

環境中の腐植物質

その特徴と研究法

石渡良志
米林甲陽
宮島 徹
編著

環境中の 腐植物質

その特徴と研究法

日本腐植物質学会 監修

石渡良志・米林甲陽・宮島 徹 編著

三共出版



3.2.1 概 要

腐植物質は土壌、泥炭、各種堆積物、陸水、腐朽植物遺体など、地殻表面の様々な物質の中に普遍的に存在している。その性質は、それぞれの生成環境の違いを反映して、幅広く変動しており、最も基本的な性質のひとつである元素組成もその例外ではない。元素分析のみから腐植物質の構造を知ることはできない。しかし、元素組成の変化は酸化・還元、水和・脱水、脱水素、無機化による炭素・窒素の分解消失など、腐植物質がその生成の過程で受けた様々な化学反応や生化学反応の結果を反映しているため、腐植物質が、その起源となった物質からどのような変化を受けて生成したのか、また、今後環境中でどのような変化を受けていくのかを、元素組成から推定することができる。

3.2.2 方 法

(1) 装 置

有機元素分析装置は、有機化合物の主構成元素である C, H, N, S の含有量を燃焼分解により定量的に H_2O , CO_2 , N_2 , SO_2 に変換し、これらの各成分を熱伝導度検出器により定量し、C, H, N, S の含有量を決定するものである。C, H, N は一度の燃焼操作で同時に定量されるが、S は別に秤取燃焼して定量することが多い。酸素含量は、試料の全重量から炭素、窒素、水素、硫黄含量と灰分を差し引いて求める。ただし、硫黄分析は、これを分析できる機器があまり普及していなかったこと、腐植物質中の硫黄含量が通常非常に低いことから分析例が少なかった。

(2) 操 作

試料は、超微量電子天秤を用いて $0.1 \mu g$ までの精密秤量を行う。また、試料燃焼後に残留する灰分の重量測定も可能である。元素分析は自分で行うことは少なく、大学や公立・民間の試験研究機関に分析を依頼する場合が多い。分析依頼者が注意すべき点は、灰分の少ない試料を調製し、前もって水分を完全に除去することである。また、分析に直接必要な試料の量は数 mg と少ない

が、試料採取誤差を少なくするため、ある程度多量の試料を調製し、数十 mg 程度の試料を提出することが望ましい。腐植物質試料中の灰分含量を少なくするためには、酸による繰り返し洗浄や 0.1 M 塩酸-0.3 M フッ化水素酸処理を行う。また、水分を完全に除去するためには、五酸化リンを入れたデシケータ中で真空乾燥する必要がある。

(3) 注 解

(a) 腐植物質の各元素含量

Rice and MacCarthy¹⁾ は、腐植物質の元素組成に関する既往の文献を集約し、腐植物質の元素組成を統計的に評価した。フミン酸の元素組成の平均値は炭素含量 55.1 %、水素含量が 5.0 %、窒素含量が 3.5 %、硫黄含量が 1.8 %、酸素含量が 35.6 %であった。フルボ酸の元素組成の平均値は炭素含量が 46.2 %とフミン酸より約 9 %低く、窒素含量 2.5 %および硫黄含量 1.2 %もそれぞれフミン酸より低かった。酸素含量は 45.6 %と、フミン酸よりも約 10 %高かった(1.2 参照)。

(b) 原子数比による腐植物質の元素組成の比較

有機化合物の構造を考察する上で、元素組成は重量%よりも原子数比として表した方が便利である。

van Krevelen²⁾ は石炭化過程を図的に表すため、H/C-O/C 相関図を用いた。その後、H/C-O/C 相関図は腐植物質の元素組成の特徴を示すためにも適用され、多くの研究者によりその結果が報告されている^{1-4,6,7)}。

Kuwatsuka *et al.*³⁾ は日本の各種土壌から抽出された約 40 点のフミン酸を H/C-O/C 相関図に示し、A 型、B 型、Rp 型等の各型フミン酸(腐植酸)と埋没火山灰土のフミン酸、フルボ酸および各種植物体構成有機成分がこの図の上で別の領域に分布することを示した。Kumada⁴⁾ は H/C-O/C 相関図以外にも H/C-O/H 相関図や C'-H'-O' 三角図などが、各型フミン酸およびフルボ酸の元素組成の違いを示すうえで有用であることを示した。O/H は O/C よりも値の分布幅が広いいため、様々な腐植物質のグループを区別するうえで有用である。この図上でフミン酸は H/C が 0.4~1.4、O/H が 0.2~1.2 の範囲で弧状の分布を示し、Kumada⁴⁾ はこれをフミン酸バンドと呼んだ。フルボ酸はフミン酸バンドの上方に接する広い領域に分布し、フルボ酸領域と名づけられた。

