

第 8 章 腐植酸の紫外および可視部吸収スペクトルに対するカルボニル基の寄与

第 6 章 および 7 章では、土壌腐植酸の紫外および可視部吸収に対するフェニール性水酸基およびカルボキシル基の解離の影響を検討した。他方、土壌腐植酸中のカルボニル基の炭素は全炭素の 5 ないし 20% を占め、腐植化度が高くなるほど増加した (第 3 章)。従って、カルボニル基も、腐植酸中の暗色高分子の構造に大きく寄与し、紫外および可視部吸収にも大きな影響を及ぼしていることが予測される。Adler ら (51) は、リグニンおよびその関連化合物を NaBH_4 で還元し、その吸収スペクトルの変化を研究しているが、腐植酸についてはこの種の研究は行われていない。本章では、腐植酸の紫外および可視部吸収スペクトルに対するキノンやその他のカルボニル基の影響を明らかにするため、腐植酸および各種関連化合物の NaBH_4 および $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 還

元にともなう吸収スペクトルの変化を検討した。

試料および方法

1) 試料

土壌腐植酸：表 18 に示す 40 点の腐植酸を供試した。

フルボ酸：七宗ポドソル B_h 層土壌のフルボ酸分画試料 2 点，Fr. B₄ および Fr. D₁ を供試した。

関連化合物：第 5 章 および 第 7 章 で用いたグルコース腐植酸，ハイドロキノニ腐植酸，ポリマレイン酸，稲わらのミルドウッドリグニン (MWL)，および東京大学山崎素直博士より恵与されたサーコスポリン (cercosporin) を供試した。サーコスポリンは *Cercospora kikuchii* の菌糸から単離された 4, 9-ジヒドロキシペリレン-3, 10-キノニの誘導体である。

2) 腐植酸の $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 還元と吸収スペクトルの測定

(1) 0.1 N NaOH 中での還元

各腐植酸を 0.1 N NaOH 中に溶解し、濃度を 2 ないし 12 mg / 100 ml とした。この溶液の吸収スペクトルを 400 から 700 nm まで測定したのち、約 10 mg の $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を吸光度測定用セル中の溶液 (約 3 ml) に添加し、直ちに吸収スペクトルおよび差スペクトルを測定した。これらのスペクトルは、400 nm 以下の波長では $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ そのものの吸収があるため測定できなかった。

(2) pH 7 のリン酸緩衝液中での還元

各腐植酸を 0.1 N NaOH 中に溶解し、濃度を 5 ないし 60 mg / 100 ml とした。この溶液を 2 ml ずつ 2 本の試験管に分注し、一方には pH 7 の 1/12 M リン酸緩衝液を、もう一方には、あらかじめ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を 0.5% 溶解した pH 7 の 1/12 M リン酸緩衝液を添加した。これらの非還元および還元腐植酸溶液の吸収スペクトル

および差スペクトル [ΔE ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ at pH 7)] を 400 nm から 700 nm まで測定した。還元溶液の吸収スペクトルの測定は還元剤添加後直ちに行なった。

3) 腐植酸の NaBH_4 還元と吸収スペクトルの測定

各腐植酸を 0.1% NaOH 中に溶解し、濃度を 5 ないし 60 mg / 100 ml とした。この溶液 2 ml ずつを 2 本の試験管に分注し、一方には 0.1% NaOH 2 ml および pH 10.1 の 0.2 M ホウ酸緩衝液 4 ml を添加した。他の 2 ml には、あらかじめ NaBH_4 を 0.8% 溶解した 0.1% NaOH 2 ml および pH 10.1 のホウ酸緩衝液 4 ml を添加した。これらの非還元および還元腐植酸の吸収スペクトルおよび差スペクトル [ΔE (NaBH_4)] を 220 nm から 700 nm まで測定した。還元溶液の吸収スペクトルの測定は、還元剤を添加して 15 ないし 18 時間ののちに行なった。

4) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 還元腐植酸の ΔE (pH 12.4 - 7) スペクトル

各腐植酸を 0.1% NaOH に溶解し濃度を 10 倍にし 60 mg / 100 ml としたのち、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を 0.3% とするようになし追加し還元した。この還元腐植酸溶液 5 ml ずつを 2 本の試験管に分注し、それぞれに 0.1% NaOH 20 ml または pH 7 の 1/12 M リン酸緩衝液 20 ml を添加し、pH を 12.4 および 7.0 とした。これらの溶液の差スペクトルを 400 nm から 700 nm まで測定した。

