

有機・無機複合体より抽出した腐植酸の分子量別画分の性質

誌名	日本土壌肥料学雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
著者	米林, 甲陽 久馬, 一剛 服部, 共生
巻/号	48巻5/6号
掲載ページ	p. 147-155
発行年月	1977年5月

有機・無機複合体より抽出した腐植酸の分子量別画分の性質*

米林甲陽**・久馬一剛***・服部共生**

1. 緒 言

著者らは既報¹⁾において、土壌中の有機・無機複合体を化学的にあまり変成させることなく、粒径の違いに応じて分画し、その有機物の性質を調べ、有機物の富化が粗粘土および細粘土相当画分にある場合と、粗粘土相当画分のみにある場合があることから、粗粘土画分の重要性を示した。さらに $\Delta \log K$ 値から判断した腐植酸の腐植化度は、粗粘土およびシルト相当画分で高いことを認めた。

これらのことは、分解度の異なる動植物遺体や腐植化度の異なる有機物の混合物と考えられる腐植を、土壌から直接抽出するよりは、粒径別画分から抽出するほうが、組成的に複雑性の減少した腐植として取扱えることを示すものであろう。そこで、さらに種々の方法で粒径別画分から抽出した腐植の分別を行ない、その性質を検討すれば、腐植の生成、腐植化過程を知るうえで重要な手がかりが得られるものと思われる。

腐植の分別法の一つとして、分子量差に基づく分離を行なうゲルクロマトグラフィーが最近よく用いられている。

POSNER²⁾ は、Salt boundary 法を用い、セファデックスゲルの種類を変えて腐植酸を溶出し、6個の排除画分に分画した。そして分子量 4~10 万を境とした高分子量グループはリグニンに由来し、低分子量グループは易分解性植物成分と高分子量グループの分解物に由来すると推定した。その後、LINDQVIST³⁾ はこの Salt boundary 法を批判し、排除画分の再溶出実験から、この方法で得た高分子、低分子画分はともにゲルの外表面に吸着することを示した。そして、塩を添加した試料を水で溶出することは、塩溶媒中での吸着に基づく分離を行なっているにすぎないとした。

SWIFT⁴⁾ は、12% 寒天ゲルを用いて腐植酸のゲル層

過を行ない、分別腐植酸の分子吸光係数が分子量の減少とともに増大することから、芳香族性または共役系の導入が低分子腐植酸で高いことを推定した。さらに紫外および赤外吸収スペクトルから、低分子腐植酸は非リグニンのであり酸化された形態であることを認め、低分子赤褐色腐植酸は腐植化の最終産物であり、重合の前駆物質と考えるべきでないとした。

その後さらに SWIFT⁴⁾ は、腐植酸を分子量差に基づいて分離するために、ゲルと腐植酸間の相互作用の少ない溶離液について検討し、アミノカチオンを含むアルカリ緩衝液、特にトリス緩衝液が、セファデックス、バイオゲル、寒天ゲルいづれにも適当であることを報告している。

著者らは前報⁵⁾で、セファデックスゲルと腐植化度の異なる腐植酸を用い、SWIFT⁴⁾ の用いたトリス緩衝液よりも尿素-アルカリ溶液を溶離液とすれば、不可逆的吸着はほとんどなく、溶出画分の再溶出実験からゲルと腐植酸間の相互作用もほとんどないことを認め、分子量差のみに基づく分離がなされると推察した。

そこでこの溶離液を用い、粒径分画して得た有機・無機複合体から抽出精製した腐植酸を分子量別に分画し、その光学的性質および官能基の測定を行ない、腐植化度と、腐植化の進行について考察を行なった。

2. 実験方法

(1) 供試土壌

既報¹⁾で用いた水田土壌作土 4 点を供試した。OK (干拓地水田土壌)、TO (腐植質火山灰土)、LB (グルムゾル-タイ国一)、RS (酸性硫酸塩土壌-タイ国一)

(2) 実験方法

a) 有機・無機複合体の調製

既報¹⁾と同様に、土壌をナトリウム飽和したのち超音波処理を行ない、沈降法と遠心分離法のくり返しにより、細粘土相当 ($< 0.2 \mu$)、粗粘土相当 ($0.2 \sim 2 \mu$)、シルト相当 ($2 \sim 20 \mu$) 画分を分離し、有機物-細粘土複合体、有機物-粗粘土複合体、有機物-シルト複合体とした。それぞれ fcx, ccx, six と略称する。

b) 腐植の抽出と腐植酸の精製

腐植の抽出は熊田らの方法に準じ、既報⁷⁾のように

* 本報告の一部は日本土壤肥科学会昭和 46 年度および昭和 47 年度大会において報告した。なお研究費の一部は文部省科学研究費の補助を受けた。

** 京都府立大学農学部 (京都市左京区下鴨半木町 1)

*** 京都大学東南アジア研究センター

昭和 51 年 4 月 3 日受理

日本土壤肥科学雑誌 第 48 巻 第 5, 6 号 p. 147~155 (1977)

0.1 M 水酸化ナトリウムおよび 0.1 M ピロリン酸ナトリウムによる逐次加熱 (50°C) 反復徹底抽出を行なった。

なお、LBfcx は水酸化ナトリウム抽出腐植が微量であるため、ピロリン酸ナトリウム抽出腐植を供試した。LBfcx 以外はすべて、抽出腐植の大部分をしめる水酸化ナトリウム抽出腐植を供試した。

