

土壤中フミン酸の抽出・定量方法の検討

高坂英壺*・石塚眞治

Examination of extraction and determination method of humic acid

Hidekazu Kousaka* and Shinji Ishidzuka

(2007年11月30日受理)

Humus is mixture of organism which is made from carcasses of flora and fauna by biodegradation. Humic acid is an element of humus that doesn't dissolve to acid and dissolves to alkali. To raise ground strength when the building is constructed, cement might be added to the soil. However, strength doesn't rise because stiffening of cement is disturbed by humic acid in the soil. Then, the method of handily extracting and measuring the humic acid contained in the soil was examined in this study.

Unfortunately, organic solvent was not found which was able to be dissolved all of humic acid. Although it was found that humic acid was partly dissolved in polar organic solvents and never in nonpolar solvents.

It was thought that the pH of solution greatly took part in the dissolution of humic acid. The relation between the pH of solution and the dissolution of the humic acid was examined, amount of humic acid dissolves was proportional to the pH.

1. 緒言

1.1 フミン酸の性質¹⁾

土壤中に埋没した動植物の死骸が微生物によって分解された後に新たに形成された有機物を腐植という。腐植は土壤中に存在する有機質の大半を占め、黒褐色ないし黒色を呈する。この腐植物質は1826年にドイツの Sprengel により、酸にもアルカリにも溶解しないものは‘フミン’、アルカリにも酸にも溶解するものは‘フルボ酸’、アルカリに溶解して酸に溶解しないものは‘フミン酸’と分類された。²⁾

このため、フミン酸とは単一物質の名称ではなく混合物の総称である。また、フミン酸は構造的にはポリフェノールでありカルボキシル基を複数有している高分子化合物であることが判明している。¹⁾

1.2 フミン酸の作用³⁾

近年、土地を有効利用するために土壤改良の必要性が高まっている。土壤改良剤には石灰系材料が用いられる。石灰系材料はカルシウムを含んでおり、

カルシウムが水和することで硬化する。しかし、改良対象の土壤にはフミン酸が多く含まれている。フミン酸がカルシウムと反応すると、水に不溶のフミン酸カルシウムが生成することが知られている。

このフミン酸カルシウムは、石灰粒子の表面を覆って石灰の水和を阻害する。石灰系材料は水和を阻害されると硬化が起こらない。そのため、フミン酸を含む土壤に石灰系材料を添加しても期待通りの効果が現れない。そこで、土壤に含まれているフミン酸の量を知る必要がある。

1.3 現在日本で用いられているフミン酸の抽出・定量方法

現在、日本では以下に示す腐植の形態分析法が用いられている。⁴⁾

- (1) 有機態炭素の総量が約200mgに相当する風乾微細土を100ml 三角フラスコに入れる。
- (2) 三角フラスコに0.5%水酸化ナトリウム溶液あるいは0.1M ピロリン酸ナトリウム溶液60 mlを加え、湯浴で30分加熱振とうする。
- (3) 三角フラスコを流水で冷却したあと、7000 rpm 20分で遠心分離して上澄み液を得る。

* 秋田高専専攻科学生

上澄み液は二等分する。(上澄み液=浸出部
二等分した一方は浸出部として保存)

- (4) 一方の上澄み液に濃硫酸(上澄み液100ml に対して1 ml)を加え、ガラス棒で約30秒激しく掻き混ぜて1時間放置する。
- (5) 黒褐色の沈殿がほぼ完全に沈降した後に、小型のろうとを用いてろ過する。ろ液はフラスコに受ける。(フルボ酸部)
- (6) ろ紙上の沈殿を0.1%硫酸で洗浄したあと、50ml メスフラスコの上で0.1%水酸化ナトリウム溶液を少しずつ加えて完全に溶解させ、同溶液で定容とする。(フミン酸部)
- (7) 浸出部、フルボ酸部の一定量を100ml 三角フラスコにとり、0.1 N 過マンガン酸カリウム溶液12.5ml を正確に加える。
- (8) さらに4 N 硫酸5 ml を加え、蒸留水で全量を50ml とする。
- (9) 溶液の蒸発濃縮を防ぐために小型のろうとを三角フラスコの口に置き、15分湯浴する。
- (10) 湯浴から取り出したらすぐに0.1 N シュウ酸ナトリウム溶液12.5ml を正確に加える。
- (11) 2分間湯浴で温めて脱色させた後、0.1 N 過マンガン酸カリウム溶液を用いて液色が淡紅色になるまで滴定する。