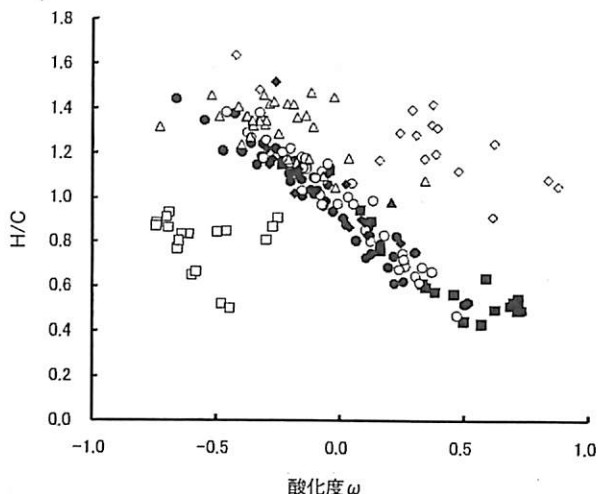


図3-1 酸化度 (ω) と H/C の関係

●文献3)の土壌フミン酸, ■腐植質埋没火山灰土フミン酸, ○文献7)各種土壌, 海洋・湖底堆積物フミン酸, △海洋・湖底堆積物フミン酸, ▲同堆積物ヒューミン, □石炭(亜炭, 褐炭, 瀝青炭, 無煙炭), ◆文献6)ロシア各地の土壌フミン酸平均値, ◇文献6)ロシア各地の土壌フルボ酸平均値, ■, △, ▲, □については文献4)所収の図表の原データを使用させて頂いた。

C'-H'-O'三角図はC, H, O, 3元素の原子数の和を100としてそれぞれの元素の割合を計算し, 三角図に示したものである。この図も各種腐植物質群の元素組成の特徴を示すうえで有用である。

(c) 元素組成の総合的表現

元素組成を総合的に表現する指標としては, 以下のようなものがある。以下の計算では全て原子数が用いられている。

燃焼率 (CQ) は Tamiya⁵⁾ が提案した呼吸商の理論値であり

$$CQ = 4C / (4C + H - 3N - 2O) \quad (1)$$

によって表される。

不飽和度 (DU) は炭素100当りの不飽和結合および環結合の数を示し,

$$DU = (2C + N - H) / 2C \times 100 \quad (2)$$

で表すことができる。

酸化度 (ω) は,

$$\omega = (2O - H) / C \quad (3)$$

によって計算され、分子内の酸素および水素の過不足を、 $C_n(H_2O)_n$ との比較において示すものである⁶⁾。腐植物質におけるこの値は-0.8から+0.9の間に分布し、H/C- ω 相関図(図3-1)においては、H/C-O/Hの場合と同様に、フミン酸は狭いバンド内に幅広く分布した。またフルボ酸および石炭の分布域はフミン酸のバンドとは十分離れて分布した。これらのことから、酸化度 ω の値は腐植物質内の各種物質群の特徴と相対的關係を示すうえで非常に有用と考えられる。

引用文献

- 1) Rice, J.A. and P. MacCarthy : Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances. *Org. Geochem.*, **17**, 635-648 (1990).
- 2) van Krevelen, D.W. : Graphical statistical method for the study of structure and reaction process of coal. *Fuel*, **29**, 269-284 (1961).
- 3) Kuwatsuka, S., K. Tsutsuki, and K. Kumada : Chemical studies on soil humic acid I. Elementary composition of humic substances. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **24**, 337-347 (1978).
- 4) Kumada, K. : "Chemistry of Soil Organic Matter", p.241, Japan Scientific Societies Press, Tokyo(1987).
- 5) Tamiya H.: Zur Theorie des respiratorischen Quotienten nebst einer Bemerkung über den Einfluss der oxydreduktiven Zellvorgänge auf den Gewächsel der Zellen, *Acta Phytchim.*, **6**, 227-304 (1932).
- 6) Orlov, D. S. : "Humus Acids of Soils", p.378 Translation of Gumusovye Kisloty Pochv. Moscov University Publishers, Moscow, 1974, A.A. Balkema/Rotterdam (1985).
- 7) Yonebayashi, K. and T. Hattori : Composition of elemental and functional groups of humic acids. Chemical and biological studies on environmental humic acids I. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **34**, 571-584 (1988).

