

アルカリ加熱抽出における腐植の特性変化

山本定博*・本名俊正*・宮田 修*・高田秀夫*

平成元年 5月31日受付

Alteration of Humus Characteristics on the Extraction by Heating with Alkaline Solvent

Sadahiro YAMAMOTO*, Toshimasa HONNA*, Osamu MIYATA*
and Hideo TAKATA*

Effects of the extraction by heating with alkali on humus characteristics were investigated in Kuroboku soils (Andisols).

Optical and quantitative properties of humus extracted with 0.1N NaOH solution at 100 °C for 30 min (high temperature extraction) were compared with extracts with it by shaking at 30°C for 1 hour (room temperature extraction). The extraction at room temperature had lower extracting efficiency, but the optical properties of these extracts showed higher degree of humification, as compared with that at 100°C. Low molecular weight fractions (< MW 1000) in extracts were increased by high temperature extraction, and this suggested that a part of humus was decomposed to lower molecular fractions by alkali on the condition at high temperature.

Changeability of these properties on extraction temperature appeared to be related to the degree of humification, that is, lower humified humus was more changeable.

結 言

土壤の有機成分はきわめて複雑な構成内容をもっている。なかでも暗色を呈する不均質重縮合高分子物質群は『腐植物質』(狭義の腐植)と総称され、土壤の構成要素として極めて重要な機能を有するとともに、その性状は土壤の生成過程と密接な関係を持っている。

腐植の特性を知るためには、まず土壤の無機成分と結

合し不溶化している腐植物質を可溶態にして抽出分離する必要がある。腐植の抽出剤としては、腐植の物理的・化学的性質を変化させることなく、しかも完全に抽出しうるものが理想的であるが、未だ見出されていない³⁾。火山灰を母材とする土壤が卓越し、アルミニウムや鉄が腐植の結合物質になっている本邦土壤に対しては、抽出効率を第一に考え、希水酸化ナトリウム溶液による加熱抽出法が広く普及している。しかし、アルカリ抽出剤を用

* 鳥取大学農学部農林総合科学科資源利用化学講座

* Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Tottori University

いた場合、抽出中に腐植が変性（部分的な酸化、加水分解等）する可能性が指摘されている。特に我が国で広く普及している希水酸化ナトリウム溶液を用いた沸騰水中での加熱抽出はかなり過激な条件であると考えられ腐植の変性が憂慮されている^{3,4)}。

本研究では、アルカリ溶媒（希水酸化ナトリウム溶液）による加熱抽出が腐植の特性に及ぼす影響、特に腐植酸画分の変化を室温条件での抽出と比較して検討した。

実験方法

1 供試土壌

中国地方に分布する未耕地火山灰土壌について、全炭素3%以上含有するA層を鳥取県より2点、広島県より2点、島根県より2点、岡山県より1点、兵庫県より3点、京都府より1点、計11点を供試した。第1表に供試土壌の概要を示した。

第1表 供試土壌

試料名	層位	深さ (cm)	全炭素 (乾土%)	採取地
片腕の松	1	0-22	6.20	島根県大田市
掛合	1	0-16	6.21	島根県飯石郡掛合町
前谷	2	22-60	11.23	広島県比婆郡東城町
塩原	1	0-8	12.03	広島県比婆郡東城町
尾高	1	0-20	4.04	鳥取県西伯郡大山町
広留野Ⅲ	4	29-49	3.02	鳥取県八頭郡若桜町
掛田	1	0-25	15.65	岡山県真庭郡八束村
太田神鍋	1	0-24	20.60	兵庫県城崎郡日高町
東河内神鍋	1	0-15	20.57	兵庫県城崎郡日高町
東河内神鍋	2	15-48	5.39	兵庫県城崎郡日高町
夜久野	3	30-44	5.26	京都府天田郡夜久野町

2 腐植の抽出条件

（加熱抽出）加熱抽出は従来^{12,13)}に準じた。有機炭素200mg含有土壌(<0.5mm)を200ml容三角フラスコに秤取し0.5%NaOH溶液60ml(炭素:液=1:300)を加え、小型ロータをかぶせ、沸騰水中で時々振り混ぜながら正確に30分間加熱抽出した。流水中で冷却後、遠心分離(15,000rpm,10min.)を行ない上澄み液を得た。これを抽出腐植溶液とした。