分析結果

①沈殿部割合：浸出された腐植中でフミン酸が占める割合

$$\text{沈殿部割合} = (A - B) / A \times 100$$

ここで、

A：浸出部1 ml 当りの0.1 N 過マンガン酸カリウム溶液消費量 (ml)

B：フルボ酸部1 ml 当りの0.1 N 過マンガン酸カリウム溶液消費量 (ml)

である。

②腐植浸出割合：浸出された腐植の量が土壤試料に含まれていた割合

$$\text{腐植浸出割合} = (A \times H) / M \times L \times 100$$

ここで、

H：浸出部の全液量 (ml)

M：土壤試料に含まれる有機態炭素量 (mg)

L：0.1 N 過マンガン酸カリウム溶液1 ml に相当する腐植炭素の量 (mg)

である。

$$\text{フミン酸の量} = \text{土壤試料全量} \times \text{①} \times \text{②}$$

1.4 研究目的

1.3 に示した方法では、土壤試料に含まれている有機態炭素量が予めわかっていないと腐植の量を定量出来ない。

そこで、本研究では様々な条件下でのフミン酸の溶解挙動を調べ、未知試料に含まれるフミン酸をより簡便に定量できる抽出・定量方法を検討することを目的とした。

2. 実験

以下に初めに検討したフミン酸の抽出・定量方法を示す。

- (1) 試料10g をアルカリ溶液50ml 中で30分・100°C (10分に1回振とう) で加熱する。
- (2) 不溶物を取り除く。
- (3) 溶液に酸を加える。
- (4) 固体と液体を分離する。
- (5) 固体を有機溶媒に溶解させ、別容器に移す。
- (6) 溶媒を留去する。
- (7) 重量を測定し、定量する。

手順(1)、(2)は試料からフミン酸とフルボ酸を抽出することを目的とする。手順(3)は溶液からフミン酸を析出させることを目的とする。手順(4)はフルボ酸を除去することを目的とする。手順(5)はフミン酸と中和反応により生成する塩を分離することを目的とする。塩は有機溶媒には溶解しづらく水には易溶なので、フミン酸を有機溶媒に溶解させた後に水層を除くことでフミン酸と塩を分離できると考えた。

手順(1)のアルカリ溶液には、0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液、0.1 M アンモニア水、濃アンモニア水の3種類を使用した。アルカリ溶液50ml、土壤試料10g を用い、30分間100°C で抽出を行い抽出能力の違いを検討した。

手順(3)の酸には、塩酸を用い、溶液のpHが4になるまで加えた。

手順(5)の有機溶媒には、ヘキサン、ベンゼン、エーテル、THF、CH₂Cl₂、CHCl₃、CCl₄、ギ酸、酢酸、酢酸エチル、酢酸ブチル、メタノール、エタノール、イソプロパノール、フェノールの15種類を使用し、有機溶媒に対する溶解試験を試みた。溶解試験は、フミン酸0.005g に対して有機溶媒5 ml を用いて行った。

