

土壤フルボ酸の化学的研究

名古屋大学農学部

土壤学研究室

渡辺 彰

名古屋大学図書
和 1066178

目 次

第1章 緒論	1
第2章 各種土壌のフルボ酸含量と腐植組成	5
はじめに	5
試料および方法	5
結果	6
考察	10
要約	12
第3章 フルボ酸の分画と化学的性質－1	14
1. はじめに	14
2. 吸着樹脂PVPによるフルボ酸の分画	15
試料および方法	15
結果および考察	16
3. 可視・紫外線吸収スペクトル	19
試料および方法	19
結果および考察	19
4. イオン化示差スペクトル	23
試料および方法	23
結果	23
考察	30
5. 低分子化合物のイオン化示差スペクトル	32
試料および方法	32
結果および考察	34
6. 要約	41
第4章 フルボ酸の分画と化学的性質－2	42
1. はじめに	42
2. エタノールに対する溶解性に基づく分画	43
試料および方法	43
結果および考察	46
3. 元素組成	50
試料および方法	50
結果および考察	50

4.	I R スペクトル	59
	試料および方法	59
	結果	60
	考察	69
5.	可視・紫外線吸収スペクトル	72
	試料および方法	72
	結果および考察	72
6.	糖含量	76
	試料および方法	76
	結果および考察	77
7.	分子粒径分布	81
	試料および方法	81
	結果	82
	考察	88
8.	^{13}C -NMR スペクトル	92
	試料および方法	92
	結果	93
	考察	104
9.	^1H -NMR スペクトル	109
	試料および方法	109
	結果	110
	考察	121
10.	PVP 通過面分の水-エタノールによる分別沈殿	123
	試料および方法	123
	結果	124
	考察	132
11.	要約	137
第5章 総合考察		139
第6章 要約		153
謝辞		157
引用文献		158

第1章 緒論

Kononova (1966、管野ら訳 1976)、Stevenson (1982)によれば、腐植の研究の歴史において、“フルボ酸 (Fulvic Acid)” という術語はOden (1919)の報告に初めて現れた。ただし、フルボ酸に相当する、すなわち水溶性で腐植酸より明るい色を呈する腐植物質の存在は、それよりさらに80年前にすでにBerzelius (1839)によって報告されている。彼は、それらを鉱泉水や腐植質土壌の水抽出液中に見出し、クレン酸 (Spring Acid) およびアポクレン酸 (クレン酸の酸化生成物、Sedimentary Spring Acid) と名付けた。一方、Odenは腐植物質を、Humuskohle (腐植炭、ヒューミンに相当する)、Huminsäuren (腐植酸)、Hymatomelansäuren (ヒマトメラン酸) およびFulvosäuren (フルボ酸) の4グループに分類した。彼は、腐植酸とヒマトメラン酸を化学的に単一な化合物と考えていたのに対し、腐植炭とフルボ酸はグループ概念としてとらえていた。“フルボ酸”の名前は、その色、すなわち、黄色を意味するラテン語の“fulvus”に由来している。

フルボ酸の土壌環境中における機能は多岐にわたっているが、金属の可溶化はその中でも最も重要なものである。フルボ酸が多価カチオンや二三酸化物、特に酸化鉄と高い可動性を持つ錯化合物を作ること古くから知られている (Kononova 1966)。また、一般に、腐植酸/フルボ酸の比は下層ほど小さく、このことは、実際にフルボ酸の移動性が大きいことを示唆している。金属を伴ったフルボ酸の溶脱は土壌断面、特にB層の形成に大きく関与している。フルボ酸による金属、特にCu、Fe、Mn、Mo等の植物の微量元素やCd、Pb等の有害重金属の可溶化や吸着、移動は、作物の成育にも影響を及ぼしている。また、フルボ酸は金属とともに岩石や粘土鉱物中のケイ酸塩を可溶化させることも報告されており (Schnitzer・Kodama 1976)、土壌の生成とともに土壌の風化にも関係していると考えられる。

フルボ酸は植物に対し、微量元素と共に多量要素も供給している。フルボ酸には水溶性の易分解性有機物が多く含まれており、それらは植物のN源のみ

でなく、S源やP源にもなる。これらの易分解性有機物は同時に微生物に対する栄養源となる。また、腐植物質も徐々に微生物によって分解、利用される。

また、フルボ酸は多くのカルボキシル基や水酸基をもっているため、置換容量が高く、カチオンを吸着して土壌環境における急激なpH変化に対する緩衝能を示す。さらに、パラコート (Khan 1973b)、DDT (Ballard 1971)、アミトロール (Maqedaら 1989) その他多くの農薬を吸着することも報告されており、それらの分解、溶脱や不活性化にも関係している。

このほか、作物の葉や根に対する生長促進作用 (Linehan 1976、Chen 1986) や根の形成促進作用 (Schnitzer・Poapst 1967) を示すことも報告されている。菱田 (1989) はまた、黒ボク土および泥炭土の水抽出液中に、イネ幼植物の生長を促進する既知の植物ホルモンとは異なる物質が含まれていることを明らかにした。

このように、土壌中においてフルボ酸がきわめて重要な役割を果たしているにもかかわらず、その組成や構造に関しては、現在もなお不明な点が多く残されている。これは、フルボ酸が複雑な高分子物質の混合物であるのに加え、腐植の研究がこれまで腐植酸を中心に行なわれてきたためである。Rice・MacCarthy (1988) は、1985年までのChemical Abstracts (1-103巻) に載った腐植に関する研究報告10315報のうち、じつに7556報が腐植酸について行なわれた研究であったことを報告している。一方、フルボ酸について行なわれたものは2350報と、全体の23%にとどまっていた。多くの研究者が腐植酸を研究対象としたのは、腐植酸が腐植物質を主体としており、土壌固有の有機物としての特性を顕著に示すこと、酸性にすることによって沈殿し、固体粉末として容易に回収できることなどによるものと考えられる。わが国においても、腐植酸に関しては、熊田 (1981、1987)、Kuwatsukaら (1978)、筒木 (1979)、米林 (1988) らによって多くの研究が行なわれており、特に腐植酸の性質と土壌の種類との関連についての研究成果は、世界的にも高いものであるといえる。これに対し、フルボ酸が腐植酸ほど研究されてこなかったのは、腐植酸に比べると精製にはるかに手間がかかること、さらにその画分中に腐植物質と共に多量の非腐植物質を含んでいることなどによるものと考えられる。

しかしながら、フルボ酸は量的にみても腐植酸やヒューミンとならぶ土壤有機物の主要な構成成分であり、また、先にも述べたように金属の移動や植物に対する栄養の供給、あるいは団粒の形成に対する役割も大きい (Stevenson 1985) ことから、その構造や化学的性質の解明は、土壤学の分野においてきわめて重要な問題である。本研究は、以上のような背景をもとに、土壤フルボ酸の実態を、フルボ酸の性質と土壤の種類との関連、腐植酸の性質との関連に注目しながら、明らかにすることを目的として行なった。

本研究では、供試土壤として各種の褐色森林土、黒ボク土、灰色および褐色低地土 (水田土壤、以下本論文では低地水田土とする) および赤黄色土を用いた。これらの土壤はいずれも日本の典型的な土壤である。わが国の土壤で最も面積が多いのは褐色森林土で、全国土の51%を占めている。次いで、黒ボク土16%、低地水田土8%の順となっており、赤黄色土の3%を加えるとこの4種でわが国の土壤の80%に相当する (久保 1983)。第2章では、これらの土壤からフルボ酸画分を抽出、分離し、フルボ酸の含量および腐植組成 (フルボ酸、腐植酸、ヒューミンの構成比) が土壤の種類によってどう異なるかについて調べた。

土壤有機物 (腐植) は、大きく分けて腐植物質、すなわち土壤中で生成した暗色無定形の高分子物質と、非腐植物質、すなわち糖、アミノ酸、ペプチド、核酸等の有機化学的に既知の物質とから構成されている。一方、土壤フルボ酸の定義は“土壤よりアルカリによって抽出され、抽出液を酸性にしても沈殿しない区分”という分析操作上のものであり、その際、得られた有機物全てを指すのか、あるいは得られた物質のうちの腐植物質のみを指すのかが問題になってきた (Kononova 1966、熊田 1981)。アルカリで抽出し、抽出液を酸性にして腐植酸とフルボ酸を分離するという操作においては、当然、非腐植物質も腐植物質と同様、抽出、分画される。特にフルボ酸画分 (酸性上澄液) には多くの非腐植物質が分配され、このことは腐植研究者のフルボ酸に対する興味を減じさせてきた。そこで、1981年に創立された国際腐植物質学会 (IHSS) では、国際的に基準となる標準腐植調製法 (IHSS法) を暫定的に定め、腐植の酸およびアルカリ可溶成分のうちの腐植物質のみをフルボ酸とするという見解のもとに、疎水性吸着樹脂 Amberlite XAD-8に対して吸着性をもつ物質をもって

“フルボ酸”とすることとした。しかしながら、IHSS法では、得られた画分に非腐植物質がほとんど含まれない代わりに、腐植物質の多くも非吸着画分として除去されてしまうため、フルボ酸のごく一部を研究対象としていることにしかならない (Kuwatsukaら、投稿中)。腐植物質、非腐植物質が概念上の分類であり、実際には明確に区分できない状態で存在していること、非腐植物質についても、生物によってそれらが生産されたときの構造を保っているわけではなく、土壌中において化学的および生物的に変化を受けていると推定されることなどを考えると、酸およびアルカリに可溶性な土壌有機物画分全てを“フルボ酸”とするのが妥当であると結論される。

しかしながら、その一方で、フルボ酸の混合物としての性格は、分析によって得られる情報を著しく減少させる妨げであり、その化学構造を詳しく知るためには、分画して構造、性質のよく似た物質を集めることが必要不可欠と考えられる。その際、吸着樹脂による腐植物質と非腐植物質への分画は、フルボ酸の最も良い分画法として浮かび上がってくる。そこで、本研究では著者ら (鍬塚ら 1986) が行なった分離用吸着樹脂の比較の結果から、腐植物質と非腐植物質への分離能が最も高いと判断された polyvinylpyrrolidone (PVP) を用いて、各種土壌のフルボ酸の分画を行なった。第3章、第4章では、フルボ酸のPVP吸着画分およびPVP通過画分への分配割合および両画分の化学構造について分光化学的性質の分析を中心に調べた。また、第4章では、さらに、PVP吸着・通過両画分をエタノールに対する溶解性に基づいて細画分し、それらの分布、構造についても調べた。第5章では、各分析結果をもとに、フルボ酸各画分の組成、構造について総合的に考察を行なった。同時に、土壌の種類によってそれらがどのように異なるかについてもまとめた。

フルボ酸と同一土壌由来の腐植酸との比較は、両腐植画分の異同を明確にするだけでなく、土壌中における腐植の生成に関する手がかりになると考えられる。そこで、本研究では、フルボ酸と共に腐植酸あるいはそのエタノール可溶画分であるヒマトメラン酸についても分析を行なった。第5章では、両腐植画分の化学的性質および各種土壌の腐植組成をもとに、フルボ酸と腐植酸の関係、さらに、フルボ酸の生成についても考察を行なった。

第2章 各種土壌のフルボ酸含量と腐植組成

本章では、フルボ酸の含有量と土壌の種類との関係を調べた。また、同時に、各種土壌において腐植各画分がどのような割合で存在しているのかについても調べた。

フルボ酸、腐植酸、ヒューミンの腐植の3画分は、土壌中において、生成、分解、変質を繰り返しており、各画分は連続的に遷移していると考えられる。しかしながら、これらの過程は見かけ上平衡状態を保っているため、それぞれの土壌は特有の腐植組成をもっている。したがって、腐植3画分の存在割合は各土壌における腐植の重要な特徴のひとつであると考えられる。

ここではまた、各種土壌における各腐植画分の割合の異同を、これまで用いられてきた H_E/H_T （腐植抽出割合）や C_h/C_f （腐植酸含量/フルボ酸含量）（熊田 1981）といった2者間の関係ではなく、3者間の関係を同時にかつ視覚的に表すために、土性を求めるのに用いられる三角図法の適用を試みた。

試料および方法

土壌は、褐色森林土A層5、黒ボク土6（草地土壌A層5、水田土壌作土層1）、低地水田土作土層4（灰色低地土3、褐色低地土1）、赤黄色土（畑地土壌作土層）4を用いた（表2-1参照）。各土壌は風乾し、2mmの篩に通した後、さらにピンセットでできる限り未分解の植物残さを除去してアルカリ抽出に供した。

アルカリ抽出は、200ml容ナルゲンボトル（ポリプロピレン製）に炭素含量500mg相当量の土壌を採り、0.1N NaOH 150mlを加え、 N_2 置換した後、25℃で48時間、ときどき振盪しながら静置することにより行なった。その後、凝集剤として Na_2SO_4 4.5gを加え、1,500Xgで15分間遠心分離して、抽出液と抽出残さを分けた。抽出残さには、0.1N NaOH 150mlおよび Na_2SO_4 4.5gを加え、1,500Xgで15分間遠心分離して、上澄液は先に得た抽出液と合わせた。アルカリによる抽出回数は、予備実験において、4回の抽出量の98%が2回の抽出で回収され

ることが明らかとなったため、以後2回とした。抽出残さは、水による洗浄を繰り返した後、凍結乾燥してヒューミン画分を得た。アルカリ抽出液は、3N H₂SO₄でpH 1.0として一夜放置した後、1500×gで10分間遠心分離して可溶部と沈殿部に分けた。沈殿部は、再溶解、再沈、遠心分離を行い、上澄液は先に得た酸可溶部に合わせ、沈殿は凍結乾燥して腐植酸画分を得た。酸可溶部は、カチオン交換樹脂（Dowex HCR-W）に通して金属イオン（主にAl）を除去した後、500mlに定容した（フルボ酸画分）。

各土壌、ヒューミン画分および腐植酸画分の炭素および窒素含量は、柳本C NコーダーMT-500で測定した。また、フルボ酸画分の炭素含量は重クロム酸カリ・硫酸による比色定量法（立川 1966）、窒素含量はケルダール法（深山ら 1973）で、それぞれ測定した。

結果

各土壌の炭素含量、窒素含量、C/N比は表2-1に、腐植組成（各腐植画分の全有機物に対する相対含量）および各腐植画分への窒素分配は表2-2に、それぞれ示した。

全炭素量とフルボ酸炭素量との間には、図2-1に示したように高い正の相関関係（ $r=0.965^{***}$ ）が認められ、腐植の集積に伴ってフルボ酸含量も増加することが明らかになった。フルボ酸の土壌有機物全体に対する相対含量は6-24%と、土壌によって様々であった。今回用いた土壌のうちフルボ酸の相対含量が最も高かったのは宮原黒ボク土（24.1%）であったが、黒ボク土のフルボ酸含有率は土壌間でばらつきが大きく、総体的にみると、フルボ酸含有率の最も高い土壌は褐色森林土であり、次いで黒ボク土、低地水田土あるいは赤黄色土の順であった。

図2-2(a)には、各土壌の腐植組成を三角図法を用いて示した。三角図には、各腐植画分の炭素量の合計を100としたときの各画分の含有率を算出してプロットした。各土壌の腐植組成は、褐色森林土および黒ボク土と、低地水田土および赤黄色土とで明確に異なる範囲に分布した。2つのグループの差異はヒューミン画分の含有率、すなわちアルカリで抽出されない有機物の含有率の差に

表 2-1 供試土壤の炭素含量、窒素含量およびC/N比

土壤の分類	土壤	T-C (%)	T-N (%)	C/N
褐色森林土 (Dystric Cambisol)	稲武A ₁ (愛知県稲武町) ^a	14.88	1.12	17.6
	稲武A ₂ (同上) ^a	11.98	0.85	14.3
	賀茂 (愛知県足助町)	7.94	0.45	13.3
	蘭荊 (愛知県額田町)	6.56	0.46	14.1
	段戸 (愛知県設楽町)	6.19	0.34	18.2
黒ボク土 (Humic Andosol)	猪之頭 (静岡県富士宮市)	16.71	1.04	16.1
	設楽 (愛知県設楽町)	11.78	0.50	23.6
	宮原 (静岡県富士宮市)	9.85	0.71	13.9
	三鷹 (東京都三鷹市)	8.20	0.51	16.1
	大野原 (鹿児島県垂水市)	2.61	0.22	11.9
低地水田土 (Anthraquic Gleysol)	茨城 (茨城県水戸市)	5.37	0.45	11.9
	菊川 (静岡県菊川町)	1.57	0.15	10.5
	長野 (長野県長野市)	1.49	0.14	10.6
	福岡 (福岡県筑紫野市)	1.42	0.13	10.9
(Anthraquic Fulvisol)	安城 (愛知県安城市)	1.23	0.12	10.3
赤黄色土 (Dystric Cambisol)	名大農場厩肥無施用区 (愛知県東郷町)	0.60	0.06	10.0
	同 厩肥連用 20t/ha区 (同上)	1.20	0.12	10.0
	同 厩肥連用 50t/ha区 (同上)	1.81	0.19	9.5
	同 厩肥連用100t/ha区 (同上)	2.99	0.33	9.1

^a同一地点で採取

表 2 - 2 各腐植面分の相対含量および各腐植面分への窒素の分配

土 壤	腐植組成 (相対含量 %)				窒素分配 (相対含量 %)			
	FA	HA	Humin	recov.	FA	HA	Humin	recov.
褐色森林土								
稻武A ₁	20.6	21.7	45.3	87.6	20.2	24.8	41.2	86.2
稻武A ₂	22.4	22.2	39.8	84.4	21.2	26.8	35.0	83.0
賀 茂	15.4	23.8	51.9	91.1	16.3	24.2	38.1	78.6
闇 刈	21.1	24.0	48.6	93.7	23.1	27.1	36.1	86.3
段 戸	23.4	11.1	43.9	78.4	23.1	27.0	34.8	84.9
黒ボク土								
猪之頭	21.1	30.5	53.4	105.0	27.6	25.7	42.8	96.1
設 楽	12.7	34.4	45.3	92.4	16.6	24.5	37.4	78.5
宮 原	24.1	17.5	43.7	85.3	28.0	16.4	39.9	84.3
三 鷹	13.8	31.4	33.4	78.6	29.3	24.3	27.9	81.5
大野原	17.6	21.9	36.3	75.8	18.5	21.9	23.3	63.7
茨 城	13.0	27.5	40.8	81.3	17.9	34.0	43.3	95.2
低地水田土								
菊 川	10.8	8.6	65.7	85.1	11.5	9.8	64.1	85.4
長 野	6.2	7.9	70.5	84.6	8.6	9.0	69.4	87.0
福 岡	6.7	13.6	61.6	81.9	9.5	17.7	67.3	94.5
安 城	12.0	8.7	65.1	85.8	16.9	8.9	59.9	85.7
赤黄色土								
名大農場厩肥無施用区	11.8	5.9	67.5	85.2	15.2	5.8	65.6	86.6
同 厩肥連用 20t/ha区	8.8	9.6	53.9	72.3	13.1	9.8	52.2	75.1
同 厩肥連用 50t/ha区	6.6	12.0	69.9	88.5	11.1	11.6	60.5	83.2
同 厩肥連用100t/ha区	9.4	13.8	63.6	86.8	9.5	12.4	54.2	76.1

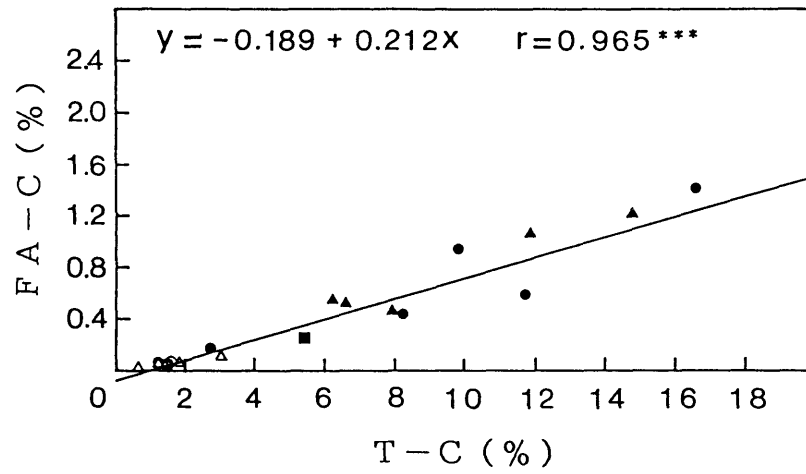


図 2-1 全炭素量とフルボ酸炭素量の関係

▲：褐色森林土、●：黒ボク土（草地）、■：黒ボク土（水田）、
○：低地水田土、△：赤黄色土

起因していた。褐色森林土と黒ボク土の間には明確な境界は存在しなかった。また、黒ボク水田土の腐植組成は、他の低地水田土の腐植組成とは大きく異なり、草地黒ボク土の腐植組成と類似していた。このことから、元来腐植含有量の高い黒ボク土では、水田化の腐植組成に及ぼす影響はきわめて小さいことが推定された。

図2-2(b)には、各土壌の各腐植画分への窒素分配を同じように三角図を用いて示した。各腐植画分への窒素分配も腐植組成と同様、褐色森林土および黒ボク土と、低地水田土および赤黄色土とで明確に異なることが明らかになった。

考察

褐色森林土および黒ボク土と、低地水田土および赤黄色土との腐植組成の差異は、ヒューミン画分の相対含量が規定していることが明らかになった。一般にヒューミン画分には、1)未分解の植物組織、2)腐植化が高度に進んで炭化した腐植、3)粘土鉱物に強固に結合しているためにアルカリで抽出できない物質等が含まれていると考えられる（鍛塚 1984）。低地水田土や赤黄色土では、腐植酸の型がP型またはRp型である（熊田 1981）ことからわかるように、腐植化は進んでおらず、2)のタイプの物質がヒューミンの主成分であることは考えられない。1)のタイプの物質の存在は十分考えられるが、水田あるいは畑土壌の炭水化物含量は、堆肥あるいは稲わらを添加した土壌においても全有機物量の約10%にすぎないことが報告されている（管家 1987）。したがって、これらの土壌におけるヒューミン画分は、主に3)のタイプの物質によって構成されていると推定される。腐植の集積の少ない低地水田土や赤黄色土では、施用された厩肥あるいは作物残さが分解してできた腐植物質が、粘土鉱物と強く結合しやすく、その結果腐植酸やフルボ酸の相対含量が低くなると推察した。

名大付属農場の厩肥連用圃場（20、50、100t/ha相当量の牛ふん厩肥を年2回8年間施用（吉田ら 1985））の腐植酸の相対含量をみると、施用厩肥量の多い区ほど高くなっており、有機物含量の増加に伴って遊離型の腐植酸も増加することが推察された。腐植の集積が進めば、同じDystric Cambisolに属する褐色森林土のように、アルカリで抽出可能な遊離型の腐植（腐植酸およびフルボ酸

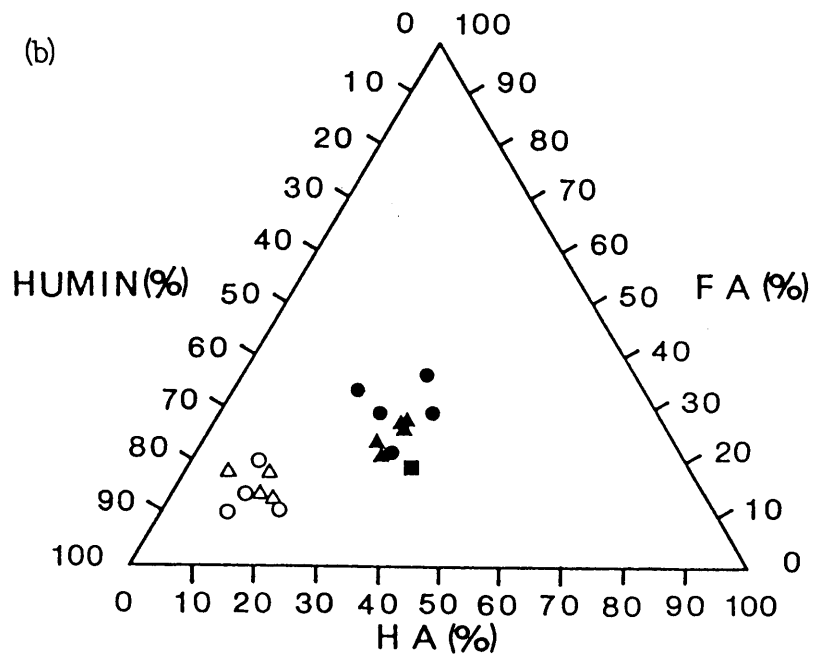
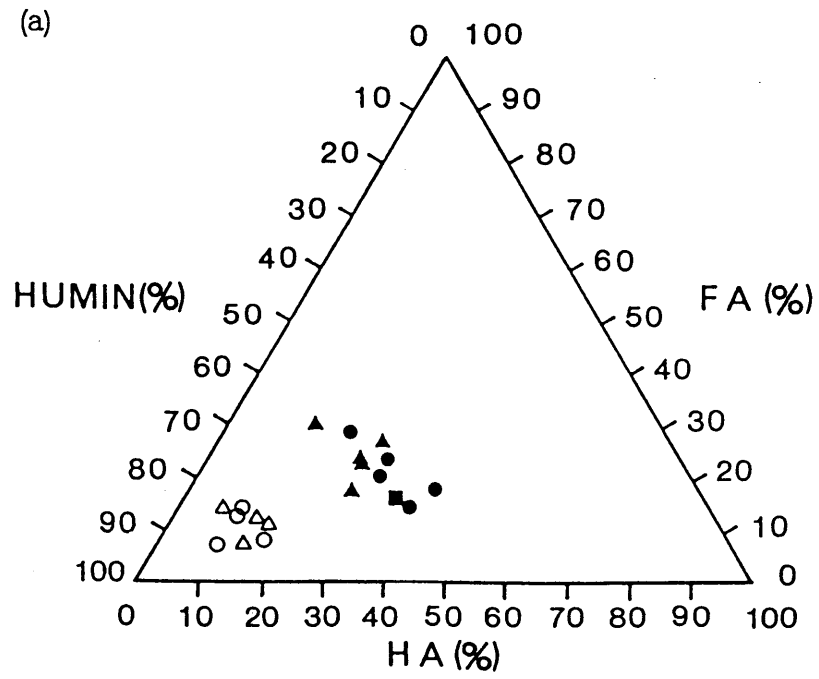


図2-2 各種土壌の(a)腐植組成と(b)各腐植画分への窒素分配
 ▲：褐色森林土、●：黒ボク土（草地）、■：黒ボク土（水田）、
 ○：低地水田土、△：赤黄色土

)の割合が高くなるのであろう。一方、フルボ酸の場合には、その絶対量は先に述べたように施用既肥量の多い区すなわち全炭素量の多い区ほど高かった(図2-1参照)が、相対含量は腐植酸のように増大する傾向は認められなかった。これは、フルボ酸の方が微生物等による分解が速いためであると推察した。黒ボク土における腐植の集積には、アロフェンよりもむしろA1の影響が強いとされており、腐植酸が安定に集積されることはよく知られている。起源が新しく腐植含量が低い大野原黒ボク土(1914年の桜島の噴火による降灰に由来する)の腐植組成も、他の黒ボク土と同様遊離型腐植の割合が高く、腐植の集積機構が鉱質土壌とは初期の段階から異なることを示唆した。

Watanabe・Kuwatsuka(1990)は、別に埋没泥炭土の腐植組成についても同じ方法を用いて調べ、三角図において、泥炭土が、他の2つのグループとは離れた第3のグループとして分布することを明らかにした。その際、他の2グループとの差異は、フルボ酸の相対含量がきわめて低いことであつた。フルボ酸の含有率が低いことに対しては、埋没後糖質の多くが既に分解されていたこと(筒木ら1989)、還元的条件下にあるためアルコール性水酸基やアルデヒド基のカルボキシル基への酸化が起こりにくかったこと、さらにはフルボ酸が水溶性で溶脱しやすいことなどに起因するものと推察した。また、腐植組成に関しては、年代経過に伴ってヒューミンが増加し、腐植酸が減少する傾向が認められ、埋没土壌中で還元条件下に長期間おかれるうちに腐植酸の一部が徐々にヒューミンへと変化することが推察された。

要約

各種土壌型の土壌19種を用いて、フルボ酸の含有量、腐植組成(各腐植画分への炭素分配)および各腐植画分への窒素分配と土壌の種類との関係について調べた。

- (1)フルボ酸炭素量は、全炭素量の高い土壌ほど高く、両者の間には高い正の相関関係が認められた。
- (2)フルボ酸の全有機物に対する相対含量は、総体的に、褐色森林土>黒ボク土>低地水田土(灰色および褐色低地土)および赤黄色土の傾向が認められた。

- (3)腐植組成は、ヒューミン画分の含有率の差によって、(a)褐色森林土および黒ボク土、(b)低地水田土および赤黄色土の2つのグループに明確に分かれた (a)<(b)。
- (4)各腐植画分への窒素分配も同様に褐色森林土および黒ボク土と、低地水田土壌および赤黄色土とで明確に異なっていた。

1. はじめに

本章と第4章では、混合物であるフルボ酸を分画することにより、その化学構造について研究した。

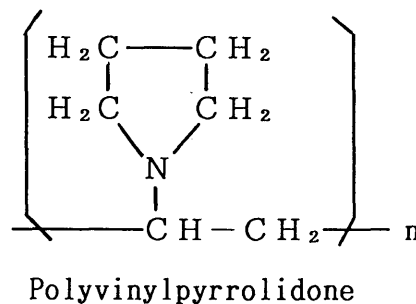
腐植酸がその研究の初期において、特定の構造をもつ単一の化合物であると考えられていたのに対し、フルボ酸は、当初から一定の条件を満たす様々な物質の総称として捉えられてきた (Oden 1919)。Forsyth (1947) は、活性炭を用いてフルボ酸を分画し、その主成分がポリフェノールや多糖類であることを巧みに表わした。以来、フルボ酸の吸着性に基づく分画は、活性炭の他、アルミナ (Kononovaら 1958) やセルロース (Sowden・Deuel 1961) 等を用いて行なわれてきたが、いずれも一般的に用いられるには至らなかった。

現在では、腐植から純粋な同定しうる化合物を分離しようとする試みは無駄である (Swift 1985)、という考え方が一般的である。しかしながら、多種多様な物質から成るフルボ酸をそのまま研究に供試しても、得られる情報は複雑かつ拡散されたものであり、より構造の近い物質群を得ることを目的としたフルボ酸の分画は、その構造や機能に関する研究上必要であると考えられる。本研究では、フルボ酸中に腐植物質と非腐植物質が混在している点に着目し、吸着樹脂を用いてそれらの分離を試みた。分離用吸着樹脂については、近年、各種の樹脂の開発が進み、フルボ酸中の腐植物質と非腐植物質の分離に適した担体として Polyvinylpyrrolidone (PVP) や XAD-8 (井藤 1985) が広く用いられるようになってきている。ここでは PVP を使用した。

本章では、まず、フルボ酸の PVP に吸着する画分と吸着しない画分 (通過画分) への分配割合が土壌の種類によってどう変化するかを調べた。その後、各画分について可視・紫外線吸収スペクトルおよびイオン化示差スペクトルを測定し、吸光特性より各画分間あるいは各土壌間におけるフルボ酸の構造の差異について検討した。

2. 吸着樹脂PVPによるフルボ酸の分画

PVPのうち不溶性の“Polyclar AT”（下図参照）は、担体として水溶媒中でのフラボノイドやフェノールの分離に用いられてきた（Clifford 1974）。その吸着機構については、Anderson・Sowers（1968）によって、芳香環についた水酸基あるいはカルボキシル基との水素結合であることが明らかにされている。フルボ酸中の腐植物質は、フェノールカルボン酸を中心としたポリマーであると考えられており、PVPの吸着特性は、これらの腐植物質と他の脂肪族系の化合物（非腐植物質）との分離に適していると考えられる。Swincerら（1968）は、土壤糖の研究において着色物質の除去に、Goh（1970）やKumada（1985a）は反対にフルボ酸画分中の腐植物質の分離、すなわち、糖、ペプチド等の非腐植物質および無機分の除去に、それぞれPVPを利用している。また、PVPに吸着する物質、吸着しない物質の両方を回収した研究例としては、Lowe（1975）やSaiz-Jimenez・de Leeuw（1984）の報告等がある。



試料および方法

試料には、第2章で調製した19種の土壤のフルボ酸を用いた。PVPによる分画は、以下の方法で行なった。

PVP（五協産業株式会社製“Polyclar AT”）は、水に懸濁して静置し、上澄をデカンテーションによって除去する操作を浮遊物がなくなるまで繰り返した後、カラムにつめた。次に、0.5N H₂SO₄、水、0.5N NaOH、水の順で各3カラム容量を流す操作を3回繰り返すことによって混雑物を取り除き、その後、pH1.0のH₂SO₄を3カラム容量流した。

以上の操作の終わったカラムにpH1.0のフルボ酸溶液を通し、吸着する物質（PVP吸着画分）と吸着しない物質（PVP通過画分）とに分画した。カラムは、pH1.0の H_2SO_4 を3カラム容量流すことによって洗浄し、洗浄液は通過画分に合わせた。吸着画分は、0.1N NaOH溶液によって脱着した。なお、カラム容積は予備実験を行なって充分量を求め、フルボ酸溶液250mlに対し40mlとした。

フルボ酸のPVP吸着・通過両画分への分配割合は、重クロム酸カリ―硫酸による比色法で求めた両画分の有機炭素含量より算出した。

結果および考察

各フルボ酸のPVP吸着・通過両画分への分配割合と回収率を図3-1に示した。回収率は、最も低い名大農場既肥連用50t/ha区で91.3%、平均で99.1%であった。100%を越える値がいくつかあったため測定法による誤差を考慮する必要があるにしても、非常に高い値が得られたといえる。Malcolmら（1988）や米林（1988）は、PVPが吸着物質の一部と不可逆的吸着を起こすことを指摘しており、本研究においてもアルカリによる脱着後に、樹脂に若干着色が認められた。しかしながら、それらは見た目に比べ、炭素量としてはきわめて微量であり、問題はないと判断した。

PVP吸着画分とPVP通過画分への分配割合は、フルボ酸の由来する土壌の種類と大きく関係していた。すなわち、吸着画分の割合は、褐色森林土由来のフルボ酸で1点（閩荊）を除いて50%以上と最も高く（平均51.8%）、黒ボク土のフルボ酸（平均44.1%）、低地水田土および赤黄色土由来のフルボ酸（平均29.3%）の順に低くなった。

低地水田土のフルボ酸でPVP吸着画分の割合が低かったのに対し、黒ボク水田土（茨城）のフルボ酸は、草地黒ボク土と同様高い値を示した（42.7%）。したがって、同土壌のフルボ酸中の腐植物質は、水田化以前から既に集積していたか、あるいは既に集積していた腐植酸もしくはヒューミンからフルボ酸に移行してきたと推察した。

また、名大付属農場の既肥連用100t/ha区のPVP吸着画分の割合は、既肥

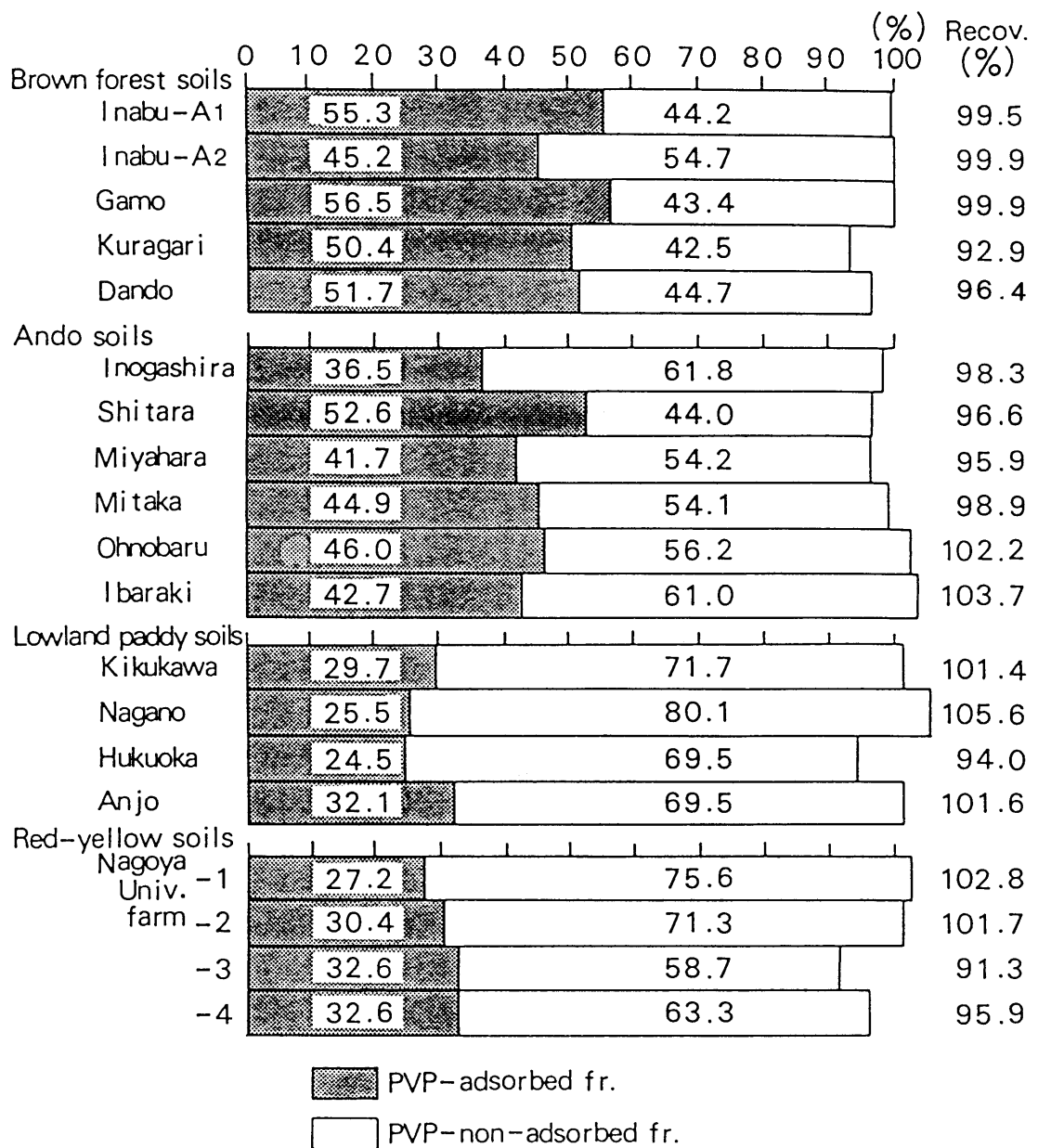


図3-1 フルボ酸のPVP吸着画分・PVP通過画分への分配割合および回収率

Nagoya Univ. farm-1: 厩肥無施用区、2: 厩肥連用20t/ha区、3: 厩肥連用50t/ha区、4: 厩肥連用100t/ha区

無施用区に比べて約5%高かった。このことから、有機物の施用は、フルボ酸の絶対量と共にフルボ酸中の腐植物質の割合も増加させることが推察されたが、それは、他の種類の土壌との差に比べれば小さいものであるといえる。

3. 可視・紫外線吸収スペクトル

腐植酸の可視・紫外線吸収スペクトルは、長波長側から短波長側に向かって単調増加し、波長を横軸、吸光係数値を縦軸にとると直線的な形となる。そのため、腐植酸の研究においては、古くから吸収スペクトルの傾き（色調係数、 $\Delta \log K$ あるいは E_4/E_6 ）が相対色度（RFあるいは E_{600} ）とともに腐植化度の指標として用いられてきた（Chen 1977）。Kumadaら（1967）は、RF（単位炭素濃度あたりの600nmの吸光度）と $\Delta \log K$ （ $\log K_{400} - \log K_{600}$ ）を用いた腐植酸の分類法を開発し、Kuwatsukaら（1978）やTsutsuki・Kuwatsuka（1978a）は、元素組成や官能基組成をはじめとする多くの化学的性質からこの分類が妥当であることを証明した。ここでは、分画によるフルボ酸の可視・紫外線吸収スペクトルの形状あるいは傾きの変化と、それらが土壌によってどう違うかについて調べた。

試料および方法

試料には、第2章で用いた19の土壌のフルボ酸、腐植酸および前節で調製したフルボ酸のPVP吸着画分、通過画分を用いた。

可視・紫外線吸収スペクトルは、試料溶液のpHを12.0に調整した後、230-700nmの範囲で測定した。試料溶液の炭素含量は、重クロム酸カリ・硫酸による比色法で測定した。

結果および考察

図3-2に可視・紫外線吸収スペクトルの代表的な例を示した。PVP吸着画分のスペクトルは未分画フルボ酸のスペクトルと同様、いずれも長波長側から短波長側にむかって指数関数的に吸光度が増大するのみであった。PVP通過画分のスペクトルも265nm付近に肩状吸収が認められた以外は、特徴的なピークは存在しなかった。

表3-1には各スペクトルの傾きの指標である $\Delta \log K$ と、単位炭素濃度あたりの280nmの吸光度（ E_{280} ）の例を示した。PVP吸着画分の E_{280} は、未分画

