

肥料科学, 第3号, 93~131 (1980)

腐植酸の化学

筒木 潔・熊田 恭一*

1. 腐植酸の分類
2. 腐植酸の化学的組成
3. 腐植酸の紫外および可視部吸収
4. 要約

* 名古屋大学農学部

土壤有機物のなかで、腐植酸は量的にも多く、また、土壤固有の有機物としての特性を顕著に示すこと、固体粉末として得やすいことなどから、最もよく研究されてきた。また近年、有機物の構造解析のための分析機器の長足の進歩にともない、各種の新たな分析方法が腐植酸の研究に用いられつつある。

これら多くの研究によって、腐植酸の有機化学的、物理化学的性質については、かなりの知見が得られてきた。しかし、腐植酸は暗色無定形の高分子物質を主成分とする多種多様な物質の混合物であるため、その構造はまだ不明のまま残されている。また、腐植酸の性質は土壤の種類によって大きく異なっているが、多数の腐植酸を同時に分析して、各種の性質の変動に見られる規則性を追求した例は少ない。

筆者らは、各種土壤から得られた40点の腐植酸を試料として、元素組成、官能基組成、窒素成分、酸、アルカリ分解生成物や分子量分布と、腐植酸の腐植化度や型あるいは土壤の種類との関係について研究してきた。また、腐植酸の腐植化度の重要な指標とされている紫外および可視部吸収スペクトルの発現に対する腐植酸中のフェノール性水酸基、カルボキシル基、キノン、キノン以外のカルボニル基の寄与について検討した¹⁻⁸⁾。

本稿はこれらの研究結果を要約するとともに、これまでの知見の総合によって得られた新しい概念の提出も意図したものである。

1. 腐植酸の分類

腐植酸は、構造的にも組成的にも非常に複雑な有機物であり、その性質は土壤の種類によって異なっている。従って、偏差の大きい腐植酸の性質を統一的に理解するためには、何らかの基準にもとづいた系列付けあるいは分類が必要である。

熊田^{9,10)}は、腐植酸の可視部吸収に関する特性値をもって腐植酸の分類基

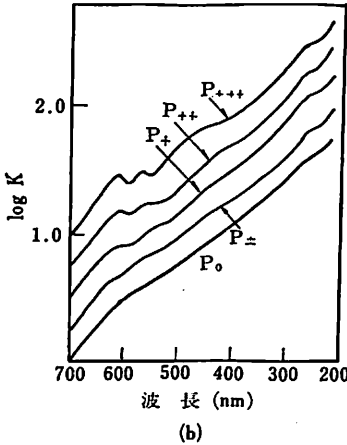
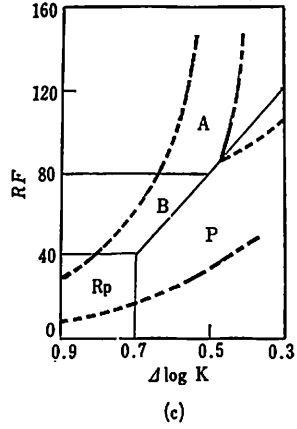
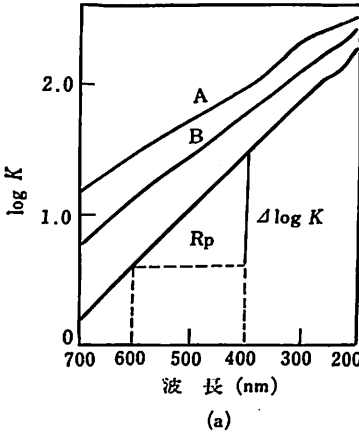


図 1 腐植酸の吸収スペクトルおよび分類図

$$\text{注 } RF = \frac{K_{600} \times 1000}{(\text{腐植酸溶液 } 30\text{ml 当りの } 0.1\text{NKMnO}_4 \text{ 消費量})}$$

$$\Delta \log K = \log K_{400} - \log K_{600}$$

ただし K_{400} , K_{600} はそれぞれ 400nm および 600nm における吸光度

準とすることを提案した。すなわち、腐植酸アルカリ溶液の紫外・可視部吸光度は、一般に波長の増大とともにほぼ指数関数的に減少し、その吸収スペクトル ($\log K$ - λ 曲線, K は吸光度,

λ は波長) は、ほぼ直線状となる (図1-a)。そこで、図1の注のように定義される RF (一定濃度の腐植酸溶液の 600nm の吸光度) と $\Delta \log K$ (吸収スペクトルの波長軸に対する傾き) を、この吸収スペクトルの特性値として採用し、RF- $\Delta \log K$ 図上で、腐植酸を A, B, Rp および P 型に大別することとした(図1-b)。なお、P 型は、Pg 色素による吸収帯を多少とも持つもの (P_{\pm} ~ $P_{\#}$ 型) と、この吸収帯を持たないもの (P_0 型) に区分する (図 1-c)。熊田らは、光吸収性以外の腐植酸の諸性質もこの分類と対応して区分されることを示し、また、土壌の種類と腐植酸の型との対応についても調べているが⁹⁾,

なお検討不十分である。本研究は、熊田らによる腐植酸分類法の妥当性の検証と、その発展を意図したものである。

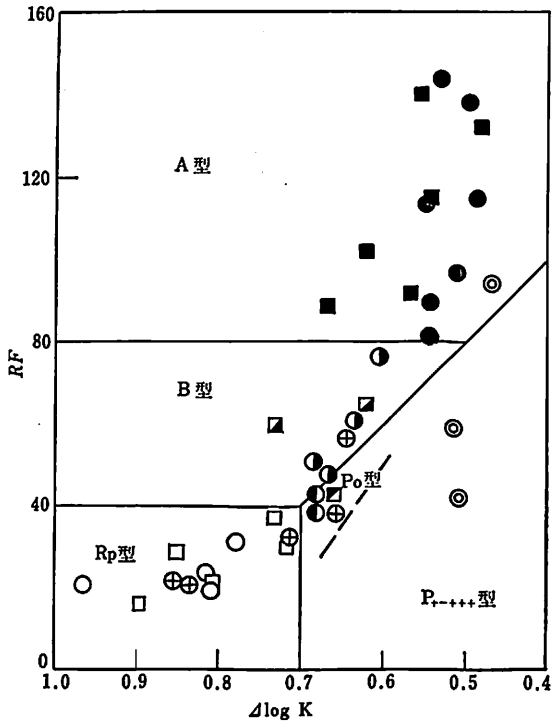


図2 腐植酸の分類

- 火山灰土由来のA型腐植酸
- 石灰質土壌由来のA型腐植酸
- 褐色森林土由来のB型腐植酸
- ⊙ 石灰質土壌由来のB型腐植酸
- 火山灰土および褐色森林土由来のPo型腐植酸
- ⊠ 石灰質土壌由来のPo型腐植酸
- 石灰質土壌由来のRp(1)型腐植酸
- ⊕ 水田土壌由来のRp(1)型, Po型, B型腐植酸
- 森林土壌Ao層由来のRp(2)型腐植酸
- ⊗ P_g色素の吸収が明らかなP₊...型腐植酸

図2は、この研究で用いた腐植酸を熊田らの分類法にあてはめ、図示したものである。供試腐植酸の由来は、図2の注に示すように、記号によって区別した。図からわかるように、同じ種類の土壌からも型を異にする腐植酸が得られており、また、ある型の腐植酸が多種類の土壌から得られている。

なお、同じRp型に属する腐植酸でも、土壌の無機層位から得られた腐植

酸と、森林土壌 A。層および腐朽植物遺体から得られた腐植酸とでは、その性質に大きな違いが認められたので、これらを R_p(1)型と R_p(2)型に細区分して扱うこととした。

熊田ら^{9,11)}は、腐植酸の生成過程すなわち腐植化過程が、非火山灰土では R_p型 → B型 → A型の方向をたどり、火山灰土では R_p型 → P。型 → (B型) → A型の方向をたどると推論している。しかし、本研究で扱った P。型腐植酸のなかには火山灰土由来のものは1点のみであり、他の3点もそれぞれ異なった種類の土壌から得られたこと、および実験結果に基づき、供試腐植酸は R_p(2)型 → R_p(1)型 → P。型 → B型 → A型に系列づけ、さらに各型腐植酸は RF によって配列して取り扱うこととした。すなわち、以下の記述では、腐植酸の変化系列を上記のように想定し、かつ、RF 値の増大をもって腐植化度の上昇とみなしたことになる。なお、RF 値と諸性質の間にみられる全体的傾向からのかたよりによって、各種土壌の特徴を識別しようとした。

P型腐植酸は、既述のように、P_g色素による吸収を多少とも持つもの (P_{±-+++}型) と持たないもの (P。型) に区分される。P_g色素を含む腐植酸は世界的に広く分布し、とくに温帯から亜寒帯にいたる森林土壌に多いが、一部の草原土壌や熱帯の土壌、さらに火山灰土の腐植質埋没土にも見られる。この P_g色素の給源は土壌中のかび *Cenococcum graniforme* その他の菌核および菌糸である⁹⁾。また、P_g色素の母核は熊田ら⁹⁾によれば、4,9-ジヒドロキシペリレン-3, 10-キノンと推定され、そのアルカリ溶液は、611nm, 568nm, 445 nm, および280 nm 付近に吸収極大を持ち、緑色を呈する。

P_{±-+++}型腐植酸の場合には、その RF 値に対する P_g色素の吸収の影響が大きいため、他の型の腐植酸と同一系列上で比較することは困難である。従って、この論説では、吸収スペクトルの比較以外の点では、P_{±-+++}型腐植酸に関する記述を省略した。

2. 腐植酸の化学的組成

a. 元素組成

腐植酸の最も基本的な性質として、まず第1に元素組成をとりあげる。表1に筆者らが試料とした腐植酸の炭素、窒素、水素、酸素含量の各型ごとの平均値を示した。なお、表中の不飽和度は後にとりあげる。

表 1 腐植酸の元素組成(平均値)

型	土壌の種類	試料数	重量% (無水, 無灰分重当り)				不飽和度	注3
			C	H	N	O		
A	火山灰土	7	57.8	3.73	3.13	36.1	64.9	
	石灰質土壌	6	57.0	3.48	3.08	36.5	67.0	
B	各種 注1	6	56.8	4.82	4.13	34.3	53.9	
P ₀	各種 注2	4	57.5	6.00	4.08	32.4	42.4	
R _p (1)	石灰質土壌	5	55.2	5.72	4.92	34.2	43.0	
"	水田土壌	3	55.2	5.57	5.67	33.6	45.8	
R _p (2)	森林土壌A ₀ 層	4	58.2	5.48	3.45	32.9	47.8	

注 1 B型腐植酸は褐色森林土 3 点, 石灰質土壌 2 点, 水田土壌 1 点からなる

注 2 P₀型腐植酸は火山灰土, 褐色森林土, 石灰質土壌, 水田土壌各 1 点からなる。

注 3 不飽和度は, C, H, N の重量%から次式によって計算した。

$$\text{不飽和度} = \frac{(C\%) - 6 \left(\frac{H\%}{C\%} + 0.429 \frac{N\%}{C\%} + 12 \right)}{C\%} \times 100$$

