

144. Decarboxylierung der organischen Substanz des Bodens III¹⁾. Extraktion und Fraktionierung decarboxylierbarer Humusstoffe²⁾

von H. Deuel und P. Dubach

(7. VI. 58)

Uronsäuren spalten in siedender 12-proz. HCl quantitativ CO₂ ab³⁾. SHOREY & MARTIN⁴⁾ haben diese Methode erstmals auf Böden angewandt und gefunden, dass die organische Substanz des Bodens, der Humus, meist eine beträchtliche Menge CO₂ abspaltet. Sie sprachen aber vorsichtig nur von scheinbaren Uronsäuren. FULLER⁵⁾ beobachtete bei der Decarboxylierung von Bodenproben und von Pektin in siedender 12-proz. HCl die gleiche Kinetik; die decarboxylierbaren Verbindungen des Humus sollten deshalb tatsächlich Uronsäuren sein. Es sind derartige «Uronsäure»-Bestimmungen an Böden sehr oft durchgeführt (Literatur¹⁾²⁾⁶⁾), aber wiederholt auch kritisiert worden⁷⁾.

Der Humus spaltet bereits unter viel mildereren Bedingungen CO₂ ab, als dies für Galakturonsäure und uronsäurehaltige Polysaccharide der Fall ist¹⁾. Die Decarboxylierung der organischen Bodensubstanz in siedender 12-proz. HCl kann daher nur zu einem geringen Teil durch Uronsäuren bedingt sein. Mit verschiedenen Methoden konnten zudem im A-Horizont einer Braunerde und im B-Horizont zweier Podsole keine monomeren Uronsäuren und nur relativ wenig gebundene Uronsäuren nachgewiesen werden. Besonders im Humus des B-Horizontes des Podsoles finden sich kaum Uronsäuren, obwohl hier die Menge an decarboxylierbaren Gruppen besonders hoch ist.

Im folgenden wird von Versuchen berichtet, aus Böden decarboxylierbare Verbindungen nicht-uronsäureartiger Natur zu isolieren.

Es wurde zunächst nach einem Extraktionsmittel gesucht, das möglichst viel der decarboxylierbaren Substanz extrahiert. Über die Art der Bindungen der organischen Substanz im Boden ist man nur mangelhaft unterrichtet. Die sog. Humin- und Fulvosäuren⁶⁾ können u. a. als unlösliche Salze oder Komplexe mehrwertiger Metallkationen vorliegen, oder sie können an anorganischen Bodenbestandteilen durch Nebenvalenz- oder ionische Bindungen fixiert sein. Mit Wasser und den gewöhnlichen organischen Lösungsmitteln lassen sich nur bescheidene Mengen an Humusstoffen extrahieren. Mit Erfolg hat man zur Extraktion wässrige Lösungen von NaOH, Mineralsäuren, gewissen

¹⁾ I: H. DEUEL, P. DUBACH & R. BACH, Z. Pflanzenern. Düng. Bodenk., **81**, 189 (1958); II: H. DEUEL & P. DUBACH, *ibid.*, im Druck.

²⁾ Auszug aus P. DUBACH, Diss. ETH., Zürich, 1958.

³⁾ K. U. LEFÈVRE & B. TOLLENS, Ber. deutsch. chem. Ges. **40**, 4153 (1907).

⁴⁾ E. C. SHOREY & J. M. MARTIN, J. Amer. chem. Soc. **52**, 4907 (1930).

⁵⁾ W. H. FULLER, Proc. Soil Sci. Soc. Amer. **11**, 280 (1946).

⁶⁾ Vgl. M. M. KONONOWA, Die Humusstoffe des Bodens, Berlin 1958.

⁷⁾ S. A. WAKSMAN & H. W. REUSZER, Soil Sci. **33**, 135 (1932); S. MATTSON & E. KOUTLER-ANDERSSON, Ann. Agr. Coll. Sweden **12**, 70 (1944); J. M. BREMNER, J. Soil Sci. **2**, 67 (1951); P. DUBACH, G. ZWEIFEL, R. BACH & H. DEUEL, Z. Pflanzenern. Düng. Bodenk. **69**, 97 (1955); F. J. STEVENSON, Soil Sci. **84**, 99 (1957).

Neutralsalzen und Metallchelatlösern verwendet⁸⁾. In Tab. 1 sind Extraktionsversuche an einer Braunerde zusammengestellt.

Tabelle 1. *Extraktion decarboxylierbarer Humusstoffe aus dem A-Horizont der Braunerde «Koppigen»*

Extraktion von je 10 g lufttrockenem Boden mit 100 ml Flüssigkeit; Decarboxylierung in 12-proz. HCl bei 145° Ölbadtemperatur während 4 Std.; CO₂-Abspaltung aus Braunerde «Koppigen» 5,4 mMol/100 g

Extraktionsmittel	Extrakt.-Temp. und Dauer	CO ₂ -Abspalt. des Extraktes in % der CO ₂ -Abspalt. des gesamten Bodens
H ₂ O	20°, 24 Std.	0
H ₂ O	95°, 24 Std.	0
NaOH 2 -proz.	20°, 24 Std.	28
NaOH 4 -proz.	20°, 24 Std.	35
NaHCO ₃ 8,5-proz.	20°, 70 Std.	5
NH ₄ OH 1,8-proz.	20°, 24 Std.	5
HCl 3,6-proz.	20°, 24 Std.	10
HCl 7,5-proz.	20°, 24 Std.	15
HCl 20 -proz.	20°, 24 Std.	38
H ₂ SO ₄ 4 -proz.	20°, 24 Std.	8
H ₂ SO ₄ 20 -proz.	20°, 24 Std.	15
H ₂ SO ₄ 40 -proz.	20°, 24 Std.	20
HCOOH 12,5-proz.	100°, 10 Std.	22
HCOOH 25 -proz.	100°, 10 Std.	22
HCOOH 50 -proz.	100°, 10 Std.	25
HCOOH konz.	100°, 10 Std.	44
(COOH) ₂ 3 -proz.	20°, 20 Std.	5
(COOH) ₂ 3 -proz.	100°, 20 Std.	40
(COONH ₄) ₂ 3 -proz.	100°, 20 Std.	25
ÄDTA 2 -proz.	20°, 24 Std.	20
ÄDTA 2 -proz.	60°, 24 Std.	25
Äthanol 90 -proz.	Sdp., 24 Std.	0
Diäthyläther	Sdp., 24 Std.	0
Propylenoxyd	20°, 168 Std.	0
Acetylaceton/Aceton/ H ₂ O (20/40/40 ml)	20°, 48 Std.	0

