Bestimmung der funktionellen Gruppen von Huminstoffen

Von *F. Martin**), *P. Dubach*, *N. C. Mehta* und *H. Deuel* †

Aus dem Agrikulturchemischen Institut der
Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich

(Eingegangen: 30. 5. 1963)

Einleitung

Mit der Analyse der funktionellen Gruppen von Huminstoffen aus Böden haben sich nur wenige Forscher beschäftigt. In der Literatur finden sich viele Hinweise, jedoch wenige Beweise für das Vorkommen fast aller sauerstoffhaltigen Gruppen (Karboxylgruppen; chinoide-, phenolische-, enolische- und alkoholische Hydroxylgruppen; Karbonylgruppen und Äthergruppen). Es bestehen nicht nur Meinungsverschiedenheiten über die Menge der einzelnen Gruppen, sondern auch über deren Existenz. Weil für Huminstoffe praktisch keine Reinheitskriterien bestehen, sind größere Unstimmigkeiten zu erwarten, besonders, wenn Huminstoffe verschiedener Böden untersucht werden. Allerdings wurden neulich auch bei der Analyse sehr ähnlicher Fulvosäurepräparate durch verschiedene Forscher (29, 36) völlig andere Resultate erzielt. Während im einen Fall 9 mäßige Karboxylgruppen pro g bestimmt wurden (35, 36), führte die Analyse im anderen Fall zu Zweifeln an der Existenz von Karboxylgruppen (29). Schwierigkeiten müssen deshalb auch auf die Natur der Huminstoffe zurückzuführen sein: hochmolekularer Charakter (28) (unvollständige Reaktionen, Adsorption von Reagenzien); extreme Polydispersität (unerwünschte Fraktionierungen beim Aufarbeiten von Reaktionsgemischen); Empfindlichkeit (28; 31, S. 58—61) gegenüber Alkali sowie Alkali und Säure bei erhöhter Temperatur (verunmöglicht viele Reaktionen, z. B. quantitative Verseifung); Nebeneinander vieler und offenbar verschiedener Gruppen (verändert die Reaktivität der Gruppen, vermindert die Spezifität der Reagenzien).

Die meisten Untersuchungen galten der Säurenatur der Huminstoffe. Dazu wurden die folgenden Methoden angewendet: Titrationsen im wässrigen und nicht wässrigen Milieu (10, 11, 29, 30, 36), Titrationsen in Gegenwart mehrwertiger Kationen (Studium der Chelatbildung) (3, 20, 26), Reaktion mit

*) Dipl.-Chem. *F. Martin*, Universitätsstraße 2, Zürich/Schweiz.

Ba(OH)₂ (für totale Azidität) (33, 36), Reaktion mit Ca-Azetat und KI/KIO₃ sowie Dekarboxylierung (für Karboxylgruppen) (33, 36), Reaktion mit Azetanhydrid und Dinitrofluorbenzol (für Hydroxylgruppen) (14, 16, 19, 29, 36), Methylierungen und Verseifungen (Unterscheidung von Karboxyl- und phenolischen und alkoholischen Hydroxylgruppen (4, 18, 19, 21). Die Azidität der Huminstoffe wurde in der Folge allen möglichen aziden Gruppen zugeschrieben: Karboxyl- (4), Hydroxychinon- (14, 24), phenolischen Hydroxyl- (24, 29), und enolischen Hydroxylgruppen (19, 29). Da sich die pK-Werte dieser Gruppen überschneiden können — 2,5-Dihydroxychinon ist eine stärkere Säure als Essigsäure (14) — ist eine genaue Unterscheidung mit den aufgezählten Methoden, welche mit Ausnahme der unspezifischen Dekarboxylierung, pK-abhängig sind, nicht möglich. Hinzu kommt, daß auch die pK-Werte individueller Gruppen, wegen dem polybasischen Aziditäts-Charakter der Huminstoffe, verschieden sein müssen (11). Dies sollte auch berücksichtigt werden bei allen Versuchen und Überlegungen über die Fähigkeit der Huminstoffe, mehrwertige Kationen stark, evtl. als Chelate, zu binden (31, S. 77—81, 20). Es wurde nämlich gezeigt, daß z. B. Polyacrylsäure Cu⁺⁺ stärker bindet als die analoge monomere Essigsäure und Glutarsäure (10).

Zuerst muß also die Anwesenheit oder Abwesenheit individueller azider Gruppen mit vom pK-Wert unabhängigen Methoden gezeigt werden. Dies gelang bis jetzt einzig für Karboxylgruppen (13, 23, 32), mit Hilfe der IR-Spektroskopie (Verschiebung der Karbonylabsorption bei der Salzbildung). Die wiederholt beobachtete reversible Aufhellung von Huminstoff-Lösungen bei Behandlung mit Reduktionsmitteln (13, 37) könnte auf chinoiden Charakter weisen, welcher allerdings durch reduktive Azetylierung nicht bestätigt werden konnte (13, 32). Bei der Bestimmung der Karbonylgruppen in Huminstoffen mit Hydroxylamin und Dinitrophenylhydrazin wurden unerwartet kleine Werte (um 1—2 mäg/g) erhalten (14, 29, 36); Reaktion mit NaBH₄ (29) hingegen ergab unwahrscheinlich hohe Werte (14 mäg/g). Beim Lignin konnte diese Unstimmigkeit mit der Anwesenheit von Schwermetallen erklärt und durch Ausschluß des Luftsauerstoffs behoben werden (27). Huminstoffe lassen sich halogenieren, was auf aromatische oder andere ungesättigte Strukturen weist. Wegen der leichten Oxydierbarkeit der Huminstoffe ließen sich die Doppelbindungen nicht durch Bromanlagerung bestimmen (9, 29).