結果および考察

1) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 還元による差スペクトル

図 36 に、pH 7 のリン酸緩衝液中での $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 還元による腐植酸の差スペクトルを示した。 P_{1-11} 型腐植酸 (図 36, No. 8, 9) を除いては、差スペクトルの形状に大きな違いは認められなかった。ただし差スペクトルは 420 から 450 nm の間で最大値を示し、このピークは

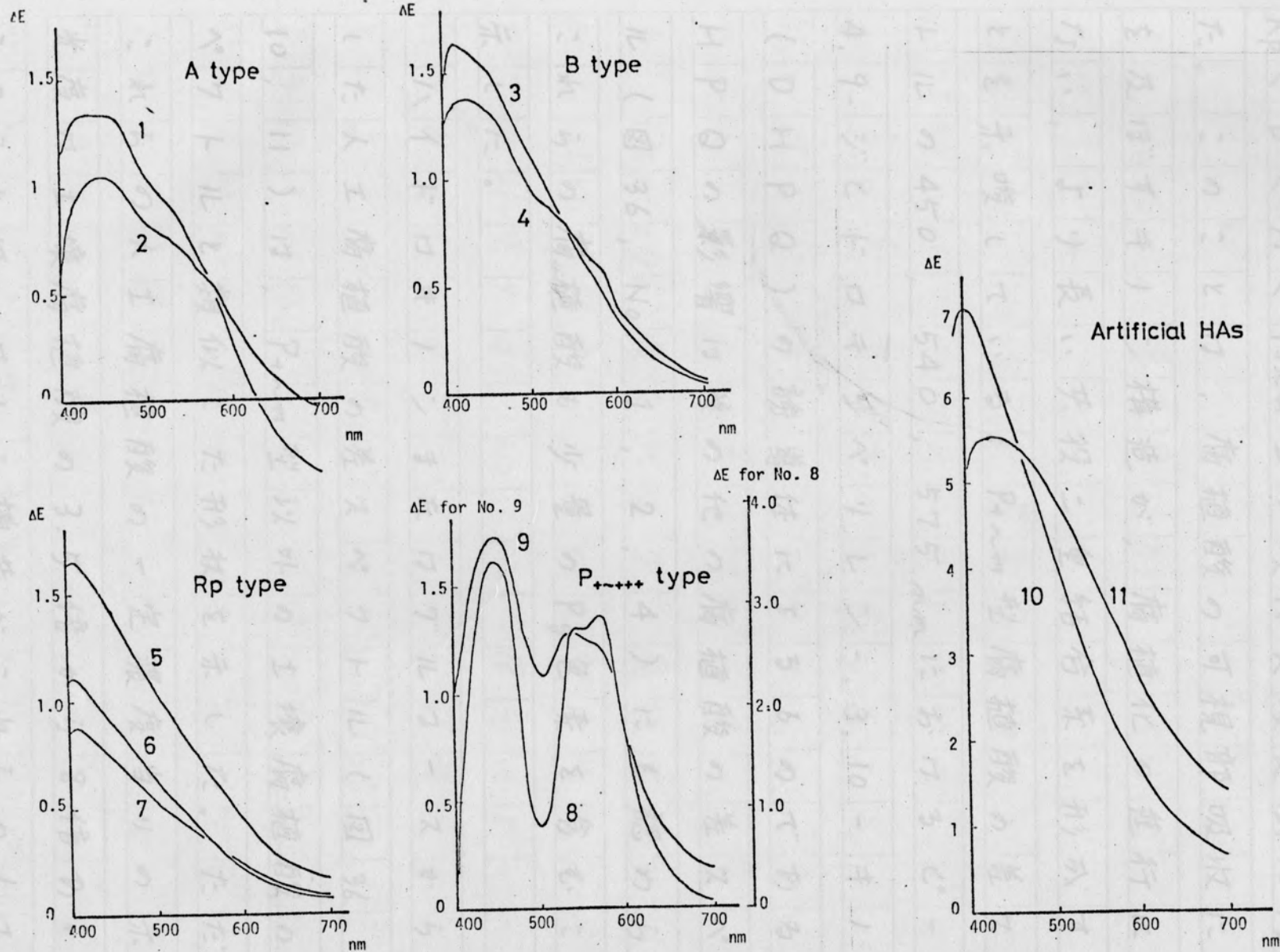


Fig. 36. Difference spectra of humic acids by $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ reduction in pH 7 phosphate buffer. 1. Nagara P, 2. Inogashira-1, 3. Kinshozan F, 4. Kuragari 1, 5. Higashiyama (F-H), 6. Kinshozan OH, 7. Gifu, 8. Tsubame Pg, 9. Tsubame-1, 10. H.Q.-HA, 11. Glu.-HA. Concentrations are fixed at 0.1 % organic matter.

$R_p < B < A < P_{+m}$ 型の順に長波長側に移動した。このことは、腐植酸の可視部吸収に影響を及ぼすキノン構造が、腐植化の進行にともない、より長い共役二重結合系を形成することを示唆している。 P_{+m} 型腐植酸の差スペクトルの450, 540, 575 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)の誘導体によるものである。DHPQの影響はその他の腐植酸の差スペクトル(図36, No. 1, 2, 4)にも認められ、これらの腐植酸も少量のPg色素を含むことを示した。