Bei Temperaturen über 50° wird schon viel CO₂ abgespalten. Extraktionen bei solchen Temperaturen sind daher zu vermeiden. Die decarboxylierbaren Stoffe lassen sich mit Wasser und organischen Lösungsmitteln nicht extrahieren, obwohl sie, wenn extrahiert, darin zu einem grossen Teil löslich sind. NaOH ergibt eine relativ grosse Ausbeute an decarboxylierbaren Stoffen. NaOH

⁸⁾ J. M. BREMNER & H. LEES, J. Agr. Sci. **39**, 274 (1949); A. HAMY & G. LEROY, Ann. agron. **3**, 939 (1952); J. M. BREMNER, J. Soil Sci. **5**, 214 (1954); A. E. MARTIN & R. REEVE, Chemistry & Industry **13**, 356 (1955); J. Soil Sci. **8**, 278 (1957); **9**, 89 (1958); M. SCHNITZER & J. R. WRIGHT, Canad. J. Agr. Sci. **36**, 511 (1956).

lässt sich mit Kationenaustauschern leicht entfernen, verändert die organische Substanz vielleicht aber stark. Immerhin wurde die Decarboxylierung der untersuchten Braunerde durch Schütteln in 1-n. NaOH während 24 Std. bei Zimmertemperatur unter Luftzutritt nicht verändert. Mit HCl wird mehr decarboxylierbare Substanz extrahiert als mit H₂SO₄. In 20-proz. HCl wird bei Zimmertemperatur während 24 Std. noch kein CO₂ abgespalten. HCl lässt sich aber aus dem Extrakt nicht leicht entfernen; an Anionenaustauschern blieb stets auch ein Teil der decarboxylierbaren Substanz haften. Ammonoxalat und ÄDTA (Dinatriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure) sind hier keine besonders wirksamen Extraktionsmittel.

Beim Schütteln des Bodens mit dem stark basischen Anionenaustauscher «Dowex 2» (in der OH⁻, HCO₃⁻- oder HCOO⁻-Form) in wenig Wasser wurden keine decarboxylierbaren Stoffe extrahiert, obwohl bereits extrahierte decarboxylierbare Humusstoffe von diesem Austauscher teilweise adsorbiert wurden.

Aus den B-Horizonten von Podsolen liessen sich die decarboxylierbaren Stoffe leichter extrahieren (Tab. 2) als aus dem A-Horizont der Braunerde (Tab. 1). Es ist lange bekannt⁹⁾, dass der B-Horizont des Podsol relativ reich an Fulvosäuren und arm an Huminsäuren ist. Die Humusstoffe sind zum Teil aus oberen Bodenhorizonten in den B-Horizont verlagert worden. Sie haben vermutlich ein kleineres Molekulargewicht und sind weniger leicht durch Elektrolyte flockbar.

Die Chelatbildner Acetylaceton und ÄDTA eignen sich zur schonenden Extraktion. Nach der Extraktion von Podsolproben mit Acetylaceton lassen sich dieser Chelatbildner und seine Metallverbindungen mit Äther extrahieren; in der wässrigen Phase finden sich dann gelöste und geflockte Humusstoffe neben beträchtlichen Mengen an Fe³⁺. 2,5-proz. ÄDTA-Lösung flockt bei einem pH von ca. 4,5 die Tonminerale¹⁰⁾, und die Extrakte lassen sich leicht klar zentrifugieren. Aus den ÄDTA-Extrakten lassen sich das ÄDTA, die ÄDTA-Metallchelate und die mitextrahierten anorganischen Verbindungen bei der Perkolation durch ein Mischbett von Kationen- und Anionenaustauscher vollständig entfernen. Im sauren Perkolat finden sich gelöste Humusstoffe. Ein Teil der extrahierten Humusstoffe wird jedoch vom Kationenaustauscher ausgefällt oder vom Anionenaustauscher adsorbiert.

Die Fraktionierung extrahierter Humusstoffe ist mit verschiedensten Methoden versucht worden¹¹⁾¹²⁾, bisher aber nicht befriedigend gelungen. Die decarboxylierbaren Substanzen in den Extrakten wurden nun mit verschiedensten Methoden zu fraktionieren versucht. Da das Studium niedermolekularer Stoffe leichter als das hochmolekularer Stoffe ist und da der B-Horizont von

⁹⁾ W. LAATSCH, Dynamik der mitteleuropäischen Mineralböden, Leipzig 1954.

¹⁰⁾ E. FREI & E. SCHÜTZ, Landw. Jahrbuch Schweiz **67**, 563 (1953).

¹¹⁾ S. A. WAKSMAN, Humus, Baltimore 1936; A. HOCK, Z. Pflanzenern. Düng. Bodenk. **5**, 1 (1937); W. G. C. FORSYTH, Biochem. J. **41**, 176 (1947); J. BREMNER, J. Soil Sci. **1**, 198 (1950); **5**, 214 (1954); F. J. STEVENSON, I. D. MARKS, J. E. VARNER & W. P. MARTIN, Proc. Soil Sci. Soc. Amer. **16**, 69 (1952); E. SCHLICHTING, Z. Pflanzenern. Düng. Bodenk. **61**, 97 (1953); W. FLAIG, F. SCHEFFER & B. KLAMROTH, *ibid.* **71**, 33 (1955).

¹²⁾ E. FREI, Ber. Schweiz. bot. Ger. **54**, 267 (1944).

Podsolen wohl reicher an niedermolekularen Humusstoffen als der A-Horizont von Braunerde ist, wurden vor allem Versuche an Extrakten aus dem Ortstein «Champex» ausgeführt. Dazu wurden hauptsächlich ÄDTA-Extrakte verwendet.

