

3-2 非腐植物質の分離分析方法

前項では土壤有機物中の腐植酸とフルボ酸の分離方法について述べたが、この項ではより非腐植物質の性格の強い多糖類、リグニン由来のフェノール性化合物、脂質成分、アミノ化合物等の分離分析法について述べる。

1. 土壤中性糖の分析法

土壤中の糖成分は植物成分に由来するものと微生物の菌体や代謝成分に由来するものがあり、植生や土地利用の履歴によって糖組成に特徴が表れる。土壤中の糖成分は加水分解した後、高速液クロ¹⁾やガスクロ²⁾などの方法によって分析される。加水分解の方法としては硫酸による加水分解やトリフルオロ酢酸による分解が行われるが、硫酸による非セルロース型とセルロース型糖の逐次加水分解が古くから最も多く行われている³⁾。高速液クロ法とガスクロ法を比べると液クロ法は誘導体を調製しなくてもよいという利点はあるが、ポンプ、糖専用カラム、蛍光検出器などの分析システムが高額となる。ガスクロにおいては揮発性誘導体を調製しなくてはならないが、液クロよりも導入しやすいし高感度分析が可能である。また化合物の分離はキャピラリーガスクロが最も優れている。ここでは硫酸によって逐次加水分解した糖をアルジトールアセテートへと誘導し、キャピラリーガスクロによって分析する方法を述べる。

1.1 非セルロース型糖

100 ml ガラス三角フラスコに風乾土 2 g をはかり取り、2.5 M 硫酸を 40 ml 加え、環流冷却器を取り付け、沸騰水浴上で 20 分環流する。冷却後ガラス遠心管に移し 1500 rpm で 10 分間遠心分離する。上澄みを 100 ml ガラス三角フラスコに移す。加水分解を行った三角フラスコ内の土壤残渣を蒸留水で遠心管に洗い込み、もう一度遠心分離する。上澄液は 1 回目の上澄液と合わせる。残渣は続いてセルロース型糖の加水分解に供するために保存する。この上澄液に内部標準として 2-デオキシ-D-グルコース 1 mg ないしミオイノシトール 1 mg を加える (1 g/l 溶液から 1 ml を添加)。この上澄液から約 20 ml を取り、XAD-7HP 樹脂を 3 ml 充填したカラムに通過させ、さらに炭酸バリウムを 10 g 加えて中和し、硫酸塩イオンを除去する。これをアドバンテック No. 6 濾紙で濾過し、メタノールで残渣を洗い込む。濾液は 100 ml ナス型フラスコに移し、ロータリーエボレーターで 40℃ で減圧乾固する。これに水素化ホウ素ナトリウム 20 mg を 2 ml の水に溶かして加え 1 晩放置する。陽イオン交換樹脂 Dowex HCR-W 2 を 3 ml 充填したカラ

ムに通し、100 ml ナス型フラスコに受ける。酢酸 0.2 ml およびメタノール 2 ml を加え 40℃ で減圧乾固する。この操作を 2 回繰り返す。塩酸：メタノール (1 : 1000) を 2 ml 加え 40℃ で減圧乾固する。この操作を 2 回繰り返す。メタノールを加えて溶解しネジ口試験管に移し 30℃ で減圧乾固し、真空乾燥機中で 30 分乾燥させる。ピリジン 0.1 ml および無水酢酸 0.1 ml を加え、密栓しアルミブロックヒーターで 120℃ で 20 分加熱する。放冷後減圧乾固する。メチレンクロライドを 1 ml 加え減圧乾固する。この操作を 2 回繰り返す。メチレンクロライド 0.1 ml に溶解し 1 μl をキャピラリーガスクロで分析する。

1.2 セルロース型糖

非セルロース型糖の加水分解残渣土壤に蒸留水 10 ml を加えて攪拌し遠心分離する。この操作を 2 回繰り返す。上澄液は捨てる。沈殿部は凍結乾燥し、これに 13 M 硫酸を 2 ml 加え、16 時間室温で放置する。蒸留水 50 ml で 100 ml ガラス三角フラスコ中に洗い込む。硫酸濃度は 0.5 M となる。これに環流冷却器を取り付け沸騰水浴上で 5 時間環流する。冷却後遠心管に移しその後は非セルロース型糖の場合と同様に処理する。