得られた腐植抽出液を 2 M 硫酸で pH 1.0 とし、16 時間放置後遠心分離し腐植酸を得た。腐植酸の精製は前報⁹⁾と同様に行ない、再沈殿、高速遠心 (20,000×G) による微細粘土の除去、イオン交換樹脂による脱塩処理を行なった。

c) ゲルクロマトグラフィー

セファデックス G-75 をゲルクロマトグラフィーの担体とし、尿素-アルカリ溶液 (尿素 1.5 M, 水酸化ナトリウム 0.1 M) を溶離液として、前報⁹⁾と同様に行なった。4.6×90 cm のカラムを用い、試料添加量 20 ml (炭素 10~15 mg 相当量の腐植酸を含む)、流速 3.5 ml/cm²/hr, 20 ml ずつのフラクションに分取する条件で行なった。

各フラクションは 400 nm および 600 nm の吸光度を測定したのち、排除画分を (I) に、排除されない画分の前半 (K_D 約 0.08~0.4) を (II) に、後半 (K_D 約 0.4~0.8) を (III) にとりまとめた。

d) 炭素量, K_{600} 値, K_{400} 値, $\Delta \log K$ 値および窒素量

ゲルクロマトグラフィーにより分別し、3 つにとりまとめた各画分を 2 M 硫酸と 0.1 M 水酸化ナトリウムによる再沈殿と溶解をくりかえして精製した。0.1 M 水酸化ナトリウム溶液の 400 nm および 600 nm の吸光度を測定し、それぞれの対数値の差を $\Delta \log K$ 値とした。

分画腐植酸の炭素量は迅速比色定量法⁹⁾により測定した。腐植酸炭素 1 mg 当りの 600 nm における吸光係数を計算し K_{600} 値とした。なお、熊田⁹⁾の RF 値と比較するため、0.1 N 過マンガン酸カリウム 1 ml を炭素 0.4 mg とし¹⁰⁾換算すると、 K_{600} 値の 3, 6 はそれぞれ熊田の RF 値で 40, 80 にほぼ相当する。

また腐植酸炭素 1 mg 当りの 400 nm における吸光係数を計算し K_{400} 値とした。

分画腐植酸の窒素量はマイクロケルダール法により測定した。

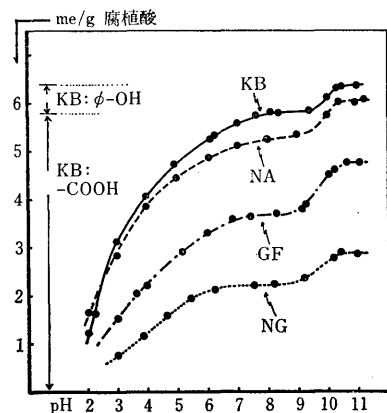
e) カルボキシル基およびフェノール性水酸基の定量

分画腐植酸のカルボキシル基およびフェノール性水酸基量は、微量定量が可能な千手¹¹⁾のコロイド滴定法により求めた。

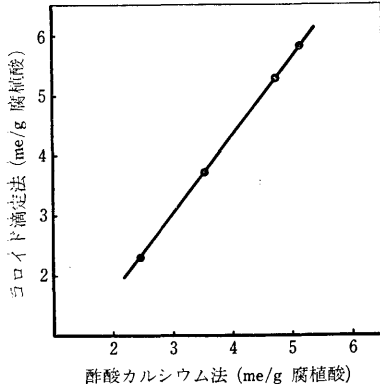
N/200 メチルグリコールキトザン (M. G. Ch.; 和光純薬製) 1~2 ml をビーカーにとり、水 10 ml と 0.1 M 水

酸化ナトリウムに溶解した腐植酸試料 (0.1~0.2 mg 炭素相当量) を加える。希塩酸で pH を 3~11 に適宜調整したのち、0.1% トルイジンプルー 3 滴を加え、N/400 ポリビニル硫酸カリ (PVSK; 和光純薬製, エステル化度 98.5%) で滴定する。滴定の終点はメタクロマジーによる色変で明瞭であるが、腐植酸の色によって色変がわかりにくい場合でも変色と同時に沈殿凝集が起こるから、終点は容易に検知できる。ほぼ同一 pH における M. G. Ch. のみを PVSK で滴定した滴定値と M. G. Ch.-腐植酸を PVSK で滴定した滴定値との差から、計算により腐植酸の当量数を求めた。各 pH における当量数を pH (3~11) に対してプロットし、コロイド滴定曲線を得た。なお、用いた M. G. Ch. は重合度 600 を越える典型的な高分子コロイドであるから、正負コロイド間の結合力は十分に強力であり、反応は化学量論的に進行すると考えられている¹¹⁾。

第 1 図に示すように腐植酸のコロイド滴定曲線には、pH 8~9 と pH 10~11 の 2 か所に平坦部がある。pH 9 までの解離をカルボキシル基、pH 9 以上 pH 11 までの解離をフェノール性水酸基によるものとした。これらのコロイド滴定曲線は、コロイド滴定法の検討を行なうための 4 種の土壌¹²⁾から大量に抽出精製した腐植酸について得られた結果である。同じ試料を用い酢酸カルシウム法¹³⁾によってカルボキシル基の定量を行ない、コロイド滴定法より求めた値と比較した。第 2 図に示すように、カルボキシル基含量が多くなるに従いコロイド滴定値がやや高くなる傾向があるが、かなり良い相関関係が期待されるからコロイド滴定法を腐植酸官能基の微量定量法として用いた。