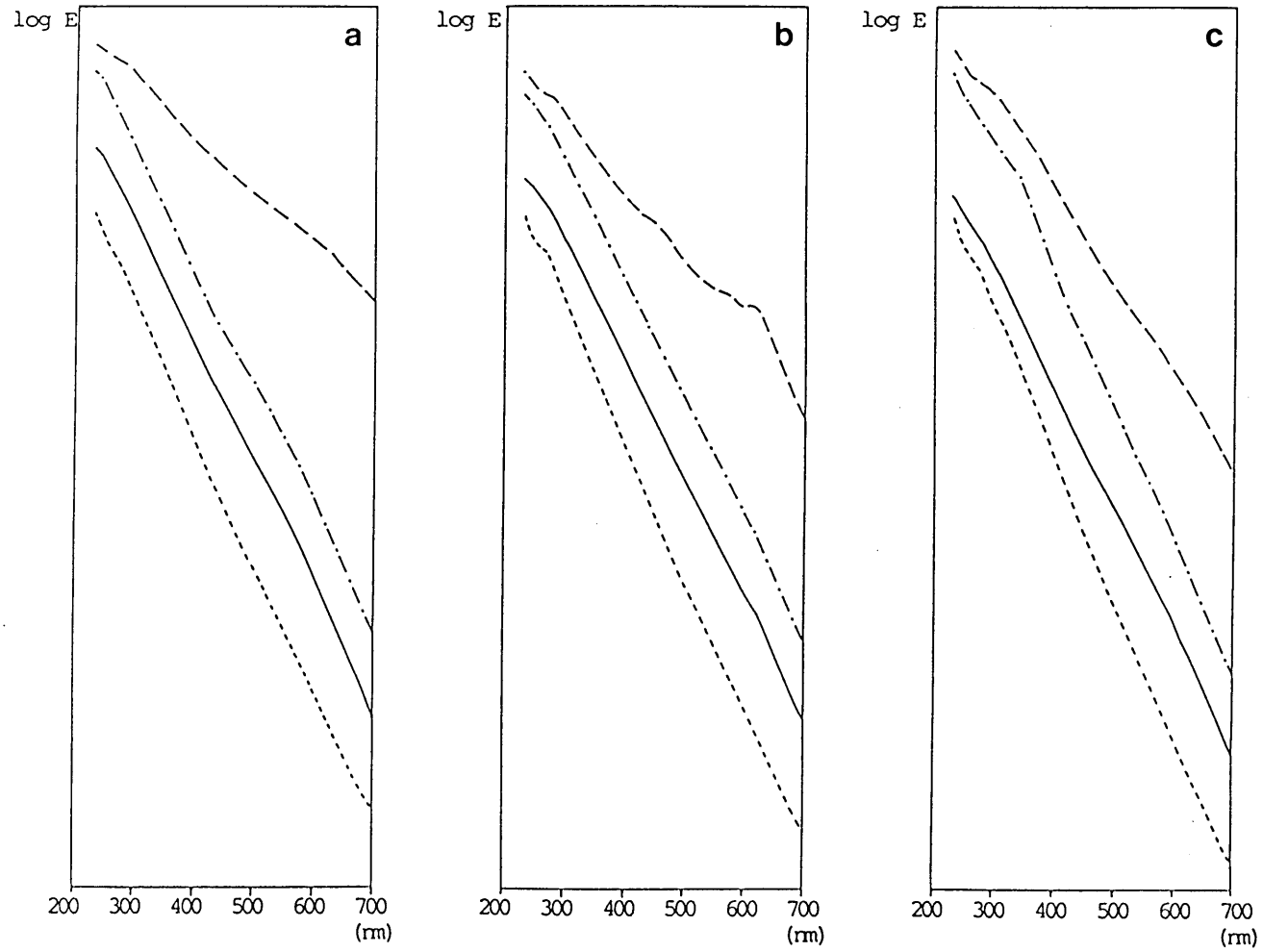


図3-2 未分画フルボ酸、PVP吸着画分、PVP通過画分および腐植酸の可視・紫外線吸収スペクトル
 ——未分画フルボ酸、---PVP吸着画分、.....PVP通過画分、—腐植酸
 a: 猪之頭 (黒ボク土)、b: 段戸 (褐色森林土)、c: 長野 (低地水田土)

表 3 - 1 未分画フルボ酸およびPVP吸着画分、PVP通過画分の吸光特性

		$\Delta \log K$	E_{280}^*
未分画フルボ酸	段戸 (褐色森林土)	1.175	38.4
	猪之頭 (黒ボク土)	1.160	29.8
	長野 (低地水田土)	1.194	19.5
PVP吸着画分	段戸	1.176	47.6
	猪之頭	1.128	52.4
	長野	1.172	57.9
PVP通過画分	段戸	1.353	7.33
	猪之頭	1.300	5.60
	長野	1.448	5.91

* $E_{280} = OD_{280} / 1 \text{ mgC}$

フルボ酸と比較していずれも1.5-3倍高く、反対に、PVP通過画分の E_{280} は未分画フルボ酸の1/3-1/6であった。このことは、芳香族物質が分画によってPVP吸着画分に濃縮され、PVP通過画分ではそれらの存在割合がきわめて低いことを示している。

PVP吸着画分と未分画フルボ酸の $\Delta \log K$ には差はなかった。さらに、これらの値は、いずれの種類 of 土壌においても類似しており、フルボ酸では腐植酸と異なり土壌の違いによる吸収スペクトルの違いは存在しないことが明らかになった。

図3-2には、腐植酸のスペクトルも合わせて図示した。腐植酸のスペクトルでは、A型（猪之頭）とRp型（長野）でその傾きに明確な差が認められたほか、段戸腐植酸のようなP型腐植酸（段戸はP₊₊型）では615、570および450 nm付近にPgによる肩状吸収が存在した。一方、フルボ酸では、段戸土壌を含め、本研究で用いたいずれの土壌のいずれの画分にもPgに由来する吸収は認められなかった。ポドゾルのBh層および褐色森林土の埋没腐植集積層から分離したフルボ酸の吸収スペクトルにPgによる吸収が認められたという報告もあるが（Schnitzer・Skinner 1968；Kumada 1985a）、一般的には、フルボ酸にPgが含まれていたとしても、その量は同じ土壌の腐植酸に比べればごく微量であると推定される。

4. イオン化示差スペクトル

アルカリ性溶液と中性溶液の差スペクトルは、主にフェノール性水酸基の解離に基づいている。中性溶液においてプロトンと結合したフェノール性水酸基が、pHの上昇に伴って解離すると、 π 電子の広がりが大きくなり、吸収帯が長波長側へ深色移動する。この深色効果は、共役系の長いものほど、長波長域にまで広がって現れる。これらの結果は、アルカリ性—中性差スペクトルにピークとして現われる。一方、中性溶液と酸性溶液の差スペクトルには、弱酸性で解離するフェノール性水酸基のほか、カルボキシル基の解離も影響する。タンパク質のUVスペクトルがpHによって変化することは、以前から知られており、Scheraga (1957) およびDonovanら (1958) は、カルボキシル基の解離に伴うカルボキシル基とチロシル残基との分子内水素結合の解除に基づくものと推定しているが、水素結合の分裂を含め、種々の構造変化がスペクトルの変化に寄与していると考えられる。

腐植酸のイオン化示差スペクトルに関してはTsutsuki・Kuwatsuka (1979d) の報告がある。また、Kumada (1985b) は、イオン化示差スペクトルが腐植物質の吸収スペクトルの発現機構を説明する有力な手法のひとつであると述べている。

試料および方法

前節と同じ試料を用いた。

炭素含量0.5mg相当の試料を3つのビーカーにとり、濃度の違う数種の H_2SO_4 およびNaOH溶液を用いて、それぞれpHを、3.0、7.0、12.0に調整した。試料溶液を25ml容メスフラスコに移し、同様に調整した同じpHの水溶液によって定容後、pH12.0—pH7.0 (ΔE_{7-12}) スペクトルおよびpH7.0—pH3.0 (ΔE_{3-7}) スペクトルを測定した。ただし、腐植酸については ΔE_{7-12} スペクトルのみを測定した。

結果

(1) ΔE_{7-12} スペクトル

アルカリ性—中性差スペクトルについては、リグニンの分野でよく研究されており、300nmに現れる吸収極大は飽和もしくは核と非共役の側鎖をもつフェノールに、300-400nmに現れる吸収帯は側鎖に共役カルボニルまたは共役二重結合をもつフェノール、あるいは遊離のフェノール性水酸基をもつビフェニル構造単位やスチルベン構造単位に、250nmに現れるピークはそのいずれかにそれぞれ帰属されている（寺島 1982）。

フルボ酸 P V P 吸着画分の ΔE_{7-12} スペクトルを図3-3に示した。各土壌の P V P 吸着画分の ΔE_{7-12} スペクトルは、大きく3つの型に分かれた（以下 I 型 II 型、III 型とする）。図3-4には、各型の典型的な例を同一土壌より得られた未分画フルボ酸、P V P 通過画分および腐植酸のスペクトルと共に示した。

260、280および330-360nmに吸収極大があるほか、470-490nmにブロードな吸収帯が認められるスペクトルを I 型とした。黒ボク土より分離したフルボ酸の P V P 吸着画分 5点（草地土壌4、水田土壌1）がこの型のスペクトルを示した。

330、360 および400nm付近に極大または肩をもつ紫外部から可視部にかけての大きな吸収帯のほか、250nm に吸収極大（あるいは肩状吸収）の認められるスペクトルを II 型とした。褐色森林土より分離したフルボ酸の P V P 吸着画分 5点がこの型のスペクトルを示した。

250nmおよび350nm付近に吸収極大、300nmに弱い肩状吸収の認められるスペクトルを III 型とした。低地水田土4点、赤黄色土4点および草地黒ボク土1点（大野原）より分離したフルボ酸の P V P 吸着画分9点がこの型のスペクトルを示した。

以上のように P V P 吸着画分の ΔE_{7-12} スペクトルの分類は、その由来する土壌の種類と明らかに対応していた。唯一の例外である大野原の黒ボク土は、1914年の桜島噴火による降灰後にできたもので、黒ボク土としては非常に若く、腐植が未発達であるため、他の黒ボク土よりも、赤黄色土などのフルボ酸に構造が似ているのであろう。

腐植酸の ΔE_{7-12} スペクトルもまた、各型（A、B、P および R p 型）でそれぞれ類似しており、同一土壌由来のフルボ酸（P V P 吸着画分）と腐植酸との

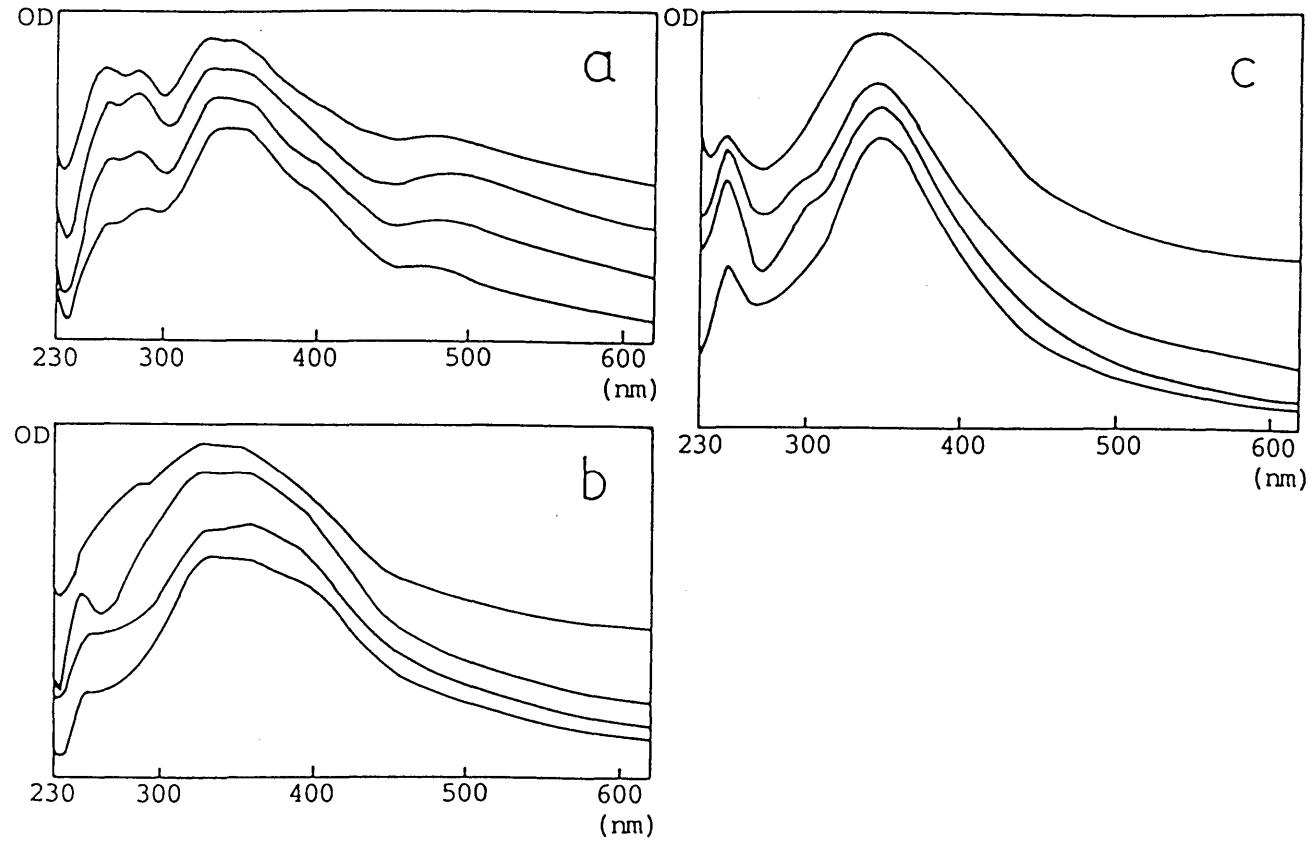


図3-4 フルボ酸PVP吸着画分のpH12-7差スペクトル
a: I型、b: II型、c: III型

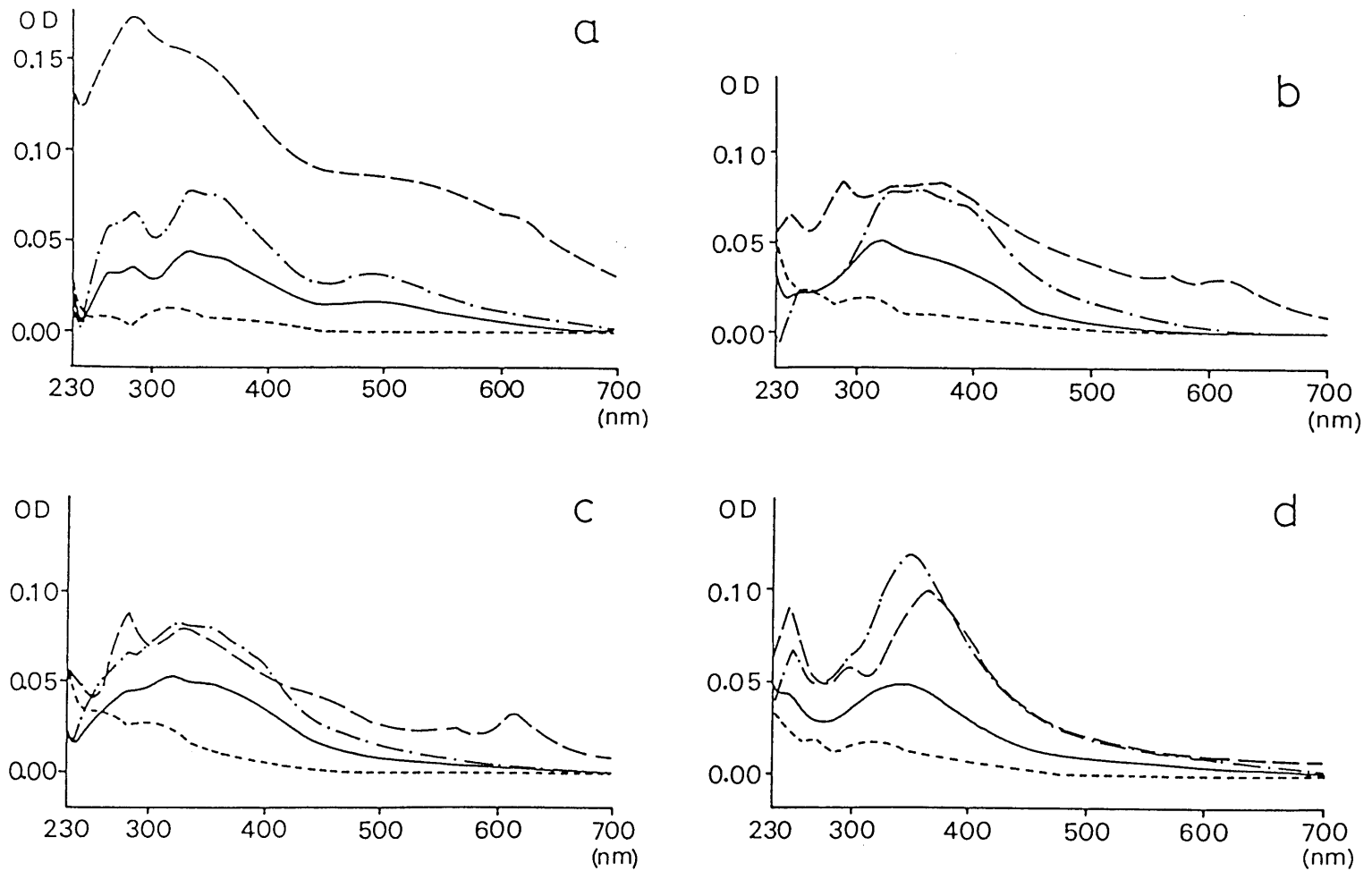


図3-5 未分面フルボ酸、PVP吸着面分、PVP通過面分および腐植酸のpH12-7差スペクトル
 ——未分面フルボ酸、- · - PVP吸着面分、·····PVP通過面分、---腐植酸
 a : 三鷹 (黒ボク土)、b : 関荊 (褐色森林土)、c : 稲武A₁ (褐色森林土)、d : 長野 (低地水田土)

間には、I型とA型、II型とB型あるいはP型、III型とRp型、という対応関係が成立し、両者のスペクトルも総体的に類似していた。しかし、A型腐植酸のスペクトルは、可視部吸収帯の700nm付近までの広がり、Pg吸収の存在、さらには全体的な吸収の強さにおいてフルボ酸PVP吸着画分のI型のスペクトルと異なっており、フェノール化合物の種類や量、共役系の発達等に差があることが推定された。両腐植画分のスペクトルの差は、I型とA型の間で最も大きく、II型とB型、II型とP型、III型とRp型、の順で小さくなった。フルボ酸のIII型のスペクトルとRp型腐植酸のスペクトルの間では、吸収強度には差はなかったが、両者の構造の違いは吸収極大が腐植酸では360nm、フルボ酸では350nmに認められたこと、250nmと300nmの吸収が腐植酸でより強かったことから推定された。

PVP吸着画分の ΔE_{7-12} スペクトルが、3つの型に分かれたのに対し、PVP通過画分の ΔE_{7-12} スペクトルは、全土壌間で明確な差異はなく、いずれも270nm付近および300nm付近に、共役系をもたないフェノール性化合物によると推察される弱くブロードな吸収帯が認められるのみであった。

(2) ΔE_{3-7} スペクトル

図3-5にPVP吸着画分の ΔE_{3-7} スペクトルを示した。各土壌のフルボ酸PVP吸着画分の ΔE_{3-7} スペクトルは、同画分の ΔE_{7-12} スペクトルと同様、3つの型に大別された。①大野原土壌を除く黒ボク土5点、②褐色森林土5点、③鉱質水田土、赤黄色土および大野原黒ボク土の9点より分離したフルボ酸のPVP吸着画分は、それぞれ類似したスペクトルを示した。これらを ΔE_{7-12} スペクトルと同じようにI型、II型、III型とした。図3-6には、各型のスペクトルの典型的な例を、同一土壌の未分画フルボ酸およびPVP通過画分のスペクトルと共に示した。

PVP吸着画分のいずれの型の ΔE_{3-7} スペクトルも235、280、315、および380nmに吸収極大あるいは肩が認められた。しかしながら、I型のスペクトルでは、315nmの吸収強度に対する285nmの吸収強度が相対的に強く、一方、III型のスペクトルでは、235nmの吸収強度が最も強かった。また、I型のスペクトル

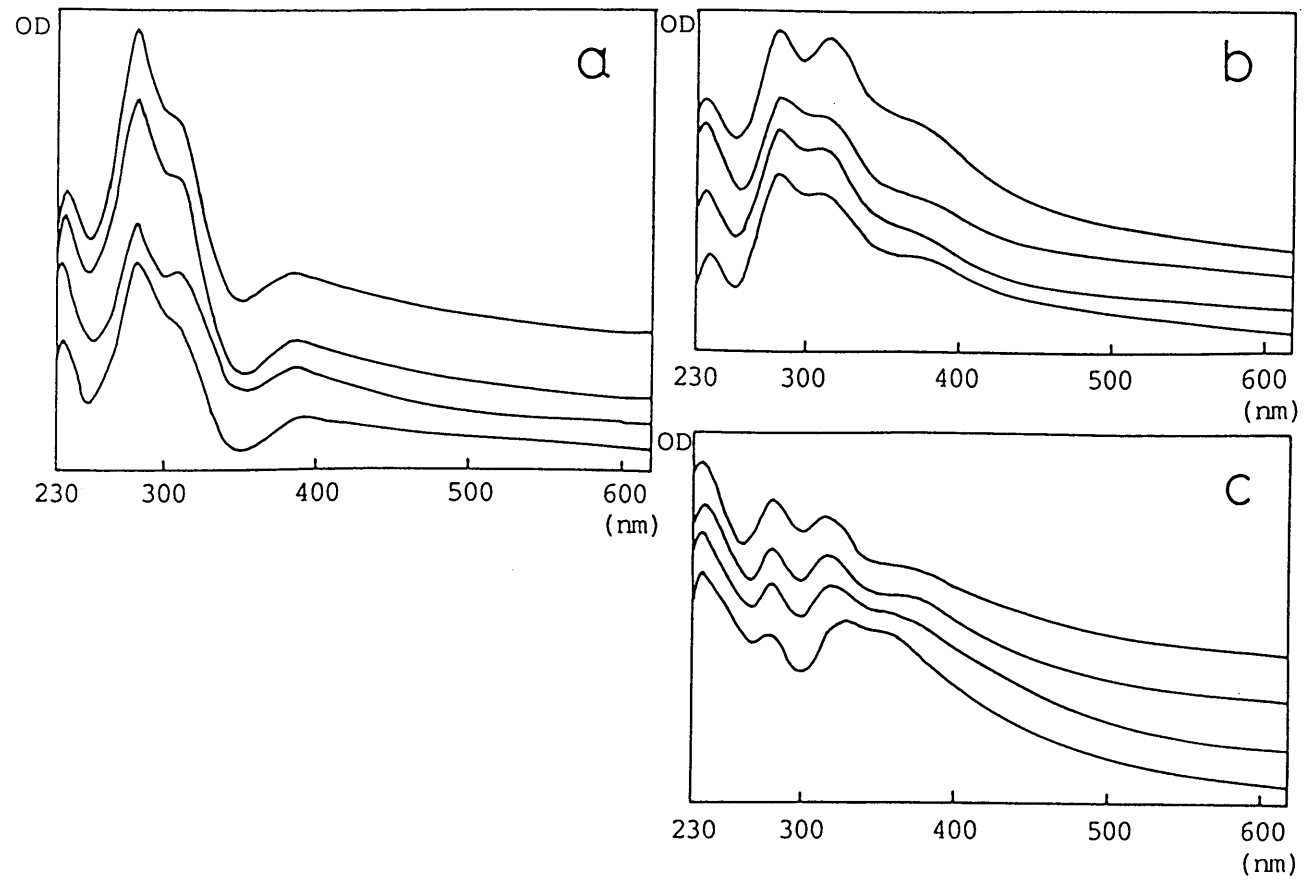


図3-6 フルボ酸PVP吸着面分のpH7-3差スペクトル
a: I型、b: II型、c: III型

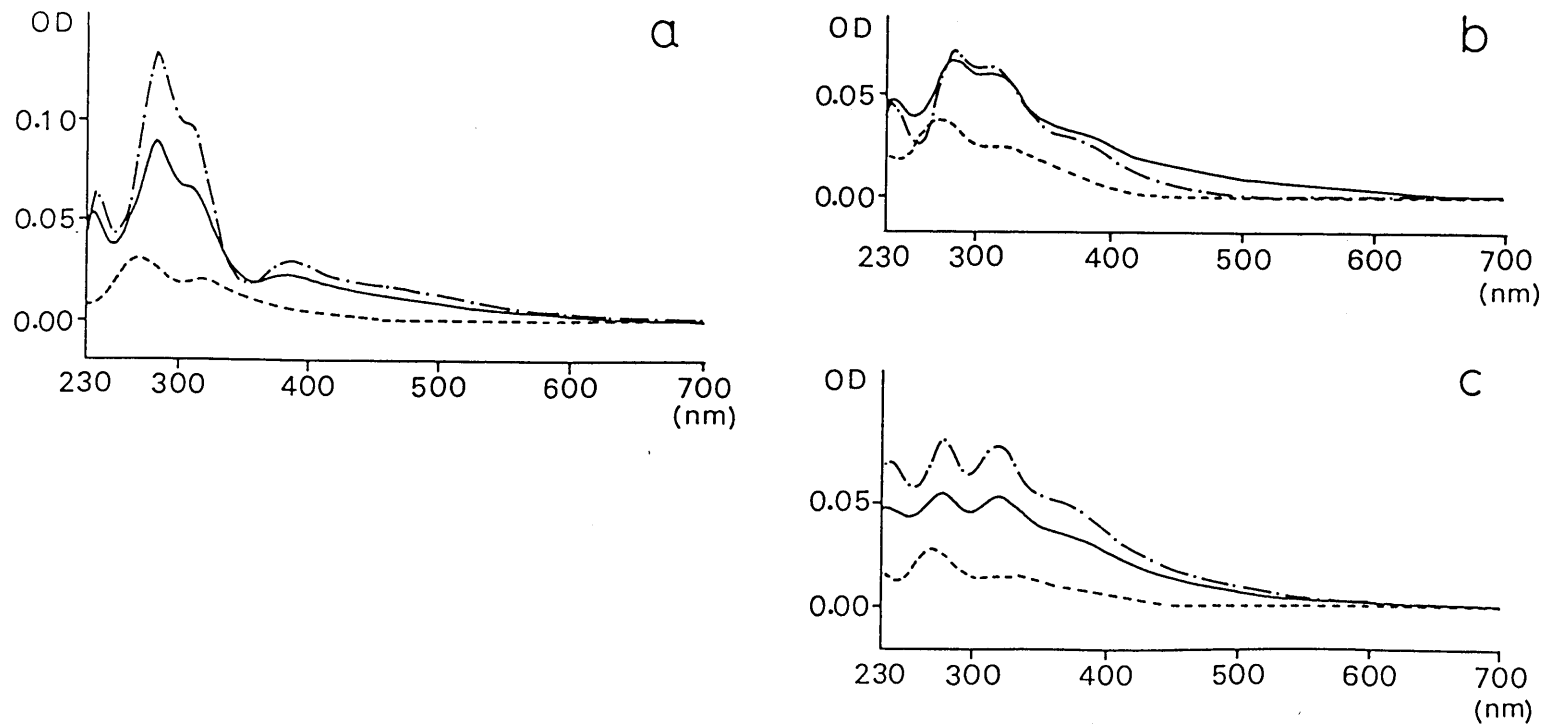


図3-7 未分画フルボ酸およびPVP吸着画分、PVP通過画分のpH7-3差スペクトル
 ——未分画フルボ酸、---PVP吸着画分、.....PVP通過画分
 a: 三鷹(黒ボク土)、b: 稲武A₁(褐色森林土)、c: 長野(低地水田土)

ルでは350nm付近に極小が認められたが、Ⅱ型とⅢ型では認められなかった。

PVP通過画分の ΔE_{3-7} スペクトルは、土壌間で明確な差はなく、いずれも260nm付近に吸収極大、320-330nmに弱くブロードな吸収帯が認められた。

考察

フルボ酸PVP吸着画分のⅡ型の ΔE_{7-12} スペクトルをⅢ型の ΔE_{7-12} スペクトルと比較すると、330-360nmに極大をもつ吸収帯はⅢ型よりも長波長側に広がっており、また、250nmの吸収はⅢ型より弱い傾向が認められた。これらのことから、Ⅱ型のスペクトルを示すフルボ酸は、Ⅲ型のスペクトルを示すフルボ酸よりも共役系が発達しており、構造がより複雑であることが推察された。大野原土壌のPVP吸着画分の ΔE_{7-12} スペクトルは、他のⅢ型スペクトルよりも400nm付近の吸収が強く、Ⅱ型とⅢ型の間的なタイプといえた。したがって、試料数を増やすことにより、両型は連続的に遷移する可能性があると考えられた。

I型の ΔE_{7-12} スペクトルに認められた260、280および480nm付近のピークは、Ⅱ型で280nmに肩をもつものもあったが、それ以外は他の型のスペクトルには認められず、I型のスペクトルを示すフルボ酸の化学構造と他のフルボ酸の化学構造との間に明確な差異があることを示唆した。特に、480nm付近の吸収極大は、構造中に縮合環が存在する可能性を示した。

PVP吸着画分のⅡ型のスペクトルには、280nm付近の肩状吸収が明確なものと不明確なものとの存在した。この肩状吸収がはっきりと認められたフルボ酸と同じ土壌から分離した腐植酸はいずれもP型で、280nmのピークは腐植酸の ΔE_{7-12} スペクトルにも認められた。しかしながら、腐植酸のスペクトルにみられたPgによる他の吸収帯(460、570、615nm)はPVP吸着画分のスペクトルには認められなかったため、280nmの吸収がPgに起因するものか否かは不明であった。フルボ酸のI型のスペクトルやA型あるいはB型腐植酸のスペクトルにも280nmにピークが存在するため、Pg以外の物質に起因している可能性も十分考えられる。

各種土壌のフルボ酸が、 ΔE_{7-12} スペクトルおよび ΔE_{3-7} スペクトルによっ

て同じように分類されたことから、フルボ酸中の腐植物質は、各種の土壌に特徴的な化学構造をもつことが推察された。

また、フルボ酸のPVP吸着画分と腐植酸の ΔE_{7-12} スペクトルが類似していたことや、スペクトルに基づく分類が対応していたことから、フルボ酸中の腐植物質の生成や構造の変化が腐植酸の構造と密接に関係していることが推察された。

PVP通過画分では、 ΔE_{7-12} スペクトル、 ΔE_{3-7} スペクトルとも、土壌間でスペクトルの違いは認められなかった。この画分の ΔE_{7-12} スペクトルに認められた吸収帯は、その波長から、飽和した側鎖をもつフェノールによるものと推察された。したがって、スペクトルに差がないのは、長い共役系をもつ化学構造がほとんど含まれていないためと考えられる。また、通過画分の両イオン化示差スペクトルには、吸着画分のスペクトルと同じ波長にはピークは存在しなかった。このことは、PVPによる分画で、通過画分への腐植物質の混入が少なかったことを示している。

5. 低分子化合物のイオン化示差スペクトル

フルボ酸の吸収がpHによって異なる点に着目したアルカリ性-中性差スペクトル (ΔE_{7-12} スペクトル) および中性-酸性差スペクトル (ΔE_{3-7} スペクトル) には、可視・紫外線吸収スペクトルよりも多くのピークや肩状吸収が存在し、両スペクトルは土壌の種類と対応した3つの型に分類された。アルカリ性-中性差スペクトルは、リグニンの研究に以前から用いられており、吸収帯の帰属も行なわれている。しかしながら、フルボ酸とリグニンとでは吸収帯が現れる波長は異なっており、また、中性-酸性差スペクトルについては、吸収帯の帰属は明らかにされていない。

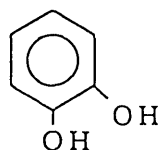
そこで、フルボ酸のイオン化示差スペクトルにみられる吸収帯に、どのような構造が関与しているかを推察するために、アミノ酸を含む低分子芳香族化合物24点のイオン化示差スペクトルの測定を行なった。特に、I型の ΔE_{7-12} スペクトルには、腐植酸のPg画分やA型腐植酸の差スペクトルと同様280nmにピークが存在し、480nm付近のブロードなピークと合わせて縮合環の存在が推察されたため、低分子の多環芳香族化合物、特にナフタレン系化合物のスペクトルから情報が得られることを期待した。

試料および方法

測定に供試した化合物およびその化学構造を以下に示す。

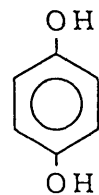
o-ヒドロキシ

ベンゼン



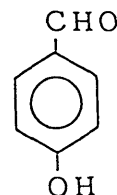
ハイドロ

キノン



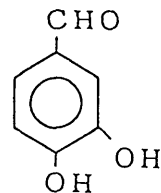
p-ヒドロキシ

ベンズアルデヒド



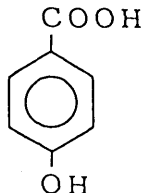
3,4-ヒドロキシ

ベンズアルデヒド



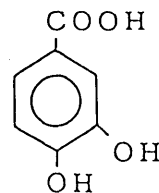
p-ヒドロキシ

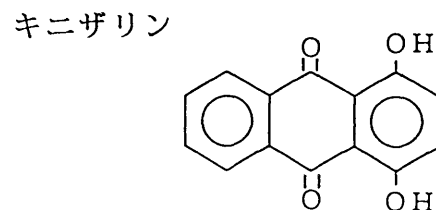
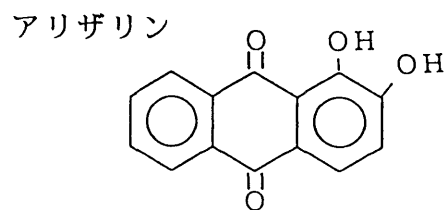
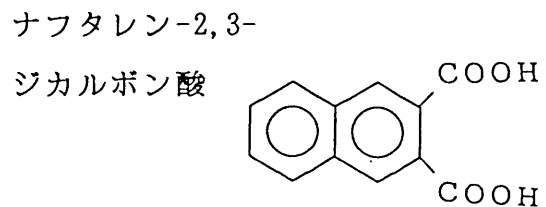
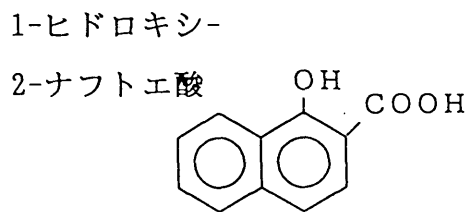
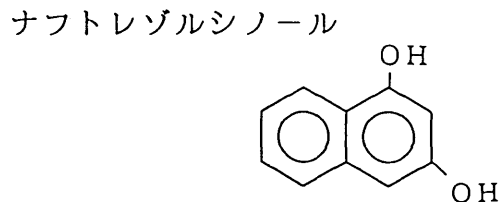
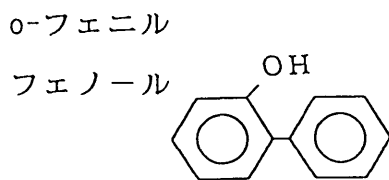
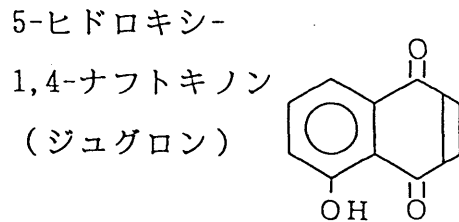
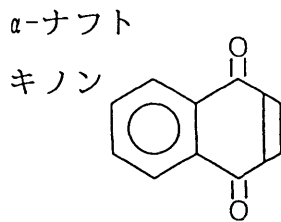
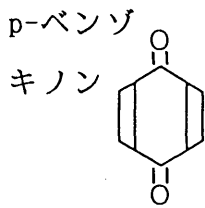
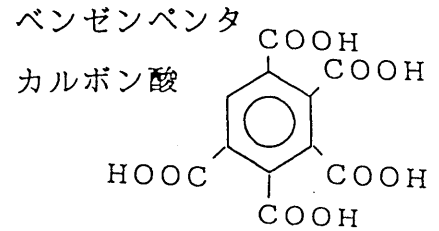
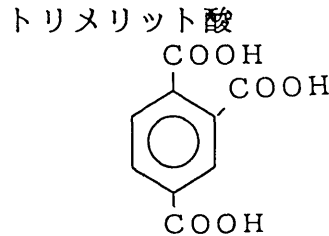
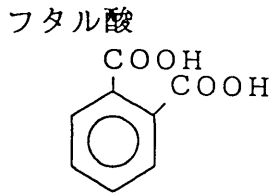
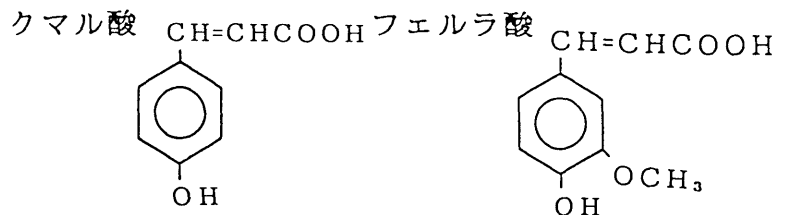
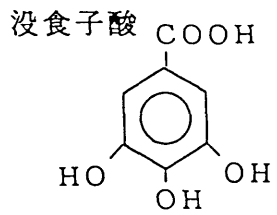
安息香酸



プロト

カテキユ酸





L-フェニルアラニン

L-チロシン

L-トリプトファン

供試化合物は、フルボ酸の酸化分解物として検出されているものを選んだ (Schnitzer・Khan 1972)。また、縮合環をもつ化合物は酸、アルカリ可溶性の芳香族化合物の中から選んだ。

各試料 (1-5mg) はまず、0.01N NaOHに溶かして可視・紫外線吸収スペクトルを測定し、得られたスペクトルから25mlに定容した際にスペクトルの最大吸収が約1.0となる量を算出した。算出した量の試料溶液を3つのビーカーにとり、それぞれに0.01N HCl、pH7.0の0.1Mリン酸緩衝液および0.01N NaOHを10mlずつ加え、さらにHCl溶液およびNaOH溶液を用いて試料溶液のpHを3.0、7.0および12.0に調整した。各溶液は25mlに定容し、pH12-7およびpH7-3の差スペクトル (230-700nm) を測定した。

結果および考察

(1) ΔE_{7-12} スペクトル

各化合物の ΔE_{7-12} スペクトルを図3-8に示した。また、スペクトルにおける極大の波長を表3-2にまとめた。なお、フタル酸、トリメリット酸、ベンゼンペンタカルボン酸およびナフタレン-2,3-ジカルボン酸の ΔE_{7-12} スペクトルには吸収帯は認められなかった。

α -ナフトキノン (図中11) とジユグロン (12) の ΔE_{7-12} スペクトルを比較すると、ジユグロンでみられた吸収帯のうち、235nmおよび360nmのピークは α -ナフトキノンでは認められなかったため、両ピークが水酸基の解離に基づくものであることが推定された。また、フェノール、フェノールカルボン酸およびフェノールアルデヒドの ΔE_{7-12} スペクトルを比較すると、ピークは水酸基の *p*-位の置換基がカルボキシル基 (6) < アルデヒド基 (4) < 水酸基 (2) の順で長波長側に認められた。このことから、Rp型腐植酸やリグニンのスペクトル (Tsutsuki・Kuwatsuka 1979d) で360nm付近にみられるピークが、フルボ酸のⅢ型スペクトルで350nm付近にみられたのは、フルボ酸中のフェノール構造が、側鎖としてアルデヒド基よりもカルボキシル基を多く含んでいるためと推察した。

450nmより長波長域にピークがみられたのは、縮合環を持つ化合物のスペクトルのみであった。したがって、フルボ酸のⅠ型のスペクトルに認められた480nm付近の吸収帯は、縮合環の存在を示すものと推定した。なお、アントラキノン系の化合物、アリザリン (15) およびキニザリン (16) のスペクトルで

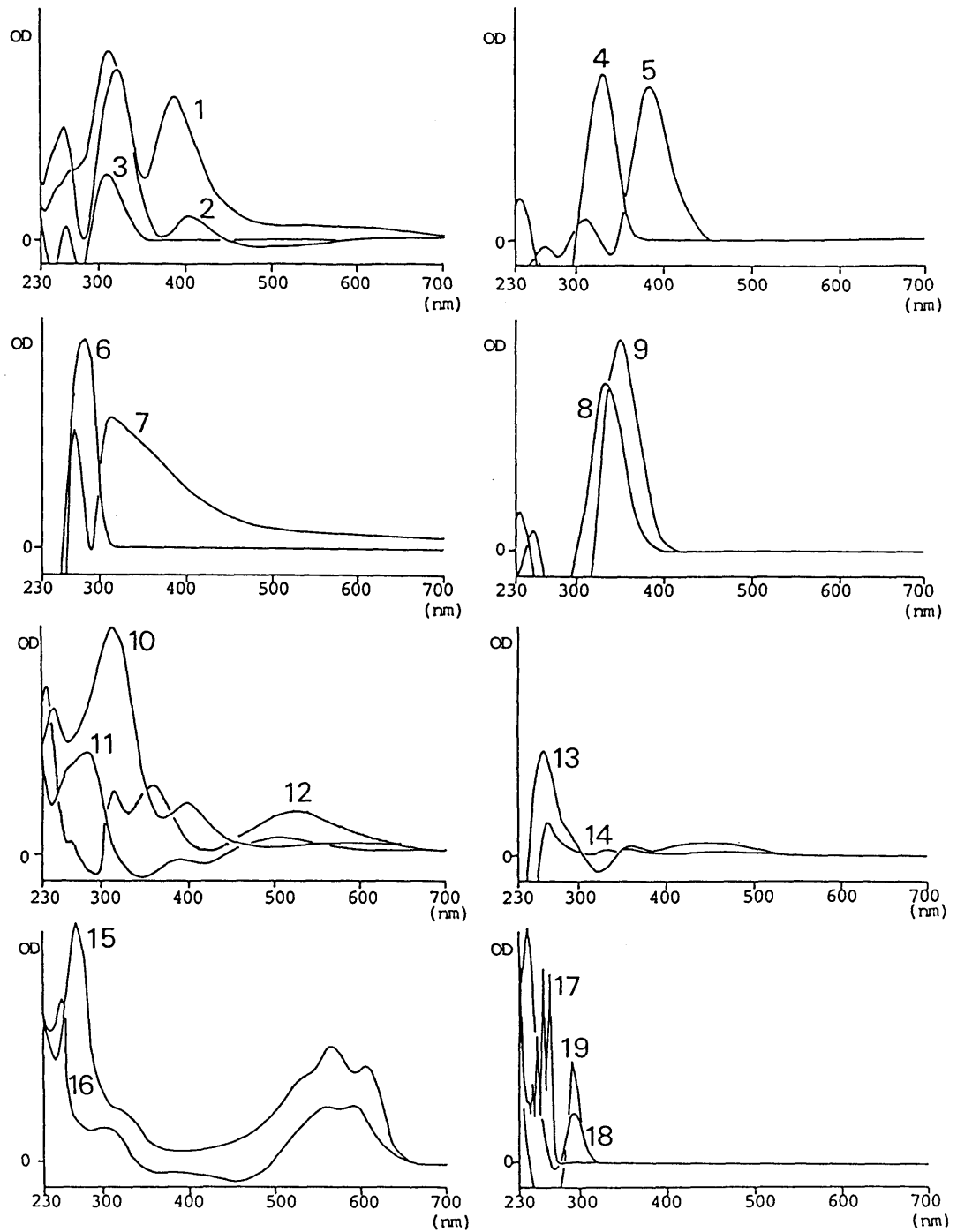


図3-8 低分子化合物のpH12-7差スペクトル

1 : o-ジヒドロキシベンゼン、2 : ハイドロキノン、3 : o-フェニルフェノール、4 : p-ヒドロキシベンズアルデヒド、5 : 3,4-ジヒドロキシベンズアルデヒド、6 : p-ヒドロキシ安息香酸、7 : プロトカテキユ酸、8 : クマル酸、9 : フェルラ酸、10 : ベンゾキノン、11 : α -ナフトキノン、12 : ジュグロン、13 : ナフトレゾルシノール、14 : 1-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸、15 : アリザリン、16 : キニザリン、17 : L-フェニルアラニン、18 : L-チロシン、19 : L-トリプトファン