本文中に示した式は原子数比を用いての計算法であり、この式と同一のものである。

注 4 この表の値は文献(1)のデータから計算した。

A層土壌から得られた R_p(1)型腐植酸と森林土壌 A₀層および腐朽植物遺体から得られた R_p(2)型腐植酸を比較すると、R_p(1)型は R_p(2)型よりも窒素含量がかなり高く、他方、炭素含量はわずかに低く、水素含量および酸素含量には有意な差がなかった。R_p(2)型から R_p(1)型への変化過程においては、土壌生物による易分解性有機物の消費と菌体タンパク質の増加があり、その結果、窒素含量が増加したものと思われる。また水素含量および酸素含量の変化がほとんどないことからわかるように、この過程では腐植酸分子の酸化はほとんど進行していない。R_p(1), P₀, B, および A型の間では、腐植化度の増大にとともに、水素含量および窒素含量は著しく減少し、炭素含量およ

び酸素含量はわずかに増加した。この過程では腐植酸分子の酸化が著しく進行し、不飽和結合の数が増加し、暗色無定形高分子が形成され、他方窒素成分は無機化によって失われてゆくものと思われる。

図3は、腐植酸と石炭、泥炭、リグニンその他の植物体成分を、原子数比 H/C-O/C 比相関図によって較したものである。この図における腐植酸のプ

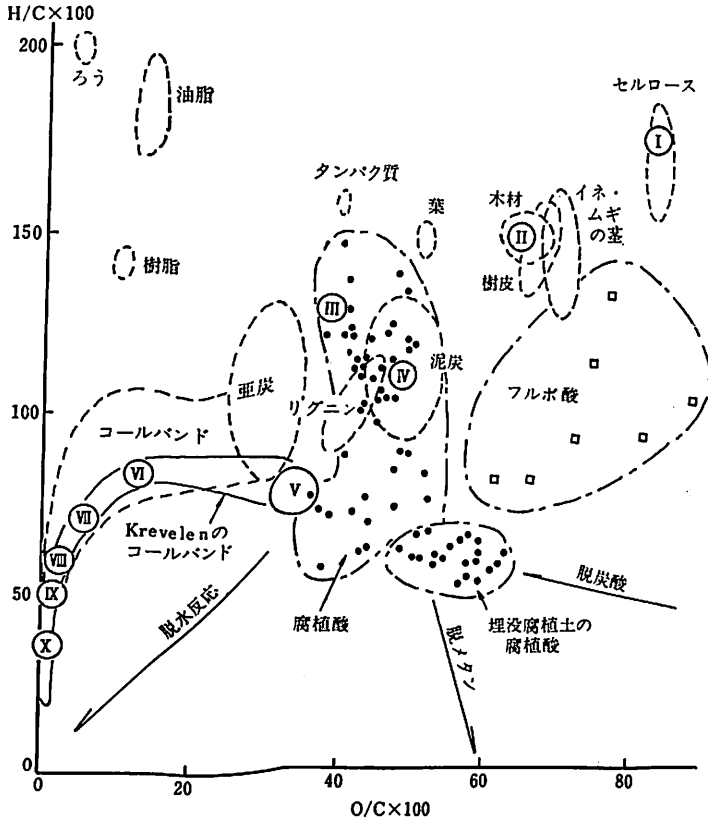


図3 H/C-O/C 相関図 腐植酸と石炭または各種植物体成分の比較

各種植物体成分およびコールバンドの領域は、Van Krevelen (12) および村田(13)の報告から引用した。埋没腐植土腐植酸は Yoshida ら (14) による。I セルロース, II 木材, III リグニン, IV 泥炭, V 褐炭, VI 低品位れき寄炭, VII 中品位れき寄炭, VIII 高品位れき寄炭, K 半無煙炭, X 無煙炭

(100) 腐植酸の化学

ロットの分布範囲はかなり広く、腐植酸の元素組成は大きな幅を持つことがわかる。H/C-O/C 相関図から見た場合、腐植酸の分布領域は石炭やリグニン以外の各種植物体成分とは異なる場所に位置し、リグニンと泥炭を包含し、リグニンよりも酸素に富む。なお、脱水素 (H/C 比の低下) の方向は全体として腐植化度の増大に対応している。

また、腐植酸のうち、リグニンおよび泥炭の分布域より下方に位置するものはほとんど A 型腐植酸であって、これらは脱水反応の方向に配列していた。それ故、A 型腐植酸の生成には、脱水縮合 (炭化反応) が関与すると推定される。なお、最近の吉田ら¹⁴⁾の研究によれば、火山灰土の埋没腐植層の腐植酸は、図示したように、本研究で用いた腐植酸とは異なる位置に分布する。これは、埋没年代の経過とともに酸素付加 (O/C 比の上昇) が著しく進行することを意味するのであろう。

上述の H/C-O/C 相関図は元素組成の総合的表現の 1 つの方法である。同じく総合的表現として、腐植酸の不飽和度を算出した。ここにいう不飽和度とは、C, H, N, O からなる有機物を、同じ数の C と N を持つ飽和化合物と比べた場合の水素分子の脱離数を、炭素 100 個当たりについてあらわすものであって、H/C 比よりも直截的な不飽和度の表現である。計算は次式による。

$$\text{不飽和度} = \frac{2[\text{C}] + 2 - [\text{H}] + [\text{N}]}{2[\text{C}]} \times 100$$

ただし [C], [H], [N] は原子数である。なお、酸素含量は不飽和度には関係しない。

各型腐植酸の不飽和度の平均値は表 1 に併記した。不飽和度は R_p 型および P_o 型で低く、B 型、A 型の順に増加した。

A 型腐植酸の不飽和度の平均値 65, 67 は非常に高い値である。ちなみに、共役ポリエチン H-(C=C)_n-H の不飽和度も 50 にすぎない。一方、ベンゼンカルボン酸の不飽和度は高く、例えば安息香酸は 71, フタル酸は 75, ベンゼントリカルボン酸は 78 であり、キノンでは 83 である。次項に述べるように腐植酸は多量のカルボキシル基およびカルボニル基を持っているから、A 型

腐植酸の高い不飽和度には、これらの構造が大きく寄与しているものと思われる。

図4は不飽和度と腐植化度 RF の関係を示したものである。図から明らかなように、両者間には非常に高い正の相関 ($r=0.899^{**}$) が認められた。この高い相関は、H/C-O/C 図において腐植酸の分布がかなりの幅を持つことと対照的である。このことはまた可視部吸光度から導かれた腐

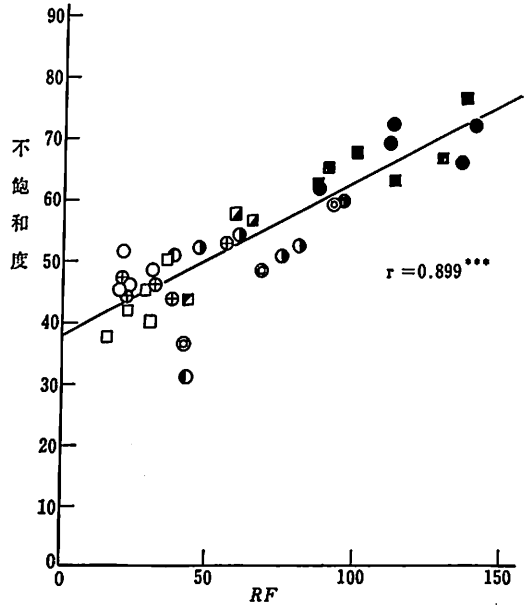


図4 腐植酸の不飽和度と腐植化度の関係
注 記号については図2の注を参照 (以下同じ)

植化度 RF が、腐植酸の基本的性質と緊密な関係を持っており、従って腐植酸の生成過程や分類の指標として妥当であることを示している。





b. 官能基組成

腐植酸は、カルボキシル基、フェノール性水酸基、カルボニル基、アルコール性水酸基、メトキシル基などの含酸素官能基を多量に含む。腐植酸の酸性、錯体形成能、吸着能などの性質は、これらの官能基の働きによるものである。

表2には、腐植酸中のこれらの官能基の量を各型ごとの平均値によって示した。

全酸度 (酸性官能基の総量) は、 $R_p(2)$ 型から $R_p(1)$ 型にかけて減少した。

表2 腐植酸の官能基組成 (平均値 me/g)

型	土壌の種類	全酸度	フェリッン比色値による							官能基 酸素 全酸素 × 100
			カルボ キシル 基	フェノ ール性 水酸基	カルボ ニル基	アルコ ール性 水酸基	メトキ シル基	フェノー ール性水酸 基	アルコー ール性水酸 基	
			CO ₂ H		C=O		-OCH ₃			
A	火山灰土	7.01	4.71	2.30	6.60	1.20	0.26	1.12	2.48	84.8
	石灰質土壌	7.90	5.56	2.34	10.26	0.54	0.22	1.03	1.86	116.3
B	各種	7.05	3.92	2.13	6.63	2.98	0.68	1.04	4.10	93.4
Po	各種	5.91	2.93	2.99	3.55	2.48	0.62	1.07	4.29	77.2
R _p (1)	石灰質土壌	5.16	2.96	2.20	3.40	3.22	0.80	0.87	4.40	72.9
	水田土壌	4.01	2.49	1.52	2.52	3.42	1.25	0.75	4.18	65.2
R _p (2)	森林土壌A ₁ 層	5.99	2.73	3.25	3.26	2.53	1.29	1.18	4.42	78.1

注) 定量法 全酸度は水酸化バリウム法, カルボキシル基は酢酸カルシウム法, フェノール性水酸基は全酸度とカルボキシル基の差, カルボニル基はオキシム化法, アルコール性水酸基はアセチル化で求めた全水酸基含量からフェノール性水酸基含量を差し引いたもの, メトキシル基はヨウ化水素分解法
詳細については文献(2)を参照

R_p(2)型の全酸度のうちわけをみると, フェノール性水酸基含量がカルボキシル基含量よりも多い。他方, R_p(1)型のフェノール性水酸基含量はカルボキシル基含量よりも少ない。ただし, カルボキシル基含量はR_p(1)型とR_p(2)型の間であまり異ならない。従って, R_p(2)型からR_p(1)型へかけての全酸度の減少は, 主にフェノール性水酸基の減少によるもので, 腐朽植物遺体中の易分解性フェノールの分解が推察される。

R_p(1)型からP.型およびB型を経てA型に至る過程では, カルボキシル基もフェノール性水酸基もともに増加した。ただしフェノール性水酸基の増加はわずかであり, カルボキシル基の増加が著しかった。



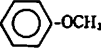
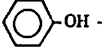

腐植酸の官能基のなかで, 量が最も多いのはカルボニル基であった。カルボニル基の中にはかなりの量のキノンも含まれ, 腐植酸の強い可視部吸収の原因になっているものと思われる。カルボキシル基と同様, カルボニル基も腐植酸の腐植化度が高くなるほど増加し, またカルボキシル基含量とカルボニル基含量の間にはほぼ正比例な関係が認められた。このことは, カルボキ