第 1 図 腐植酸のコロイド滴定曲線
KB: 腐植質火山灰土壌 NA: 褐色森林土
GF: 黒泥土壌 NG: 強グライ土壌



第2図 コロイド滴定法および酢酸カルシウム法により定量した腐植酸のカルボキシル基の比較

f) 赤外線吸収スペクトル

脱塩水に対して十分透析した分画腐植酸を凍結乾燥した後、腐植酸濃度約0.5%の臭化カリウム錠剤を作成し、島津 IR-27G 型赤外線分光光度計を用いて赤外線吸収スペクトルを測定した。

3. 結果と考察

(1) 分画腐植酸の吸光係数および $\Delta \log K$ 値

各有機・無機複合体より抽出精製した腐植酸を、セファデックス G-75 を用いたゲルクロマトグラフィーにより分画した。回収率は 400 nm の吸光度から計算すると、用いた試料では 95~104% の範囲であり、ゲルに対する腐植酸の不可逆的吸着はほとんど認められなかった。また、 V_e 以後の溶出は認められず、可逆的吸着もほとんどないと考えられる。溶出フラクションを3画分 (I, II, III) にまとめたが、本報では分子量約5万以上とされる画分 (I) を高分子画分と呼び、分子量約1~2万とされる画分 (III) を便宜上低分子画分と呼ぶことにした。

なお、未分画腐植酸を熊田¹⁴⁾の腐植化度の区分に従って分類すると、つぎのようであった。

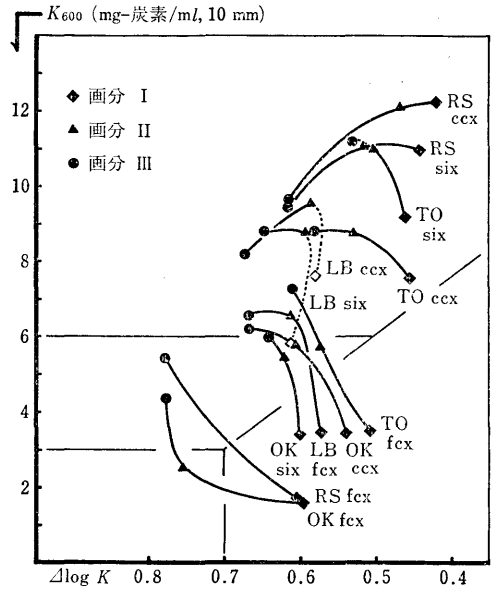
Rp 型腐植酸：OKfex, RSfex

B 型腐植酸：OKsix, OKccx, LBfex, TOsix

A 型腐植酸：LBsix, LBccx, TOccx, TOsix, RSsix, RScx

(分類型内では、ほぼ記載順に腐植化度は高い。)

第3図に示した各複合体腐植酸画分 (I), (II), (III) の K_{600} 値および $\Delta \log K$ 値から明らかなように、分子量別画分の分布状態は未分画腐植酸の腐植化度に対応して異なっている。すなわち、腐植化度の低い Rp 型腐植酸と B 型腐植酸の場合には、画分 (I) は画分 (III) に比

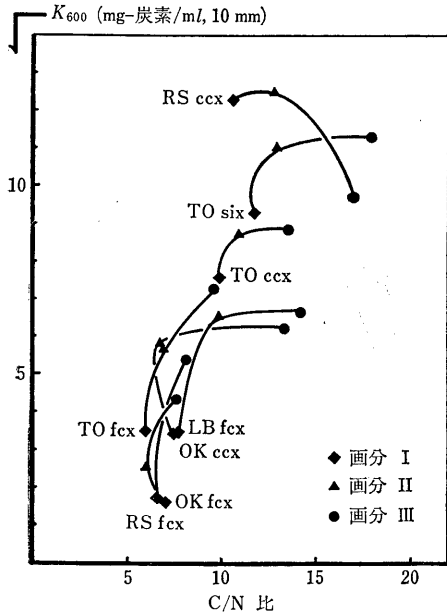


第3図 分画腐植酸の K_{600} 値と $\Delta \log K$ 値

べて K_{600} 値は低く $\Delta \log K$ 値も低い。腐植化度の高い A 型腐植酸では画分 (I) は画分 (III) に比べ $\Delta \log K$ 値は小さく、 K_{600} 値は未分画腐植酸の腐植化度の高いほど画分 (III) より高くなる傾向があった。これらの結果は井ノ子¹⁵⁾、KUMADA ら¹⁶⁾や大塚¹⁷⁾の報告とやや異なり、特に A 型腐植酸の場合で逆となっている。それは本報告ではゲルと腐植酸間の相互作用がほとんどない条件で実験していることと、土壌を粒径別に分画した複合体から腐植酸を分離し、組成的にあまり複雑でない腐植酸として扱いたためと思われる。

画分 (I) の K_{600} 値は未分画腐植酸が Rp 型の場合 1.6~1.7, B 型では 3.4~3.5, A 型では 5.8~12.1 であった。 $\Delta \log K$ 値は Rp 型で 0.60, B 型で 0.57~0.51, A 型で 0.46~0.42 であった。画分 (III) の K_{600} 値は未分画腐植酸が Rp 型の場合 4.3~6.1, B 型で 6.0~7.2, A 型で 8.2~11.2 であった。 $\Delta \log K$ 値は Rp 型で 0.78, B 型で 0.68~0.61, A 型で 0.67~0.53 であった。

