

第7章 土壤腐植酸の紫外および可視部吸収スペクトルのpH依存性

第6章以降の章では、主として腐植酸の紫外および可視部吸光度と化学構造の関係の解明に焦点を置いた。前章では、腐植酸の吸光度-pH曲線から、腐植酸中の解離基の pK_a の分布および解離の様式について検討した。これに引き続き本章は、腐植酸の紫外部および可視部吸光度に対するカルボキシル基およびフェニール性水酸基の寄与を検討することを目的とした。腐植酸のpH10およびpH6溶液の差スペクトルについては、既に弘法ら(46)によって各型腐植酸とリグニンが、またSuzukiら(15)によって各種腐朽植物遺体の腐植酸が、いずれもGoldschmidt(47)の方法によって研究されている。本研究ではアルカリ域のみならず酸性域での差スペクトルも測定し、差スペクトル、示差吸光度と腐植酸の型、腐植化度、解離基含量、土壤の種類との関係を

検討した。

試料および方法

1) 試料

腐植酸 7.0 : 表 1 の腐植酸 39 点を用いた。

フルボ酸 : 七宗ポドソル B_h 層土壤のフルボ酸中の 2 画分, Fr. B₄ および Fr. D₁ を用いた。

調製法は第 5 章に示した。

関連化合物 : 第 5 章に調製法を示したグルコース腐植酸, ハイドロキノン腐植酸, およびポリマレイン酸を用いた。また名古屋大学農学部寺島典二教授より恵与された稲わらのミルドウッドリグニン (MWL) を用いた。

2) 方法

各腐植酸を 0.1% NaOH に溶解し, 濃度を 10 ないし 60 mg / 100 ml とした。この溶液を 5 ml ずつ 3 本の試験管に分注し, それぞれに 0.1% NaOH 20 ml, 1/12 M リン酸緩衝液 (K₂HPO₄

0.975% - KH_2PO_4 0.570%) 20 ml, または
 0.5 M グリシン緩衝液 (pH 3.0) 20 ml を添加
 し, pH をそれぞれ 12.4, 7.0, 3.5 とした。
 これらの溶液の紫外および可視部吸収スペク
 トル, および pH 12.4 と pH 7.0 溶液の差スペク
 トル, pH 7.0 と pH 3.5 溶液の差スペクトルを
 220 から 700 nm まで日立 124 型分光光度計で
 測定した。以後, pH 12.4 と pH 7 溶液の示差吸
 光度は ΔE (pH 12.4 - 7), pH 7 と pH 3.5 溶液
 の示差吸光度は ΔE (pH 7 - 3.5) と表わす。
 なお, 分画フルボ酸およびポリマレイン酸は
 酸性にしても沈殿しないため, 酸性試料溶液
 はグリシン緩衝液の代りに 0.1 N 塩酸 20 ml を
 加えて調製し, pH を 1 とした。

結果および考察

R_p 型および B 型腐植酸と稲わら MWL の
 ΔE (pH 12.4 - 7) スペクトルは, 250, 300,
 および 360 nm 付近にピークがあった (図 31)。