（振とう抽出）上記と同様に土壌試料を秤取し同量の0.5%NaOH溶液を加えた後、パラフィルムで密封し、恒温振とう機で振とう(30°C, 1時間)した。振とう後、遠

心分離(15,000rpm,10min.)を行ない上澄み液を得た。これを抽出腐植溶液とした。

3 腐植酸の光学性および抽出腐植、腐植酸、フルボ酸炭素量の測定

2つの抽出処理で得られた抽出腐植溶液は、弘法・大羽法¹²⁾に準じて腐植酸、フルボ酸に分別した後、腐植酸については光学性、炭素量を、また抽出腐植、フルボ酸については炭素量を測定した。

4 抽出腐植の透析

A型腐植酸、P型腐植酸を含む土壌それぞれ3点、2点について、加熱抽出、振とう抽出で得られた抽出腐植溶液について分画分子量1000の透析膜(Spectrapor 6 MWCO 1000, Spectrum Medical Industries Inc.)を用い蒸留水に対し24時間透析を行ない、透析前後の腐植溶液について光学性を大羽・本名¹³⁾に準じて、炭素量をチューリン法で測定した。

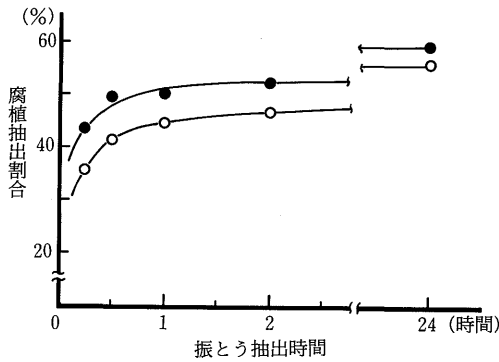
結果

1 振とう抽出条件

本実験に先立ち、振とう抽出条件（抽出温度、抽出時間）を決定するための予備実験を行なった。抽出温度を30°Cに設定し、振とう時間と抽出量との関係を見たところ、第1図に示したとおり、急速な抽出量の増加は1時間間まででそれ以降は著しい増加は認められず、24時間振とうの抽出量は2時間振とうの20%増にすぎなかった。24時間振とう後の抽出腐植量は加熱抽出時の80~90%であり、長時間振とうすれば加熱抽出に匹敵する量が得られるわけであるが、アルカリとの接触時間が長くなるほど腐植の特性に与える影響が大きくなることが認められたため、この点を考慮に入れ、しかもある程度の量が抽出される条件として振とう時間は1時間に設定した。抽出温度については、15~30°Cの間では1時間の振とうでは腐植の光学性、抽出量に殆ど変化が認められず、室温領域内では同質の腐植が同量抽出されることが確認された。なお、振とう振幅数も50~200往復/分の間では腐植の質、量に殆ど影響がみられなかった。以上の結果より、本実験の振とう抽出は30°C, 1時間, 100往復/分の条件で行なった。

2 抽出腐植量の変化

抽出温度がNaOH抽出腐植量に及ぼす影響をみると(第2表)、抽出割合(Ex.)が振とう抽出では高温加熱抽出



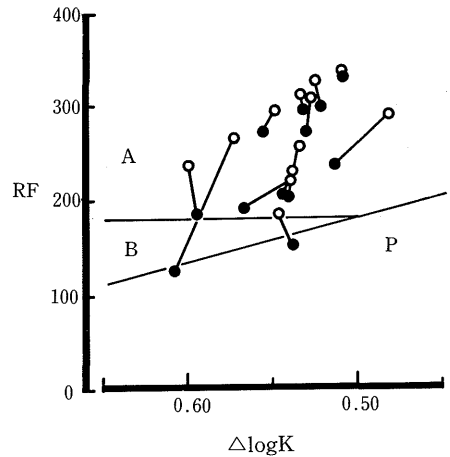
第1図 振とう時間と抽出量との関係 (30°C)

● A型腐植酸含有土壌 ○ P型腐植酸含有土壌

に比べてA型腐植酸を含む土壌で平均して約15%低下したのに対して、P型腐植酸を含む土壌で非常に大きく40%近く低下し、腐植化度の低い腐植は振とう抽出では抽出されにくくなることが認められた。なお、この変化と土壌の腐植含量との間には有為な関係は認められなかった。