シル基とカルボニル基がいわゆる腐植物質の主要な官能基であり、両者が同様な機構で生成されることを示唆している。

アルコール性水酸基およびメトキシ基は腐植化度が高くなるほど減少し、RF 値との間に高い負の相関を示した。これは腐植化の進行にともなう、炭水化物やリグニンの分解を示すのであろう。

他方、腐植酸の酸素のなかには、これらの含酸素官能基によって説明されないものがある。この種の酸素は主として多糖類、リグニン、タンパク質等の架橋酸素および環内酸素と思われるが、このような酸素は腐植化度の上昇にともなって減少し、特にA型腐植酸では酸素のほとんどがカルボキシ基、カルボニル基およびフェノール性水酸基の酸素で説明された(表2)。

表3 官能基炭素による腐植酸の炭素の説明(全炭素に対する%)

型	土壌の種類	カルボキシ シル基	フェノ ール性 水酸基	カルボ ニル基	アルコー ル性水酸 基	メトキシ 基	フオリン法		官能基による 炭素の合計
		CO ₂ H		C=O					フアリ ン法
A	火山灰土	9.76	28.8	13.6	2.51	3.86	14.0	5.14	44.9~58.4
	石灰質土壌	11.76	29.6	21.8	1.17	3.30	13.0	3.98	57.8~72.1
B	各種	8.18	25.0	14.0	7.43	10.1	12.9	8.31	53.6~65.4
P ₀	各種	6.15	37.3	7.42	5.23	9.15	13.4	9.03	46.8~65.8
R _p (1)	石灰質土壌	6.59	28.6	7.58	7.07	12.4	11.3	9.68	49.3~61.7
	水田土壌	5.40	19.8	5.49	7.45	15.3	9.85	9.04	48.9~57.2
R _p (2)	森林土壌A ₀ 層	5.65	40.2	6.81	5.24	18.6	14.7	9.10	57.5~76.5

注1 フェノールおよびメトキシ基についてはベンゼン環の炭素6個を官能基炭素として計算した。

注2 官能基による炭素の合計は、フェノールおよびメトキシ基のついたベンゼン環に重複がないものとして計算した。

注3 計算に用いたデータは文献(2)のものである。

ところで、これらの官能基の含む炭素は、腐植酸中の全炭素の何%を占めるであろうか。表3に計算例を示す。カルボキシ基の炭素は腐植酸の全炭素の5%から12%を、カルボニル基の炭素は5%から22%を占めている。カルボニル基の量は石灰質土壌の腐植酸では特に高い。炭酸石灰によるアルカリ性条件下で有機物の酸化が促進され、カルボニル基やカルボキシ基が増

(104) 腐植酸の化学

加することは考えられるが、ここに得られた値は異常に高いと思われる。カルボニル基の定量にはヒドロキシアミンによるオキシム化法を用いたが、ヒドロキシルアミンがカルボニル基以外の官能基と反応しないかどうか、検討の余地がある。

フェノール性水酸基が結合しているベンゼン環の炭素は、全酸度とカルボキシル基含量の差によって求めた場合20%から40%、フォルリン試薬による比色で求めた場合10%から15%を占める。

メトキシル基およびメトキシル基が結合したベンゼン環によって説明される炭素は、全炭素の3%から19%を占める。腐朽木の腐植酸 ($R_p(2)$ 型) の1例では、この値が非常に高く38%にも及ぶ。

アルコール性水酸基が結合している炭素の数は全炭素の1%から7.5%であった。

表3には、これらの官能基炭素の合計も示した。この値はメトキシル基とフェノール性水酸基が同じベンゼン環に結合しているか、別々のベンゼン環に結合しているかによって異なる。ここでは、別々のベンゼン環に結合しているとみなした。フェノール性水酸基およびアルコール性水酸基含量をフォルリン試薬による比色値から計算した場合、官能基による炭素の合計値は全炭素の45%から58%を占める。全酸度とカルボキシル基含量の差をフェノール性水酸基含量とした場合は、官能基による炭素の合計値は全炭素の57%から77%を占める。

官能基に含まれる炭素の合計値は、各型腐植酸の間で著しい違いを示さない。これは、腐植化の進行にともなうアルコール性水酸基やメトキシル基の減少とカルボキシル基やカルボニル基の増加がほぼ補いあっていることと、フェノール性水酸基含量の違いがあまり大きくないことによる。以上の計算には仮定のあること、さらに、分析法の信頼性にも問題があることなどから、確実なことは言えないが、腐植酸の炭素のおそらく5割程度が官能基炭素で説明されることになる。

c. アミノ酸, 糖, その他の酸加水分解性成分

表4には, 腐植酸の酸加水分解物中のアミノ酸, フェノール, ヘキソース,

表4 腐植酸の酸加水分解生成物(炭素換算の収率, 平均値)

型	土 壤	全炭素に対する各化合物態炭素%				合 計	ウロン酸
		アミノ酸	フェノール	ヘキソース	ウロン酸		ヘキソース
A	火山灰土	7.77	2.02	1.85	0.784	12.4	0.461
	石灰質土壤	6.78	1.55	0.87	0.526	9.62	0.747
B	各種	12.9	3.62	2.21	0.926	19.6	0.465
Po	各種	12.2	4.45	2.12	0.870	17.5	0.461
Rp(1)	石灰質土壤	21.9	5.51	2.18	1.012	30.8	0.517
	水田土壤	18.2	5.56	2.78	0.768	27.3	0.299
Rp(2)	森林土壤A ₀ 層	8.72	2.92	1.89	0.668	20.1	0.380

注 計算に用いたデータは文献(4)のものである。

およびウロン酸の量を全炭素に対する割合で示した。アミノ酸とフェノールは腐植酸を8N硫酸中で110°C, 20時間加水分解することにより, またヘキソースとウロン酸は1N硫酸中で沸とう水浴中, 2時間加水分解することにより得られたものである。

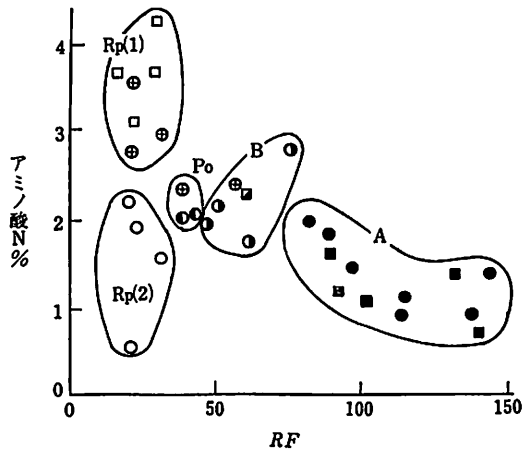


図5 腐植酸の8N硫酸加水分解によるアミノ酸生成量

アミノ酸態炭素によって腐植酸の全炭素のうちの7%から22%が, また, 表示してないが窒素としては全窒素の25%から60%が説明された。このことからタンパク質またはアミノ酸が腐植酸の構造の重要な部分を形成していることがわかる。なお, タンパク質の末端アミノ基や遊離のアミノ基のなかには, 腐植酸中のキノンやフェノールに求核付加し, 容易には加水分解されない形になっているものも

(106) 腐植酸の化学

あるであろう。

加水分解によるアミノ酸生成量は図5に示したように、 $R_p(2)$ 型から $R_p(1)$ 型にかけて著しく増加し、 $R_p(1)$ 型からB型、A型にかけて、腐植化度が高くなるほど減少した。これは、 $R_p(2)$ 型腐植酸が、土壤生物による分解があまり進んでいない（あるいは分解途上の）腐朽植物遺体から得られた腐植酸であること、これに対し、 $R_p(1)$ 型は易分解性有機物の土壤生物による分解がほとんど終了し、他方、菌体成分などが集積した無機層位の土壤から得られた腐植酸であること、さらに、 $R_p(1)$ 型からA型にかけては、土壤固有の暗色無定形高分子（腐植物質）が多量に生成され、タンパク質等の非腐植物質の量比が減少することなどによるものと思われる。

アミノ酸の収量はこのように各種の腐植酸で異なっていたが、アミノ酸の構成比は土壤の種類や腐植化度を異にする腐植酸の間できわめてよく類似していた。これは、微生物起源のタンパク質が腐植物質や粘土鉱物との結合によって分解を免れて残留することを示唆する。なお、アミノ酸のなかでは、アスパラギン酸、グルタミン酸などの酸性アミノ酸およびグリシン、アラニンの生成量が多かった。

その他、加水分解性窒素含量、加水分解性フェノール含量、および加水分解性全有機物量も、図5のアミノ酸収量とRFの関係と同様に、 $R_p(2)$ 型から $R_p(1)$ 型にかけて増加し、 $R_p(1)$ 型、P_o型、B型、A型の間では、RFの上昇とともに減少した。

腐植化度の上昇とともに、アミノ酸や加水分解性窒素含量が減少するのに対し、図表にはあらわしていないが、非加水分解性窒素含量はわずかながら増加した。また非加水分解性窒素が全窒素中に占める割合はA型腐植酸の間では、腐植化度の上昇とともに著しく増加し、最高64%におよんだ。非加水分解性窒素は、複素環窒素や芳香核へ直接結合した窒素として、難分解性の腐植物質の構造に参与しているものと思われる。

ヘキソースの含量は腐植酸の全炭素の0.4%から3.5%であり、ウロン酸の含量は0.3%から1.4%であった。これらの含量も腐植化度の増大とともに減

少ししたが、 $R_p(1)$ 型と $R_p(2)$ 型の間で、アミノ酸収量の場合のような、含量の差異は認められなかった。図6はヘキソース含量と腐植化度 RF の関係を示したものである。各種の土壤のなかでとくに石灰質土壤の腐植酸においては、ヘキソースおよびウロン酸の含量と腐植化度 RF との間の負の相関が非常に高かった。またウロン酸の含量とヘキ

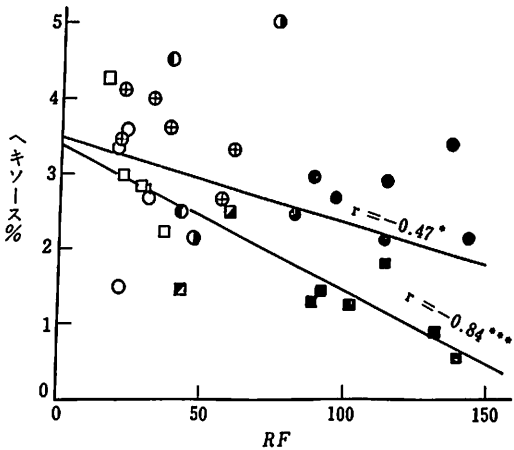


図6 腐植酸のヘキソース含量と腐植化度 RF の関係
 $r = -0.47^*$ は全試料についての相関係数
 $r = -0.84^{**}$ は石灰質土壤腐植酸のみについての相関係数

ソースの含量の比 (U/H) を計算すると、この比は石灰質土壤腐植酸ではその他の土壤の腐植酸よりも著しく高かった。これには石灰質土壤における高 pH およびカルシウムイオンとの錯体形成等の要因が関与するものと考えられる。