腐植化過程を熊田¹⁸⁾が仮定したように、リグニンや炭水化物などの結合物 (L) → Rp 型腐植酸 → B 型腐植酸... $A_2 \rightarrow A_1$ 型腐植酸の形成過程とみなし、腐植化の進行に応じて、その高分子画分 (I) での変化をみると、未分画腐植酸の Rp 型 → B 型への変化では主として K_{600} 値の増大、B 型腐植酸間では $\Delta \log K$ 値の減少、B 型 → A 型への変化では K_{600} 値の増大と $\Delta \log K$ 値の減少、A 型腐植酸間では主として K_{600} 値の増大としてそれぞれ



第6図 分画腐植酸の K_{600} 値と C/N 比

く、0.2~0.9 me/g 炭素であるのに対し、画分(III)では1.4~3.0 me/g 炭素と著しく高い値となる。しかし、A型腐植酸では画分(I)のフェノール性水酸基量は0.6~1.5 me/g 炭素であり、画分(III)のそれは0.9~2.0 me/g 炭素であって著しい差はみられない。むしろ腐植化度の高い場合には(RScex, six), 画分(I)中の含量のほうが少ない傾向さえみられた。

各腐植酸の分子量別画分の C/N 比を K_{600} 値に対応させて第6図に示した。Rp型腐植酸の C/N 比は画分(I)で6.6~7.0, 画分(III)でも7.6~8.2といずれも低い値を示した。B型腐植酸の画分(I)では5.8~7.6であるが、画分(III)で9.6~14.2と高い値であった。A型腐植酸の場合、画分(III)の C/N 比は非常に高く13.8~18.0であるが、画分(I)も9.8~11.8とかなり高い値を示した。

各分子量別画分ごとに C/N 比と腐植化度との関係を見ると、腐植化の進行にとまない C/N 比は増大する傾向が認められ、熊田の未分画腐植酸

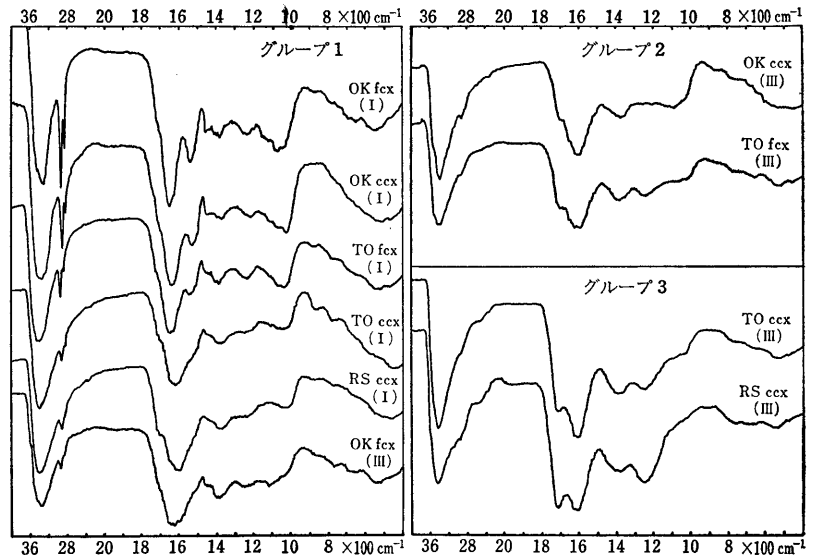
についての報告²²⁾と一致している。また、大部分の腐植酸では高分子画分の C/N 比は低分子画分よりも低く、井ノ子ら¹⁵⁾の報告と一致している。このことは酸化分解によって窒素の放出が起こったか、重縮合過程で窒素のとりこみが起こったことを示唆していよう。さらに、Rp, B型腐植酸の画分(I)の C/N 比が非常に低いことは、微生物遺体などの混入が著しいことを意味するものとも思われる。

(3) 分画腐植酸の赤外線吸収スペクトル

分画腐植酸の赤外線吸収スペクトルの一部を第7図に示した。いずれも 3400 cm^{-1} と 1600 cm^{-1} 付近に強い吸収がみられるが、他の吸収帯の存否と強度はそれぞれ異なっており、特に 2900 cm^{-1} 付近と $1500\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ の吸収の強度には違いが認められる。そこでこれらの違いを考慮して、各腐植酸画分の赤外線吸収スペクトルを次の3つに分類した。

グループ1にはRp型、B型およびA型腐植酸の画分(I)とRp型腐植酸の画分(II), (III)が含まれる。 3400 cm^{-1} と 1640 cm^{-1} 付近の吸収が著しく、 1700 cm^{-1} 付近の吸収はほとんどなく、 1540 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} , 1380 cm^{-1} , 1050 cm^{-1} , 2900 cm^{-1} 付近に吸収が認められる。OKfex (Rp型腐植酸)の画分(I)はその典型的な例である。これは STEVENSON²³⁾の報告している Type III (泥湖の底質土およびポドソルB層からの腐植酸と種々の高分子フルボ酸)のスペクトルによく類似している。