ハイドロキノンまたはグルコースから調製した人工腐植酸の差スペクトル(図36, No. 10, 11)は、 P_{+m} 型以外の土壌腐植酸の差スペクトルと類似した形状を示した。ただし、これらの人工腐植酸の一定濃度当りの示差吸光度は土壌腐植酸の3.5倍から8倍あった。このことは、キノン構造がこれらの人工腐植酸の可視部吸収に重要な役割を果たしているこ

とを示唆している。

2) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 還元腐植酸の ΔE (pH 12.4 - 7)
スペクトル

図 37 に, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 還元腐植酸および非還元腐植酸の ΔE (pH 12.4 - 7) スペクトルを対照して示した。第 7 章でも述べたように, 腐植酸の ΔE (pH 12.4 - 7) スペクトルは主としてフェノール性水酸基の解離に基づくものである。 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 還元により, 腐植酸の可視部の ΔE (pH 12.4 - 7) 示差吸光度は非常に増大した。この増大は, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 還元によって腐植酸中のキノンがジフェノールに還元されたことによるものと考えられる。 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 還元による ΔE (pH 12.4 - 7) の増加率は $R_p(1)$ 型く B 型く A 型の順に増大し, また $R_p(2)$ 型腐植酸および人工腐植酸でも大きな値を示した。 $P_{\text{H}} \sim \text{III}$ 型腐植酸では, 還元により DHPQ に基づくピークが短波長側へ移動した。これらの結果は, キノンの関与する共役二重結合系の量は