3 腐植酸画分の変化

腐植の黒色はおもに腐植酸に起因する。腐植酸は抽出腐植から酸で沈殿する画分であり、沈殿しない画分がフルボ酸である。この腐植酸について加熱抽出が及ぼす影



第2図 NaOH加熱抽出が腐植酸の光学性におよぼす影響

○振とう抽出 ●加熱抽出

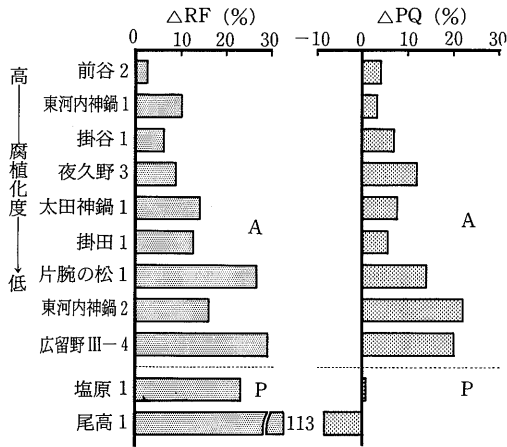
響を検討し、結果を第2表、第2図、第3図に示した。

加熱抽出、振とう抽出で得られた腐植酸の光学的特性を熊田による腐植酸区分図 (RF- $\Delta\log K$ 図)⁹⁾に表わした(第2図)。ここで、RFは腐植酸の黒色味の程度を、 $\Delta\log K$ は腐植酸の腐植化度、すなわち芳香環の重合度を評価する値であり¹⁰⁾、RFが大きく $\Delta\log K$ が小さいものほど腐植化が進行していると言える。室温条件で振とう抽出

第2表 腐植の形態 (弘法・大羽法)

試料名	層位	全炭素 (乾±%)	100°C 30分 加熱抽出					30°C 1時間 振とう抽出				
			Ex.	PQ	RF	$\Delta\log K$	type	Ex.	PQ	RF	$\Delta\log K$	type
前谷	2	11.23	83	87.9	330	0.510	A	77	91.3	338	0.510	A
東河内神鍋	1	20.57	69	82.8	298	0.522	A	56	85.6	328	0.525	A
掛谷	1	6.21	83	85.1	295	0.533	A	69	90.9	313	0.533	A
夜久野	3	5.26	69	72.4	272	0.556	A	62	81.2	296	0.548	A
太田神鍋	1	20.60	63	73.2	271	0.531	A	56	78.8	310	0.527	A
掛田	1	15.65	85	68.6	205	0.544	A	69	72.4	231	0.538	A
片腕の松	1	6.20	57	54.4	203	0.541	A	48	61.9	257	0.534	A
東河内神鍋	2	5.39	46	47.7	191	0.567	A	47	58.2	221	0.539	A
広留野III	4	3.02	77	32.9	184	0.595	A	62	39.6	237	0.599	A
塩原	1	12.03	57	51.5	151	0.538	P	39	51.8	186	0.546	A
尾高	1	4.04	54	54.9	125	0.608	P	24	50.1	266	0.572	A

Ex.=抽出割合(%), PQ=沈殿部割合, RF=相対色度(単位腐植酸あたりの600mmにおける吸光度), $\Delta\log K = \log A_{400} - \log A_{600}$ (A400, A600は腐植酸溶液の400, 600mmにおける吸光度), type=腐植酸の型(熊田¹¹⁾による)



第3図 NaOH抽出における腐植酸の特性変化と腐植化度との関係

$\Delta RF = (RF_{\text{振とう抽出}} - RF_{\text{加熱抽出}}) / RF_{\text{加熱抽出}}$
 $\Delta PQ = (PQ_{\text{振とう抽出}} - PQ_{\text{加熱抽出}}) / PQ_{\text{加熱抽出}}$

された腐植酸は加熱抽出と比較して全体的にRFが高く、 $\Delta \log K$ が低い傾向を示し、腐植化度が高くなることが認められた。また、同一の土壌より得られた腐植酸を線で結ぶと、その変化の大きさが線分の長さから知ることができ、腐植化度の低い腐植酸ほど加熱の影響で大きく特性を変えていることが認められた。特に、加熱抽出でP型と判定された腐植酸は振とう抽出によって大きく位置を変えてA型の領域に入ってきており腐植酸の形態分析