腐植酸中の糖類含量が、腐植化度の上昇とともに急激には減少せず、腐植化度に対して高い相関を示しながら徐々に減少するということは、糖類が腐植酸中のかなり安定な構成成分であることを示唆している。

この項で述べたアミノ酸、酸加水分解性フェノール、ヘキソース、およびウロン酸によって説明される炭素の合計は全炭素の6%から30%におよび、 $R_p(2)$ 型から $R_p(1)$ 型にかけて増加し、 $R_p(1)$ 、 P_0 、 B 、およびA型の順に、RFの上昇とともに減少した。先の項で述べた官能基による炭素と併せれば、多少の重複もあるが、ほとんどの腐植酸の全炭素の半分以上は、官能基および加水分解性成分によって説明されたことになる。

d. KOH 分解生成物

腐植酸の構成成分を解析するため、前項の加水分解よりもさらに強い分解法を試みた。すなわち封管中180℃で腐植酸を濃 KOH (KOH 2g, 水0.4ml) により分解し、分解生成物をガスクロマトグラフィーおよびマススペクトロメトリーにより同定し、定量した。

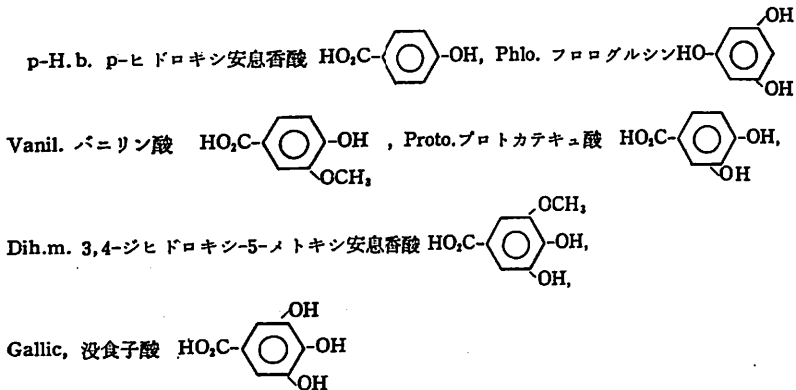
土壌腐植酸の KOH 分解生成物としては、コハク酸、グルタル酸、p-ヒドロキシ安息香酸、バニリン酸、プロトカテキユ酸、3,4-ジヒドロキシ-5-メトキシ安息香酸、および没食子酸が検出された。表5にこれらの分解生成物の収量を、表6に分解生成物の収量と腐植化度 RF およびプロトカテキユ酸

表5 腐植酸の KOH 分解生成物の収量 (me/g)
(各型の平均)

型	試料数	Succi.	Glutar.	p-H.b.	Phlo.	Vanil.	Proto.	Dih.m.	Gallic	合計	ニ-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
Po	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

注1 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。

注2 Succi, コハク酸, $\text{HO}_2\text{C}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}_2\text{H}$, Glutar. グルタル酸 $\text{HO}_2\text{C}-(\text{CH}_2)_3-\text{CO}_2\text{H}$,



注3 計算は文献(15)のデータを用いて行なった。

表6 各種 KOH 分解生成物収量の RF 値およびプロトカテキユ酸収量に対する相関係数

	Succi.	Glutar.	p-H.b.	Phlo.	Vanil.	Proto.	Dih.m.	Gallic	合計値	エーテル 可溶物
RF に対する	* -0.536	* -0.592	** -0.683	N.S. -0.448	*** -0.774	*** -0.809	** -0.645	* -0.514	*** -0.927	*** -0.764
プロトカテキ ユ酸の収量に 対する	N.S. 0.380	N.S. 0.433	*** 0.778	N.S. 0.258	*** 0.832	1	** 0.693	N.S. 0.425	—	—
コハク酸の収 量に対する	1	*** 0.772	—	—	—	—	—	—	—	—

注 有意水準 *** 0.1%, ** 1%, * 5% 水準で有意
N.S. 5%水準で有意ではない。

の収量との間の相関を示した。フロログルシンを除き、いずれの分解生成物の収量も RF との間に有意な負の相関を示し、腐植化度が高くなるほど収量が減少する傾向がみられた。

p-ヒドロキシ安息香酸、バニリン酸、プロトカテキユ酸、3,4-ジヒドロキシ-5-メトキシ安息香酸の各収量の間には高い正の相関が認められ、従って同一のグループに属する分解生成物と見なすことができる。すなわち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ものと推定される。

p-ヒドロキシ安息香酸の収量は、草本植生下の土壌から得られた R_p(1) 型腐植酸で高く、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 R_p(2) 型腐植酸では比較的低かった。またフラボノイドおよび縮合型タンニン等に由来するものと推定されるフロログルシンは、木本植生と関係を持つ B 型および R_p(2) 型腐植酸から多く生成された。これらのことは、土壌腐植酸の構造に植生がかなり影響をおよぼしていることを示唆している。

没食子酸の収量は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が、これ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ものと思われる。

また、表6に示すように、コハク酸とグルタル酸の生成量の間にも非常に高い正の相関が存在した。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および人工ヒューミンからも同程度生成したことから、これらは糖類の褐変物に由来するものと推定される。なお、これらのジカルボン酸の

(110) 腐植酸の化学

収量は、腐植化過程の中間に位置する R_p (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、腐植酸の構造中にはリグニンに由来する構造、フラボノイドに由来する構造、タンニンに由来する構造、および糖の褐変物に由来する構造が寄与し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含量は最高 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、人工腐植酸等からの分解生成物の収量も低く、数% のオーダーであったので、分解生成物の収量の低いことが必ずしも上に推察した構造部分の量が少ないことを意味してはいない。腐植酸中でこれらの構造部分がどれ程のウエ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。

e. 腐植酸の分子量分布

以上の諸結果からもわかるように、腐植酸の化学構造や物質組成は非常に複雑である。これに加うるに腐植酸の分子量は非常に多分散性であり、広い範囲にひろがって分布しているであろう。それ故、腐植化の進行にともなう分子量の変化や、分子量とその他の物理的、化学的性質との関係を調べることは、腐植酸の生成過程を解明するうえで有効な手段になると思われる。

このような理由から、高速液体クロマトグラフィーによる分子量測定用に開発されたゲル（シラノール基をマスクした微粒多孔性シリカ、商品名マイクロボンダゲル）および多孔性ガラス（CPG-10）を用いて、腐植酸の浸透クロマトグラフィーを行なった。

図 7 は、マイクロボンダゲルによる腐植酸の浸透クロマトグラフィーにおける溶離液のイオン強度と溶出容積の関係を示したものである。試料には A、B、R_p 型腐植酸各 1 点を用いた。腐植酸の溶出容積は溶離液のイオン強度の増大とともに増大し、溶出容積とイオン強度の対数の間には、ほぼ直線的な関係が認められた。浸透クロマトグラフィーにおいて溶出容積が増大すること、すなわち、溶出が遅れることは分子量が小さくなることを意味する。従

って、図7の結果は、イオン強度が0.029から0.5へ増大する間に、デキストランとの対照によるみかけの分子量が、A型腐植酸では21万から2580まで、B型腐植酸では21万から2340まで、R_p型腐植酸では32万4千から4470まで小さくなったことになる。腐植酸の型による溶出容積の違いが最も顕著にあらわれたのは、イオン強度が0.05から0.5の間であり、腐植酸のみかけの分子量はR_p型、B型、A型の順に小さくなった。

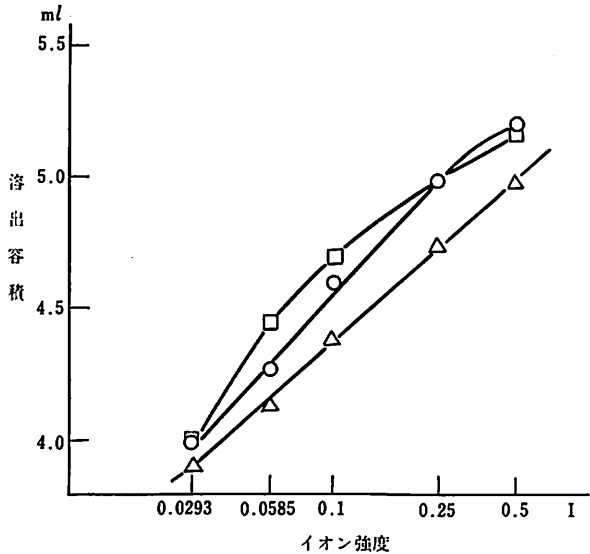


図7 腐植酸の高速ゲル浸透クロマトグラフィーにおける溶離液のイオン強度と溶出容積の関係

カラム：マイクロポングゲル E-125-E. linear 直列結合

溶離液：pH 7.5 トリス・リン酸緩衝液

流速：0.5 ml/min

試料注入量：15 μ l 約 50 μ g

□：天文台（腐植質火山灰土，A型），○：東山（褐色森林土，B型），△：安城（水田土壌，R_p(1)型）

上述の結果は腐植酸分子のひろがりイオン強度に依存し、分子がイオン強度の増大とともに収縮することを示している。このような現象は解離基を多く持つ鎖状高分子に一般的に認められるものであり、従って腐植酸はかつて KUMADA・KAWAMURA¹⁵⁾ が腐植酸の粘度特性から推論したように、鎖状高分子的で、かなり伸縮自在の構造を持つものと考えられる。また、この結果からすれば、浸透クロマトグラフィーでは腐植酸の分子量を一義的に決定することはできないといわなければならない。なお、このことは、セファデックスなどを用いる浸透クロマトグラフィー一般についても同様であろう。

(112) 腐植酸の化学

また、多孔質ガラス CPG-10 を用い、腐植酸を分子サイズによって多数の画分に分画し、各画分の RF と $\Delta \log K$ を測定した結果によれば、RF は全体の中位の分子サイズ画分で最も大きく、それより分子サイズが大きくなっても小さくなくても RF は低下した。他方 $\Delta \log K$ は分子サイズが大きくなるほど低下したが、この低下は低分子サイズから中分子サイズにかけて著しく、中分子サイズ以上ではほぼ一定していた。 $\Delta \log K$ からすれば腐植酸分子は一般に分子サイズが大きいほど腐植化が進んでいるといえるが、高分子サイズ画分には、可視部吸収に対する寄与の少ない高分子すなわちタンパク質や多糖類もかなり含まれるため、RF が小さくなったものと考えられる。このことはまた、腐植酸の生成過程が、原料としての生体高分子の分解過程と、土壤に固有な暗色無定形高分子の合成過程との二面性を持つことを示唆している。

3. 腐植酸の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) および分類法が腐植酸の各種の性質の遷移を説明するうえで有効であることは、これまでの記述から明らかである。しかし腐植酸の可視部吸収の本体である暗色高分子 (腐植物質) の構造または可視部および紫外部吸収の発現機構については、まだ不明な点が多い。この節では、腐植酸の解離基およびカルボニル基が腐植酸の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収スペクトルの変化

紅茶にレモンを浮べると、液の色はサッと薄くなる。腐植酸溶液も紅茶のような色をしており、酸を加えて pH を下げると色が薄くなる。その様子を紫外および可視部吸収スペクトルによってあらわしたのが図 8 であり、アル

