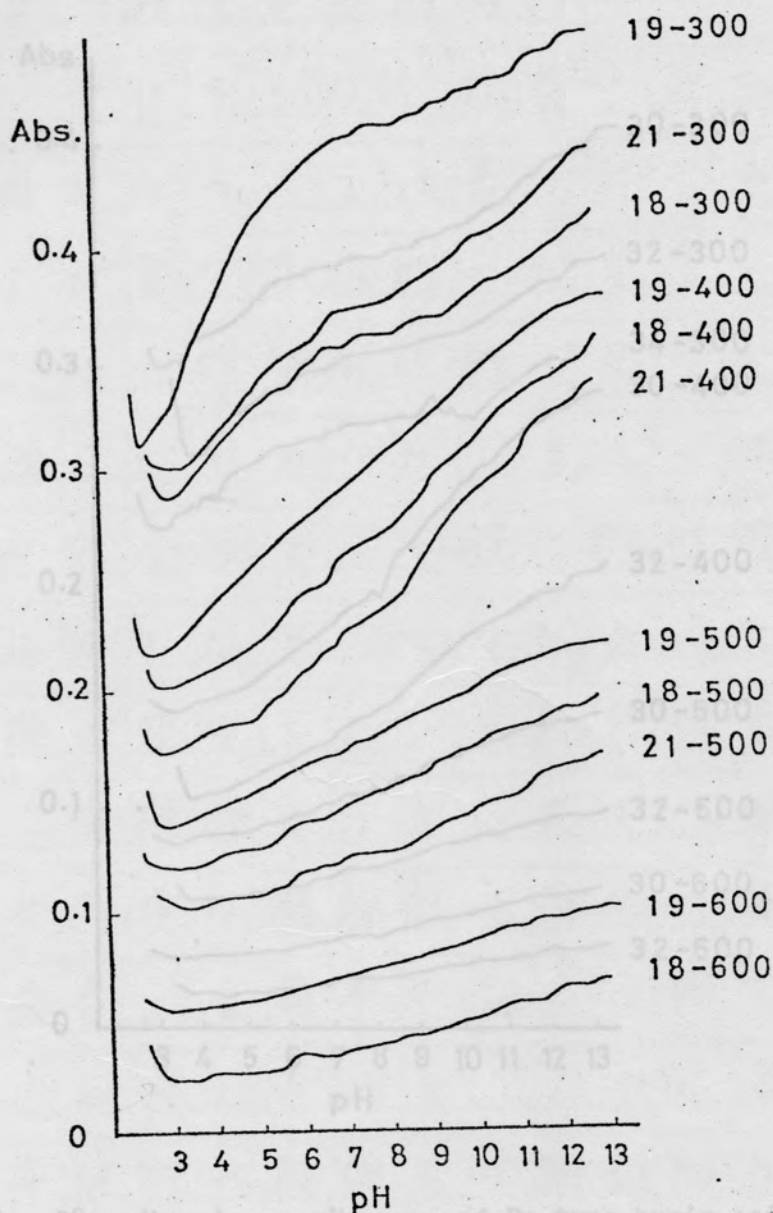


Fig. 27. Absorbance-pH curves of B type humic acids.

Numbers 18, 19, and 21 denote the sample numbers of Kuragari, Kinshozan F, and Higashiyama(A), respectively. 300, 400, 500, and 600 denote the wavelengths (nm). Concentrations of the solutions are fixed at 60 mg carbon / l. The curves are shifted parallel to the axis of the ordinates by arbitrary distance.