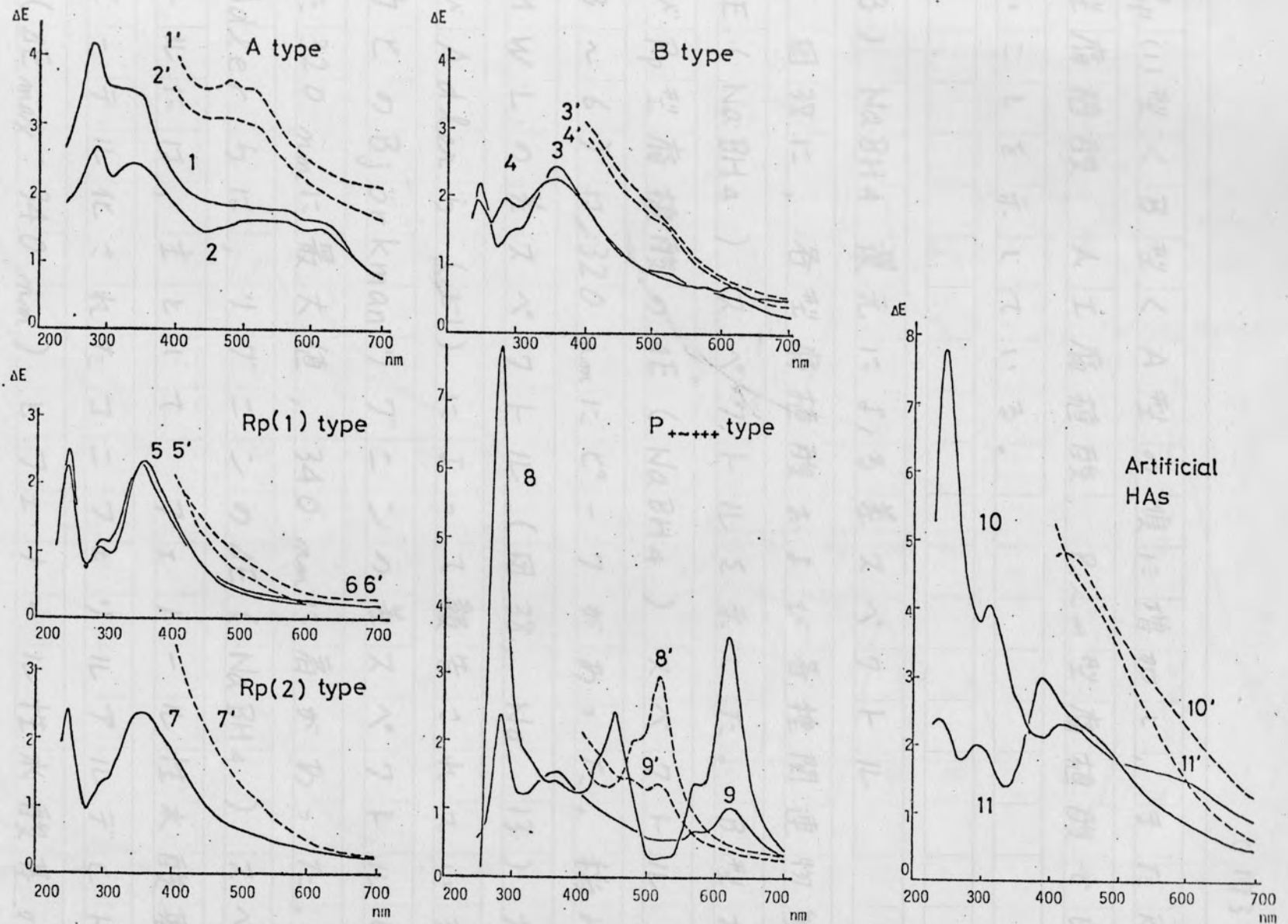


Fig. 37. ΔE (pH 12.4-7) spectra of the humic acids reduced with $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ and the non-reduced humic acids. 1. Nagara P, 2. Inigashira, 3. Kinshozan F, 4. Kuragari, 5. Gifu, 6. Kinshozan OH, 7. Higashiyama (F-H), 8. Tsubame Pg (1/2 scale), 9. Tsubame, 10. Hydroquinone-HA, 11. Glucose-HA. Broken lines represent the curves for reduced humic acids, and solid lines for non-reduced humic acids.

R_p (1)型 < B型 < A型の順に増加し, また R_p (2)型腐植酸, 人工腐植酸, $P_{+ \sim +}$ 型腐植酸でも多いことを示している。

3) $NaBH_4$ 還元による差スペクトル

図 38 に, 各型腐植酸および各種関連物質の $\Delta E (NaBH_4)$ スペクトルを示した。B型および R_p 型腐植酸の $\Delta E (NaBH_4)$ スペクトル (No. 3 ~ 6) は 320 nm にピークがあった。稲わら MWL の差スペクトル (図 38, No. 13) および Adler ら (51) によって報告されているトウモロコシの Björkman リグニンの差スペクトルもまた 320 nm に最大値, 340 nm に肩があった。

Adler らは, リグニンの $\Delta E (NaBH_4)$ スペクトルには, 主として, フェニール性水酸基のエステル化されたコニフェリルアルデヒド (ΔE_{max} : 340 nm) とフェニール性水酸基がエステル化された 4-ケトグアヤシル基 (ΔE_{max} : 303 ~ 314 nm) が貢献していることを示した。