Tabelle 2. *Extraktion decarboxylierbarer Humusstoffe aus dem B-Horizont von Podsolen*
Extraktion von je 10 g lufttrockenem Boden mit 100 ml Flüssigkeit (Acetylacetonlösungen 120 ml); Decarboxylierung in 12-proz. HCl bei 145° Ölbadtemperatur während 4 Std.; CO₂-Abspaltung aus Ortstein «Champex» 8,0 mMol/100 g, aus Orterde «Nante» 28 mMol/100 g.

Extraktionsmittel	Extrakt.-Temp. und Dauer	CO ₂ -Abspalt. des Extraktes in % der CO ₂ -Abspalt. des gesamten Bodens
<i>Ortstein «Champex»</i>		
H ₂ O	20°, 15 Std.	7
H ₂ O	60°, 15 Std.	9
NaOH 2 -proz.	20°, 24 Std.	75
HCl 3,6-proz.	20°, 15 Std.	30
Salicylsäure 3 -proz.	20°, 20 Std.	30
ÄDTA 2,5-proz.	20°, 15 Std.	72
ÄDTA 2,5-proz.	60°, 40 Std.	72
Äthanol	20°, 15 Std.	8
Diäthyläther	Sdp., 24 Std.	3
Acetylaceton/Äthanol (20/100 ml)	20°, 30 Std.	50
<i>Orterde «Nante»</i>		
H ₂ O	20°, 15 Std.	0
H ₂ O	60°, 15 Std.	3
Acetylaceton/Aceton (20/100 ml)	20°, 30 Std.	45
Acetylaceton/Wasser (20/100 ml)	20°, 30 Std.	70

Bei der Dialyse und Elektrodialyse von ÄDTA-Extrakten aus Orterde «Nante» und Ortstein «Champex» passieren etwa die Hälfte der decarboxylierbaren Stoffe die feinporenen Zellophanmembranen. Decarboxylierbare Gruppen finden sich also in höher- und niedermolekularen Fraktionen. – ÄDTA-Extrakte aus Braunerde und Podsol wurden durch Perkolatation über «Dowex 50» in der H-Form zunächst von metallischen Kationen befreit. Dann wurde langsam über den stark basischen «Dowex 2» in der OH⁻-, HCO₃⁻- bzw. HCOO⁻-Form perkoliert. 80–90% der decarboxylierbaren Stoffe erschienen im Perkolat. An diesem Anionenaustauscher wurden auch uronsäurehaltige Polysaccharide praktisch nicht adsorbiert. Wohl gerade die gesuchten niedermolekularen Fraktionen blieben am Anionenaustauscher haften; sie liessen sich jedoch mit 1,5-n. NaOH, 0,5-n. HCl bzw. 2,5-n. HCOOH nicht eluieren. Die Versuche wurden deshalb nicht weitergeführt. Mit anderen Austauschern und Elutionsmitteln sind vielleicht bessere Resultate zu erzielen. – Aus ÄDTA-Extrakten des Ortsteins «Champex» wurden die Huminsäuren mit HCl gefällt und abfiltriert. Das Filtrat wurde durch Säulen aus 1 Teil Celit und 2 Teilen Aktivkohle perkoliert. Dann wurde nacheinander mit 0,1-n. HCl, Aceton, Methanol und Wasser bei 40° eluiert. Die farblosen bis gelbgrünen Eluate enthielten keine decarboxylierbare Substanz. Die decarboxylierbare Substanz liess sich mit 0,1-n. NaOH nur

sehr unvollständig eluieren, während FORSYTH¹³⁾ uronsäurehaltige Polysaccharide bereits mit Wasser von Aktivkohle ablösen konnte. Diese Beobachtungen sprechen gegen den Polysaccharidcharakter der decarboxylierbaren Stoffe des B-Horizontes des Podsol. – Aus den ÄDTA-Extrakten des Ortsteins «Champex» wurden mit Äthanol oder Aceton (1 Vol. Extrakt auf 10 Vol. organisches Lösungsmittel) bis 90% der decarboxylierbaren Stoffe ausgefällt. – Bei der Ausfällung mit Salzen mehrwertiger Kationen nahm die Menge an geflockter decarboxylierbarer Substanz in folgender Reihenfolge zu: Ca^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{3+} und Polyäthylimin. Bei genügender Konzentration der ÄDTA-Extrakte an Humusstoffen kann mit den drei zuletzt genannten Kationen die decarboxylierbare Substanz quantitativ ausgefällt werden.

Zur Fraktionierung wurde der ÄDTA-Extrakt aus dem Ortstein «Champex» durch Perkolation über ein Ionenaustauscher-Mischbett gereinigt und dann in acht Stufen mit konz. $\text{Ba}(\text{OH})_2$ neutralisiert. Die jeweils anfallenden Niederschläge (Fraktionen I bis VIII) wurden gereinigt. Nach der Neutralisation bis pH 7 und Abtrennung der Fraktion VIII wurden die in Lösung gebliebenen decarboxylierbaren Stoffe mit Äthanol ausgefällt (Fraktion Y). Die zuerst ausgefallenen Fraktionen waren dunkelbraun, die zuletzt ausgefallenen hellgelb. – Vor der fraktionierten Fällung mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ war der Extrakt mit Anionenaustauscher behandelt worden. Dabei ging etwas decarboxylierbare Substanz verloren. Es handelt sich dabei wohl um eine Fraktion mit relativ geringem Molekulargewicht, die hier besonders interessiert. Es wurde deshalb aus dem ÄDTA-Extrakt des Ortsteins «Champex» noch eine äthylacetatlösliche Fraktion Z gewonnen. Die isolierten zehn Humusfraktionen aus dem Ortstein «Champex» sind amorph und wasserlöslich, sie bilden mit metallischen Kationen teils lösliche und teils unlösliche Salze oder Komplexe. Sie können zu den Fulvosäuren gerechnet werden.

An diesen Fraktionen, die alle noch Gemische darstellen, wurden weitere Auftrennungen ausprobiert: Flockung aus wässriger Lösung durch steigende Mengen an organischen Lösungsmitteln, Papierchromatographie und Chromatographie der Fraktionen und ihrer Dinitrophenylhydrazin-Derivate an Silikagel-, Aluminiumoxyd- und Cellulose-Säulen. Es konnten bisher keine reinen Verbindungen isoliert werden.

