

腐植物質分析ハンドブック

— 標準試料を例にして —

日本腐植物質学会 監修
渡辺 彰 編
藤獄 暢英
長尾 誠也

腐植物質分析ハンドブック

標準試料を例にして

渡辺 彰・藤獄 暢英・長尾 誠也 編

三恵社

三恵社

5. 官能基分析

腐植物質には表 5-1 に示すような各種の官能基が含まれ、腐植物質の様々な物理的・化学的機能、陽イオンの保持や重金属との錯体形成（カルボキシル基、フェノール性水酸基、エノール基、アミノ基）、親水性吸着部位の提供（アルコール性水酸基）、疎水性吸着部位の提供（アルキル基、アリル基）、酸化還元反応（キノン、ヒドロキノン）、陰イオンの保持（アミノ基）、農薬や人工有機化合物との化学反応および吸着（カルボニル基、キノン）等に関わっている。したがって、腐植物質中の官能基の含量を正確に知ることは、その機能、生成機構、養分供給能等を解明するために不可欠である。近年では、 ^1H および ^{13}C NMR や FT-IR 等の機器分析法の進歩によって、微量な試料を用い、しかも試料を回収可能な方法で官能基組成の概要を知ることができるようになった。しかし、これらの方法も万能ではなく、化学反応、酸化還元反応、酸塩基反応等を用いて定量した値と相補的に用いることが望ましい。

なお、本章では「データおよび解説」および「引用文献」は全項の説明の後で一括して紹介する。

表 5-1 腐植物質に含まれる主な官能基

アミド基	アルコール性水酸基	カルボキシル基
アミノ基	アルデヒド基	カルボキシレート陰イオン
アミン	エーテル基	カルボニル基
イミノ基	エステル基	ケトン基
ペプチド基	エノール基	ケト酸
アルキル基	キノン基	フェノール性水酸基
メトキシル基	ヒドロキシキノン基	フェノレート陰イオン

5-1. 全酸度

腐植物質の全酸度には、pH 13 以下で解離する全ての酸性官能基（カルボキシル基、フェノール性水酸基およびエノール基）が含まれる。水酸化バリウムと腐植物質の酸性官能基が反応すると、腐植物質のバリウム塩が形成され、沈殿し、溶液中に未反応の水酸化バリウムが残る。これを塩酸標準液で滴定する。ブランクは腐植物質を加えない水酸化バリウム溶液とする。実際の手法としては各種の変法があるが、ここでは Tsutsuki・Kuwatsuka¹⁾が Martin ら²⁾の方法に若干の修正を加えた方法を紹介する^{a)}。

方法

- 1) ガラス共栓付遠心管（50 mL 容）中に、約 50 mg の腐植物質を正確に秤取り、これに炭酸を含まない 0.1 N NaOH 10 mL を加えて腐植物質を溶解する。
- 2) 0.1 N BaCl₂ 溶液 25 mL を加えて密栓し、16 時間振とうした後、2500 g で 10 分遠心分離する。その上澄液 25 mL をとり、ただちに 0.1 N HCl 標準液で滴定する。
- 3) 滴定はガラス—カロメル電極法で行い、pH 8.4 を中和点とする。フェノールフタレインを指示薬として、赤色が消えるまで滴定してもよい。
- 4) 同様にして、試薬のみの混合物を滴定し（ブランク試験）、次式により全酸度（ $\text{me g}^{-1} = \text{mol kg}^{-1}$ ）を求める：

$$\frac{0.1 \times (\text{ブランク滴定値 mL} - \text{試料滴定値 mL}) \times f \times 35}{\text{試料秤取量 mg} \times 25} \quad (5.1)$$

f は標準液の濃度補正ファクターである（本章では全て同様）。

留意点

- a) Schnitzer³⁾ は、腐植物質 50~100 mg を 0.2 N Ba(OH)₂ 20 mL と反応させた後、これを濾過し、濾液を 0.5 N HCl で滴定しているが、