グループ2にはB型腐植酸の画分(II), (III)とA型



第7図 分画腐植酸の赤外線吸収スペクトル

腐植酸の画分 (II) が含まれる。3400 cm^{-1} と 1610 cm^{-1} 付近に強い吸収があり, 1700 cm^{-1} , 1380 cm^{-1} 付近にやや吸収が認められる。

グループ 3 は A 型腐植酸の画分 (III) である。3400 cm^{-1} , 1610 cm^{-1} と 1710 cm^{-1} 付近に強い吸収があり, 1380 cm^{-1} と 1250 cm^{-1} 付近に明瞭な吸収が認められる。STEVENS²³⁾ の Type I (プルニゼムおよび亜炭からの腐植酸) の吸収スペクトルによく類似している。

2900 cm^{-1} 付近の吸収は脂肪族 C-H 伸縮振動に基づき, CH_2 , CH_3 基の存在によるものと考えられており^{23, 24)}, グループ 1 に強いシャープな吸収が認められ, グループ 2, 3 ではほとんどみられない。

1710 cm^{-1} 付近の吸収は主としてカルボキシル基の C=O 伸縮振動に基づくと考えられる^{23, 25-27)}。グループ 1, 2, 3 の順に吸収は強まっており, コロイド滴定値から得たカルボキシル基量がグループ 1, 2, 3 の順にそれぞれ 4.0~7.5 me/g 炭素, 8.6~10.3 me/g 炭素, 10.3~10.9 me/g 炭素であることとよく一致している。

1600~1660 cm^{-1} の吸収は多くの吸収帯が複合している可能性が高いが, 1610 cm^{-1} の吸収は芳香族性 C=C 結合によるものが主であり^{24, 26)}, 一部に強く水素結合した C=O に基づくものも含まれていると考えられている²³⁾。

1650 cm^{-1} と 1540 cm^{-1} の吸収はペプチッドのアミドの吸収によるものと考えられる^{23, 25, 26)}。この吸収はグループ 1 で強く, グループ 2 でやや認められ, グループ 3 ではほとんど認められない。またグループ 1 では腐植化度の低下にともない 1540 cm^{-1} の吸収が強まり, 1610 cm^{-1} と 1650 cm^{-1} の吸収が分離せず, 1640 cm^{-1} 付近に強い吸収となって現われる。STEVENS²³⁾ もこれと同様な結果を得ている。また, 各画分の C/N 比はグループ 1 では 6.0~10.6, グループ 2 は 9.6~13.3, グループ 3 は 13.6~16.9 であり, グループ 1 が窒素化合物に富んでいることとよく一致している。

1460 cm^{-1} 付近の吸収は脂肪族またはメトキシル基の C-H 変角振動によるもので^{24, 27)}, グループ 1 で弱い吸収がみられるのみであり, 2900 cm^{-1} 付近の吸収によく対応している。

1050 cm^{-1} 付近の吸収は炭水化物の C=O 伸縮振動によるものと思われ^{25, 26)}, グループ 1 で吸収が認められるが, グループ 2, 3 の順にその吸収は弱まる。

以上の結果から判断して, グループ 1 特に Rp 型腐植酸の画分 (I) は, リグニンの性格が強く残っており, アミド様窒素および炭水化物の存在が著しく, B 型腐植酸の画分 (I) にもかなりその性格は残っているが, A

型腐植酸の画分 (I) ではこれらの特徴は弱まる。グループ 3 はリグニンの性格はほとんどなく, アミド様窒素および炭水化物の存在を示す吸収はまったくみられず, カルボキシル基量の増大が著しい。また, グループ 2 は 1 と 3 の中間的性質を有しているといえよう。

(4) 腐植化度と吸光係数 (K_{600} 値, K_{400} 値) および $\Delta \log K$ 値

腐植化度とは, 熊田¹⁸⁾ によれば腐植の黒色化における黒色調の度合であり, その実体は不均質重縮合物質系における二重結合の平均的密度, つまり π 電子密度を表わしており, RF 値 (K_{600} 値に相当) や $\Delta \log K$ 値はその程度を表わす指標である。

SWIFT⁴⁾ は, 分子量の減少にともない単位重量当りの吸光係数 (230nm) が指数的に増大し, 単環芳香族化合物の吸光係数に指向することから, 吸光係数は腐植酸における共役度または芳香族性の尺度となると推定している。

芳香族化合物では縮合ベンゼン環の数の増大にともない, 吸収極大は長波長側へ移動し (ナフタセン, ベンタセンでは 480 nm, 580 nm にそれぞれ吸収極大がある), 分子吸光係数も増大することが知られている³⁰⁾。また, 染料分子では重合体生成にともない, 吸収が長波長側へ移動することが知られている³⁰⁾。

腐植酸の可視部吸収スペクトルには明瞭な吸収ピークが認められず, それは多くの吸収帯が重なり合った結果と解釈できる。もし短波長側の吸収の一部が長波長側へ移動したとすれば, 吸収スペクトルの傾きが弱くなり, $\Delta \log K$ 値は小さな値を示す。このことは芳香族化合物である腐植酸では芳香環の発達を意味すると同時に, 重縮合度の増大をも意味していよう。なお, 腐植酸の 400 nm における吸光係数は腐植化度の違いによってあまり変化しないことが知られており, RF 値や $\Delta \log K$ 値を腐植化度の指標とするときは, このことを一つの前提条件にしていると考えられる。