In Tab. 3 sind die Elementaranalysen und Methoxylgehalte einiger dieser Humusfraktionen zusammengestellt. Bei den Fraktionen I bis VII, die durch Fällung mit steigenden Mengen $\text{Ba}(\text{OH})_2$ gewonnen wurden, nehmen der C- und Methoxyl-Gehalt ab und der O-Gehalt zu; in gleicher Richtung sind die Präparate heller, leichter in verd. HCl löslich und schwerer flockbar.

Ein Vergleich der Elementaranalysen dieser Humusfraktionen mit solchen der Literatur⁶⁾ ergibt, dass ihr C-Gehalt geringer als der von Huminsäuren und höher als der von Fulvosäuren ist. Umgekehrt ist der O-Gehalt der Fraktionen höher als der von Huminsäuren und niedriger als der von Fulvosäuren. Der N-Gehalt der Fraktionen ist geringer als die meisten Angaben der Literatur für Humin- und Fulvosäuren.

Die Humusfraktionen sind alle sauer. Die Titrationskurven zeigen undeutliche Wendepunkte bei ca. pH 8,5. Nach den in Tab. 4 angegebenen Gehalten an sauren Gruppen variieren die Äquivalentgewichte zwischen 131 und 208.

¹³⁾ W. G. C. FORSYTH, *Biochem. J.* **41**, 176 (1947).

Tabelle 3. *Elementarzusammensetzung, Asche- und Methoxylgehalt von Humusfraktionen aus dem Ortstein «Champex»*

Humusfraktion	C %	H %	O %	N %	Asche %	Summe %	—OCH ₃ %
I	52,42	3,68	40,36	0,95	3,07	100,48	1,42
III	50,63	3,21	44,74	0,59	2,16	101,33	0,67
V	49,41	3,39	47,34	0,18	0,27	100,59	0,85
VII	48,41	3,52	46,37	0,51	0,76	99,57	0,48
Y	49,25	4,36	45,15	0,99	0,97	100,72	0,77
Z	47,27	4,32	46,63	0,09	2,00	100,31	2,83

Tendenzmässig nimmt der Gehalt an sauren Gruppen mit abnehmender Flockbarkeit durch Ba(OH)₂, mit fallendem C- und Methoxyl-Gehalt und mit steigendem O-Gehalt zu. Die Rücktitration der alkalischen Lösungen der Humusfraktionen mit 0,1-n. HCl ergab praktisch die gleichen Titrationskurven wie bei der Hintitration mit 0,1-n. NaOH.

Tabelle 4. *Titration und Decarboxylierung von Humusfraktionen aus dem Ortstein «Champex»*
Titration von je 100 mg in 20 ml H₂O mit 0,1-n. NaOH bis pH 8,5; Decarboxylierung von je 100 mg in 12-proz. HCl bei 145° Ölbadtemperatur während 7 Std.

Humusfraktion	Saure Gruppen mÄq./100 g	CO ₂ -Abspaltung mMol/100 g	CO ₂ -Abspaltung in % der sauren Gruppen	Abgespaltene Molekeln CO ₂ / 100 C-Atome
I	520	166	32	3,8
II	570	162	28	—
III	600	200	33	4,7
IV	660	205	31	—
V	710	212	30	5,1
VI	730	205	28	—
VII	760	207	27	5,1
VIII	750	195	26	—
Y	480	181	38	4,4
Z	670	—	—	—

Alle Humusfraktionen werden in siedender 12-proz. HCl (Tab. 4) decarboxyliert. Nur etwa ein Drittel so viele Gruppen sind decarboxylierbar, wie titrierbar sind. Unter den gewählten Bedingungen werden von 100 C-Atomen 3,8 bis 5,1 C-Atome als CO₂ abgespalten; diese Zahl beträgt für die gesamte organische Substanz des Ortsteins «Champex» 8. Es müssen danach im Humus dieses Ortsteins noch Fraktionen vorhanden sein, die mehr CO₂ abspalten als die isolierten Fraktionen. Es wurden bereits früher aus dem Humus von Humuscarbonatböden Fraktionen mit verschiedenem Gehalt an decarboxylierbaren Gruppen gewonnen¹⁴⁾.

¹⁴⁾ P. DUBACH, G. ZWEIFEL, R. BACH & H. DEUEL, Z. Pflanzenern. Düng. Bodenk. 69, 97 (1955).

Die Fraktionen I bis IV waren in verd. HCl nicht vollständig löslich; die übrigen Fraktionen waren darin vollständig löslich. Während der sauren Decarboxylierung bildeten sich bei allen Fraktionen Huminsäure-ähnliche Niederschläge (dunkelbraun, löslich in verd. NaOH und wieder fällbar mit verd. HCl). Während der Decarboxylierung wurde kein Furfurol gebildet. Die Fraktionen spalten alle auch in siedendem Wasser CO₂ ab⁹⁾). Es bildeten sich dabei auch Niederschläge, mit etwas hellerer Farbe und in etwas geringerer Menge als in verd. HCl.

Wenn die Humusfraktionen CO₂ aus freien titrierbaren Carboxylgruppen abspalten, so sollte die Titrationsazidität nach der Decarboxylierung kleiner sein als vorher. Humusfraktionen wurden deshalb durch 7-stündiges Kochen in Wasser decarboxyliert. Dann wurde der Verbrauch an 0,1-n. NaOH bei Titration bis pH 8,5 bestimmt. Die Verminderung der Titrationsazidität war bedeutend geringer, als bei der Decarboxylierung freier Carboxylgruppen zu erwarten wäre.