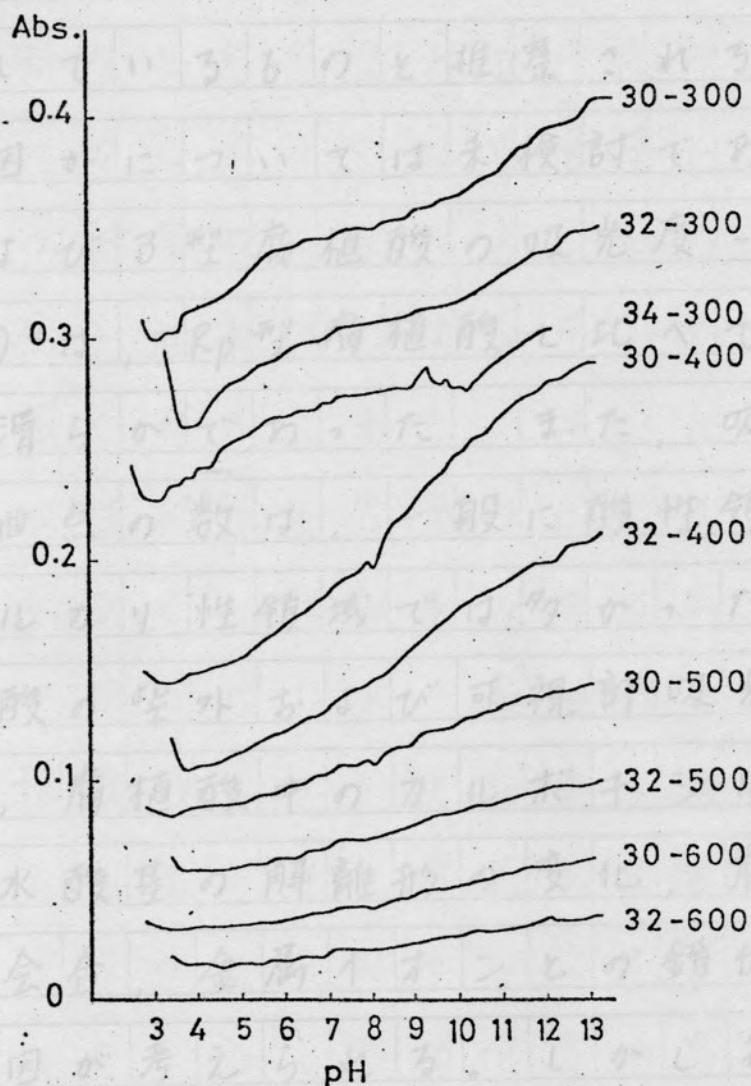


Fig. 28. Absorbance-pH curve of Rp type humic acids.

Numbers 30, 32, and 34 denote the sample numbers of Higashiyama (FH), Kinshozan OH, and Ishimakisan OH, respectively. 300, 400, 500, and 600 denote the wavelengths (nm). Concentrations of the solutions are fixed at 60 mg carbon / l. The curves are shifted parallel to the axis of the ordinates by arbitrary distance.

変化には、酸性基の解離形の変化以外の要因が関与しているものと推察されるが、どのような要因かについては未検討である。他方、A型およびB型腐植酸の吸光度 - pH曲線(図26, 27)は、Rp型腐植酸と比べて変曲点が少なく、滑らかであった。また、吸光度 - pH曲線の変曲点の数は、一般に酸性領域では少なく、アルカリ性領域では多かった。

腐植酸の紫外および可視部吸光度のpH依存性には、腐植酸中のカルボキシル基やフェニール性水酸基の解離形の変化、腐植酸分子の分散 - 会合、金属イオンとの錯体形成等の各種の原因が考えられる。しかし各種の要因はすべて腐植酸の解離基の解離形の変化に対応するものと推察され、従って、吸光度 - pH曲線の変曲点も、腐植酸中のカルボキシル基やフェニール性水酸基の解離形の変化と対応するものと推定される。また吸光度 - pH曲線中に多数の変曲点が存在することは、腐植酸中の個々の解離基の間の静電的相互作用が少な

く、それらが互いに独立して解離していることを示すものと推察される。Rp型腐植酸は解離基、特にカルボキシル基含量が少ないため、解離基間の静電的相互作用も少なく、従ってその吸光度 - pH曲線に変曲点が多数存在するものと推定される。また、一般に腐植酸中のフェニール性水酸基含量はカルボキシル基含量よりも少なく、解離基の間の静電的相互作用も小さいことにより、腐植酸の吸光度 - pH曲線は酸性領域よりもアルカリ性領域に多数の変曲点を示すものと推定される。

土壌腐植酸のカルボキシル基含量は、第3章で述べたように、腐植化度が高くなるほど増加した。これにともないカルボキシル基の間の静電的相互作用も増大するものと考えられる。解離基の間に静電的相互作用が存在すると、個々の解離基の解離域は広げられる

(41)。従って、腐植化度の高い腐植酸の吸光度 - pH曲線、あるいは一般に吸光度 - pH曲線の酸性領域では、各解離基の解離域が重な

り変曲点の数が少なくなるものと推察される。ただし、燕 P_g の吸光度 - pH 曲線 (図 29) に示されるように、解離基の種類が非常に単純な場合にも、曲線は非常に滑らかになる。しかし未分画の土壌腐植酸の場合には、解離基の種類が非常に単純であるとは考え難い。