3.4.1 概 要

腐植物質の定義には、黄褐色、褐色、暗褐色ないし黒色等の色を表わす表現が必ず伴っている。すなわち、黄褐色、褐色、暗褐色ないし黒色という色は、腐植物質の本質的な属性である。

腐植物質の色は、紫外・可視吸収スペクトルによって定量的に示すことができる。腐植物質の紫外・可視吸収は、一般に特定の吸収ピークを持たず、紫外部から可視部にかけて指数関数的に減少する。紫外・可視部吸収をもたらす有機物の化学構造には、C=C二重結合および酸素、窒素、硫黄などの原子上の非共有電子対が関与している。これらの構造は、それぞれ単独では長波長域に及ぶ可視部吸収をもたらすことはできず、いくつもの二重結合や非共役電子対が長く連なり共役する必要がある。また、腐植物質は通常特定の吸収ピークを持たないことから、特定の共役二重結合系が卓越するのではなく、様々な構造と長さを持った共役二重結合系が混在していると考えられる。ただし、土壤中で生産されるキノンがフミン酸の可視部吸収に特徴的な吸収ピークをもたらす場合もある（P型フミン酸中のPg色素）。

3.4.2 方 法

(1) 試 薬

水酸化ナトリウム 0.01 M NaOH, 0.025 M (0.1%) NaOH, 0.1 M NaOH など
炭酸水素ナトリウム 0.05 M NaHCO₃

(2) 操 作

一定濃度の腐植物質溶液を調製し（フミン酸は 100 mgC L⁻¹ 以下、フルボ酸は 250 mgC L⁻¹ 以下）、700 nm から 220 nm にかけての吸収スペクトルを紫外・可視分光光度計で測定する。対照セルには溶解に用いた溶媒を入れる。吸光度が 1.0 を越えそうになったら、希釈してから測定を続ける。希釈割合は希釈前後の吸光度を同一波長で正確に測定すれば計算できる。可視部から紫外部への光源の切り替えは 370 nm から 340 nm の間で行う。測定は 220 nm で終

了する。220~230 nm にかけては、炭酸塩の吸収があるため、試料溶液が空気中の二酸化炭素を吸収しないよう注意する。

溶媒には、主としてアルカリ水溶液が用いられる。0.05 M NaHCO_3 , 0.01 M NaOH , 0.025 M (0.1%) NaOH , 0.1 M NaOH などがよく用いられる溶媒である。低濃度かつアルカリ性の弱い溶媒が用いられてきたのは、アルカリによる腐植物質の変性を少なくするためである。しかし、低濃度かつ弱アルカリ性の溶媒では、腐植物質の溶解性が低いことや、腐植物質の吸光度が pH 低下に伴って低くなるなどの問題がある。0.1 M NaOH に溶解したフミン酸溶液は最も高く安定した吸光度を与え、溶解後 2 時間以内に測定すれば、吸光度の変化もほとんど起こらない¹⁾。

3.4.3 注 解

(1) 可視部吸光度によるフミン酸 (腐植酸) の分類

一定濃度のフミン酸溶液の 600 nm 吸光度および 600 nm と 400 nm の吸光度の比率は、フミン酸の分類手段として用いられてきた。

RF 値はフミン酸溶液の 600 nm における吸光度 (K_{600}) を同溶液 30 mL による 0.02 M KMnO_4 溶液の消費量 (mL) によって除した値を 1,000 倍したものである。

また $\Delta \log K$ 値は

$$\log (K_{400}/K_{600}) = \log K_{400} - \log K_{600}$$

によって表され、対数グラフに表した吸収曲線の可視部における傾きを示している。 RF および $\Delta \log K$ はフミン酸を A 型、B 型、 R_p 型、P 型へ分類する際の指標値として用いられるとともに (図 3-3)、フミン酸の各種性質 (元素組成、官能基組成、窒素成分、分解生成物の収量) と高い相関を示す。