IR.-Spektren wurden von Fraktion Z, ihrem Reaktionsprodukt mit CH₂N₂ und ihrem Reaktionsprodukt mit NaBH₄ und anschliessend mit CH₂N₂ (Fig. 1) aufgenommen. Da es sich um Stoffgemische handelt, zeigen die Spektren keine sehr scharfen Banden. Auf die Anwesenheit aromatischer und chinoider Bausteine kann nicht mit Sicherheit geschlossen werden. Die IR.-Spektren zeigen in dem für aromatische Verbindungen charakteristischen Bereich von 1500 bis 1600 cm⁻¹ keine deutliche Absorption¹⁵⁾. Aromatische Verbindungen ergeben auch im Bereich von 650 bis 1000 cm⁻¹ starke Absorptionsbanden. Es ist zweifelhaft, ob die breiten und schwachen Banden bei 880 und 720–730 cm⁻¹ (Fig. 1 A), bei 770 cm⁻¹ (Fig. 1 B) und bei 720–750 cm⁻¹ (Fig. 1 C) auf aromatische Strukturen zurückzuführen sind. Bei Lignin¹⁶⁾ kommen die Aromatenbanden im Bereich von 650 bis 1000 cm⁻¹ viel deutlicher zum Vorschein. Für Carboxylgruppen spricht die schwache und breite Adsorption bei 2500–2700 cm⁻¹¹⁵⁾ (Fig. 1 A). Diese verschwindet bei Veresterung (Fig. 1 B). Für Carboxylgruppen sprechen auch die Verschiebung der C=O-Absorption der Carboxylgruppe bei Veresterung von 1725 cm⁻¹ (Fig. 1 A) nach 1740 cm⁻¹ (Fig. 1 B), sowie die Abnahme der Absorption in der Gegend von 3400 bis 3600 cm⁻¹. Die nach dem Verestern bleibende Absorption in diesem Bereich deutet auf nicht verätherte Hydroxylgruppen. Die Bande bei 1450 cm⁻¹ (Fig. 1 B und 1 C) ist wohl auf die eingeführten OCH₃-Gruppen zurückzuführen. An den IR.-Spektren der Humusfraktionen lassen sich Carbonylgruppen neben Carboxylgruppen schwer erkennen. Nach Reduktion evtl. vorhandener chinoider Gruppen sollten in den IR.-Spektren Aromatenbanden auftreten. Dies ist jedoch am Spektrum der Fig. 1 C nicht erkennbar. Es ist hier eine etwas stärkere OH-Absorptionsbande bei 3400 bis

¹⁵⁾ Vgl. L. J. BELLAMY, Ultrarot-Spektrum und chemische Konstitution, Darmstadt 1955.

¹⁶⁾ K. FREUDENBERG, H. DIETRICH & W. SIEBERT, Chem. Ber. **84**, 961 (1951); S. F. KUDIZIN, R. M. DEBAUN & F. F. NORD, J. Amer. chem. Soc. **73**, 4615 (1951); G. DE STEVENS & F. F. NORD, *ibid.* **73**, 4622 (1951); U. SCHOBINGER, Diss. ETH., Zürich 1958.

3600 cm^{-1} gegenüber dem nur mit CH_2N_2 behandelten Präparat (Fig. 1 B) festzustellen. Danach hatten unverätherte OH-Gruppen durch Reduktion von Carbonylgruppen zugenommen.

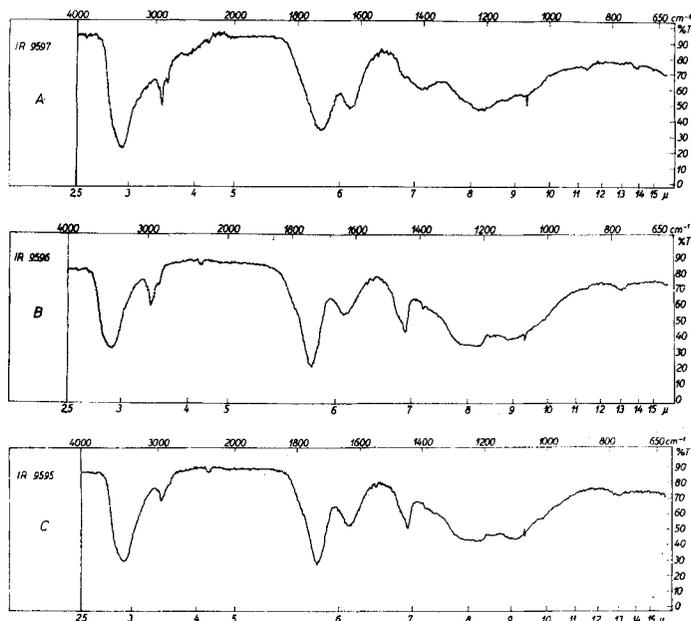


Fig. 1

IR.-Spektren der Humusfraktion Z in KBr

A: unbehandelt B: mit CH_2N_2 behandelt C: mit NaBH_4 und CH_2N_2 behandelt

Zur Bestimmung aktiver Gruppen, besonders von Gruppen, die für die leichte Decarboxylierbarkeit der Humusfraktionen verantwortlich sind, wurden noch einige Untersuchungen ausgeführt. – Sämtliche unhydrolysierte Fraktionen aus dem Ortstein «Champex» reduzierten FEHLING'sche und alkalische Silbernitratlösung. Mit Dinitrophenylhydrazin wurden in salzsaurer Lösung Niederschläge erhalten. Papierchromatographisch liessen sich in den Fraktionen sowohl vor als auch nach Hydrolyse (2-n. H_2SO_4 , 14 Std., 100°) praktisch keine Zucker nachweisen. Die reduzierenden Stoffe sind also keine Kohlehydrate.

Bei Behandlung mit CH_2N_2 nahm der N-Gehalt der Fraktionen durchschnittlich um 1% zu. 1,4-Chinone und α,β -ungesättigte Aldehyde und Ketone werden von CH_2N_2 an der Doppelbindung angegriffen und gehen in Pyrazolinderivate über¹⁷⁾. In unseren Fraktionen entfiel demnach eine solche Gruppe auf ein Äquivalentgewicht von 2800.

Die Fraktionen I, VI und VII wurden zur Reduktion von Carbonyl- und Chinongruppen mit NaBH_4 behandelt. Danach war die Decarboxylierung höchstens um 10% geringer als vorher.

Fraktion V wurde zur Ermittlung von Doppelbindungen mit einem Überschuss von Br_2 behandelt. Der Verbrauch an Br_2 war bei Zimmertemperatur nach längerer Zeit noch nicht abgeschlossen. Dem Br_2 -Verbrauch nach 30 Min. entspricht ein Äquivalentgewicht von 1200 pro Doppelbindung, nach 24 Std. ein Äquivalentgewicht von 500. Nach Addition von Br_2 können jedoch Sekundärreaktionen eingetreten sein¹⁸⁾.

¹⁷⁾ Vgl. C. D. GUTSCHE, *Organic Reactions* **8**, 385 (1954).