また、比較のため、土壤試料から抽出したフミン酸のほかに、市販のフミン酸(和光純薬工業製)も

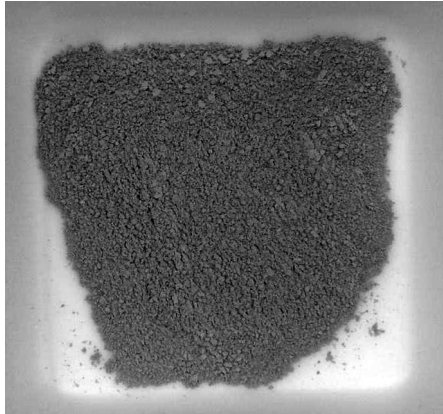


写真1 試料A：約700°Cで焼いた粘土

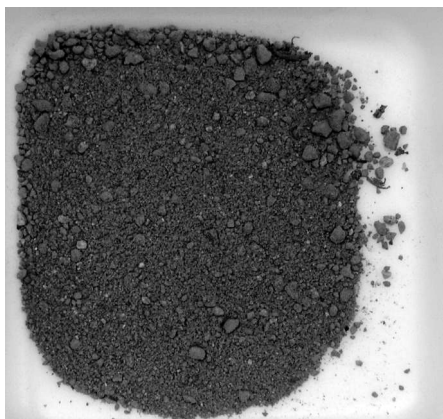


写真2 試料B：秋田市桜の造成地の土壌

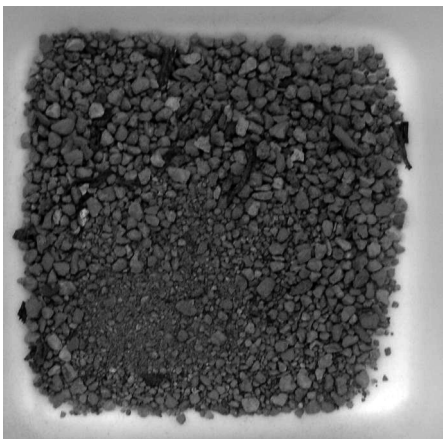


写真3 試料C：秋田市笠岡の道路予定地の土壌

溶解試験の対象とした。

本研究で用いた3種類の土壌試料を写真1～3に示す。

これらの試料は秋田高専環境都市工学科対馬研究室より提供していただいた。

3. 実験結果及び考察

3.1 アルカリ溶液の検討

手順(1)で使用した3種類のアルカリ溶液の抽出能力の違いを検討した。試料Bと3種類の同量のアルカリ溶液を用いて手順(2)までを行った様子を写真4に示す。

この写真から、0.1 M NaOH 水溶液が一番色が濃く、一番色が薄いのは0.1 M アンモニア水であることがわかる。

フミン酸は黒褐色ないしは黒色を呈することが知られている。¹⁾そのため、フミン酸の量が多いと溶液の色は黒色に近付くと考えられる。写真4の中で、最も溶液が黒色に近いのは0.1 M NaOH 水溶液である。このことから、0.1 M NaOH 水溶液が3種の中で最もフミン酸の抽出能力が高いと考えられる。

アンモニア水の抽出能力が低い原因の1つとして、次のことが考えられる。抽出の際に加熱を行っているので、アンモニアが気化して溶液中のアンモニア濃度が下がる。そのため、溶液のpHが低下する。それに比例してフミン酸の抽出量が減少したと考えられる。