燕腐植酸 (No. 11, P_+ 型) からセフアデックス G 50 で分画した燕 P_g の吸光度 - pH 曲線には、酸性領域とアルカリ性領域にそれぞれ 1 個の変曲点が存在した。これらの 2 つの変曲点は、 P_g 色素の母核である 4,9-ジヒドロキシペリレン-3,10-キノンの第 1 および第 2 解離に相当する。第 1 解離のフェノール性水酸基が非常に強い酸性を示すのは、フェノレートアニオンの負電荷が隣接カルボニル基および芳香環上に非局在化されること、および未解離のフェノール性水酸基とフェノレートアニオンの互変異性効果によって、セミキノン型が安定化されるためと推定される。逆に第 2 解離のフェノール性水酸基の酸性が普通の

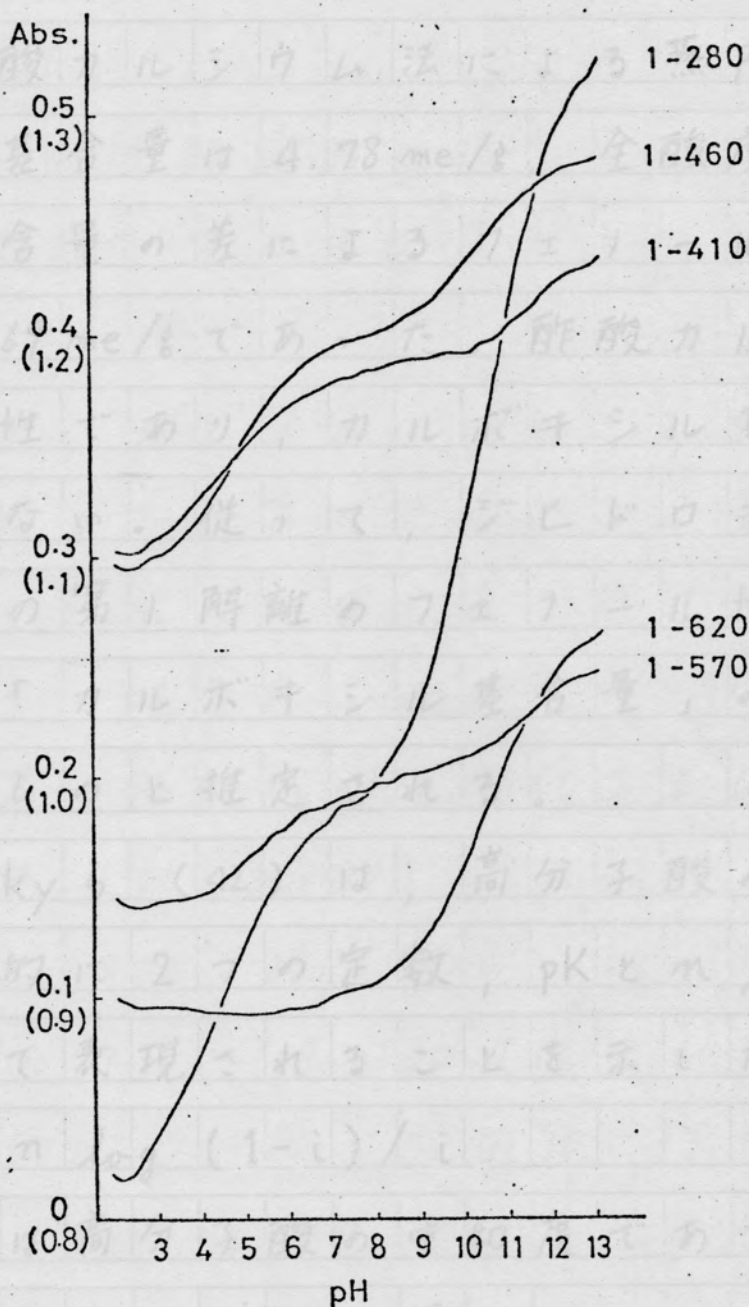


Fig. 29. Absorbance-pH curves of Tsubame Pg.