フミン酸溶液の炭素含量は、他にも重クロム酸カリウム酸化比色法や溶存炭素計で求めることができるし、元素分析によってフミン酸の炭素含量が得られていれば、これから炭素濃度を計算することもできる。過マンガン酸カリウム酸化滴定法は熟練と手間を要するので、これら他の方法で求めた炭素濃度をもとに吸光度を表すことも行われる。

Ikeya and Watanabe²⁾ は、 RF の代りに、有機炭素濃度 1 mg mL^{-1} のフミ

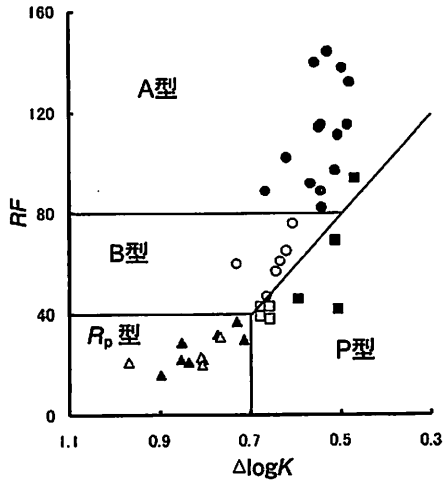


図3-3 RFと $\Delta\log K$ によるフミン酸の分類
 ● A型, ○ B型, ■ Pg吸収の明らかなP型,
 □ Pg吸収のないP型, ▲ 鈣質土壌からのRp型,
 △ 堆積腐植からのRp型

ン酸溶液の600 nmにおける吸光度 (A_{600}/C) を使用することを提案した。この場合、Rp型とB型の区分は $A_{600}/C=2.5$ で、B型とA型の区分は $A_{600}/C=5.0$ で行われる。

図3-4に、このようにして分類された各型フミン酸の紫外可視吸収スペクトルを示した。

(2) E_4/E_6

Kononova³⁾ によって提唱された E_4/E_6 比は465 nmと665 nm吸光度の比率であり、フミン酸およびフルボ酸の特性付けに用いられてきた。溶媒としては0.05 M NaHCO_3 が推奨されている。この値は各種土壌型のフミン酸毎に異なる値を与える。例えば、SpodosolsおよびInceptisolsのフミン酸では約5.0、Boralfsでは3.5、Haploborollsでは3.0~3.5、Aridic Haploborollsでは4.0~4.5であった。フルボ酸の E_4/E_6 比は6.0~8.5の間で変動した。

Chen *et al.*¹⁾ は、フミン酸とフルボ酸の E_4/E_6 比は主として分子量(粒子量)により支配され、溶液のpH値に依存し、ラジカル含量およびカルボキシ

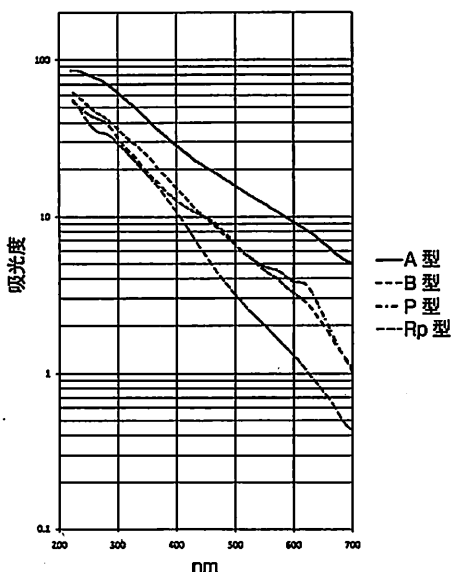


図3-4 各型フミン酸の紫外可視吸収スペクトル
 A型猪之頭(火山灰土), B型東山(褐色森林土),
 P型燕埕没菌核Pg画分, Rp型安城(水田土壤)
 濃度は 1 mgC mL^{-1} に統一

ル基含量の影響を受け、縮合芳香環の相対的含量とは直接関係しないと推定している。

ただし、Kumada⁴⁾は E_4/E_6 比の465 nm および 665 nm という波長の選定に特に本質的な意味がないこと、400 nm と 600 nm の間の方が対数尺で表した吸収曲線の直線性が高いこと、Pgによる吸収は高pHでのみ検出されること、0.1 M NaOH 中の方が高く安定した吸光度が得られることなどの理由から、0.1 M NaOH 中で測定した400 nm と 600 nm の吸光度を用いて吸光度比を計算することを提案している。いずれにせよ、どちらの方法を用いたかは明記しなくてはならない。