Tsutsuki・Kuwatsuka¹⁾の用いた方法は以下のような利点を持っている。すなわち、Ba(OH)₂ 溶液は溶解しにくいうえに注意していても二酸化炭素を吸収して濁りやすいが、BaCl₂ 溶液は調製が容易であり、しかも濁らない。フミン酸の場合、Schnitzer³⁾の方法ではBa(OH)₂ 溶液を直接反応させるためフミン酸は溶解しないが、Tsutsuki・Kuwatsuka¹⁾の方法ではフミン酸がいったん NaOH に溶解するため、反応が均一に進む。また、濾過をせず遠心分離を行っているため、濾過中の二酸化炭素の吸収が起こらない。

5-2. カルボキシル基

腐植物質中のカルボキシル基は、酢酸カルシウムと反応すると、自身はカルシウム塩となって沈殿し、溶液中に酢酸を遊離する。この酢酸をアルカリ標準液により滴定する⁴⁾。

方 法^{1,3,4)}

- 1) ガラス共栓付 125 mL 容三角フラスコ中に、50~80 mg の腐植物質を正確に秤取り、脱炭酸水 50 mL、1 N 酢酸カルシウム 10 mL を加えて密栓し、室温で 16 時間振とうする。
- 2) 反応液全量を ADVANTEC No. 6 等の濾紙で濾過し、濾紙上の沈殿を純水で洗浄する。濾液を 0.1 N NaOH により、フェノールフタレインを指示薬として、溶液が微赤色になるまで滴定する。フミン酸を加えないブランク試験も行い、同様に滴定する。自動滴定装置を用いる場合の滴定終点は pH 9.0 とする。
- 3) カルボキシル基含量 ($\text{me g}^{-1} = \text{mol kg}^{-1}$) は次式により計算する：

$$\frac{0.1 \times (\text{試料滴定値 mL} - \text{ブランク滴定値 mL}) \times f}{\text{試料秤取量 mg}} \quad (5.2)$$

留意点

a) 腐植物質中には非常に弱い酸から非常に強い酸まで、 pK_a の異なるカルボキシル基が含まれている。これらを分別定量するためには、別途電気伝導度滴定⁵⁾ や、内部標準として安息香酸やフタル酸を添加してジメチルスルフォキシド中で滴定する方法⁶⁾ 等が提案されている。

5-3. フェノール性水酸基

フェノール性水酸基を直接定量する方法としてフォリン・シオカルト試薬により青色に呈色する反応⁷⁾ を利用する比色法がよく用いられる。また、間接的定量法では、全酸度 (5-1.) とカルボキシル基含量 (5-2.) の差をフェノール性水酸基含量とする。ここでは直接比色定量法を紹介する。

方法

- 1) 腐植物質を $0.1 N$ NaOH に溶解して濃度 $30\sim 50 \text{ mg L}^{-1}$ とする。このとき正確な濃度を記録しておく。
- 2) 25 mL メスフラスコ中にこの腐植物質溶液 10 mL をとり、フォリン・シオカルトフェノール試薬 (市販品) 2 mL を加え、 30 分放置する。
- 3) その後 200 g L^{-1} 炭酸ナトリウム 10 mL を加え、蒸留水で定容してよく混合し、 40°C の恒温槽中で約 1 時間加温する。
- 4) 放冷後、 720 nm の吸光度を測定する。
- 5) ブランクは試薬の添加順序を以下のように変えて調製する：フォリン・シオカルトフェノール試薬 2 mL に 200 g L^{-1} 炭酸ナトリウム 10 mL を加え、 40°C で 1 時間加温し、無呈色の溶液を得た後、これにフミン酸溶液 10 mL を添加し、水で定容する。
- 6) 試料発色溶液とブランク発色溶液の吸光度の差を、フェノールによる正味の発色とする。

- 7) 検量線はフェノール標準液 (0, 1, 2, 3, 4, 5 mg L⁻¹) を同様に発色させて作成する。

5-4. カルボニル基

カルボニル基とヒドロキシルアミン塩酸塩を反応させると、オキシムが生成し塩酸 1 分子が遊離する。遊離した塩酸は溶媒中の弱塩基、N,N-ジメチルアミノエタノールにより中和される。未反応のヒドロキシルアミン塩酸塩を過塩素酸で滴定する。ブランクと試料反応液の滴定値の差からカルボニル基が求められる。