表3-2 低分子芳香族化合物およびフルボ酸各画分の
pH12-7スペクトルにおける極大吸収波長

化合物名	極大吸収波長				
o-ジヒドロキシベンゼン	245	258	320	388	
ハイドロキノン	250(s)	266(s)	312	403	
p-ヒドロキシベンズアルデヒド	239	328			
3,4-ジヒドロキシベンズアルデヒド	263	310	383		
p-ヒドロキシ安息香酸	282				
プロトカテキユ酸	270	313			
没食子酸	290(s)	410	450(s)		
クマル酸	235	333			
フェルラ酸	250	303	347		
フタル酸	—				
トリメリット酸	—				
ベンゼンペンタカルボン酸	—				
ベンゾキノン	244	312	400		
α -ナフトキノン	260(s)	282	390	505(b)	
ジュグロン	236	266	310	360	525(b)
o-フェニルフェノール	—				
ナフトレゾルシノール	262	286(s)	356	450	
1-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸	263	360(b)			
ナフタレン-2,3-ジカルボン酸	—				
アリザリン	270	322(s)	530(s)	565	607
キニザリン	252	305	555	592	
L-フェニルアラニン	240	247	252	259	267
L-チロシン	239	292			
L-トリプトファン	273(-)	283	298		
フルボ酸PVP吸着画分(I型)	260	280	330	360	480(b)
同(II型)	250	280	330	360	400(s)
同(III型)	250	300(s)	350		
フルボ酸PVP通過画分	270(b)	300(b)			

*s=shoulder, b=broad, -=最大値が負

は500nm以長にもピークがみられたため、これらの誘導体がフルボ酸の分子構造中に含まれている可能性は否定された。 α -ナフトキノン、ナフトレゾルシノール (13)、L-トリプトファン (19) などの縮合環化合物のスペクトルでは、同時に280nm付近にもピークが認められ、フルボ酸においても、480nm付近に吸収帯を示したのと同じ成分が280nmのピークに関与していることが推察された。ただし、p-ヒドロキシ安息香酸のスペクトルにもまた282nmにピークがみられたため、一部のII型スペクトルのように、280nmに吸収が存在しても450nm以長に吸収が認められない場合には、縮合環の存否は定かではない。

(2) ΔE_{3-7} スペクトル

各化合物の ΔE_{3-7} スペクトルを図3-9に示した。また、スペクトルにおける極大の波長を表3-3にまとめた。

フタル酸 (19)、トリメリット酸 (20)、ベンゼンペンタカルボン酸 (21) およびナフタレン-2,3-ジカルボン酸 (16) といった置換基にカルボキシル基しか持たない化合物の紫外部吸収は、いずれも負の値を示した。したがって、カルボキシル基の解離は ΔE_{3-7} スペクトルにむしろ負の影響を与えるものと推察した。

一方、複数の水酸基を持つ化合物 (1, 2, 5, 8, 14) およびキノン化合物 (11-13, 17, 18) は全域にわたって正の吸収を示した。複数の水酸基をもつ化合物が正の吸収を示したのは、水酸基のpKaが低く、pH7で既にその一部が解離しているためと推定された。p-ヒドロキシ安息香酸 (6)、プロトカテキュ酸 (7) および没食子酸 (8) の ΔE_{3-7} スペクトルを比較すると、没食子酸ではpHを7にすることにより、紫外部の吸収が全体的に増大し、その影響は可視部にまで広がっていた。これは、水酸基の一部が解離後、酸化重合が起こったためと推定した。

以上のことから、フルボ酸が ΔE_{3-7} スペクトルで正の吸収を示すのは、その分子中にキノンあるいは縮合環構造をもっているためかあるいは多数のフェノール性水酸基をもっているためと推察した。Schnitzer (1978) がフルボ酸の構造として提案したようなヒドロキシベンゼンカルボン酸が水素結合でつな

った構造では、酸性から中性にした際に、カルボキシル基の解離に伴って水素結合が切れ、かえって吸収は減少すると推察される。

ヒドロキシベンズアルデヒド (4,5) の ΔE_{3-7} スペクトルでは、250-300nmには吸収帯はみられず、300-350nmに強いピークが認められた。 ΔE_{7-12} スペクトルから、低地水田土のフルボ酸は同一土壌の腐植酸よりもアルデヒド基が少なく、カルボキシル基が多いことを推察したが、フルボ酸の ΔE_{3-7} スペクトルにおけるⅢ型からⅠ型への280nmと315nmの吸収強度の比率の変化は、さらなるアルデヒドの減少を示しているのかもしれない。

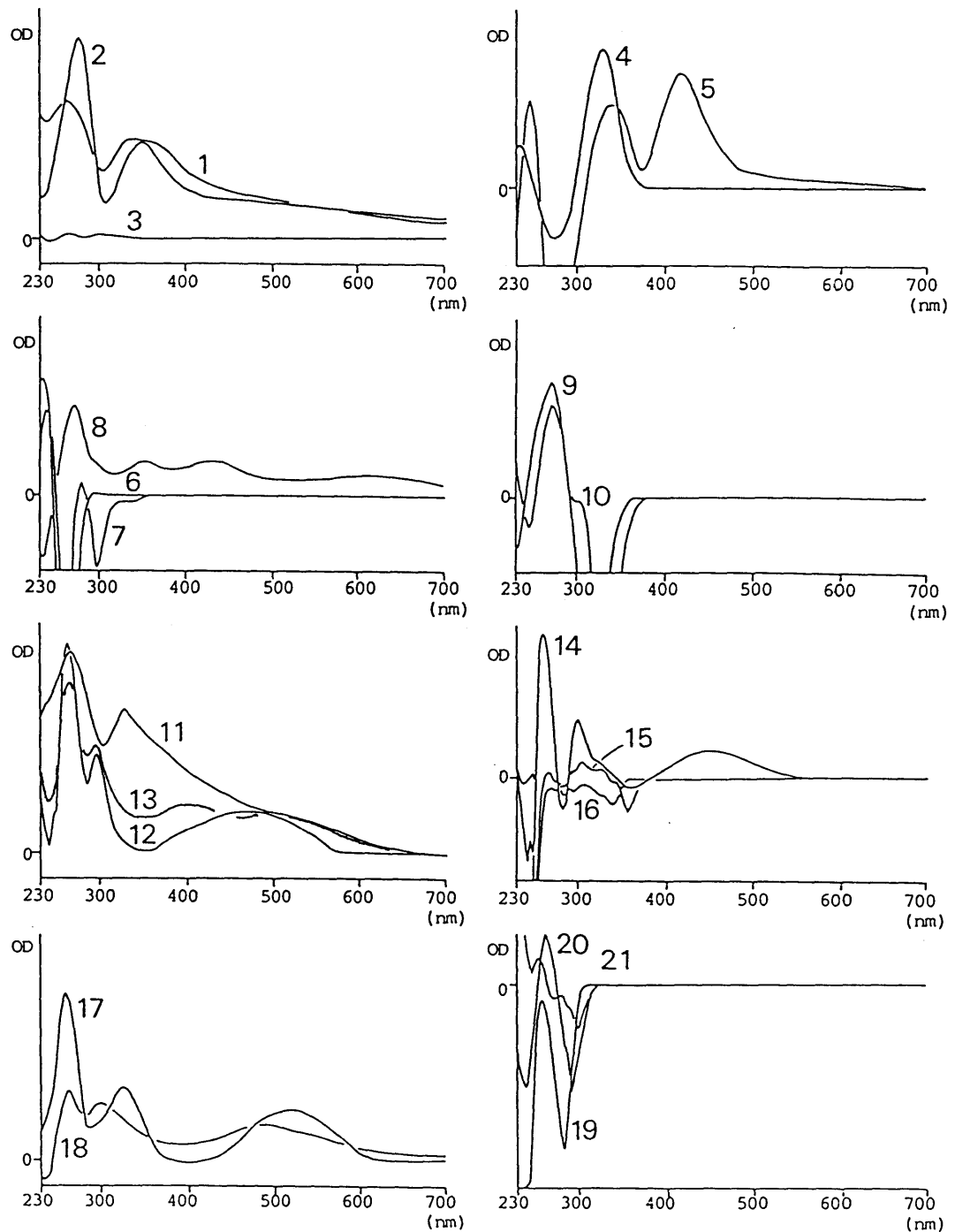


図3-9 低分子化合物のpH7-3差スペクトル

1 : o-ジヒドロキシベンゼン、2 : ハイドロキノン、3 : o-フェニルフェノール、4 : p-ヒドロキシベンズアルデヒド、5 : 3,4-ジヒドロキシベンズアルデヒド、6 : p-ヒドロキシ安息香酸、7 : プロトカテキュ酸、8 : 没食子酸、9 : クマル酸、10 : フェルラ酸、11 : ベンゾキノン、12 : α -ナフトキノン、13 : ジュグロン、14 : ナフトレゾルシノール、15 : 1-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸、16 : ナフタレン-2,3-ジカルボン酸、17 : アリザリン、18 : キニザリン、19 : フタル酸、20 : トリメリット酸、21 : ベンゼンペンタカルボン酸

表3-3 低分子芳香族化合物およびフルボ酸各画分の
pH7-3スペクトルにおける極大吸収波長

化合物名	極大吸収波長			
o-ジヒドロキシベンゼン	277	349		
ハイドロキノン	262	332-370		
p-ヒドロキシベンズアルデヒド	235	328		
3,4-ジヒドロキシベンズアルデヒド	246	338	417	
p-ヒドロキシ安息香酸	234	295		
プロトカテキュ酸	240	282	327(-)	
没食子酸	272	350	430(b)	620(b)
クマル酸	271			
フェルラ酸	272	300		
フタル酸	258(-)			
トリメリット酸	262	285(s-)		
ベンゼンペンタカルボン酸	256	282(-)	293(s-)	
ベンゾキノン	264	327		
α -ナフトキノン	261	295	465(b)	
ジュグロン	262	296	400(b)	485(b)
o-フェニルフェノール	263(b)	305(b)		
ナフトレゾルシノール	246(-)	259	298	325(s) 455(b)
1-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸	248	268(-)	280(-)	292(s) 303 328
ナフタレン-2,3-ジカルボン酸	266	280(s-)	290(-)	304(-) 330(s-)
アリザリン	260	325	520	
キニザリン	262	300	490	
L-フェニルアラニン	260(b)			
L-チロシン	245(b)	290(b)		
L-トリプトファン	283	290		
フルボ酸PVP吸着画分(I型)	235	280	315	380(b)
同(II型)	235	280	315	380(s)
同(III型)	235	280	315	380(s)
フルボ酸PVP通過画分	260	325(s)		

*s=shoulder, b=broad, -=最大値が負

6. 要約

各種土壌のフルボ酸を吸着樹脂Polyvinylpyrrolidone (PVP) を用いて2つの画分 (PVP吸着画分、PVP通過画分) に分画し、両画分への分配割合および両画分の吸光特性 (可視・紫外線吸収スペクトル、pH12-7差スペクトル (ΔE_{7-12} スペクトル) およびpH7-3差スペクトル (ΔE_{3-7} スペクトル)) について調べた。

- (1)フルボ酸のPVP吸着画分、通過画分への分配割合は、土壌の種類と高い関連性を示した。PVP吸着画分の割合は、褐色森林土由来のフルボ酸で最も高く、次いで黒ボク土フルボ酸、低地水田土および赤黄色土のフルボ酸の順であった。
- (2)未分画フルボ酸とそのPVP吸着画分、通過画分のいずれの可視・紫外線吸収スペクトルにも、特徴的な吸収はみられず、また、各画分とも土壌間でスペクトルの傾きに差は認められなかった。
- (3) ΔE_{7-12} スペクトルは、フルボ酸中のフェノール性化合物がPVP吸着画分に濃縮されたことを明確にした。
- (4)PVP吸着画分は、 ΔE_{7-12} スペクトルおよび ΔE_{3-7} スペクトルのパターンによって、土壌の種類に対応した3つのグループ (I型-黒ボク土、II型-褐色森林土、III型-低地水田土および赤黄色土) に分かれた。
- (5)PVP通過画分の ΔE_{7-12} スペクトルおよび ΔE_{3-7} スペクトルには、土壌間の差は認められなかった。
- (6)既知低分子化合物のイオン化示差スペクトルの測定結果から、I型のスペクトルを示すフルボ酸が縮合環を含んでいることが推定された。
- (7)同一土壌より得られたフルボ酸PVP吸着画分と腐植酸の ΔE_{7-12} スペクトルは類似しており、各土壌におけるフルボ酸中の腐植物質の構造と腐植酸の構造の類似を示した。両画分のスペクトルの差異は、III型 (フルボ酸) - Rp型 (腐植酸)、II型-P型、II型-B型 およびI型-A型の順で増大し、これに対応して両画分の構造の差も大きくなることが示唆された。

1. はじめに

本章では、各種土壌から分離精製したフルボ酸の元素組成、IRスペクトル、糖含量、分子粒径分布、 ^{13}C -NMRおよび ^1H -NMRの各性質について調べた。その際、パーミエーションクロマトグラフィーによって得られた分子粒径分布からは平均分子量を、また、定量法を用いて測定した ^{13}C -NMRスペクトルからは炭素組成を、 ^1H -NMRスペクトルからは水素組成をそれぞれ求めた。

試料には、未分画のフルボ酸とそのPVP吸着画分、通過画分を用いたほか、PVP吸着・通過両画分をさらにエタノールに対する溶解性に基いて細画分し、あわせて供試した。また、腐植酸あるいはそのアルコール可溶画分であるヒマトメラン酸との比較もあわせて行なった。

フルボ酸の構造に関する研究法は、本研究で行なった分光化学的性質の測定などの非分解的手法と分解的手法とに大きく分けられる。フルボ酸は加水分解に対しては、ある構造部分は不安定であり、また一部は抵抗性が強い。さらに、酸化分解のような強い分解では構造の変化を免れないため、検出された化合物が本当に構成成分として存在していたかどうかに対する疑問が残る。一方、分解を行わずに分析する場合には、情報が制限されるため、分画、修飾あるいは測定条件を変えるとといった手段を用いて情報量を拡大する必要がある。分解的手法を用いた研究は、Schnitzerとその共同研究者によってポドゾルのBh層より分離したフルボ酸について詳しく研究されており (Schnitzer・Khan 1972)、主要な分解生成物として C_{16} - C_{18} のn-脂肪酸、ジカルボン酸、トリカルボン酸、および水酸基1-3、カルボキシル基1-5を含むベンゼンカルボン酸が得られることが明らかにされている。

2. NAGOYA法によるフルボ酸の調製とエタノールによる分画

本項では、まず、未分画フルボ酸とそのPVP吸着画分、通過画分、および腐植酸の粉末精製試料の調製法と、PVP吸着画分、通過画分をそれぞれさらにエタノール可溶画分、不溶画分に細分画した方法およびその際の両画分への分配割合について記す。

PVP吸着画分の ^{13}C -NMRスペクトルは、同画分になお糖が含まれていることを示した。そのため、より非腐植物質を含まない画分を得ることを目的として、エタノール抽出による細分画を行なった。PVP通過画分についても、糖を主体とする画分と、他の非腐植物質を主体とする画分に分けることに主眼を置いてエタノールによる細分画を行なった。なお、腐植酸のエタノール可溶画分は、ヒマトメラン酸として知られている (Kononova 1966)。

抽出による分画は、分画法としては精度の高い方法ではないが、分画の基準がその対象となる物質の性質のひとつであり、また、大量の試料を一度に処理できるため、腐植の分画のように個々の化合物を単離するのが目的ではなく、分画後の各画分の性質をまとめて推察する場合には、きわめて有効な手法であるといえる。

試料および方法

(1) 供試土壌

褐色森林土A層（愛知県設楽町段戸）、黒ボク土A層（静岡県富士宮市猪之頭）、低地水田土（灰色低地土）作土層（長野県長野市）の3土壌を供試した。各土壌の性質を表4-1に示す（表中の値は一部、表2-1、2-2および3-1と重複する）。

(2) フルボ酸および腐植酸の粉末試料の調製

まず、土壌を風乾し、粉碎後、2mmのふるいに通し、さらに植物残さや根をできるだけ取り除いた。次に、炭素含量 (g) の300倍相当の0.1N NaOH (ml) を加え、 N_2 置換した後、ときどき振盪しながら、25℃に48時間放置すること

表4-1 供試土壌

	段戸 (愛知県設楽町)	猪之頭 (静岡県富士宮市)	長野 (長野県長野市)
種類	褐色森林土 Dystric Cambisol	黒ボク土 Humic Andosol	低地水田土 Anthraquic Gleysol
層位	A層	A層	作土層
植生	ミズナラ, ツガ, ブナ	ススキ, ササ, カヤ	——
土性	LiC	LiC	LiC
pH(H ₂ O)	4.7	4.2	5.4
全炭素量(%)	6.2	16.7	1.5
全窒素量(%)	0.34	1.04	0.14
C/N	18	16	9.4
ヒューミン含量(%)*	43.9	53.4	70.5
腐植酸含量(%)*	11.1	30.5	7.9
フルボ酸含量(%)*	23.4	21.1	6.2
PVP吸着画分(**)	51.7	36.5	29.7
PVP通過画分(**)	44.7	61.8	71.7

*全有機物中に占める割合
**フルボ酸中に占める割合

により、腐植を抽出した。抽出液は、3%となるようにNaClを加えた後、遠心分離（1500Xg、15分）によって分離した。次に、抽出に用いたのと同容量のNaCl 3%を含む0.1N NaOH溶液で残さ土壌を洗浄した。洗浄液は、遠心分離（1500Xg、15分）して、抽出液と合わせ、濾過（Toyo No.2）した。濾液は、3N HClを用いてpH 1.0とし、一夜静置後、遠心分離（1500Xg、10分）により、フルボ酸画分（上澄液）と腐植酸画分（沈殿）に分離した。

フルボ酸画分は、濾過（Toyo No.6）した後、カチオン交換樹脂Dowex HCR-Wに通して金属イオンを除去した。次に、NaOH溶液で中和し、38℃以下で減圧濃縮した後、Sephadex G-10に通して脱塩した。脱塩後、再度カチオン交換樹脂（Dowex HCR-W）に通してH⁺型とし、凍結乾燥してフルボ酸粉末精製試料を得た。

腐植酸画分は、2N NaOHで中和し、NaCl 3%を含む0.1N NaOHに溶解した後、遠心分離（6000Xg、20分）して不溶物を除去した。上澄液は、3% NaCl溶液で約50倍に希釈し、3N HClでpH 1.0とした。一夜静置した後、遠心分離（1500Xg、10分）して沈殿を集めた。沈殿は中和、溶解、希釈後、再沈殿させる操作を、酸性の上澄液がほとんど無色になるまで繰り返した。次に、灰分を除去するために、沈殿の約10倍容の0.1M HCl : 0.3M HF（1:1）を加え、室温で一昼夜振盪した後、遠心分離（1500Xg、10分）して上澄を除去する操作を3回繰り返した。この沈殿を、AgNO₃溶液を加えてCl⁻が検出されなくなるまで透析し、凍結乾燥して腐植酸粉末精製試料を得た。

(3) PVP吸着画分、PVP通過画分の粉末試料の調製

金属イオンを除去した酸性フルボ酸溶液の一部は、PVPによる分画に供した。分画は、第3章第2項に記載した方法で行なった。ただし、前回H₂SO₄を用いたところは、全てHClを用いて行なった。前回H₂SO₄を用いたのは炭素の定量（重クロム酸カリ-硫酸による比色法）の際に、Clが反応の妨げとなるためであり、今回HClを用いたのはSephadexG-10による脱塩の際に、Na₂SO₄よりもNaClの方が分離しやすいためである。

PVP吸着・通過両画分は、それぞれ中和し、未分画フルボ酸の場合と同様

に、濃縮（38℃以下）、Sephadex G-10による脱塩、イオン交換樹脂（Dowex HCR-W）によるH⁺型への変換を行なった後、凍結乾燥して粉末精製試料を得た。

(4) エタノールに対する溶解性に基づく分画

十分に真空乾燥したフルボ酸PVP吸着画分あるいはPVP通過画分の粉末精製試料500mgにエタノール150mlを加え、5分間振盪抽出した。静置後、上澄液を移し、さらにエタノール150mlを加えて30分間振盪した。上澄液は濾過（Toyo No.6）し、最初の抽出液と合わせた。抽出液（エタノール可溶画分）および抽出残さ（エタノール不溶画分）は、それぞれ減圧乾固を繰り返した後、凍結乾燥して粉末試料を得た。なお、抽出に用いるエタノールの量および振盪時間については、予備実験を行っており、1回目の抽出で可溶画分のほとんどが抽出されることを確認している。

また、比較のため、腐植酸についても同様の方法によりエタノール可溶画分（ヒマトメラン酸）の抽出を行なった。

結果および考察

フルボ酸PVP吸着画分およびPVP通過画分のエタノール可溶・不溶両画分への分配割合と回収率を表4-2に示した。また、表4-3にはエタノール可溶画分、不溶画分がフルボ酸全体に占める割合を示した。

粉末状態で褐色を呈したPVP吸着画分は、赤褐色のエタノール可溶画分と暗褐色のエタノール不溶画分とに分かれた。エタノール可溶画分の割合はいずれも80%以上であったが、特に段戸（褐色森林土）試料では91%と他の2土壤の試料を約10%上回った。

PVP通過画分から得られたエタノール可溶画分は黄色、エタノール不溶画分は分面前と同じ薄い肌色を呈した。分配割合は、吸着画分とは逆にエタノール不溶画分が90%以上を占めた。エタノール可溶画分の割合は5-7%であった。また、エタノール可溶画分の割合は、PVP吸着画分の場合と同様、段戸試料が最も高い値を示した。

なお、エタノールと同時に他の有機溶媒による抽出も試みたが、極性の低い

表4-2 フルボ酸PVP吸着画分、PVP通過画分および腐植酸の
エタノール可溶画分、エタノール不溶画分への分配割合

	エタノール 可溶画分(%)	エタノール 不溶画分(%)	回収率 (%)
PVP吸着画分			
段戸(褐色森林土)	90.8	9.2	100.0
猪之頭(黒ボク土)	80.8	18.4	99.2
長野(低地水田土)	81.8	18.8	100.6
PVP通過画分			
段戸	7.3	91.5	98.8
猪之頭	5.8	93.3	99.1
長野	4.6	98.0	102.6
腐植酸			
段戸	2.6	89.7	92.3
猪之頭	1.4	91.0	92.4
長野	7.4	83.5	90.9

表4-3 フルボ酸細画分のフルボ酸全体に占める割合

	段戸 (褐色森林土)	猪之頭 (黒ボク土)	長野 (低地水田土)
PVP吸着-エタノール可溶画分	46.9(%)	29.5(%)	24.3(%)
-エタノール不溶画分	4.8	6.7	5.6
PVP通過-エタノール可溶画分	3.3	3.6	3.3
-エタノール不溶画分	40.9	57.7	70.3

エーテル、酢酸エチルでは全く抽出されなかった。Ogner・Schnitzer (1971) は、ポドゾルBh層から分離したフルボ酸についてn-ヘキサン、ベンゼン、酢酸エチルの順でソックスレー抽出を行ない、抽出量がそれぞれ0.02%、0.02%および0.41%にすぎなかったことを報告している。

フルボ酸細画分がフルボ酸全体に占める割合(表4-3)は、PVP通過-エタノール不溶画分が41-70%と最も高かった。主要な腐植物質画分であるPVP吸着-エタノール可溶画分は、PVP通過-エタノール不溶画分同様、土壌間の差が大きく、段戸土壌(褐色森林土)では47%であったのに対し、長野土壌(低地水田土)では24%と、段戸土壌の約1/2であった。一方、PVP吸着-エタノール不溶画分、PVP通過画分-エタノール可溶画分の存在割合は、それぞれ、5-7%、3-4%と、主要2画分に比べると土壌間の差はわずかであった。

表4-2には腐植酸のエタノール可溶画分・不溶画分への分配割合もあわせて示した。Kumada・Kawamura (1968) や白谷・熊田 (1973) は、アルコールを用いて腐植酸の分別沈殿を行い、腐植化度の低い腐植酸ほど高アルコール濃度で沈殿する割合が高いことを報告している。ヒマトメラン酸(エタノール可溶画分)の収率もまた、Rp型腐植酸(長野) > P型腐植酸(段戸) > A型腐植酸(猪之頭)の順であった。しかしながら、長野土壌の腐植酸にしてもエタノール可溶画分の割合は7.4%で、フルボ酸PVP吸着画分からの抽出量と比較するときわめて少量であった。エタノールによる加熱抽出では、15-21%の物質が腐植酸から抽出されたという例もある(Fraigら 1974)が、いずれにせよ、両腐植画分のエタノールに対する挙動の違いは明らかである。なお、各型の腐植酸のエタノールに対する挙動の違いは、主に母核(芳香環)に対する脂肪族側鎖の存在割合の違いによるものと推察した。

3. 元素組成

フルボ酸あるいは腐植酸の元素組成は、化学構造に関する基本的な値として、多くの研究において分析が行なわれている。元素分析の結果からは、単に各構成元素の含量が明らかになるだけでなく、原子数比 (C/N、H/C、O/C等) (Kumada 1987) や不飽和度 (筒木・熊田 1980) を算出することにより、間接的にはあるが化学構造に関するある種の情報を得ることができる。

試料および方法

第2項で調製したフルボ酸各画分および腐植酸を用いた。

炭素、水素及び窒素含量の測定は、試料を充分真空乾燥した後、名古屋大学農学部元素分析室に依頼した。酸素含量は、全重量から、炭素、水素、窒素および灰分の重量を引いた値とした。

結果および考察

各試料の元素組成 (重量および原子数による) を表4-4、4-6、4-8に、原子数比を表4-5、4-7、4-9にそれぞれ示した。また、図4-1には未分画フルボ酸、PVP吸着画分、PVP通過画分および腐植酸の値をプロットしたCHO相関図を、図4-2には全試料の値をプロットしたH/C-O/C相関図をそれぞれ示した。H/C-O/C相関図には、また、植物体成分および腐植酸の値を、村田 (1964) およびKuwatsukaら (1978) からそれぞれ引用し、あわせて示した。

CHO相関図においてフルボ酸の各試料は、炭素含量が高く、水素含量が低い領域から、炭素含量が低く、水素含量が高い領域へ水平方向に広がって分布しており、酸素含量 (垂直方向) の広がりには小さかった。PVP吸着画分とPVP通過画分は、それぞれ未分画フルボ酸の分布域の両側に分布し、3土壤間の元素組成のばらつきは、未分画フルボ酸に比べPVP吸着画分あるいはPVP通過画分では明らかに小さかった。

原子数比をみると、PVP吸着画分およびそのエタノール可溶画分のH/Cは約0.9で、二重結合を多く含むかあるいは側鎖に枝分かれが多いことが推察さ

表4-4 未分画フルボ酸、PVP吸着画分、PVP通過画分および腐植酸の元素組成

試料	C	H	N	O	C	H	N	O
	----- 重量 % -----				----- 原子数 % -----			
未分画フルボ酸								
段戸(褐色森林土)	46.86	4.30	1.62	47.33	34.73	37.97	1.03	26.77
猪之頭(黒ボク土)	44.36	4.68	2.41	48.55	32.00	40.22	1.49	26.29
長野(低地水田土)	44.06	5.30	3.88	46.76	30.25	43.36	2.28	24.10
平均	45.09	4.76	2.64	47.55	32.33	40.52	1.60	25.72
PVP吸着画分								
段戸	48.90	3.56	1.11	46.43	38.47	33.37	0.75	27.42
猪之頭	47.99	3.44	1.79	46.78	38.20	32.63	1.22	27.95
長野	49.79	3.87	2.34	44.00	38.03	35.22	1.53	25.22
平均	48.89	3.62	1.75	45.74	38.23	33.74	1.17	26.8
PVP通過画分								
段戸	44.86	5.49	4.30	45.35	30.31	44.20	2.49	23.00
猪之頭	43.25	5.56	3.98	47.21	29.16	44.66	2.30	23.89
長野	42.35	5.94	3.03	48.68	27.81	46.48	1.71	24.00
平均	43.49	5.66	3.77	47.08	29.09	45.11	2.17	23.63
腐植酸								
段戸	55.16	5.31	4.75	33.59	37.34	42.83	2.76	17.07
猪之頭	55.99	3.60	3.43	36.29	43.39	33.23	2.28	21.11
長野	54.40	5.30	5.34	33.82	36.88	42.81	3.10	17.21
平均	55.18	4.74	4.51	34.57	39.20	39.62	2.71	18.46

表4-5 未分画フルボ酸、PVP吸着画分、PVP通過画分
および腐植酸の原子数比

試料	H/C	N/C	O/C	O/H
未分画フルボ酸				
段戸(褐色森林土)	1.093	0.0296	0.756	0.692
猪之頭(黒ボク土)	1.257	0.0466	0.822	0.654
長野(低地水田土)	1.433	0.0755	0.797	0.556
平均	1.261	0.0506	0.792	0.634
PVP吸着画分				
段戸	0.867	0.0196	0.713	0.822
猪之頭	0.854	0.0320	0.732	0.857
長野	0.926	0.0403	0.663	0.716
平均	0.882	0.0306	0.703	0.798
PVP通過画分				
段戸	1.458	0.0822	0.759	0.520
猪之頭	1.532	0.0789	0.819	0.535
長野	1.671	0.0613	0.863	0.516
平均	1.554	0.0741	0.814	0.524
腐植酸				
段戸	1.147	0.0738	0.457	0.399
猪之頭	0.766	0.0525	0.487	0.635
長野	1.161	0.0842	0.467	0.402
平均	1.025	0.0702	0.470	0.479

表4-6 PVP吸着-エタノール可溶画分、エタノール不溶画分の元素組成

試料	C	H	N	O	C	H	N	O
	----- 重量 % -----				----- 原子数 % -----			
PVP吸着-								
エタノール可溶画分								
段戸(褐色森林土)	48.21	3.68	1.08	47.03	37.58	34.18	0.72	27.52
猪之頭(黒ボク土)	48.47	3.82	0.81	46.90	37.32	35.04	0.53	27.10
長野(低地水田土)	50.68	4.17	2.01	43.14	37.69	36.95	1.28	24.08
平均	49.12	3.89	1.30	45.69	37.53	35.39	0.84	26.23
PVP吸着-								
エタノール不溶画分								
段戸	42.27	4.68	3.03	45.02	31.45	41.48	1.93	25.14
猪之頭	45.85	5.09	2.93	46.13	31.92	42.22	1.75	24.11
長野	44.42	4.74	4.27	46.57	31.84	40.48	2.62	25.06
平均	44.18	4.84	3.41	45.91	31.74	41.39	2.10	24.77

表4-7 PVP吸着-エタノール可溶画分、エタノール不溶画分の原子数比

試料	H/C	N/C	O/C	O/H
PVP吸着-				
エタノール可溶画分				
段戸(褐色森林土)	0.910	0.0192	0.732	0.805
猪之頭(黒ボク土)	0.939	0.0143	0.726	0.774
長野(低地水田土)	0.980	0.0340	0.639	0.652
平均	0.943	0.0225	0.699	0.744
PVP吸着-				
エタノール不溶画分				
段戸	1.319	0.0615	0.800	0.606
猪之頭	1.323	0.0548	0.755	0.571
長野	1.271	0.0824	0.787	0.619
平均	1.304	0.0662	0.781	0.599

表4-8 PVP通過-エタノール可溶画分、エタノール不溶画分の元素組成

試料	C	H	N	O	C	H	N	O
	----- 重量 % -----				----- 原子数 % -----			
PVP通過-								
エタノール可溶画分								
段戸(褐色森林土)	45.56	5.85	2.21	46.38	29.98	45.87	1.25	22.91
猪之頭(黒ボク土)	44.66	6.33	2.11	46.70	28.46	48.06	1.15	22.34
長野(低地水田土)	42.07	4.74	4.27	46.57	27.61	46.61	1.38	24.39
平均	44.10	5.64	2.86	46.55	28.68	46.85	1.26	23.21
PVP通過-								
エタノール不溶画分								
段戸	45.23	5.77	4.48	44.52	29.91	45.46	2.54	22.10
猪之頭	43.98	5.93	4.09	46.00	28.81	46.28	2.30	22.62
長野	42.38	6.06	3.06	48.50	27.59	47.00	1.71	23.70
平均	43.86	5.92	3.88	46.34	28.77	46.25	2.18	22.81

表4-9 PVP通過-エタノール可溶画分、
エタノール不溶画分の原子数比

試料	H/C	N/C	O/C	O/H
PVP通過-				
エタノール可溶画分				
段戸(褐色森林土)	1.530	0.0416	0.764	0.500
猪之頭(黒ボク土)	1.689	0.0405	0.785	0.465
長野(低地水田土)	1.688	0.0500	0.883	0.523
平均	1.636	0.0440	0.811	0.496
PVP通過-				
エタノール不溶画分				
段戸	1.520	0.0849	0.739	0.486
猪之頭	1.607	0.0797	0.785	0.489
長野	1.704	0.0619	0.859	0.504
平均	1.610	0.0755	0.794	0.493

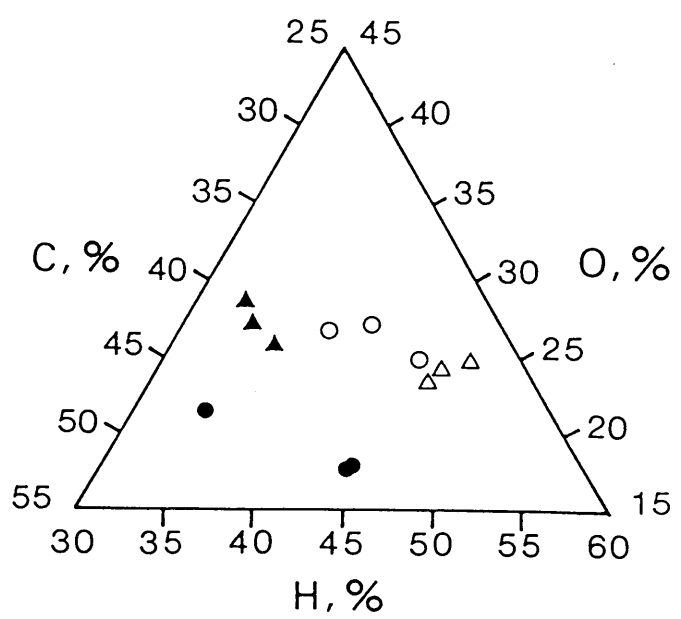


図4-1 未分画フルボ酸、PVP吸着画分、PVP通過画分
 および腐植酸のC-H-O相関図
 ○：未分画フルボ酸、▲：PVP吸着画分、
 △：PVP通過画分、●：腐植酸

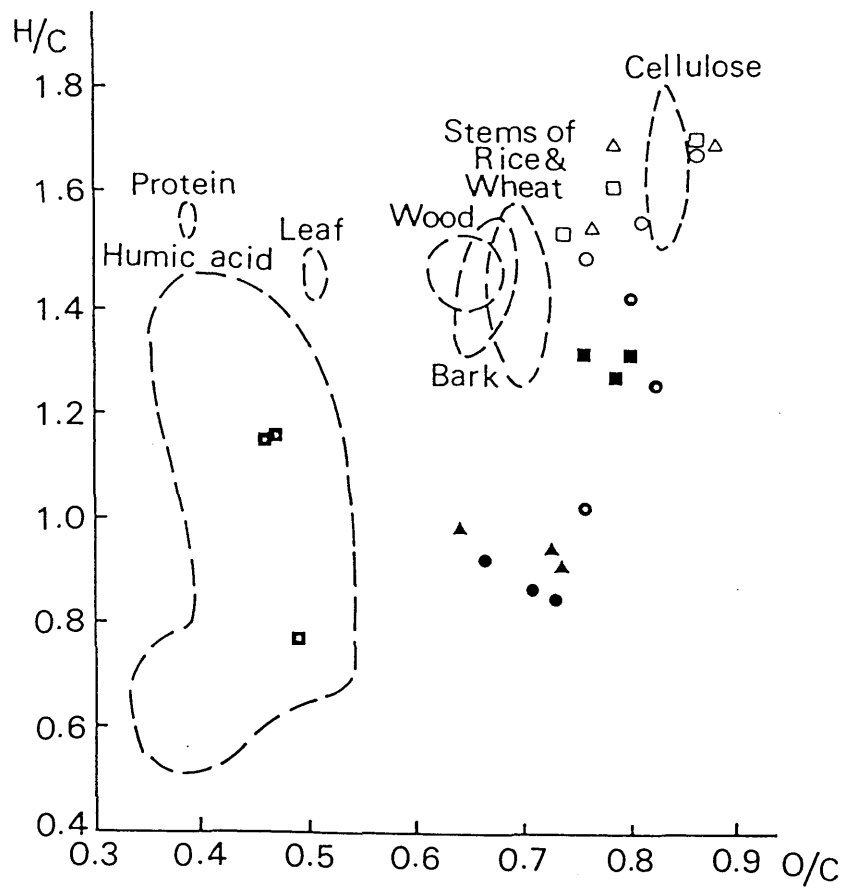


図4-2 フルボ酸各画分および腐植酸のH/C-O/C相関図

○：未分画フルボ酸、●：PVP吸着画分、○：PVP通過画分、■：腐植酸、
 ▲：PVP吸着-エタノール可溶画分、■：PVP吸着-エタノール不溶画分、
 △：PVP通過-エタノール可溶画分、□：PVP通過-エタノール不溶画分、

れた。一方、エタノール不溶画分は約1.3と分面前よりもかなり高い値を示した。

H/C-0/C相関図において、フルボ酸のPVP吸着各画分の値は、いずれも腐植酸の分布域とは重ならなかった。これは、3画分とも0/Cが腐植酸の値を上回ったためであり、フルボ酸中の腐植物質の方が腐植酸よりも酸化が進んでいることが示唆された。

フルボ酸の窒素含量は、腐植酸やヒューミンと比較して少ないとされているが (Schnitzer 1985)、PVP吸着画分のN/Cは0.02-0.04と未分画フルボ酸よりもさらに低かった。一方、PVP通過画分に分配された窒素はフルボ酸中の窒素の50-80%に相当した。Khan・Sowden (1972)、Sowdenら (1976) によれば、加水分解後にアンモニア、アミノ酸およびアミノ糖として検出される窒素はフルボ酸の全窒素の45-70%であるため、それらのほとんどがPVP通過画分に移行したものと推定される。PVP吸着画分のエタノール可溶画分ではN/Cの値はさらに下がって0.01-0.03となり、フルボ酸中の腐植物質の大部分が、その構造中に窒素を含まないことが明らかになった。PVP吸着-エタノール不溶画分のN/Cは逆に0.05-0.08と高く、PVP吸着画分中の含窒素化合物が不溶画分に濃縮されたことを示した。

PVP吸着画分およびそのエタノール可溶画分、不溶画分の元素組成は、例えば、炭素含量がエタノール可溶画分では37.3-37.7%、不溶画分では31.5-31.9%であるように、土壌の型に関わらずきわめて類似していた。3土壌より得られたPVP吸着-エタノール可溶・不溶両画分の元素組成の平均は、エタノール可溶画分ではC38:H35:N1:O26、エタノール不溶画分ではC32:H41:N2:O25であった。

PVP吸着画分のエタノール可溶画分と不溶画分の元素組成がH/C-0/C相関図において明確に異なる範囲に位置していたのに対し、PVP通過画分とそのエタノール可溶画分、不溶画分の元素組成は、きわめて類似していた。PVP通過各画分はまた、H/C-0/C相関図において植物体、特にセルロースの領域の近くに分布した。長野 (低地水田土) 試料と猪之頭 (黒ボク土) および段戸 (褐色森林土) 試料との0/Cの差は、糖含量の差によるものと推察される。

PVP通過各画分の3土壤の結果をまとめると、エタノール可溶画分の平均元素組成はC29：H47：N1：O23、一方、エタノール不溶画分の平均元素組成はC29：H46：N2：O23であった。

4. IRスペクトル

IRスペクトルは、古くから腐植の研究に用いられてきた分析法の一つであり、多重結合や官能基に関する情報が得られることから、それらの存在を知ると共に、吸収帯の有無や吸収強度の違いに基づく試料間の比較に威力を発揮してきた。Kumada・Aizawa (1958) は各種土壌の腐植酸のIRスペクトルを測定し、可視・紫外線吸収スペクトルによる腐植酸の分類が、IRスペクトルによっても成り立つことを示した。Wagner・Stevenson (1965) やTheng・Posner (1967) は、腐植酸の誘導体形成に伴うIRスペクトルの変化より、官能基、特にカルボニル基の性質を明らかにしようとした。また、Gerasimowicz・Byler (1985) は、コンポストの腐熟化過程における腐植酸の構造の変化を調べるためにFT-IRスペクトルを利用している。

ここでは、PVPに対する吸着性の違いおよびエタノールに対する溶解性の違いに基づいて分画したフルボ酸の細画分の構造の異同をIRスペクトルにより推定した。また、同時に土壌の種類による各画分の構造の差異や腐植酸との異同についても考察を行なった。

試料および方法

本章第2節で調製したフルボ酸各画分、腐植酸および段戸（褐色森林土）のPVP吸着画分、通過画分のNa⁺型試料についてIRスペクトルを測定した。また、長野（低地水田土）のヒマトメラン酸についても測定を行なった。Na⁺型の試料は以下の方法で調製した。

試料を蒸留水に溶かし、10% NaCl溶液により再生したカチオン交換樹脂（Dowex HCR-W）に通した。Na⁺型となった試料は凍結乾燥して回収した。

IRスペクトルはいずれもKBr法を用いて測定した。試料とKBrの混合比は試料1.2mgに対しKBr150mgとした。

各吸収の帰属は、前出各報文やFraigら (1975) 等の腐植物質のIRスペクトルに関する報告や、Pretschら（中西ら訳 1982）、松田・馬場 (1986)、岡原 (1986) 等を参考にして行なった。