Das neuartige Reduktionsmittel Diboran schien, wegen seiner besonderen Reaktionsweise mit fast allen sauerstoffhaltigen (und auch anderen) Gruppen und Doppelbindungen sowie wegen seiner geringen Molekülgröße (keine sterische Hinderung) geeignet, die Analyse der funktionellen Gruppen von Huminstoffen auf anderer Basis und unabhängig von pK-Werten zu ermöglichen. Dieses Reagens wurde bis jetzt hauptsächlich für präparative und weniger für analytische Zwecke verwendet (5, 6).

Diboran reagiert in inerten Lösungsmitteln (z. B. Tetrahydrofuran = THF) mit den hier interessierenden Gruppen organischer Verbindungen in folgender

Weise: Karboxyl- und Hydroxylgruppen entwickeln sofort je ein Mol Wasserstoff pro Gruppe, welcher als aktiver Wasserstoff gemessen werden kann. Karboxylgruppen sowie Carbonylgruppen (keine H_2 -Entwicklung) werden in dieser Reihenfolge sehr rasch zu den entsprechenden Alkoholgruppen reduziert. Ester und Laktone werden (ohne H_2 -Entwicklung) nur sehr langsam zu den entsprechenden Alkoholen reduziert. Nichtaromatische Doppelbindungen und Dreifachbindungen werden sehr rasch hydroboriert, d. h. es wird H und B angelagert, wobei die entstehende C-B-Bindung gegen Wasser stabil ist.

In dieser Arbeit wird über die Analyse der sauerstoffhaltigen Gruppen von Huminstoffen berichtet. Karboxylgruppen wurden pK-unabhängig mit Diboran, Hydroxylgruppen durch Azetylierung und Carbonylgruppen durch Reaktion mit $NaBH_4$ bestimmt. An einer THF-löslichen Fulvosäure wurde die Methodik eingehend geprüft und dann bei einer Reihe von Fraktionen verschiedenen mittleren Molekulargewichtes angewendet.

Material

Für die Untersuchungen wurden ausschließlich Huminstoffe aus dem B_h -Horizont eines Podsols (Nante) verwendet. Die Gewinnung der THF-löslichen *Fulvosäure FS-2* sowie der *Braunhuminsäure B-HS* ist in einer früheren Arbeit beschrieben worden (28). Aus der Gesamt-Fulvosäurefraktion (FS-HCl), mit 1 N HCl extrahiert und über das Fe-Salz isoliert (12), wurden durch fraktionierte Dialyse die *Fulvosäurefraktionen D₁*

Tabelle 1

Fraktionierte Dialyse der Fulvosäure FS-HCl (20 g)

Fractional dialysis of the fulvic acid FS-HCl (20 g)

Fraktion	Dialyse- dauer	Ausbeute	optische Dichte bei 450 μ E 1 % 1 cm
	Std.	g	
D ₁	1	0,772	9,5
D ₂	16	3,709	10,0
D ₃	19	0,623	10,3
D ₄	65	5,220	11,7
D ₅	73	0,608	13,2
D ₆	88	0,800	13,8
D ₇	121	1,137	16,6
D ₈	137	0,761	18,3
D ₉	184	0,637	18,4
D ₁₀	328	1,009	19,9
D ₁₁	383	0,924	23,0
D ₁₂	472	0,556	25,4
D ₁₃	Rückstand	2,202	28,5
FS-2	—	—	20,0
B-HS	—	—	64,0

bis D_{13} gewonnen. 20 g von FS-HCl (0,9 % Asche, 0,8 % N) wurden in 150 ml Wasser gelöst, in einen Zellophanschlauch gegeben und in einem 2-Liter-Meßzylinder gegen Wasser dialysiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden die herausdialysierten Fulvosäuren unter Vakuum konzentriert, gefriergetrocknet, gewogen und die optische Dichte einer Lösung von 5–20 mg in 100 ml NaOH-Glycinpuffer (28) gemessen (Tabelle 1).

Methoden

1. Die *IR-Spektren* wurden im Laboratorium von Herrn Dr. Simon (Laboratorium für organische Chemie, E.T.H.) aufgenommen. Die untersuchten Na-Salze wurden durch Titration bis pH 10 gebildet und die Lösung gefriergetrocknet.

2. Die *Elementaranalysen*, die *Acetylbestimmungen* sowie die *Bestimmung des aktiven Wasserstoffs* nach Zerewitinoff wurde im mikroanalytischen Laboratorium von Dr. A. Bernhardt, Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mülheim (Ruhr) ausgeführt.