Numbers 280, 410, 460, 570, and 620 denote the wavelengths (nm). Concentration of the solution is 30 mg carbon / l. The absorbance for the curve 1-280 is in parentheses.

$$pK_a = pH - \log \frac{i}{(1-i)} \quad (1)$$

$$pK_a = pK + (n-1) \log \frac{i}{(1-i)} \quad (2)$$

フェノールより弱いのも、同上の理由で説明される。酢酸カルシウム法による燕Pg中のカルボキシル基含量は4.78 me/g, 全酸度とカルボキシル基含量の差によるフェノール性水酸基含量は3.69 me/gであった。酢酸カルシウム法はpK依存性であり, カルボキシル基のみの特異的ではない。従って, ジヒドロキシペリレンキノンの第1解離のフェノール性水酸基は, 燕Pgの「カルボキシル基含量」の中に含まれているものと推定される。

Katchalskyら(42)は, 高分子酸の滴定曲線は, 経験的に2つの定数, pKとn, により次式によって表現されることを示した。

$$\text{pH} = \text{pK} - n \log (1-i) / i \quad (1)$$

ここで, iは高分子酸の中知度である。また解離指数は次式によって得られる。

$$\text{pK}_a = \text{pH} - \log i / (1-i) \quad (2)$$

(1) および(2)式から,

$$\text{pK}_a = \text{pK} + (n-1) \log i / (1-i) \quad (3)$$

他方, 中知度は吸光度から次式によって計算

される。

$$i = (E - E_{AH}) / (E_A - E_{AH}) \quad (4)$$

ここで、 E_{AH} は未解離形の吸光度、 E_A は完全解離形の吸光度、 E は中和度が i のときの吸光度である。

従って、 pK_a および $\log i/(1-i)$ の値は吸光度 - pH 曲線から計算可能である。各吸光度 - pH 曲線の (3) 式への適合性を検討するため、これらの値を、吸光度 - pH 曲線 1-460 (燕 Pg. 460 mm) の第 1 解離域、1-460 および 1-620 の第 2 解離域 (以上 図 29)、2-300 (天文台, 300 mm)、4-300 (猪之頭)、14-300 (長檜 OH) (以上 図 27)、19-300 (金生山 F, 図 28) 等の酸性解離域で計算し、図 30 にプロットした。いずれの場合にも、 pK_a と $\log i/(1-i)$ の間には正の相関が認められた。

腐植酸の解離様式が式 (3) に適合することに対しては、従来 2 通りの解釈が存在する。そのひとつは、式 (3) によって表わされる直線関係を、腐植酸の高分子電解質としての性