カリ性 (pH12), 中性 (pH 7), 酸性 (pH 3.3) の等濃度腐植酸溶液の吸収スペクトルを比較したものである。各型腐植酸の吸収スペクトルは任意の間隔で図示したが、各腐植酸の等濃度アルカリ溶液の 600nm および 230nm における吸光度は表7に示した。この表から明らかなように、 K -600nmで示された吸光度の大きさの順序、 $R_p(2)$ 型 $< R_p(1)$ 型 B 型 $< A$ 型は 230nmにおいても変わらないが、吸光度の差は前者のほうがはるかに大きい。

アルカリ性から中性への pH 低下にともなって腐植酸の可視部および紫外部吸収は220nmから700nmの全波長域にわたって減少した。対数グラフにおいては2本の吸収曲線の間隔は吸

光度の減少率をあらわすから、吸光度の減少率は長波長側ほど大きいことがわかる。ちなみに、紫外部 (230nm) での減少率は1%~5%であるのに対して、600nmでは24%~37%であった。後述するように、腐植酸のフェノール性水酸基は、アルカリ性溶液中では解離してフェノレート陰イオンとな

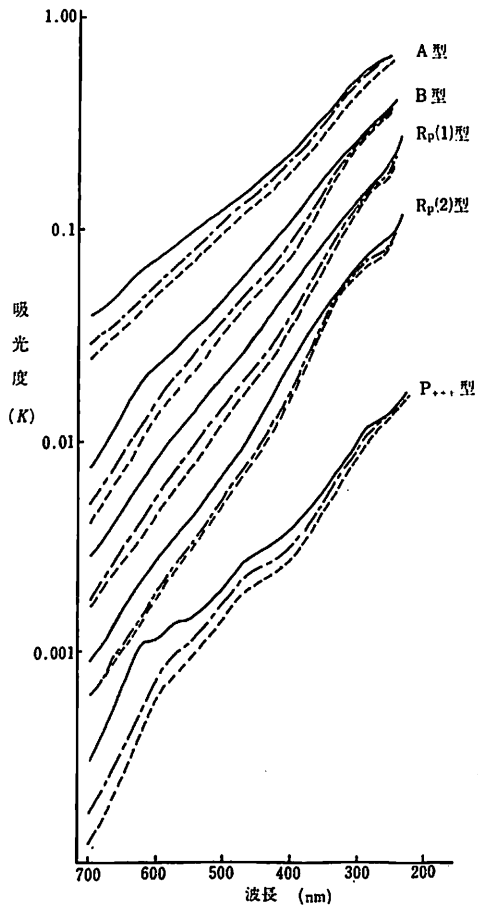


図8 腐植酸溶液の pH と吸収スペクトルの関係
 実線 pH 12.4 溶液, 一点鎖線 pH 7 溶液, 破線 pH 3.3 溶液, A型 天文台 (火山灰土), B型 東山 (褐色森林土), Rp(1)型 安城 (水田土壌), Rp(2)型 木曾駒 (森林土壌 A₀層), P...型 Pg 色素

表7 腐植酸アルカリ溶液の吸光係数

試料	型	RF ₆₀₀	RF ₂₃₀	K ₆₀₀	K 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

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

K₆₀₀ および K₂₃₀ : 炭素濃度換算1%の腐植酸溶液の600nm および230nmの吸光度

っており、これが吸光度の増大に寄与している。アルカリ溶液を中和すれば、フェノレート陰イオンはプロトンと結合するため、腐植酸中のπ電子のひろがりや縮められ、吸収帯が短波長側へと浅色移動する。浅色効果は長波長側の吸収ほど著しいため、上述のような結果が得られたものと思われる。

他方、中性と酸性の吸収スペクトルを比べると、吸光度は同様に減少しているが、吸収曲線の傾きは、特に可視部領域ではほとんど変化せず、吸収曲線の変化が平行移動的である。このことは、吸収波長はあまり変化せず、吸収強度のみが減少したことを示唆している。このような現象は浅色効果と称され、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。すなわち浅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持つ場合に、いわゆるランダムコイルに比して著しく吸光度が小さいことがあげられる。腐植酸の場合にも、カルボキシル基のほとんどが解離した中性状態と、解離の抑制された酸性状態では、分子形が著しく異なるものと推察される。pHによる還元粘度の変化¹⁵⁾は、この考えを支持するものであり、中性から酸性にかけての腐植酸の吸収強度の減少は、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、酸性溶液中では、酸素や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¹⁶⁾。このことも、腐植酸酸性溶液の吸光度低下の一因であろう。

d. アルカリ性-中性差スペクトル

溶媒の pH 変化にともなう紫外および可視部吸収スペクトルの変化は差ス

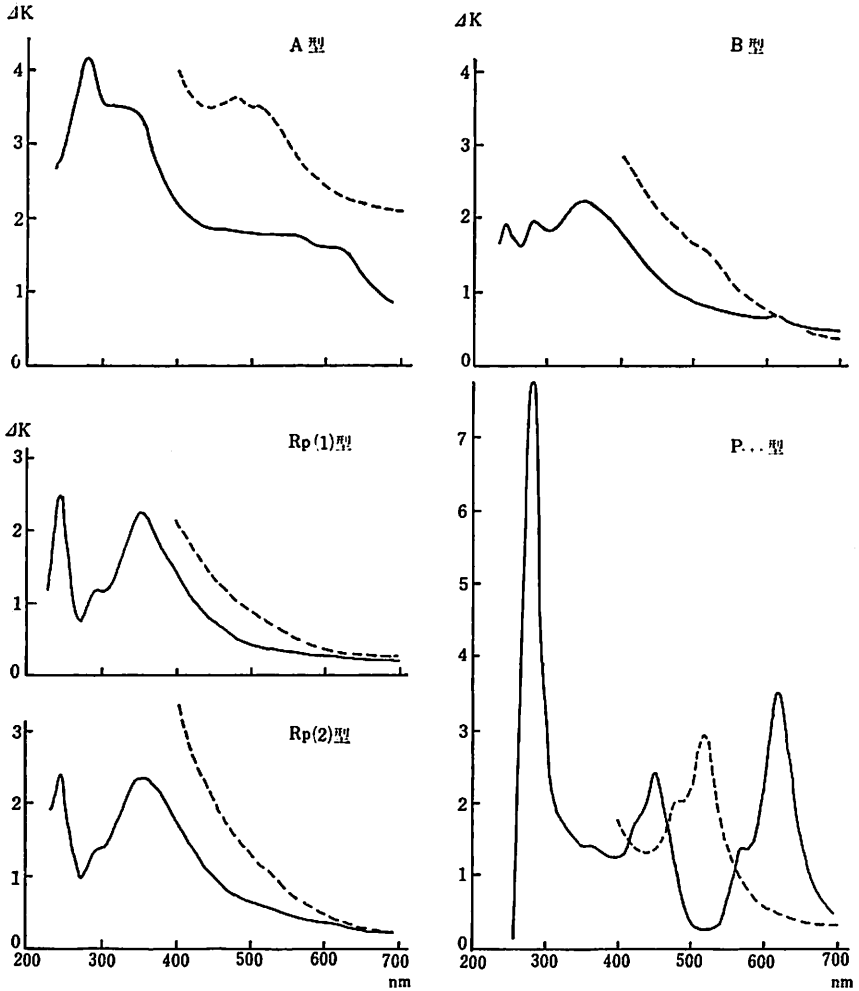


図9 腐植酸のアルカリ性-中性差スペクトル (濃度0.1%)

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 長楽P (石灰質土壌)，Rp(2)型 東山FH (褐色森林土A層)，

B型 閩苳 (褐色森林土)，P...型 燕腐植酸中のPg色素，

Rp(1)型 金生山OH (石灰質土壌)

(116) 腐植酸の化学

ベクトルによっても表わすことができる。図9に各型腐植酸のアルカリ性-中性差スペクトル(pH7の腐植酸溶液を対照に、pH12.4の同濃度腐植酸溶液の吸収スペクトルを測定したものを示した。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。

R_p型およびB型腐植酸のアルカリ性-中性差スペクトルは250, 300, および360nmにピークを持ち、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り、A型腐植酸のスペクトルに示されるように、可視部および280nm付近の示差吸収が増大した。この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構造が減少し、他方で、土壤に固有の暗色無定形高分子が増加する様子を示している。他方、Pg色素の差スペクトルは280, 460, 570, 620nmにピークを持つ。A型腐植酸の差スペクトルにみられる280nmおよび可視部の強い示差吸収は、縮合多環キノン(おそらくPg色素)がA型腐植酸の構造に関与していることを示唆する。

c. 腐植酸の紫外および可視部吸収に対するカルボニル基およびキノンの寄与

腐植酸は多量のカルボニル基とキノンを含むため、その紫外および可視部吸収に対してもこれらが大きく寄与していると推察される。そこで、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、吸収スペクトルの変化を調べ、吸収スペクトルに対するカルボニル基およびキノンの寄与を検討した。

水素化ホウ素ナトリウムでの還元による腐植酸の吸収スペクトルの変化は、図10に例示した。還元によって、腐植酸の紫外および可視部吸収は著しく減少した。減少率は長波長側ほど大きく、従って吸収曲線の傾きは増大した。水素化ホウ素ナトリウムでの還元による600nmの吸光度の減少率は、キノンを含めたカルボニル基全体の可視部吸収に対する寄与率とみなすことができ

る。表8に示すように、この値は32%から98%の範囲にあった。この値は、RFとは相関を示さなかったが、土壌の種類や腐植酸の型による違いが認められた。すなわち、森林土壌A₀層や腐朽木由来の腐植酸(R_p(2)型)、石灰質土壌由来の腐植酸、Pg色素を含む腐植酸、および hidroキノンやグルコースから調製した人工腐植酸では、それぞれ同程度のRF値をもつ他の腐植酸と比べて、600nmの吸光度減少率が大きかった。これらの腐植酸では光吸収に対するカルボニル基の寄与が大きいと言えよう。とくに、腐植化過程の初期段階において、カルボニル基が腐植酸の光吸収に大きく寄与している点、

および、石灰質土壌での炭酸石灰によるアルカリ性条件が腐植酸の光吸収におけるカルボニル基の寄与を増加させていると推定される点は注目に値する。

他方、水田土壌の腐植酸では水素化ホウ素ナトリウム還元による吸光度の減少率が低く、さらに、腐植化度が高くなるほど減少率の低下する傾向が認められた。この結果は、表2にも明らかなように、水田土壌の腐植酸のカル