3. *Herstellung von Diboran*: Eine 1 M Lösung von NaBH_4 in Diäthylenglykoldimethyläther (7,56 g/200 ml) wurde langsam zu BF_3 -Äthylätherat (50 ml) tropfen gelassen, und das entwickelte Diboran-Gas wurde im N_2 -Strom im THF (120 ml) geleitet (5). Die erhaltene 1 M Lösung von Diboran (B_2H_6) in THF wurde im Kühlschrank unter N_2 aufbewahrt und war 2 Monate haltbar.

4. *Reduktion der Fulvosäure FS-2*: In drei Kolben wurden je 50 mg von FS-2 in 5 ml trockenem THF gelöst und 5 ml Diboranlösung zugegeben. Die Kolben wurden mit einem Polyäthylenstopfen mit Chlorkalziumrohr geschlossen und in einem Exsikkator mit P_2O_5 im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach zwei Tagen wurde die Reaktionslösung des ersten Kolbens am Vakuum eingedampft. Der Rückstand war nicht mehr so gut wasserlöslich wie FS-2. Die Borsäure wurde durch wiederholtes Lösen in Methanol, Versetzen mit etwas CH_2N_2 und Eindampfen als Methyl-ester entfernt. Das IR-Spektrum in KBR zeigte nur eine sehr geringe Verminderung der Absorption im Carbonylgebiet. Nach einer Woche bzw. nach einem Monat wurden die Reaktionslösungen der beiden anderen Kolben ebenfalls eingedampft; die reduzierten Fulvosäuren lösten sich nicht mehr in Wasser. Die Borsäure wurde deshalb durch Dialyse gegen Wasser (1 Woche) entfernt. Die Lösung wurde gefriergetrocknet und die Präparate sowie ihre bei pH 10 gebildeten Na-Salze IR-spektroskopisch untersucht. Ein größerer Ansatz von 500 mg FS-2 wurde während eines Monats vollständig reduziert (= FS-2 R, Ausbeute 60 %, Verlust niedrigmolekularer Fraktionen bei der Dialyse).

5. *Bestimmung des aktiven Wasserstoffs mit Diboran*: Die Substanz wurde in ein gut getrocknetes Schliffkölbchen (75 ml) mit flachem Boden und seitlichem Rohransatz eingewogen, mit einer trockenen Pipette 5 ml trockenes THF zugegeben, der Hauptschliff mit einer Gummikappe gut verschlossen und mit dem seitlichen Rohransatz über Kugelschliff-Verbindung an eine Gasbürette von 100 ml angeschlossen. Als Absperrflüssigkeit diente Wasser. Mit einer Medizinalspritze wurde 1 ml Diboranlösung durch die Gummikappe sorgfältig in den Kolben gespritzt. Die Wasserstoffentwicklung war bei Substanzen, die sich in THF lösten, nach 1–2 Minuten beendet. Nach genau 5 Minuten wurde der Wasserstoff in der Gasbürette mit Hilfe eines Niveaufäßes unter Atmosphärendruck gemessen und die Temperatur und der Barometerstand notiert. Es wurden jeweils mindestens drei Bestimmungen mit verschiedenen Einwägen, welche ca. 30, 40 und 50 ml H_2 entwickelten, durchgeführt. Jedesmal wurde graphisch ge-

prüft, ob die H_2 -Entwicklung sich linear zur Einwaage verhält, und dann durch Extrapolation auf Einwaage Null der Blindwert der H_2 -Entwicklung ermittelt. Die zu prüfenden Substanzen müssen vor der Analyse gut getrocknet werden (1 Mol H_2O gibt 2 Mol aktiven Wasserstoff). Da Huminstoffe im allgemeinen stark hygroskopisch sind und nach Trocknung nicht mehr gut in Lösung gehen, wurden sie luftfeucht analysiert und das Resultat für Wasser korrigiert. Der Wassergehalt wurde durch Trocknung unter Hochvakuum bei $40^\circ C$ über P_2O_5 bestimmt.

Für die Fulvosäurefraktion D_2 z. B. gestaltete sich die Bestimmung wie folgt:

Einwaagen: 20, 35 und 50 mg. H_2 -Entwicklung bei $23^\circ C$ und 732 mm Hg: 31,0 ml, 38,75 ml und 46,5 ml. Blindwert: 20,7 ml. Wassergehalt: 7,6%. — H_2 -Entwicklung von 1 g luftfechter Substanz für Normalbedingungen korrigiert: 459 ml. H_2 -Entwicklung von Wasser in 1 g luftfechter Substanz bei Normalbedingungen: 189 ml. H_2 -Entwicklung 1 g trockener Substanz bei Normalbedingungen: 292,5 ml, entsprechen 13 mÄq aktivem Wasserstoff.

In THF unlösliche Substanzen (D_{10} , D_{13} , B-HS) wurden in 4 ml trockenem Dimethylformamid gelöst, 1,5 ml Diboran-Lösung zugespritzt und im übrigen wie vorher beschrieben verfahren.

Von allen geprüften Modellschubstanzen (Hydroxyl- und Methoxylsubstituierte Benzoe- und Benzoldikarbonsäuren, Polyphenole, substituierte Chinone und andere hydroxylierte oder karboxylierte aromatische Verbindungen) wurde eine der Theorie entsprechende H_2 -Entwicklung gemessen.