キャピラリーガスクロの条件：カラムは Chrompack CP-Sil 43CB 0.25 mm × 25 m。カラム温度は 195℃ から 225℃ まで毎分 6℃ 昇温しその後 11 分 225℃ を保持する。注入口温度は 270℃、FID 検出器温度は 300℃ とする。キャピラリーカラム以外にも 3% ECNSS-M/Gaschrom Q を充填したガラスカラムでも分析できる²⁾。

2. フェノール性化合物

土壤有機物をアルカリ分解すると各種のフェノール性化合物が得られる。これらは主としてリグニン成分から分解生成したものであり、その由来した植物の種類によってフェノール性化合物組成には著しい特徴がある⁴⁾。ここに述べる方法では *p*-ヒドロキシ安息香酸、*p*-ヒドロキシベンズアルデヒド、*p*-ヒドロキシアセトフェノン、バニリン酸、バニリン、アセトバニロン、シリンガ酸、シリンガルアルデヒド、アセトシリンゴン、*p*-クマール酸、フェルラ酸、フロログルシノールなどのフェノール性化合物が分析される。

2.1 酸化銅アルカリ分解によるフェノール性化合物の分析⁵⁾

外径 9 mm のバイレックス標準管を用いバーナーで片側を丸く閉じた長さ約 25 cm の試験管を作る。これに炭素 10 mg 相当の試料と酸化銅 + モール塩混合物 (5 : 1) 100 mg と 2 M NaOH 1.0 ml を加える。この後、この試

験管の上から7 cmほどの所をバーナーで加熱してくびらせる。これを氷と塩を入れたビーカーの中央に立て、スタンドとクランプで固定し、管の口にサッカーの吸引ホースをとりつける。よく冷えたらサッカーで吸引を開始する。吸引開始後3分経過したらくびれた部分を酸素バーナーで加熱し封管する。封管した試験管はアルミブロックヒーターを用い150℃で6時間加熱する。加熱終了後放冷し、試験管の上から3分の1ほどの所にヤスリで傷をつけ開封する。内容物をガラススピッツ管に移し、さらに試験管内の残渣は蒸留水で洗い出し、スピッツ管に加える。これを2000 rpmで遠心分離する。

上澄液にはフェノキシ酢酸100 μg (内部標準) と3 M 塩酸1 mlを加えて酸性にし、20 mlの酢酸エチルで3回抽出する。抽出物は硫酸ナトリウムで脱水した後ロータリーエバポレーターで乾固し、ネジ栓付き試験管に移し、真空デシケーター中で1夜乾燥する。これにBSA (*N*, *O*-ビストリメチルシリルアセトアミド) 40 μl とアセトニトリル80 μl を加え、アルミブロックヒーターで90℃30分加熱してシリル化し1 μl をキャピラリーガスクロに供試する。

キャピラリーガスクロの条件：キャピラリーカラムはジーエルサイエンスのNB-1 (内径0.25 mm, 膜厚0.4 μm , 長さ60 m)を用い、検出器はFID, インジェクターおよび検出器温度280℃, カラム初期温度100℃, 昇温速度5℃/min, 最終温度250℃に設定する。

この分解方法は原法⁶⁾ではテフロンつぼと加圧容器を用いて行われている。原法の方が試料の量を増やすことができるが、本法はそれらの器具の代用として工夫した方法である。泥炭や植物などのように有機物含量の多い試料には適しているが、炭素含量の低い土壌試料の場合は検出が困難になることもある。

2.2 2M NaOH抽出によるフェノール性化合物の分析

テフロンライナーのスクリュウキャップ付き50 mlガラス遠沈管に試料1 gをはかり取り、2 M NaOH 10 mlを加える。遠心管内を窒素ガスで置換したのち密栓し、100℃ \pm 5の乾燥機中で12時間加熱する。放冷後3 M 塩酸10 mlで酸性にし、酢酸エチル20 mlで3回抽出する(隅田裕明氏私信)。以下は上記と同じ方法でフェノール性化合物を分析する。

