

た。これは、元素組成における窒素含量の変化と軌を一にしている。

このように、アミノ酸の収量は腐植酸の型や腐植化度によって異なっていたが、アミノ酸の構成比はいずれもよく類似しており、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、アラニンなどが主なものであった。

加水分解性の全窒素含量、フェノール、ヘキソース、ウロン酸などの量とRFとの間にも、図2-41と同様な関係が認められている。なお、石灰質土壌の腐植酸においては、ヘキソースまたはウロン酸の含量とRFとの間の負の相関がとくに高く、またウロン酸とヘキソースの含量比は他の土壌腐植酸よりも明らかに高かった。これには、石灰質土壌における高pHおよびカルシウムイオンとの錯形成が関係すると考えられる。

上記の各化合物態炭素の合計は全炭素の10ないし31%を占める。これと官能基の炭素とを合わせると、全炭素の半分以上がこれらの炭素によって説明されることになる。

2-5-4 KOH 分解生成物

腐植酸の構成成分を解析するため、上述の加水分解よりもさらに強い分解法、すなわち、封管中180°Cで腐植酸を濃KOH (KOH 2g, 水 0.4ml)によって分解し、生成物をガスクロマトグラフィーとマスマスペクトロメトリーにより、同定・定量した。表2-32に分解生成物の収量を、また表2-33にこれらの収量とRFおよびプロトカテキ酸とコハク酸の収量との間の相関を示した。いずれの分解生成物の収量もRFとの間に有意な相関があり、腐植化度が高くなるほど収量は減少する傾向がみられた。

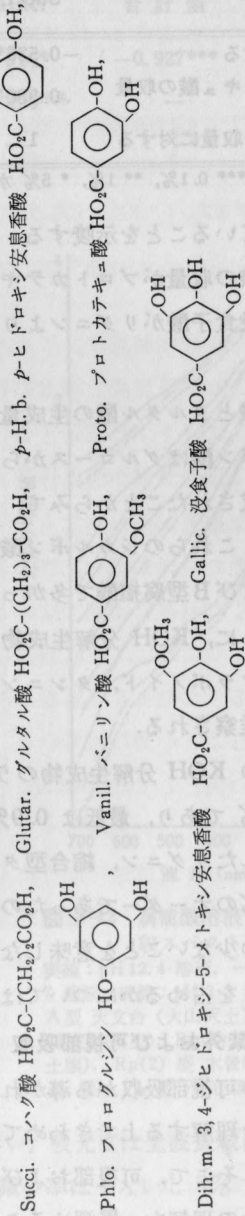
プロトカテキ酸、*p*-ヒドロキシン安息香酸、バニリン酸、3,4-ジヒドロキシン-5-メトキシ安息香酸の各収量の間には高い正の相関があり、したがってこれらは同一のグループに属する分解生成物とみることができる。これらのフェノール性酸は腐植酸中のリグニン構造に由来すると推定される。

p-ヒドロキシン安息香酸の収量は、草木植生下の土壌から得られたRp(1)型で高く、木本植生下の土壌およびA₀層の腐朽植物遺体から得られたB型およびRp(2)型では比較的低かった。また、フラボノイド、縮合型タンニンなどに由来すると推定されるフロログルシンは、木本植生と関係をもつB型とRp(2)型から多く生成された。これらのことは、腐植酸の構造に植生がかなり影響を

表 2-32 腐植酸の KOH 分解生成物の収量 (各型の平均) (me/g)

型	試料数	Succi.	Glutar.	<i>p</i> -H. b.	Phlo.	Vanil.	Proto.	Dih. m.	Gallic.	合計	エーテル可溶物
A	4	6.42	1.15	1.38	0.32	0.56	3.40	0.09	0.08	13.4	180
B	4	11.2	2.23	2.30	3.17	0.81	5.84	0.47	0.30	26.3	281
P ₀	1	9.94	1.69	3.49	2.73	0.57	4.81	0.55	0.47	24.3	229
Rp(1)	4	9.68	2.80	5.64	0.57	1.36	9.46	2.21	1.02	32.7	248
Rp(2)	2	8.38	1.67	2.19	4.83	1.23	8.78	1.09	0.26	28.7	194