6. *Bestimmung der Karbonylgruppen mit $NaBH_4$ (27)*: Je 50 mg Substanz wurde in den unter 5. beschriebenen Reaktionskolben gegeben, in 2 ml Wasser gelöst und mit 2 N NaOH pH 7—8 eingestellt. Dann wurden 3 ml einer alkoholischen Lösung von Borsäure (1 g/100 ml) zugegeben. Der Kolben wurde mit der Gummikappe geschlossen und während 2 Stunden durch eine Impfnadel Argon in die Lösung eingeleitet um den Luftsauerstoff zu entfernen. Der Kolben wurde, wie unter 5. beschrieben, an die Gasbürette geschlossen und 3 ml $NaBH_4$ -Lösung (1 g/100 ml 0,1 N NaOH) eingespritzt. Nach 3 Stunden wurden 2 ml 2 N H_2SO_4 eingespritzt und die H_2 -Entwicklung gemessen. Gleichzeitig wurde ein Blindversuch auf genau gleiche Weise durchgeführt. Aus der Differenz ergab sich der für die Reduktion der Karbonylgruppen verbrauchte Wasserstoff (1 Mol H_2 /mÄq Karbonyl). — Die Methode ergab mit p-Benzochinon und Morin der Theorie entsprechende Werte.

7. *Azetylierung*: Je 20 mg Huminstoff wurden in 10 ml Azetanhydrid während 24 Stunden bei $60^\circ C$ im Ölbad erwärmt. (Bei FS-2-R, B-HS, D_{10} und D_{13} wurden zwei Tropfen konc. H_2SO_4 zugegeben.) Die braune Lösung wurde in Eiswasser gegossen und 6 Stunden im Kühlschrank stehen gelassen. Das ausgefällte Azetat wurde auf einer G-4-Nutsche abgenutscht, mit kaltem Wasser gut gewaschen und mit Aceton aus der Nutsche gelöst. Die Lösung wurde konzentriert und das Azetat in Petroläther ausgefällt. Die Azetylgehalte waren wie folgt:

FS-2 = 13,3%, FS-2-R = 31,0%, D_2 = 7,8%, D_4 = 12,7%, D_7 = 14,34%, D_{10} = 15,9%, D_{13} = 19,6%, B-HS = 15,6%.

8. *Gesamtazidität durch Reaktion mit $Ba(OH)_2$ (33,36)*: 50 mg Huminstoff wurden in ein Zentrifugenglas (250 ml) eingewogen, in 10 ml Wasser gelöst, bzw. suspendiert, und unter Einleiten von N_2 50 ml 0,1 N $BaCl_2$ und anschließend 20 ml 0,1 N NaOH

zugegeben. Das Zentrifugenglas wurde geschlossen, 16 Stunden geschüttelt und dann zentrifugiert. Aliquote der überstehenden, nur schwach gefärbten Lösung wurden mit 0,1 N HCl und Phenolphthalein titriert. Die Gesamtazidität ergab sich nach der Titration eines Blindversuches.

9. „Karboxylgehalt“ durch Reaktion mit Ba-Azetat: 50 mg Huminstoff wurden in einem Zentrifugenglas wie unter 8. beschrieben gelöst. Unter N_2 wurden 50 ml 3 N Ba-Azetat (ergab besseren Niederschlag mit Huminstoffen als Ca-Azetat) zugegeben, 16 Stunden geschüttelt und zentrifugiert. Aliquote der überstehenden, fast farblosen Lösung wurden mit 0,1 N NaOH (Phenolphthalein) titriert. Die verbrauchte Lauge ergab, da der Blindwert Null war, direkt den „Karboxylgehalt“.

Resultate und Diskussion

Abbildung 1 zeigt die IR-Spektren der Fulvosäurefraktion FS-2 (Kurve 1) und des bei pH 10 gebildeten Na-Salzes (Kurve 2). Ein gleiches Spektrum zeigt das Al-Salz, welches durch Lösen von FS-2 in Wasser, Ausfällung mit 1 N $AlCl_3$ (bei leicht saurer Reaktion), Dialyse und Gefriertrocknung erhalten wurde. Sie bestätigen auch für dieses Huminstoffpräparat die oben erwähnte Verschiebung des Hauptteils der Karbonylabsorptionsbande von $5,7-5,8 \mu$ nach $6,1-6,2 \mu$, was auf die Anwesenheit einer bedeutenden Menge von Karboxylgruppen weist. Das Hauptziel der Untersuchungen bestand deshalb in einer pK-unabhängigen Bestimmung der Karboxylgruppen.

Diboran reduziert Karboxylgruppen normalerweise sehr rasch zu primären Alkoholgruppen. Die Bestimmung der Karboxylgruppen sollte sich deshalb 1) aus dem verbrauchten Hydrid (6), 2) aus der Elementaranalyse des reduzierten Produkts (Zunahme des Wasserstoffs und Abnahme des Sauerstoffs) und 3) aus der Zunahme der Hydroxylgruppen ergeben, wobei das Resultat für reduzierte Karbonylgruppen korrigiert werden müßte.