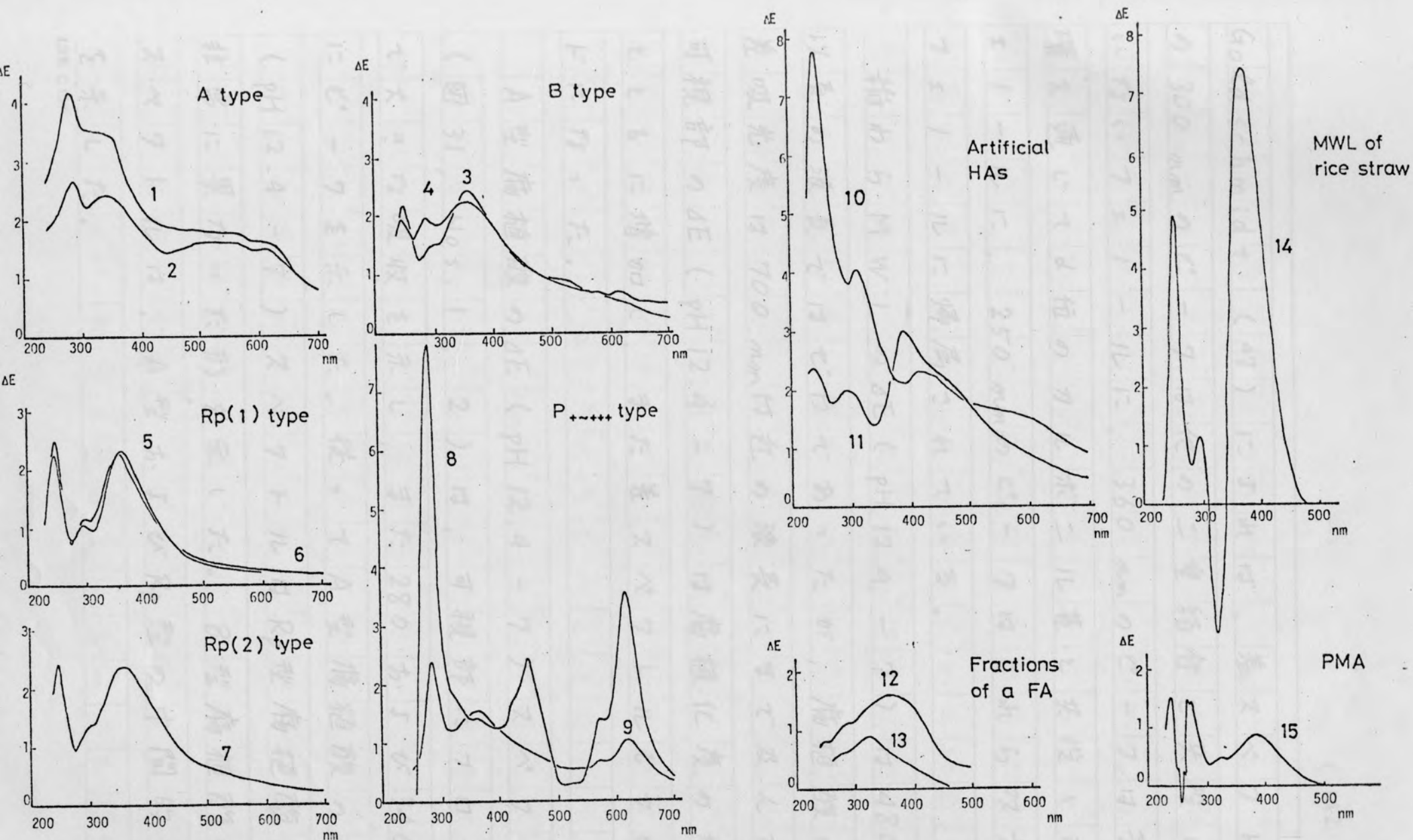


Fig. 31. ΔE (pH 12.4-7) spectra of humic acids and related compounds.

1. Nagara P, 2. Inogashira, 3. Kinshozan F, 4. Kuragari, 5. Gifu, 6. Kinshozan OH, 7. Higashiyama (F-H), 8. Tsubame Pg (1/2 scale), 9. Tsubame, 10. Hydroquinone-HA, 11. Glucose-HA, 12. Fr. D₁ of Hichiso FA, 13. Fr. B₄ of Hichiso FA, 14. Milled wood lignin of rice straw, 15. Polymaleic acid. Concentration are fixed at 0.1 % organic matter.

Goldschmidt (47) によれば, 差スペクトルの 300 nm のピークは他の二重結合と共役していないフェニールに, 360 nm のピークは芳香環を通過して2位のカルボニル基と共役したフェニールに, 250 nm のピークはこれら双方のフェニールに帰属されている。

稲わら MWL の ΔE (pH 12.4 - 7) は 480 nm 以上の波長ではゼロであったが, 腐植酸の示差吸光度は 700 nm 付近の波長にまで及んだ。可視部の ΔE (pH 12.4 - 7) は腐植化度の増大とともに増加し, また差スペクトルもブロードになった。

A型腐植酸の ΔE (pH 12.4 - 7) スペクトル (図 31, Nos. 1, 2) は, 可視部にブロードで大きな吸収を示し, また 280 および 340 nm にピークを示した。従って A型腐植酸の ΔE (pH 12.4 - 7) スペクトルは R_p 型腐植酸とは非常に異なった形を示した。B型腐植酸の差スペクトルは, A型および R_p 型の中間的な形を示した。