そこで, 高分子腐植酸と低分子腐植酸の K_{400} 値に著しい差がなければ, 高分子腐植酸は低分子腐植酸より $\Delta \log K$ 値は小さくなり, RF 値 (K_{600} 値) は大きくなるはずである。それゆえ, ほぼ同じ程度の分子量分布をした未分画腐植酸の間での腐植化度, または同じ分子量画分の間での腐植化度を比較する場合には, $\Delta \log K$ 値は RF 値とともによい指標となろう。しかし, 分子量別に分画した腐植酸間でその K_{400} 値に著しい違いが認められる場合は, $\Delta \log K$ 値のみからその腐植化度を比較することはできないと考えられる。

第 4 図にみられるように Rp 型, B 型腐植酸の高分子

画分 (I) の K_{400} 値は著しく低い。この画分はリグニンなど非腐植高分子物質の性格の強いことが赤外線吸収スペクトルから明らかであり、高分子画分 (I) の腐植化度は低分子画分 (III) に比べ著しく低いとしなければならず、二重結合の平均的密度、 π 電子密度の著しい違いは、まず K_{400} 値の差に現われると考えられる。また、 K_{400} 値の増大は、第3図に示されるように K_{600} 値の増大となって現われる。

一方A型腐植酸の場合は、画分 (I) および画分 (III) の K_{400} 値はいずれも高い値を示し、両画分間で著しい差があるとはいえず、 $\Delta \log K$ 値の小さい画分 (I) の π 電子密度は高く、画分 (III) に比べて芳香環の重合度は高いと考えられる。また、第3図にみられるように、もっとも腐植化度の高い RScex の場合、 $\Delta \log K$ 値の減少は K_{600} 値の増大となって現われている。

これらのことから、 K_{400} 値によって主として π 電子密度を評価し、 $\Delta \log K$ 値によって主として芳香環の重合度を評価し、 K_{600} 値から両者を評価しようと考えられることも可能かと思われる。したがって、腐植化度を比較する場合、まず K_{400} 値から π 電子密度の差に注目し、著しい差がなければ $\Delta \log K$ 値によって芳香環の重合度の差を比較すべきであり、重合度の異なる分子量別画分の腐植化度の指標として1つを選ぶなら、 K_{600} 値がもっともよいと考えられる。

(5) 腐植酸の腐植化過程

第1表に供試腐植酸高分子画分 (I) および低分子画

第1表 分画腐植酸の光学的性質と官能基量 (平均値)

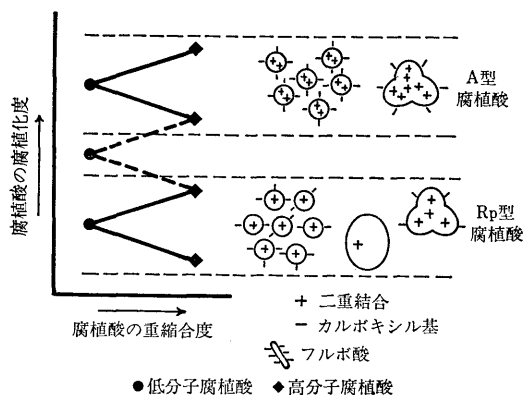
腐植酸の型*		B		A	
		高分子画分	低分子画分	低分子画分	高分子画分
Rp	K_{400} 値	6.4	28.8		
B			12.3	28.8	
A	(E_{400}/mg 炭素)			37.7	27.0
Rp	K_{600} 値	1.7	4.9		
B			3.5	6.4	
A	(E_{600}/mg 炭素)			9.4	9.1
Rp	$\Delta \log K$ 値	0.60	0.78		
B			0.56	0.65	
A				0.61	0.49
Rp	カルボキシル基	4.5	8.4		
B			5.7	8.8	
A	(me/g 炭素)			10.2	7.2
Rp	フェノール性水	0.5	2.1		
B	酸基		0.6	2.0	
A	(me/g 炭素)			1.6	0.9

* 熊田の分類に基づく未分画腐植酸の型

分 (III) の光学的密度、官能基量を、未分画腐植酸の腐植化度に対応させて平均値でまとめて示した。

Rp 型およびB型腐植酸の場合、第1表にみられるように画分 (III) の官能基量はカルボキシル基、フェノール性水酸基ともに画分 (I) より増大している、これは熊田¹⁹⁾の述べる非腐植高分子物質の解裂に始まる初期の腐植化過程で起こることと一致している。なお、画分 (III) の吸光係数が画分 (I) より著しく高いことは、先に述べたように画分 (III) の π 電子密度がかなり高いことを意味しており、画分 (III) が分解だけでなく複雑な過程で生成することを示唆している。また、非腐植高分子物質の一つである稲わらリグニンは、Rp 型、B型腐植酸の画分 (I) に比べ、吸光係数に著しい差はなく³¹⁾、 $\Delta \log K$ 値は非常に大きく³¹⁾、カルボキシル基はほとんど含まれないことが知られており、 $\Delta \log K$ 値の小さい画分 (I) を直接腐植化の出発物質と考えることはできない。この場合、画分 (I) を非腐植高分子物質と、少量の吸光係数の高い $\Delta \log K$ 値の小さい、カルボキシル基量のかかなり多い高分子腐植酸との混合物と考えれば説明できる。このような高分子腐植酸は次のA型腐植酸で述べるように、低分子腐植酸の重合縮合によって生成すると仮定しなければならないが、画分 (I) からそれらを分離したわけではなく、さらに検討を要する。なお、赤外線吸収スペクトルの結果によれば、Rp 型腐植酸の画分 (I) には、リグニンや炭水化物および含窒素化合物の混入が著しく高いが、B型腐植酸の場合にはそれらの混入は減少している。