において無視できない変化をしていた。

次に抽出腐植溶液中に占める腐植酸の割合 (PQ) をみると(第3図)、振とう抽出の方が増加している傾向が認められた。PQが増加するということは、抽出腐植溶液中の腐植酸画分が増加しそれだけフルボ酸画分が減少していることを意味しており、加熱抽出では腐植酸の一部が分解してフルボ酸画分へ移行していることを示している。即ち、抽出腐植の組成が熱の影響によって変化していることを示している。そして、この変化はRF、 $\Delta \log K$ の変化と同様に腐植化度の低いものほど大きく、腐植化度の低い腐植酸はアルカリ性高温条件に対して不安定な構造を有していることが考えられた。なお、P型腐植酸においては、振とう抽出ではPQの増加が殆ど認められず逆に減少するものが認められたが、このことは、加熱抽出中にフルボ酸画分から腐植酸様物質が生成していることを示唆しており、条件下でのアルカリの腐植に対する影響はかなり多様であることが考えられた。

アルカリ抽出において加熱することが腐植酸に対して及ぼす影響は、おもに抽出腐植溶液中の腐植酸割合の減少、腐植酸の黒色調の低下というかたちで腐植化度の低いものに大きく表われやすいことが認められた。なお、加熱抽出によりフルボ酸のRFが大きく減少することも認められ、アルカリ加熱抽出は腐植全体に対して影響を及ぼしていることが明らかになった。

4 抽出腐植溶液の低分子量画分の変化

加熱による抽出腐植の変化の方向性を明確にするため

第3表 透析によるNaOH抽出腐植の特性の変化

試料名	層位	透析処理	100°C 30分 加熱抽出				30°C 1時間 振とう抽出			
			CD	$\Delta \log K$	C	CD/C	CD	$\Delta \log K$	C	CD/C
東河内神鍋	1	前	11.25	0.528	58.6	0.192	10.41	0.534	52.1	0.200
		後	10.83	0.527	53.9	0.201	9.98	0.534	49.6	0.201
夜久野	3	前	8.89	0.549	62.0	0.143	8.56	0.565	53.9	0.159
		後	8.40	0.546	53.3	0.158	8.21	0.566	50.2	0.164
東河内神鍋	2	前	3.63	0.635	56.0	0.065	3.31	0.618	40.5	0.082
		後	3.38	0.611	43.6	0.078	3.13	0.610	36.7	0.085
塩原	1	前	2.98	0.651	59.7	0.050	2.26	0.657	42.1	0.054
		後	2.66	0.631	43.3	0.062	2.11	0.647	33.4	0.063
尾高	1	前	2.17	0.638	33.4	0.065	2.11	0.645	25.3	0.083
		後	1.87	0.623	25.8	0.073	1.93	0.643	21.9	0.088

CD=抽出腐植溶液の600nmにおける吸光度(抽出原液換算)

$\Delta \log K = \log A_{400} - \log A_{600}$ (A400, A600は抽出腐植溶液の400, 600nmにおける吸光度)

C=抽出腐植溶液中の炭素量 (mg)

CD/C=CD÷C

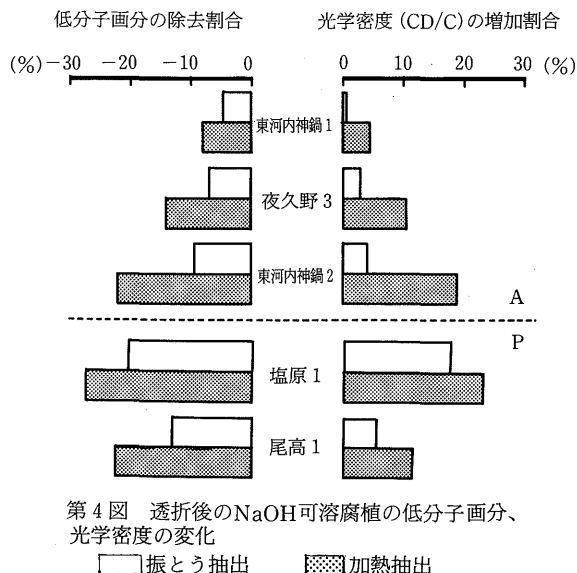
に、抽出腐植の低分子量領域（分子量1000以下）の変化を透析実験にて検討した。結果は第3表、第4図に示した。