表16に、各型腐植酸の250, 300および360 nmでの ΔE (pH 12.4 - 7)の平均値および標準偏差を示した。250および360 nmの示差吸光度は、 $R_p(2) > R_p(1) \approx B > P_0 > A$ 型の順に減少した。ここで、 $R_p(2)$ 型は R_p 型腐植酸のうち森林土壌の A_0 層および腐朽木から抽出されたものであり、従って、分解程度の低いリグニン成分を多量に含むものと推定される。しかし稍わらMWLの示差吸光度は、 $R_p(2)$ 型腐植酸の2ないし3倍の値を示した。従って、 $R_p(2)$ 型腐植酸ではリグニン構造が全構造の $1/3$ ないし $1/2$ を占めるものと推定される。

250および360 nmにおける示差吸光度の標準偏差は、 $R_p(1)$, $R_p(2)$ およびB型腐植酸では大きかったが、A型腐植酸では小さかった。このことは、 R_p 型およびB型腐植酸の間では、リグニン構造が分解した程度はかなり変動するが、A型腐植酸の間ではほとんど差がないことを示唆している。同様な傾向は、第3章に示したメトキシ基含量においても認めら

れた。A型腐植酸は、その中のリブリン構造がかなり分解され、複雑ではあるが互いに似通った構造を持つものと推察される。

Table 16. ΔE (pH 12.4-7) in the ultraviolet range.

Type	wavelength (nm)			
	250	300	360	
A	$\bar{x}^a)$	22.4	24.4	28.2
	s ^{b)}	4.3	3.0	2.4
B	\bar{x}	35.5	26.8	36.7
	s	12.6	3.9	8.4
Po	\bar{x}	27.1	29.1	29.4
	s	7.7	3.1	6.6
Rp(1)	\bar{x}	33.8	18.8	35.4
	s	12.4	3.3	10.6
Rp(2)	\bar{x}	51.0	23.2	41.8
	s	7.5	0.7	11.5
MWL of rice straw	c)	90.5 (242nm)	21.7 (293nm)	134 (374nm)

- a) \bar{x} : average value for each type
- b) s: standard deviation
- c) E values of the MWL of rice straw are obtained at its peak wavelengths.

7) は a) \bar{x} : average value for each type
 b) s: standard deviation
 c) E values of the MWL of rice straw are obtained at its peak wavelengths.
 1-ル性木酸基含量と有意な相関を示さなか
 ったが、腐植化度が高くなるほど増加し、図
 32に示すように600 nmの吸光度と非常に高い
 正の相関を示した。この結果は、600 nmの示

れた。A型腐植酸は、その中のリグニン構造がかなり分解され、複雑ではあるが互いに似通った構造を持つものと推察される。

250 および 360 nm の示差吸光度と異なり、300 nm の示差吸光度には腐植酸の型の違いは影響しなかった。リグニンに対しては 300 nm の示差吸光度が非共役型フェニールの定量に用いられているが、腐植酸の場合には 300 nm の示差吸光度は両側の 250 および 360 nm の吸収帯の影響を大きく受けているため、適用は困難であった。

フェニール性水酸基の解離は腐植酸の吸光度変化の原因であるにもかかわらず、腐植酸の 250, 300 および 360 nm での ΔE (pH 12.4 - 7) はフェニール性水酸基含量と相関を示さなかった。600 nm での示差吸光度もまたフェニール性水酸基含量と有意な相関を示さなかったが、腐植化度が高くなるほど増加し、図 32 に示すように 600 nm の吸光度と非常に高い正の相関を示した。この結果は、600 nm の示