3. 脂肪酸・ステロール

3.1 脂肪酸組成

土壌試料1 gをガラス遠心管中にはかり取り、スクワン0.4 mg (内部標準)を添加した後、クロロホルム：メタノール(2：1)溶媒30 mlで3回超音波抽出

する(350 W, 1分30秒)。毎回遠心分離後抽出液を合併し、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、クロロホルム・メタノールで容量を20 mlに調節する。ここから1 mlをネジ付き試験管にとり濃縮乾固した後、塩酸メタノール(1.3 M)1 mlを加えて密栓し、アルミブロックヒーターで加熱する(90℃, 2時間)。加熱終了後蒸留水1 mlを加え、ヘキサン5 mlで3回抽出する。ヘキサン抽出液は炭酸水素ナトリウム溶液(20 g/l)4 mlで洗浄した後、無水硫酸ナトリウム5 gを加えて脱水する。これを濃縮乾固した後ヘキサン1 mlに溶解し、ここから1 μl を採取してキャピラリーガスクロに供試する。なおこの方法では全脂質中の脂肪酸を分析しているが、全脂質をケイ酸カラムあるいはSep-pack Silicaに吸着させた後クロロホルム、アセトン、メタノールで逐次溶出すれば中性脂質、糖脂質、リン脂質画分をそれぞれ分析できる^{7,8)}。

キャピラリーガスクロの条件：カラムは信和化工ULBON-HR-SS10 (内径0.25 mm \times 長さ50 m)を用い、カラム初期温度150℃, 昇温速度3℃/min, 最終温度220℃, 注入口およびFID検出器温度250℃に設定する。

3.2 ステロール

土壌中には植物由来のカンベステロール、ステイグマステロール、 β -シトステロール、糸状菌由来のエルゴステロール、微生物や動物由来のコレステロールなどのステロールの存在が知られている。

上記の脂肪酸分析に供試したメチル化試料を乾固し、トリメチルシリルイミダゾールを40 μl 加えて100℃で30分シリル化し、下記の条件でキャピラリーガスクロを行う⁹⁾。60 mのカラムを用いているため脂肪酸とステロールの分離は良い。なお、ステロールのみを抽出分析する場合は、脂肪酸の影響をなくすため以下の方法により行う。脂質抽出液1 mlを乾固しこれに5% KOHメタノール：水(4：1)混液3 mlを加え60℃で3時間加熱する。放冷後飽和食塩水2 mlを加えヘキサン：エーテル(4：1)混液で3回抽出する。抽出液を硫酸ナトリウム5 gで脱水し、エバポレーターで濃縮乾固する。これにトリメチルシリルイミダゾールを40 μl 加え、100℃で30分加熱してシリル化し、これから1 μl をキャピラリーガスクロに供試する。

キャピラリーガスクロの条件：カラムはジーエルサイエンスNB-1 (内径0.25 mm \times 長さ60 m)カラム初期温度220℃, 昇温速度5℃/min, 最終温度320℃, 注入口およびFID検出器温度320℃に設定する。

4. アミノ酸・アミノ糖

4.1 アミノ酸

土壌中のタンパク質を構成するアミノ酸は通常6 M 塩酸で16~24時間加水分解の後、加水分解液を各種のアミノ酸分析法で分析する²⁾。

4.2 アミノ糖・ムラミン酸

アミノ糖は主として土壌中のムコ多糖類、ムコペプチド、キチン等の微生物成分に由来すると考えられている。土壌中で重要なアミノ糖はグルコサミン、ガラクトサミン、マンノサミン、ムラミン酸等であるが、これらの成分は最近になって初めて効率よく分離分析できるようになった¹⁰⁾。ここではキャピラリーガスクロマトグラフィーによる分析法を紹介する。