結果

(1)未分画フルボ酸、PVP吸着画分、PVP通過画分および腐植酸のIRスペクトル

図4-3(a)に腐植酸のIRスペクトルを示した。供試した腐植酸のうち猪之頭（黒ボク土）腐植酸は最も腐植化の進んだA型、長野（水田土）腐植酸は最も腐植化の進んでいないRp型、段戸（褐色森林土）腐植酸は両者の中間的な型（P型）であり、それらのIRスペクトルには既にKumada・Aizawa（1958）によって報告されているように、各型の構造の違いを反映した差異が認められた。すなわち、Rp型からP型、A型と腐植化が進行するにつれ、 1600cm^{-1} （C=C）および 1720cm^{-1} （カルボニルC=O）の吸収強度が増大し、 1650 （アミドC=O）および 1540cm^{-1} （アミドN-H）の吸収強度が減少することが確認された。また、Rp型腐植酸のスペクトルでは、 $1510\text{-}1030\text{cm}^{-1}$ 間にリグニンのスペクトルに特徴的な多くの小さく鋭いピークがみられ、前駆体としてのリグニン構造の残存が推察されたが、それらのピークは腐植化が進むにつれてブロードな吸収帯へと変化した。

図4-3(b)には未分画フルボ酸のIRスペクトルを示した。フルボ酸のIRスペクトルは土壤間で類似しており、その差は主に吸収の相対強度に認められた。すなわち、 $3200\text{-}3000$ （カルボキシルO-H、芳香環C-H）および 1620cm^{-1} （芳香環と共役したカルボニルC=O）の吸収の相対強度は、段戸>猪之頭>長野の順で強く、一方、 1650 、 1540 、 1150 （アセタール）および 1040cm^{-1} （アルコールC-O）の吸収は、逆に長野>猪之頭>段戸の順で強かった。特に、 1540cm^{-1} の吸収は、段戸試料のスペクトルではかすかに肩として確認できる程度であった。以上のように各土壤のフルボ酸のIRスペクトルにおける相対強度の違いは、2つのパターンに集約された。これらの結果から、褐色森林土のフルボ酸は、カルボキシル基、共役カルボニル、芳香環構造が多く、糖を含むアルコール性水酸基が少ないこと、低地水田土のフルボ酸ではその逆の特徴をもつことが推定された。

図4-4(a)にはPVP吸着画分のIRスペクトルを示した。PVP吸着画分のIRスペクトルは、未分画フルボ酸のスペクトルに比べ、カルボキシル基によ

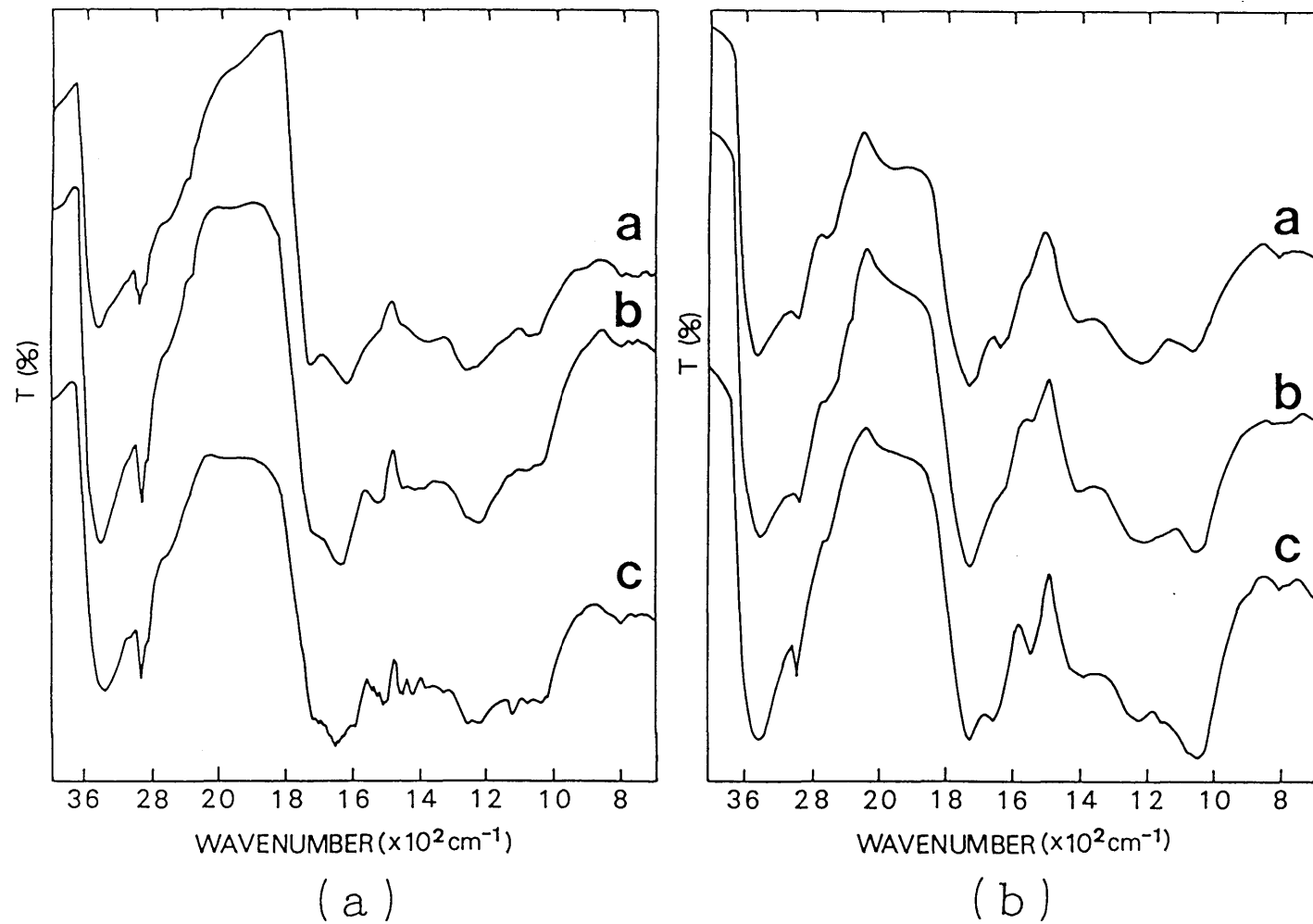


図4-3 (a)腐植酸および(b)未分画フルボ酸のIRスペクトル
a: 段戸 (褐色森林土)、b: 猪之頭 (黒ボク土)、c: 長野 (低地水田土)

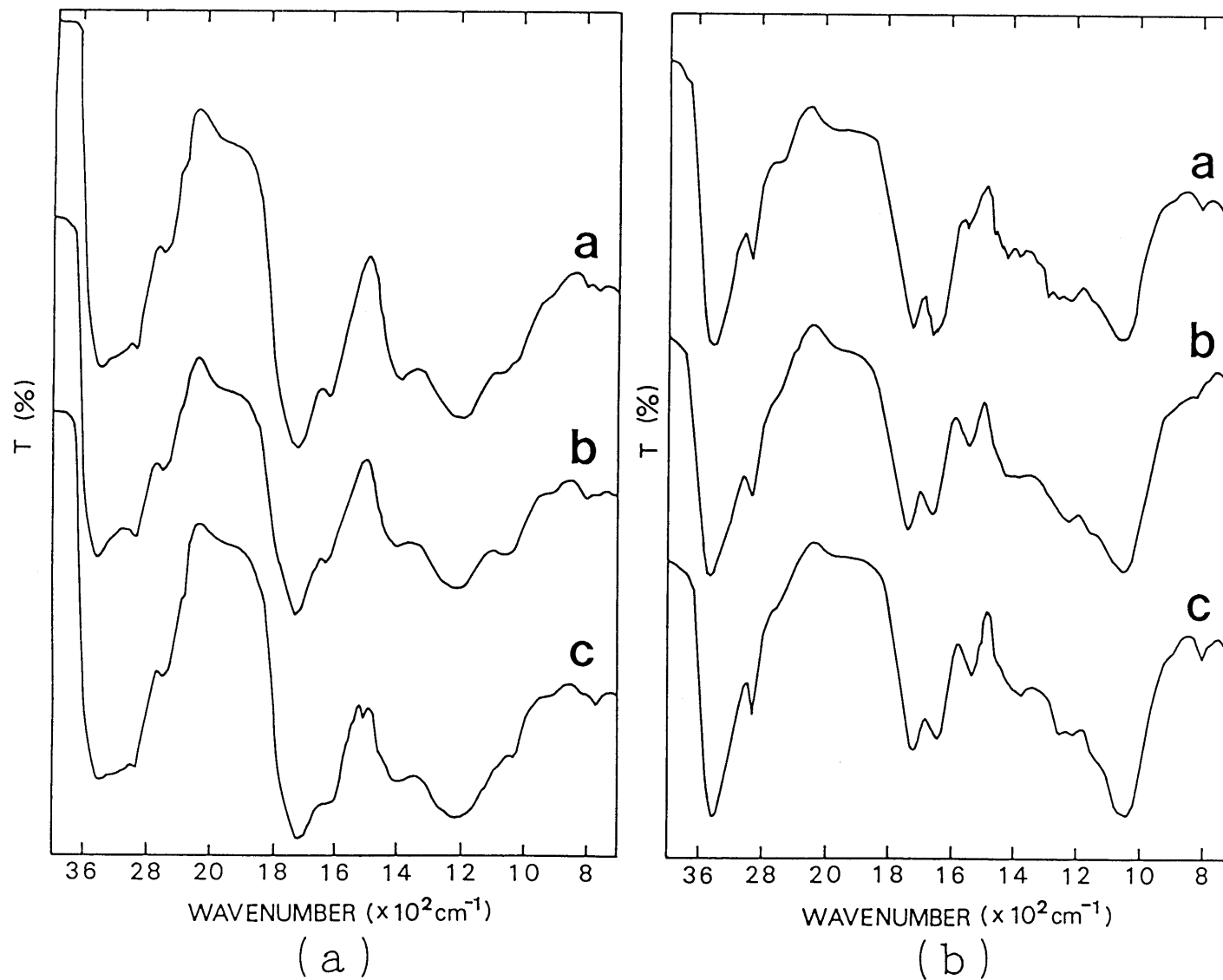


図4-4 フルボ酸(a)PVP吸着画分、(b)PVP通過画分のIRスペクトル
a : 段戸 (褐色森林土)、b : 猪之頭 (黒ボク土)、c : 長野 (低地水田土)

る 3200、2600 および 1720cm^{-1} の吸収や、芳香環構造に関連した 3100-3000、 $1620-1600\text{cm}^{-1}$ の吸収が強く、アミドによる 1650 、 1540cm^{-1} の吸収や、糖の影響が強く現われる 1150 、 1040cm^{-1} のアセタールおよびアルコール C-O の吸収は弱かった。カルボニル C=O の吸収帯は 1720cm^{-1} から長波長側に広がって認められたため、カルボキシル C=O のほかエステル C=O の存在が推察された。また、土壌間の差はほとんど認められなかった。

図4-4(b)には PVP 通過画分の IR スペクトルを示した。PVP 通過画分の IR スペクトルは、吸着画分のスペクトルとは対照的に 1650 、 1540 、 1300 、 1150 、 1050cm^{-1} の各波長の吸収が強く、この画分に糖やペプチドが多く含まれていることを示唆した。 1720cm^{-1} のカルボニル C=O のピークは、PVP 吸着画分に比べ、シャープであった。土壌間の差は、PVP 吸着画分の場合と同様ほとんど認められなかった。

(2) PVP 吸着-エタノール可溶画分、エタノール不溶画分の IR スペクトル

フルボ酸 PVP 吸着画分のエタノール可溶画分とエタノール不溶画分の IR スペクトルを図4-5に示した。エタノール可溶画分のスペクトル(図4-5(a))の特徴は、PVP 吸着画分と共通していたが、 $3100-3000\text{cm}^{-1}$ (芳香族 C-H) の吸収の相対強度はさらに強く、 $1080-1040\text{cm}^{-1}$ (アルコール C-O) の吸収強度はより弱い傾向が認められた。

一方、PVP 吸着-エタノール不溶画分の IR スペクトル(図4-5(b))は、PVP 吸着画分のスペクトルよりもむしろ未分画フルボ酸のスペクトルに類似しており、C=C、C=O の各吸収帯は可溶画分と比べて弱く、糖による吸収は強かった。さらに可溶画分のスペクトルには認められなかったアミドによる吸収(1540cm^{-1})も確認された。エタノール可溶画分、不溶画分とも、PVP 吸着画分同様、3 土壌間で明確な吸収の差は認められなかった。

(3) PVP 通過-エタノール可溶画分、エタノール不溶画分の IR スペクトル

PVP 通過画分のエタノール可溶画分、エタノール不溶画分の IR スペクトルを図4-6に示した。段戸(褐色森林土)と猪之頭(黒ボク土)のエタノール

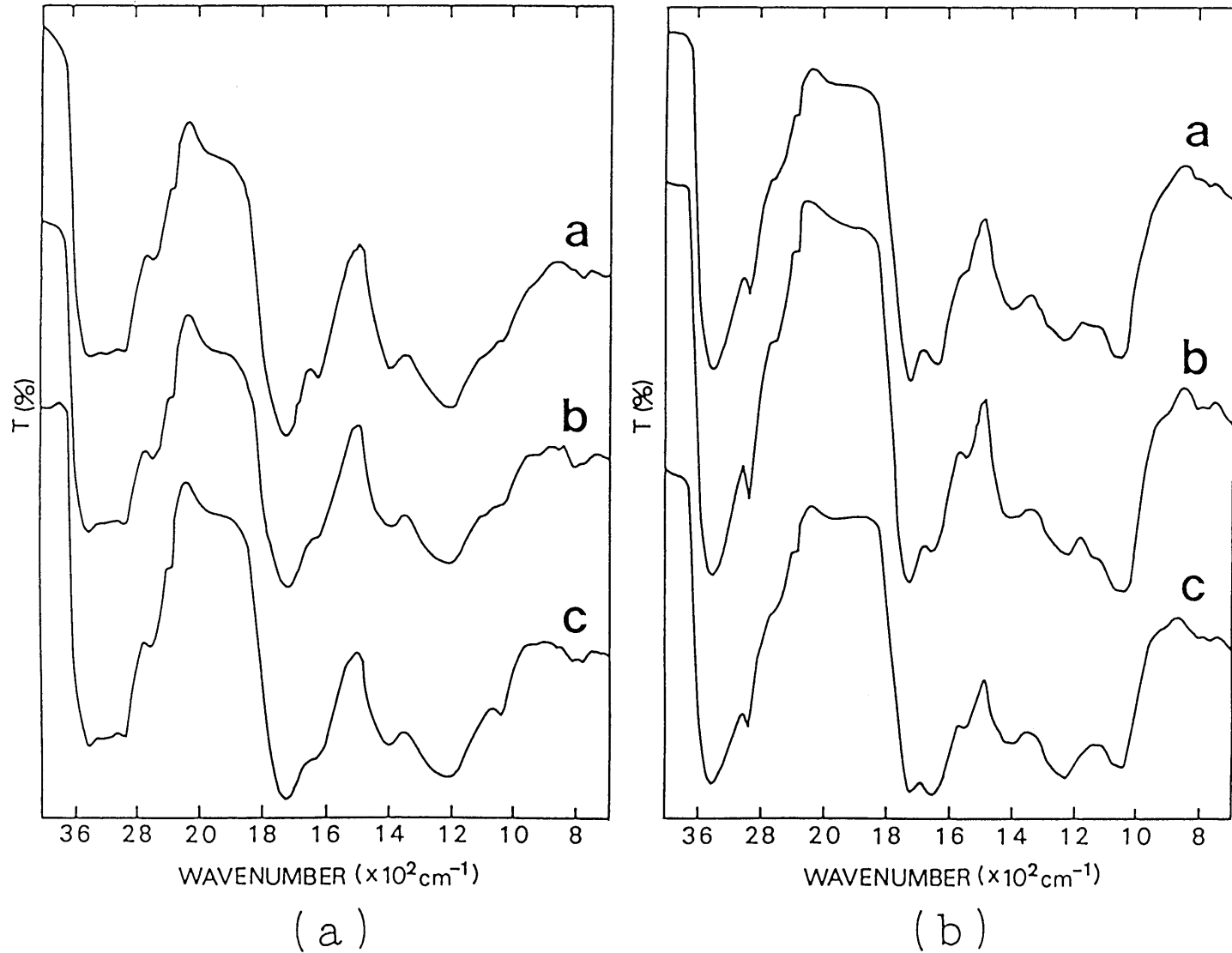


図4-5 (a)PVP吸着-エタノール可溶画分、(b)エタノール不溶画分IRスペクトル
a: 段戸(褐色森林土)、b: 猪之頭(黒ボク土)、c: 長野(低地水田土)

可溶画分のスペクトル（図4-6(a)）はきわめて類似しており、3400（水酸基）、2960-2940（脂肪族C-H）、1720、1460、1400（共に脂肪族C-H）、1260（フェノール、エーテル等）、1090（第2アルコール）、1030（第1アルコール）および810 cm^{-1} （置換ベンゼン）等に強いピークが認められた。また、1650および1540 cm^{-1} にも吸収帯が認められ、ペプチドの存在が示唆された。1100-1000 cm^{-1} にみられる吸収については、主に糖に由来するものとしてきたが、この画分に関しては、エタノールに可溶であること、アセタールのピーク（エタノール不溶画分では1150 cm^{-1} ）がみられないことから、1090および1030 cm^{-1} のピークに対する糖の影響は少なく、アルコールあるいはエーテルが強く影響していると考えられた。水田土のエタノール可溶画分のスペクトルは、やや特徴が異なっており、1260 cm^{-1} にはシャープなピークは認められず、また、920 cm^{-1} に他の2土壌ではみられなかったピークが認められた。

PVP通過-エタノール不溶画分にはPVP通過画分の90%以上が分配されたため、そのスペクトル（図4-6(b)）は、エタノール分画前の通過画分のスペクトルと類似していた。3試料の特徴は共通しており、明確な差は認められなかったが、1500-1200 cm^{-1} のいくつかの小さいピークは、褐色森林土由来の試料（段戸）で顕著にみられ、一方、水田土由来の試料（長野）では1460-1380 cm^{-1} と1300-1200 cm^{-1} の2つのブロードな吸収帯としてしか認められなかった。

(4)Na⁺型試料のIRスペクトル

各吸収帯の帰属、特にPVP吸着画分のスペクトルにおける1720 cm^{-1} のカルボニルの吸収の長波長側への広がりがエステルによるものであることを確認するために、段戸（褐色森林土）のNa⁺型のPVP吸着画分およびPVP通過画分のIRスペクトルを測定した。Na⁺型試料のスペクトルは図4-7に示した。

PVP吸着画分のスペクトルは、試料をNa⁺型にすることにより、2600、1720および1260-1200 cm^{-1} の吸収帯が消失または相対的に弱くなり、1600 cm^{-1} 付近および1395 cm^{-1} 付近に強い吸収帯が現われた。また、1760 cm^{-1} 、1700 cm^{-1} の肩状吸収は残った。一方、Na⁺型のPVP通過画分のスペクトルでは、吸着画分の場合と同様に2600、1720、1260および1220 cm^{-1} の吸収帯が消失し、1600

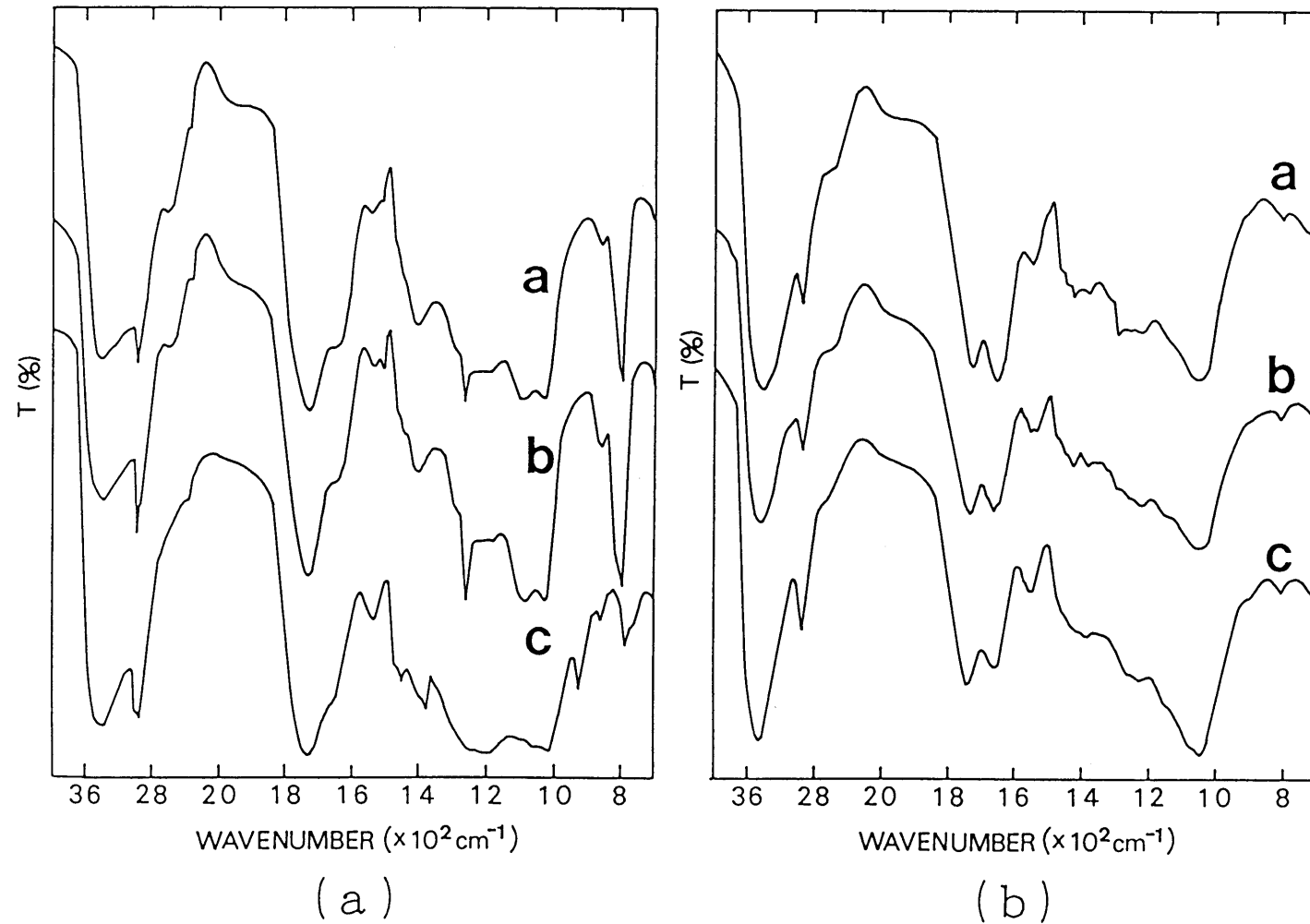


図4-6 (a)PVP通過-エタノール可溶画分、(b)エタノール不溶画分のIRスペクトル
a: 段戸(褐色森林土)、b: 猪之頭(黒ボク土)、c: 長野(低地水田土)

cm^{-1} および 1400cm^{-1} に新しい吸収帯が認められた。 H^+ 型から Na^+ 型への変換で現われた2つの吸収帯はカルボン酸塩によるものであり、これらの結果から、消失した 2600cm^{-1} 、 1720cm^{-1} の吸収帯は遊離のカルボキシル基に起因するものであることが確認され、残った 1760cm^{-1} の肩状吸収およびカルボキシル基のピークの遷移に伴って現われた 1700cm^{-1} の肩状吸収は、それぞれエステル（あるいは無水酸化物）、ケトンあるいはアルデヒドに起因すると推定された。したがってPVP吸着画分はその構造中にエステル結合をもつと考えられる。また、 H^+ 型PVP通過画分のスペクトルにみられた $1300\text{--}1200\text{cm}^{-1}$ 間の3つのピークのうち、 Na^+ 型のスペクトルに認められなかった 1260cm^{-1} 、 1220cm^{-1} の2つはフェノール性水酸基あるいはカルボキシル基に起因すると推定された。一方、 Na^+ 型のスペクトルにも認められた 1290cm^{-1} のピークは第2アルコールの水酸基等の可能性が考えられる。

(5)ヒマトメラン酸のIRスペクトル

図4-8には長野（低地水田土）Rp型腐植酸から分離したヒマトメラン酸（エタノール可溶画分）のIRスペクトルを示した。ヒマトメラン酸のIRスペクトルは、腐植酸やフルボ酸のPVP吸着-エタノール可溶画分のスペクトルに比べると吸収がシャープであり、その特徴として 2950 と 2860cm^{-1} （脂肪族C-H）にきわめて強いピークが認められた。

Rp型腐植酸のカルボキシル基含量は低いことが知られている（Tsutsuki・Kuwatsuka 1978a）。しかしながら、ヒマトメラン酸のIRスペクトルには、 $3200\text{--}3100$ や 1720cm^{-1} にカルボキシル基による非常に強い吸収が認められた。反対に、水酸基（ 3400cm^{-1} ）の吸収は弱く、また、もとの腐植酸のスペクトルではっきり認められたペプチドによる吸収（ 1650 、 1540cm^{-1} ）は、ヒマトメラン酸ではほとんど確認できなかった。カルボキシル基による吸収が強く、ペプチドによる吸収が微弱な点は、フルボ酸のPVP吸着-エタノール可溶画分と共通していた。

一方、 1460 、 1260 、 1090 、 1030 、 860 および 810cm^{-1} の各ピークは、 2950 、 2860cm^{-1} の強いピークと共に、段戸土壌や猪之頭土壌のPVP通過-エタノール

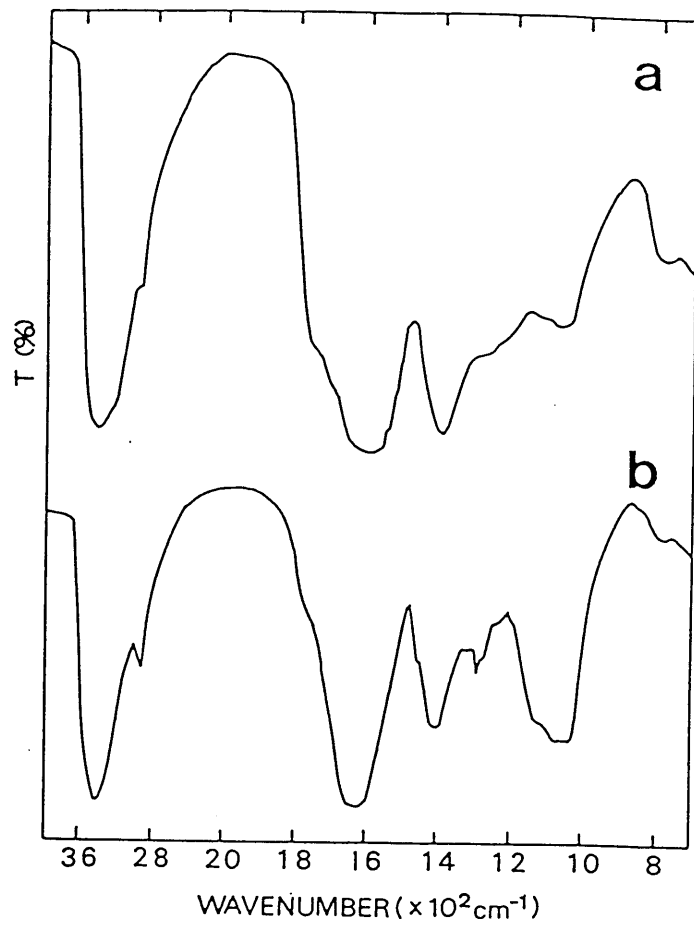


図4-7 Na⁺-型試料のIRスペクトル(段戸-褐色森林土)
a: PVP吸着面分、b: PVP通過面分

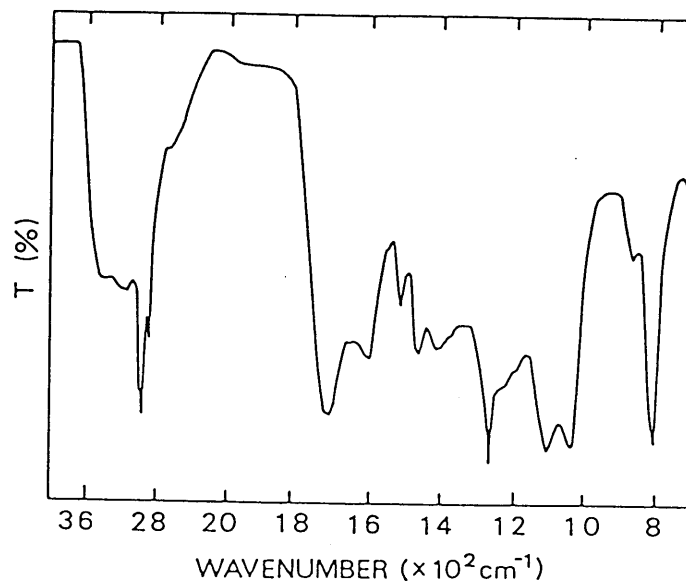


図4-8 長野(低地水田土)ヒマトメラン酸のIRスペクトル

ル可溶画分のスペクトルと共通しており、両画分がともに主要な構造として水酸基、カルボキシル基をもつ脂肪族鎖を含んでいることが推察された。

Saiz-Jimenez・de Leeuw (1986) は、スペイン北部の褐色土 (Typic Xerochrept) の A₁ 層のヒマトメラン酸について熱分解 GC-MS を行い、そのクロマトグラムがほとんど炭化水素や脂肪酸等の脂質のピークから成っており、芳香族化合物のピークはわずかしか認められないことを報告している。しかしながら、長野土壌のヒマトメラン酸の IR スペクトルには、1600 および 1500 cm⁻¹ にはっきりとピークが認められ、芳香環の存在が示された。

考察

各試料の IR スペクトルに認められた主な吸収帯の帰属を表4-10にまとめた。

本項では、フルボ酸各画分の IR スペクトルを比較し、画分間の構造上の異同を明らかにした。すなわち、PVP 吸着画分と PVP 通過画分の IR スペクトルは、両画分で芳香環、エステル C=O、糖、アミドの含有量に差があることを示した。同様に PVP 吸着画分のエタノール可溶画分、不溶画分のスペクトルもまた、両画分間でカルボキシル基、糖、アミド等の含有量に差があることを示した。また、PVP 通過画分の主成分であるエタノール不溶画分の IR スペクトルは、PVP 通過画分のスペクトルときわめて類似しており、エタノール可溶画分が PVP 通過画分中で構造的に特異であることが示唆された。

フルボ酸細画分の IR スペクトルは、分面前のスペクトルからは推定できなかった物質の存在を明らかにした。例えば、段戸土壌 (褐色森林土) の未分画フルボ酸のスペクトルでは、アミド C=O による 1650 cm⁻¹ の吸収帯は、1620 cm⁻¹ (芳香環と共役したカルボニル基) の吸収が強いため、はっきりとは認められなかった。しかし、その PVP 通過画分のスペクトルで 1650 cm⁻¹ に吸収帯が認められたことから、フルボ酸中にペプチドが存在していたことが確認された。長野土壌 (低地水田土) の未分画フルボ酸のスペクトルでは、反対に、共役カルボニルのピークがアミド C=O によるピークに隠されていたが、やはりその PVP 吸着画分のスペクトルに認められたため、フルボ酸中における存在が明らかになった。また、PVP 吸着-エタノール不溶画分のスペクトルで、エタノ

表4-10 フルボ酸各画分のIRスペクトルに認められる吸収の帰属

波長(cm^{-1})	帰属
3400	O-H伸縮 (水素結合した)、N-H伸縮 (水素結合した)
3200	O-H伸縮 (カルボン酸)
3100-3000	C-H伸縮 (芳香族および不飽和脂肪族)
2960, 2940, 2850	C-H伸縮 (脂肪族)
2600	O-H伸縮 (カルボン酸)
1760	C=O伸縮 (エステル、酸無水物)
1720	C=O伸縮 (カルボン酸)
1650	C=O伸縮 (水素結合したアミド)
1620-1600	C=O伸縮 (環構造と共役した)、芳香環C=C伸縮
1540	N-H変角 (水素結合した)
1500	C=C伸縮
1460	C-H変角 (脂肪族)
1400	C-H変角、O-H面内変角 (アルコール、カルボン酸)
1350	C-H変角
1290	C-H変角
1260, 1220	C-O伸縮 (カルボン酸、フェノール)
1240-1180	O-H変角 (カルボン酸)、
1150	C-O伸縮 (アセタール、脂肪族エーテル)
1090-1030	C-O伸縮 (炭水化物、第1および第2アルコール、芳香族エーテル)
860, 810	C-H変角 (置換ベンゼン)

ール分画前には認められなかった 1540cm^{-1} の吸収が認められたことから、アミノ基がPVP吸着面分中にも含まれていたことが明らかになった。

土壌の違いによる各画分のスペクトルの異同に関しては、未分画フルボ酸で認められたような吸収強度の土壌間の差は、そのPVP吸着面分や通過面分ではほとんどみられなかった。したがって、未分画フルボ酸で認められた土壌間の差は、各フルボ酸の腐植物質（吸着面分）、非腐植物質（通過面分）の含有率の差に起因するものといえる。PVP吸着面分に関しては、そのエタノール可溶画分、不溶画分についても3土壌間で、スペクトルの明確な差異は確認できなかった。一方、PVP通過面分の場合には、エタノール可溶画分のスペクトルで段戸（褐色森林土）、猪之頭（黒ボク土）両土壌の試料と、長野（低地水田土）の試料との間に差が認められた。

長野土壌の腐植酸のスペクトルの $1510\text{-}1030\text{cm}^{-1}$ に認められたリグニンと類似した吸収は、同土壌のフルボ酸およびそのPVP吸着各画分のいずれのスペクトルにも認められず、フルボ酸の方が土壌中でより多くの変化を受けていることが推察された。

長野腐植酸から分離したヒマトメラン酸のスペクトルはシャープで、同じエタノール可溶成分でも、PVP吸着—エタノール可溶画分とは、構造的に大きく異なることが推察された。同画分のIRスペクトルが、むしろ、段戸土壌や猪之頭土壌のPVP通過—エタノール可溶画分のスペクトルと類似していたことから、長野土壌のヒマトメラン酸は、リグニンの分解物を含む褐色物質に、腐植抽出液をフルボ酸と腐植酸に分けた際に腐植酸と共沈した黄色物質が混在している可能性も考えられた。同土壌のPVP通過—エタノール可溶画分のIRスペクトルが他の2土壌のスペクトルと異なっていたのも同じ理由によると推察される。

5. 可視・紫外線吸収スペクトル

未分画フルボ酸およびPVP吸着画分・通過画分の可視・紫外線吸収スペクトルについては、すでに第3章で述べた。本項では、PVP吸着画分から得られたエタノール可溶画分、エタノール不溶画分の可視・紫外線吸収スペクトルについて考察を行なった。

試料および方法

試料には、段戸（褐色森林土）、猪之頭（黒ボク土）、長野（低地水田土）各土壌のフルボ酸PVP吸着画分から得たエタノール可溶画分およびエタノール不溶画分を用いた。

可視・紫外線吸収スペクトルは、試料を0.1N NaOHに溶かし、吸光度が0.01-1.0になるように調整しながら、230-700nmの範囲で測定した。また、試料溶液中の有機炭素含量を重クロム、過カリ・硫酸による比色法を用いて測定し、炭素濃度1mg当たりの吸光度を求めた。

結果および考察

各試料の可視・紫外線吸収スペクトルを図4-9に示した。また、 $\Delta \log K$ および単位炭素濃度（1mgC）あたりの280nmの吸光度（ E_{280} ）を表4-11に示した。エタノール可溶画分およびエタノール不溶画分の可視・紫外線吸収スペクトルには、分画前のPVP吸着画分と同様、特異な吸収は認められなかった。

エタノール可溶画分の E_{280} は、分画前のPVP吸着画分よりやや高く、エタノール不溶画分の約1.5-3倍であった。このことから、エタノール可溶画分には芳香族化合物がより濃縮され、その含有量はエタノール不溶画分より高いことが推定された。

一方、エタノール可溶画分の $\Delta \log K$ が1.10-1.24と未分画フルボ酸やPVP吸着画分との間に差がなかった（第3章第3項参照）のに対し、エタノール不溶画分の $\Delta \log K$ は0.94-1.04と、いずれの土壌においても他の画分よりも約0.2低い値を示した。したがって、芳香環含量は可溶画分よりも低い、エタノー

ル不溶画分には、フルボ酸の中でも色の濃い、すなわち共役系の長い芳香族化合物が、選択的に分配されたものと推定した。

また、エタノール可溶画分、不溶画分の $\Delta \log K$ 、 E_{280} の土壌間の差は、両画分の間差に比べると小さいものであった。

$\Delta \log K$ における0.2の差は、腐植酸ではA型とB型あるいはB型とRp型の差に相当する(熊田 1981)。一方、第3章で測定した各種土壌のフルボ酸PVP吸着画分19点の $\Delta \log K$ は1.09-1.33で、最大値と最小値の差は0.24であった。したがって、同一土壌より得られたPVP吸着-エタノール可溶画分と不溶画分のスペクトルの傾きの差は大きいといえる。エタノール不溶画分の $\Delta \log K$ はまた、腐植酸の値と比較すると、Rp型の中の高い方の値に相当しており、両腐植画分の間差にあるといえる。

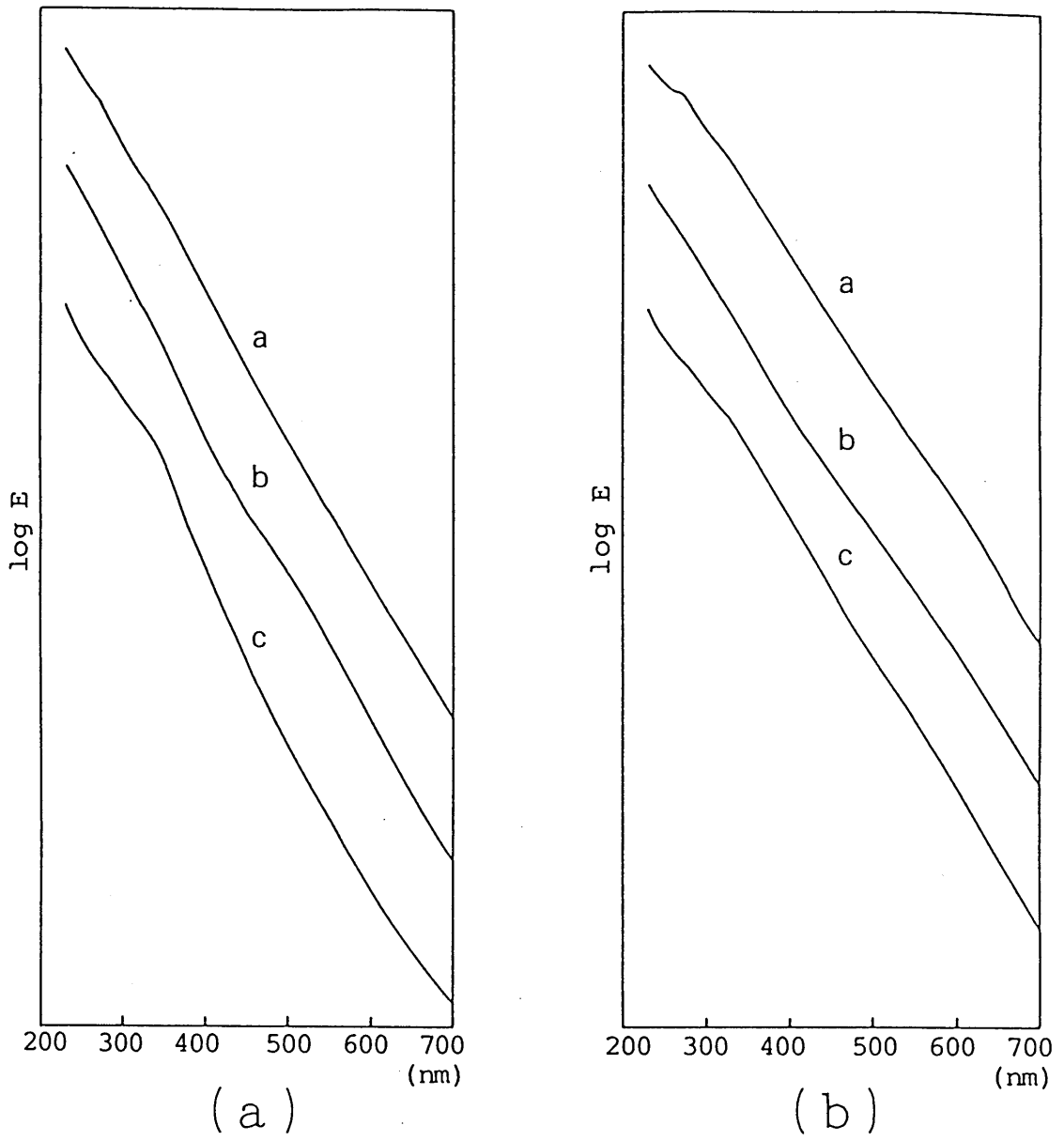


図4-9 PVP吸着-(a)エタノール可溶画分、(b)エタノール不溶画分の
可視・紫外線吸収スペクトル
a: 段戸(褐色森林土)、b: 猪之頭(黒ボク土)、c: 長野(低地水田土)

表4-11 PVP吸着-エタノール可溶画分、
エタノール不溶画分の吸光特性

	$\Delta \log K$	E_{280}^*
PVP吸着-		
エタノール可溶画分		
段戸(褐色森林土)	1.151	48.2
猪之頭(黒ボク土)	1.100	57.9
長野(低地水田土)	1.224	60.6
PVP吸着-		
エタノール不溶画分		
段戸	0.993	31.5
猪之頭	0.943	19.2
長野	1.044	25.9

* $E_{280} = OD_{280} / 1\text{mgC}$

6. 糖含量

I Rスペクトルの結果は、フルボ酸中の糖成分が、P V P吸着画分よりP V P通過画分、エタノール可溶画分よりエタノール不溶画分により多く分配されたことを示唆した。本項では、比色法によってヘキソース、ペントースおよびウロン酸の定量を行ない、各画分中に占める糖の割合を明らかにした。