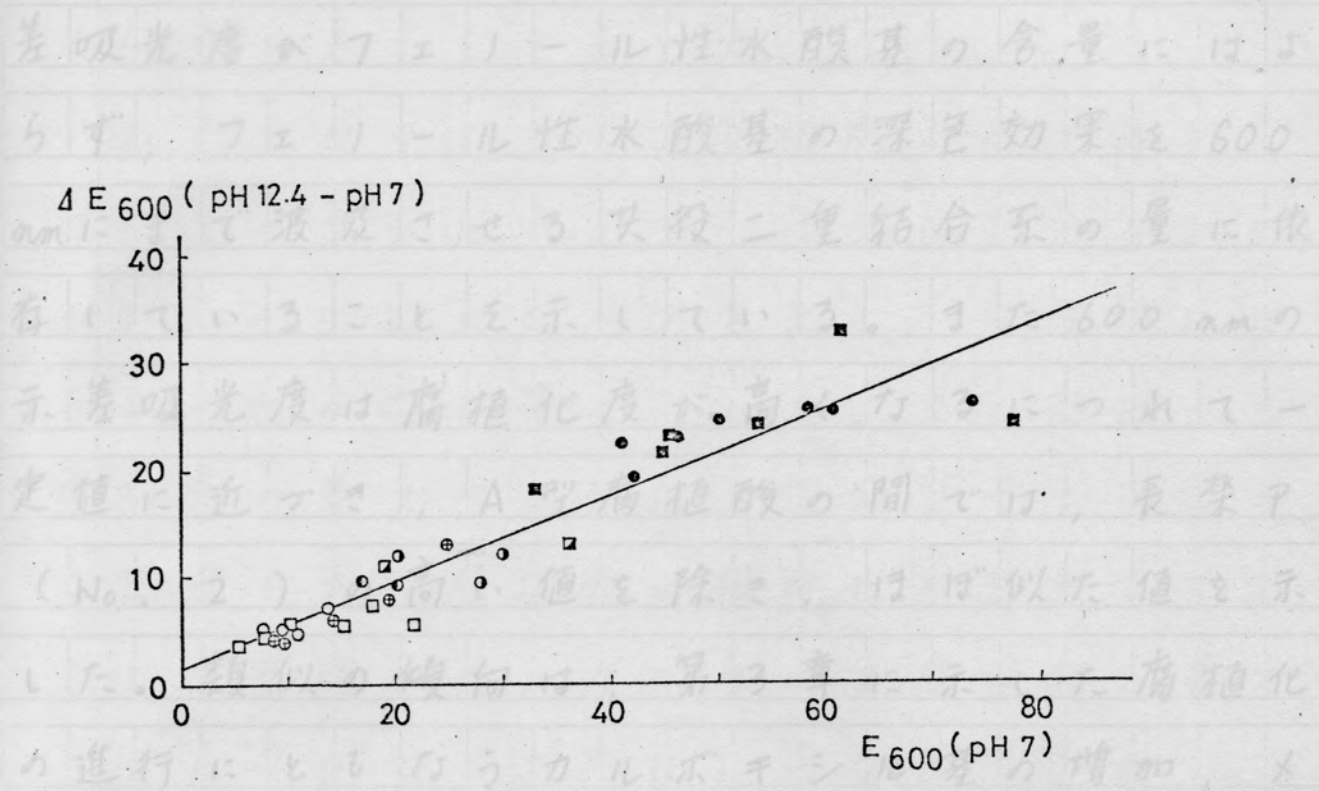


Fig. 32. Relationship between $\Delta E(\text{pH } 12.4-7)$ and $E(\text{pH } 7)$ at 600 nm of soil HAs (concentration; carbon 1g/100ml).

P_{2-4} 型腐植酸の $\Delta E(\text{pH } 12.4-7)$ スペクトル (図 31, Nos. 8, 9) の 280, 455, 570 および 620 nm における C-7 は, 4, 9-ジヒドロキシペリレン-3, 10-キノン (DHPQ) の解離によるものである (5)。これらの P_2 色素に基づく吸収は, アルカリ溶液の吸収スペクトルよりも差スペクトルのほうが明瞭にあらわれた。 P_2 色素に基づくこれらの吸収は, その他の型の腐植酸の差スペクトル中にも認められ, P_2 色素が各種の土壤に在

差吸光度がフェニール性水酸基の含量にはよらず、フェニール性水酸基の深色効果を600 nmにまで波及させる共役二重結合系の量に依存していることを示している。また600 nmの示差吸光度は腐植化度が高くなるにつれて一定値に近づき、A型腐植酸の間では、長榮P (No. 2) の高い値を除き、ほぼ似た値を示した。類似の傾向は、第3章に示した腐植化の進行にもなるうカルボキシル基の増加、メトキシル基の減少においても認められた。

