

水田土壌中のアルコールの定量法

久保田正亜・大和田広一・浅見輝男

1. 緒 言

水田土壌は稲作期間中、田面水により酸素の供給が制限され、土壌中の易分解性有機物の分解とともに還元状態が発達する。土壌微生物はこのような土壌中の変化に深く関与しており、¹⁾種々の代謝産物を生成していると考えられる。有機酸に関しては、作物に対する有害性とも関連して比較的多く研究^{2~8)}が行われてきたが、水田土壌中で生成される可能性の大きいアルコールについては、ほとんど研究が行われていない⁹⁾。そこで水田土壌中における物質変化を明らかにする研究の一環として水田土壌中のアルコールの定量法を検討したので報告する。

2. 試料, 試薬, 機器および分析条件

1) 土壌

土壌は鴻巣市にあった農林水産省農事試験場水田のうち有機質肥料連用区水田土壌および無機質肥料連用区水田土壌の表土を用いた。土壌は1978年6月に採取した風乾細土を用いた。

2) 試薬

メタノール, エタノール, n-プロパノール, iso-プロパノール, n-ブタノール, iso-ブタノールは純正化学K K製特級試薬, 硫酸マグネシウム, 塩化カリウム, 硫酸第一鉄は和光純薬K K製特級試薬, 塩化アルミニウム, 塩化カルシウム, 塩化マンガンは純正化学K K製一級試薬を用いた。

3) 機器

ガスクロマトグラフはK K島津製作所製, 4BPFT型を用いた。

4) 分析条件

カラム充てん剤は多孔質ポリマービーズのTENAX

GC, 60~80メッシュを1mガラスカラムに充てんして用いた。本品は水溶液試料の分析が可能であり, 2,3-ブタンジオール定量の際に使用した物と同じである。温度等の条件は検討の結果, 第1表のように設定した。内部標準物質はメタノールを用いた。

第1表 分析条件

カラム	ガラス 1m × 0.4cm
充てん剤	TENAX GC, 60-80メッシュ
温度	カラム: 60-160℃, 5℃/min 昇温 試料室: 200℃ 検出器: 200℃
検出器	水素炎イオン化検出器
キャリアガス	窒素 40ml/min

3. 結果と考察

ガスクロマトグラフによるアルコール定量に際しては、ピーク面積より濃度を算出するのが常法であるが、ピークの高さと濃度の間に比例関係が認められたので以下の実験においてピークの高さより濃度を求めた。

1) 試料溶液のpHの影響

土壌中の成分を定量するには、まずその成分を土壌より抽出しなければならない。より完全に抽出するために抽出剤等抽出条件の検討が必要である。各種抽出剤の検討を行う上で試料溶液のpHの影響を検討することがまず必要と考え検討を行った。

pHを変えた低級アルコールの100μg/ml溶液(内部標準物質のメタノールを含む)を作り、ガスクロマトグラフによって低級アルコールの定量を行ったところ、各低級

アルコールとも pH 1~13 の範囲でほぼ一定の値が得られた。したがって定量の際の pH 調査は不要であると考えられた。

2) 共存イオンの影響

土壌中には Mg, Al, K, Ca, Mn, Fe, Cu のような多種多量の元素が存在しており、アルコールを抽出する際に同時に抽出される可能性がある。そこでこれら共存イオンがアルコールの定量に及ぼす影響について検討を行った。

試料溶液はこれらの元素 1000 µg/ml の溶液と各アルコールの 1000 µg/ml 溶液それぞれ 10ml と内部標準物質

のメタノール溶液を加え 100ml とした。最終濃度は共存イオンが 1000 µg/ml, 低級アルコールが 100 µg/ml である。この試料 2 µl を前記条件下のガスクロマトグラフに注入し、分析を行った。

結果を第2表に示した。回収率はエタノールで 100~104%, n-プロパノールで 98~103%, iso-プロパノールで 97~101%, n-ブタノール 97~105%, iso-ブタノールで 97~105% であり、元素によって特に定量に影響があるとは考えられない。したがってこれらの元素の共存はアルコールの定量に影響しないと考える。