以降の実験では手順(1)で0.1 M NaOH 水溶液で抽出した試料のみを使用した。

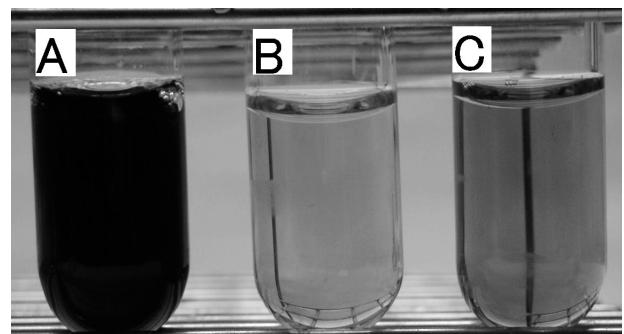


写真4 試料Bを用いて抽出を行ったアルカリ溶液

A：0.1 M NaOH 水溶液
B：0.1 M アンモニア水
C：濃アンモニア水



写真5 試料Aで抽出を行った直後の様子

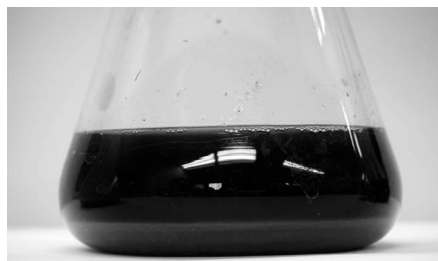


写真6 試料 B で抽出を行った直後の様子



写真8 試料 A を用いて手順 (2) まで終えた様子

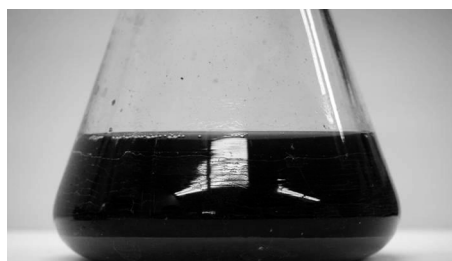


写真7 試料 C で抽出を行った直後の様子

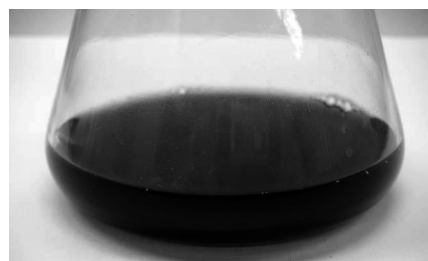


写真9 試料 B を用いて手順 (2) まで終えた様子

3.2 フミン酸とフルボ酸の抽出

0.1 M NaOH 水溶液を用いて、各土壌試料からフミン酸とフルボ酸を抽出した。その結果を写真5～7に示す。

抽出の結果、試料 A では溶液の色が黄褐色に、試料 B, C では黒褐色になった。また、不溶物は下に沈降し、溶液はすべて濁っていた。さらに、溶液の色が最も濃いのは試料 B であった。溶液の色の違いから、各試料に含まれるフミン酸の量は $B > C > A$ であると考えられる。

次に試料から不溶物を取り除くためにろ紙を用いて吸引ろ過を行い、不溶物の除去を試みた。しかし、吸引ろ過ではろ液に若干の濁りが残った。濁っているということは、微粒子が試料中に存在していることを示している。

そのため、ろ過後さらに4000rpm 30分で遠心分離を行い、溶液中の微粒子を除去した。その結果を写真8～10に示す。これらの写真から、溶液の濁りが完全になくなり、不溶物が完全に除去できたことがわかる。

3.3 フルボ酸の除去

次に、各溶液に塩酸を加えて pH4 にした。加えた直後、A 溶液では肉眼で観察できる変化は見られなかった。一方 B と C の溶液は褐色に濁った。酸性にすることで析出したのはフミン酸であると考え、これを完全に析出させるために19時間静置した。

静置した後は A 溶液にも若干の褐色の沈殿が観



写真10 試料 C を用いて手順 (2) まで終えた様子

察できた。また、B と C の溶液では沈降がはっきり確認できるだけの沈殿が析出した。なお、19時間以上静置しても析出量の増加は肉眼では観察できなかった。

析出の様子から、試料 A に含まれているフミン酸は微量であることがわかった。また、試料 B と C にはある程度のフミン酸が含まれていることが確認できた。さらに、フミン酸の含有量は B が一番多いことが確認できた。

最後に、フミン酸沈殿を取り出すために遠心分離を4000rpm・30分を行い、溶液と沈殿を分離した。

3.4 有機溶媒の検討

次に、16種類の有機溶媒を用いて、試料 A～C から抽出したフミン酸と、試料 D として市販のフミン酸（和光純薬工業製）の溶解試験を行った。その結果を表1に示す。

表1からわかるように、ヘキサン、ベンゼン、エーテル、ハロゲン系溶媒にはどの試料もまったく溶解

表1 有機溶媒に対する溶解試験の結果

有機溶媒	試料 A	試料 B	試料 C	試料 D
ヘキサン	×	×	×	×
ベンゼン	×	×	×	×
エーテル	×	×	×	×
CH ₂ Cl ₂	×	×	×	×
CHCl ₃	×	×	×	×
CCl ₄	×	×	×	×
酢酸ブチル	○	○	○	○
酢酸エチル	○	○	○	○
酢酸	○	○	○	○
THF	○	◎	◎	△
フェノール	○	○	○	○
イソプロパノール	○	○	○	○
エタノール	○	○	○	○
メタノール	○	○	○	○
ギ酸	○	○	○	○

○：常温で一部が溶解，加熱による変化はなし
 ◎：常温で一部が溶解，加熱すると溶解量が増加
 △：常温で不溶，加熱すると一部が溶解
 ×：常温で不溶，加熱しても変化なし