試料および方法

段戸（褐色森林土）、猪之頭（黒ボク土）、長野（低地水田土）各土壌のフルボ酸P V P吸着画分のエタノール可溶画分、不溶画分およびP V P通過画分のエタノール可溶画分、不溶画分について分析した。

ヘキソースの定量は、立川（1966）のアンスロン—硫酸法に準じて行なった。試料溶液2mlに、0.2%アンスロン—濃硫酸溶液4mlを加え、よく攪拌し、放冷した後、625nmの吸光度を測定した。標準曲線はグルコースを用いて作成した（0-20 μ g/ml）。

ペントースの定量には、オルシノール—塩酸法（福井 1969）を用いた。試料溶液2mlに、1%塩化鉄(III)—濃塩酸溶液2mlと1%オルシノール—エタノール溶液2mlを加え、冷やしながら混和した後、よく攪拌し、ガラス玉をのせ、沸騰水浴中で20分加熱した。氷冷後、同溶液の660nmの吸光度を測定した。標準曲線はL(+)-アラビノースを用いて作成した（0-10 μ g/ml）。なお、この方法では、ウロン酸も発色するため、D-グルクロン酸（0-10 μ g/ml）を用いて作成した検量線と、各試料のウロン酸含量から、ウロン酸による発色分を算出して差し引いた。

ウロン酸の定量には、カルバゾール—硫酸法を用いた（福井 1969）。0.95%ホウ酸ナトリウム—濃硫酸溶液2.5mlを氷冷し、その上に試料溶液0.5mlを静かにのせ、最初はゆっくり、次に激しく混和した。ガラス玉をのせ、沸騰水浴中で10分間加熱後、氷冷して室温とした。さらに、カルバゾール—メタノール溶液0.1mlを加えて攪拌し、沸騰水浴中で15分間加熱した後、氷冷し、530nmの吸光度を測定した。標準曲線はD-グルクロン酸を用いて作成した（0-40 μ g/ml）。

PVP吸着-エタノール可溶・不溶両画分については、それぞれ呈色試薬のかわりに濃硫酸、エタノールあるいはメタノールを同量加えて同様の処理を行なったものの吸光度を対照として差し引いた。PVP通過-エタノール可溶・不溶両画分については、いずれも呈色試薬を加えない場合には、吸光度をもたなかった。

結果および考察

PVP吸着画分のエタノール可溶画分および不溶画分の糖含量を表4-12に示した。エタノール可溶画分の糖含量はきわめて低く、ヘキソース含量は1.3-2.1%、ペントース含量は0.4-1.3%、ウロン酸含量は0.5-0.9%で、3種の糖の合計は2.4-3.7%であった。ヘキソース含量およびウロン酸含量は、Tsutsuki・Kuwatsuka (1979a) が報告している腐植酸の値とほぼ等しかった。

PVP吸着-エタノール不溶画分の糖含量は、ヘキソース9.3-18%、ペントース2.9-8.5%、ウロン酸3.4-8.8%で、全糖含量は17-30%であった。これらの結果から、PVP吸着画分中のエタノール可溶性物質は構造中に糖鎖をほとんど含まず、一方、エタノール不溶物質は糖と結合した形態をもつことが推定された。

表4-13にはPVP通過画分のエタノール可溶画分、エタノール不溶画分の糖含量を示した。3種の糖の含量はいずれもエタノール不溶画分においてより高く、ヘキソース含量は12-22%、ペントース含量は2.4-8.5%、ウロン酸含量は8.6-15%であった。全糖含量は23-42%に達した。また、いずれの試料でもその約1/2がヘキソースであった。

段戸土壌（褐色森林土）および猪之頭土壌（黒ボク土）のPVP通過-エタノール可溶画分では、いずれの糖の含量も3%未満で、合計は6%前後であった。このことから、両土壌の同画分のIRスペクトル（本章第4項）にみられた1090および1030 cm^{-1} のピークは、糖以外のアルコールC-Oに起因していることが確認された。一方、長野土壌（低地水田土）のPVP通過-エタノール可溶画分では、ウロン酸含量は2.6%と他の土壌とほぼ同じであったが、ヘキソース、ペントースの含量が高く、糖含量の合計は12%と他の2試料の約2倍であった。

表4-12 PVP吸着-エタノール可溶画分、エタノール不溶画分の糖含量

試料	ヘキソース	ペントース	ウロン酸	合計
PVP吸着-				
エタノール可溶画分				
段戸(褐色森林土)	1.28(%)	0.39(%)	0.71(%)	2.38(%)
猪之頭(黒ボク土)	2.10	0.75	0.87	3.72
長野(低地水田土)	1.43	1.25	0.45	3.13
PVP吸着-				
エタノール不溶画分				
段戸	10.47(%)	2.87(%)	3.61(%)	16.95(%)
猪之頭	17.95	2.89	8.84	29.68
長野	9.27	8.46	3.36	22.09

表4-13 PVP通過-エタノール可溶画分、エタノール不溶画分の糖含量

試料	ヘキソース	ペントース	ウロン酸	合計
PVP通過-				
エタノール可溶画分				
段戸(褐色森林土)	2.78(%)	0.77(%)	2.43(%)	5.98(%)
猪之頭(黒ボク土)	2.95	0.85	2.45	6.25
長野(低地水田土)	5.65	3.63	2.57	12.42
PVP通過-				
エタノール不溶画分				
段戸	12.08(%)	2.45(%)	8.61(%)	23.14(%)
猪之頭	17.99	2.40	14.58	34.97
長野	22.38	8.54	11.15	42.07

しかしながら、この値は同土壌のPVP通過-エタノール不溶画分の全糖含量(42%)に比べればはるかに低いものであった。

糖含量の土壌間の差は、特にPVP吸着-エタノール不溶画分およびPVP通過-エタノール不溶画分で明確であり、両画分とも、ウロン酸含量は黒ボク土試料(猪之頭)で、ペントース含量は低地水田土試料(長野)で最も高かった。同じ傾向は、ペントースについてはPVP吸着-エタノール可溶画分およびPVP通過-エタノール可溶画分で、ウロン酸についてはPVP吸着-エタノール可溶画分でも認められた。Yoshidaら(1979)は、埋没腐植質火山灰土壌のフルボ酸に含まれているウロン酸とヘキソースの比が、年代が古くなるにつれて大きくなることを報告しており、黒ボク土ではフルボ酸中のウロン酸が安定に保持されていることが推定された。また、ウロン酸が粘土についた多価カチオンと結合することによって団粒形成に参加していることは以前から考えられており(Cheshire 1979)、黒ボク土試料でウロン酸含量が高かったのは、同タイプの土壌に豊富に含まれているA1等の多価カチオンとの結合によって安定化しているためと推定した。

低地水田土の各画分で、きわめて含有量の高かったペントースは、ウロン酸とは逆に植物残さに由来していると考えられる。イネ科植物のヘミセルロースの主成分であるキシランは、多糖の中でも微生物分解に対する高い抵抗性をもつことが知られており(Mehtaら 1961)、泥炭の深さ3.6mの地点において他の糖の2-3倍量のキシロースが検出された例が報告されている(Cheshire 1979)。同様に、水田土壌中にもキシロースが多く含まれていることが明らかにされており(管家 1988)、本研究において低地水田土のフルボ酸各画分でペントースが多量に検出されたのも、イネ由来のキシロースによるところが大きいと推定した。

7. 分子粒径分布

フルボ酸分子は環境条件によって形状が変化する、すなわち高濃度、低pH、高イオン強度条件下においては凝縮し、濃度の低下、pHの上昇およびイオン強度の減少に伴って分子粒径が広がることが知られている (Schnitzer 1986)。また、Tsutsuki・Kuwatsuka (1984) は、同様のことを腐植酸分子について報告している。このような形状の変化は、フルボ酸など高分子電解質物質の特徴のひとつとして、その土壌中における挙動を考える際には考慮に入れなければならないことではあるが、分子ふるいによる分子量の測定には障害となる。しかしながら、測定条件を一定にすることによって、試料間の分子粒径分布の比較は可能である。

フルボ酸あるいは腐植酸のゲルクロマトグラフィーを行なう際には、さらに腐植物質とゲルとの吸着が問題となる。そのため、Sephadexと腐植酸との非可逆的吸着を防ぐために溶離液 (0.1N NaOH) に尿素を加えるなどの工夫がこれまで行なわれてきた (米林・服部 1977)。Sephadexに比べ、多孔質ガラスの場合には、表面が負の電荷をもっているため、蛋白質、特に塩基性蛋白質等は強く吸着されるが、腐植酸やフルボ酸では吸着は起きない。

そこで、本項では、多孔質ガラスCPG-10を用いてパーミエーションクロマトグラフィーを行ない、フルボ酸各画分の分子粒径分布を明らかにした。著者ら (鍛塚ら 1988) は先に、CPG-10を用いて、P型腐植酸のSephadexG-50によるゲルクロマトグラフィーによって低分子画分として得られる緑色画分 (Pg画分) の分子粒径が、実は腐植酸のなかでも中程度であり、低分子画分として他の腐植酸分子から分離されるのは分子量が小さいからではなく、Sephadexへの吸着のためであることを明らかにした。

試料および方法

本章第2項で調製したフルボ酸各画分および腐植酸について分析した。

フルボ酸各画分は、それぞれ3.0mgを溶離液1mlに溶解した。腐植酸は、粉末試料からでは溶離液に溶けにくいため、炭素含量2mg相当量をいったん 0.1N

NaOH 5mlに溶解し、1N HCl 1mlを加えて沈殿させ、遠心分離し、上澄液を除去した後に、溶離液2mlに溶解した。各試料溶液は、濾過（メンブランフィルター、孔径0.45 μ m）した後、25 μ lまたは50 μ lをCPG-10（公称孔径170 \AA 、Electro-Nucleonics社製）を充填したカラム（内径8.2mm \times 高さ100cm）に添加し、流速1.0ml/minで溶出した。溶離液には、りん酸を用いてpHを7.5に調整した0.05M Tris-buffer（イオン強度0.0585）を、濾過、脱気して用いた。ポンプはWaters Associate Model 6000Aを用い、検出は250nmの吸光度（島津分光光度検出器SPD-6AV）によって行なった。

ボイド容量（ V_0 ）、ゲル粒子内溶媒容量（ V_i ）は、それぞれ、Blue Dextran 2000（Pharmacia社製）、ベンジルアルコールによって求めた。また、デキストランD-9260（M.W.9,400）、D-4133（M.W.40,000）、D-5001（M.W.173,000）およびD-5251（M.W.500,000、以上Sigma社製）を示差屈折計（Waters社製、R-400型）によって検出し、校正曲線を作成した。

結果

(1)未分画フルボ酸、PVP吸着画分、PVP通過画分および腐植酸の分子粒径分布

図4-10に未分画フルボ酸とそのPVP吸着画分、PVP通過画分および腐植酸の溶出曲線を示した。いずれの画分も V_0 を除けばピークはひとつであった。排除画分の割合は、腐植酸で最も高く、次いでPVP通過画分、未分画フルボ酸、PVP吸着画分の順であった。腐植酸とフルボ酸各画分との差は大きく、腐植酸がフルボ酸のいずれの画分よりも大きい分子粒径を持つことは明らかであった。

PVP吸着画分とPVP通過画分の溶出曲線を比較すると、PVP吸着画分の方がピークがやや低分子側にあり、分布域も狭かった。通過画分は、高分子側、低分子側の両方に広がって分布しており、特にフルボ酸の高分子粒径部は、PVPに対して吸着性を持たない物質の占める割合が高いことが明らかになった。

表4-14にはデキストランを用いて作成した校正曲線より求めたフルボ酸各画

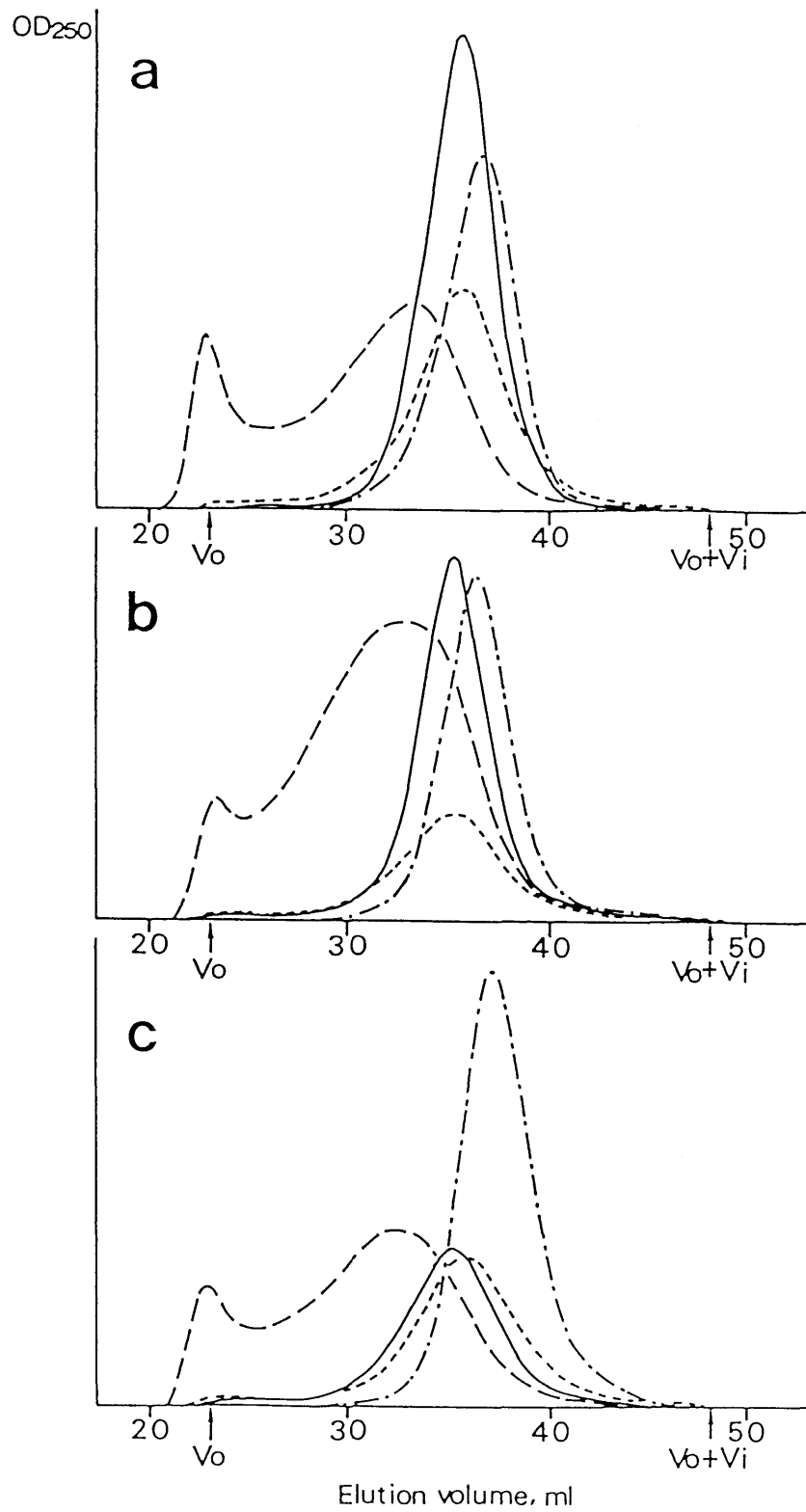


図4-10 未分画フルボ酸、PVP吸着画分、PVP通過画分および腐植酸の分子粒径分布
 a: 段戸 (褐色森林土)、b: 猪之頭 (黒ボク土)、c: 長野 (低地水田土)
 — 未分画フルボ酸、- - - PVP吸着画分、..... PVP通過画分、- · - 腐植酸

表4-14 未分画フルボ酸およびPVP吸着画分、PVP通過画分の平均分子量

	数平均分子量 \bar{M}_n	重量平均分子量 \bar{M}_w	多分散度 $d(\bar{M}_w/\bar{M}_n)$
未分画フルボ酸			
段戸(褐色森林土)	13,300	21,100	1.78
猪之頭(黒ボク土)	11,800	21,100	1.59
長野(低地水田土)	11,400	23,000	2.02
PVP吸着画分			
段戸	14,400	19,700	1.37
猪之頭	13,100	17,100	1.31
長野	14,100	18,500	1.31
PVP通過画分			
段戸	10,800	21,800	2.02
猪之頭	10,400	26,500	2.54
長野	8,930	24,400	2.73

分の数平均分子量 (\bar{M}_n) と重量平均分子量 (\bar{M}_w) を示した。平均分子量の算出はTsutsuki・Kuwatsuka (1989) に従い、以下の式を用いて行なった。

$$\bar{M}_n = \sum n_i M_i / \sum n_i = \sum c_i / \sum (c_i / M_i)$$

$$\bar{M}_w = \sum n_i M_i^2 / \sum n_i M_i = \sum c_i M_i / \sum c_i$$

n_i は分子*i*の分子数、 M_i は分子*i*の分子量、 c_i は分子*i*の濃度 (g/l) である。ここでは、溶出量 x_{iml} の際の吸光度を c_i として計算した。表に同時に示した多分散度 (d) は、 \bar{M}_w と \bar{M}_n の比で、分子量の広がりを表す指標 (値が1に近いほど正規分布に近い) となる。

\bar{M}_n は、フルボ酸の PVP 吸着画分で13,100-14,400、PVP 通過画分で8,900-10,800と、いずれの土壌においても吸着画分の方が高かった。これに対し \bar{M}_w は、PVP 吸着画分で17,100-19,700、PVP 通過画分で21,800-26,500と、逆に通過画分の方が高かった。これは、PVP 吸着画分は分布域が狭く、ピーク (いずれも分子量約19,500) に近い分子量をもつ分子の占める割合が高かったのに対し、分布域の広い PVP 通過画分では、 \bar{M}_n に低分子の影響が強くなったためである。フルボ酸のような多分散系の物質群の場合には、 \bar{M}_w の方が全体の傾向をよく反映していると考えられる。

(2) PVP 吸着-エタノール可溶画分、不溶画分の分子粒径分布

図4-11には PVP 吸着画分のエタノール可溶画分、不溶画分の溶出曲線を示した。PVP 吸着-エタノール不溶画分の分子粒径は、エタノール可溶画分の分子粒径と比較して明らかに高分子側に広がって分布していた。分画前の PVP 吸着画分の溶出曲線では、排除画分およびその付近の分布はほとんど確認できず、デキストラン換算で分子量約60,000以上の物質は、エタノール不溶性であることが推定された。ピークは両画分ともひとつであったが、エタノール不溶画分のピークがブロードであったのに対し、エタノール可溶画分のピークはシャープで、分子粒径がかなり均一であることが示された。

表4-15には両画分の平均分子量を示した。エタノール可溶画分の \bar{M}_w は PVP 吸着画分より小さく、12,800-14,200であった。これに対し、エタノール不溶画分の \bar{M}_w は24,700-29,600と大きく、可溶画分の約2倍であった。平均分子

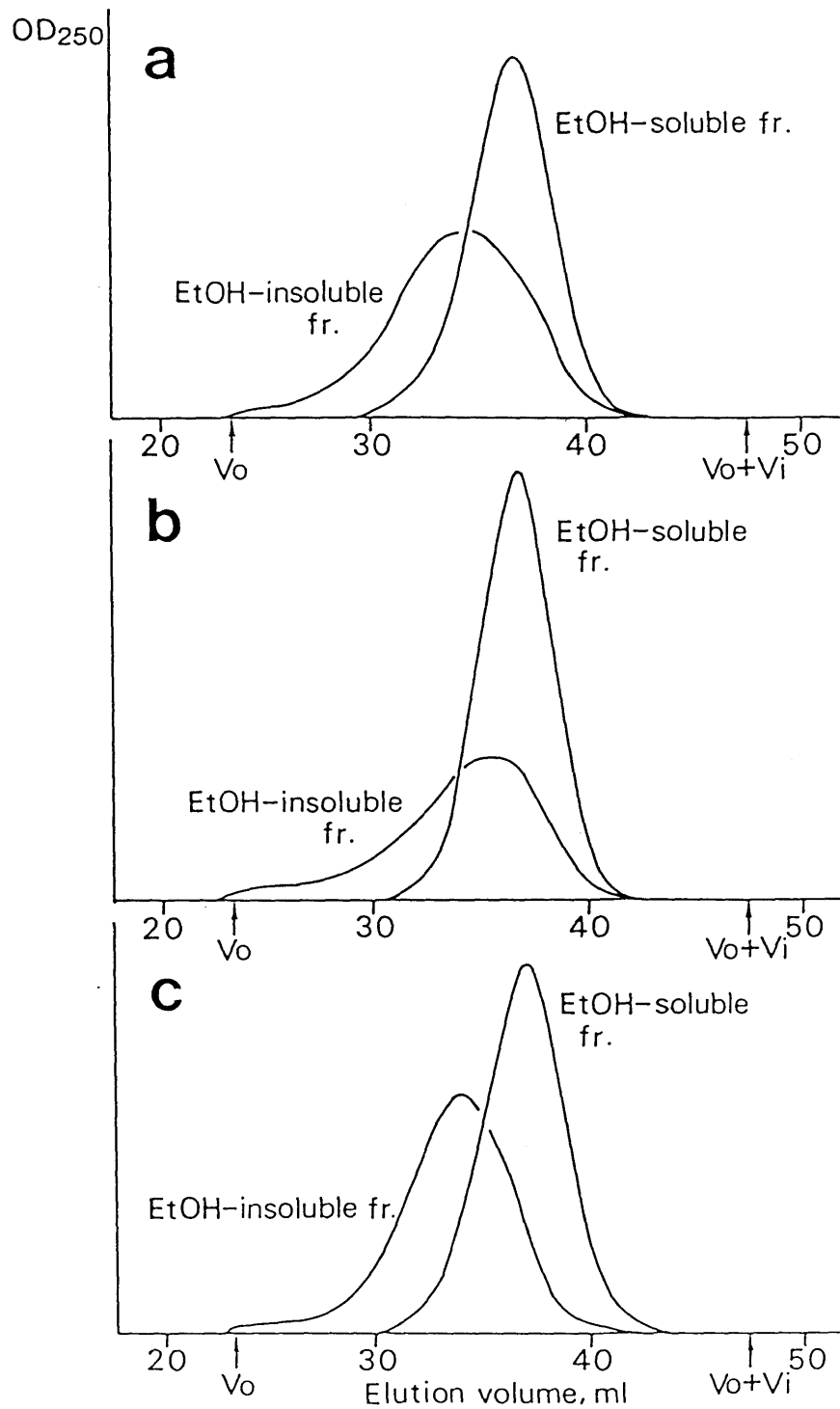


図4-11 PVP吸着-エタノール可溶画分、エタノール不溶画分の分子粒径分布
 a : 段戸 (褐色森林土)、b : 猪之頭 (黒ボク土)、c : 長野 (低地水田土)

表4-15 PVP吸着-エタノール可溶画分、エタノール不溶画分の平均分子量

	数平均分子量 \bar{M}_n	重量平均分子量 \bar{M}_w	多分散度 $d(\bar{M}_w/\bar{M}_n)$
PVP吸着-			
エタノール可溶画分			
段戸(褐色森林土)	14,000	12,800	0.91
猪之頭(黒ボク土)	11,400	14,200	1.25
長野(低地水田土)	8,020	13,700	1.71
PVP吸着-			
エタノール不溶画分			
段戸	19,800	25,900	1.30
猪之頭	18,100	29,600	1.64
長野	14,300	24,700	1.73

量の算出には、排除画分として検出された物質は含んでいないため、実際には不溶画分の平均分子量はさらに大きく、したがって、可溶画分との差もより大きいものと推定された。

(3) P V P 通過—エタノール可溶画分、エタノール不溶画分の分子粒径分布

図4-12にはP V P 通過画分のエタノール可溶画分、不溶画分の溶出曲線を示した。エタノール可溶画分の分子粒径は低分子側に、エタノール不溶画分の分子粒径は高分子側にそれぞれ広がって分布する傾向が認められた。また、ピーク的位置もエタノール可溶画分の方が低分子側に認められた。

表4-16には両画分の平均分子量を示した。可溶画分の平均分子量は、フルボ酸の分画で得られた画分の中で最も小さく、 \bar{M}_n は2,600-4,900、 \bar{M}_w は8,800-10,500であった。一方、エタノール不溶画分の \bar{M}_n は可溶画分の約2-4倍、 \bar{M}_w は約1.5-2倍であり、両画分の分子量の差は明確であった。しかしながら、エタノール不溶画分の \bar{M}_w (15,700-23,000) は、P V P 通過画分の \bar{M}_w を下回るものであった。これは、P V P 通過画分中におけるエタノール可溶性物質と不溶性物質、あるいは不溶性物質間の緩やかな結合が、エタノールを用いた分画によって切れたためと推察した。

考察

パーミエーションクロマトグラフィーによって分子量を求めるときには、対象となる物質が V_0 と V_0+V_i の間に溶出される濾過剤を選択することが重要であり、場合によっては2種類あるいはそれ以上の濾過剤を用いることもある(志村ら1978)。今回用いた孔径170ÅのCPG-10では、腐植酸はその8-15%が V_0 に溶出したため、平均分子量の算出は行わなかった。フルボ酸の場合にも、P V P 通過画分やP V P 吸着、通過両画分のエタノール不溶画分では V_0 に溶出が認められたが、その量は最も多いものでも試料の2.6%だったため除外して平均分子量の算出を行なった。

パーミエーションクロマトグラフィーの結果は、エタノールに対する溶解性に基づく分画で得られたエタノール可溶画分、不溶画分の分子量が異なる(不

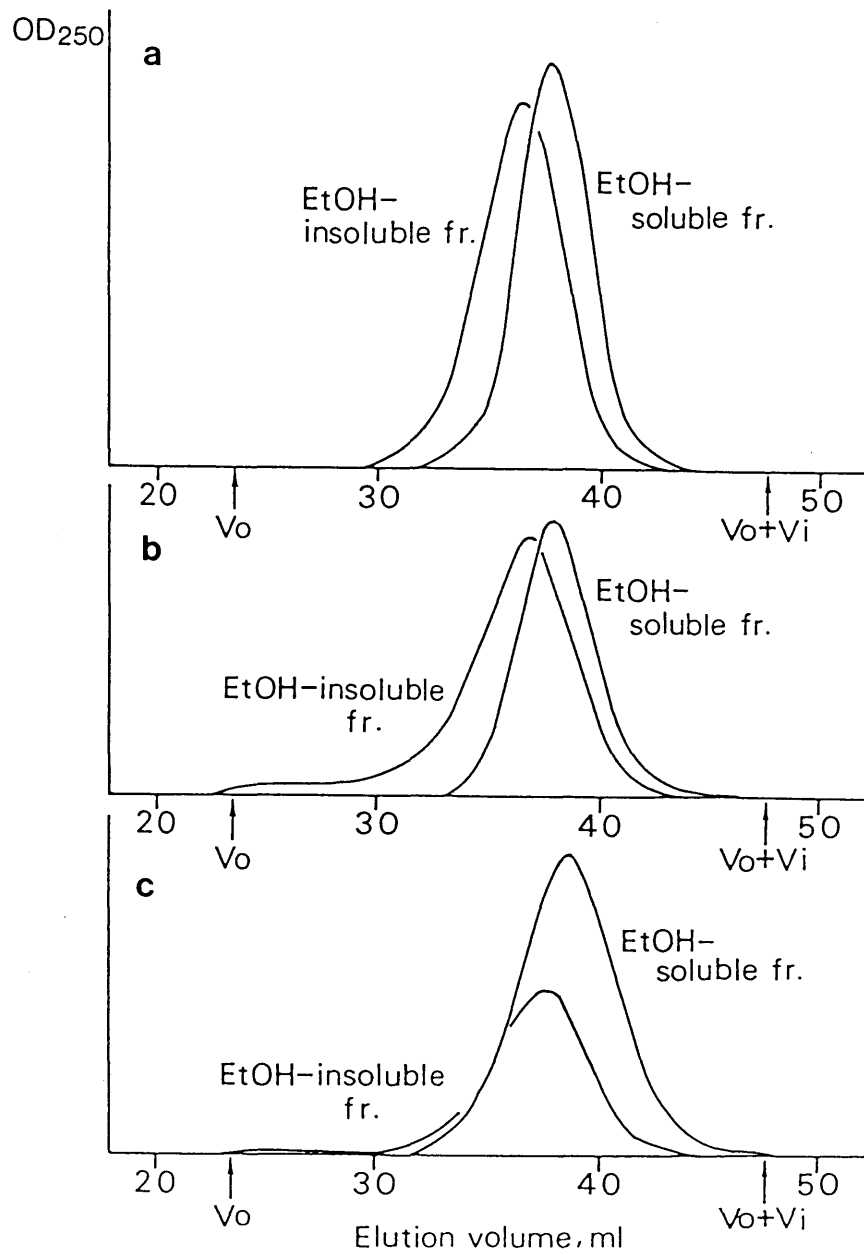


図4-12 PVP通過-エタノール可溶画分、エタノール不溶画分の分子粒径分布

a : 段戸 (褐色森林土)、b : 猪之頭 (黒ボク土)、c : 長野 (低地水田土)

表 4 - 1 6 PVP 通過 - エタノール可溶画分、エタノール不溶画分の平均分子量

	数平均分子量 \bar{M}_n	重量平均分子量 \bar{M}_w	多分散度 $d(\bar{M}_w/\bar{M}_n)$
PVP 通過 -			
エタノール可溶画分			
段 戸 (褐色森林土)	4,830	10,500	2.17
猪之頭 (黒ボク土)	3,880	9,470	2.44
長 野 (低地水田土)	2,570	8,800	3.43
PVP 通過 -			
エタノール不溶画分			
段 戸	11,900	15,700	1.32
猪之頭	7,750	18,700	2.41
長 野	11,400	23,000	2.02

溶画分>可溶画分)ことを明らかにした。また、エタノール不溶画分の分子粒径分布が広範囲にわたっており、様々な分子粒径をもつ物質によって構成されていることが示唆された。一方、エタノール可溶画分、特にPVP吸着-エタノール可溶画分の溶出曲線はシャープで多分散度が低く、多くの分子が13,000に近い分子量を持つことが推定された。PVP吸着-エタノール不溶画分の多分散度が1.3-1.7と低い値であったのは、分子量を算出する際に排除画分を計算に入れなかったため、排除画分を無視した場合、同画分の分子粒径分布は正規分布に近いことになる。

腐植酸の分子粒径は、フルボ酸各画分の中で最も大きい分子粒径を示したPVP吸着-エタノール不溶画分と比較しても明らかに大きかった。Tsutsuki・Kuwatsuka (1989)は、排除限界が今回用いたCPG-10の10倍以上である公称孔径500ÅのCPG-10を用いて腐植酸のパーミエーションクロマトグラフィーを行なっているが、その際にもやはり V_0 に溶出が認められている。したがって、分子粒径分布は、吸光特性と共にフルボ酸と腐植酸とで明確に異なる性質のひとつであるといえる。

8. ^{13}C -NMR

^{13}C -NMRの腐植の研究への導入は、近年、急速に進んだ。これは、ひとつには、フーリエ変換法の開発によって腐植のような高分子物質についても情報が得られるようになったためであり、もうひとつはCP-MAS（交差分極-マジック角回転）法により固体高分解能NMRスペクトルの測定が可能になったためである（斉藤 1986）。 ^{13}C CP-MAS NMRは、溶媒を必要としないことからヒューミンや土壌全体についても測定が可能であり、最近ではむしろ固体NMRの方が多く用いられている（Hatcherら 1986、Arshadら 1988、Kogelら 1988）。しかしながら、固体試料の ^{13}C -NMRスペクトルは液体試料のスペクトルに比べるとブロードであり、ヘテロ原子置換芳香族炭素（主にフェノール）の吸収帯とカルボニル炭素の吸収帯が重なっている等の欠点があり（Schnitzer・Preston 1986）、スペクトルの解析に関しては液体のスペクトルの方が適している。

本項では、フルボ酸各画分および腐植酸の液体試料を用い、反転ゲートデカップリング法によって、 ^{13}C -NMRスペクトルの測定を行なった。通常の ^{13}C -NMRスペクトル測定では、スピナー格子緩和時間が長いことと核オーバーハウザー効果の存在によって定量的なスペクトルを得ることはできない。しかしながら、シグナルを取り込む間のみプロトンを照射し、その後、十分なパルス遅延時間をとることにより、ピーク面積が炭素数と比例したスペクトルを得ることが理論的に可能である（反転ゲートデカップリング法）。特に芳香族炭素については、他に直接的な定量法がないため、きわめて有効な手段である。

試料および方法

^{13}C -NMRスペクトルの測定は、以下の試料について行なった。

未分画フルボ酸----段戸（褐色森林土）、猪之頭（黒ボク土）、
長野（低地水田土）、

PVP吸着画分----段戸、猪之頭、長野、
PVP通過画分----段戸、猪之頭、長野、
PVP吸着-エタノール可溶画分----段戸、猪之頭、長野、
同 -エタノール不溶画分----猪之頭、
PVP通過-エタノール可溶画分----猪之頭、
同 -エタノール不溶画分----段戸、猪之頭、長野、
腐植酸----猪之頭、長野

PVP通過画分はD₂O、未分画フルボ酸、PVP吸着画分は0.5N NaODに、それぞれ100-300mg/mlとなるように溶かした。また、腐植酸は0.5N NaODに100 mg/mlとなるように溶かした。これらの試料の¹³C-NMRは、外部基準としてTMSを用いるか、あるいは内部基準としてジオキサソを用いて、JEOL JNM FX-200により以下の条件で測定した。

データポイント数：16384	45°パルス
観測周波数幅：12004Hz	観測周波数：50.20MHz
測定法：反転ゲートデカップリング法	パルス遅延時間：4.3秒
積算回数：23,000-30,000回	

PVP通過-エタノール不溶画分はD₂O、PVP通過-エタノール可溶画分およびPVP吸着-エタノール可溶・不溶両画分は0.2N NaODに、それぞれ75-200mg/mlとなるように溶かした。これらの試料の¹³C-NMRは、TMSを外部基準として、BRUKER MSL 200により以下の条件で測定した。

データポイント数：16384	45°パルス
観測周波数幅：25000Hz	観測周波数：50.33MHz
測定法：反転ゲートデカップリング法	パルス遅延時間：4.3秒
積算回数：4,300-15,000回	

フルボ酸の測定に対する十分なパルス遅延時間としては5秒 (Wilson・Goh 1983)、10秒 (Preston・Blackwell 1985) などが提案されているが、井藤 (1984) は4.3秒でもカルボニル炭素のシグナル強度の減少は起きないことを確認しており、本研究でも4.3秒とした。

結果

(1)未分画フルボ酸、PVP吸着画分、PVP通過画分の ^{13}C -NMRスペクトル

図4-13に、猪之頭土壌（黒ボク土）の未分画フルボ酸およびそのPVP吸着画分、通過画分の ^{13}C -NMRスペクトルを示した。未分画フルボ酸の ^{13}C -NMRスペクトルには、10-48ppmに脂肪族炭素、110-165ppmに芳香族炭素のブロードな吸収帯が、48-110ppmにヘテロ原子（酸素、窒素等）によって置換された脂肪族炭素、165-192ppmにカルボニル炭素のより鋭い吸収が認められた。48-110ppmに認められたシグナルのうち、63ppmの鋭いピーク（第1アルコール）、78-86ppmの強い吸収帯（第2アルコール）および95-110ppmの吸収帯（アセタール）は、糖のスペクトルに特有な吸収で、それぞれ、ヘキソース C_6 あるいはペントース C_5 、ヘキソース C_2 - C_5 あるいはペントース C_2 - C_4 、ヘキソースおよびペントース C_1 に帰属した（石塚 1975）。一方、48-60ppmにみられたシグナルは、メトキシル基あるいはアミノ酸に起因すると推定した。

これらのシグナルはPVPによる分画後、きわめて興味深い分布を示した。すなわち、芳香族炭素の吸収帯は、PVP吸着画分のスペクトルで非常に強く、一方、炭水化物炭素の各吸収帯はPVP通過画分のスペクトルでより強かった。これらの結果は、PVP吸着画分には腐植物質、PVP通過画分には非腐植物質がそれぞれ濃縮されたことを示したものと見える。また、未分画フルボ酸のスペクトルの10-48ppmに認められたアルキル炭素によるブロードな吸収帯はPVP吸着画分のスペクトルにのみ認められ、一方、この吸収帯上にみられた小さく鋭いいくつかのピークは、いずれも、PVP通過画分のスペクトルにのみ認められた。

カルボニル炭素によるシグナルは、PVP吸着・通過両画分のスペクトルで認められたが、その化学シフトは異なっていた。一般にカルボニル炭素のシグナルは、エステル、酸、アルデヒドおよびケトンの順で低磁場にシフトしてみられ、さらにカルボキシル基のうち、飽和カルボン酸のシグナルは、不飽和カルボン酸よりも低磁場に現われる（斉藤・田中 1975）。PVP通過画分のス

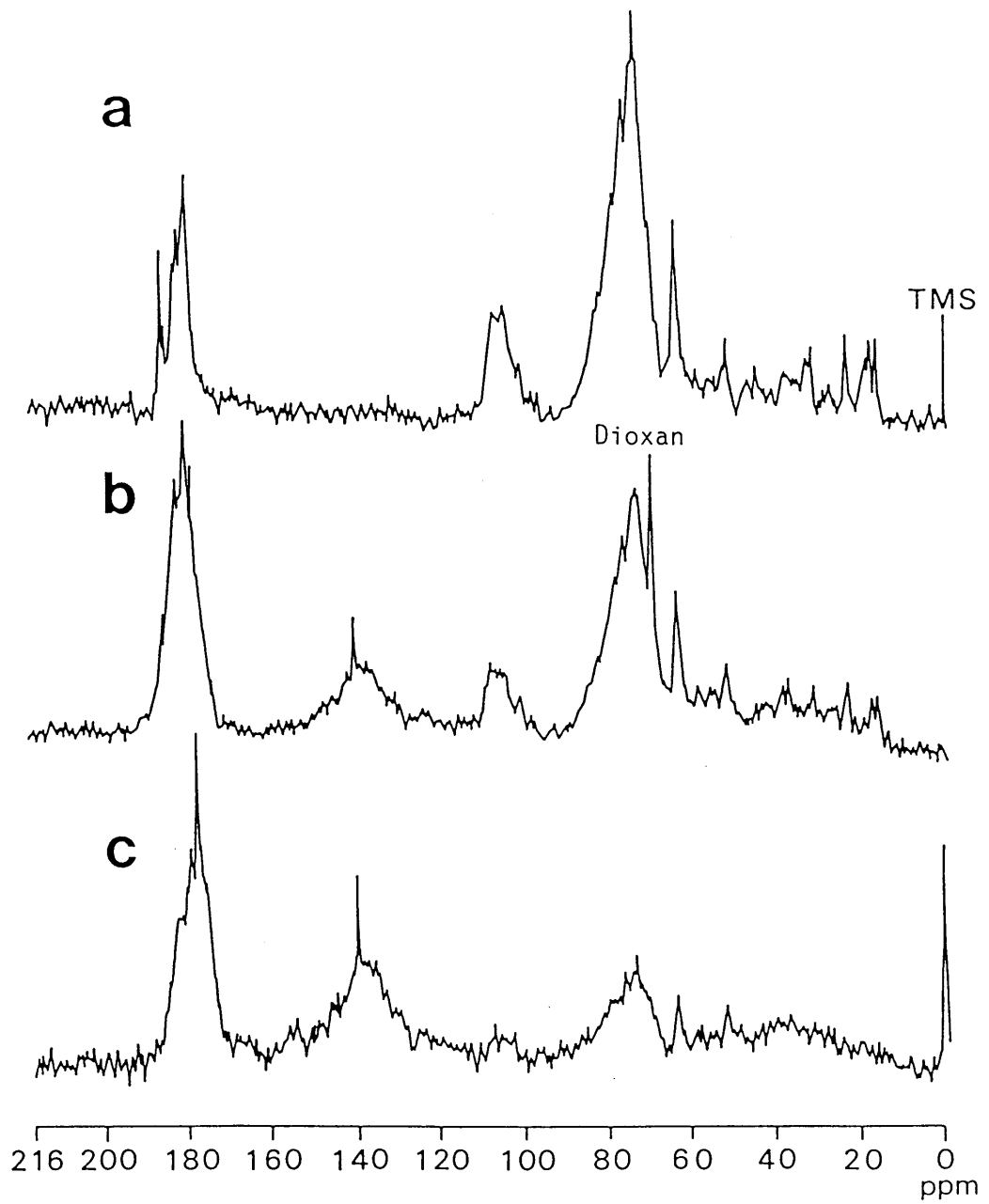


図4-13 未分画フルボ酸およびPVP吸着画分・通過画分の ^{13}C -NMRスペクトル(猪之頭-黒ボク土)
 a: PVP通過画分、b: 未分画フルボ酸、c: PVP吸着画分

ペクトルに認められたシグナル (179.4、182.3、185.7ppm) は、いずれも飽和カルボン酸のカルボキシル基によると推定した。PVP吸着画分のスペクトルでは、主たる吸収帯は、178.0ppmをピークにして両側に広がっており、エステル、不飽和および飽和カルボン酸の各種のシグナルから構成されているものと推定した。

フルボ酸各画分の ^{13}C -NMRスペクトルは、上記のように解析した後、全域を飽和脂肪族炭素域 (10-60ppm)、炭水化物炭素域 (60-110ppm)、芳香族およびアルケン炭素域 (110-165ppm)、カルボニル炭素域 (165-216ppm) の4領域に区分し、各領域の面積の全面積に対する割合から炭素の組成を求めた。一般に、ヘテロ原子で置換されたアルキル炭素の化学シフトは105ppmより高磁場とされており、腐植の定量分析においても105ppmを境界としている例は多い (Wershaw 1985)。しかしながら、フルボ酸の ^{13}C -NMRスペクトルでは、アセタールの吸収帯が110ppm付近にまで広がって現われたため、本研究では110ppmで炭水化物炭素領域と芳香族炭素領域を区分した。Preston・Blackwell (1985) は、腐植酸については105ppm、フルボ酸については110ppmを境界としているが、ここでは110ppmに統一した。

各土壌の未分画フルボ酸およびPVP吸着・通過両画分の炭素組成を表4-17に示した。PVP吸着画分の炭素組成をみると、いずれもカルボニル炭素の含有率が30-32%と最も高く、炭水化物炭素をなお19-22%含んでいるというように同じ傾向を示し、土壌間の差は各炭素の含有率とも5%以内であった。PVP通過画分の炭素組成も、3土壌で類似しており、炭水化物炭素の含有率が43-53%と全体の約1/2を占めた。飽和脂肪族炭素の含有率は、PVP吸着・通過両画分とも19-24%であったが、その性格が吸着画分と通過画分とで大きく異なると推定されたことは先に記した。