$P_{+ \sim \#}$ 型腐植酸の ΔE (pH 12.4 - 7) スペクトル (図31, Nos. 8, 9) の280, 455, 570 および620 nmにおけるピークは、4,9-ジヒドロキシペリレン-3,10-キノン (DHPQ) の解離によるものである(13)。これらのPg色素に基づく吸収は、アルカリ溶液の吸収スペクトルそのものよりも差スペクトルのほうに明瞭にあらわれた。Pg色素に基づくこれらの吸収は、その他の型の腐植酸の差スペクトル中にも認められ、Pg色素が各種の土壤に広

く分布することを示した。

23 ハイドロキノニン人工腐植酸の ΔE (pH 12.4 - 7) スペクトル (図 31, No. 10) は, 245, 315, 420 nm にピークを示し, 可視部にはプラトー状の吸収帯を示した。この形状は A 型腐植酸の差スペクトルと類似しており, キノン構造が A 型腐植酸の構造にも寄与していることを示唆した。グルコース腐植酸の差スペクトル (図 31, No. 11) は 240, 295, 390 nm にピークがあり, 可視部にかなり大きな示差吸収を示した。しかし差スペクトルの形状は土壤腐植酸とはかなり異なっていた。

24 七宗ポドソール B_h 層土壤の 2 点のフルボ酸分画試料, Fr. B₄ と Fr. D₁ は互いに異なった波長に ΔE (pH 12.4 - 7) スペクトルのピークを示した (図 31, Nos. 12, 13)。これらのスペクトルは土壤腐植酸のスペクトルとも異なっていた。

25 Anderson ら (38) によって土壤フルボ酸との構造的類似性が示唆されているポリマレ

イニ酸の差スペクトル (図 31, No. 15) は, 237, 266, 380 nm にピークがあり, 255 nm に最小値を示した。この差スペクトルは, フルボ酸, 腐植酸の差スペクトルとは似ていなかった。

前章に示したように, 土壌腐植酸の紫外および可視部吸光度は pH の低下とともに減少した。A 型腐植酸の溶液は, pH を 2 付近まで下げても安定であったが, Rp 型腐植酸の中には pH 3 以上ですでに凝集しはじめるものが存在した。これは, A 型腐植酸は酸性の強いカルボキシル基を多量に含んでいるが, Rp 型腐植酸はあまり含んでいないことによるものと推定される。

土壌腐植酸の ΔE (pH 7 - 3.5) スペクトルは, 280 - 285 nm に最大ピークが, 320 nm に肩があった (図 33)。280 nm の示差吸光度は腐植化度が高くなるほど増大し, 反対に 320 nm の肩は A 型腐植酸ではほとんど認められなかった。いくつかの Rp 型腐植酸の差スペクト