第4図に示すとおり、A型腐植酸、P型腐植酸ともに加熱条件で低分子画分が大きく増加することが認められた。即ち、先にA型腐植酸において加熱抽出腐植のPQが低下することで認められたように、アルカリ加熱抽出中に腐植の一部が分解して低分子化していることが確認された。また、P型腐植酸において腐植酸様物質が人工的に合成されていることが示唆されたが、アルカリ加熱抽出下では分解反応が優勢に進行していることが考えられた。これらの変化はやはり腐植化度に対応しており、腐植化度の低いものほど熱の影響を強く受けて高い割合で低分子化した。

透析膜内に残存した腐植の光学密度すなわち単位炭素当たりの600nmでの吸光度（CD/C）は、もとの抽出腐植溶液よりも値が高くなり、高くなる割合は低分子画分が除去される割合に対応していた。

考 察

腐植の化学構造については未だその詳細は分かっていないが、腐植酸については芳香環を中心とする不均質な重縮合物質群であると推測されている⁷⁾。多くの腐植酸の構造モデルが提唱されているが^{1,2,5,6,8)}、それらに共通している点として、Kasatochkinら^{5,6)}が提唱しているモデルに代表されるように芳香環からなる縮合環を核としてその核に飽和あるいは不飽和の脂肪族性線形高分子（この中には芳香核、キノイド構造も含まれると考えられる）が結合しているということがあげられる。この腐植の化学構造は、腐植化の進行に伴って変化する。すなわち核と側鎖の比率、質的内容が変化し、米林¹⁴⁾は、腐植酸の化学構造は腐植化の進行にともない芳香族性が高まり、芳香環の縮合度が高くなり、側鎖炭素数が短くなることを述べている。また、引法・大羽¹⁰⁾も同様の見解を述べている。即ち、先に示した結果が腐植化度によく対応していたことは腐植の化学構造と関連性があると考えられる。腐植化度の低い腐植酸ほど熱により大きく特性を変えたのは、その構造中で側鎖に相当する部分が占める割合が大きく、おもにこの部分がアルカリと熱の相乗的な影響によって分解されたためと考えられる。加熱抽出におけるアルカリの作用機構、低分子化の動向については今後詳細な検討を要するところであるが、加熱抽出腐植酸が振とう抽出したものに比べて黒味調が低くなったことは、アルカリによって暗色出現に関与する共役二重結合系が



第4図 透析後のNaOH可溶腐植の低分子画分、光学密度の変化

□振とう抽出 ▨加熱抽出

多く分解され腐植酸全体としての π 電子密度が低下したことを物語っている。また、抽出腐植の透析残存腐植のCD/Cについて、加熱抽出が振とう抽出よりも高くなった現象は、暗色調の発現にあまり関与しない側鎖部位がより多く分解され低分子化して排除された結果、共役二重結合系に富む芳香族重縮合環すなわち核に相当する部分の密度がそれだけ高くなったためと思われる。

Neyroud and Schnitzer¹¹⁾は、2N-NaOH、170°C、3時間という非常に過激な条件で腐植酸、フルボ酸の加水分解を行ない、核の構成成分であるフェノール性化合物の分解とそれらに吸着していた脂肪族化合物、窒素化合物の放出を確認し、アルカリはおもにC—O結合の分解に作用しC—C結合によって結合している芳香環構造を分解するには至らないことを述べている。腐植酸の核に相当する部分へのアルカリの影響が、本実験で認められた腐植酸の変性にどの程度寄与しているかはわからないが、加熱抽出条件（100°C、30分間）またアルカリの濃度（0.5%NaOH）からみて、腐植酸の本質そのものを変えてしまうまでには至っていないと思われる。

振とう抽出での腐植抽出量の減少割合も腐植化度に対応しており、この点も腐植の構造と関連があると考えられる。土壌中で無機成分と結合し不溶化して集積している腐植が、腐植化度が低くなるほど常温で抽出されにくくなったことは、この無機成分との結合において側鎖部が大きく関与していることが原因の1つであると考えられるが、この詳細な可溶性機構については今後検討を要