方 法^{1,9)}

- 1) 10~40 mg の試料を 30 mL 容の三角フラスコ中に秤取り、3.0 mL の 0.25 M N,N-ジメチルアミノエタノール溶液に溶解した後、5 mL の 0.3 M ヒドロキシルアミン塩酸塩溶液を加える。
- 2) 100°C で 16 分間加熱した後、内容物を約 10 mL の蒸留水で小ビーカー中に洗いこみ、0.2 N HClO₄ 溶液で滴定する。
- 3) 滴定はガラス-カロメル電極法で行い、pH 3.5 を中和点とする。
- 4) カルボニル基含量 (me g⁻¹ = mol kg⁻¹) は次式により計算する：

$$\frac{0.2 \times (\text{ブランク滴定値 mL} - \text{試料滴定値 mL}) \times f}{\text{試料秤取量 mg}} \quad (5.3)$$

5-5. 全水酸基, アルコール性水酸基

水酸基をピリジン触媒下で無水酢酸と反応させてアセチル化する。未反応の無水酢酸を蒸留水で酢酸へと加水分解し、アルカリ標準液で滴定する。ここでは Dewalt ら⁹⁾の方法を紹介するが、数種の既知化合物について試験した結果、特に糖類に対して、原法のアセチ

ル化の時間 5 分は不十分であったので、2 時間とした。

方 法

- 1) 約 100 mg の試料を 20 mL 容のネジ栓付き試験管に秤取り、3 M 無水酢酸—ピリジン溶液 (5:12 v/v) 1.0 g を 0.1 mg の桁まで正確に量って添加する。
- 2) 密栓後、オイルバスにより、120°C で 2 時間加熱還流する。
- 3) 冷却後、内容物を蒸留水で洗い出して濾過 (例えば ADVANTEC No. 5C) し、濾液を 0.1 N NaOH で滴定する。
- 4) 全水酸基含量 ($\text{me g}^{-1} = \text{mol kg}^{-1}$) は次式により計算する：

$$\frac{0.1 \times (\beta \text{ mL} - \text{試料滴定値 mL}) \times f}{\text{試料秤取量 mg}} \quad (5.4)$$

β は秤取った重量の無水酢酸—ピリジン溶液によって消費される 0.1 N NaOH の量

- 5) 全水酸基含量からフェノール性水酸基含量を差し引いた値をアルコール性水酸基含量とする。

5-6. メトキシル基

メトキシル基はヨウ化水素中で加熱するとヨウ化メチル (CH_3I) に変化する。この CH_3I を、二酸化炭素をキャリアーガスとして、臭素を滴下した酢酸ナトリウム—酢酸溶液に導く。 CH_3I は臭素と反応することにより、等モル数のヨウ素酸 (HIO_3) に変化する。過剰の臭素を蟻酸で分解し、 HIO_3 をヨウ化カリウムと H_2SO_4 で処理すると、等モル数のヨウ素 (I_2) が生成する。この I_2 をチオ硫酸ナトリウム標準液によって滴定する。メトキシル基蒸留装置を用いる。

方 法¹⁰⁾

- 1) 反応フラスコに錫カプセルに包んだ腐植物質試料約 10~30 mg

を入れ、57%ヨウ化水素 5 mL を添加する。

- 2) 127°C で 30 分間加熱し、メトキシル基を CH_3I に変換する。
- 3) 反応フラスコに導入する前に 5%硫酸カドミウムと 5%チオ硫酸ナトリウムの混液で洗浄した二酸化炭素をキャリアガスとして用い、発生した CH_3I を、臭素 10 滴を滴下した 10%酢酸ナトリウム-酢酸溶液 2 mL に導いて吸収させる。
- 4) CH_3I を吸収させた捕集液は、20%酢酸ナトリウム水溶液を用いて 100 mL 容三角フラスコ中に洗い込み、ギ酸数滴を添加して過剰の臭素を分解する。この段階で CH_3I は HIO_3 に変換されている。
- 5) これに 10%ヨウ化カリウム 2 mL と 2 N H_2SO_4 2 mL を添加して I_2 を遊離させ、澱粉を指示薬として 1/50 N チオ硫酸ナトリウム標準液で滴定する。
- 6) メトキシル基含量 ($\text{me g}^{-1} = \text{mol kg}^{-1}$) は次式により計算する：