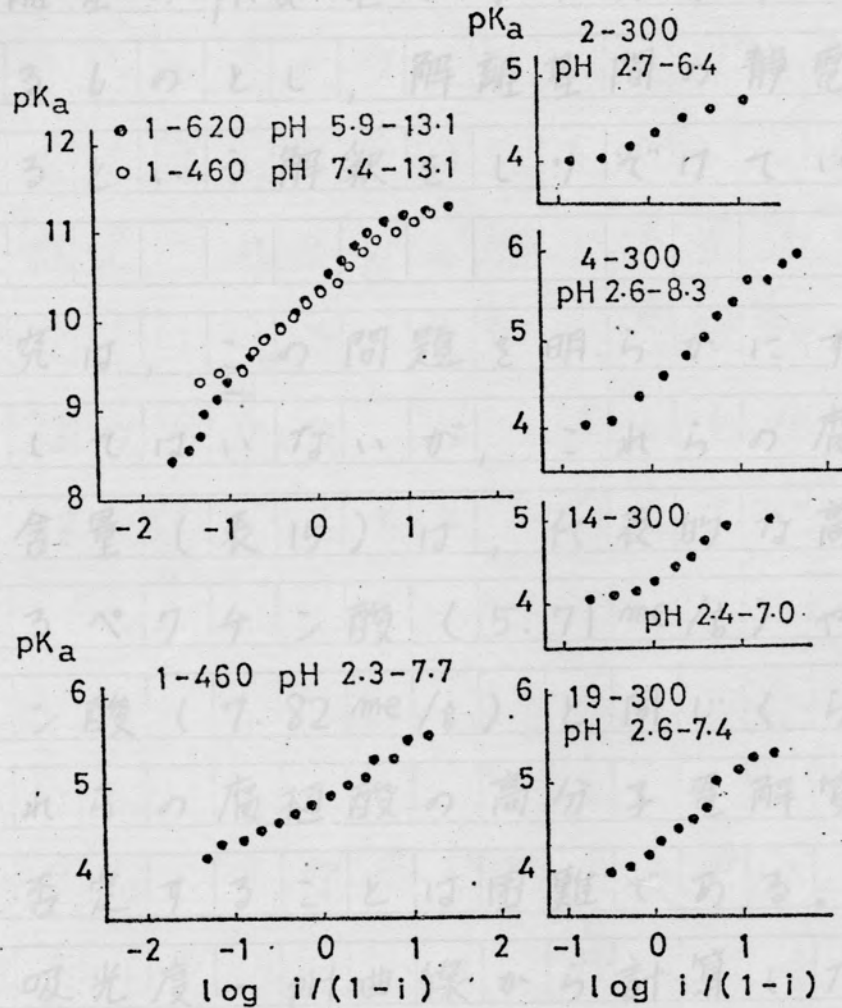


Fig. 30. Relationship between pK_a and $\log i/(1-i)$.

Numbers 1, 2, 4, 14, and 19 represent the sample numbers of Tsubame Pg, Temmondai, Inogashira, Nagara OH, and Kinshozan F, respectively. 620, 460, and 300 represent the wavelengths (nm). The values of pK_a and $\log i/(1-i)$ are calculated from the values of absorbance and pH in the pH range shown in the figures.

質によるものとし (43), もうひとつの解釈は, 解離基の pK_a 値がガウス分布していることによるものとし, 解離基間の静電的相互作用によるという解釈をしりぞけている (44, 45)。

本研究は, この問題を明らかにすることを目的としてはいないが, これらの腐植酸中の解離基含量 (表15) は, 代表的な高分子電解質であるペクチン酸 (5.71 me/g) やポリアスパラギン酸 (7.82 me/g) と同じくらい高いので, これらの腐植酸の高分子電解質としての挙動を否定することは困難である。従って, 燕 P_g の吸光度 - pH 曲線から計算した pK_a と $\log i/(1-i)$ の間に高い正の相関が認められたことは, 腐植酸中で P_g 色素がポリマーとして存在していることを示している。

天文台, 猪之頭, 長楽OH, 金生山F等の腐植酸の酸性解離域における pK_a と $\log i/(1-i)$ の間の直線関係は, 解離基の種類組成が単純な燕 P_g の場合ほど高くはなかった。

腐植酸の吸光度 - pH曲線中に存在する多数の変曲点は、腐植酸中に pK_a 値の異なる各種のカルボキシル基やフェノール性水酸基が存在することを示している。しかしこれらの変曲点から推定される pK_a 値が不連続でかつ不規則に分布していることは、腐植酸中の解離基の pK_a 値の分布が、必ずしもガウス分布に従ってはいないことを示唆している。

要約

A型, B型, R_p 型腐植酸各3点とP型腐植酸の P_g 画分1点について、溶液のpH値と紫外および可視部吸光度の関係を検討した。腐植酸の吸光度はpHの低下とともに段階的に減少した。吸光度 - pH曲線の変曲点から推定される解離基の pK_a 値は、pH 3.5 から pH 13 までの非常に広い範囲に分布した。しかし腐植化度の高い腐植酸の吸光度 - pH曲線の特に pH 7 以下の領域には、変曲点の数が少なかった。こ

れは、カルボキシル基含量の増加にともなっ
 て、カルボキシル基間の静電的相互作用が増
 し、また解離域が重なるためと推定した。ま
 た高腐植化度の腐植酸中のカルボキシル基、
 P_g 画分中のフェニール性水酸基等は、高分子
 電解質の解離様式に従って解離した。

腐植酸中のカルボキシル基の解離様式は、
 分子全体の解離の様式について検討した。こ
 れに引いて、本報告は、腐植酸の紫外部および
 可視部吸光度に対するカルボキシル基および
 フェニール性水酸基の寄与を検討することと
 目的とした。腐植酸の紫外部および可視部の
 差スペクトルについては、既に松本ら(46)
 によつて各種腐植酸とリグニンと、また Sauer
 ら(45)によつて各種腐植酸と植物遺体の腐植
 酸と、いずれも Goldschmidt (47)の方法に
 よつて研究されている。本研究所では、ルカリ
 成のみならず酸性域での差スペクトルも測定
 し、差スペクトル、差吸光度と腐植酸の腐
 植化度、解離基含量、pHとの関係と