窒素0.3 mg相当の土壌を50 ml 容耐圧ガラス瓶中にとる。6 M 塩酸10 ml および内部標準としてミオイノシトール50 μg (ガスクロでFTDないしNP検出器を用いる場合にはN-メチルグルカミン100 μg) を添加する。窒素を通じて空気を追い出した後、テフロンで内張りしたスクリュウキャップを締め、105 $^{\circ}\text{C}$ で6時間加熱する。遠心分離し、上澄液をロータリーエバポレーターにて40 $^{\circ}\text{C}$ で乾固し塩酸を除く。これを20 ml の水に再び溶解した後、pHを0.4 M KOHで6.6~6.8に調節する。沈殿を遠心分離して除去し、上澄液をロータリーエバポレーターで乾固する。残渣を3 ml の乾燥メタノールに溶解し、遠心分離して塩を除去する。上澄液はネジ栓付小試験管に移しロータリーエバポレーターで、あるいは窒素を吹き付けて乾固した後、真空デシケーター中で完全に乾燥させる。アミノ糖のアルドノニトリル誘導体調製試薬としてヒドロキシルアミン塩酸塩32 mg、4-ジメチルアミノピリジン40 mgをピリジン・メタノール(4:1 v/v) 1 ml に溶解する。この試薬0.3 ml を乾燥した試料に加える。試験管を密栓し数秒振り混ぜた後、75~80 $^{\circ}\text{C}$ で30分加熱する。これを室温まで冷却した後1 ml の無水酢酸を加え、密栓して75~80 $^{\circ}\text{C}$ で再び20分加熱する。放冷後2 ml のジクロロメタンと1 ml の1 M 塩酸を添加し、30秒激しく振り混ぜたのち上部の水相を除去する。同様に1 ml の蒸留水による洗浄を3回繰り返す。最後の洗浄では水はなるべく完全に除去する。有機溶媒相をロータリーエバポレーターで乾固し、最終

的に300 μl の酢酸エチル・ヘキサン(1:1)に溶解し、1 μl をキャピラリーガスクロに供試する。

キャピラリーガスクロの条件: カラムはジーエルサイエンスNB-5 (内径0.25 mm×長さ25 m) を用い、カラム初期温度120 $^{\circ}\text{C}$ 、昇温速度10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、最終温度270 $^{\circ}\text{C}$ 、注入口温度250 $^{\circ}\text{C}$ およびFIDないしFTD検出器の温度は300 $^{\circ}\text{C}$ に設定する。

参考・引用文献

- 1) 菅家文左衛門, 田中治夫: 高速液体クロマトグラフィーによる土壌糖の分析 (日本土壌肥科学会編: 土壌構成成分分析法), 博友社, pp. 37-70 (1992)
- 2) 土壌環境分析法編集委員会編: 土壌環境分析法, 博友社, pp. 104-109 (1997)
- 3) J. M. Oades, M. A. Kirkman and G. H. Wagner: The use of gas-liquid chromatography for the determination of sugars extracted from soils by sulfuric acid, *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, Vol. 34, pp. 230-235 (1970)
- 4) J. R. Hedges and D. C. Mann: The characterization of plant tissues by their lignin oxidation products, *Geochim. Cosmochim. Acta.*, Vol. 43, No. 11-G, 1803-1809 (1979)
- 5) K. Tsutsuki, I. Esaki and S. Kuwatsuka: CuO-oxidation products of peat as a key to the analysis of the paleo-environmental changes in a wetland, *Soil Sci. Plant Nutr.*, Vol. 40, No. 1, 107-116 (1991)
- 6) J. I. Hedges and J. R. Ertel: Characterization of lignin by gas capillary chromatography of cupric oxide oxidation products, *Anal. Chem.*, Vol. 54, 174-178 (1982)
- 7) 荒尾知人, 岡野正豪, 金森哲夫: 淡色黒ボク土壌におけるリン脂質脂肪酸組成の解析および微生物バイオマスとの関係, *土肥誌*, Vol. 69, No. 1, 38-46 (1998)
- 8) K. Tsutsuki et al.: The composition of lignin-degradation products, lipids, and opal phytoliths in a peat profile accumulated since 32,000 years B.P. in central Japan, *Soil Sci. Plant Nutr.*, Vol. 39, No. 3, 463-474 (1993)
- 9) 筒木 潔, 近藤隼三: 泥炭地の乾燥化と植生変化に伴う泥炭の脂質組成の変化, *土肥誌*, Vol. 69, No. 1, 12-20 (1998)
- 10) X. Zhang and W. Amelung: Gas chromatographic determination of muramic acid, glucosamine, mannosamine, and glucosamine in soils, *Soil Biol. Biochem.*, Vol. 28, No. 9, 1201-1206 (1996)