Die restlose Reduktion der Karboxylgruppen wurde IR-spektroskopisch an der reduzierten Fulvosäure und ihrem Na-Salz überprüft. Die Reduktion der Karboxylgruppen erfolgte viel langsamer als in der Literatur für einfache organische Säuren beschrieben ist (6). Nach 2 Tagen war das IR-Spektrum kaum verändert, nach einer Woche (Abb. 1, Kurve 3) war die Karbonylabsorptionsbande bei $5,7-5,8 \mu$ deutlich kleiner geworden, und nach einem Monat (Kurve 4) war in diesem Gebiet keine Absorptionsbande mehr festzustellen. Hingegen erstreckte sich von $5,6-6,0 \mu$ immer noch eine diffuse Restabsorption, welche nach Salzbildung nicht verändert wurde und deshalb nicht von Karbonylgruppen stammt.

Die Messung des Hydrid-Verbrauchs war technisch nicht möglich, nachdem zur vollständigen Reduktion eine sehr lange Reaktionszeit benötigt wurde. Es wurde deshalb das Ausgangsmaterial und das vollständig reduzierte Produkt analysiert (Tab. 2). Da bei der Reduktion der Kohlenstoff nicht verändert wird, müssen die Analysen auf gleiche Kohlenstoffmengen umgerechnet werden

P 2966 1

Abbildung 1

IR-Spektren der Fulvosäure FS-2 und Derivaten

Kurve 1: FS-2; Kurve 2: Na-Salz von FS-2

Kurve 3: FS-2 nach 1 Woche Reduktion mit Diboran

Kurve 4: FS-2 nach 1 Monat Reduktion mit Diboran

IR-spectra of fulvic acid FS-2 and derivatives

Curve 1: FS-2; curve 2: Na-salt of FS-2

curve 3: FS-2 after reduction with diborane for 1 week

curve 4: FS-2 after reduction with diborane for 1 month

(FS-2-R*). Der Wasserstoff nahm durch die Reduktion um 15 mÄq/g zu und der Sauerstoff um 7,5 mÄq/g ab, was einem Karboxylgehalt von 7,5 mÄq/g entsprechen würde. Die azetylierbaren Hydroxylgruppen nahmen um 5,8 mÄq/g zu. Im reduzierten Präparat wurden mit NaBH_4 keine Carbonyle mehr festgestellt. Nach der Korrektur für reduzierte Carbonyle (1 mÄq/g) erhält man für den Karboxylgehalt aus der Wasserstoffzunahme 6,5 mÄq/g, aus der Sauerstoffabnahme 7,4 mÄq/g und aus der Azetylzunahme 4,8 mÄq/g. Wegen möglicher nicht vollständiger Azetylierung bzw. Elimination von Nichtkarboxyl-

Sauerstoff (2), ist 4,8 mÄq/g als unterer und 7,5 mÄq/g als oberer Grenzwert der unabhängig von pK bestimmten Karboxylgruppen anzusehen.

Durch Titration mit NaOH bis pH 8,5 wurden 5,8 mÄq und durch Reaktion mit Ba-Azetat 7,8 mÄq/g saure Gruppen bestimmt. Nach Berücksichtigung der durch Reduktion mit Diboran bestimmten Karboxylgruppen bleibt deshalb kaum Platz für stark saure Hydroxychinone oder Enole. Das reduzierte Prä-

parat enthielt kein Bor, was zeigt, daß die Fulvosäure keine hydroborierbaren, olefinischen Doppelbindungen, z. B. Enole (7), enthält.

Die reduzierte Fulvosäure war im Unterschied zum Ausgangsmaterial in allen gebräuchlichen Lösungsmitteln wie Wasser, Säuren, Alkohol, Dioxan, Dimethylformamid, THF und Benzol unlöslich; sie ging erst in Boratpuffer von pH 11 in Lösung.

Azetylierung in Azetanhydrid bei 60° C und mikroanalytische Bestimmung des Azetylgehaltes durch Verseifung ergab 3,6 mÄq/g Hydroxylgruppen (Tab. 2). Durch Azetylierung und titrimetrische Bestimmung des unverbrauchten Azetanhydrids (29, 36) wurden viel größere Werte erhalten (7—9 mÄq/g). Diese Methode scheint, wegen des sauren Charakters der Huminstoffe, zweifelhafte Werte zu geben (25).

Für einen geringen Gehalt an Hydroxylgruppen sprechen auch Oxydationsversuche mit NaIO₄ partiell methylierter Huminstoffe (FS-2, B-HS). Bei der NaIO₄-Oxydation der Monomethyläther von o- und p-Dihydroxybenzolen wird Methanol abgespalten (1). Methylierung der Modells-substanzen Brenzkatechin und Hydrochinon mit CH₃N₂ ergab vorwiegend Monoäther- und erst nach längerer Reaktionszeit auch Dimethyläther-Derivate. Deshalb sollte man o- und p-Dihydroxybenzol-Strukturen in Huminstoffen nach partieller Methylierung und Oxydation mit NaIO₄

Tabelle 2

Analysenresultate der Fulvosäure FS-2 vor und nach Reduktion
(1 Monat) mit Diboran (FS-2-R)
Analytical data of fulvic acid FS-2 before and after reduction
(1 month) with diborane (FS-2-R)

Material	C %	C mÄq/g	H %	H mÄq/g	O %	O mÄq/g	N %	OCH ₃ mÄq/g	OH mÄq/g	C=O mÄq/g
FS-2	51	42	3,6	36	44	27,5	0,8	0,04	3,6	1
FS-2-R	57	47,6	5,7	57	35,8	22,4	1,2	0,02	10,5	0
FS-2-R*	(51)	(42)	5,1	51	32,0	20,0	—	—	9,4	0

FS-2-R*: Umrechnung auf C-Gehalt von FS-2,

$$\text{z. B. } O = \frac{22,4}{57} \cdot 51 = 20 \text{ mÄq/g}$$

auf Grund der Methanol-Produktion bestimmen können. Die partiell methylierten Huminstoffe ergaben aber bei der Oxydation gleich viel Methanol wie Blindversuche mit Wasser allein, was lediglich auf eine Verseifung von Methylestergruppen deutet.