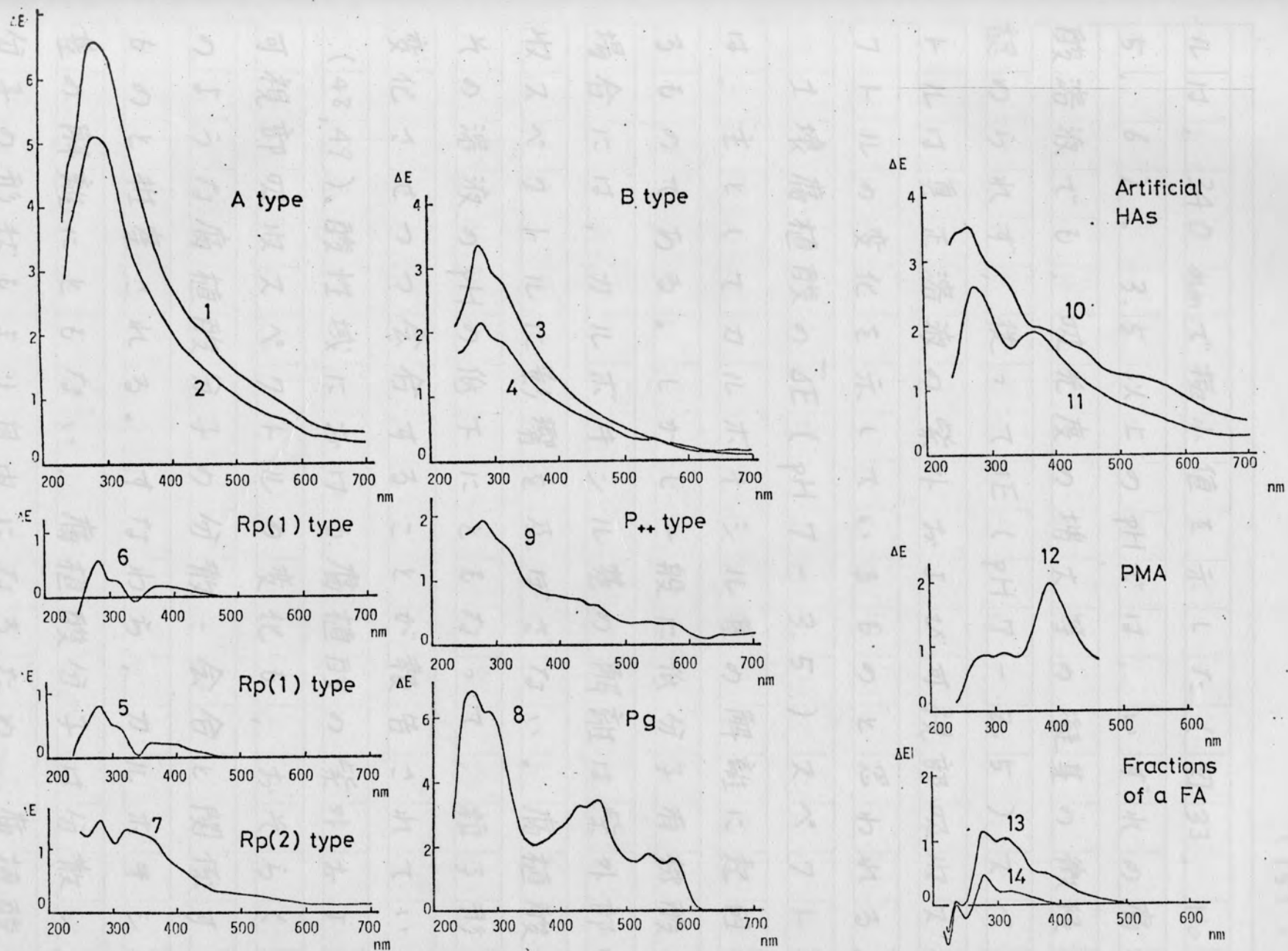


Fig. 33. $\Delta E(\text{pH } 7-3.5)$ spectra of humic acids and related compounds.

1. Nagara P, 2. Inogashira, 3. Kinshozan F, 4. Kuragari, 5. Gifu, 6. Kinshozan OH, 7. Higashiyama (FH), 8. Tsubame Pg, 9. Tsubame, 10. Hydroquinone-HA, 11. Glucose-HA, 12. Polymaleic acid, 13. Fr. D₁ of Hichiso FA, 14. Fr. B₄ of Hichiso FA. Concentrations are fixed at 0.1 % organic matter.

ルは、 340 nm で極小値を示した(図33, No. 5, 6)。3.5以上のpHでは、いずれの腐植酸溶液でも、吸光度の増大等の凝集の徴候は認められず、従って ΔE (pH 7 - 3.5)スペクトルは真正溶液の紫外および可視部吸収スペクトルの変化を示しているものと思われる。

土壌腐植酸の ΔE (pH 7 - 3.5)スペクトルは、主としてカルボキシル基の解離に起因するものである。しかし一般に低分子有機酸の場合には、カルボキシル基の解離は紫外部吸収スペクトルに影響を及ぼさない。腐植酸は、その溶液のpHの低下にともなって、粒子形を変化させつつ会合することが報告されている(48, 49)。酸性域における腐植酸の紫外および可視部吸収スペクトルの変化も、おそらくこのような腐植酸分子の分散 - 会合と関係するものと推察される。すなわち、カルボキシル基の解離にともない、腐植酸分子は分散し、分子の形状もより自由になるため、腐植酸分子の π 電子が励起されやすくなるものと推察