分析した試料数が少ないので、他の表のようにA型およびRp(1)型を土壌の種類によって細分することはしなかった。



計算は Tsumaki-Kuwatsuka (1979 b) のデータを用いて行なった。

表 2-33 各種 KOH 分解生成物収量の RF 値および

	Succi.	Glutar.	p-H. b.	Phlo.
RF に対する	-0.536*	-0.592*	-0.683**	-0.448 ^{N.S.}
プロトカテキユ酸の収量 に対する	0.380 ^{N.S.}	0.433 ^{N.S.}	0.778***	0.258 ^{N.S.}
コハク酸の収量に対する	1	0.772***	—	—

有意水準：*** 0.1%, ** 1%, * 5% 水準で有意, N.S. 5% 水準で有意でない。

およぼしていることを示唆する。

没食子酸の収量がプロトカテキユ酸の収量との間に有意な相関を示さなかったのは、没食子酸がリグニンよりもむしろタンニンに由来することによると思われる。

コハク酸とグルタル酸の生成量の間には、高い正の相関がみられた。これらのジカルボン酸はグルコースから調製した人工腐植酸と人工ヒューミンからも同程度生成されたことからみて、これらは糖類の褐変物に由来する可能性がある。なお、これらのジカルボン酸の収量は、腐植化過程の中間に位置する Rp(1) 型および B 型腐植酸で多かった。

このように、KOH 分解生成物の組成からみると、腐植酸の構造中には、リグニン、フラボノイド、タンニン、および糖の褐変物に由来する構造が含まれていると推察される。

腐植酸の KOH 分解生成物のうち、構造が同定されたものの収量の合計は、最高 3.8% であり、最低は 0.9% にすぎない。しかし、比較のために同じ条件で分解したリグニン、縮合型タンニン、人工腐植酸等からも、分解生成物の収量は数%のオーダーであったので、収量の低いことは必ずしも上に推察した構造部分の少ないことを意味しない。これらの構造部分が腐植酸中でどれほどのウェイトを占めるかについては、さらに綿密な研究が必要である。

2-5-5 紫外および可視部吸収

腐植酸の可視部吸収から導かれた腐植化度 (RF) と分類法が腐植酸の諸性質の遷移を理解する上できわめて有効であることは、これまでの記述から明らかである。そこで、可視部および紫外部吸収の発現機構に関する研究は、諸性質の遷移性の理解を一層深めることに役立つことであろう。また、この種の研

プロトカテキユ酸とコハク酸収量に対する相関係数

Vanil.	Proto.	Dih. m.	Gallic.	合計値	エーテル 可溶物
-0.774***	-0.809***	-0.645**	-0.514*	-0.927***	-0.764***
0.832***	1	0.593**	0.425 ^{N.S.}	—	—
—	—	—	—	—	—

究は、暗色高分子とされる腐植物質の実体の究明にとり不可欠である。

ここでは、腐植酸の解離基とカルボニル基が紫外および可視部吸収にどのように寄与しているかについて検討した結果と、腐植酸の光吸収機構に関する考察を述べる。

a) 腐植酸の解離状態による吸光曲線の変化

図 2-42 は、アルカリ性 (pH 12.4)、中性 (pH 7)、酸性 (pH 3.3) の等濃度腐植酸溶液の吸光曲線である。この図では縦軸は各腐植酸ごとに適宜にとって図示した。各型腐植酸の吸光能を比較するため、表 2-34 に、等濃度のアルカリ溶液の波長 600 および 230 nm の RF と吸光度を例示した。

吸光能は、Rp(2) 型 ≅ Rp(1) 型 < B 型 < A 型の順であるが、吸光能の差は可視部 (600 nm) のほうが紫外部 (230 nm) よりもはるかに大きい。なお、RF と $E^{1\%}$ の値はほぼ比例している。

アルカリ性から中性への pH の低下に伴い、吸光度は全波長域にわたって減少するが (図 2-42)、紫外部 (230 nm) の減少率は 1 ないし 5% であるのに対し、可視部 (600 nm) では 24 ないし 37% であった。後述するように、腐植