$$\frac{3.33 \times (\text{試料滴定値 mL} - \text{ブランク滴定値 mL}) \times f}{\text{試料秤取量 mg}} \quad (5.5)$$

データおよび解説

表 5-2 に日本腐植物質学会土壤腐植物質試料の各種官能基含量を示した¹¹⁾。両土壤において、フルボ酸のアルコール性水酸基含量は計算上ゼロ以下となり、求めることができなかつた。これは何らかの理由でこれらのフルボ酸の全水酸基含量定量値が非常に低い値を与えたためである。Watanabe ら¹¹⁾は、全水酸基の定量におけるアセチル化が不完全であったためと推論している。

参考として、各種気候帯土壤から得られたフミン酸とフルボ酸の官能基含量を表 5-3 に、著者らが測定した熊田の分類¹²⁾による各型フミン酸の官能基含量を表 5-4 にそれぞれ示した。約 40 点のフミン酸についてフミン酸の型および腐植化度と官能基含量の関係について検討した結果¹⁾では、Rp(1)型から P₀および B 型を経て A 型に至る過程で、カルボキシル基、フェノール性水酸基はともに増加した。

表 5-2 日本腐植物質学会標準試料の各種官能基含量 ($\text{cmol}_c \text{kg}^{-1}$)

官能基	フミン酸		フルボ酸	
	猪之頭	段戸	猪之頭	段戸
全酸度	6.31	5.88	10.88	9.08
カルボキシシル基	4.35	3.70	9.81	7.72
フェノール性水酸基	1.96	2.18	1.07	1.36
アルコール性水酸基	2.56	3.43	N.D.*	N.D.
カルボニル基	6.05	4.24	5.44	5.83
全水酸基	4.43	5.62	0.69	0.52

*非検出。

表 5-3 各種気候帯土壌から得られたフミン酸およびフルボ酸の各種官能基含量 ($\text{cmol}_c \text{kg}^{-1}$)

官能基	フミン酸	フルボ酸
全酸度	560 ~ 890	640 ~ 1420
カルボキシシル基	150 ~ 570	520 ~ 1120
フェノール性水酸基	210 ~ 570	30 ~ 57
アルコール性水酸基	20 ~ 490	260 ~ 950
カルボニル基	10 ~ 560	120 ~ 420
メトキシシル基	30 ~ 80	30 ~ 120

ただしフェノール性水酸基の増加はわずかであり、カルボキシシル基の増加が著しかった。カルボニル基はカルボキシシル基よりやや少ない程度含まれたが、石灰質土壌 A 型フミン酸では特に多く含まれた。カルボニル基にはかなりの量のキノンも含まれ、フミン酸の強い可視部吸収の原因となっているものと思われる。カルボキシシル基と同様、カルボニル基もフミン酸の腐植化度が高くなるほど増加し、また、カルボキシシル基含量とカルボニル基含量の間には正の相関が認められた。アルコール性水酸基およびメトキシシル基は腐植化度が高

表 5-4 各型フミン酸の各種官能基含量 (cmol_c kg⁻¹)

官能基	Rp(2)型	Rp(1)型*	Rp(1)型**	P ₀ 型	B型	A型
全酸度	5.99	4.01	5.16	5.91	7.05	7.90
カルボキシル基	2.73	2.49	2.96	2.93	3.92	5.56
フェノール性水酸基	3.25	1.52	2.20	2.99	2.13	2.34
アルコール性水酸基	4.42	3.42	3.22	2.48	2.98	0.54
カルボニル基	3.26	2.52	3.40	3.55	6.63	10.3
メトキシル基	1.29	1.25	0.80	0.62	0.68	0.22