される。類似の現象として、ポリペプチドや DNA も、そのらせん構造や二重らせん構造がほどけてランダムコイル構造に変化する際、紫外部吸光度が増大することが知られている (50)。

ジヒドロキシペリレンキノンの第1解離のフェノール性水酸基のように pH 7 以下で解離する特殊なフェノール性水酸基も、腐植酸の ΔE (pH 7 - 3.5) スペクトルに貢献するものと推定される。しかし、腐植酸のフェノール性水酸基含量そのものが少ないことから、そのような特殊なフェノールの寄与率はさらに小さいものと思われる。

土壌腐植酸の ΔE (pH 7 - 3.5) スペクトルは 280 ~ 285 nm に最大値があった。この 285 nm の ΔE (pH 7 - 3.5) と E (pH 7) の間には、図 34 に示すように 0.1% 水準で有意な正の相関が存在した。図 32 に示した 600 nm における ΔE (pH 12.4 - 7) と E (pH 7) の関係と異なり、図 34 の回帰直線は、 E (pH 7) 軸の切片

がかなり大きい正の値を示した。この切片により 285 nm の $E(\text{pH } 7)$ は 2 つの部分に分けられる。切片によって表わされる吸光度は、 $\text{pH } 3.5$ から 7 までの pH 変化の影響を受けない吸光度部分とみなすことができる。285 nm の $E(\text{pH } 7)$ の残りの部分は $\Delta E(\text{pH } 7 - 3.5)$ とほぼ正比例した。この吸光度部分は $\text{pH } 3.5$ から 7 までの pH 変化の影響を受け、また吸光度変化の原因となる化学構造の量を反映するものとみなすことができる。一般に腐植酸においては、腐植化度の指標となる可視部吸光度が増大するとき紫外部吸光度も増大する。従って、285 nm での $\Delta E(\text{pH } 7 - 3.5)$ と $E(\text{pH } 7)$ の正の相関は、酸性 pH 域での吸光度変化の原因となる化学構造部分が、腐植化の進行とともに増加することを示している。

360 nm においても $\Delta E(\text{pH } 7 - 3.5)$ と $E(\text{pH } 7)$ の間に高い正の相関が認められた(図 35)。図 35 でのプロットの分布は土壌の種類との間に以下のような関係を示した。