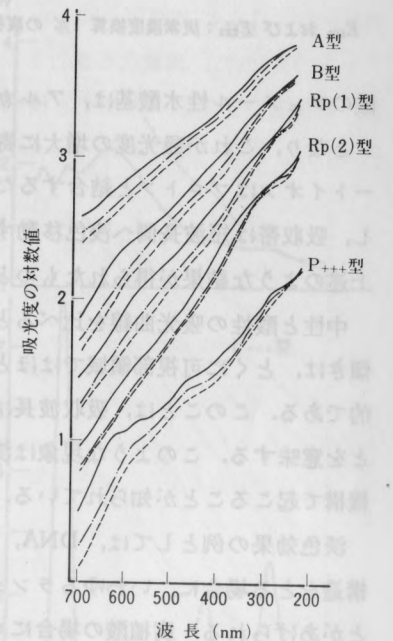


図 2-42 腐植酸溶液の pH と吸収スペクトルの関係
実線：pH 12.4 溶液、一点鎖線：pH 7 溶液、破線：pH 3.3 溶液
A 型 天文台 (火山灰土)、B 型 東山 (褐色森林土)、Rp(1) 型 安城 (水田土壌)、Rp(2) 型 木曾駒 (森林土壌 A₀ 層)、P₊₊₊ 型 Pg 色素

表 2-34 腐植酸アルカリ溶液の吸光係数

試料	型	RF ₆₀₀	RF ₂₃₀	E ₆₀₀	E ₂₃₀
猪之頭	A	138	1316	86.2	822
東山(A)	B	47	892	32.9	624
安城	Rp(1)	21	820	13.2	542
木曾駒	Rp(2)	20	632	14.3	452
燕	P ₊	69	946	38.6	529

$$RF_{600} \text{ および } RF_{230} : RF_{600}(RF_{230}) = \frac{K_{600}(K_{230}) \times 1000}{(\text{腐植酸溶液 } 30 \text{ ml 当りの } 0.1 \text{ N KMnO}_4 \text{ 消費量 ml})}$$

E₆₀₀ および E₂₃₀ : 炭素濃度換算 1% の腐植酸溶液の 600 nm および 230 nm 吸光度

酸のフェノール性水酸基は、アルカリ性溶液では解離してフェノレート陰イオンとなり、これが吸光度の増大に寄与する。この溶液を中和すれば、フェノレートイオンはプロトンと結合するため、腐植酸中のπ電子のひろがりも縮小し、吸収帯は短波長側へ浅色移動する。浅色効果は長波長側ほど著しいため、上述のような結果が得られたものと思われる。

中性と酸性の吸光曲線を比べると、吸光度は同様に減少しているが、曲線の傾きは、とくに可視部領域ではほとんど変わらず、吸光曲線の変化は平行移動的である。このことは、吸収波長はあまり変化せず、吸収強度のみ減少したことを意味する。このような現象は淡色効果と称され、上述の浅色効果とは別の機構で起こることが知られている。

淡色効果の例としては、DNA、ポリペプチドなどがヘリックスなどの規則構造をとる場合に、いわゆるランダムコイルに比べて吸光度が著しく小さいことがあげられる。腐植酸の場合にも、カルボキシル基がほとんど解離した中性状態と、解離の抑制された酸性状態とは、分子形が著しく異なるであろう。pH による還元粘度の変化(図 2-21)はこの考えを支持する。中性から酸性にかけての吸光度の減少は、このような分子形の変化によるところが大きいと思われる。また、酸性溶液では、酸素、窒素などのヘテロ原子の非結合電子はプロトンの攻撃を受けるため、その n→π* 遷移が抑制される(サンドルフィ 1963) ことも、吸光度低下の一因であろう。

なお、図 2-42 に示したように、P型腐植酸に特有な吸収帯は、pH の低下によって浅色移動し、かつ不明瞭となる。したがって、腐植酸の吸光曲線を

中性ないし弱アルカリ性溶液で測定するならば(たとえば Kononova (管野ら 1966) は pH 7.2~9.8 を推奨している)、この吸収帯はほとんど観察できないことになる。