B型および R_p 型腐植酸の差スペクトルがリグ

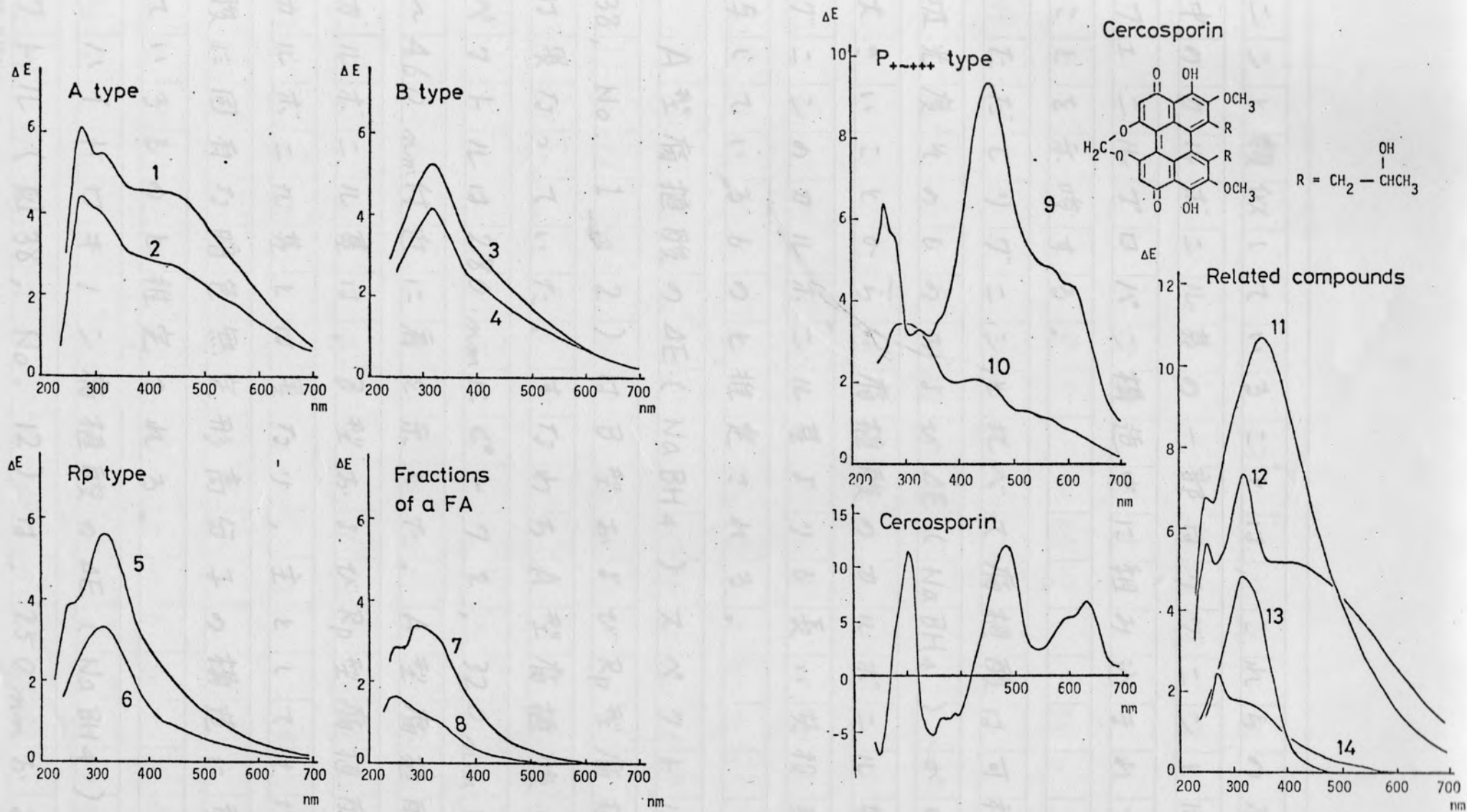


Fig. 38. Difference spectra of humic acids by NaBH_4 reduction.

1. Nagara P, 2. Inogashira-1, 3. Kinshozan F, 4. Kuragari-1, 5. Higashiyama (F-H), 6. Gifu, 7. Fr.D₁, 8. Fr.B₄, 9. Tsubame Pg, 10. Tsubame-1, 11. Glu.-HA, 12. H.Q.-HA, 13. Milled wood lignin of rice straw, 14. polymaleic acid. concentrations are fixed at 0.1 % organic matter.