(2) PVP吸着-エタノール可溶画分・不溶画分の ^{13}C -NMRスペクトル

図4-14には各土壌のフルボ酸PVP吸着画分から得られたエタノール可溶画分の ^{13}C -NMRスペクトルを、図4-15には猪之頭 (黒ボク土) のエタノール

表4-17 未分画フルボ酸およびPVP吸着画分、PVP通過画分の炭素組成

	飽和脂肪族 炭素 (10-60ppm)	炭水化物 炭素 (60-110ppm)	芳香族および アルケン炭素 (110-165ppm)	カルボニル 炭素 (165-216ppm)
未分画フルボ酸				
段戸(褐色森林土)	24.1(%)	29.5(%)	17.7(%)	28.7(%)
猪之頭(黒ボク土)	17.6	38.6	16.9	26.9
長野(低地水田土)	17.1	41.5	17.0	24.4
PVP吸着画分				
段戸	21.6(%)	20.5(%)	25.0(%)	32.9(%)
猪之頭	18.7	21.6	28.9	30.8
長野	20.4	19.4	30.0	30.2
PVP通過画分				
段戸	24.0(%)	43.4(%)	10.0(%)	22.6(%)
猪之頭	18.6	53.0	6.9	21.5
長野	21.7	45.4	11.1	21.8

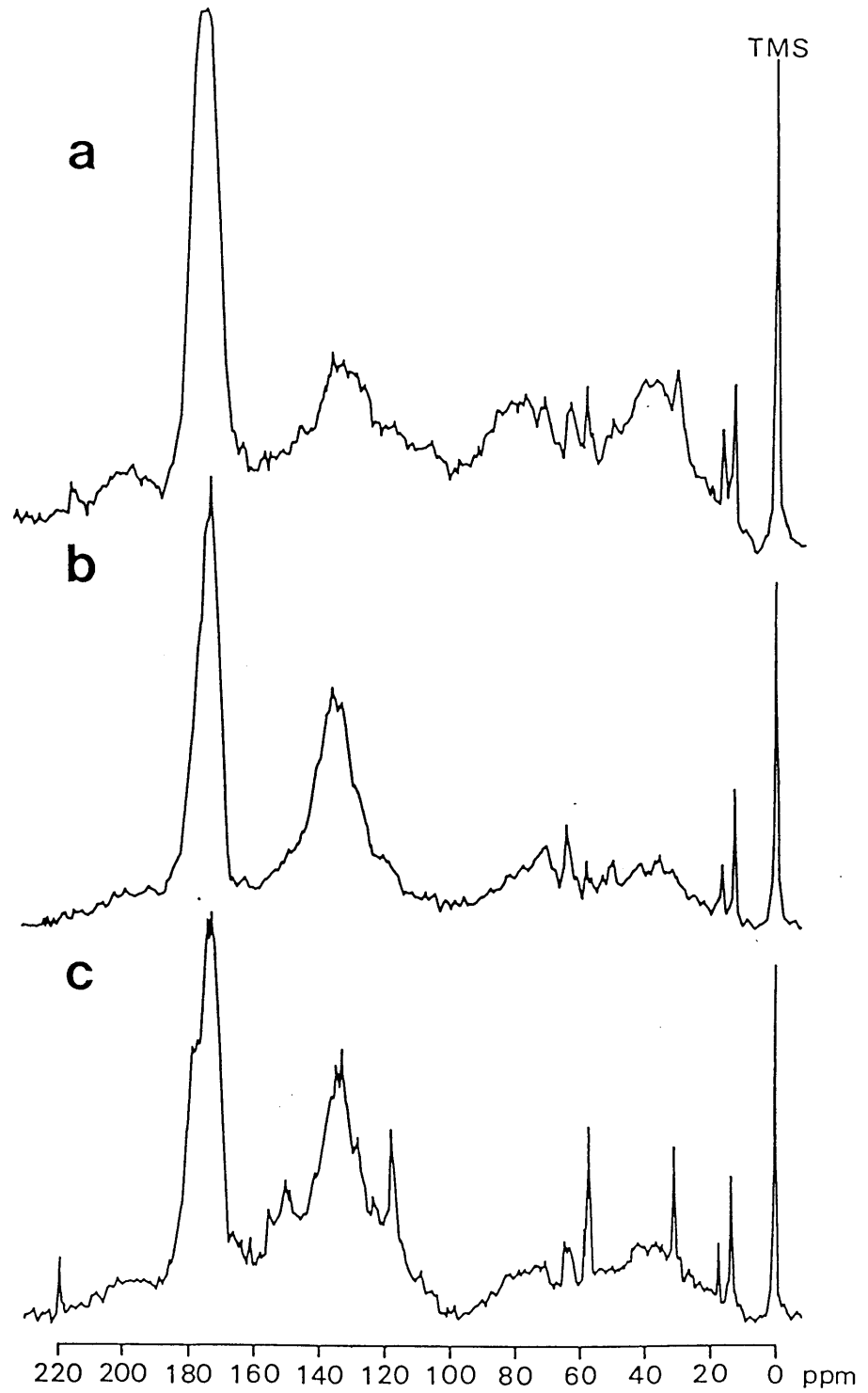


図4-14 PVP吸着-エタノール可溶画分の ^{13}C -NMRスペクトル
 a: 段戸(褐色森林土)、b: 猪之頭(黒ボク土)、c: 長野(低地水田土)

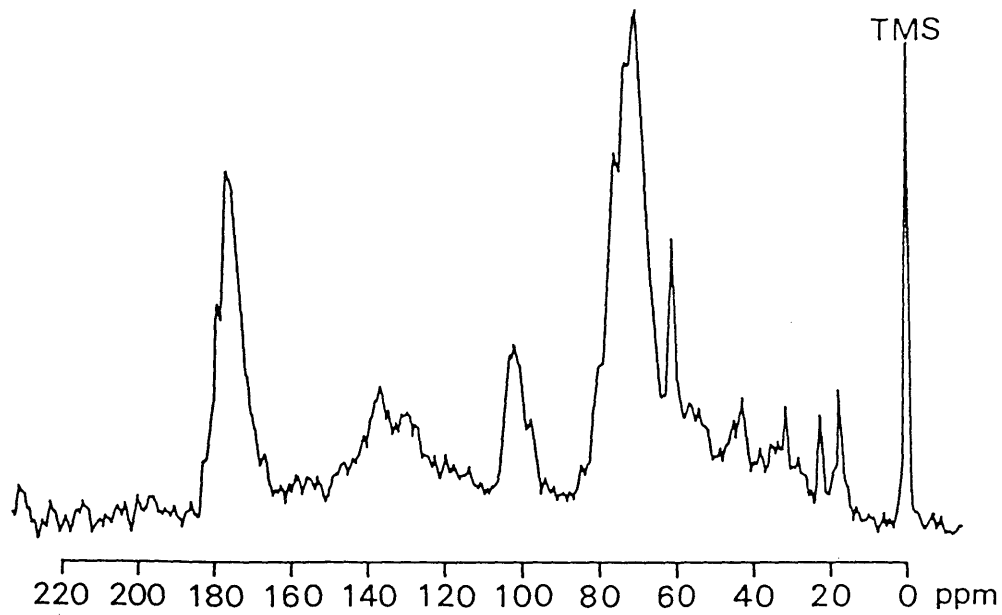


図4-15 猪之頭（黒ボク土）PVP吸着-エタノール不溶画分の¹³C-NMRスペクトル

表4-18 PVP吸着-エタノール可溶画分、エタノール不溶画分の炭素組成

	飽和脂肪族 炭素 (10-60ppm)	炭水化物 炭素 (60-110ppm)	芳香族および アルケン炭素 (110-165ppm)	カルボニル 炭素 (165-216ppm)
PVP吸着-				
エタノール可溶画分				
段戸（褐色森林土）	20.7(%)	18.5(%)	28.6(%)	32.2(%)
猪之頭（黒ボク土）	16.1	13.3	38.1	32.5
長野（低地水田土）	18.1	10.0	41.7	30.2
PVP吸着-				
エタノール不溶画分				
猪之頭	18.5(%)	43.3(%)	19.8(%)	18.5(%)

不溶画分のスペクトルを示した。また、両画分の炭素組成を表4-18に示した。

猪之頭土壌由来のPVP吸着-エタノール可溶画分とエタノール不溶画分の ^{13}C -NMRスペクトルは、両者の構造の違いを反映して各領域ともかなり相違がみられた。エタノール可溶画分の脂肪族炭素域には、約30ppmを中心とした弱くブロードな吸収帯のほか、13.0、16.7ppmにメチル基によると推定されるシグナル、57.4ppmにメトキシル基によると推定されるシグナルが認められた。一方、エタノール不溶画分のスペクトルでは、PVP通過画分と同じ17.6、22.1、31.3、42.3ppm等に小さく鋭いピークが認められた。

エタノール可溶画分のスペクトルでは、炭水化物炭素域のシグナルは、PVP吸着画分のそれらよりもさらに弱く、一方、エタノール不溶画分では、炭水化物炭素の含有率は40%を越え、各炭素のなかで最も高い値を示した。このことは、分画により、その構造中に糖質を多く含む物質がエタノール不溶画分に移行したことを示唆している。芳香族炭素の含有率は、逆にエタノール可溶画分で29-42%と高く、その値はPVP吸着画分の値を最高（長野）で11%上回った。

カルボニル炭素のシグナルの化学シフトも両画分で異なっており、そのピークはエタノール可溶画分では170.6ppm、エタノール不溶画分では175.0ppmに認められた。このことから、PVP吸着画分中の飽和脂肪族カルボン酸は主に不溶画分に移行したと推察した。エタノール可溶画分のスペクトルでは、また、192ppmより低磁場側に弱くブロードな吸収帯が存在した。これは、ケトンカルボニルによるものと推定され、分画によって可溶画分に濃縮されたために認められるようになったものと考えられる。

PVP吸着画分の主成分であるエタノール可溶画分の ^{13}C -NMRスペクトルも3土壌間でかなり類似していた。土壌間の最も顕著な差異は、フェノール（あるいはアリルエーテル）とメトキシル基のシグナルに認められた。フェノールによるシグナル（150-165ppm）は、3土壌のなかで最も酸化を受けていないと考えられる長野土壌（水田土）の同画分のスペクトルで、最もはっきり認められ、同領域の吸収の相対強度は、長野>段戸>猪之頭の順であった。水田

土から得られた試料のスペクトルには、55.8および57.4ppmにメトキシル基によるシグナルが認められたが、このシグナルの強度もまた長野>段戸>猪之頭の順であった。さらに、115.4ppmの非置換不飽和炭素、30.2ppmの飽和脂肪族炭素のシグナル強度も同じ傾向を示した。

(3) PVP通過-エタノール可溶画分・不溶画分の ^{13}C -NMRスペクトル

図4-16には各土壌のPVP通過画分のエタノール不溶画分の ^{13}C -NMRスペクトルを、図4-17には猪之頭土壌のエタノール可溶画分のスペクトルをそれぞれ示した。また、各試料の炭素組成を表4-19に示した。

PVP通過画分のエタノール可溶画分と不溶画分の ^{13}C -NMRスペクトルもまた、各領域に大きな差異が認められた。可溶画分のスペクトルには、長いアルキル鎖によると推定される30.0ppmの強いシグナル、第2アルコールあるいは脂肪族エーテルによる70.4ppmの強いシグナル、およびカルボキシル基による178.3ppmを極大とする強い吸収帯が、その特徴として認められた。また、このほかメチル基によると推定される13.0および16.7ppmのシグナルをはじめ、各領域に弱くブロードな吸収帯が確認された。各炭素の含有率は、飽和脂肪族炭素28%、炭水化物炭素25%、芳香族およびアルケン炭素17%、カルボニル炭素31%とかなり均等で、エタノール不溶画分と比較して、芳香族およびアルケン炭素、カルボニル炭素の含有率は高く、炭水化物炭素の含有率は低かった。エタノール不溶画分のスペクトルには、炭水化物炭素域の3つの吸収帯およびカルボニル炭素域の吸収帯のほか、飽和脂肪族炭素域にいくつかの小さく鋭いピーク（17.6、22.2、31.3、42.4および49.4ppm等）が認められた。炭水化物炭素域の強い吸収帯は、PVP通過画分中の糖質が、ほとんどエタノール不溶画分に分配されたことを示した。一方、芳香族炭素含有率は3-5%ときわめて低く、PVP通過画分の1/2以下であった。したがって、細分画によって、さらに芳香環構造の少ない画分が得られたといえる。

PVP通過画分の主成分であるエタノール不溶画分の ^{13}C -NMRスペクトルは、3土壌間でかなり類似していた。土壌間の最も顕著な差異は脂肪族炭素

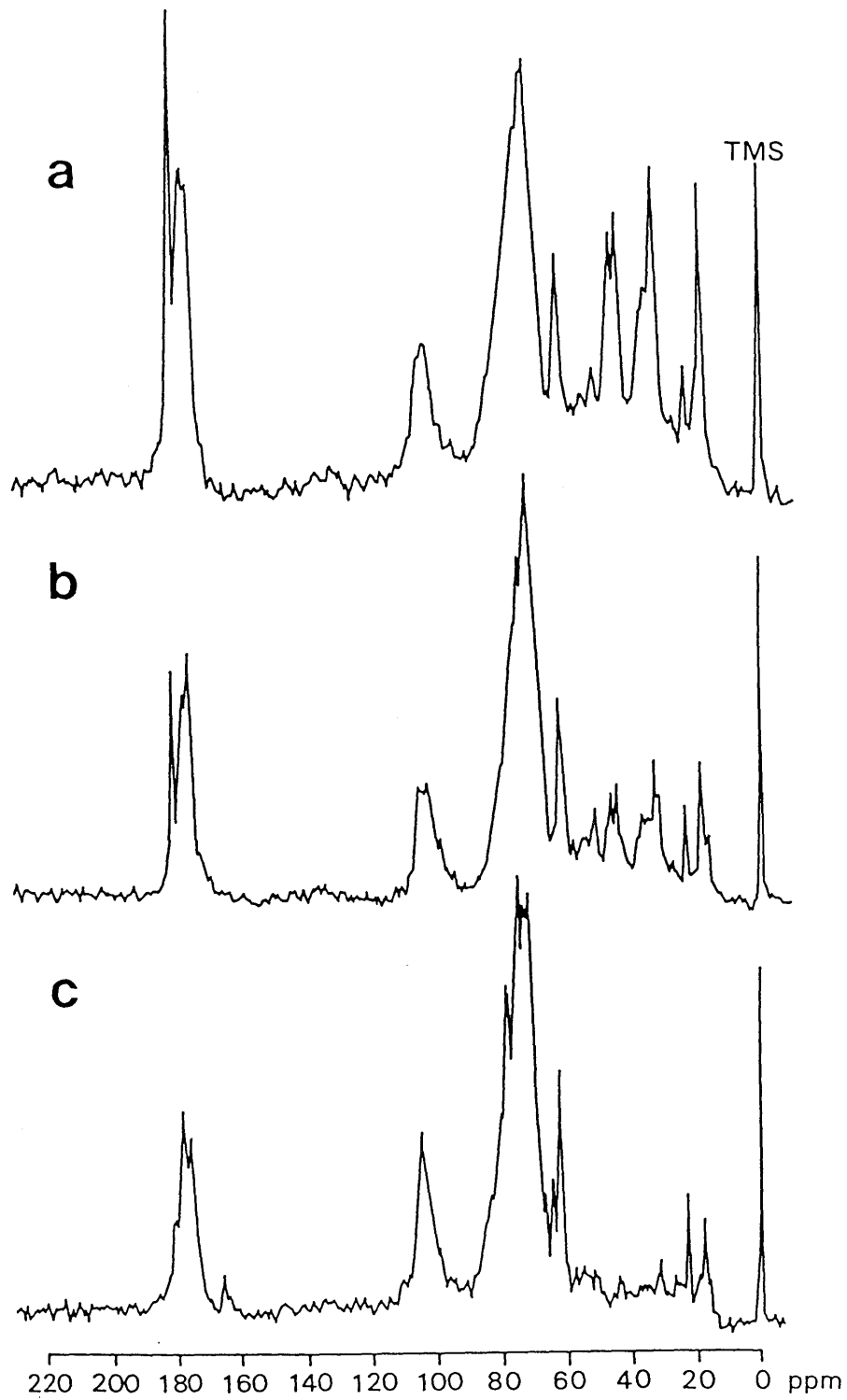


図4-16 PVP通過-エタノール不溶画分の ^{13}C -NMRスペクトル
 a: 段戸(褐色森林土)、b: 猪之頭(黒ボク土)、c: 長野(低地水田土)

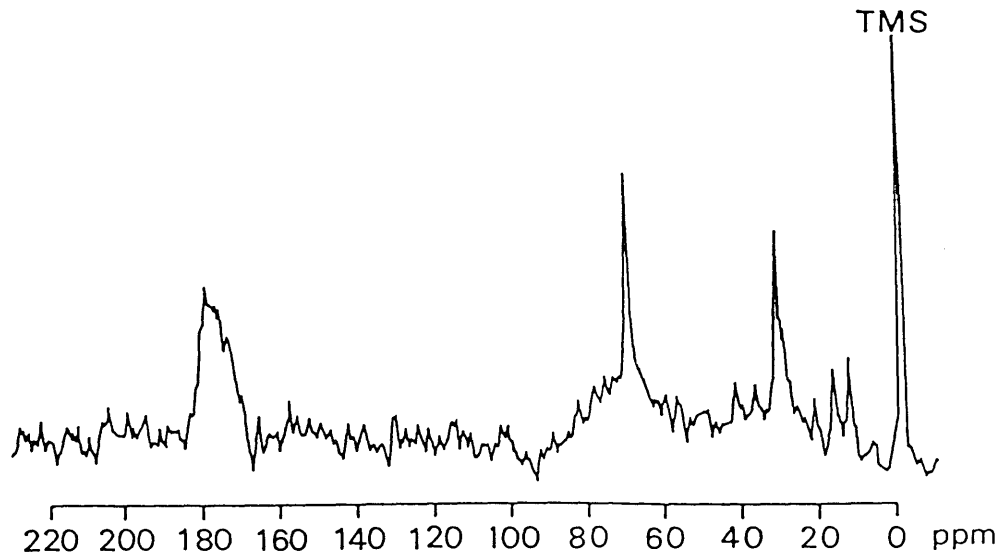


図4-17 猪之頭（黒ボク土）PVP通過-エタノール可溶画分の¹³C-NMRスペクトル

表4-19 PVP通過-エタノール可溶画分、エタノール不溶画分の炭素組成

	飽和脂肪族 炭素 (10-60ppm)	炭水化物 炭素 (60-110ppm)	芳香族および アルケン炭素 (110-165ppm)	カルボニル 炭素 (165-216ppm)
PVP通過- エタノール不溶画分				
段戸（褐色森林土）	32.4(%)	43.1(%)	3.4(%)	21.0(%)
猪之頭（黒ボク土）	25.1	53.0	2.9	19.0
長野（低地水田土）	12.3	67.0	5.0	15.7
PVP通過- エタノール可溶画分				
猪之頭	27.9(%)	24.6(%)	16.9(%)	30.6(%)

域のシグナルに認められた。これらの化学シフトは3試料間でほぼ一致していたが、その含有率は段戸（褐色森林土）の32.4%に対し、猪之頭（黒ボク土）では25.1%、長野（水田土）ではわずか12.3%であった。炭水化物炭素の含有率は逆に、長野（67%）、猪之頭（53%）、段戸（43%）の順であり、植物由来の糖質の分解が進むにつれて、微生物由来の脂肪族成分が増加することを示唆した。

(4)腐植酸の ^{13}C -NMRスペクトル

猪之頭黒ボク土の腐植酸（A型）および長野水田土の腐植酸（Rp型）の ^{13}C -NMRスペクトルを図4-18に、それらの炭素組成を表4-20にそれぞれ示した。

両型の腐植酸の ^{13}C -NMRスペクトルおよび炭素組成は、他の性質と同様、かなり異なっていた。特に芳香族炭素の含有率は、最も腐植化度が高いとされているA型では45%、一方、腐植化度が低いRp型では35%と、両者の芳香族性に差があることが確認された。また、カルボニル炭素の含有率もA型腐植酸の方が高かった。このことは、Tsutsuki・Kuwatsuka（1978a）による腐植酸のカルボキシル基（酢酸カルシウム法）およびカルボニル基（オキシム化法）の化学的定量結果と一致した。

Rp型腐植酸のスペクトルでは、ブロードな吸収帯の中にシグナルが埋没して確認できないA型と異なり、メトキシル基（57ppm）およびフェノール（あるいはアリルエーテル） C_1 （158ppm）のシグナルがはっきりと認められ、Rp型腐植酸中にその前駆体であると推定されるリグニン構造が多く残存していることが示された（Tsutsuki・Kuwatsuka 1979b）。同様のことはIRの結果（第4項）からも推察されている。

考察

^{13}C -NMRスペクトルの測定により、PVP通過画分は、炭水化物がその主成分ではあるが、飽和脂肪族炭素もまた全炭素の約20-25%とかなりの割合を

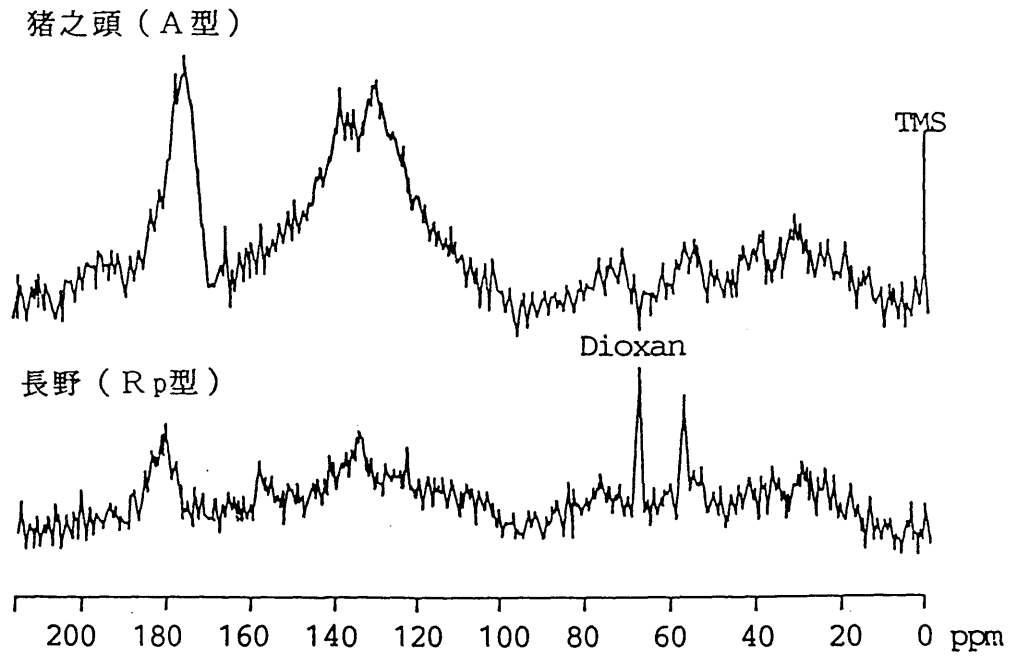


図4-18 腐植酸の¹³C-NMRスペクトル

表4-20 腐植酸の炭素組成

	飽和脂肪族 炭素 (10-60ppm)	炭水化物 炭素 (60-110ppm)	芳香族および アルケン炭素 (110-165ppm)	カルボニル 炭素 (165-216ppm)
猪之頭 (A型)	18.8(%)	10.9(%)	44.7(%)	25.7(%)
長野 (Rp型)	25.4	19.1	35.2	20.3

占めていることが明らかとなった。この中には、アミノ酸あるいはペプチド由来のメチル基、メチレン基等も当然含まれると推定されるが、窒素含量が2.5%以下である（第3項参照）ことから、他のアルキル鎖も多く含まれていると推察された。エタノールに対する溶解性に基づく分画において、エタノール可溶画分には長いアルキル鎖を含む物質が分画された。しかし、エタノール不溶画分もまた多くの脂肪族炭素を含んでおり、糖成分との分離はできなかった。したがって、これらの脂肪族成分は、比較的強く糖と結合していると推定される。PVP通過-エタノール不溶画分の飽和脂肪族炭素含有率は、長野試料（水田土）と段戸試料（褐色森林土）の間には2.6倍の差が認められたが、一方、同領域の各シグナルの化学シフトは3試料間でよく一致していた。したがって、同画分の脂肪族成分は土壌間で構造あるいは組成が類似しており、その含量に差があると推定された。また、177.7ppmにみられたシグナルの強度に、脂肪族炭素域の各シグナルと同じ傾向（段戸>猪之頭>長野）が認められたことから、このシグナルがアルキル鎖についたカルボキシル基によるものであることが推察された。

これに対し、PVP通過-エタノール可溶画分については、不溶画分と脂肪族炭素域の各シグナルの化学シフトが異なっていたほか、糖以外のアルコールによる強いシグナルが認められる等の差異が認められ、糖、芳香環と脂肪族鎖の構成比だけでなく、脂肪族部位の構造についても不溶画分と異なっていることが推定された。

多糖類の ^{13}C -NMRについては、石塚（1975）によって C_1 、 C_6 の化学シフトから結合形態がわかることが明らかにされている。すなわち、ヘキソース C_6 のシグナルは結合していない場合には61-64ppm、1-6結合を形成している場合には64-68ppmに現われ、また、 C_1 の化学シフトも1-2結合を形成している場合あるいは遊離の場合（95-100ppm）と1-4結合を形成している場合（100ppm-）とで異なる。PVP通過画分の ^{13}C -NMRではいずれも C_6 （あるいはペントース C_5 ）のシグナルは61-63ppm、 C_1 のシグナルは101-104ppmを中心にみられた。したがって、フルボ酸に含まれている炭水化物の主体は1-4結合を多く含

む多糖であると推察した。

PVP吸着画分にカルボキシル基が多量に含まれていることはIRの結果からも推定されているが（本章第4項）、 ^{13}C -NMRの結果ではその含有率は芳香族炭素と同じかやや上回っており、各芳香環が複数のカルボキシル基を含んでいるのはもちろんのこと、脂肪族鎖にもカルボキシル基が存在することが推定された。PVP吸着-エタノール可溶・不溶両画分における芳香族炭素とカルボニル炭素の存在比は分面前とほぼ同じであった。しかし、全炭素に対するカルボニル炭素の割合は、不溶画分では可溶画分の60%以下と低く、このことがエタノールに対する溶解性の違いの要因の一つになっていると推察された。

フルボ酸のPVP吸着-エタノール可溶画分の芳香族炭素含有率は、分面前（PVP吸着画分）よりも3-12%増大し、エタノールに対する溶解性に基づく分面によって、さらに腐植物質の濃縮された画分が得られたことを示した。PVP吸着-エタノール可溶画分と腐植酸の ^{13}C -NMRの結果を比較すると、芳香族炭素の含有率は、黒ボク土では腐植酸の方が6.6%高かったが、水田土では逆にPVP吸着-エタノール可溶画分の方が6.5%高く、同画分の芳香族性が腐植酸に匹敵することが示された。

メトキシル基およびフェノール C_1 のシグナルは腐植酸、フルボ酸PVP吸着-エタノール可溶画分とも水田土の試料で強く現れ、黒ボク土では弱いかあるいは確認できなかった。このことから、低地水田土ではフルボ酸中の腐植物質にも、腐植酸同様、リグニン構造が残存していることが推察された。

段戸土壌（褐色森林土）のPVP吸着-エタノール可溶画分の炭水化物炭素含有率は他の2土壌と比較すると高く、再度の分面においても、ほぼ等しい炭水化物炭素含有率を示した。このため、これらの土壌では、炭水化物はかなり強く他の芳香族あるいは脂肪族部位と結合しているものと推定した。同画分の炭水化物炭素含有率は、いずれも比色法による糖含量の測定結果とは差があるため（本章第6項参照）、 ^{13}C -NMRスペクトルの炭水化物炭素域に認められたシグナルの一部は、リグニンの ^{13}C -NMRに認められるようにベンゼン環の側鎖のC-ORやC-OHに起因している可能性もある（寺島 1982、

Steelink・Petsom 1987)。

PVP吸着-エタノール可溶画分、PVP通過-エタノール不溶画分の ^{13}C -NMRスペクトルをそれぞれ土壌間で比較すると、両画分とも、飽和脂肪族炭素含有率は段戸（褐色森林土）で高く、長野（低地水田土）で低い傾向が認められた。これは、芳香族炭素含有率が長野のPVP吸着-エタノール可溶画分で最も高く、炭水化物炭素含有率が長野のPVP通過-エタノール不溶画分で最も高いことと対応していた。すなわち、水田土では、腐植化が最も未発達で、フルボ酸の組成中にイネ由来のリグニンやセルロース、キシラン等の分解残さが占める割合が高く、一方、褐色森林土では、微生物由来の脂肪族成分のフルボ酸分子中への取込みが進み、分画を行なっても、芳香族部位や糖鎖から分離されず、同じ挙動を示したと考えられる。

9. ^1H -NMR

腐植酸の ^1H -NMRに関する報告は、Schnitzer・Barton (1963) によるものが最初であるが、 ^{13}C -NMRの発達に伴ってあまり行なわれなくなった。これは、ひとつには腐植酸がアルカリ溶液にしか溶けず、NaOD溶液の ^1H -NMRスペクトルでは、HODの吸収が強く現われ、アルコール性水酸基やメトキシル基の吸収を隠してしまうばかりか、他の領域にも影響を与えるためであり、さらには、分布域が炭素の1/20と狭いためにシグナルが重なり合ってブロードとなり、多くの情報が得られないためと考えられる。

その後、Hatcherら (1980)、Wilson (1981)、Wilsonら (1983) は、 ^1H -NMRを ^{13}C -NMRと組合せることによって腐植酸の構造に関してより多くの情報が得られることを示した。また、Yonebayashi・Hattori (1989) は、DM $\text{S}\text{O}-d_6$ を溶媒として腐植酸の ^1H -NMRを測定し、各水素の含有率を求めた。

一方、フルボ酸中の各構成水素を ^1H -NMRを用いて定量を行なった前例はみられない。そこで、本項では、フルボ酸各画分のスペクトルとともに、メチル化したフルボ酸の ^1H -NMRスペクトルを測定することによって、各シグナルの区分を明確にし、炭素組成と同様にして水素組成を求めた。

試料および方法

(1) 試料

本章第2項で調製したフルボ酸各画分を用いた。また、段戸土壌（褐色森林土）のPVP吸着画分、通過画分のメチル化試料についても測定を行なった。

(2) フルボ酸のメチル化

フルボ酸PVP吸着画分、通過画分のメチル化は、まず、箱守法に準じて行なった（三崎ら 1976）。五酸化リン上で真空乾燥した試料100mgを30ml容三角フラスコにとり、Wキャップをし、窒素を充填した風船を付けたカテラン針をつけた。次に、モレキュラーシーブを用いて脱水した特級DMSO 5mlをシリンジで注入し、試料を溶解させた。あらかじめ作っておいたメチルスルファニルカ

ルボアニオン1ml (理論値4mmol) を加え、室温で一夜攪拌した。その後、水冷しながら、ヨウ化メチル0.7mlを少しずつ添加した。なお、以上の操作は全て熱乾燥した器具を用いて行なった。メチル化の終了した試料溶液は、水で希釈して移し、メチルスルファニルカルボアニオン中に含まれている鉱油を除去するためにn-ヘキサンで繰り返し洗浄した。次にメチル化された試料をクロロホルムに移し、DMSOを除去するために水で繰り返し洗浄した。

クロロホルム可溶性となった試料のIRスペクトルには、弱くなっていたが、まだ水酸基の吸収が認められたため、再度、箱守法によってメチル化を行い、さらに連続して酸化銀とヨウ化メチルによるメチル化を行なった。酸化銀とヨウ化メチルによるメチル化は、クロロホルム層を減圧乾固した後、試料30mgに対し、アセトン5ml、酸化銀80mgおよびヨウ化メチル1mlを加えて、一夜攪拌することにより行なった。反応終了後、酸化銀は濾過して除去した。

(3) ^1H -NMRスペクトルの測定

^1H -NMRスペクトルの測定は、五酸化リン上で真空乾燥したフルボ酸各画分10-15mgを溶媒0.5mlに溶かし、TMSを内部標準として行なった。積算回数は200回とした。溶媒には、DMSO- d_6 (100% d) を用いた。ただし、PVP通過-エタノール可溶画分については、試料が少なかったため、測定後に試料の回収が容易なMeOD (99.9% d) を溶媒に用いた。この際、溶媒の違いによるスペクトルの変化を確かめるために、猪之頭 (黒ボク土) のPVP通過-エタノール可溶画分のみ、DMSO- d_6 、MeODの両方で測定を行なった。なお、すべての画分が完全にDMSOに溶解した。

メチル化試料の ^1H -NMRスペクトルの測定は、 CD_3Cl (100% d) を溶媒に用いた以外は、他の試料と同じ条件で行なった。

結果

(1) 未分画フルボ酸、PVP吸着画分、PVP通過画分の ^1H -NMRスペクトル

未分画フルボ酸の ^1H -NMRスペクトルを図4-19に、また、PVP吸着画分およびPVP通過画分のスペクトルを図4-20、4-21にそれぞれ示した。フルボ

酸各画分のスペクトルにみられたシグナルの帰属は、腐植酸の $^1\text{H-NMR}$ に関する前出各報文や諸星・榑原（1972）、Pretschら（中西ら訳 1982）、松田（1986）等を参考にして行なった。

0.8-0.9ppmの弱いシグナルは末端メチル基に、1.1-1.3ppmのシグナルは β 位のメチルおよび β 位以上のメチレンにそれぞれ帰属した。1.8-1.85ppmのシグナルは α 位のメチルおよび β 位のメチレンおよびメチンに帰属した。このシグナルの強度は、PVP通過画分でより強かった。2.5ppmのシャープなピークはDMSOによるものと考えられるが、同時に α 位の水素も関与していると推定された。2.5ppm付近の吸収の相対強度はPVP吸着画分でより強かった。

3.5-4.0ppmに極大をもつブロードな吸収帯はメトキシル基、アルコール性水酸基を含む置換脂肪族水素に帰属した。

4.2-6.3ppmにみられたシグナルは主に糖に起因する（Bach Tuyetら 1985）と推定したが、6ppmより低磁場にみられたシグナルの帰属は困難であった。これまで、腐植酸の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルに認められる6-9ppmのシグナルは芳香族水素に帰属されてきた（Wilson 1981）が、IRや $^{13}\text{C-NMR}$ の結果から分子中にほとんど芳香環を含まないことが明らかになっているPVP通過画分の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにも8.1ppm付近にシグナルが確認された。この領域にはカルボキシル基あるいはフェノール性水酸基が現れる可能性もある。そこで、芳香環について水素であればメチル化の影響は受けないことから、試料をメチル化し、 $^1\text{H-NMR}$ の測定を行なった。

メチル化した段戸（褐色森林土）フルボ酸のPVP吸着画分、通過画分の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを図4-22に示した。メチル化したPVP通過画分のスペクトルでは、メチル化以前にみられた8.1ppm付近のシグナルは消失していた。したがって、このシグナルは芳香族水素によるものではなく、カルボキシル基によるものであると推定した。メチル化後の通過画分のスペクトルではまた、4.0-6.5ppmの吸収も大きく減少しており、同領域のシグナルが糖などに含まれるアルコール性水酸基によるものであることが確認された。メチル化したPVP吸着画分の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいても、4.0-6.5ppm、8ppmより低磁場の吸収は消失あるいは減少していたが、6.5-7.5ppmのシグナルはメチル化の影

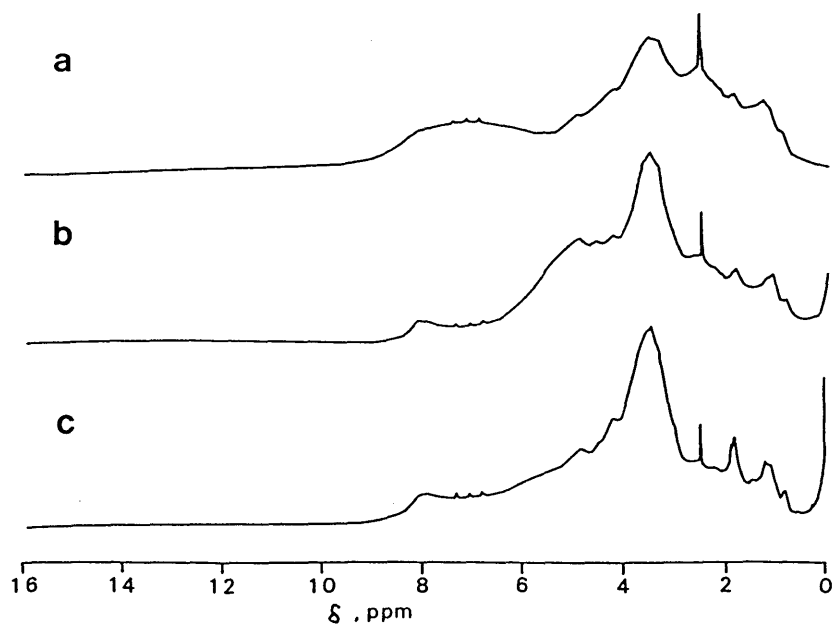


図4-19 未分画フルボ酸の ^1H -NMRスペクトル
 a : 段戸 (褐色森林土)、b : 猪之頭 (黒ボク土)、c : 長野 (低地水田土)

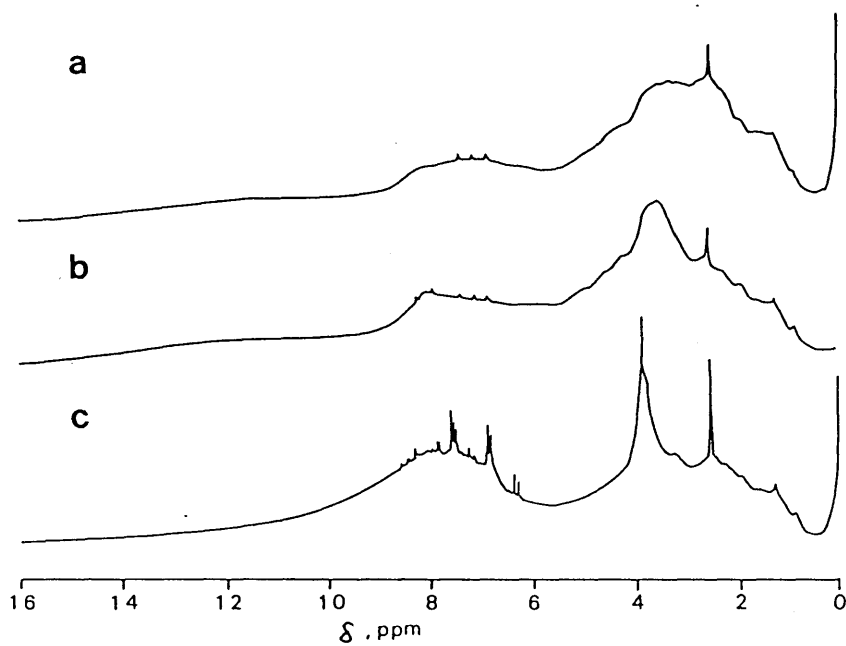


図4-20 PVP吸着画分の ^1H -NMRスペクトル
 a : 段戸 (褐色森林土)、b : 猪之頭 (黒ボク土)、c : 長野 (低地水田土)

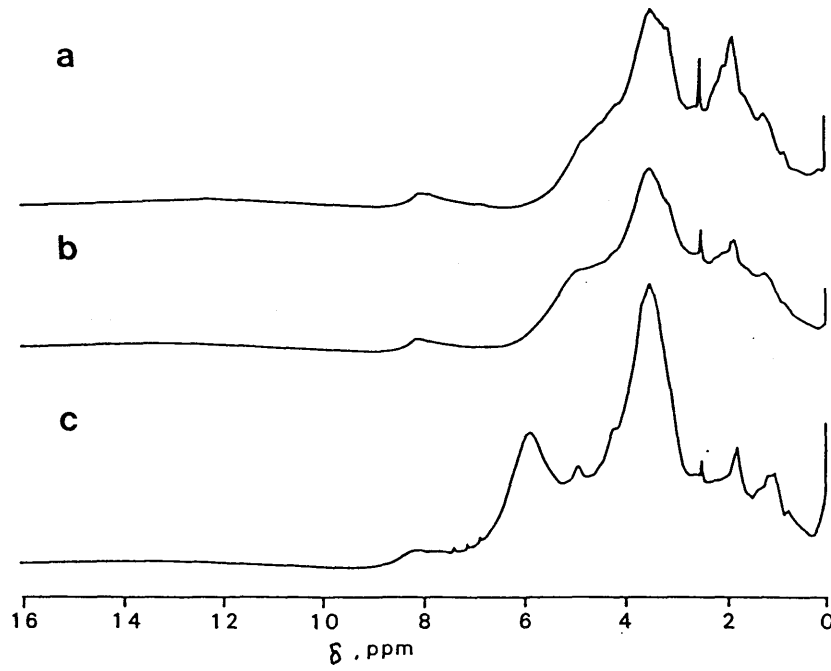


図4-21 PVP通過画分の¹H-NMRスペクトル
 a : 段戸 (褐色森林土)、b : 猪之頭 (黒ボク土)、c : 長野 (低地水田土)