第2表 共存イオンの影響

共存イオン	添加量 µg	回収率 (%)				
		エタノール	n-プロパノール	iso-プロパノール	n-ブタノール	iso-ブタノール
—	—	100	100	100	100	100
Mg ²⁺ (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	1000	102	101	99	97	100
Al ³⁺ (AlCl ₃ ·6H ₂ O)	1000	103	103	101	105	103
K ⁺ (KCl)	1000	102	100	99	102	99
Ca ²⁺ (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	1000	102	100	99	102	99
Mn ²⁺ (MnCl ₂ ·4H ₂ O)	1000	104	101	101	103	105
Fe ²⁺ (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	1000	100	98	97	97	98
Cu ²⁺ (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	1000	102	98	98	101	97

3) 抽出剤の検討

水田土壌中の有機酸の抽出剤として瀧島¹⁰⁾、山根ら¹¹⁾は 0.5 N 硫酸を提案した。筆者の一人久保田はアセトイン¹²⁾、2,3-ブタンジオールの定量¹³⁾の際、水抽出、1 N 塩化カリウム抽出、1 N 硫酸抽出で検討した。その結果三者において、大差がなかった。低級アルコールの抽出においても、アセトイン、2,3-ブタンジオールの場合と同様、水、1 N 塩化カリウムおよび 1 N 硫酸を用いて検討した。

水田作土風乾細土 10g を管ビン(径 25mm, 高さ 120mm)に秤取し、1000 µg/ml のアルコール混合液を 1ml と水 6.5ml を加え 4℃ で 3 時間静置した。抽出剤として水、

1 N 塩化カリウムおよび 1 N 硫酸を 7.5ml ずつ添加し、水平振とう機で 5 分間振とうの後、5000 r.p.m. で 20 分間遠心分離を行い上澄液を得た。この上澄液の塩化カリウムおよび硫酸の濃度はほぼ 0.5 N となる。この上澄液の一部を小試験管に取り、内部標準物質を加えた後ガスクロマトグラフを用いてアルコールの定量を行った。

第3表にエタノールと n-ブタノールについて示した。二土壌において各抽出剤による相違はほとんどない。したがって低級アルコールの抽出剤はアセトイン、2,3-ブタンジオールと同様、水でよいと考える。以下の実験はすべて水抽出で行った。

第3表 抽出剤の検討

土 壤	抽出剤	アルコール濃度(μg/ml)	
		エタノール	n-ブタノール
鴻巣有機	H ₂ O	64.9	64.9
質肥料連用	1N-KCl	66.8	64.9
区水田土壌	1N-H ₂ SO ₄	64.0	63.4
鴻巣無機	H ₂ O	66.6	65.0
質肥料連用	1N-KCl	65.5	64.2
区水田土壌	1N-H ₂ SO ₄	67.4	65.0

4) 繰り返し測定

以上の結果からガスクロマトグラフによる水田土壌中の低級アルコールの定量が可能になった。そこでこの方法による繰り返し測定を行った。操作は3)に準じて行った。

無機質肥料連用区土壌の結果を第4表に示した。

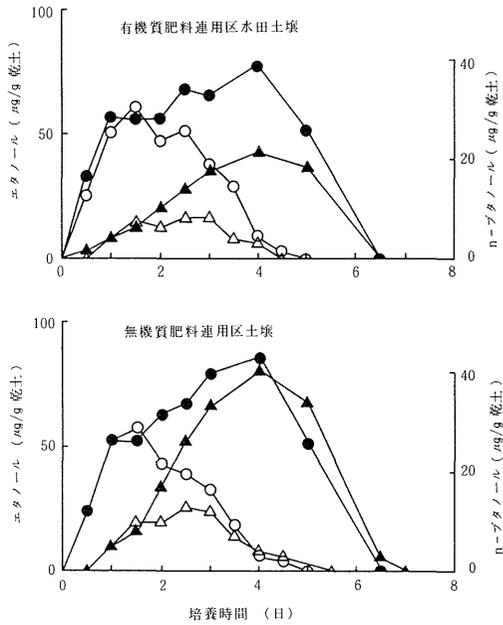
第4表 繰り返し測定

アルコール	μg/g 乾土	C.V. %
エタノール	102.1 ± 2.1	2.1
n-プロパノール	100.2 ± 2.3	2.3
iso-プロパノール	98.8 ± 1.5	1.5
n-ブタノール	99.1 ± 2.0	2.0
iso-ブタノール	97.8 ± 4.3	4.4