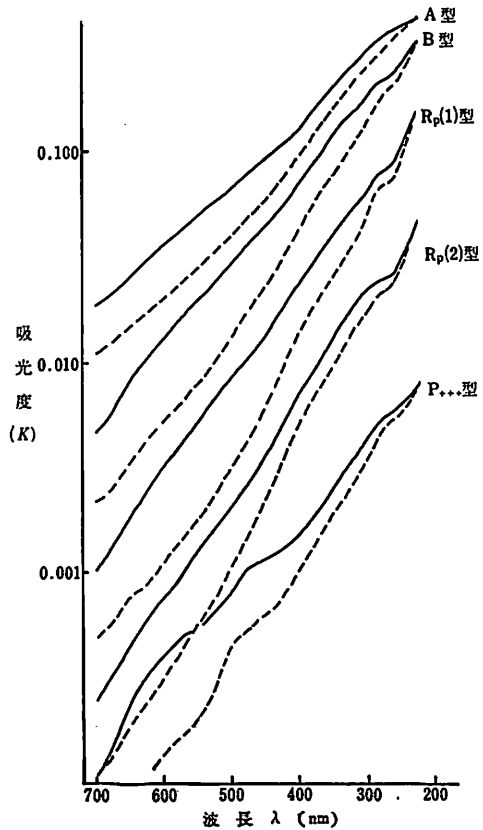


図10 NaBH₄還元による腐植酸の吸収スペクトルの変化
pH10.2 ほう酸緩衝液中, NaBH₄濃度0.2%。A型 天文台(火山灰土), B型 東山(褐色森林土), Rp(1)型 安城(水田土壌), Rp(2)型 木曾駒(森林土壌A₀層), P₊₊₊型 Pg色素

表8 腐植酸の 600nm 吸光度に対するカルボニル基の寄与率

土壌の種類	型	カルボニル基全体の寄与率 a)	キノン寄与率 b)
石灰質土壌	A型	32 - 61%	0 - 9.8%
"	B, P型	35 - 59%	15 - 46%
"	Rp(1)型	35 - 59%	21 - 62%
火山灰土壌	A型	35 - 45%	2 - 15%
森林土壌	B, P型	37 - 58%	16 - 59%
A ₀ 層	Rp(2)型	53 - 79%	60 - 77%
水田土壌	B, P ₀ , Rp(1)型	37 - 49%	22 - 48%
埋没土・その他	P ₊ - ₊₊₊ 型	50 - 89%	39 - 65%

注 a) pH 10.2 での水素化ホウ素ナトリウム還元による 600nm 吸光度の減少率

b) pH 7.0 でのヒドロサルファイト還元による 600nm 吸光度の減少率

ボニル基含量が少ないことと符号する。これらは、水田土壌が還元的環境におかれていることによるものと思われる。

水素化ホウ素ナトリウム還元による腐植酸の吸収スペクトルの変化を、差スペクトルによって図11に例示した。B型およびR_p型腐植酸の差スペクトルは320nmにピークを持つ。リグニンの差スペクトルも同様であって、リグニンとB型およびR_p型腐植酸の構造の類似性が示唆される。一方、A型腐植酸では、320nmの示差吸収は肩状になり、280nm付近にピークが移動した。また、450nm付近に肩を持つ強いブロードな示差吸収が可視部にあらわれた。A型腐植酸にみられたこれらの特徴は、Pg色素の差スペクトルと類似する。すなわち、Pg色素の還元差スペクトルは、紫外部では260nmにピーク、280nmに肩を持ち、可視部では、450nmにピーク、570nmと620nmに肩を持っている。このことから、A型腐植酸はPg色素のような多環キノン構造を含むことが推定される。

キノンの還元剤であるヒドロサルファイトを用い、腐植酸を0.1N NaOH中で還元した場合の吸収スペクトルの変化を図12に示す。なお、この還元剤は紫外部に吸収を持つので還元腐植酸の紫外部の吸収スペクトルは測定できない。アルカリ溶液中でのヒドロサルファイト還元では、Pg色素を含む腐植酸と石灰質土壌以外のR_p型およびB型腐植酸の大部分で可視部吸収が減少したが、A型腐植酸および石灰質土壌のA型、B型、R_p型腐植酸の大部分

3. 腐植酸の紫外および可視部吸収 (119)

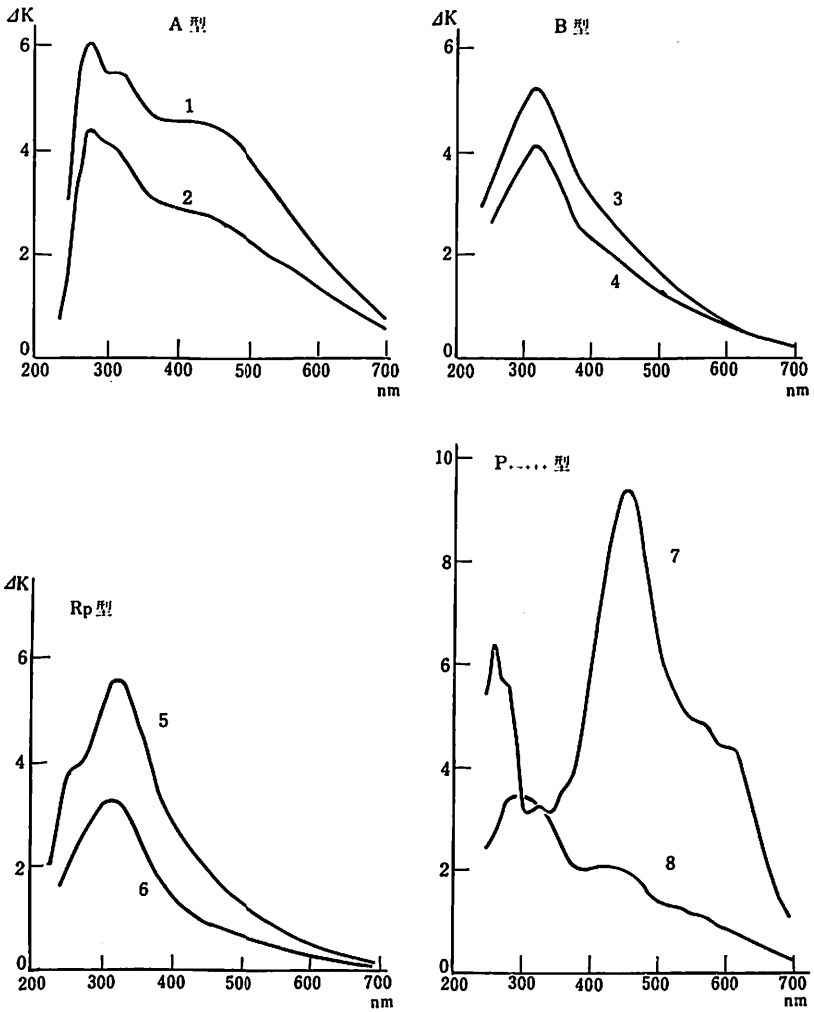


図11 水素化ホウ素ナトリウム還元による腐植酸の差スペクトル

(濃度は0.1%)

- 1 長菜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 閩刈 (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)

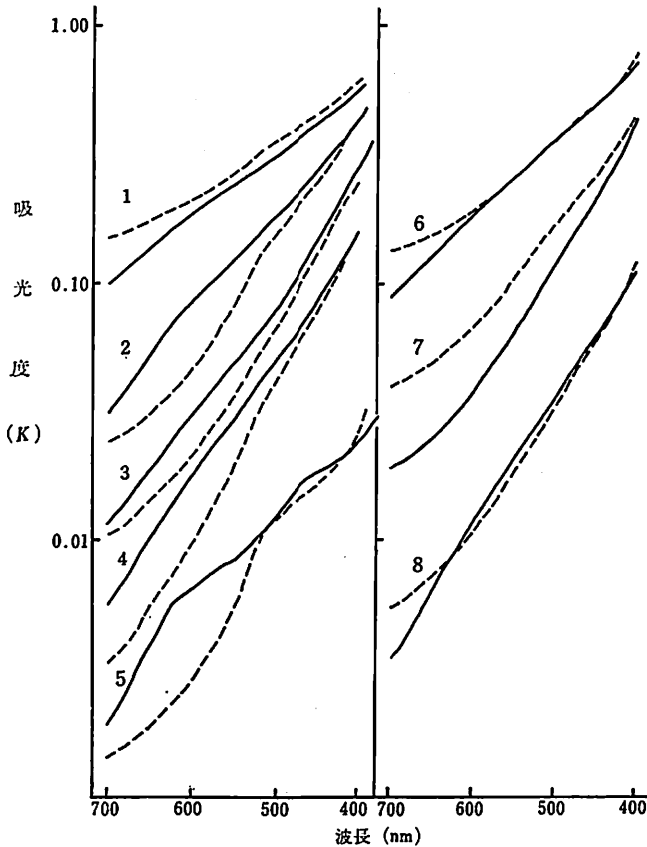


図12 ハイドロサルファイト還元による腐植酸の吸収スペクトルの変化 (0.1N NaOH中)

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 Na₂P₂O₇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)

前に対する600nmの吸光度比は、0.1N NaOH中での還元の場合と同様、RFの上昇とともに増大した。

では、可視部吸収が逆に増大した。また、石灰質土壌以外の腐植酸では、還元後の吸光度の還元前の吸光度に対する比率が腐植化度RFの上昇とともに増大した。なお、0.1N NaOHの代りにpH7のリン酸緩衝液中でヒドロサルファイト還元を行えば、どの腐植酸の場合にも、還元による吸光度の増加は認められなかった。しかし、還元後の還元

3. 腐植酸の紫外および可視部吸収 (121)

キノンは普通、還元によって可視部吸収が浅色移動するため、その吸光度は減少することが知られている。従って、pH7でのヒドロサルファイト還元による600nmの吸光度の減少率を、腐植酸の可視部吸収に対するキノンの寄与率とみなせば、表8に示したように、この値は、腐植化度の高い腐植酸ほど低い。

しかし、他方、腐植酸中のキノン含量は、各種の事実(ESR, 可視部吸収スペクトル等)から、腐植化度が高くなるほど増加することが推察されるが、この推察は上記の傾向と矛盾する。

また、アルカリ溶液中でのヒドロサルファイト還元による、A型腐植酸や石灰質土壌の各型腐植酸の可視部吸光度の増大は何を意味するものであろうか。

これらの点を吟味するために、ヒドロサルファイトで還元した腐植酸のアルカリ性および中性溶液の差スペクトルを測定した。図9で、未還元腐植酸の差スペクトルとともに破線で表わしたものがそれである。ヒドロサルファイト還元腐植酸の可視部の示差吸収は、未還元腐植酸のそれよりも大きく、還元によるこの増加は腐植化度の高い腐植酸ほど著しい。腐植酸ではアルカリ性-中性差スペクトルは、主としてフェノール性水酸基の差によるものであり、還元による示差吸収の増大は、キノンが還元されて生成したフェノール性水酸基によるものと考えられる。従って、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、腐植化度の高い腐植酸ほど多量のキノン構造を持ち、還元によって多くのフェノール性水酸基が生成したことによると考えられる。このことから、ヒドロサルファイト還元による可視部吸光度の減少率がRFの上昇とともに低下したのは、キノン含量の低いことによるものではないと言えよう。

ヒ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、上記のほかに、還元によるラジカルの生成が考えられる。腐植酸のESRを測定した実験によれば、ヒドロサルファイト還元によって可視部吸収が増大する腐植酸では、還元によってラジカルが増加し、還元によって可視部吸光度が減少