*水田土壌。 **石灰質土壌。

くなるほど減少し、 A_{600}/C 値との間に高い負の相関を示した。このことは、腐植化の進行に伴う、フミン酸中の炭水化物成分やリグニン成分の分解を示している。

他方、フミン酸中の酸素の中には、これらの含酸素官能基によって説明されないものがある。主として多糖類、リグニン、タンパク質等の架橋酸素および環内酸素と考えられるが、このような酸素は腐植化度の増大とともに減少し、特にA型フミン酸では、酸素のほとんどがカルボキシル基、カルボニル基、およびフェノール性水酸基の酸素によって説明される。

なお、キノンの定量法としては、以下の3種類の方法が提案されている¹³⁾: ①酸性溶液中で塩化スズ(SnCl_2)により還元し、反応せずに残った Sn^{2+} をヨウ素で滴定する方法、② N_2 置換した0.1 M NaOH中で SnCl_2 と1時間反応させ、未反応の Sn^{2+} を重クロム酸カリウム溶液で逆滴定する方法、③アルカリ性のトリエタノールアミン中で Fe^{2+} によりキノンを還元し、未反応の Fe^{2+} を重クロム酸カリウム溶液で逆滴定する方法。詳細はStevenson¹³⁾をご覧ください。なお、Schnitzer・Riffaldi⁸⁾は、酸性条件下での還元法はアルカリ条件下での還元法よりも高いキノン含量を与え、アルカリ条件下での Sn^{2+} による還元法と Fe^{2+} による還元法はよく一致した値を与える

ことを示している。

引用文献

- 1) Tsutsuki, K. and S. Kuwatsuka : Chemical studies on soil humic acids. II. Composition of oxygen containing functional groups of humic acids. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **24**, 547-560 (1978)
- 2) Martin, F., P. Dubach, N.C. Mehta, and H. Deuel : Bestimmung der funktionellen gruppen von huminstoffen. *Z. Pflanzenerhaehrung, Dung und Bodenkunde*, **103**, 27-39 (1963)
- 3) Schnitzer, M. : Chemical, spectroscopic and thermal methods for the classification and characterization of humic substances. In Proceeding of International Meeting on Humic Substances, p. 293-310, Pudoc, Wageningen (1972)
- 4) Blom, L., L. Edelhausen, and D.W. van Krevelen : Chemical structure and properties of coal. XVIII. Oxygen groups in coal and related products. *Fuel*, **36**, 135-153 (1957)
- 5) Arai, S. and K. Kumada : Fractional determination of functional groups of humic acids by conductometric titration. *Geoderma*, **19**, 307-317 (1977)
- 6) Yonebayashi, K. and T. Hattori : Nonaqueous titration of functional groups in humic acid. *Org. Geochem.*, **8**, 47-54 (1985)
- 7) Kuwatsuka, S. and H. Shindo : Behavior of phenolic substances in the decaying process of plants. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **19**, 219-227 (1972)
- 8) Schnitzer, M. and R. Riffaldi : The determination of quinone groups in humic substances. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **36**, 772-777 (1972)
- 9) Dewalt, C.W. and R.A. Glen : Analytical acetylation - application to coal hydrogenation products. *Anal. Chem.*, **24**, 1789-1795 (1952)
- 10) Pregle, F. and H. Roth : Quantitative organische Mikroanalyse. 6th edition, p. 226, Springer, Wien (1949)
- 11) Watanabe, A., K. Itoh, S. Arai, and S. Kuwatsuka : Comparison of the

composition of humic and fulvic acids prepared by the IHSS method and Nagoya method. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **40**, 601-608 (1994)

- 12) 熊田恭一：土壤有機物の化学 第2版, 304 pp., 学会出版センター, 東京 (1981)
- 13) Stevenson, F.J.: *Humus Chemistry—Genesis, Composition, Reactions.* Second edition, p. 212-235, Wiley, New York (1994)

(筒木 潔)