しなかった。また、THF、カルボン酸、酢酸エステル、アルコール類、フェノールには一部溶解したが、全量を溶解させる溶媒は発見できなかった。

化合物には極性効果というものがある。これは、分子内に電気双極子を持つことで化合物に現れる影響のことを言う。電気双極子は、分子の成分原子間の電気陰性度差によって電荷が偏り、分極すると生じる。また、CCl₄は分子内に極性結合を持っているが、完全対称な分子なので分子全体では電気双極子を持たない。極性効果を有する化合物を極性化合物といい、それを溶媒として用いる場合は、極性溶媒という。一般に、極性溶媒は極性化合物を溶かしやすいとされる。これは、溶質-溶媒間で強い双極子-双極子による力や水素結合などにより溶液状態が安定化するためである。⁵⁾

上記の性質より、フミン酸が溶解した溶媒はフミン酸と極性がある程度近いと考えることができる。

また、表1は誘電率から予想される極性の低い分子から高い分子の順に並べてある。表1の結果から、フミン酸が溶解しなかった溶媒が上、溶解した溶媒が下に集中している。そのため、フミン酸の極性はある程度高いと考えることができる。

一般に、構造が似ている化合物は極性も似通うとされる。逆に見ると、極性が似ている化合物は構造も似ていると考えられる。この点より、抽出したフ

ミン酸の構造について考えてみる。本実験に用いたフミン酸は、エステルやアルコールに一部が溶解しているの、それらと構造が似ていると考える。つまり、フミン酸がカルボキシル基やヒドロキシル基を持っていると考えられる。同様に、フェノールに対する溶解よりポリフェノール構造を有していると考えられる。実際に、フミン酸はポリフェノール構造にカルボキシル基やヒドロキシル基を複数有している混合物だと知られている。¹⁾

また、エーテルに溶解せずTHFに溶解したのは、直鎖構造と環状構造の差に由来すると見ることができる。そのためフミン酸は環構造を有しているが、直鎖のエーテル結合は含まない可能性がある。

3.5 濃アンモニア水の検討

2章で示した方法では、完全にフミン酸沈殿を溶解させる溶媒が無くてはフミン酸を取り出すことができない。そこで、フミン酸をよく溶解し、蒸発により取り除ける濃アンモニア水を有機溶媒の代わりに使用することにした。

各試料から抽出したフミン酸0.005gに、濃アンモニア水を5ml加えた結果を写真11~13に示す。溶液の色が濃いため写真ではわかりにくいだが、フミン酸の全量が濃アンモニア水に溶解した。

フミン酸を完全に溶解できる溶媒が見つかったので、次にフミン酸に含まれる塩を分離する方法を考えた。水はフミン酸を溶解しにくい塩を溶解しやすい。そこで、蒸留水で抽出フミン酸を洗浄することにした。まず、フミン酸のアンモニア水溶液を加熱して溶媒を蒸発させてフミン酸沈殿を取り出した。次に、抽出したフミン酸0.005gに蒸留水を30ml加えて攪拌すると、フミン酸は溶解はしなかったが一部が溶液中で浮遊した。そのため、洗浄に用いた水を除去するためにデカンテーションを試みたが、水を完全に除去することはできなかった。残った水は加熱・蒸発してフミン酸を得た。

今回の実験では、加えた蒸留水は30mlだが、そのうちデカンテーションで除去できたのは5~10mlである。つまり、塩が溶解していた場合、除去できた塩は3分の1から6分の1、つまり半分未満ということになるので、解決が望まれる。

これを解決する方法が、2つ考えられる。

1つ目はデカンテーションの回数を増やすことである。デカンテーションを終えたら再度水を加え、攪拌と静置を行う。そしてまたデカンテーションを行う。回数が増えるほど一度に除去できる塩の量は減っていくが合計除去量は増加する。