する。

以上、腐植のアルカリ抽出において加熱抽出は振とう抽出に比べて腐植の特性に及ぼす影響が大きく、特に腐植化度の低いものほど熱に弱くその影響が光学性、抽出量に大きく表われることが認められた。そして、その影響はおもに構造の側鎖部が分解、低分子化を受けた結果表われていると考えられた。米林¹⁵⁾は種々の土壤型の腐植酸の特性について因子分析を行なった結果側鎖成分が高い因子負荷量を持つことを認め、腐植酸を特徴づける際まず側鎖部分に着目すべきであると述べている。アルカリ抽出はそれ自体が多少過激であり腐植を変性させることなく抽出しているとは言い難いが、土壤中に存在している形態をより反映させるためにも、アルカリ抽出は加熱を行わず室温条件で行なう方が望ましいと考えられた。本実験はA型腐植酸を含む黒ボク土を主体とし対照にP型腐植酸を含むものを用いたが、他の型の腐植酸を含む広範囲の土壤型についても検討することでアルカリ加熱抽出による腐植の変性の機構がより明らかになって行くものと思われる。

要 約

従来行なわれている腐植のアルカリ加熱抽出において加熱処理が腐植の特性に及ぼす影響をみるために、黒ボク土を供試し、加熱抽出(100°C, 30分)と振とう抽出(30°C, 1時間)で得られた腐植の特性を対比し検討した。得られた結果を要約すると次のとおりである。

1) 腐植抽出量は、振とう抽出では加熱抽出に比べA型腐植酸含有土壤で約15%、P型腐植酸含有土壤で約40%低下した。

2) 振とう抽出では加熱抽出に比べてRFが高く、 $\Delta \log K$ が低くなり、腐植化度の高い腐植が抽出された。

3) 抽出腐植溶液中に占める腐植酸の割合(PQ)は、振とう抽出によりA型腐植酸では増加し、P型腐植酸では逆に低下するものも認められた。

4) 加熱抽出により抽出腐植溶液中の低分子画分が大きく増加した。

5) 1)～4)の変化は、腐植化度の低い腐植ほど大きく表われた。

以上の結果より、アルカリ加熱抽出は、腐植を分解等の作用により低分子化する方向に変化させることが認められ、腐植化度の低いものほど熱に対して不安定であり特性を大きく変えやすいことが明らかになった。

文 献

- 1) Aiken, G. R., McKnight, D. M., Wershow, R. L. and MacCarthy, P. : Humic Substances in Soil, Sediment and Water. Geochemistry, Isolation. and Characterization. A Wiley-Interscience Publication, New York (1985) pp.329-362
- 2) Haworth, R. D. : The chemical nature of humic acid. *Soil Sci.*, 111 71-79 (1971)
- 3) 本田親史：各種土壤の腐植の特徴づけ。農業技術研究報告B第35号, 112-119 (1983)
- 4) 本田親史：新しい土壤腐植組成分析法の提案 1. 腐植の *in situ* な画分について。ペドロジスト, 28 26-37 (1983)
- 5) Kasatochikin, V. I. and Zil'berbland, O. I. : The application of X-ray and infrared spectroscopy to the structure of humus substances. *Pochvovnenie*, No. 5 80-85 (1956)
- 6) Kasatochikin, V. I., Kononova, M. M., Larina, N. K. and Egorova, O. I. : Thesis on "spectral and X-ray investigation of chemical structure of humic substances of soil." Trans. 8th. Intern. Congr. Soil Sci., Bucharest, Romania, III, (1964) pp.81-86
- 7) 熊田恭一：土壤有機物の化学 第2版。学会出版センター, 東京 (1981) pp.52-56
- 8) 熊田恭一：同上, pp.111-119
- 9) Kumada, K: Chemistry of soil organic matter. Japan science societies press, Tokyo(1987) pp.17-33
- 10) 弘法建三・大羽裕：火山灰土壤の有機物含量・炭素率および腐植の形態と土壤の風化度・母材との関係。土肥誌, 45 227-233 (1974)
- 11) Neyroud, J. A. and Schnitzer, M. : The alkaline hydrolysis of humic acid. *Geoderma*, 13 171-188 (1975)
- 12) 大羽裕：土壤腐植研究法II 弘法・大羽法。ペドロジスト, 8 108-116 (1964)
- 13) 大羽裕・本名俊正：黒ボク土判定のための腐植の分析法。土肥誌, 55 55-61 (1984)
- 14) 米林甲陽：生態系における腐植物質の化学構造と植物生育促進に関する研究。昭和62年度科学研究費補助金研究成果報告書, (1988) pp.3-29
- 15) 米林甲陽：同上, pp.30-38
- 16) 米林甲陽・久馬一剛・服部共生：有機・無機複合体より抽出した腐植酸の分子量別画分の性質, 土肥誌, 48 147-155 (1977)