b) アルカリ性-中性差スペクトル

pH 変化に伴う吸光曲線の変化は、差スペクトルの測定によって、より詳しく調べることができる。また、この差スペクトルは腐植酸の型によって相違し

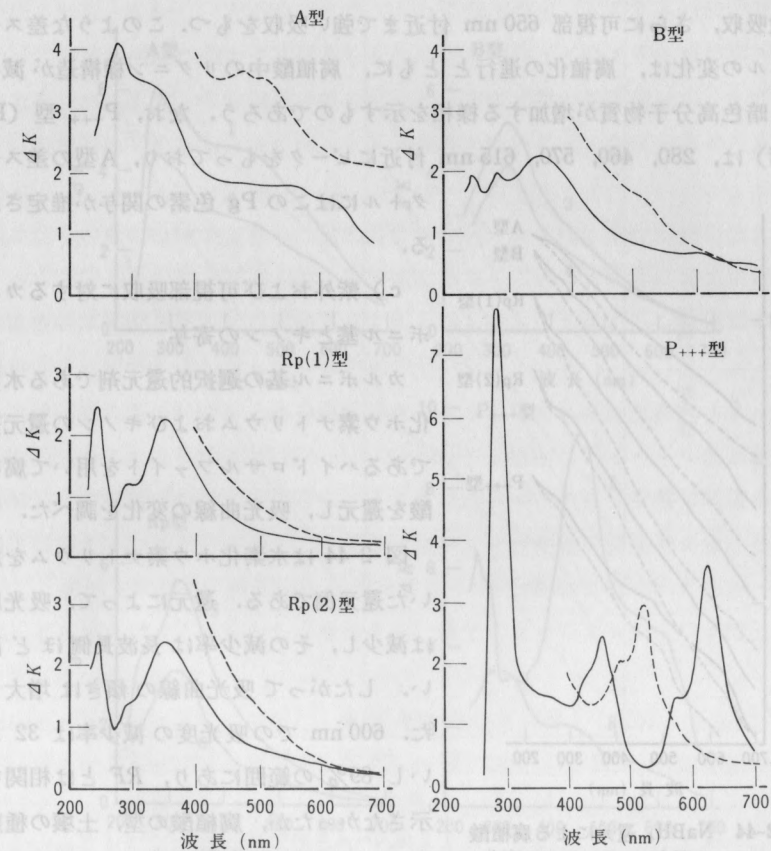


図 2-43 腐植酸のアルカリ性-中性差スペクトル(濃度 0.1%)

実線: 未還元腐植酸, 破線: ハイドロサルファイト還元腐植酸

A型 長染P(石灰質土壌), B型 蘭刈(褐色森林土), Rp(1)型 金生山OH(石灰質土壌), Rp(2)型 東山FH(褐色森林土 A₀層), P₊₊₊型 燕腐植酸中のPg色素(腐植質埋没土)

ている。

図 2-43 に、アルカリ性-中性差スペクトル (pH 7 の腐植酸溶液を対照とし、pH 12.4 の同濃度溶液の吸光スペクトルを測定したもの) を例示した。破線は還元腐植酸のものであり、これについては後に述べる。

Rp 型および B 型腐植酸の差スペクトルは、250、300 および 360 nm にピークをもち、これらはリグニンと共通する。腐植化度の上昇とともにこれらのピークはブロードになる。一方、A 型では 280 nm のピーク、350 nm 付近の強い肩状吸収、さらに可視部 650 nm 付近まで強い吸収をもつ。このような差スペクトルの変化は、腐植化の進行とともに、腐植酸中のリグニン様構造が減少し、暗色高分子物質が増加する様相を示すものであろう。なお、P₊₊₊ 型 (Pg 色素) は、280、460、570、615 nm 付近にピークをもち、A 型の差スペクトルにはこの Pg 色素の関与が推定される。

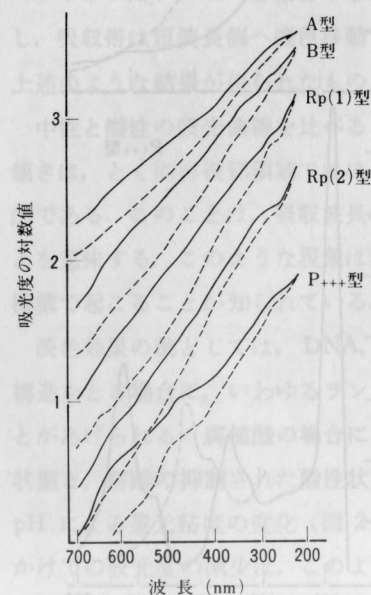


図 2-44 NaBH₄還元による腐植酸の吸収スペクトルの変化
pH 10.2 ホウ酸緩衝液中、NaBH₄濃度 0.2%。実線、破線は図 2-43 と同じ。
A 型 天文台(火山灰土)、B 型 東山(褐色森林土)、Rp(1) 型 安城(水田土壌)、Rp(2) 型 木曾駒(森林土壌 A₀層)、P₊₊₊ 型 Pg 色素

c) 紫外および可視部吸収に対するカルボニル基とキノンの寄与

カルボニル基の選択的還元剤である水素化ホウ素ナトリウムおよびキノンの還元剤であるヒドロサルファイトを用いて腐植酸を還元し、吸光曲線の変化を調べた。

図 2-44 は水素化ホウ素ナトリウムを用いた還元例である。還元によって、吸光度は減少し、その減少率は長波長側ほど高い。したがって吸光曲線の傾きは増大した。600 nm での吸光度の減少率は 32 ないし 89% の範囲にあり、RF とは相関を示さなかったが、腐植酸の型、土壌の種類などによる違いが認められた。すなわち、