(3) pH 示差吸収スペクトル

腐植物質の吸収スペクトルそのものは特徴に乏しいものであるが、各種の差スペクトルによって、強い吸収に隠されていた特徴的な吸収を見いだすことが

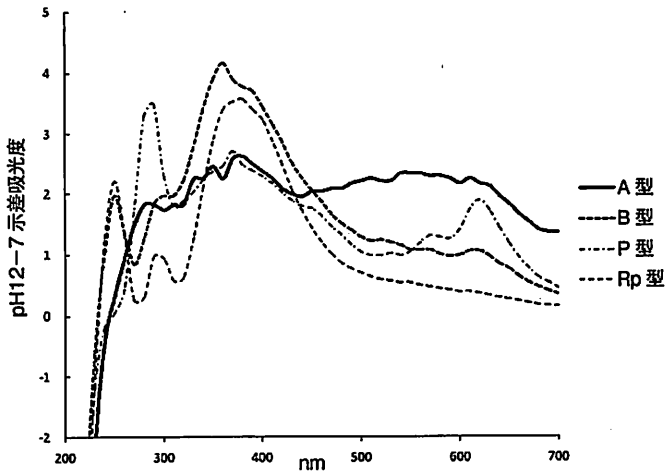


図 3-5 各型フミン酸の pH 12-7 示差吸収スペクトル
(図 3-4 と同じフミン酸を用いた)

できる。アルカリ性-中性差スペクトルの測定方法を紹介する⁵⁾。

10~40 mg のフミン酸を 0.025 M (0.1 %) NaOH に溶解して、容量を 50 mL とする。この際、腐植化度の高いフミン酸ほど薄い溶液を調製する。この溶液を 5 mL ずつ 2 本の試験管に分注し、それぞれに 0.025 M NaOH 20 mL、および 1/12 M リン酸緩衝液 (9.75 g K_2HPO_4 + 5.7 g KH_2PO_4 L⁻¹) 20 mL を正確に添加する。これらのフミン酸溶液の最終 pH は 12.4、および 7.0 となる。対照セルに pH 7.0 の試料溶液、試料セルに pH 12.4 の試料溶液を入れ、ダブルビーム紫外可視分光光度計を用いてこれらの溶液の差スペクトルを測定する。図 3-5 に、図 3-4 と同じフミン酸について測定した pH 12-7 示差吸収スペクトルを示す。

Rp 型および B 型フミン酸の pH 12-7 差スペクトルは、250, 300, および 360 nm にピークを持ち、これらはリグニンと共通していた。

360 nm の吸収は芳香環を通じて α 位のカルボニル基や C=C 二重結合と共役したフェノールに、300 nm の吸収は他の二重結合と共役していないフェノールに、250 nm の吸収はこれら両方によると推定されている。腐植化の進行と

ともにこれらのピークはブロードになり、A型フミン酸では、650 nm 付近にまで及ぶ可視部の示差吸収が増大した。このような変化は、腐植化の進行とともにフミン酸中のリグニン構造が減少し、他方で土壤に固有の暗色無定形構造が増加する様子を示している。他方、P型フミン酸 (Pg) の差スペクトルは 280, 460, 570, および 620 nm 付近にピークを示した。ここで用いたB型フミン酸にも明らかにPgの吸収が含まれていた。

引用文献

- 1) Chen, Y., N. Senesi, and M. Schnitzer : Information provided on humic substances by E4/E6 ratios, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **41**, 352-358 (1977).
- 2) Ikeya, K. and A. Watanabe : Direct expression of an index for the degree of humification of humic acids using organic carbon concentration. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **49**, 47-53 (2003).
- 3) Kononova, M.M. : "Soil Organic Matter ; Its Nature, Its Role in Soil Formation and in Soil Fertility. 2nd Engl. Ed"., p.544, Pergamon Press, Oxford (1966).
- 4) Kumada, K. : "Chemistry of Soil Organic Matter", p.241, Japan Scientific Societies Press, Tokyo (1987).
- 5) Tsutsuki, K. and S. Kuwatsuka : pH-dependent nature of the ultraviolet and visible absorption spectra of humic acid. Chemical studies on soil humic acids. VI. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **25**, 373-384 (1979).