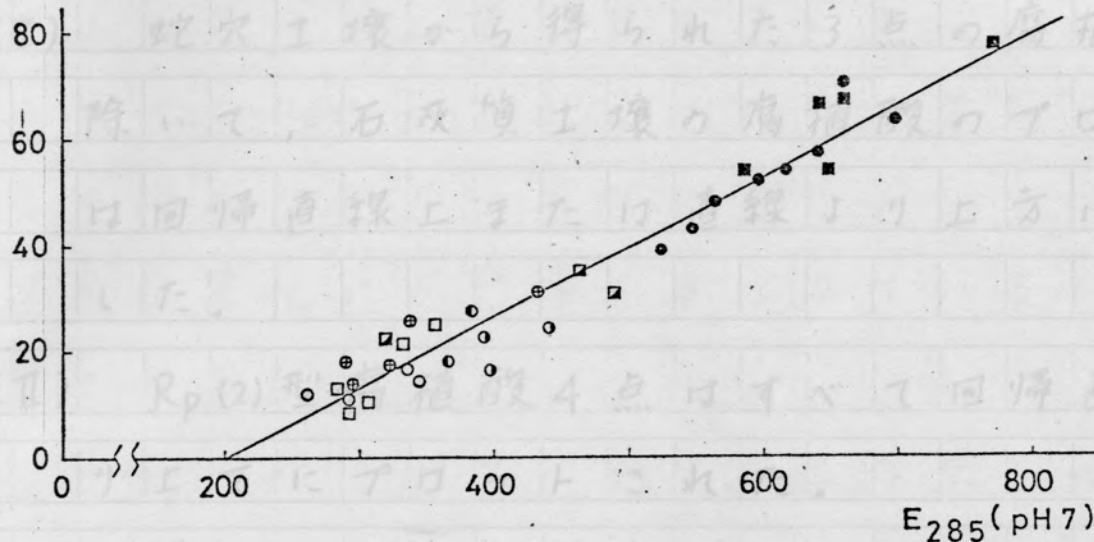
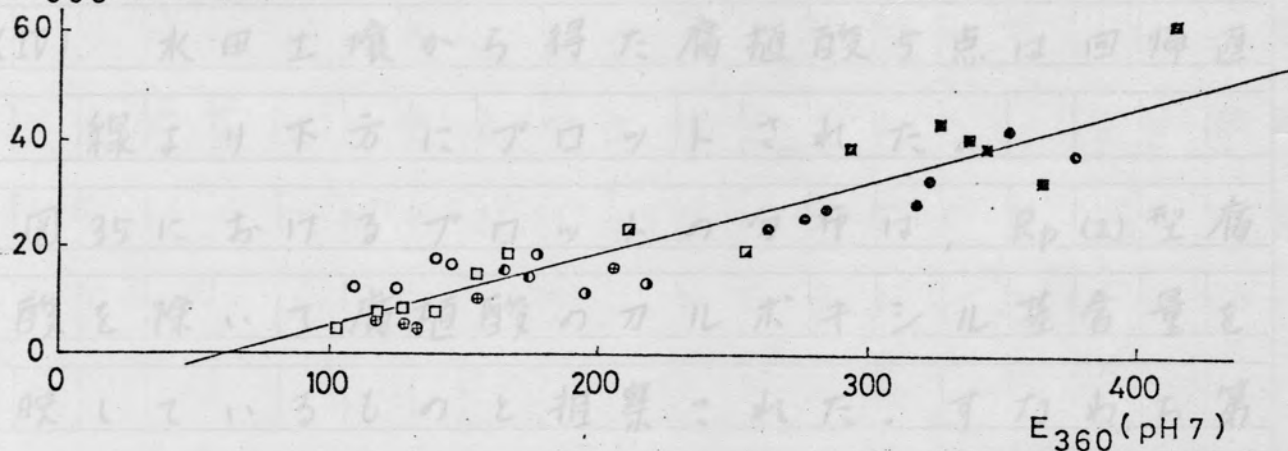
$\Delta E_{285}(\text{pH7-pH3.5})$  $\Delta E_{360}(\text{pH7-pH3.5})$ 

Fig. 34. Relationship between $\Delta E(\text{pH } 7-3.5)$ and $E(\text{pH } 7)$ at 285 nm of soil HAs. (concentration; carbon $\text{lg}/100\text{ml}$). See the note of Fig. 35.

Fig. 35. Relationship between $\Delta E(\text{pH } 7-3.5)$ and $E(\text{pH } 7)$ at 360 nm of soil HAs. (concentration; carbon $\text{lg}/100\text{ml}$).

- □ represent A, B and Rp type HAs obtained from calcareous soils.
- represents A type HAs obtained from kuroboku soils.
- represents B type HAs obtained from forest soils.
- ⊕ represents HAs obtained from paddy soils.
- represents Rp(2) type HAs obtained from Ao layer of forest soils.

(I) 蛇穴土壤から得られた3点の腐植酸を除いて、石灰質土壤の腐植酸のプロットは回帰直線上または直線より上方に位置した。

(II) $R_p(2)$ 型腐植酸4点はすべて回帰直線より上方にプロットされた。

(III) 黒ぼく土のA型腐植酸6点中の5点は回帰直線より下方にプロットされた。

(IV) 水田土壤から得た腐植酸5点は回帰直線より下方にプロットされた。

図35におけるプロットの分布は、 $R_p(2)$ 型腐植酸を除いて腐植酸のカルボキシル基含量を反映しているものと推察された。すなわち第3章に示したように、腐植化度が同程度の他の種類の腐植酸と比べて、石灰質土壤の腐植酸はカルボキシル基含量が高く、逆に黒ぼく土および水田土壤の腐植酸はカルボキシル基含量が低かった。 $R_p(2)$ 型腐植酸のカルボキシル基含量も低かったが、360 nmの ΔE (pH 7 - 3.5) は高かった。 $R_p(2)$ 型腐植酸においては、