Rp(2) 型腐植酸、石灰質土壌由来の腐植酸、P_{±~#} 型腐植酸およびグルコース人工腐植酸では、それぞれ同程度の RF 値をも

つ他の腐植酸に比べて 600 nm の吸光度減少率が大きかった。これらの腐植酸では、可視部の光吸収に対するカルボニル基の寄与が大きいと言える。一方、水田土壌由来の腐植酸では、吸光度の減少率が低かった。なお、石灰質土壌と水田土壌の腐植酸の減少率の大きさはカルボニル基含量(表 2-29)の多少とよく符合している。

腐植酸の水素化ホウ素ナトリウム還元による差スペクトルを図 2-45 に例示した。Rp 型と B 型は 320 nm にピークをもち、リグニンに似ている。A 型で

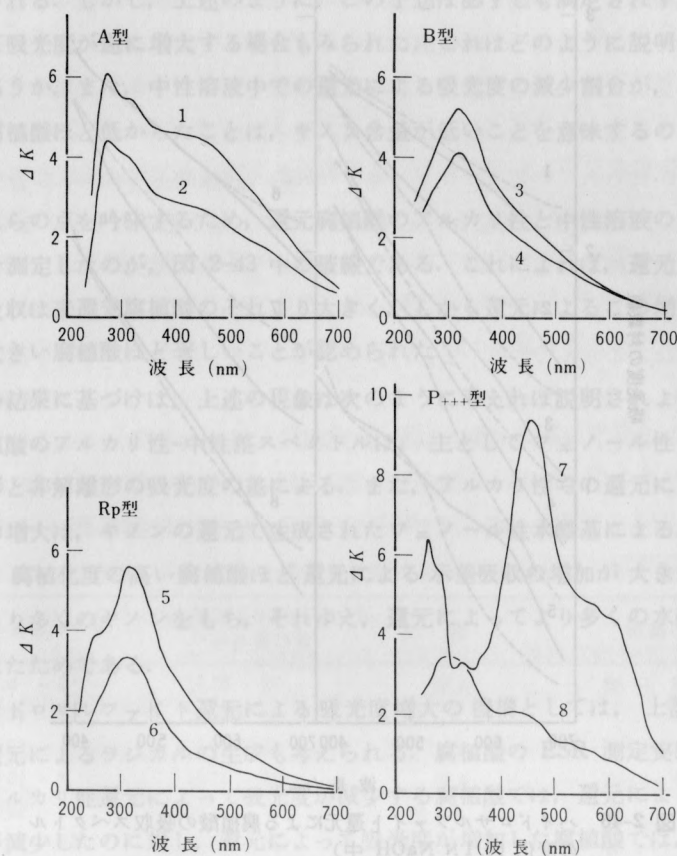


図 2-45 腐植酸の NaBH₄還元による差スペクトル (濃度は 0.1%)
1 長楽P(石灰質土壌)、2 猪之頭(火山灰土)、3 金生山F(石灰質土壌)、4 關苧(褐色森林土)、5 東山 FH(褐色森林土 A₀層)、6 岐阜(水田土壌)、7 Pg 色素(P₊₊₊型)、8 燕(腐植質埋没土、P_±型)

は、280 nm 付近にピークがあり、320 nm 付近と 400 nm 付近に肩状吸収がみられる。この A 型の差スペクトルは Pg 色素の差スペクトル (260 nm にピーク、280 nm に肩状、450 nm にピーク、570 および 620 nm に肩状吸収) に似ており、このことから A 型にペリレンキノン様構造の存在が示唆される。