Nach *Zerewitinoff* wurden 6 mÄq/g aktiven Wasserstoffs bestimmt. Dieser Wert ist viel zu tief, denn die bestimmten Karboxyl- und Hydroxylgruppen verlangen einen Wert von 8,4 bis 11,1 mÄq/g. Die Methode nach *Zerewitinoff* ergibt nicht immer stöchiometrische Werte (34). Mit Diboran konnte bei einer großen Zahl von Verbindungen der aktive Wasserstoff (von Karboxyl- und Hydroxylgruppen genau bestimmt werden (s. unter Methoden und [25]). Die Bestimmung des aktiven Wasserstoffs der Fulvosäure mit Diboran ergab 11,6 mÄq/g. Dieser Wert stimmt mit der oberen Grenze der Summe der bestimmten Karboxyl- und Hydroxylgruppen (8,4–11,1 mÄq/g) gut überein. Es ist deshalb möglich, Karboxylgruppen in Huminstoffen aus dem Unterschied zwischen dem aktiven Wasserstoff (Diboran) und den Hydroxylgruppen (Azetylierung) zu errechnen.

Die Bestimmung der Gesamtazidität mit Ba(OH)_2 ergab 11,9 mÄq/g. Dieser Wert stimmt gut mit dem aktiven Wasserstoff überein und weist auf die Abwesenheit nicht azider, d. h. alkoholischer Hydroxylgruppen.

Durch Reaktion mit NaBH_4 (nach sorgfältigem Ausschluß des Sauerstoffs) wurde ein Karbonylgehalt von 1 mÄq/g bestimmt (Tab. 2). Damit wurden in 4,8–7,5 mÄq Karboxyl-, in 3,6 mÄq Hydroxyl- und in 1 mÄq Karbonylgruppen 15,2–19,6 mÄq oder 55–70% des Sauerstoffs (27,5 mÄq/g) der Fulvosäure erfaßt. Es bleiben 30–45% oder 7,9–12,3 mÄq/g Rest-O, was auf einen beträchtlichen Gehalt an Äther-O deutet.

Es war nun interessant, eine Reihe verschiedener Huminstoff-Präparate zu analysieren. Die Fulvosäurepräparate D_1 bis D_{13} wurden durch fraktionierte Dialyse und die Braunhuminsäure B-HS durch Fraktionierung mit NaCl erhalten. Gelfiltration (28) ergab für die Fulvosäurefraktionen D_2 bis D_{13} und für die Braunhuminsäure B-HS (28) ein zunehmend größeres mittleres Molekulargewicht (Abb. 2), FS-2 hatte eine ähnliche Molekulargewichtsverteilung wie D_7 (28).

Wie aus Tab. 3 hervorgeht, nahm der aktive Wasserstoff mit steigendem Molekulargewicht von 13,0 mÄq/g (D_2) auf 7,1 mÄq/g (B-HS) ab und stimmte ziemlich gut mit der Gesamtazidität (Ba(OH)_2) überein. Die azetylierbaren Hydroxylgruppen stiegen in den Dialysefraktionen mit dem Molekulargewicht und waren in B-HS wieder etwas kleiner. Der Karboxylgehalt, errechnet aus dem Unterschied zwischen dem aktiven Wasserstoff und den Hydroxylgruppen sowie der Karboxylgehalt nach der Ba-Azetat-Methode nahmen mit steigendem Molekulargewicht der Fraktion stark ab. Der Unterschied zwischen den beiden Methoden stieg mit zunehmendem Molekulargewicht und Hydroxylgehalt der Fraktionen, vermutlich wegen der Reaktion von Hydroxylgruppen mit Ba

P2966.2

Abbildung 2

Molekulargewichtsverteilung der Fulvosäurefraktionen
D₂, D₄, D₇, D₁₀ und D₁₃ an Sephadex G-75

Molecular weight distribution of fulvic acid fractions
D₂, D₄, D₇, D₁₀ and D₁₃ on Sephadex G-75

(Komplexbildung?). Der Karbonylgehalt der Fraktionen ist ziemlich konstant (1,9—2,5 mäs/g) mit Ausnahme von Fraktion FS-2, welche einen geringeren Karbonylgehalt (1 mäs/g) hat.