A型腐植酸の場合、第1表にみられるように、画分 (I) は画分 (III) に比べ $\Delta \log K$ 値は低下し、カルボキシル基、フェノール性水酸基量ともに減少している。このことは、熊田¹⁹⁾の述べるA型での腐植化過程で起こることと一致している。なお、吸光係数は K_{400} 値、 K_{600} 値とも平均値では画分 (I) のほうがやや低い値を示すが、第3図に明らかなように、未分画腐植酸の腐植化度がB型に近い場合は、画分 (I) の K_{600} 値は画分 (III) のそれより低く、腐植化度の高まりとともに画分 (I) の K_{600} 値は著しく増大し、画分 (III) のそれより高くなる。また、画分 (I) における K_{600} 値の分布のパラッキは、画分 (III) におけるそれに比べて大きく、A型における腐植化の進行は、画分 (I) の腐植化の進行に主として現われているようにみえる。しかしA型腐植酸でも赤外線吸収スペクトルによれば、画分 (I) に微量ではあるが非腐植高分子物質の混入がみられることから、その K_{600} 値の増大は重合縮合高分子腐植酸の腐植化度の高まりのみを意味するばかりでなく、非腐植物質の混入度



第 8 図 腐植酸の腐植化度と重縮合度

の減少を意味する可能性も考えられよう。いずれにせよ、これらのことから SWIFT⁴⁾の結論と異なり、腐植化の最終産物は、吸光係数の大きい、 $\Delta \log K$ 値の小さい重縮合高分子腐植酸であると考えざるを得ない。

腐植化の進行について KONONOVA³²⁾ や SCHEFFER³³⁾ らは低分子物質の重縮合過程と対応させ、SCHNITZER³⁴⁾ や SWIFT⁴⁾ らは高分子物質の分解方向と一致させて考えている。熊田¹⁵⁾は Rp 型、B 型腐植酸の腐植化過程をリグニンなどの分解とし、A 型腐植酸の場合にはフェノールやキノン類の重縮合による腐植化の進行を推定している。

著者らは得られた結果から、非腐植高分子物質を初期腐植化の出発物質とし、腐植化の最終産物を重縮合高分子腐植酸として、水田土壌における腐植化過程を次のように仮定した。

第 8 図に示すように、リグニンと炭水化物や含窒素化合物との結合物である非腐植高分子の一部が、酸化分解により二重結合がやや増大し、カルボキシル基の多い低分子腐植酸となり、その一部が高分子腐植酸に重縮合する。非腐植高分子および重縮合高分子腐植酸の一部が再び分解し、さらに重縮合することをくり返すことで腐植化が進行し、 π 電子密度の高い、官能基量の多い低分子腐植酸と、 π 電子密度および芳香環の重合度の高い、官能基量のあまり多くない重縮合高分子腐植酸が生成すると仮定すれば、腐植化過程を統一的に解釈することができよう。そして Rp 型腐植酸は、おそらく重縮合が進みにくいために、分解と重縮合のくり返しがあまり進まない条件下で生成し、A 型腐植酸は分解と重縮合のくり返しが十分に進行して生成するものと推察される。なお、この推察は、分子量別に分画した高分子画分に非腐植高分子が混入しているであろうことを仮定した推察であり、それらの分離については今後検討しなければならない。

4. 要 約

粘土鉱物の種類、有機物含量などを異にする 4 種類の水田土壌作土を用い、既報と同様に有機物-細粘土 ($< 0.2 \mu$) 複合体、有機物-粗粘土 ($0.2 \sim 2 \mu$) 複合体および有機物-シルト ($2 \sim 20 \mu$) 複合体に分離した。各複合体より抽出精製した腐植酸を、ゲルクロマトグラフィーにより高分子画分 (分子量約 5 万以上) から低分子画分 (分子量約 1 ~ 2 万) に分画し、その光学的性質の測定、コロイド滴定による官能基の定量、C/N 比の測定、赤外線吸収スペクトルの測定を行なった。また未分画腐植酸を熊田の腐植化度の区分に従って分類し、それぞれの分子量別画分について検討を行なった。

その結果、400 nm における腐植酸の吸光係数は主として π 電子密度の指標であり、 $\Delta \log K$ 値は主として芳香環の重合度の指標であり、600 nm における吸光係数は両者を組み合わせた腐植化度の指標であると推察した。

また、腐植化の進行について、得られた結果から検討し次のように推察した。リグニンと炭水化物や含窒素化合物などの結合物である非腐植高分子の一部が、酸化分解により二重結合がやや増大し、カルボキシル基量の多い低分子腐植酸となり、その一部が高分子腐植酸に重縮合する。非腐植高分子および重縮合高分子腐植酸の一部が再び分解し、さらに重縮合することをくり返すことで腐植化が進行し、 π 電子密度の高い、芳香環の重合度の高い、官能基量のあまり多くない重縮合高分子腐植酸が生成すると推察した。従って腐植化の最終産物は、黒色調の著しい重縮合高分子腐植酸と考えられる。