0.1 N NaOH 中、ハイドロサルファイト還元による吸光曲線の変化を、図 2-46 に示した。なお、この還元剤は紫外部に吸収をもつので、可視部のみ測定した。

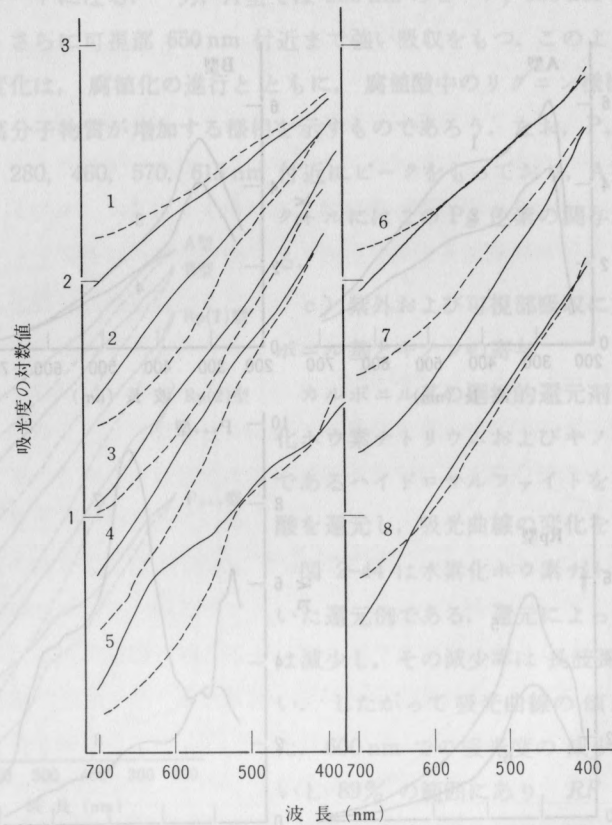


図 2-46 ハイドロサルファイト還元による腐植酸の吸収スペクトルの変化 (0.1 N NaOH 中)

実線：対照，破線：還元腐植酸

1 天文台(火山灰土，A型)，2 東山(褐色森林土，B型)，3 安城(水田土壌，Rp(1)型)，4 木曾駒(森林土壌 A₀層，Rp(2)型)，5 Pg 色素，6 金生山 P (石灰質土壌 Na₄P₂O₇抽出，A型)，7 金生山 F (石灰質土壌 NaF 抽出，B型)，8 金生山 OH(NaOH 抽出，Rp(1)型)

この還元により、P₂₋₄型、石灰質土壌由来以外の Rp 型および B 型では、可視部吸収は減少した。しかし、A 型および石灰質土壌由来の腐植酸の大部分では、可視部吸収が逆に増大した。

0.1 N NaOH の代わりに pH 7 のリン酸緩衝液中で還元を行なった場合には、すべての腐植酸で吸光度は減少したが、減少割合は RF 値の大きい腐植酸ほど低かった。

キノンを還元すれば、可視部吸収帯は浅色移動し、吸光度は減少することが予想される。しかし、上述のように、この予想は必ずしも満足されず、還元によって吸光度が逆に増大する場合もみられた。これはどのように説明されるのであろうか。また、中性溶液中での還元による吸光度の減少割合が、RF の大きい腐植酸ほど低かったことは、キノン含量が低いことを意味するのであろうか。

これらの点を吟味するため、還元腐植酸のアルカリ性と中性溶液の差スペクトルを測定したのが、図 2-43 中の破線である。これによれば、還元腐植酸の示差吸収は未還元腐植酸のそれより大きく、しかも還元によるこの増加は RF 値の大きい腐植酸ほど著しいことが認められた。

この結果に基づけば、上述の現象は次のように考えれば説明されよう。

腐植酸のアルカリ性-中性差スペクトルは、主としてフェノール性水酸基の解離形と非解離形の吸光度の差による。また、アルカリ性での還元による示差吸収の増大は、キノンの還元で生成されたフェノール性水酸基による。したがって、腐植化度の高い腐植酸ほど還元による示差吸収の増加が大きかったのは、より多くのキノンをもち、それゆえ、還元によってより多くの水酸基が生成されたためである。

ハイドロサルファイト還元による吸光度増大の機構としては、上記のほか、還元によるラジカルの生成も考えられる。腐植酸の ESR 測定実験によれば、アルカリ性還元によって吸光度が減少する腐植酸では、還元によってラジカルが減少したのに対し、還元によって吸光度が増加した腐植酸では、ラジカルも増加し、しかもこのラジカルは非常に安定であったからである(筒木潔、未発表)。なお、ラジカルは未還元腐植酸にも含まれており、紫外および可視部吸収の発現に寄与しているであろう。