Für alle Fraktionen wurde der Rest-O oder Skelett-O (Tab. 3, Kolonne 8) durch Subtraktion des Sauerstoffs der bestimmten funktionellen Gruppen vom Gesamtsauerstoff (Kolonne 7) in mäs/g ausgerechnet. Er stieg in den Fulvosäurefraktionen mit steigendem Molekulargewicht von 3,5 mäs/g auf 13,4 mäs/g und war in B-HS wieder etwas kleiner. In D₁₃ waren ca. 50% des Sauerstoffs nicht in funktionellen Gruppen erfaßt worden. Da die verschiedenen Huminstoff-Fraktionen unterschiedliche Mengen funktioneller Gruppen enthalten, lassen sie sich nicht direkt vergleichen. Erst das nach Abzug der funktionellen

Tabelle 3

Analysenresultate der Fulvosäurefraktionen D₂, D₄, D₇, (FS-2), D₁₀ und D₁₃
sowie der Braunhuminsäure B-HS in mg/g

Analytical data of fulvic acid fractions D₂, D₄, D₇, (FS-2), D₁₀, D₁₃
and of brown humic acid B-HS in meq/g

Material	H-aktiv Diboran (1)	Gesamt- azidität Ba(OH) ₂ (2)	Hydroxyl Azety- lierung (3)	Karboxyl Ba—Az (4)	Karbonyl Ba—Az (1) — (3) (5)	Karboxyl (6)	O (7)	Skelett- O (8)	C (9)	Skelett- C (10)	C/O im Skelett (11)
D ₂	13,0	12,0	2,0	10,3	11,0	2,5	30	3,5	40,0	29,0	8,5
D ₄	12,4	11,6	3,4	9,9	9,0	2,5	30	6,1	40,6	31,6	5,2
D ₇	10,6	10,2	3,5	8,6	7,1	2,4	28,2	8,1	42,0	34,9	4,3
FS-2	11,6	11,7	3,6	7,8	8,0	1,0	27,5	6,9	42,0	34,0	4,9
D ₁₀	9,6	9,9	4,4	8,0	5,2	2,4	28,1	10,9	41,7	36,5	3,7
D ₁₃	9,0	8,8	5,6	5,9	3,4	2,4	28,2	13,4	42,0	38,6	2,9
B-HS	7,1	8,6	4,3	5,3	2,8	1,9	23,2	11,4	47,5	44,7	3,9

Gruppen (COOH für Karboxyl, OH für Hydroxyl und O für Carbonyl) erhaltene „Huminstoff-Skelett“ gestattet den richtigen Vergleich. Auf Grund der Abbauversuche (8) muß man sich dieses Skelett aus aromatischen Bausteinen vorstellen. Das Problem, den Rest- oder Skelett-O in einem solchen Skelett als Äther-O zu betrachten, kommt im C/O-Verhältnis des Skeletts von 3—8,5 (Kolonne 11) zum Ausdruck. (Zwei, 3 und 4 Ätherbindungen pro Benzolring ergeben ein C/O-Verhältnis von 6, 4 und 3).

In den vorliegenden Huminstoffpräparaten würden demnach bis 4 Ätherbindungen pro Benzolring (D₁₃) enthalten sein, was unmöglich scheint. Das IR-Spektrum des reduzierten Fulvosäurepräparates FS-2-R (Abb. 2, Kurve 4), welches keine Karboxylgruppen mehr enthält, läßt noch die Anwesenheit von Carbonylgruppen vermuten (Chinone, Laktone?); mit NaBH₄ ließen sich allerdings keine bestimmen.

Ähnlich wie bei Kohle ((22) und Lignin (C₉-Einheit [17])) müssen auch bei Huminstoffen die Analy-

senresultate statistisch dargestellt werden. Zum Beispiel ließe sich für die Fulvosäure FS-2 (nach Tab. 3) folgende hypothetische, aus einem Benzolring bestehende, monomere C_6 -Einheit mit 1,4 Karboxyl-, 0,6 Hydroxyl-, 0,18 Karbonyl- und 1,2 Äthergruppen (bzw. 2,4 Ätherbindungen) formulieren.

Bei der Betrachtung des C/O-Verhältnisses im Skelett der verschiedenen untersuchten Huminstoffpräparate ist, neben der Größe des Verhältnisses, dessen Schwankungsbereich von Bedeutung.

In der Frage, ob in Huminstoffen verschiedenen Molekulargewichtes immer ein einheitliches oder ein in bestimmter Richtung sich änderndes Skelett vorliegt, dürfte der Schlüssel zur Erkennung des polymeren Prinzips liegen. Zur genauen Untersuchung dieser Frage müssen die Analysenmethoden aber noch weiter ausgebaut und verfeinert werden.

Diese Arbeit wurde durch *Forschungskredite des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* und des *Fonds zur Förderung der Wald- und Holzforschung* sowie durch ein Austauschstipendium des *Consejo Superior de Investigaciones Científicas de España* ermöglicht; wir danken bestens für diese Unterstützung.