[筒木 潔]

3-3 土壌腐植物質含量の測定方法

土壌腐植物質含量の測定にあたっては、3-1項で述べた土壌有機物の分離方法と比べて、腐植物質の抽出率および回収率をより高くすることと分析操作をより簡単にし迅速分析を可能にすることが求められる。

これらの目的を満たす方法としては腐植の形態分析法や泥炭の腐植化度¹⁾の測定法などをあげることができる。これらのうち腐植の形態分析法については本事典の第5編、第2章第5節5-1項で記述されているので、ここでは泥炭の腐植化度の測定法を追加するとともに、土壌中の全腐植物質含量の測定法についても述べる。

1. 泥炭の腐植化度

1gの泥炭試料(風乾・微粉碎)を0.025Mピロリン酸ナトリウム100mlで18時間室温抽出する。これを濾過し濾液を5倍希釈する。この溶液の吸光度を550nmで測定し、その値を100倍した値を腐植化度とする。また近藤ら²⁾は340nmの吸光度も腐植化度の指標とすることを示した。この方法はNaOHによる抽出液と比べて抽出液の吸光度が退色しにくいという利点がある。また操作が簡単で泥炭に限らず鉍質土壌に適用することもできる。原法では炭素の定量を行っていないが、重クロム酸カリウム酸化による比色法³⁾によれば簡単に炭素換算の腐植物質含量を定量することができる。ただし定量には希釈前の抽出液を供試する。

2. 土壌中の全腐植物質含量の測定法

乾式法あるいは湿式法によって定量された土壌の有機

炭素含量に一定の係数(1.724)を掛けた値が土壌の腐植物質含量として採用されているが、この係数は経験的な平均値であり、また土壌の有機炭素のなかには非腐植物質に由来するものもあるので、得られた値はあくまで近似値にすぎない。したがって腐植物質含量を表す際には用いた係数も明記しておく必要がある。

乾式の有機炭素定量は各社の専用機器によって行うことが可能であるが、土壌標準分析・測定法⁴⁾にはCNコーダーによる方法とNCアナライザーによる方法が紹介されている。なお土壌が炭酸塩を含む場合には全炭素から無機態炭素含量を差し引いた値が有機態炭素含量となる。

湿式の有機炭素測定法のうち環流冷却器を使用したチューリン法は高い回収率を与える⁴⁾。Walkley法は硫酸の希釈熱を利用したより簡易で迅速な湿式定量法であるが、乾式燃焼法と比較した場合の炭素の回収率は平均77%である⁵⁾。

参考・引用文献

- 1) A. Kaila: Determination of the degree of humification in peat samples, J. Agric. Sci. Finl., 28, 18-35 (1956)
- 2) 近藤 鍊三・筒木 潔・森 隆一: 泥炭地の乾燥化と植生変化に伴う泥炭分解度指標の変化, 土肥誌, Vol.68, No. 5, 527-535 (1997)
- 3) 立川 涼: 土壌および液体試料中の有機物の迅速定量法ならびに糖類に関する二、三の定量法, 土肥誌, Vol.37, No.1, 28-33 (1966)
- 4) 土壌標準分析・測定法委員会編: 土壌標準分析・測定法, 博友社, pp.86-94 (1986)
- 5) 土壌養分分析法委員会: 土壌養分分析法, 養賢堂, pp. 120-147 (1980)

[筒木 潔]