ニンと類似していることは、これらの腐植酸中のカルボニル基の一部はリグニンと同様にフェニルプロパン構造中に組み込まれていることを示唆する。

ただしリグニンと比べて腐植酸は可視部の吸光度そのものおよび ΔE (NaBH_4) がかなり大きいことから、腐植酸のカルボニル基はリグニンのカルボニル基よりも長い共役系に関与しているものと推定される。

A型腐植酸の ΔE (NaBH_4) スペクトル (図38, No. 1, 2) はB型およびRp型腐植酸とは異なっていた。すなわちA型腐植酸の差スペクトルは280 nmにピークを、320 nmと450~460 nm付近に肩を示した。A型腐植酸中のカルボニル基は、B型およびRp型腐植酸中のカルボニル基とは異なり、主として土壌腐植酸に固有な暗色無定形高分子の構造に貢献しているものと推定される。

ハイドロキノン腐植酸の ΔE (NaBH_4) スペクトル (図38, No. 12) は、250 nmおよび

320 nm にピークが、430 nm に肩があった。差スペクトルの形状は A 型腐植酸と類似していた。これらの腐植酸の可視部の大きな示差吸光度はキノンの重合した構造と関係があるものと推定される。

グルコース腐植酸の ΔE (NaBH₄) スペクトル (図 38, No. 11) は 250 nm にピーク、355 nm に最大ピークがあった。差スペクトルは土壌腐植酸とは異なった形状を示した。

燕 Pg の ΔE (NaBH₄) スペクトル (図 38, No. 9) は 260 および 455 nm にピークを、570 および 610 nm に肩を持っていた。これらのピークや肩は DHPQ 誘導体によるものである。同じく DHPQ 誘導体のひとつであるサーコスポリンの差スペクトルは 305, 485, 600, 635 nm にピークが、345, 380, 395 nm に極小値があった。サーコスポリンの差スペクトルのピークは燕 Pg の場合よりも長波長側に移動していたが、両者の差スペクトルは互いに類似した形状を示した。サーコスポリンの

ΔE (NaBH_4) の最大値は燕 P_g の 2.7 倍であった。また燕 P_g の差スペクトルはワーゴスポリ
 このようにマイナスの値をとらなかつた。これらのことは、燕 P_g がセファデックス G50 で
 P_g 色素を精製した画分であるにもかかわらず、その紫外および可視部吸収には P_g 以外の成分
 もかなり寄与していることを示唆している。

七宗ポドソル Bk 層土壤のフルボ酸分画試料 Fr. B₄ および Fr. D₁ の ΔE (NaBH_4) スペクトル
 (図 38, No. 7, 8) は、土壤腐植酸とは異なつた波長にピークがあつた。さらにこれら
 2 試料の差スペクトルも互いに異なつていた。Fr. D₁ は 290 nm に、Fr. B₄ は 245 nm に最大ピーク
 があつた。ただし両差スペクトルとも 245 nm にピークがあり、330 nm に肩がある点では共通
 していた。

ポリマレイニ酸の差スペクトル (図 26, No. 14) は 270 nm にピークを、340 nm に肩を持って
 いた。従つて上述のフルボ酸分画試料とはピーク、肩の波長が異なつていた。

4) $\Delta E(\text{NaBH}_4)$ とカルボニル基含量の関係
I 壤腐植酸の NaBH_4 還元による吸光度の減少値を 285, 320, 360 nm で比較した。これらの波長は, NaBH_4 還元による吸光度の減少率が 600 nm 付近で最大になること, $\Delta E(\text{NaBH}_4)$ スペクトルが 285 または 320 nm にピークを示すことから選んだ。285, 320 および 600 nm における $\Delta E(\text{NaBH}_4)$ は腐植化度が高くなるほど増大した。さらに $\Delta E(\text{NaBH}_4)$ とカルボニル基含量の間には, 285 nm および 600 nm では 0.1% 水準で (図 39), 320 nm では 1% 水準で有意な正の相関が認められた。600 nm の吸光度とカルボニル基含量の間にも高い正の相関が認められたが ($r = 0.708^{***}$), $\Delta E_{600}(\text{NaBH}_4)$ とカルボニル基含量の相関はさらに高かった ($r = 0.829^{***}$)。これらの結果は, NaBH_4 還元による吸光度変化がカルボニル基の還元に直接原因することを示している。A 型腐植酸の 600 nm の示差吸光度は, すべて回帰直線による推定値よりも高い値を示した。