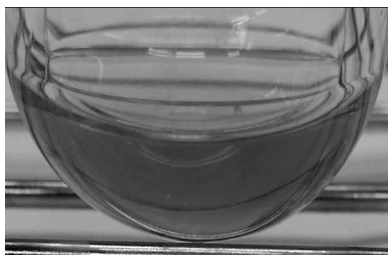


写真11 試料 A から抽出したフミン酸のアンモニア水に対する溶解試験

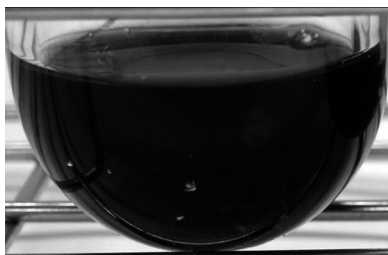


写真12 試料 B から抽出したフミン酸のアンモニア水に対する溶解試験

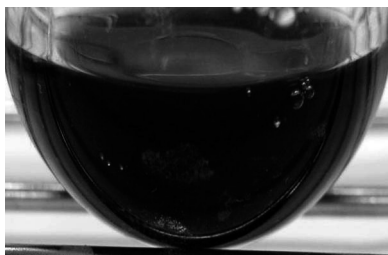


写真13 試料 C から抽出したフミン酸のアンモニア水に対する溶解試験

2つ目は蒸留水を加えて攪拌した後、デカンテーションを行う前に静置する時間を増やすことである。その後、溶液を蒸発させると、フミン酸と考えられる褐色沈殿のみが残った。

4. 溶液の pH とフミン酸の溶解の関係

3.1 より、手順 (1) で用いた 3 種のアルカリ溶液は、フミン酸の抽出量に差があった。この差が生じた理由として、溶液の pH が異なっていたことがあげられる。そこで、溶液の pH とフミン酸の溶解にどのような関係があるかを調べた。

実験は市販フミン酸（試料 D）と Briton-Robinson 緩衝溶液を用いて行った。Briton-Robinson 緩衝溶液の緩衝能の有効範囲が 12.2~2.0 であるためと、pH 2.0~4.0 の酸性領域においてはフミン酸の溶解がほとんど起こらないという性質よ

り、実験の pH 範囲は pH 12~4 とし、pH 12 以上と pH 4 以下の実験は行わなかった。

4.1 pH 別のフミン酸の溶解量

pH の違いによって、フミン酸が溶解する量にどの程度の差が出るのかを調べた。

- (1) 25ml の Briton-Robinson 緩衝溶液に試料 D を 5 mg 加えて 25℃ で 3 分間攪拌した。
- (2) 24 時間静置した後、遠心分離（4000 rpm・30 分）で溶液と試料の溶け残りを分離した。
- (3) 溶け残り と 加えた試料の重量差から溶解した量を測定した。

これらの手順を、8 通りの pH で行った結果を図 1 に示す。

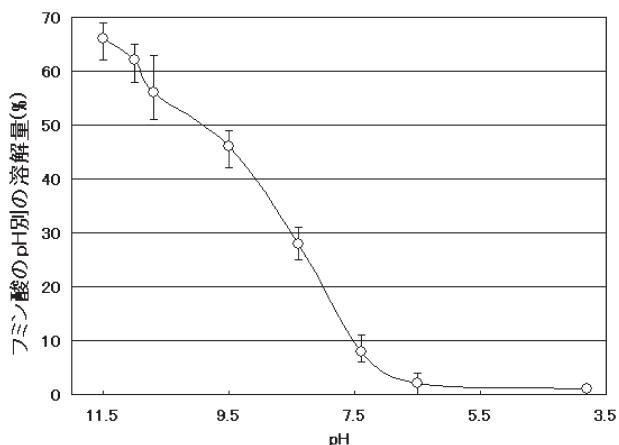


図 1 フミン酸の pH 別の溶解量

図 1 より、フミン酸が溶解する割合は pH が高いほど大きく、pH が低いほど小さいことがわかる。また、pH 約 6~9 において溶解量は大きく上昇しているが、pH 約 9 以上では溶解量の上昇を描くカーブは緩やかである。これを延長すると、pH 12~14 におけるフミン酸の pH 別の溶解量は、最大約 70 % になると予想される。

4.2 フミン酸を加えることによる pH の変化

緩衝溶液にフミン酸を徐々に加えていき、どこまで一定の pH を保つかを調べた。

- (1) 25ml の Briton-Robinson 緩衝溶液に試料 D を 5 mg 加えて攪拌した。
- (2) 10 分後、pH 変化が見られなければ試料 D を約 0.3mg 追加して攪拌した。