文 献

- 1) 米林甲陽・久馬一剛・川口桂三郎：土壌中の有機・無機複合体とその有機物の特性，土肥誌，45，416~420(1974)
- 2) POSNER, A. M.: Importance of Electrolyte in the Determination of Molecular Weights by 'Sephadex' Gel Filtration, with Especial Reference to Humic Acid. *Nature*, 198, 1161~1163 (1963)
- 3) LINDQVIST, I.: Adsorption Effects in Gel Filtration of Humic Acid. *Acta Chem. Scand.*, 21, 2564~2566 (1967)
- 4) SWIFT, R. S., THORNTON, B. K. and POSNER, A. M.: Spectral Characteristics of a Humic Acid Fractionated with Respect to Molecular Weight Using an Agar Gel. *Soil Sci.*, 110, 93~99 (1970)
- 5) SWIFT, R. S. and POSNER, A. M.: Gel Chromatography of Humic Acid. *J. Soil Sci.*, 22, 237~249 (1971)
- 6) 米林甲陽・服部共生：腐植酸のゲルクロマトグラフィーについて，土肥誌，48，130~136 (1977)
- 7) 米林甲陽・久馬一剛・川口桂三郎：土壌腐植の形態別画分と酸加水分解性窒素組成との関係，易分解性有機物の存在形態 (その 1)，土肥誌，44，327~333 (1973)
- 8) 立川 淳：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，37，28

- ～33 (1966)
- 9) 熊田恭一：腐植分析法，続作物試験法，p. 370，農業技術協会 (1960)
 - 10) 大羽 裕：土壤腐植分析法Ⅱ，弘法・大羽法，ペドロジスト，8，108～116 (1964)
 - 11) 千手諒一：コロイド滴定法，南江堂 (1969)
 - 12) 山田秀和・米林甲陽・服部共生・森田修二：ゲル濾過法によるフルボ酸の分画とそのキレート能について，京都府立大学学術報告・農学，27号，103～109 (1975)
 - 13) SCHNITZER, M. and GUPTA, U. C. : Determination of Acidity in Soil Organic Matter. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 29, 274～277 (1965)
 - 14) 熊田恭一・太田信婦：中部地方の土壤腐植の形態，土肥誌，38，267～274 (1967)
 - 15) 井ノ子昭夫・玉井 理：土壤有機物の消長に関する研究 (1) 土壤腐植の高分子科学的研究，農技研土壤第一科成績概要書昭和42年度，p. 2～24 (1968)
 - 16) KUMADA, K. and MIYARA, E. : Sephadex Gel Fractionation of Humic Acid. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 19, 255～263 (1973)
 - 17) 大塚紘雄：腐植質埋没土層の腐植酸のセファデックス分画，鹿児島県垂水市大野原の火山性土壤に関する研究 (第2報)，土肥誌，45，405～410 (1974)
 - 18) 熊田恭一：腐植化に関する一考察，土肥誌，32，466～474 (1961)
 - 19) 熊田恭一：腐植酸の形成に関する物理化学的研究 (第8報)，腐植化の進行に伴う性状変化，土肥誌，26，287～290 (1955)
 - 20) 熊田恭一・川村征夫：腐植酸の極限粘度および官能基について，土肥誌，36，367～372 (1965)
 - 21) 小坂二郎：高位地土壤に於ける腐植化過程の研究，農技研報告，B 13，253～352 (1963)
 - 22) 熊田恭一：腐植酸の形成に関する物理化学的研究 (第6報)，腐植酸の元素組成，土肥誌，26，179～182 (1955)
 - 23) STEVENSON, F. J. and GOH, K. M. : Infrared Spectra of Humic Acids and Related Substances. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 35, 471～483 (1971)
 - 24) KUMADA, K. and AIZAWA, K. : The Infra-red Spectra of Humic Acid. *Soil Plant Food*, 3, 152～159 (1958)
 - 25) FARMER, V. C. and MORRISON, R. I. : Chemical and Infra-red Studies on Phragmites Peat and Its Humic Acid. *Proc. Royal Dublin Soc. A*, 1, 85～104 (1960)
 - 26) SCHNITZER, M. and HOFFMAN, I. : Pyrolysis of Soil Organic Matter. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 28, 520～525 (1964)
 - 27) WAGNER, G. H. and STEVENSON, F. J. : Structural Arrangement of Functional Groups in Soil Humic Acid as Revealed by Infrared Analysis. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 29, 43～48 (1965)
 - 28) ISHIWATARI, R. : Structural Characteristics of Humic Substances in Recent Lake Sediments. *Advances in Organic Geochemistry*, 1966, 285～311 (1970)
 - 29) CLARK, F. E. and TAN, K. H. : Identification of a Polysaccharide Ester Linkage in Humic Acid. *Soil Biol. Biochem.*, 1, 75～81 (1969)
 - 30) RAO, C. N. R. 著，中川正澄訳：紫外可視スペクトル，p. 66，196，東京化学同人 (1964)
 - 31) 熊田恭一・鈴木正昭：腐朽植物遺体の腐植組成，土肥誌，40，353～357 (1969)
 - 32) KONONOVA, M. M. 著，菅野一郎・久馬一剛・徳留昭一・有村玄洋訳：土壤有機物，p. 34，新科学文献刊行会 (1963)
 - 33) SCHEFFER, F. and ULRICH, B. : Humus und Humusdungung. Band I, p. 41, Ferdinand Enke (1960)
 - 34) SCHNITZER, M. and HOFFMAN, I. : Thermogravimetry of Soil Humic Compounds. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 29, 859～870 (1965)