¹⁸⁾ Vgl. S. J. CRISTOL & W. P. NORRIS, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 632, 2645 (1953); E. GROVENSTEIN JR. & D. E. LEE, *ibid.* **75**, 2639 (1953).

Fraktion V wurde zudem in Methanol bei Zimmertemperatur mit Platinoxid als Katalysator hydriert. Die Reaktion erfolgte anfangs recht stürmisch. Nach 26 Std. war die H_2 -Aufnahme beendet. Der H-Gehalt des Präparates war von 3,39 auf 4,02% gestiegen. Dies entspricht einem Äquivalentgewicht von 315 pro Doppelbindung. Nach dieser Hydrierung war der Br_2 -Verbrauch in 24 Std. um ein Drittel kleiner als beim nicht-hydrierten Präparat. Die Frage ist offen, ob Br_2 sich an noch unhydrierte Doppelbindungen addiert bzw. substituierend oder oxydierend gewirkt hat. – Die Hydrierung von Doppelbindungen könnte zu einer verminderten Decarboxylierbarkeit führen, da z. B. α,β - und β,γ -ungesättigte Säuren sich leichter als gesättigte decarboxylieren lassen. So wird z. B. Kaffeesäure leicht decarboxyliert, Dihydro-Kaffeesäure (keine Doppelbindung in der Seitenkette) jedoch nicht¹⁹⁾. Nach eigenen Messungen decarboxyliert sich Kaffeesäure in siedender 12-proz. HCl in 4 Std. quantitativ und in siedendem Wasser in 4 Std. zu 20%. Die verwandte Zimtsäure (keine OH-Gruppen am Benzolring) decarboxyliert sich unter gleichen Bedingungen in HCl nur zu 10% und ist in Wasser stabil. Die hydrierte Fraktion V spaltet in 12-proz. HCl jedoch ebenso viel CO_2 ab wie das unhydrierte Präparat.

Die konventionellen Reaktionen auf Phenole sind an sämtlichen Fraktionen negativ ausgefallen.

UV.-Absorptionsspektren 0,1-proz. Lösungen der Fraktionen VIII und Z in Wasser und in Dioxan zeigen eine relativ starke Absorption, die gegen kleinere Wellenlängen noch zunimmt. Es treten jedoch keine Absorptionsmaxima auf.

Die bisherigen Untersuchungen genügen nicht, die Gruppen, die für die leichte Decarboxylierung der Humusfraktionen verantwortlich sind, zu identifizieren. Es könnte sich u. a. um Keto-, α,β - und β,γ -ungesättigte, heterocyclische und aromatische Hydroxycarbonsäuren handeln, deren leichte Decarboxylierbarkeit eingehend studiert worden ist²⁰⁾. Es muss auch beachtet werden, dass zahlreiche Verbindungen ohne freie Carboxylgruppen leicht CO_2 abspalten²¹⁾. Es sind auch leicht decarboxylierbare aromatische Säuren und Chinone bekannt, die von Mikroorganismen gebildet werden und an der Humusbildung im Boden beteiligt sein können²²⁾.

Bemerkenswert ist, dass synthetische Huminsäuren aus p-Benzochinon und aus Hydrochinon ähnlich wie natürliche Humusstoffe in siedender 12-proz. HCl und in siedendem Wasser decarboxyliert werden. p-Benzochinon-Huminsäuren lieferten während 4 Std. in siedender 12-proz. HCl 35 mMol $CO_2/100$ g, Hydrochinon-Huminsäuren 55 mMol $CO_2/100$ g. Auch die Decarboxylierbarkeit synthetischer Huminsäuren ist wegen mangelnder Kenntnis ihrer Konstitution²³⁾ noch nicht verständlich.

¹⁹⁾ K. GORTER, Liebigs Ann. Chem. **379**, 110 (1911).

²⁰⁾ Vgl. W. H. FULLER, W. V. BARTHOLOMEW & A. G. NORMAN, Soil Sci. **64**, 143 (1947); G. L. HUBER, Diss. ETH., Zürich 1951; H. HENECKA, in J. HOUBEN & TH. WEVL, Methoden der organischen Chemie **8**, 484 (1953); G. ZWEIFEL, Diss. ETH., Zürich 1956; R. T. ARNOLD, O. C. ELMER & R. M. DODSON, J. Amer. chem. Soc. **72**, 4359 (1950).

²¹⁾ Z. B. A. CHESHIRE, J. Intern. Soc. Leather Trades Chemists' **22**, 452 (1938); M. V. TRACEY, Biochem. J. **43**, 185 (1948); H. DAHN & H. HAUTH, Helv. **39**, 1366 (1956); TH. POSTERNAK, R. HUGUENIN & W. ALCALAY, *ibid.* **39**, 1564 (1956).

²²⁾ W. FLAIG, E. KÜSTER, G. SEGLER-HOLZWEISSIG & H. BEUTELSPACHER, Z. Pflanzenern. Düng. Bodenk. **57**, 42 (1952); R. H. THOMSON, Naturally Occurring Quinones, London 1957; W. B. WHALLEY, Progress in Organic Chemistry **4**, 72 (1958).

²³⁾ H. SCHULZE & W. FLAIG, Liebigs Ann. Chem. **575**, 231 (1952); W. FLAIG, H. SCHULZE, E. KÜSTER & H. BIERGANS, Landbouwkundig Tijdschrift **66**, 392 (1954).

Vielleicht ist bei der Bildung decarboxylierbarer Humusstoffe in vielen Fällen die Spaltung aromatischer Ringe²⁴⁾, die zu Keto- oder ungesättigten Carbonsäuren führen kann, von Bedeutung.

Die leichte Decarboxylierbarkeit ist eine allgemeine Eigenschaft des Humus; eine CO₂-Abspaltung dürfte auch unter natürlichen Bedingungen, z. B. bei der Kohlebildung²⁵⁾, stattfinden.

Experimenteller Teil

Braunerde «Koppigen»: Bodenproben aus dem intensiv durchwurzelten Teil des A-Horizontes einer Braunerde unter Dauerweide bei Koppigen, Kanton Bern. pH 6,7; organischer C 2,8%.

Ortstein «Champex»: Bodenprobe aus dem verfestigten B-Horizont eines subalpinen Podsoles unter Rhododendro-Abietetum²⁶⁾ bei Champex, Kanton Wallis. pH 4,4; organischer C 1,2%.