以降、(2) の作業を繰り返し行い、pH が 0.01 低下した時点を終点とした。

これらの手順を、8 通りの pH で行った結果を図

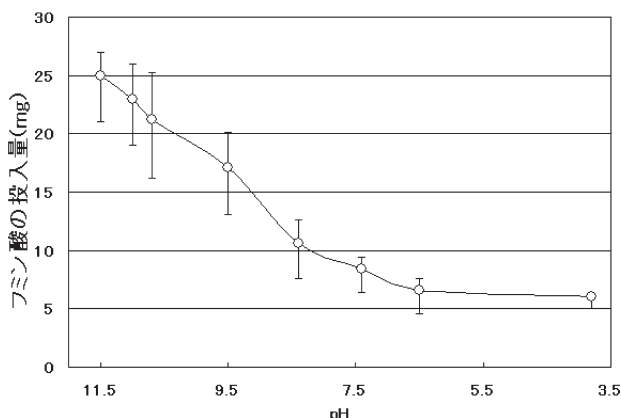


図2 一定 pH に対するフミン酸の投入量

2 に示す。溶液温度は25°Cで実験を行った。

図2より、pHが高いほど一定pHを保つ能力が高く、pHが低いほど一定pHを保てないことがわかる。また、pH 3.5~7.5程度まではフミン酸を加えてすぐにpH変化が起こっているが、pH約8以降では一定pHを保てるフミン酸の量が大きく変化している。そしてpH約8以降では一定pHを保てるフミン酸の量は、ある程度pHに比例している。pH 12以上でも同様に比例すると考えると、pH約14において、フミン酸を30mg程度まで追加しても溶液はpHを一定に保つことができると考えられる。

5. 結言

本研究により次のことがわかった。フミン酸を完全に溶解できる有機溶媒は見出せなかった。しかし、極性有機溶媒に対して溶解しやすく、無極性溶媒にはほとんど溶解しないことがわかった。また水溶液に対する溶解の挙動は、pHが高いほどフミン酸を溶解しやすく、酸性でもpH 6程度であれば微量のフミン酸が溶解することも明らかになった。

以上の結果を踏まえて、本研究は次のフミン酸の抽出・定量方法を提案する。

- (1) 試料10gを0.1M水酸化ナトリウム水溶液50ml中で10分に一度振とうしながら30分加熱して、

フミン酸とフルボ酸を抽出する。

- (2) 吸引ろ過で不溶物の大半を取り除いた後、遠心分離で微粒子を取り除いてフミン酸とフルボ酸の溶液を得る。
- (3) 溶液に塩酸を加えてフミン酸を析出させる。
- (4) 遠心分離で沈殿と溶液を分離してフルボ酸を取り除く。
- (5) フミン酸を濃アンモニア水に溶解させる。
- (6) 溶液をフラスコに移した後、溶媒を完全に蒸発させる。
- (7) 蒸留水を30ml加えて攪拌して塩を溶解させる。
- (8) 水溶液をデカンテーションで可能な限り除去する。
- (9) 残った水溶液を完全に蒸発させる。
- (10) 重量を測定し、定量する。

謝辞

本研究は環境都市工学科対馬雅己教授に提供して頂いた土壤試料が不可欠なものでありました。深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 化学大辞典編集委員会編，“化学大辞典 7，縮刷版”，共立出版株式会社（2001），pp.926-927
- 2) 山根一郎著，“改訂新版 土壌学の基礎と応用，改訂第15版”，社団法人農山漁村文化協会（1981），pp.35
- 3) アーウィン系セメントの水和に及ぼす土壤中のフミン酸の影響，内田清彦・福林幸雄・山下純成編，セメント・コンクリート論文集，vol.39，pp.486-489（1985）
- 4) 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻，東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻編，“実験応用生命化学，初版”，株式会社朝倉書店（2000），pp.31
- 5) 化学大辞典編集委員会編，“化学大辞典 2，縮刷版”，共立出版株式会社（2001），pp.875-876