(122) 腐植酸の化学

する腐植酸では、還元によってラジカルが減少したからである（未発表）。還元により生成した腐植酸のラジカルは非常に安定であった。ハイドロサルファイト還元で可視部吸収が増大した腐植酸は、主としてA型腐植酸および石灰質土壌由来のB型、R_p(1)型腐植酸であり、これらの腐植酸においては、ラジカルを安定化するような構造が発達しているものと思われる。なおラジカルは未還元腐植酸にもかなり含まれているから、紫外および可視部吸収の発現にとり、その寄与は小さくないであろう。

腐植酸中のラジカルは主としてセミキノン型のものからなることが推定されている²³⁾。石灰質土壌のような特殊な土壌条件や一般に腐植化の進行は、腐植酸中にキノンが関与する共役系を発達させる。長い共役系を持ったキノンでは、不對電子が非局在化されることにより、還元の間段階であるセミキノンラジカルが安定化される。ラジカルの電子は移動しやすいため、電荷移動型の吸収をもたらす²²⁾。従って、A型腐植酸および石灰質土壌の各型腐植酸は還元によって、かえって可視部吸光度を増大させることになると考えられる。

b. 腐植酸の光吸収機構に関する考察

本節ではこれまでに、腐植酸溶液の光吸収に関する2,3の実験結果を述べてきた。ところで、図8,10,12などで明らかなように、P型以外の腐植酸溶液の紫外・可視部吸収スペクトルは、吸光度の対数値を縦軸に、波長を横軸にとって表わせば、一般に、短波長部から長波長側に向かって下降する、ほぼ直線状の形状をとり、明らかな吸収帯（ピークまたは肩状吸収）は認められない。また、一定濃度の腐植酸溶液の吸光度は腐植酸によって異なり、かつこの吸光度は溶液のpHや還元処理などによって変化するが、吸収スペクトルの形状に顕著な相違は認められない。一般に腐植酸の吸収スペクトルがこのような均斉性を示す理由は何であろうか。換言すれば、腐植酸の光吸収機構はどのようなものであろうか。

この設問は、土壌固有の有機物あるいは腐植酸特有の構成成分とされる腐

植物質とは何かとの設問とはほぼ同義であり、腐植酸の化学における基本的命題と思われる。しかしながら、この命題に本格的に取り組んだ研究は、これまでほとんどみられない。筆者らの実証的知見も極めて少ない現状であるが、以下に腐植酸の光吸収機構に関する推論を述べることにする。

元素組成の項で、腐植酸の不飽和度が腐植化度に比例して増加することを明らかにしたが、腐植酸の不飽和結合は多種類のものからなるであろう。これに関連して、熊田¹⁷⁾はかつて、“腐植酸は、その構造中に、無秩序に分布し、かつ共役度を異にする多数の共役二重結合系を持つ高分子物質であり、この共役二重結合系群が、腐植酸の暗色部分の本体、すなわち腐植物質に他ならない。”とする考え方を発表した。以下の推論は、この考え方をさらに展開したものである。

腐植酸の共役二重結合系は、環状、鎖状の炭素-炭素二重結合 ($C=C$)_n (n は共役度)、キノンその他のカルボニル基などからなり、これらは混成 π 軌道を形成する。カルボキシル基やフェノール性水酸基の陰イオンの電子も、pH の上昇にともない、この軌道に参加するであろう。

腐植物質が上記のようなものとするれば、腐植酸は有機半導体¹⁸⁾に属することになり（この証明はまだ得られていない）、価電子帯 (π 電子軌道) と伝導帯からなる電子エネルギー帯構造を持つと想定される。なお、この種の構造モデルは、グラファイトなどの炭素材料¹⁹⁾や半導体一般に適用されている。

ところで、腐植酸の可視部の光吸収能は腐植酸ごとに異なる（表7）。ちなみに、同じ濃度の腐植酸アルカリ溶液の600nmにおける吸光度の最小値と最大値の開きは10倍以上である。また、腐植酸は、RF- Δ log K 図によって、A型、B型、R_p型などに大別して扱われているが、このように区分された腐植酸の吸収スペクトルの形状には、多少とも相違が認められる。

光吸収能の相違は共役二重結合系の多少あるいは π 電子密度の高低によるものであり、吸収スペクトルの形状の相違は共役二重結合系群の内容の相違を意味する。これらの点について、R_p型、B型、A型をとりあげてみると次のようになるであろう。

(124) 腐植酸の化学

R_P型とB型にはリグニン構造がなお保有されているが、後者は前者に比べて、無秩序に分布する共役二重結合系に富む。なお、R_F(2)型の中にはタンニンやクロロフィル変質物の混在が明らかなものも知られており²⁰⁾、P₊-#型はペリレンキノン系色素重合体を含有する腐植酸である²¹⁾。これらの腐植酸のそれぞれに特有な化学構造に基づく吸収スペクトルはここでは考えない。

A型腐植酸は、X線回折において、グラファイトの002面に相当する回折像を示すことから、縮合度の低い多環芳香環の乱層構造を持つものと思われる^{9,21)}。また、不飽和度やカルボキシル基、カルボニル基等の含量も高いことから、共役度の高い共役二重結合系をB型腐植酸よりも多量に含むと考えられる。

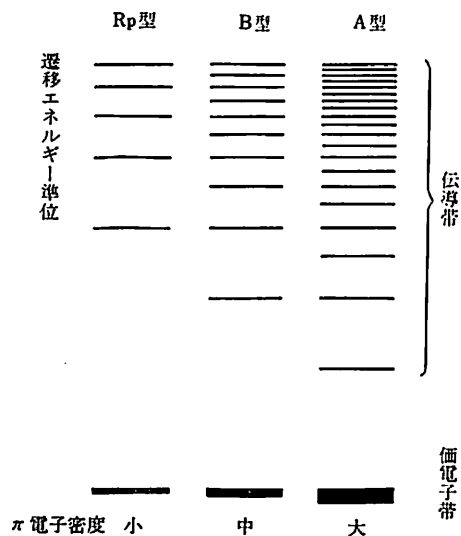


図13 腐植酸の共役二重結合系の遷移エネルギー準位

このように R_F(2) 型の一部や P₊-# 型など、特有な化学構造の存在が明らかな腐植酸を除外しても、R_P 型、B 型、A 型の共役二重結合系群の内容には、なお相違があると考えなければならない。すなわち、各型腐植酸の共役二重結合系は無秩序に分布するとはいえ、無秩序さの内容がそれぞれ異なるのであり、このことが実は、腐植酸を上記のような型に区分することの実質的な意味付けとなる。本節で

これまでに述べてきた吸収スペクトルに関する実験結果はこの無秩序さを解明する手掛りでもある。

しかしここで、腐植酸の共役二重結合系群の無秩序さの内容を捨象すれば、腐植化の進行とは共役二重結合系の発達に他ならない。そして、共役二重結

合系の発達にともなう腐植酸の電子エネルギー帯構造の変化は図13のように描けるであろう。

この図は、①伝導帯における遷移エネルギーの分布密度は高準位のものほど高く、低準位のものほど低いこと、②R_F型、B型、A型の順に、価電子帯のπ電子密度の増加に比例して伝導帯の遷移エネルギーの密度も増加すること、さらに、③R_F型、B型、A型の順に、後者ほど低準位の遷移エネルギーが増加することなどを表わしている。

光の吸収は、価電子帯の電子が光エネルギーを吸収し、伝導帯に遷移することによって起る。遷移エネルギー (ΔE) と光の波長 (λ) の間には、反比例の関係 $\Delta E = hc/\lambda$ (h はプランクの定数, c は光速) があるから、高エネルギー準位への電子の遷移によって短波長の光が吸収され、遷移エネルギーが低いほど、より長波長の光が吸収される。そして、共役二重結合系を $(C=X)_n$ (X は C または O, n は共役度) とすれば、 ΔE_n (共役度 n の共役二重結合系の遷移エネルギー) は、 n が増すほど低い値をとり、より長波長の光が吸収されることになる。

ここで、上記①で述べたことから、 $(C=X)_n$ なる二重結合の個数 m_n は $n=1$ で最も多く、 n に比例して、指数関数的に減少すると仮定する。また、無秩序に分布する共役二重結合の数が十分に多いため、 m_n および n は連続的な値をとり、電子の遷移確率はすべて等しいと考える。このような前提のもとでは、吸光度 K (光吸収) は短波長域で最も大きく、長波長側へ指数関数的に低下することになり、

$$K = a10^{-b\lambda} \dots\dots\dots(1)$$

(a, b は腐植酸ごとに異なる定数)

で表わすことができる。対数値をとれば、

$$\log K = \log a - b\lambda \dots\dots\dots(2)$$

すなわち、腐植酸の吸収スペクトル ($\log K-\lambda$ 曲線) は一般に短波長域から長波長側に向って、一方向的かつ連続的に下降する直線となる。上記②、③に述べたように、R_F型、B型、A型の順に、後者ほど低準位の遷移エネルギー

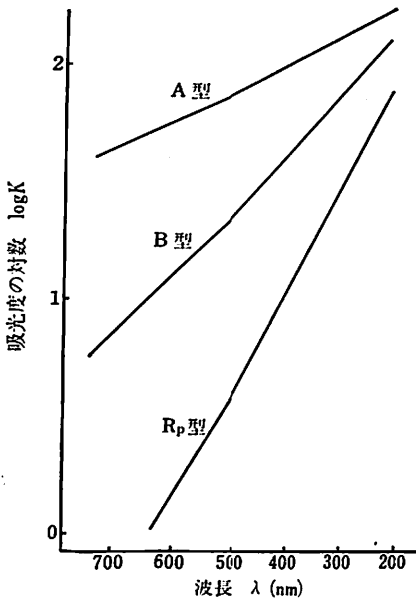


図14 腐植酸の紫外・可視部吸収スペクトルの模式図

ギーの分布密度が増加すれば、これらの吸収スペクトルは図14のように表わされることになり、これらは実際の吸収スペクトルと近似している。

なお、係数 b は、吸収スペクトルを片対数グラフで表わした場合の吸収スペクトルの傾きであり、従来用いられている $\Delta \log K$ とは $b = \Delta \log K / 200$ なる関係にある。また、 a の値は式の上では波長 0 nm での吸光度を意味する。実際にはこのような値は存在しないが、式(1)または(2)の波長 λ および吸光度 K に適当な実在

の値を代入することにより求めることができる。

各種腐植酸 43 点について、 $\Delta \log K$ から b の値を求め、式(2)の λ に 600 (nm) 、 K に炭素換算濃度 1% の腐植酸アルカリ溶液の 600 nm での吸光度を代入して a を求め、 a と b の関係をプロットしたのが図15である。

この図から明らかなように、 $\text{RF}-\Delta \log K$ 二次元図によって区分された A, B, R_p , P_o , および P 型腐植酸は、 $a-b$ 二次元図においても分布域を異にし、さらに前 4 者では、それぞれの型ごとに、非常に高い相関を示す回帰直線を得ることができた。このことは、腐植酸を $\text{RF}-\Delta \log K$ 二次元図によって各型に区分することの妥当性を示すものであろう。

図15によれば、 a と b は正の相関を示し、 b の減少とともに a も減少している。 a および b の値の物理学的な意味付けは今後の課題であるが、両者の値の減少は、簡単には、腐植化の進行にともなって低い遷移エネルギーで励