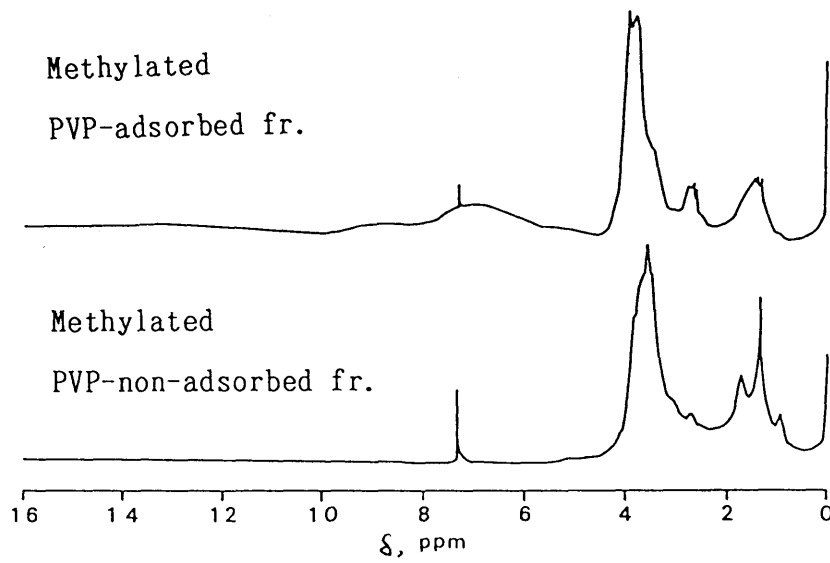


図4-22 段戸 (褐色森林土) メチル化PVP吸着画分および
 メチル化PVP通過画分の¹H-NMRスペクトル

表4-21 未分画フルボ酸およびPVP吸着画分、PVP通過画分の水素組成

試料	アルキル水素 (0.5-2.8ppm)	置換脂肪族水素、アルコール性水酸基 (2.8-6.5ppm)	芳香族水素 (6.5-7.5ppm)	カルボキシル水素 (7.5ppm-)
未分画フルボ酸				
段戸(褐色森林土)	26.1(%)	46.7(%)	8.5(%)	18.7(%)
猪之頭(黒ボク土)	24.5	63.5	3.0	9.0
長野(低地水田土)	20.0	57.3	6.2	16.5
PVP吸着画分				
段戸	28.5(%)	40.3(%)	8.1(%)	23.3(%)
猪之頭	17.7	40.5	7.5	34.3
長野	13.6	36.3	11.5	38.5
PVP通過画分				
段戸	35.7(%)	48.3(%)	1.4(%)	14.6(%)
猪之頭	37.2	48.9	1.7	12.2
長野	17.2	63.6	5.6	13.6

響を受けなかった。よって、この領域のシグナルを芳香族水素に帰属した。

以上のような帰属をもとに、スペクトルを4つの領域、すなわち、アルキル水素域(0.5-2.8ppm)、置換脂肪族水素域(アルコール性水酸基、メトキシル基、フェノール性水酸基を含む、2.8-6.5ppm)、芳香族水素域(6.5-7.5ppm)およびカルボキシル水素域(水素結合したフェノール性水酸基を含む、7.5ppm-)に分け、全水素に対する各水素の含有率を算出した。未分画フルボ酸およびPVP吸着画分、PVP通過画分の水素組成を表4-21に示した。

PVP吸着・通過両画分の水素組成は、両者の構造の違いを反映して異なっており、芳香族水素およびカルボキシル水素の含有率はPVP吸着画分でもより高く、一方、置換脂肪族水素の含有率はPVP通過画分でもより高かった。

(2) PVP吸着-エタノール可溶画分、不溶画分の¹H-NMRスペクトル

PVP吸着-エタノール可溶画分の¹H-NMRスペクトルを図4-23に示した。同画分のスペクトルにみられたシグナルは、PVP吸着画分よりもシャープであった。また、1.2-1.3ppmにいずれも強いシグナルが認められた。カルボキシル基のシグナルは、PVP吸着画分と同様、12.0-12.5ppm付近を中心にして低磁場側に広がってみられた。また、長野土壌の試料では、カルボキシル基のシグナルは、10.9ppmに強いピークとして認められた。

図4-24にはPVP吸着-エタノール不溶画分の¹H-NMRスペクトルを示した。同画分のスペクトルはエタノール可溶画分のスペクトルとはかなり異なっており、1.25ppmおよび2.5ppm付近のシグナルは弱く、一方、1.9-2.1ppmにPVP通過画分のスペクトルにみられたのと類似のシグナルが認められた。また、3.5-3.6ppmのシグナルがきわめて強い点においてもエタノール可溶画分とは異なっていた。6.6-7.1ppmには芳香族水素によるシグナルが弱いながらも認められた。

両画分の水素組成を表4-22に示した。芳香族水素の含有率はエタノール可溶画分の8-10%に対し、不溶画分では3-4%、カルボキシル水素の含有率は可溶画分の29-36%に対し、不溶画分では15-19%と、両画分の水素組成の差は、特に芳香族水素とカルボキシル水素の含有率に認められた。

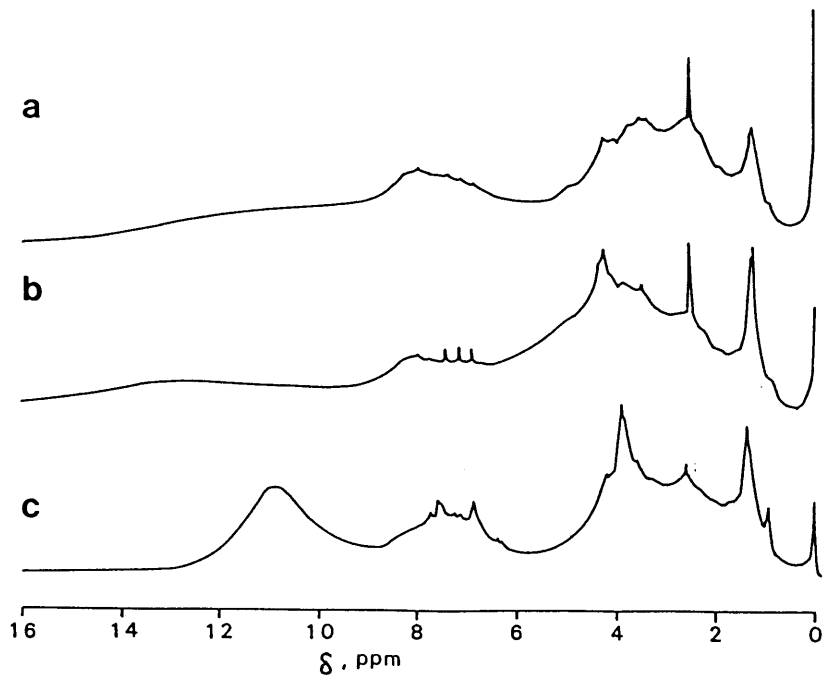


図4-23 PVP吸着-エタノール可溶画分の¹H-NMRスペクトル
 a : 段戸 (褐色森林土)、b : 猪之頭 (黒ボク土)、c : 長野 (低地水田土)

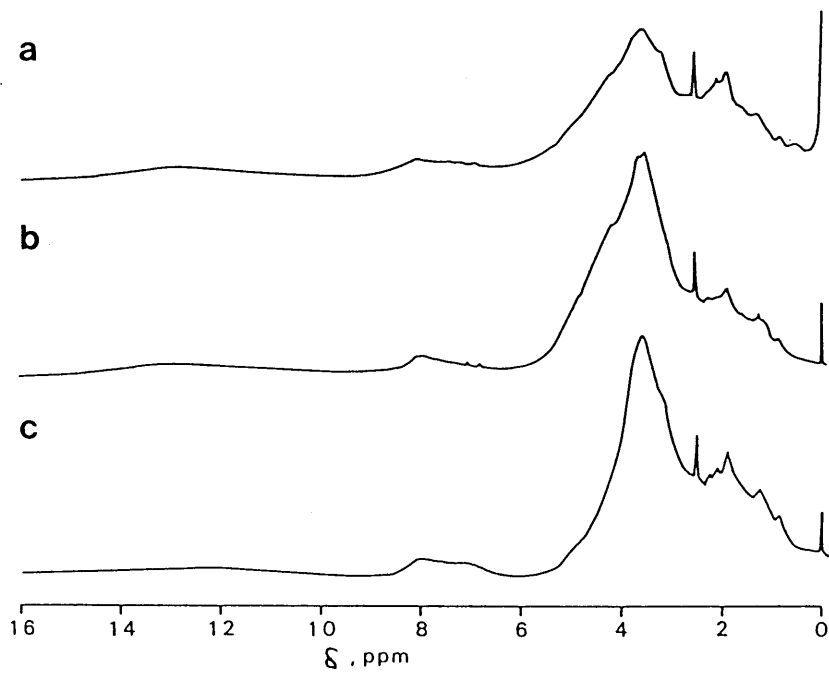


図4-24 PVP吸着-エタノール不溶画分の¹H-NMRスペクトル
 a : 段戸 (褐色森林土)、b : 猪之頭 (黒ボク土)、c : 長野 (低地水田土)

表4-22 PVP吸着-エタノール可溶画分、エタノール不溶画分の水素組成

試料	アルキル水素 (0.5-2.8ppm)	置換脂肪族水素、アルコール性水酸基 (2.8-6.5ppm)	芳香族水素 (6.5-7.5ppm)	カルボキシル水素 (7.5ppm-)
PVP吸着-				
エタノール可溶画分				
段戸 (褐色森林土)	23.2(%)	34.9(%)	7.8(%)	34.2(%)
猪之頭 (黒ボク土)	20.8	40.4	9.5	29.3
長野 (低地水田土)	22.8	30.8	10.0	36.4
PVP吸着-				
エタノール不溶画分				
段戸	44.8(%)	34.6(%)	3.7(%)	16.9(%)
猪之頭	23.7	58.2	2.9	15.2
長野	28.5	48.9	3.9	18.7

エタノール不溶画分では、置換脂肪族水素の含有率に土壤間で差が認められた。この差（猪之頭>長野>段戸）は、糖の定量の結果と一致しており（本章第6項）、各試料の糖含量の違いを反映していた。

(4) PVP通過-エタノール可溶画分、不溶画分の¹H-NMRスペクトル

PVP通過画分のエタノール可溶・不溶両細画分の¹H-NMRスペクトルを図4-25から4-27に示した。エタノール可溶画分の¹H-NMRスペクトルのシグナルは、フルボ酸各画分の中で最もシャープであった。段戸および猪之頭両土壤の同画分のスペクトルには、0.6ppmのほか、0.6-0.7、1.20-1.24(w)、1.6、1.9、2.2、2.7、3.7および4.0 ppmにシグナルが認められた。また、6.72-7.2 ppmにはベンゼン環によるAB型のシグナルが認められ、この画分中にベンゼン環が存在することが確認された。なお、3.3および4.9ppmの強いシグナルはメタノールによるものである。

図4-25では、猪之頭（黒ボク土）フルボ酸のPVP通過-エタノール可溶画分のスペクトルをDMSO-d₆で測定した場合とMeODで測定した場合とで比較した。両スペクトルは、微妙な化学シフトの違いを除けばよく一致していた。ただし、MeODでは、試料中のカルボキシル基の水素と溶媒中の重水素との置換が起きるため8ppmのシグナルは認められない。

長野（水田土）フルボ酸のPVP通過-エタノール可溶画分の¹H-NMRスペクトル（図4-26）は、他の2土壤とやや異なっており、1.3、3.6および4.2 ppmの強いシグナルがみられたほか、1.0、2.1および2.7ppmに弱いシグナルが認められた。反対に、0.6ppmおよび6.72-7.2ppmの芳香族水素によるシグナルはみられなかった。

PVP通過-エタノール不溶画分の¹H-NMRスペクトル（図4-27）は、長野試料のスペクトルにおけるアルコール性水酸基に帰属されるシグナルが6.3 ppmから5.5ppmにシフトしてみられた以外は、PVP通過画分のスペクトルと きわめて類似していた。

PVP通過画分のエタノール可溶画分、不溶画分の水素組成を表4-23に示した。エタノール可溶画分についてはDMSO-d₆を溶媒として測定した猪之頭（黒

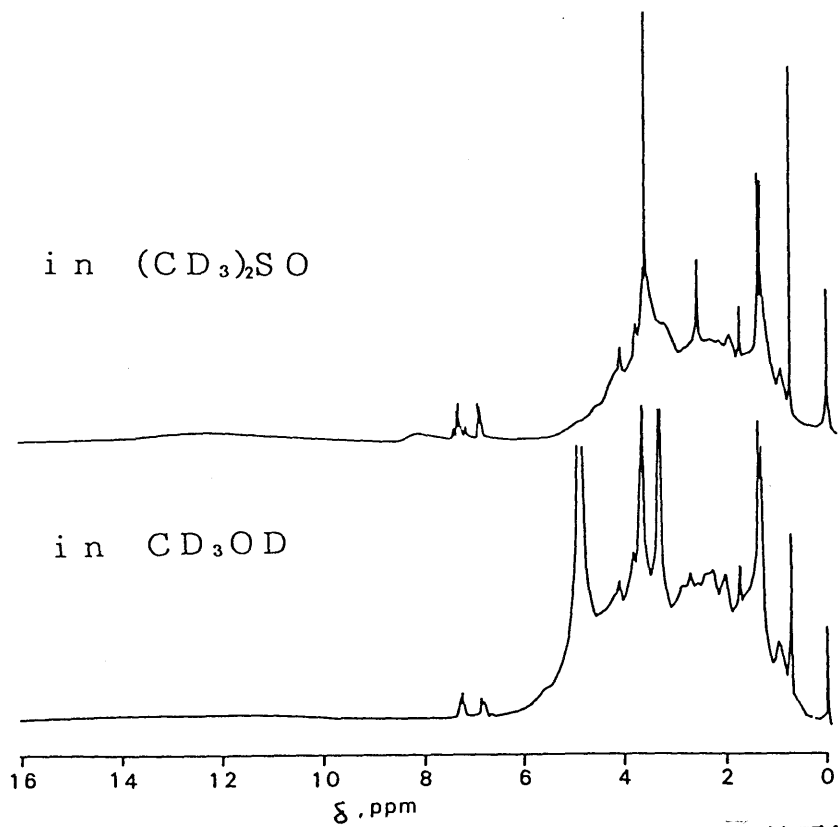


図4-25 猪之頭(黒ボク土) PVP通過-エタノール可溶画分の¹H-NMRスペクトル

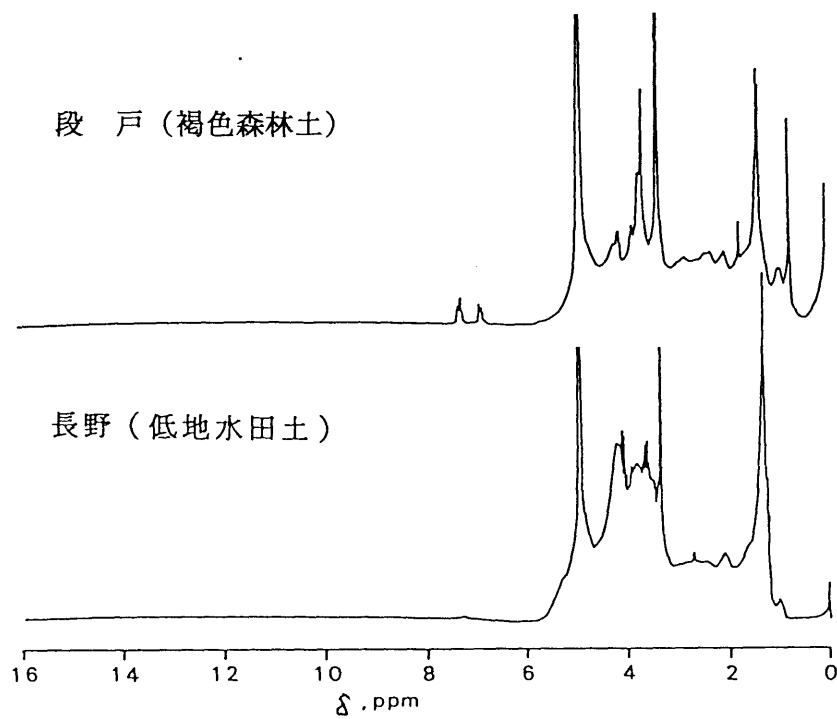


図4-26 PVP通過-エタノール可溶画分の¹H-NMRスペクトル

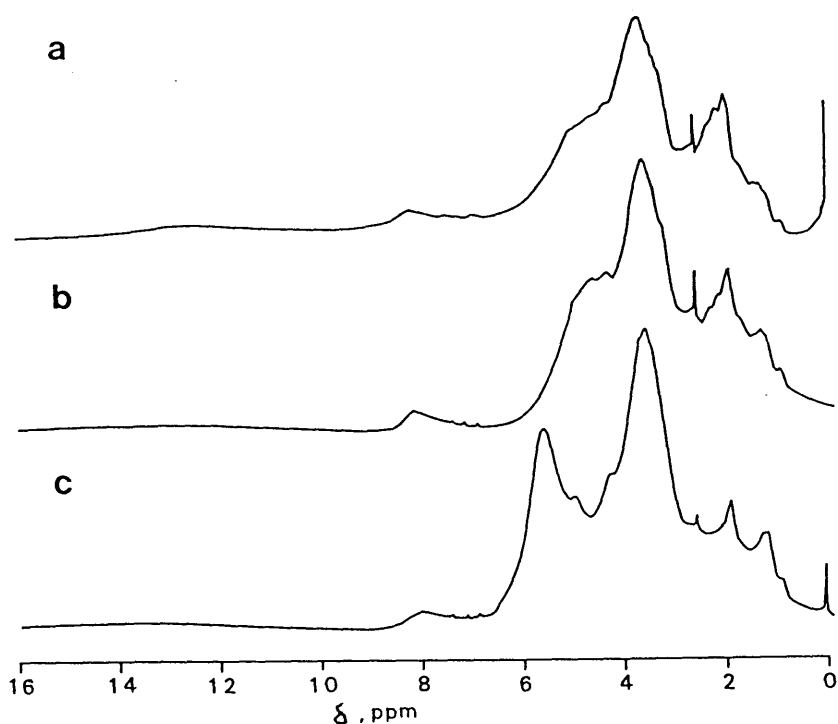


図4-27 PVP通過-エタノール不溶画分の¹H-NMRスペクトル
a:段戸、b:猪之頭、c:長野

表4-23 PVP通過-エタノール可溶画分、エタノール不溶画分の水素組成

試料	アルキル水素 (0.5-2.8ppm)	置換脂肪族水素、アルコール性水酸基 (2.8-6.5ppm)	芳香族水素 (6.5-7.5ppm)	カルボキシル水素 (7.5ppm-)
PVP通過-エタノール可溶画分				
猪之頭(黒ボク土)	44.7(%)	41.3(%)	1.9(%)	12.1(%)
PVP通過-エタノール不溶画分				
段戸(褐色森林土)	37.2(%)	51.2(%)	0.6(%)	11.1(%)
猪之頭(黒ボク土)	32.3	59.8	0.8	7.1
長野(低地水田土)	22.9	67.8	1.7	7.6

ボク土)フルボ酸の同画分の水素組成のみを示した。

エタノール可溶画分ではアルキル水素の含有率が45%と各水素の中で最も高い値を示した。一方、エタノール不溶画分では置換脂肪族水素の含有率が51-68%と最も高く、反対に芳香族水素の含有率は2%未満ときわめて低かった。さらに、カルボキシル水素の含有率もフルボ酸各画分の中で最も低く、7-11%であった。

エタノール不溶画分のアルキル水素の含有率は、段戸>猪之頭>長野の順で高かったが、これは脂肪族炭素含有率の順と一致した(本章第8項参照)。

考察

腐植酸が一部しかDMSOに溶解しないのに対し、フルボ酸は全ての画分がDMSOに可溶であった。したがって、DMSOは測定後の試料の回収がきわめて困難であるという欠点を除けばフルボ酸の¹H-NMRスペクトル測定に用いる溶媒として有効であるといえる。

シグナルの帰属に関しては、メチル化試料のスペクトルから、カルボキシル水素と芳香族水素の化学シフトの違いが明らかにされた。メチル化したPVP吸着画分の¹H-NMRスペクトルでは、8-9ppm付近の吸収は完全には消失しなかったが、この領域に現れる主要なシグナルはカルボキシル基あるいはフェノール性水酸基によるものであるため、芳香族水素域とカルボキシル水素域の境界は7.5ppmが適していると判断した。

こうして¹H-NMRスペクトルから求めた水素組成は、これまで行ってきた他の分析結果と一致するものであった。ただし、段戸土壌の未分画フルボ酸や長野土壌のPVP通過画分のスペクトルでは、アルコール性水酸基のシグナルの低磁場側へのシフトにより芳香族水素含有率は高すぎる値を示した。しかしながら、フルボ酸細画分のスペクトルには各画分の特徴が明確に現れており、エタノール可溶・不溶両画分のスペクトルから算出した各水素の含有率は、さらに確実なものといえる。

PVP通過-エタノール可溶画分の¹H-NMRスペクトルは、段戸(褐色森林土)試料と猪之頭(黒ボク土)試料とはきわめて類似しており、長野(水田

土) 試料のみシグナルの有無や化学シフトに相違が認められた。同じ傾向はIRスペクトルや糖の定量結果にも現われており、長野土壌の同画分が、芳香環含量や糖含量等の点において他の2土壌とはかなり異なることが推察された。

10. PVP通過画分のエタノールによる分別沈殿

フルボ酸中の非腐植物質を主体とするPVP通過画分は、エタノールに対する溶解性に基づく細分画において、多糖を中心としたエタノール不溶画分と、他の脂肪族化合物を主体としたエタノール可溶画分とに分かれた。両画分の構造や化学的性質の違いは明らかであったが、分配割合はいずれの土壌においても不溶画分が90%以上を占めた。

そこで、本項では、PVP通過画分を水-エタノールによる沈殿法を用いて、さらに細かく分画することにより、エタノール不溶性物質の極性に対する分布および各画分の組成の変化を明らかにすることを試みた。

試料および方法

(1)試料

段戸（褐色森林土）、猪之頭（黒ボク土）、長野（低地水田土）各土壌のフルボ酸PVP通過画分を用いた。

(2)PVP通過画分の水-エタノールに対する挙動

猪之頭（黒ボク土）のPVP通過画分100mgを蒸留水5mlに溶解し、エタノール1mlを攪拌しながら滴下した。さらによく攪拌して、冷蔵庫（4℃）に一夜放置し、生じた沈殿を遠心分離によって分けた。上澄液にはさらにエタノールを加えて、同様の処理を繰り返した。その際、溶質濃度が常に1-2%の間に入るように注意し、1%を割るときには、濃縮乾固し、適量の水-エタノール（分解時よりやや低濃度）に溶解して、分画を繰り返した。こうして、エタノール濃度が96%になるまで分画を行ない、同一エタノール濃度の試料（最高5点）を含め、70点の試料を得た。得られた各画分は減圧乾固を繰り返した後、凍結乾燥して収量（重量）を測定した。

(3)分別沈殿画分の調製

各PVP通過画分試料を(1)と同じ方法によって、40%エタノール沈殿画分（

以下0-40Pと記す)、60%、70%、80%および90%の各エタノール沈殿画分に分画した。なお、その際、沈殿部については、析出したときよりも5%濃度の高いエタノール溶液を加えて、よく攪拌し、再度遠心分離することによって共沈物質を除去した(松田 1987)。各画分は減圧乾固を繰り返した後、凍結乾燥して粉末試料を得た。90%エタノール可溶画分については、凍結乾燥後、さらにP₂O₅上で十分真空乾燥し、その後、粉末からエタノール抽出を行なって、100%エタノール可溶画分(100S)と100%エタノール不溶画分(90-100P)とに分画した。90-100Pと100Sについても、他の画分と同様の処理により粉末試料を得た。

(4)糖含量およびIRスペクトルの測定

(3)で得られた各試料について、本章第6項と同じ比色法によって、ヘキソース、ペントースおよびウロン酸の定量を行なった。また、0-60P、60-80P、80-100Pの各画分について、本章第4項に記した方法に従ってIRスペクトルの測定を行なった。

結果

(1)PVP通過画分の水-エタノールに対する挙動

図4-28に、猪之頭土壌(黒ボク土)のフルボ酸PVP通過画分の分別沈殿におけるエタノール濃度(v/v)と沈殿量の関係を示した。なお、エタノール濃度100%のときの値は、100Sの収量を合わせた値である。

沈殿量は、エタノール濃度が上がるに連れて徐々に増加し、両者の関係は、指数関数 $y=1.38342e^{0.043377x}$ で表され、きわめて高い正の相関を示した($r=0.9910^{***}$)。水-エタノールに対する挙動の異なる数種の物質から成る混合物であれば、エタノール濃度と沈殿量をプロットしたグラフは、特異な曲線となる(松田 1987参照)。したがって、PVP通過画分の分別沈殿において、あるエタノール濃度において大量に析出するか、あるいはある濃度範囲では沈殿が生成しないといった現象が認められなかったことは、同画分が、極性がわずかず異なるきわめて多様な物質から構成されていることを示唆している。

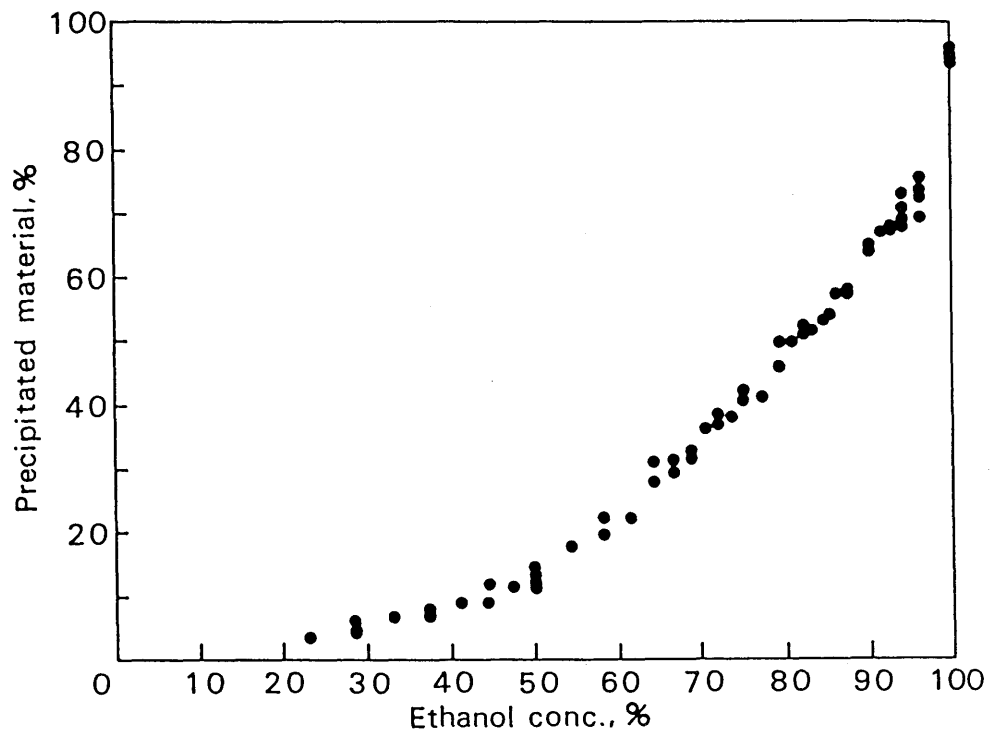


図4-28 PVP通過画分（猪之頭-黒ボク土）の分別沈殿におけるエタノール濃度と沈殿量の関係

この画分のもうひとつの特徴は、エタノール濃度の増加に対して沈殿量が指数関数的に増加したことである。エタノール濃度50%における沈殿量は全体の約14%にすぎず、エタノール濃度が90%に達してもなお1/3が可溶部に残った。純粋な多糖であれば、エタノール濃度75-80%までに沈殿するため、高エタノール濃度溶液に可溶性の物質は、糖鎖のほかにカルボキシル基等の官能基を多くもつ脂肪族鎖を含んでいることが推察された。

猪之頭試料が分別沈殿において、特異な挙動を示さなかったため、段戸および長野試料については、40P、60P、70P、80P、90P、100Pおよび100Sの7画分に分画した。図4-29には両試料の分別沈殿におけるエタノール濃度と沈殿量の関係を示した。また、表4-26には各画分への分配割合を猪之頭試料も含めて示した。段戸、長野両試料に関しても、猪之頭試料と類似した結果が得られた。

(2)分別沈殿画分の糖含量

分別沈殿各画分のヘキソース含量を表4-27および図4-30に示した。ヘキソース含量は、0-40Pから60-70Pあるいは70-80Pにかけて増加し、その後減少した。この変化は、段戸（褐色森林土）試料で最も顕著であった。逆に長野（低地水田土）試料では90-100Pまでほとんど減少せず、常に25%以上の含有量を示した。

表4-28、図4-31には各画分のペントース含量を示した。ペントース含量も、ヘキソース含量と同様、低エタノール濃度で沈殿する画分から高エタノール濃度で沈殿する画分にかけていったん増加した後に減少した。ただし、ペントースは、エタノール不溶画分全体の場合と同じように、長野土壤の各画分で他の土壤の2-3倍量が検出された。この傾向は全ての分別沈殿画分で認められた。

ウロン酸含量は表4-29、図4-32に示した。ウロン酸の場合には、中性糖よりも低エタノール濃度で多量に沈殿した。また、ペントースの場合ほど顕著ではなかったが、各画分とも、エタノール不溶画分と同様、猪之頭土壤の試料で最も多量に検出された。

各画分の3種類の糖含量の和を表4-30および図4-33に示した。糖の含量は最も高い長野土壤の60-70Pでは62.5%に達した。一方、最も低い段戸100Sの全糖含量は11.6%であった。また、土壤間で、エタノール濃度により沈殿する量の

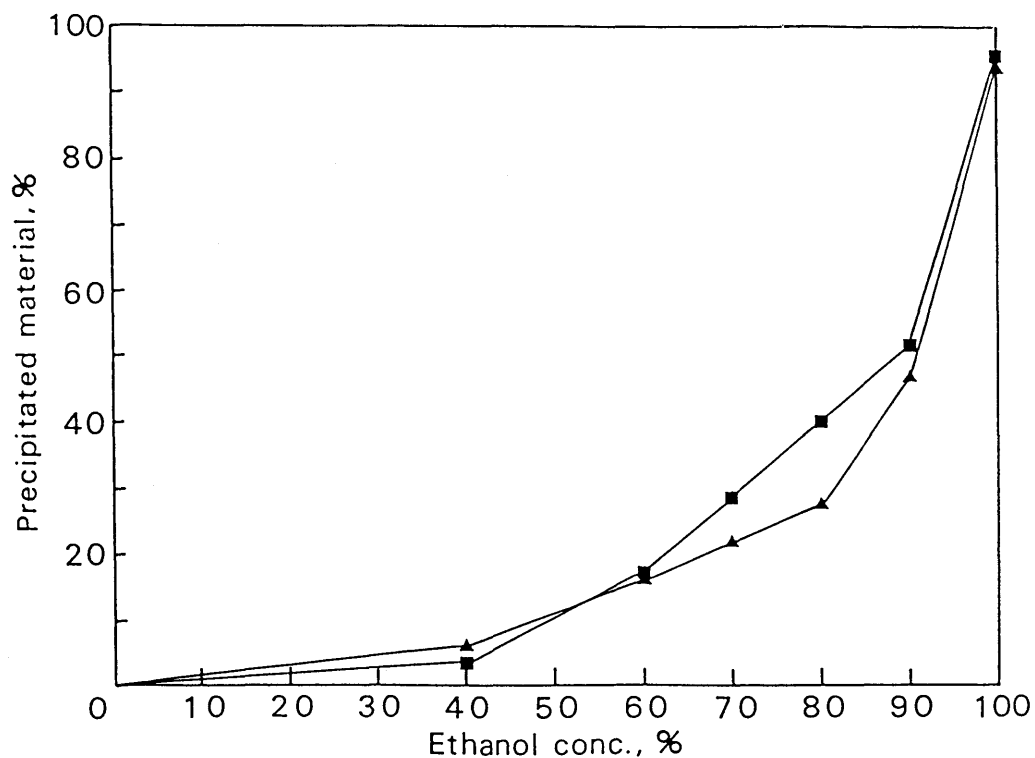


図4-29 PVP通過画分の分別沈殿におけるエタノール濃度と沈殿量の関係
 ▲：段戸（褐色森林土）、■：長野（低地水田土）

表4-26 PVP通過画分の分別沈殿における分配割合

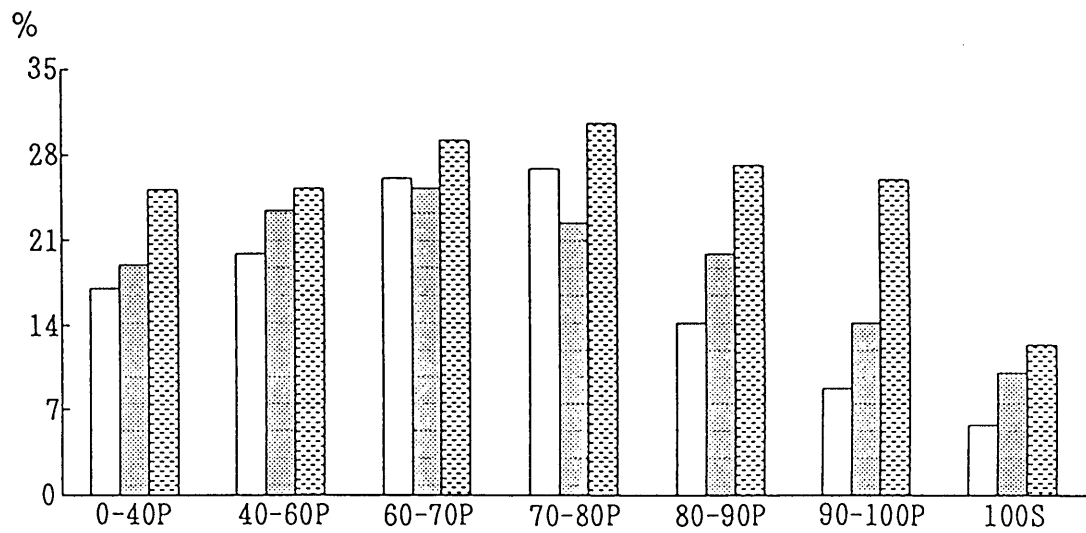
	40P	60P	70P	80P
段戸（褐色森林土）	6.6(%)	10.1(%)	5.5(%)	5.6(%)
猪之頭（黒ボク土）	8.0	13.9	11.4	11.7
長野（低地水田土）	3.6	13.8	11.4	11.2

	90P	100P	100S	回収率
段戸	19.0(%)	29.1(%)	18.2(%)	94.1(%)
猪之頭	15.2	19.0	14.9	94.1
長野	11.7	35.3	8.7	95.7

表4-27 PVP通過画分の分別沈殿画分のヘキソース含量

	40P	60P	70P	80P
段戸(褐色森林土)	17.10(%)	19.85(%)	26.07(%)	26.88(%)
猪之頭(黒ボク土)	18.99	23.52	25.21	22.42
長野(低地水田土)	25.05	25.24	29.79	30.56

	90P	100P	100S
段戸	14.22(%)	8.83(%)	5.78(%)
猪之頭	19.88	14.20	10.2
長野	27.20	26.00	12.51



□ 段戸 ▨ 猪之頭 ▩ 長野

図4-30 PVP通過画分の分別沈殿画分のヘキソース含量

表4-28 PVP通過画分の分別沈殿画分のペントース含量

	40P	60P	70P	80P
段戸(褐色森林土)	1.31(%)	3.18(%)	5.82(%)	5.58(%)
猪之頭(黒ボク土)	2.21	3.57	5.32	7.43
長野(低地水田土)	7.13	9.61	16.74	17.05

	90P	100P	100S
段戸	2.11(%)	1.48(%)	1.16(%)
猪之頭	5.38	3.73	3.01
長野	15.68	12.91	6.11

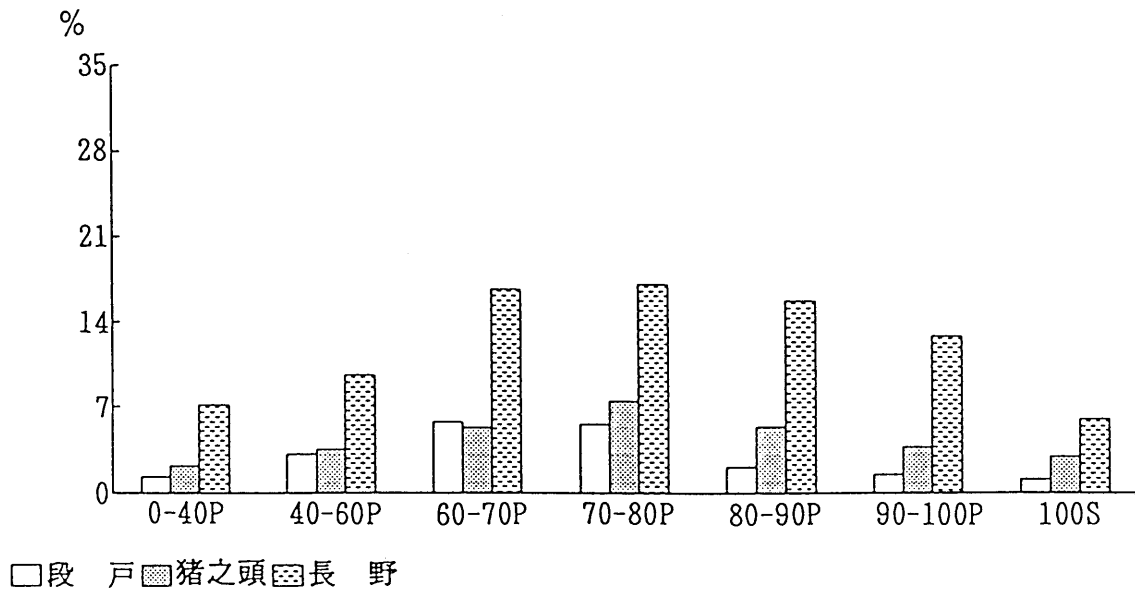


図4-31 PVP通過画分の分別沈殿画分のペントース含量

表4-29 PVP通過画分の分別沈殿画分のウロン酸含量

	40P	60P	70P	80P
段戸(褐色森林土)	14.54(%)	14.88(%)	15.55(%)	16.52(%)
猪之頭(黒ボク土)	20.05	21.53	21.66	17.62
長野(低地水田土)	15.83	18.72	16.62	13.76

	90P	100P	100S
段戸	10.05(%)	6.01(%)	4.62(%)
猪之頭	14.09	10.07	6.39
長野	11.19	9.80	5.44

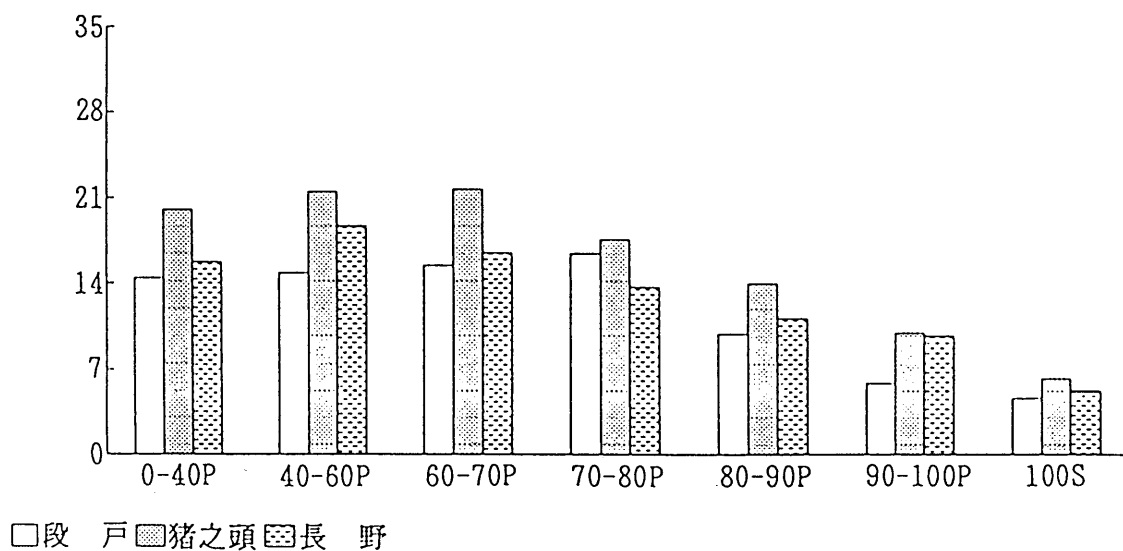


図4-32 PVP通過画分の分別沈殿画分のウロン酸含量

表 4 - 3 0 P V P 通過画分の分別沈殿画分の全糖含量

	4 0 P	6 0 P	7 0 P	8 0 P
段 戸 (褐色森林土)	32.95(%)	37.91(%)	47.44(%)	48.98(%)
猪之頭 (黒ボク土)	41.25	48.62	52.19	47.47
長 野 (低地水田土)	48.01	53.57	63.15	61.37

	9 0 P	1 0 0 P	1 0 0 S
段 戸	26.38(%)	16.32(%)	11.56(%)
猪之頭	39.35	28.00	19.60
長 野	54.07	48.71	24.06

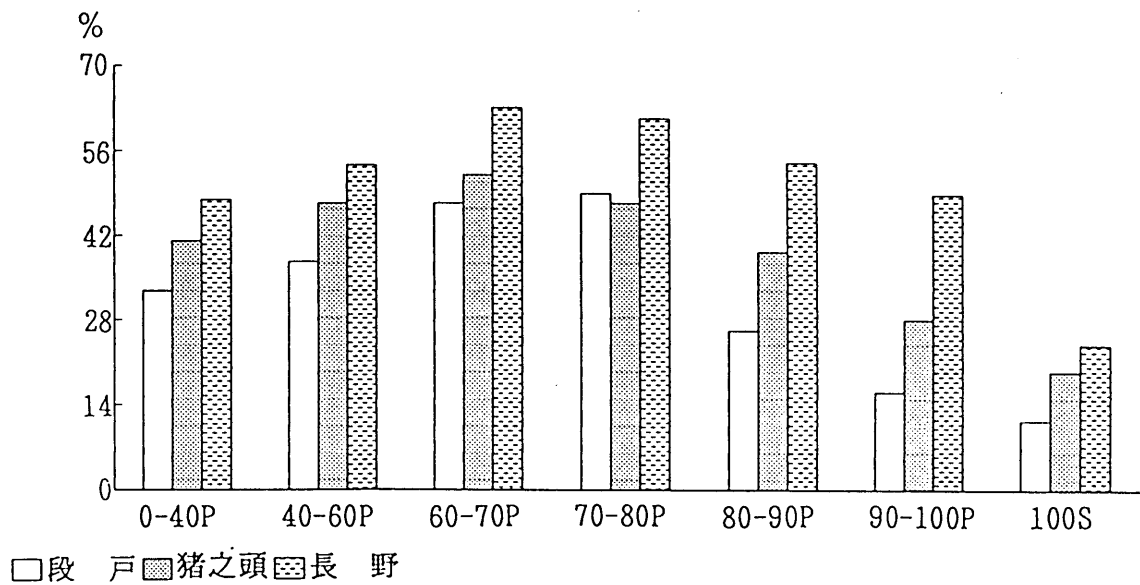


図 4 - 3 3 P V P 通過画分の分別沈殿画分の全糖含量

変化に異なった傾向があることが示された。

図4-34には分別沈殿各画分の糖の組成を示した。3土壤のいずれの画分においてもヘキソースが糖の約1/2を占めた。しかしながら、残りの1/2に占めるペントースとウロン酸の割合は、土壤や画分によって異なっていた。ウロン酸の割合は低エタノール濃度で沈殿する画分において高い傾向が認められ、その含有率が最も高い猪之頭土壤の0-40Pでは全糖の48.7%に達した。一方、ペントースの含有率は、長野土壤の高エタノール濃度で沈殿する画分で特に高かった。