Zusammenfassung

In einer Tetrahydrofuran löslichen Fulvosäurefraktion aus dem B_h -Horizont eines Podsols wurden die Karboxylgruppen durch Reduktion mit Diboran (4,8—7,5 mÄq/g), die Hydroxylgruppen durch präparative Azetylierung (3,6 mÄq/g) und die Karbonylgruppen durch Reaktion mit Natriumborhydrid (1 mÄq/g) bestimmt. Der mit Diboran bestimmte aktive Wasserstoff (11,6 mÄq/g) stimmte gut mit der Gesamtazidität aus der Reaktion mit Bariumhydroxyd überein (11,9 mÄq/g), was gegen die Anwesenheit alkoholischer Hydroxylgruppen spricht. Etwa 60% des Sauerstoffs fanden sich nicht in den bestimmten funktionellen Gruppen; es ist unwahrscheinlich, daß der gesamte Restsauerstoff in Ätherbindungen vorliegt. Bei der Analyse einer Reihe von Huminstoff-Fractionen mit steigendem Molekulargewicht nahmen die Karboxylgruppen ab, die Hydroxylgruppen zu, die Karbonylgruppen blieben konstant und der Restsauerstoff nahm zu. Eine statistische Darstellung der Analysenresultate mit Hilfe einer hypothetischen monomeren Einheit oder eines Huminstoff-Skeletts, das keine funktionellen Gruppen enthält, wurde diskutiert.

Schrifttum

- (1) Adler, E., and Magnusson, R.: Acta Chem. Scand. 13, 505—519 (1959). — (2) Bapat, D. S., Subba Rao, B. C., Unni, M. K., and Venkataraman, K.: Tetrahedron Letters (1960), No. 5, 15 bis 19. — (3) Beckwith, R. S.: Austr. J. of Agric. Res. 6, 685—698 (1955). — (4) Broadbent, F. E., and Bradford, G. R.: Soil Sci. 74, 447—457 (1952). — (5) Brown, H. C., and Tierney, P. A.: J. Amer. Chem. Soc. 80, 1552—1558 (1958). — (6) Brown, H. C.: Hydroboration. W. A. Benjamin, New York (1962). — (7) Caglioti, L., Cainelli, G., und Selva, A.: Chim. Ind. (Milan)

- 44, 36—37 (1962). — (8) Coffin, D. E., and De Long, W. A.: Trans. 7th Int. Congr. Soil Sci. II, 91—97 (1960). — (9) Deuel, H., und Dubach, P.: Helv. Chim. Acta 41, 1310—1321 (1958). — (10) Van Dijk, H.: Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 84, 150—155 (1959). — (11) Van Dijk, H.: Sic. Proc. Roy. Dublin Soc. A 1, 163—176 (1960). — (12) Dubach, P., Mehta, N. C., und Deuel, H.: 102, 1—7 (1963), I. c. 10. — (13) Farmer, V. C., and Morrison, R. I.: I. c. 11, 1, 85—104 (1960). — (14) Flaig, W., Scheffer, F., und Klamroth, B.: I. c. 10, 71, 33—57 (1955). — (15) Flaig, W.: I. c. 8, B, 471—478 (1956). — (16) Forsyth, W. G. C.: J. Agr. Sci. 37, 132—138 (1947). — (17) Freudenberg, K.: Fortschr. Chem. Organ. Naturstoffe 20, 41—72 (1962). — (18) Fuchs, W.: Ges. Abhandl. Kenntnis Kohle 9, 176—181 (1930). — (19) Gillam, W. S.: I. c. 4, 49, 433—453 (1940). — (20) Khanna, S. S., and Stevenson, F. J.: I. c. 4, 93, 298—305 (1962). — (21) Kononowa, M. M.: Die Humusstoffe des Bodens. DVW, Berlin (1958). — (22) Van Krevelen, D. W., and Schuyer, J.: Coal Science. Elsevier, Amsterdam (1957). — (23) Kumada, K., and Aizawa, K.: Soil and Plant Food (Japan) 3, 152—159 (1958). — (24) Lewis, T. E., and Broadbent, F. E.: I. c. 4, 91, 393—399 (1961). — (25) Martin, R. E., and Jay, R. R.: Anal. Chem. 34, 1007—1009 (1962). — (26) Martin, A. E., and Reeve, R.: J. Soil Sci. 9, 89—100 (1958). — (27) Marton, J., Adler, E., and Persson, K. J.: Acta Chem. Scand. 15, 384—392 (1961). — (28) Mehta, N. C., Dubach, P., und Deuel, H.: Untersuchungen über die Molekulargewichtsverteilung von Huminstoffen durch Gelfiltration an Sephadex. I. c. 10, im Druck. — (29) Meyer, W.: Die Bestimmung funktioneller Gruppen an Huminsubstanzen aus Böden. Diss. E.T.H. (1962). — (30) Pommer, A. M., and Breger, I. A.: Geochim. Cosmoch. Acta 20, 30—44 (1960). — (31) Scheffer, F., und Ulrich, B.: Humus und Humusdüngung. Enke, Stuttgart (1960). — (32) Schnitzer, M., Shearer, D. A., and Wright, J. R.: I. c. 4, 87, 252—257 (1959). — (33) Stadnikoff, G.: Kolloid-Z. 80, 60—68 (1937). — (34) Wright, G. F.: Organometallic Compounds for the Determination of Active Hydrogen. Inorganic Analysis 1, 155—195. Interscience, New York (1953). — (35) Wright, J. R., and Schnitzer, M.: Nature 184, 1462—1463 (1959). — (36) Wright, J. R., and Schnitzer, M.: I. c. 8, II, 120—127 (1960). — (37) Zetsche, F., and Reinhardt, H.: Brennstoff Chem. 20, 84—87 (1939).