起される π 電子や n 電子が著しく増加するが、高い遷移エネルギーの電子の増加はそれに比べて著しくないことを反映しているものと考えられる。

また、 a と b の関係において、A, B, および R_F 型腐植酸は連続的の分布を示さなかった。このことは、B型腐植酸をA型腐植酸の前駆的形態とみなし、 R_F 型腐植酸をB型腐植酸の前駆的形態とみなすことが、腐植化過程の実態を反映して

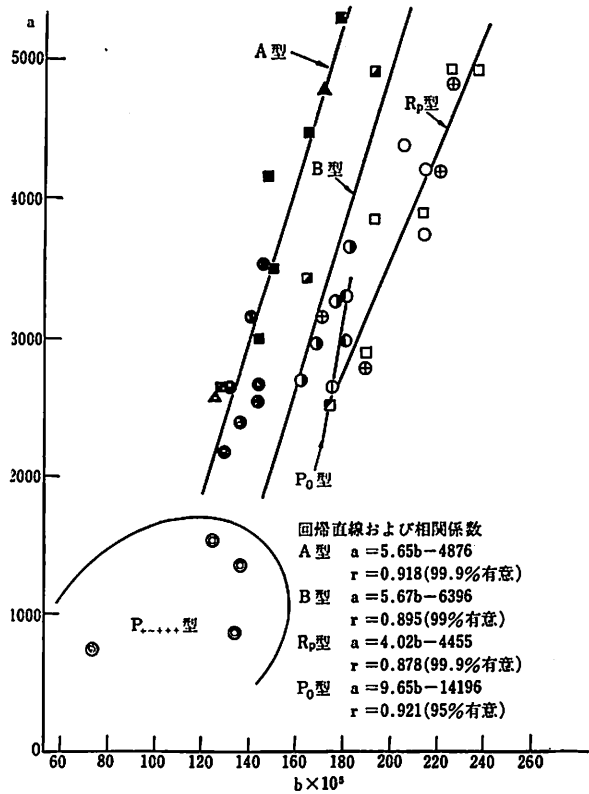


図15 各型腐植酸の可視部吸収スペクトルを指数関数 ($K = a10^{-b\lambda}$) として表わした場合の定数項 a と b の関係

いないことを意味するかもしれない。換言すれば、土壌で生成される腐植酸の型は、それぞれの土壌条件、植生、気候などによってかなり特定され、腐植酸はそれぞれの型ごとに特有な生成過程をたどるものとも考えられよう。

さらに、腐植酸の可視部吸収を記述するパラメーター a および b の関係式が、このように各型ごとに異なったことは、腐植酸中の暗色高分子のいわゆる「母核」が、各型ごとに異なっていることを示唆する。

以上は、腐植酸の本質的屬性とされている暗色の発現機構に関するかなり

大胆で、かつ極めて素朴な仮説を述べたものであり、その妥当性の検証は今後の課題である。それはともかくとして、腐植酸の光吸収機構に関する実証的かつ理論的研究は、腐植酸の化学が真に化学の名に値するものとなるための必須不可欠な課題であることを強調しておきたい。

4. 要 約

各種土壌から得られた40点の腐植酸を用い、元素組成、官能基組成、窒素成分、酸・アルカリ分解生成物や分子畳分布と、腐植酸の腐植化度や型あるいは土壌の種類との関係を検討した。また、腐植酸の紫外・可視部吸収スペクトルの発現に対するフェノール性水酸基、カルボキシル基、キノン、およびキノン以外のカルボニル基の寄与について検討するとともに、腐植酸の暗色の発現機構について考察を加えた。

腐植酸の分類は熊田ら^{9,10)}の方法によったが、R_F型腐植酸のなかで土壌の無機層位から得られたものと森林土壌のA₀層から得られたものを区別し、これらをR_F(1)型およびR_F(2)型と名付けて扱った。腐植化度の指標にはもっぱらRF値を用い、R_F(2)型→R_P型→Po型→B型→A型の系列での腐植酸の諸性質の変化を検討した。

得られた結果は以下のように要約される。

(1) 元素組成、官能基組成、酸加水分解生成物の組成等は、上記の系列に対応して規則的に遷移することが認められた。その結果から、R_P(2)型からR_F(1)型にかけての腐植酸中の易分解性有機物の消失と菌体成分の富化、およびR_F(1)型からPo型、B型、A型へかけての窒素成分の無機化と不飽和度の高い暗色無定形高分子(腐植物質)の形成が推察された。

(2) KOH分解生成物の組成から、リグニン、フラボノイド、加水分解性および縮合型タンニン、糖の褐変物などの腐植酸の構造への関与が推定されたが、これらの構造に由来すると考えられる分解生成物の畳は腐植化度の上昇とともに減少した。

(3) 浸透クロマトグラフィーは、腐植酸の分子畳決定の一義的な方法には

なりえないことが判明した。しかしこの方法により腐植酸を分画すれば、最も腐植化度の高い画分は全体の中程度の分子量画分にあり、高分子量画分には低腐植化度の物質がかなり含まれることが推察された。

(4) 腐植酸の吸収スペクトルに対する含酸素官能基の寄与について検討し、次の知見を得た。

a. 腐植酸の紫外・可視部吸収は、pHの上昇とともに増大した。これには腐植酸分子のひろがり、 n 電子に対するプロトンの攻撃の強さ、フェノール性水酸基の解離度等の変化が関係していると推定した。

b. 腐植化度の高低にかかわらず、カルボニル基は腐植酸の可視部吸収に大きく寄与していた。特に、低腐植化度の腐植酸では、キノンの寄与が著しかった。さらに、腐植酸中のキノンは、腐植化度の上昇とともに増加し、また共役度を高めることが推察された。

c. 腐植酸固有の発色団は、無秩序に分布し、かつ共役度を異にする多数の共役二重結合系の集合体であるとみなした。そして、腐植酸の紫外・可視部吸収スペクトル ($\log K-\lambda$ 曲線) が基本的には直線として表わされるのは、共役二重結合系の数が共役度の上昇とともに指数関数的に減少すると仮定することによって説明されるとの考え方を述べた。また、腐植酸の可視部吸収スペクトルを指数関数で表わした場合の定数項 a と b の関係において、 A 、 B 、 R_F 、 P_0 、 P_{++++} 型がよく区分されることを示した。

以上の諸結果を通じて腐植酸の $R_F(1)$ 型、 $R_F(2)$ 型、 B 型、 A 型への分類および R_F による系列付けの有効性が、諸性質の相違および規則的变化によって裏付けられた。また、型や腐植化度ばかりでなく、火山灰土、水田土壌、石灰質土壌など土壌の種類の違いも腐植酸の諸性質に大きな影響をおよぼしていたが、この影響は、諸性質と腐植酸の型または腐植化度との間の全体的関係からのかたよりとして、かなり明確に認識することができた。

謝 辞

本論説に引用した実験結果は、筆者の一人(筒木潔)が、名古屋大学農学

部鉄塚昭三助教授の御指導のもとに行なった研究によるものである。ここに記して厚く御礼申しあげる。

文 献

- 1) KUWATSUKA, S., TSUTSUKI, K. and KUMADA, K. : Chemical studies on soil humic acids.
I. Elementary composition of humic acids, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 24, 337-347 (1978)
- 2) TSUTSUKI, K. and KUWATSUKA, S. : Chemical studies on soil humic acids.
II. Composition of oxygen-containing functional groups of humic acids, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 24, 547-560 (1978)
- 3) TSUTSUKI, K. and KUWATSUKA, S. : Chemical studies on soil humic acids.
III. Nitrogen distribution in humic acids, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 24, 561-570 (1978)
- 4) TSUTSUKI, K. and KUWATSUKA, S. : Chemical studies on soil humic acids.
IV. Amino acid, phenol, and sugar composition in the acid hydrolysable fraction of humic acids, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 25, 29-38 (1979)
- 5) TSUTSUKI, K. and KUWATSUKA, S. : Chemical studies on soil humic acids.
V. Degradation of humic acids with potassium hydroxide, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 25, 183-195 (1979)
- 6) TSUTSUKI, K. and KUWATSUKA, S. : Chemical studies on soil humic acids.
VI. Absorbance-pH curves of humic acids, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 25, 365-371 (1979)
- 7) TSUTSUKI, K. and KUWATSUKA, S. : Chemical studies on soil humic acids.
VII. pH-dependent nature of the ultraviolet and visible absorption spectra of humic acids, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 25, 373-384 (1979)
- 8) TSUTSUKI, K. and KUWATSUKA, S. : Chemical studies on soil humic acids.
VIII. Contribution of carbonyl groups to the ultraviolet and visible absorption spectra of humic acids, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 25, 501-512 (1979)
- 9) 熊田恭一, 「土壤有機物の化学」, pp. 220, 学会出版センター (1977)
- 10) KUMADA, K., SATO, O., OHSUMI, Y., and OHTA, S. : Humus composition of mountain soils in central Japan with special reference to the distribution of P type humic acid, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 13, 151-158 (1967)
- 11) 大塚紘雄, 熊田恭一 : P_o型腐植酸の形態変化について, 鹿児島県垂水市大野原の火山性土壌に関する研究 (第4報), 土肥誌, 45, 463-468 (1974)

- 12) Van KREVELLEN, D. W. : Graphical-statistical method for the study of structure and reaction process of coal, *Fuel*, 29, 269-284 (1950)
- 13) 村田富二郎 : 「石炭化学」 pp. 326, p.81, 勁草書房 (1964)
- 14) YOSHIDA, M. and KUMADA, K. : Studies on the properties of organic matter in buried humic horizon derived from volcanic ash. V. Humic acids in buried humic horizons, *Soil Sci. Plant., Nutr.* 25, 581-589 (1979)
- 15) KUMADA, K. and KAWAMURA, Y. : Viscosimetric characteristics of humic acid, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 14, 190-197 (1968)
- 16) C. サンドルフィ (尾子義人訳) : 「 π 電子スペクトルの理論」 pp.236, 紀伊国屋書店 (1963)
- 17) 熊田恭一 : 腐植化に関する一考察, *土肥誌*, 32, 466-474 (1961)
- 18) 三川礼, 卯林成和 : 「高分子半導体」, pp.318, 講談社 (1977)
- 19) 水島三知, 岡田純 : 「炭素材料」, pp.172, 共立出版 (1970)
- 20) SUZUKI, M. and KUMADA, K. : Several properties of Rp type humic acid, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 18, 58-64 (1972)
- 21) 熊田恭一 : 腐植酸の形成に関する物理化学的研究 (第9報), X線分析と電解質による凝析, *土肥誌*, 27, 79-82 (1956)
- 22) 半田隆, 相川秀夫 : 「入門紫外・可視部吸収スペクトル」, pp.298, 南江堂(1968)
- 23) LAKATOS, B., TIBELI, T. and MEISEL, J. : EPR spectra of humic acids and their metal complexes, *Geoderma*, 19, 319-338 (1977)
- 24) KUMADA, K. and SATO, O., : Characteristics of the green fraction of P type humic acid, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 26, 309-316 (1980)