添加量 100 μg/g 乾土に対し約 98~102 μg/g 乾土であった。有機質肥料連用区土壌の結果もほぼ同様であり、満足しうるものであった。

5) 水田土壌中における低級アルコールの生成

水田土壌風乾細土10gを注射筒に秤取し、グルコースを土壌当り0.5%または1%になるように加え、さらに水を加え、添加総液量を15mlとした。気層を除いて30℃で保温静置した。経時的にこれを取り出し低級アルコールの定量を行った。



第1図 水田土壌中における低級アルコールの生成

- : エタノール (0.5% グルコース添加)
- : " (1% ")
- △ : n-ブタノール(0.5% ")
- ▲ : " (1% ")

結果を第1図に示した。検出されたアルコールはいずれの土壌でもエタノールとn-ブタノールであった。エタノールの生成はn-ブタノールの生成に比べ早く、初期生成速度はグルコースの添加量に影響されないようである。生成量の最大となる時間はグルコースの添加量が増加すると遅れるようである。しかし土壌中でのアルコールの存在量は生成量とは異なるのが普通である。土壌中には多様な微生物が生息しており、これらによりアルコールが生成される一方、他の微生物によって資化されていると考えられるので、生成量は資化量+存在量であり、上記の結果は見かけの生成量で真の生成量は土壌中の存在量よりも多いと考えられる。

4. 要 約

水田土壌中の低級アルコールの定量法をガスクロマトグラフを用い検討し、以下のように確立した。

水田土壌に水を加え5分間振とうした後、5000 r.p.m.で20分間遠心分離を行い上澄液を得る。この一部に内部標準物質を加え、これをTENAX GCを充てんした1mガラスカラムを接続したガスクロマトグラフを用い、水素炎イオン化検出器で5℃/min昇温分析を行う。あらかじめ作成した標準曲線から含有量を求め、土壌水分で補正し、乾土当りμgで表示する。

5. 文 献

- 1) 高井康雄：農業技術，**16**，1(1961)
- 2) 高井康雄・小山忠二郎・加村嵩雄：土肥誌，**26**，509(1956)
- 3) Yamane, I. and K. Sato : Soil Sci. Plant Nutri., **13**, 173 (1966)
- 4) Yamane, I. and K. Sato : Rep. Inst. Agri. Res. Tohoku Univ., **21**, 79 (1970)
- 5) 後藤重義・鬼鞍豊：九州農試彙，**14**，173(1969)
- 6) 後藤重義：九州農試彙，**15**，485(1970)
- 7) 藤井国博・小林達治・高橋英一：土肥誌，**43**，127(1972)
- 8) Chandrasparan, S. and T. Yoshida : Soil Sci. Plant Nutri., **9**，65(1973)
- 9) Wang, T.S.C., Yang, T.K. and T.T. Chuan : Soil Sci., **104**，40(1967)
- 10) 瀧島康夫：土肥誌，**31**，435(1960)
- 11) 山根一郎・佐藤和夫：土肥誌，**37**，326(1963)
- 12) 久保田正亜：土肥誌，**48**，302(1977)
- 13) 久保田正亜：土肥誌，**49**，71(1978)

Determination of Alcohols in Paddy Soils

MASATSUGU KUBOTA, KŌICHI ŌWADA and TERUO ASAMI

Gas chromatographic determination of alcohols in paddy soils was investigated. After studying the effects of sample pH, coexisting ions, and the reagents on alcohol determination, the following method was established. Ten grams of soil were shaken with 15ml of distilled water, and then centrifuged at 5000rpm for 20min. An internal standard was added to the supernatant solution. Two microliters of this solution were injected into a gas chromatograph equipped with a glass column packed with TENAX GC, and a flame ionization detector.

(Sci. Rep. Fac. Agr. Ibaraki Univ., No.36, 59~62, 1988)