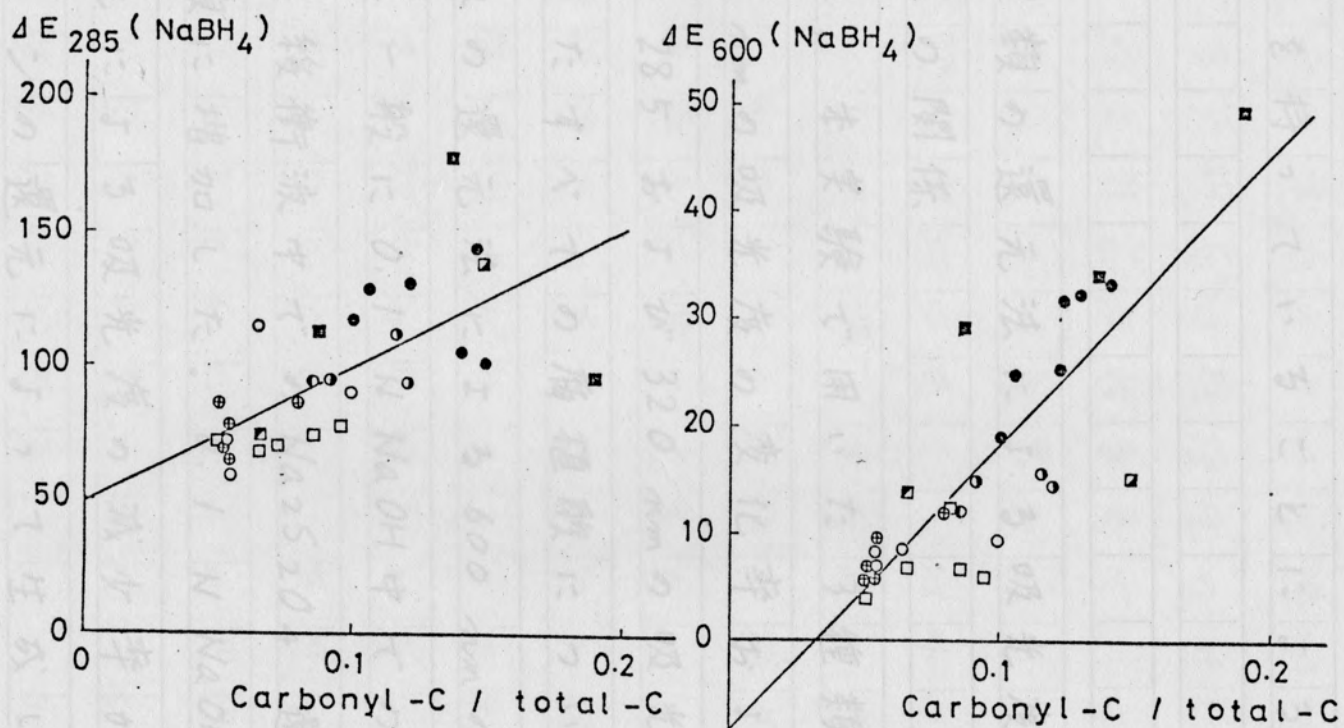


Fig. 39. Relationship between ΔE and carbonyl group content of HAs. Concentrations are fixed at carbon 1g/100ml.

これは A 型 腐植酸が他の型の腐植酸よりも長い共役系を持っていることによるものと推定される。

5) 3 種類の還元法による吸光度の変化率と腐植化度の関係

表 18 に、本実験で用いた 3 種類の還元法による 600 nm の吸光度の変化率および NaBH_4 還元による 285 および 320 nm の吸光度の変化率を、用いたすべての腐植酸について示した。それぞれの還元法による 600 nm の吸光度の減少率は、一般に 0.1 N NaOH 中での $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 還元、pH 7 緩衝液中での $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 還元、 NaBH_4 還元の順に増加した。0.1 N NaOH 中での $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 還元による吸光度の減少率が最も低いのは、キノンの還元によって生成したジフェニールが 0.1 N NaOH 中で解離し、深色効果によって還元型腐植酸の吸光度を増加させるためと推定される。

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 還元による 600 nm の吸光度の減少