Orterde «Nante»: Bodenprobe aus dem dunkelbraunen B-Horizont eines subalpinen sekundären Humuspodsoles unter *Rhodoveto-Vaccinietum extrasilvaticum* bei Nante, Kanton Tessin, in der Nähe des von FREI¹²⁾ beschriebenen Podsoles. pH 4,4; organischer C 6,0%.

Kaffee- und Zimtsäure: Präparate der Firma FLUKA AG., Buchs.

p-Benzochinon-Huminsäuren: Gewonnen in CH₃COONa-Lösung nach ERDTMAN & GRANATH²⁷⁾.

Hydrochinon-Huminsäuren: Zur Verfügung gestellt von Herr Prof. Dr. E. WELTE, Göttingen.

Decarboxylierung: Die Messungen erfolgten mit einer üblichen Decarboxylierungsapparatur zur Bestimmung von Uronsäuren²⁸⁾.

Extraktion decarboxylierbarer Humusstoffe: Für die Versuche der Tab. 1 und 2 wurden je 10 g lufttrockener Boden mit 100 bzw. 120 ml Extraktionsmittellösung in 200-ml-Polyäthylenflaschen geschüttelt. Nachher wurde auf einer G-3-Glasnutsche abgesaugt und mit 100 ml Wasser gewaschen. Das Filtrat oder Zentrifugat wurde neutralisiert, im Vakuum auf 30 ml konzentriert und mit 15 ml konz. HCl in den Decarboxylierungsapparat übergespült.

Extraktion von Humusstoffen mit ÄDTA für die Fraktionierungsversuche: 2 kg lufttrockener Boden wurden in einer 4-l-Polyäthylenflasche mit 50 g ÄDTA und 2 l H₂O 15 Std. auf der Maschine bei Zimmertemperatur geschüttelt. Dann wurde sedimentieren gelassen und dekantiert, die abdekantierte Lösung wurde zentrifugiert, das Sediment zum Bodenrückstand in die Flasche gegeben und nochmals in gleicher Weise extrahiert. Die Extraktionslösung wurde klar zentrifugiert und durch eine Mischbett-Kolonne von 2 l «Dowex 50» in der H-Form und 4 l «Dowex 2» in der OH-Form perkoliert. Die braune Lösung hatte ein pH von etwas über 1, war eisen- und praktisch aschefrei.

²⁴⁾ R. B. WOODWARD, Nature **162**, 155 (1948); Angew. Chem. **68**, 13 (1956); R. ROBINSON, Nature **162**, 524 (1948); R. Y. STANIER, J. Bact. **55**, 477 (1948); R. Y. STANIER, B. P. SLEEPER, M. TSUCHIDA & D. L. MACDONALD, *ibid.* **59**, 137 (1950); W. FLAIG & H. SCHULZE, Z. Pflanzenern. Düng. Bodenk. **58**, 59 (1952); W. FLAIG, TH. PLOETZ & H. BIERGANS, Liebigs Ann. Chem. **597**, 196 (1955); O. HAYAISHI, M. KATAGIRI & S. ROTHBERG, J. Amer. chem. Soc. **77**, 5450 (1955); W. MAYER, R. BACHMANN & F. KRAUS, Chem. Ber. **88**, 316 (1955); O. TH. SCHMIDT & W. MAYER, Angew. Chem. **68**, 103 (1956); H. S. MASON, Adv. Enzymology **19**, 79 (1957); J. C. SALFELD, Angew. Chem. **69**, 723 (1957).

²⁵⁾ Vgl. D. W. VAN KREVELEN & J. SCHUYER, Coal Science, Amsterdam 1957; H. G. SCHÄFER, Freiburger Forschungshefte **A 80**, 136 (1958).

²⁶⁾ R. BACH, R. KUOCH & R. IBERG, Mitt. Schweiz. Anstalt forstl. Versuchswesen **30**, 299 (1954).

²⁷⁾ H. ERDTMAN & M. GRANATH, Acta chem. scand. **8**, 811 (1954).

²⁸⁾ G. L. HUBER, Diss. ETH., Zürich 1951.

Fraktionierte Fällung mit Bariumhydroxyd: Der ÄDTA-Extrakt aus dem Ortstein «Champex» wurde in 8 Stufen (Fraktionen I bis VIII) mit konz. $\text{Ba}(\text{OH})_2$ neutralisiert; die bei pH 1,8; 2,0; 2,5; 3,1; 3,7; 4,7; 6,4 und 7,0 ausfallenden Fraktionen wurden jeweils abzentrifugiert und mit Wasser gewaschen. Das Waschwasser wurde zur abgetrennten Lösung gegeben. Mit «Dowex 50» in der H-Form wurde durch Schütteln und dann durch Perkolation das Ba^{2+} entfernt; die Fraktionen gingen dabei wieder in Lösung. Dann wurde mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ umgefällt, mit Wasser gewaschen und das Ba^{2+} wieder mit «Dowex 50» entfernt. Die gut wasserlöslichen, stark sauren Fraktionen wurden nach Konzentrierung der Lösungen im Vakuum gefriergetrocknet. – Nach Neutralisation mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ bis pH 7 und Abtrennung der Fraktion VIII wurde die restliche, hellgelbe Lösung bis zur leichten Trübung konzentriert und durch Zugabe des 5fachen Vol. 95-proz. Äthanol die Fraktion Y ausgefällt. Diese Fraktion wurde abzentrifugiert, in Wasser gelöst, mit «Dowex 50» von Ba^{2+} befreit und gefriergetrocknet.

Gewinnung einer Äthylacetat-löslichen Fraktion: Ein ÄDTA-Extrakt aus dem Ortstein «Champex» wurde mit «Dowex 50» in der H-Form von metallischen Kationen befreit, konzentriert, gefriergetrocknet und 48 Std. im Soxhlet mit Äther extrahiert. Es lösten sich nur wenig Substanzen in Äther; diese wurden verworfen. Der Rückstand wurde in Dioxan geschüttelt, worin er sich nach Zusatz von 10% Wasser löste. Die dunkelbraune Lösung wurde zentrifugiert und das Dioxan im Vakuum abdestilliert. Spuren von Dioxan wurden durch wiederholtes Auswaschen des Rückstandes mit Äther entfernt. Der Rückstand wurde darauf mit kleinen Portionen von 40° warmem Äthylacetat extrahiert; es wurde eine rote, klare Lösung erhalten. Beim Abkühlen der stark konzentrierten Lösung entstand eine gelbliche Flockung, die beim Erwärmen wieder verschwand. Aus der konzentrierten Lösung wurde der Extrakt im 10fachen Vol. Petroläther gefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet. Es resultierte ein oranges Pulver, das in Äthylacetat und in Wasser völlig löslich und stark sauer war (Fraktion Z).

Titrationen: Je 100 mg der im Hochvakuum während 48 Std. bei Zimmertemperatur getrockneten Humusfraktionen wurden in 20 ml H_2O gelöst und in N_2 -Atmosphäre mit 0,1-n. NaOH titriert und mit 0,1-n. HCl zurücktitriert.

Umsetzungen mit Diazomethan: Die Humusfraktion wurde in abs. Methanol gelöst, mit einem Überschuss an CH_2N_2 in Äther versetzt und 24 Std. bei 0° stengelassen. Dann wurden Lösungsmittel und CH_2N_2 im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde in wenig Chloroform gelöst, es wurde filtriert und das Filtrat im ca. 200-fachen Vol. Äther gefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit Äther gewaschen und im Hochvakuum bei Zimmertemperatur getrocknet. Das Reaktionsprodukt war neutral, wasserunlöslich und löslich in Methanol und Chloroform.

Reduktionen mit Natriumborhydrid: Es wurden die Fraktionen I, VI und VII mit NaBH_4 während 3 Std. bei Zimmertemperatur in 0,1-n. NaOH²⁹⁾ bzw. bei einem AnfangspH von 7,2 reduziert. Nach der Reduktion wurde das überschüssige NaBH_4 mit H_2SO_4 zerstört, es wurde neutralisiert, im Vakuum konzentriert und mit siedender 12-proz. HCl decarboxyliert. – Fraktion Z wurde in Wasser bei einem AnfangspH von 7,2 unter Einleitung von N_2 und leichtem Erwärmen mit NaBH_4 reduziert und mit «Dowex 50» in der H-Form von metallischen Kationen befreit. Darauf wurde mit CH_2N_2 wie oben behandelt. Beim Abdestillieren im Vakuum liess sich die Borsäure als Methylester völlig entfernen. Das aschefreie, reduzierte und veresterte Präparat wurde in Chloroform gelöst und durch Zusatz von Äther ausgefällt.

Addition von Brom: Die methanolische Lösung von 5 ml Br_2 pro l wurde nach Vorschrift³⁰⁾ gewonnen. 50 mg Fraktion V wurden in 15 ml abs. Methanol gelöst und mit 5 ml Br_2 -Lösung versetzt und 30 Min. bzw. 24 Std. bei Zimmertemperatur in der Dunkelheit reagieren gelassen. Dann wurden 15 ml 10-proz. KJ und 50 ml H_2O zugegeben, und es wurde mit 0,1-n. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ titriert.

²⁹⁾ E. H. JENSEN, A Study on Sodium Borohydride, Copenhagen 1954.

³⁰⁾ H. ROTH, in J. HOUBEN & TH. WEYL, Methoden der organischen Chemie 2, 305 (1953).

Hydrierung: Es wurden 100 mg Platinoxid³¹⁾ in 50 ml abs. Methanol in H₂-Atmosphäre unter Schütteln reduziert, bis kein H₂ mehr aufgenommen wurde. Dann wurden 200 mg Fraktion V aus einem seitlichen Reservoir zugegeben und unter Schütteln reagieren gelassen, bis kein H₂ mehr aufgenommen wurde (ca. 26 Std.). Darauf wurde die Lösung abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingedampft.

Die Mikroanalysen der Tab. 3 wurden von Herrn A. BERNHARDT, Mikroanalytisches Laboratorium am MAX-PLANCK-Institut für Kohlenforschung, Mülheim (Ruhr), ausgeführt. Die IR.-Spektren wurden im Organisch-chemischen Laboratorium der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich, aufgenommen. Herrn Dr. B. ENGEL dieses Laboratoriums danken wir für die Interpretation der Spektren und Herrn Prof. Dr. E. WELTE, Universität Göttingen, für die Überlassung von Hydrochinon-Huminsäure. – Diese Arbeit wurde durch Mittel aus den *Arbeitsbeschäftigungskrediten des Bundes* ermöglicht; wir danken für diese Unterstützung.

SUMMARY

Aqueous solutions of NaOH, HCl, and metal chelates are suitable for the partial extraction of decarboxylating substances from the A-horizon of a brown earth and the B-horizon of two podsols. Temperatures above 50° are not to be used for extraction, since otherwise decarboxylation already commences. The decarboxylating substances were more easily extractable from the podsol than from the brown earth. The organic substances of the podsol are richer in decarboxylating groups than those of the brown earth.

Various fractionation methods were tried on ethylene-diamine tetraacetate extracts of these soils, especially fractional precipitation with increasing amounts of Ba(OH)₂.

Ten water soluble, acidic, and decarboxylating fractions were isolated from the B-horizon of a podsol. The more the Ba(OH)₂ necessary for flocculation, the paler, the poorer in carbon and methoxyl groups, and the richer in oxygen and acidic and decarboxylating groups were the fractions.

All ten fractions decarboxylated in boiling 12 pc. HCl and in boiling water. The fractions formed humic-acid-like precipitates in the process of decarboxylation. By reduction with NaBH₄ and by hydrogenation there was scarcely any decrease in decarboxylating groups.

Carboxyl, carbonyl, and hydroxyl groups, and double bonds were identified in the fractions by various reactions and by IR.-spectroscopy. On the other hand aromatic and quinoid nuclei could not be definitely identified. Only a very small part of the carbonyl groups could be attributed to carbohydrates. Uronic acids could not be detected in the fractions.

The structural units responsible for the ready decarboxylation of the humus fractions and of synthetic humic acids are as yet unknown.

Agrikulturchemisches Institut
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

³¹⁾ R. ADAMS & R. L. SHRINER, J. Amer. chem. Soc. **45**, 1071 (1923); **46**, 1683 (1924).