(3)分別沈殿画分のIRスペクトル

段戸（褐色森林土）試料の分別沈殿画分のIRスペクトルを図4-35に、猪之頭（黒ボク土）試料および長野（低地水田土）試料の分別沈殿画分のIRスペクトルを図4-36にそれぞれ示した。0-60P、60-80P、80-100Pの各画分のスペクトルの差異は、糖含量の変化が最も大きかった段戸試料の各画分間で最も顕著であった。60-80Pから80-100Pにかけては、 1540cm^{-1} および $1150-1030\text{cm}^{-1}$ の吸収強度が大きく減少し、糖とともにアミノ酸あるいはペプチドの含量も減少したことが推定された。反対に 2960cm^{-1} や 1720cm^{-1} の吸収強度は増大し、脂肪族鎖やカルボキシル基の増加を示唆した。同じことは $1500-1200\text{cm}^{-1}$ の鋭いピークが高エタノール濃度で沈殿する画分ほど強かったことから推察された。また、80-100Pでは 1500cm^{-1} にピークが認められ、芳香環の存在が推定された。

猪之頭試料の分別沈殿各画分のIRスペクトルもまた、段戸試料の各画分と同じ傾向を示した。一方、糖含量の変化の最も少なかった長野試料では、IRスペクトルにおける各画分間の差異もまた少なかった。

考察

水-エタノールを用いた沈殿法による分画で、PVP通過画分はきわめて多種類の物質から成ることが示された。各画分の組成の違いの一つの指標として糖含量の測定を行ったが、各画分の糖含量は、エタノール濃度の増大に伴っていったん増加し、その後減少するといった変化をみせた。また、糖含量と共にヘキソース、ペントース、ウロン酸の含有比も画分間で異なっていた。

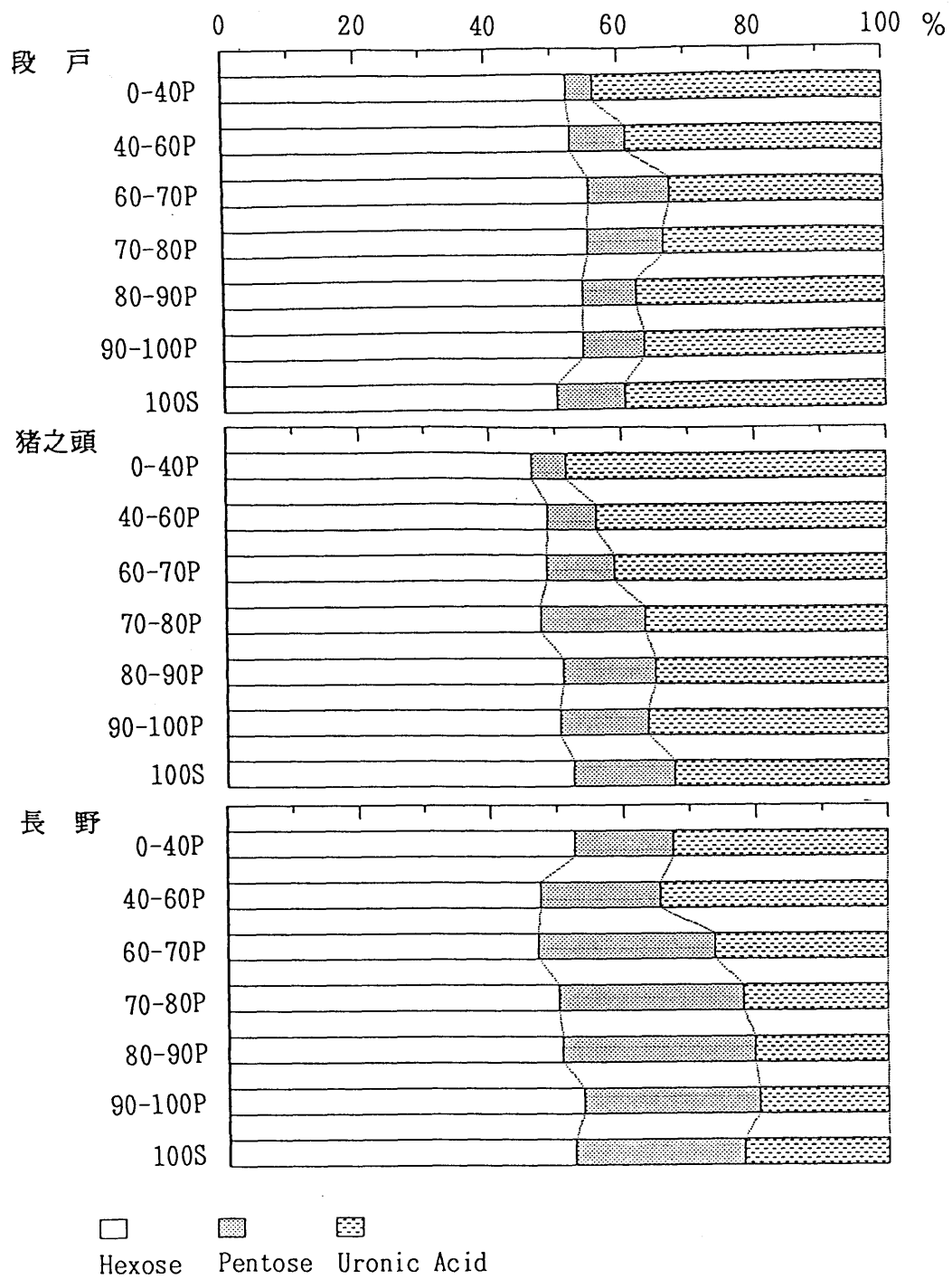


図4-33 PVP通過画分の分別沈殿画分の糖組成

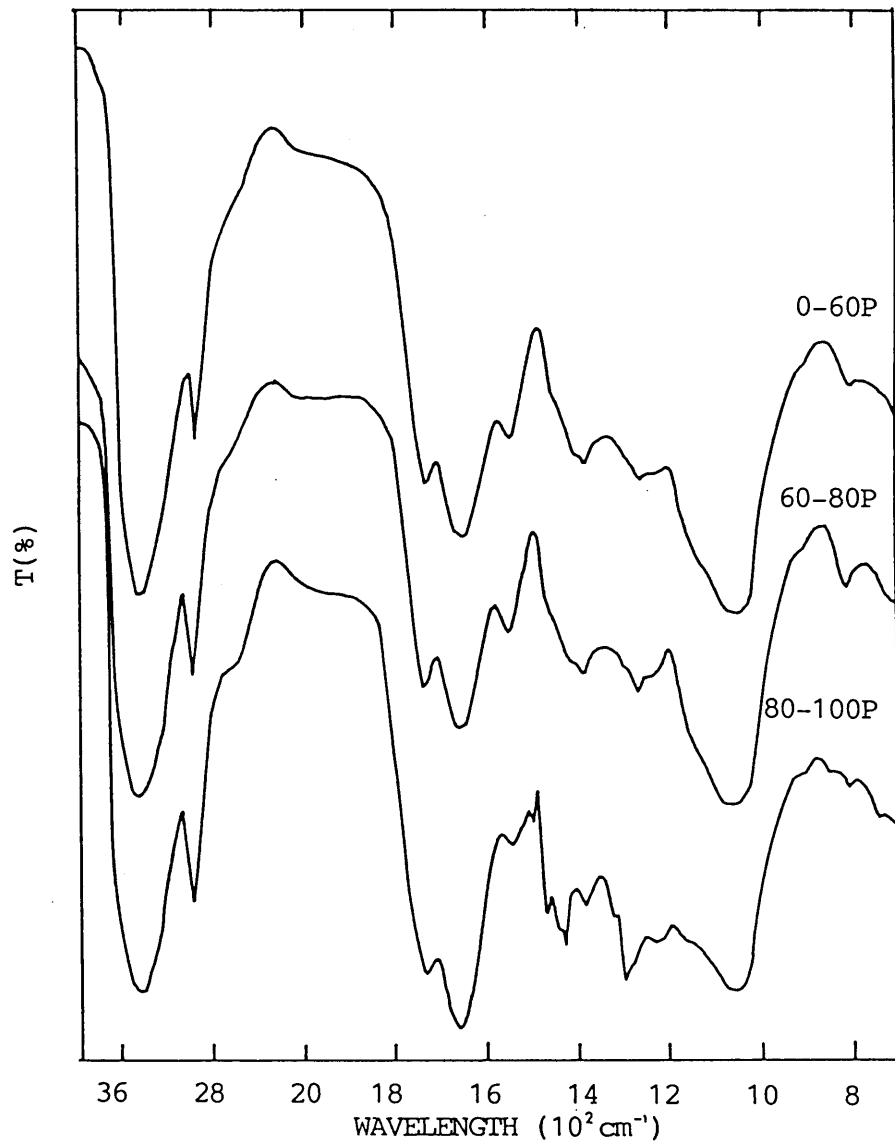


図4-34 段戸(褐色森林土)PVP通過画分の分別沈殿画分のIRスペクトル

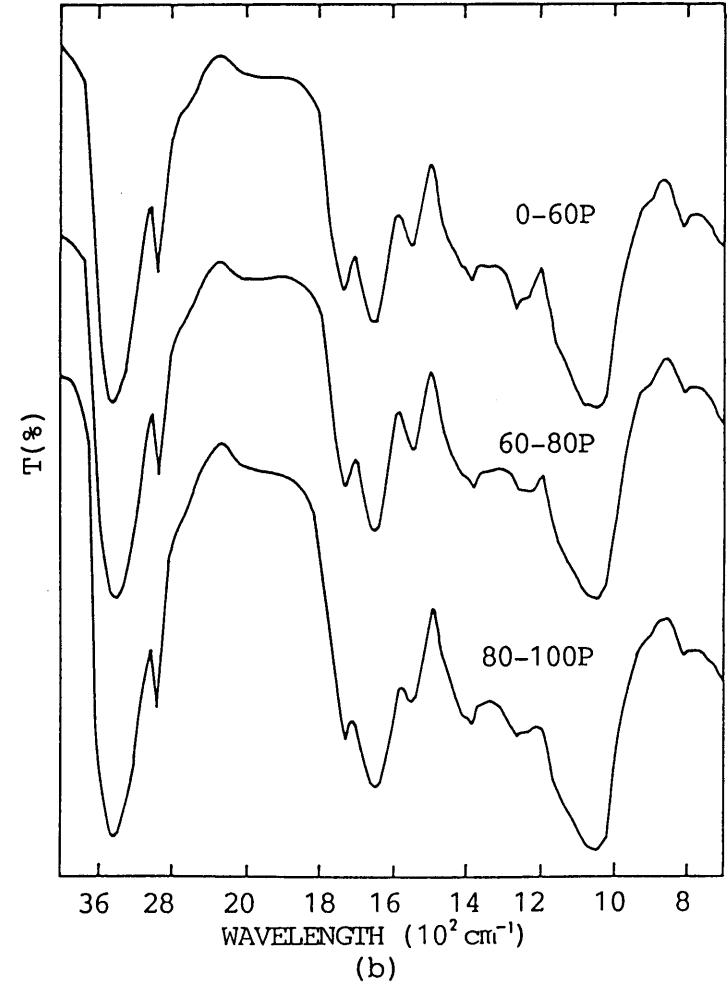
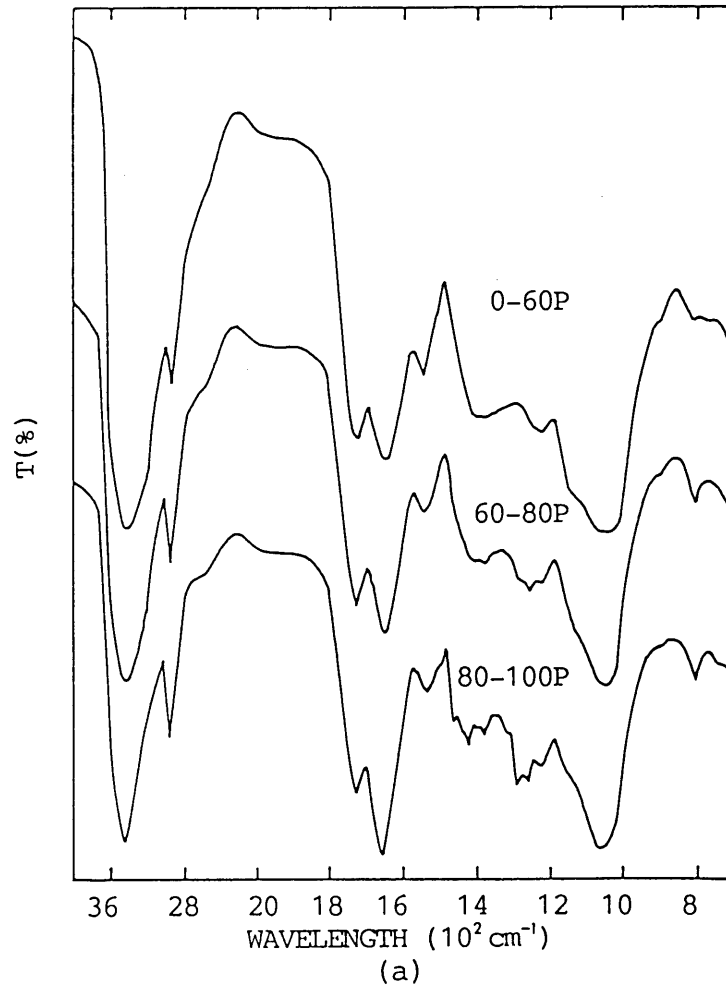


図4-35 (a)猪之頭(黒ボク土)(b)長野(低地水田土)PVP通過面分の
分別沈殿面分のIRスペクトル

I Rスペクトルにも画分間の組成の差異が認められ、低エタノール濃度で沈殿する画分から高エタノール濃度で沈殿する画分へと、糖含量、アミノ酸あるいはペプチド含量が減少し、カルボキシル基や脂肪族鎖が増加することが示された。ウロン酸の含量が、むしろ低エタノール濃度で沈殿する画分で高かったため、高エタノール濃度で沈殿する画分に含まれるカルボキシル基は、脂肪族カルボン酸によるものと推定した。90-100Pのスペクトルとエタノール可溶画分のスペクトル（本章第4項）との差は、他の画分間の差よりもはるかに大きく、エタノール沈殿画分とエタノール可溶画分では化学構造が大きく異なることが推定された。このことはまた、エタノール抽出がフルボ酸の極性の違いに基づく分画法の一つとして有効であることを示している。

沈殿法による分画では、物質の極性以外の性質も影響する。例えば、同族列の物質であれば、分子量の違いが分画の要因となる。今回の場合、特に長野土壤の試料では、90-100Pにもなお49%の糖が含まれており、また、画分間のI Rスペクトルの差も小さかったことから、他の2土壤と異なり、分子量等の組成以外の要因が、水-エタノール溶液に対する挙動に大きく影響していることが推察された。

1.1. 要約

褐色森林土（段戸）、黒ボク土（猪之頭）および低地水田土（長野）より抽出、分離したフルボ酸を、樹脂PVPに対する吸着性およびエタノールに対する溶解性に基づいて分画し、得られた画分の元素組成、IRスペクトル、可視・紫外線吸収スペクトル、糖含量、分子粒径分布、 ^{13}C -NMRおよび ^1H -NMRの分析を行ない、各画分の組成および構造について調べた。

- (1) フルボ酸のPVP吸着画分は未分画のフルボ酸と比較して、低いH/CおよびN/C、IRスペクトルにおける $1630\text{-}1600\text{cm}^{-1}$ の強い吸収、高い芳香族炭素含有率、および高い芳香族水素含有率によって特徴付けられ、フルボ酸中の芳香族成分が濃縮されたことが示された。また、カルボニル炭素、カルボキシル水素の含有率も高く、 Na^+ 型試料のIRスペクトルは、かなりの量のエステルの存在を示した。
- (2) PVP吸着画分は、エタノールに対する溶解性により、赤褐色のエタノール可溶画分80-90%と、暗褐色のエタノール不溶画分10-20%に細分画された。
- (3) PVP吸着画分の特徴は、そのエタノール可溶画分で一層顕著に認められた。低地水田土試料の芳香族炭素は全炭素の41.7%を占め、同土壌の腐植酸の値(35.2%)を上回った。一方、糖含量は2-4%、窒素含量は0.5-1.3%といずれもきわめて低かった。また、IRスペクトルよりPVP吸着画分のエタノール可溶画分と腐植酸のエタノール可溶画分、すなわちヒマトメラン酸とは構成成分が大きく異なることが推定された。
- (4) PVP吸着画分のエタノール不溶画分は、可溶画分より低い $\Delta\log K$ (0.9-1.0)を示したが、一方、糖含量も17-30%と高く、腐植化度のより高い腐植物質と多糖とが結合した物質より成ることが推定された。また、不溶画分の重量平均分子量はフルボ酸各画分中で最も高く、PVP吸着画分中の分子量約60,000以上の物質はほとんどエタノール不溶性であることが明らかとなった。
- (5) PVP通過画分は、高いH/C、IRスペクトルにおける1650、1540、1150-1050 cm^{-1} の吸収帯、高い炭水化物炭素含有率および高い置換 脂肪族水素含

有率によって特徴付けられ、糖、ペプチドがその主成分であることが明らかになった。この画分中の主な糖成分は、 ^{13}C -NMRにより1-4結合を多く含む多糖類であると推定された。

- (6) PVP通過画分は、90%以上がエタノール不溶物質であり、エタノール可溶画分の収率は5-7%であった。
- (7) PVP通過画分のエタノール不溶画分はPVP通過画分と同じ特徴を示したが、その芳香族炭素含有率はさらに低く、PVP通過画分の1/2以下であった。糖含量は土壌によって特徴的であり、ペントース含量は低地水田土、ウロン酸含量は黒ボク土でそれぞれ高い値を示した。
- (8) PVP通過画分のエタノール可溶画分は、最も分子量が小さく、低い糖含量とIRおよび ^{13}C -NMRスペクトルにおける強いアルキル鎖、アルコール性C-O、カルボキシル基のピークによって特徴付けられた。褐色森林土および黒ボク土の同画分のIRスペクトル、糖含量、 ^1H -NMRスペクトル等はきわめて類似していたが、低地水田土の試料は、他の2土壌よりも糖含量、置換脂肪族水素含有率が高く、また、芳香族水素のシグナルがみられない等、異なる性質を示した。
- (9) PVP通過画分の水-エタノールによる分別沈殿は、同画分が糖鎖と、カルボキシル基、水酸基を多く含むアルキル鎖との存在割合が少しずつ異なるきわめて多様な物質から構成されていることを明らかにした。

本研究では、フルボ酸の化学組成や構造を明らかにするために、混合物であるフルボ酸を樹脂PVPに対する吸着性、エタノールに対する溶解性に基づいてPVP吸着画分、通過画分およびそれらのエタノール可溶画分、不溶画分に分画し、得られた各画分の構成比や化学的性質を調べた。本章では、これまでに得られた結果をもとに、フルボ酸各画分の構造、組成について総合的に考察した。また、フルボ酸の化学的性質と土壌の種類との関係、腐植酸の化学的性質との関係について考察を行ない、土壌中におけるフルボ酸の生成に関して推論した。

1. フルボ酸各画分の化学構造

フルボ酸各画分の重量平均分子量（第4章第7項）と各元素の重量%（第4章第3項）から、1分子あたりの炭素、水素、窒素および酸素数を求めた。さらに、 ^{13}C -NMR（第4章第8項）から各成分炭素数を、 ^1H -NMR（第4章第9項）から各成分水素数をそれぞれ算出した。また、その際、脂肪族炭素（10-60ppm）からアルキル炭素（10-48ppm）を、芳香族炭素（110-165ppm）からフェノール炭素（150-165ppm）を、カルボニル炭素（165-216ppm）からカルボキシル炭素（165-192ppm）をそれぞれ区分して算出した（表5-1）。加えて、分子あたりのヘキソース、ペントースおよびウロン酸の数も算出した（第4章第6項）。これらの値は表5-2にまとめた。なお、炭素組成から換算した酸素数はPVP吸着-エタノール可溶画分ではやや高めであったが、他の画分では全酸素数と非常によく一致した。

1) PVP吸着-エタノール可溶画分

PVP吸着画分のエタノール可溶画分は、フルボ酸の24-47%、PVP吸着画分の81-91%にあたる主要な腐植物質画分であった（第4章第2項）。

\bar{M}_w は12,800-14,200で、元素分析、 ^{13}C -NMRの結果より、1分子あたり

表5-1 フルボ酸各画分の¹³C-NMRスペクトルから算出したアルキル炭素、フェノール炭素およびカルボキシル炭素の含有率

	アルキル炭素 (10-48ppm)	フェノール炭素 (150-165ppm)	カルボキシル炭素 (165-192ppm)
PVP吸着-			
エタノール可溶画分			
段戸 (褐色森林土)	15.6(%)	4.4(%)	27.8(%)
猪之頭 (黒ボク土)	12.0	4.5	29.3
長野 (低地水田土)	13.2	6.1	26.2
PVP吸着-			
エタノール不溶画分			
猪之頭	12.9(%)	2.9(%)	15.8(%)
PVP通過-			
エタノール可溶画分			
猪之頭	21.1(%)	6.1(%)	20.6(%)
PVP通過-			
エタノール不溶画分			
段戸	27.2(%)	0.4(%)	17.8(%)
猪之頭	18.8	0.6	16.3
長野	8.8	0.8	13.5

表5-2 フルボ酸各画分の分子あたりの各元素数、各成分炭素数、各成分水素数、および各糖の分子数

	PVP吸着		PVP通過	
	エタノール可溶画分	エタノール不溶画分	エタノール可溶画分	エタノール不溶画分
平均分子量(\bar{M}_w)	12800-14200	24700-29600	8800-10500	15700-23000
全炭素	514- 578	912-1130	308- 398	591- 812
アルキル炭素	92- 106	146	74	71- 161
炭水化物炭素	58- 95	489	87	255- 544
芳香族炭素 ^{a)}	147- 241	223	59	20- 41
(ベンゼン環)	(25- 40)	(37)	(10)	(3- 7)
フェノール炭素	23- 35	33	22	2- 7
カルボキシル炭素 ^{b)}	143- 168	179	73	105- 112
カルボニル炭素 ^{c)}	19- 25	31	35	21- 23
全水素	471- 571	1171-1507	417- 614	906-1394
アルキル水素	109- 130	334- 543	274	319- 358
置換脂肪族水素 ^{d)}	164- 219	419- 877	254	464- 663
芳香族水素	37- 57	44- 46	12	5- 24
カルボキシル水素	159- 208	205- 229	74	79- 106
全窒素	8- 20	56- 75	14- 27	50- 59
全酸素	369- 416	719- 853	256- 304	437- 697
ヘキソース	1- 2	13- 30	2- 3	11- 29
ペントース	0- 1	5- 14	1- 2	3- 14
ウロン酸	0- 1	5- 14	1	7- 15

* PVP吸着-エタノール不溶画分の各成分炭素数、エタノール可溶-エタノール可溶画分の各成分炭素数、各成分水素数は、猪之頭（黒ボク土）試料に関する値

a) アルケン炭素を含む。

b) アミド炭素を含む。

c) アルデヒド炭素を含む。

d) メトキシル基およびアルコール性水酸基を含む。

芳香族炭素を147-241含んでいることが明らかになった。芳香環を全てベンゼン環と仮定すると1分子中の芳香環数は25-40となる。芳香族炭素のうち23-35がフェノールあるいはアリルエーテルのC₁であるため、芳香環は平均1の酸素で置換されていることになる。ただし、黒ボク土のPVP吸着画分では、イオン化示差スペクトルの結果から、縮合環の存在が推定されている（第3章第4項、第5項）。

カルボキシル基の数は141-168と、芳香環数を大きく上回っており、芳香環に複数のカルボキシル基がついているほか、脂肪族カルボン酸も存在することが示唆された。¹H-NMRの結果から、芳香環の平均置換基数は4-5であることが判明したため、芳香環についているカルボキシル基の数は平均3-4で、これらのうち、いくつかはエステル結合を形成していると推定された。IRスペクトルもまたエステルの存在を示した（第4章第4項）。

¹³C-NMRスペクトルから1分子あたりの炭水化物炭素数が58-95と推定されたのに対し、比色法によって検出された糖含量は1分子あたりヘキソース1-2、ペントース0-1、ウロン酸0-1にすぎず、両者の間に大きな差がみられた。これは、¹³C-NMRスペクトルからの算出では炭水化物炭素域（60-110ppm）に現われる他の置換脂肪族炭素も炭水化物として計算しているため実際より高い値を示しているためと、比色法では、糖の種類による呈色度の差、共存物質による呈色の妨害、加水分解時の単糖の分解等により低い値を示しているためと推察した。いずれにせよ、構造中にかなりの量のエーテルあるいは糖以外のアルコール性水酸基が含まれていると推定される。アミノ糖の定量は行っていないが、分子あたりの窒素数が8-20にすぎないため、その量はわずかであると推定される。

¹³C-NMRにおいて脂肪族炭素のシグナルは、末端メチル基とメトキシル基のピーク以外はブロードな吸収帯として認められた。Steelink・Pestom（1987）は、スピネコー法を用いてフルボ酸のスペクトルの20-48ppmにみられるシグナルにはメチル炭素は存在せず、メチレン、メチンおよび4級炭素のいずれかであることを報告している。アルキル水素/アルキル炭素の比が1.4-1.7と低かったため、メチル基が少なく、枝分かれが多いと推定した。

以上より、フルボ酸中のエタノール可溶性腐植物質は、側鎖として平均水酸基1、カルボキシル基3-4を含む数十のベンゼン環（縮合環を含む場合もある）と、それらをつなぐ、あるいは側鎖としてのカルボキシル基および水酸基あるいはエーテルを含むアルキル鎖から成っていると推定した。両者の結合形態はC-C結合とエステル結合が主であると考えられるが、Khan・Schnitzer（1971）は分解生成物としてビフェニル化合物を得ており、環同士の結合も存在すると推定される。糖や含窒素化合物は含まれてはいるが微量成分にすぎない。

2) PVP吸着—エタノール不溶画分

PVP吸着画分のエタノール不溶画分は、フルボ酸中の腐植物質の9-19%に相当し、24,700-29,600と全画分中で最も大きい重量平均分子量を示した。

芳香環構造については、 $\Delta \log K$ がエタノール可溶画分よりいずれも約0.2低かったことから、フルボ酸のなかでも共役系の長い物質が選択的に分配されたと推定した（第4章第5項）。猪之頭土壌（黒ボク土）の同画分について測定した ^{13}C -NMRの結果からは、分子あたりのベンゼン環は平均37、ベンゼン環の平均置換基数は5、うち水酸基は1で可溶画分とほぼ同じであることが示された。

^{13}C -NMRスペクトルにおける脂肪族炭素のシグナルは、いずれもPVP通過画分およびそのエタノール不溶画分と化学シフトが同じであり、同画分の脂肪族部位の構造がPVP通過画分を構成する物質と類似の構造をもつことが推定された。

比色法によって検出された糖の合計は17-30%に達し、IR、 ^{13}C -NMRおよび ^1H -NMRスペクトルのいずれも多糖がこの画分の重要な構成成分であることを示した。

以上より、フルボ酸中のエタノール不溶性腐植物質画分は、フルボ酸の中でも長い共役系をもつ腐植物質と多糖とが結合した物質から構成されていると推定した。エタノールに対する不溶性は、可溶画分に比べて高い分子量、高い糖含量、高い腐植化度のいずれかあるいはそれらの複合したものに起因していると推定される。

3) PVP通過—エタノール可溶画分

PVP通過画分のエタノール可溶画分は、フルボ酸全体の約3%を占めるにすぎなかったが、他のPVP非吸着性物質とは大きく異なる構造をもつことが推定された。 \bar{M}_w は8,800-10,500で、全画分中で最も小さかった。

比色法による糖の定量値から算出した1分子中の糖の数は4-6と少なく、そのほとんどが脂肪族鎖より成っていると推定された。猪之頭土壌（黒ボク土）の同画分については、分子あたりのアルキル炭素数は74と算出された。カルボキシル基の数は芳香族炭素数を上回っており、脂肪族鎖に多くのカルボキシル基が含まれていることが推定された。また、かなりの量のアルコールあるいは脂肪族エーテルの存在が、IRスペクトルや ^{13}C -NMRスペクトルから推定された。

炭素組成からは芳香環もまた分子あたり10含んでいることが推定された。置換ベンゼンの存在はIRおよび ^1H -NMRスペクトルにおいても示された。フェノール性水酸基（アリルエーテルを含む）は2と算出された。

以上より、エタノール可溶性非腐植物質は、主にカルボキシル基と水酸基をもった脂肪族構造から成り、おそらくは側鎖としてベンゼン環、ペプチドを含んでいると推定した。

エタノールによる分画で得られた両画分が、いずれも分画前よりも小さい平均分子量を示したことを考えると、エタノール可溶性物質は、分子同士をつなぐ役目を果たしていたのかもしれない。

4) PVP通過—エタノール不溶画分

PVP通過画分のエタノール不溶画分は、フルボ酸の40-70%を占める主要画分であった。15,700-23,000の \bar{M}_w に対し、含まれるベンゼン環数はわずか3-7にすぎず、ほとんどが糖鎖と脂肪族鎖によって構成されていると推定された。また、ベンゼン環の平均置換基数は2-4とPVP吸着各画分よりも低く、うち1は水酸基であると推定された。

窒素数は分子あたり50ないし55であった。含窒素化合物の大部分はペプチドあるいはアミノ糖であると推察された。IRスペクトルにおけるアミドの吸収

(1540、1650 cm^{-1})は、フルボ酸各画分のなかで最も強かった。

エタノールを用いた分画では糖類から、他の脂肪族物質を分離することはできなかった。Tagelaarら(1989)は、腐植物質中の脂肪族部位の前駆体の可能性がある非加水分解性生体高分子の例のひとつとしてポリメチレンと多糖の重合体(1-4結合でつながった多糖の C_2 、 C_3 あるいは C_6 に直鎖および枝分かれしたアルキル鎖がエーテル結合したもの)を挙げている。このような物質はPVP通過-エタノール不溶画分の部分構造のモデルとしてきわめて考えやすい。

水-エタノールによる分別沈殿では、PVP通過画分が、エタノールに対する溶解性が少しずつ異なるきわめて多種類の物質より成ることが明らかになった(第4章第10項)。分別沈殿で得られた各細画分の糖含量は様々であり、最も高い画分では60%を越えた。また、糖含量の低い画分のIRスペクトルでは、カルボキシル基および脂肪族鎖に由来する吸収が強かった。

^{13}C -NMRスペクトルより算出した分子あたりのカルボキシル基数(アミドを含む)は105-112であった。このうちウロン酸のカルボキシル基は7-14にすぎず、主要なものはそれ以外の脂肪族カルボン酸であると推定された。また、カルボキシル基のシグナルの化学シフトはこれを支持した。

以上より、フルボ酸中のエタノール不溶性非腐植物質は、糖、ペプチド、およびカルボキシル基、水酸基を含むアルキル鎖の結合体であり、それぞれの成分の存在比が異なる多様な物質群であると推定した。

2. 土壌の種類とフルボ酸の化学的性質の関係

本研究では、フルボ酸のPVP吸着画分とPVP通過画分への分配割合が、土壌の種類と強く関連しており、腐植物質を主体とするPVP吸着画分の割合が褐色森林土で最も高く、黒ボク土、低地水田土および赤黄色土の順に低くなることを明らかにした(第3章第2項)。また、PVP吸着画分は、そのイオン化示差スペクトルの形状によって、土壌の種類に対応した3つのグループに分類された。示差スペクトルには、可視・紫外線吸収スペクトルよりも細かい構造の違いが現れるため、褐色森林土のフルボ酸が、低地水田土および赤黄色土のフルボ酸より腐植化が進んでいること、黒ボク土のフルボ酸に縮合環が存

在することなどが推定された。

しかしながら、PVP吸着画分の他の性質、可視・紫外線吸収スペクトル（第3章第3項）、IRスペクトル、元素組成、炭素組成および分子粒径分布等は、いずれも、褐色森林土、黒ボク土、低地水田土の間で明確な相違は認められなかった。PVP通過画分の各性質についてもまた、PVP吸着画分よりはばらつきが大きかったもののやはり土壌間で類似していた。これらのことから、フルボ酸の土壌間での最も大きな違いは、フルボ酸中に占めるPVP吸着画分、通過画分の割合の違いであるといえる。

フルボ酸の組成は、生化学的にも重要な土壌因子のひとつであり、土壌中の金属の移動にはフルボ酸中の腐植物質が、植物栄養分の供給には非腐植物質がそれぞれ重要な役割を果たしていると考えられる。このほかにも、例えば、Linehan (1977) はフルボ酸のトマトの根に対する成長促進作用がその腐植物質画分にあることを報告しており、また、望月・花田 (1965) はりんご園土壌のフルボ酸組成を調べ、紋羽病の発生する土壌ではいずれも非腐植物質の占める割合が高いことを明らかにしている。したがって、フルボ酸中の腐植物質と非腐植物質の存在比を表すPVP吸着画分、通過画分への分配割合は、各土壌におけるフルボ酸の特性をきわめて端的に示す指標であると結論した。

さて、PVP吸着画分、PVP通過画分に関してもそれぞれ細かく検討すると各土壌の特徴が認められた。両画分の化学的性質の土壌間の差は、エタノールを用いた細分画によって拡大した。

フルボ酸の主要な腐植物質画分であるPVP吸着-エタノール可溶画分の土壌間の差異は、 ^{13}C -NMRスペクトルにおけるメトキシ基、フェノールのシグナル強度（共に低地水田土>褐色森林土>黒ボク土）や芳香族炭素の含有率（低地水田土>黒ボク土>褐色森林土）に認められた。可視・紫外線吸収スペクトルにおける E_{280} の値もまた、芳香環含量の差を示した。低地水田土の同画分は、芳香族成分の割合がきわめて高く、また、メトキシ基、フェノールが多いことから、リグニンの分解生成物としての性格を最も強く示しているといえる。一方、褐色森林土や黒ボク土の同画分では、メトキシ基やフェノールの多くは分解され、代わりに微生物起源の脂肪族成分がその構造中に取り

込まれていると推定された。

フルボ酸の主要な非腐植物質画分であるPVP通過-エタノール不溶画分の土壌間の差異は、炭水化物炭素含有率（低地水田土>黒ボク土>褐色森林土）および飽和脂肪族炭素含有率（褐色森林土>黒ボク土>低地水田土）に認められた。IRスペクトルにおける $1500-1200\text{cm}^{-1}$ の脂肪族鎖によると推定されるいくつかの小さいピークもまた、褐色森林土>黒ボク土>低地水田土の順で強く認められた。これらのピークは、水-エタノールによる分別沈殿において高エタノール濃度で沈殿した、糖含量の低い画分ほど強く認められたが、低地水田土のPVP通過画分では、どの分別沈殿画分のスペクトルにも認められなかった。以上の結果や、低地水田土の試料で特にペントース含量が高かったことから、水田土のPVP通過-エタノール不溶画分は稲の成分であるキシラン等のヘミセルロースの性格を強くもっており、一方、褐色森林土の同画分は、微生物由来の脂肪族鎖を多く含んでいると推定された。PVP通過画分からのエタノール可溶画分の収率が褐色森林土>黒ボク土>低地水田土であったこともまた、同じ理由によると推定した。

したがって、フルボ酸の組成についてより詳しくみると、土壌によって植物体成分の性格がより強く現れているフルボ酸と、微生物由来の物質をより多く含んでいるフルボ酸とが存在するものと推定した。

3. フルボ酸と腐植酸の化学的性質の比較

本研究では、フルボ酸を調製する際に、同時に同じ土壌から腐植酸もまた分離、精製し、フルボ酸各画分とともに、元素組成、可視・紫外線吸収スペクトル、イオン化示差スペクトル、IRスペクトル、分子粒径分布および ^{13}C -NMRスペクトルの測定を行なった。

今回の分析結果からは、黒ボク土の腐植酸（A型）、褐色森林土の腐植酸（P型）、低地水田土の腐植酸（Rp型）の性質について、これまでも報告されている（Kuwatsukaら 1978； Kumada・Aizawa 1958； Tsutsuki・Kuwatsuka 1979d）ように、

①Rp型→P型→A型への炭素および酸素含量の増加、水素および窒素含量

- の減少、
- ② I Rスペクトルにおける R_p型→P型→A型への芳香族C-H、芳香環C=C、カルボキシルC=O等の吸収強度の増大とアミドN-H等の吸収強度の減少、
 - ③各型間の ΔE_{7-12} スペクトルのパターンの違い、
- 等が確認された。また、¹³C-NMRスペクトルにおいて、
- ④ R_p型→A型で芳香族炭素含有率、カルボニル炭素含有率の増大と炭水化物炭素を含む脂肪族炭素含有率の減少、
 - ⑤ R_p型→A型でのメトキシル基およびフェノールのシグナル強度の減少、
- が認められた。

これらのうち、フルボ酸においても確認されたのは、③（PVP吸着画分）と⑤（PVP吸着-エタノール可溶画分）だけであった。

フルボ酸中の腐植物質と腐植酸との化学的性質の明確な相違は、

- ①分子粒径分布（腐植酸>フルボ酸）、
- ②酸素含量（フルボ酸>腐植酸）およびO/C（フルボ酸>腐植酸）、
- ③窒素含量（腐植酸>フルボ酸）、
- ④カルボキシル炭素含有率（フルボ酸>腐植酸）、
- ⑤可視・紫外線吸収スペクトルにおける可視部の吸収強度（腐植酸>フルボ酸）および色調係数（フルボ酸>腐植酸）、

に認められた。また、フルボ酸の PVP吸着画分からのエタノール可溶画分の収率が80-90%と高かったのに対し、腐植酸からのヒマトメラン酸の収率が8%未満であったのも、両画分の性質の違いのひとつといえる。

また、フルボ酸と腐植酸との組成の差として従来からいわれてきた芳香環含量（腐植酸>フルボ酸）および糖含量（フルボ酸>腐植酸）の差は、PVP吸着-エタノール可溶画分と腐植酸との間には認められなかった。したがって、フルボ酸中の多くの腐植物質は、腐植酸と同程度の芳香族性を有しているといえる。しかしながら、両画分の可視部吸収の差は依然として大きく、フルボ酸中の腐植物質と腐植酸との違いは、芳香族成分の量の差ではなく、芳香族成分の縮重合度の差であることが明らかになった。

可視部吸収については、PVP吸着-エタノール可溶画分よりもむしろエタ

ノール不溶画分の方が強く、その $\Delta \log K$ は、いずれもR_p型腐植酸の値に匹敵した。PVP吸着-エタノール不溶画分はまた、フルボ酸各画分の中で最も高い平均分子量を示したが、パーミエーションクロマグラフィーにおける溶出曲線は、その分子粒径が腐植酸の分子粒径よりはるかに小さいことを示した。

腐植酸とフルボ酸の構造の違いは、主として酸に対する溶解性の違い、すなわち、酸性水溶液に対し、フルボ酸は溶解するが腐植酸は沈殿することによって両者が分画されていることに起因するものであり、平均分子量が低く (\bar{M}_w 30,000以下)、カルボキシル基含量が高い (PVP吸着-エタノール可溶画分) あるいは糖含量が高い (PVP吸着-エタノール不溶画分) ことがフルボ酸の重要な特徴であるといえる。

また、低地水田土の腐植酸のエタノール可溶画分 (ヒマトメラン酸) のIRスペクトルは、カルボキシル基の吸収が強く、アミドの吸収が弱い点で、未分画の腐植酸とは異なっており、フルボ酸のPVP吸着-エタノール可溶画分と類似していた。しかしながら、PVP吸着-エタノール可溶画分のIRスペクトルがきわめてブロードであったのに対し、ヒマトメラン酸のスペクトルは各吸収帯の分離が明確で、両画分の平均化学構造が大きく異なることが推定された。

一方、同一土壌から分離した腐植酸とフルボ酸PVP吸着画分の ΔE_{7-12} スペクトルの類似、さらには各種土壌のPVP吸着-エタノール可溶画分の ^{13}C -NMRスペクトルにおけるメトキシル基およびフェノールのシグナルの強度が腐植酸と同様、水田土>黒ボク土であったことは、腐植酸とフルボ酸中の腐植物質の生成過程における関連性を示唆するものである。

4. フルボ酸の生成に関する一考察

フルボ酸中の腐植物質の生成過程については、2つのパターンが考えられる。1つは、リグニンがオリゴマーのレベルまで分解し、酸化された後、再重合するというもので、腐植酸の生成過程の途中の段階にあたる。この場合、フルボ酸は腐植酸の前駆体ということになる。もう1つは、反対に腐植酸の酸化分解によってできるとするものである。Campbellら (1964) は ^{14}C 年代測定法を用い

て、各腐植画分の平均残留時間 (MRT) を測定し、フルボ酸のMRTが腐植酸のそれより明らかに短いことを示している。また、Nissenbaum・Challinger (1974) はフルボ酸の $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比が植物体のそれに近いことからフルボ酸が植物遺体から腐植酸、ヒューミンにかけての腐植化過程の中間に位置することを推察している。しかしながら、フルボ酸には易分解性の非腐植物質が多く含まれており、それらが結果に大きく影響していると考えられるため、必ずしもフルボ酸中の腐植物質が腐植酸の前駆体であるとはいえない。

本研究において、黒ボク水田土 (茨城) の腐植組成は、他の黒ボク土と類似しており、水田化は黒ボク土の腐植組成にほとんど影響しないことが推定された (第2章)。また、降灰後70年足らずの若い黒ボク土 (大野原) の腐植組成は既に他の黒ボク土と差がなく、土壌生成の初期から腐植酸が積極的に蓄積されることが示された。一方、フルボ酸に関しても、黒ボク水田土ではPVP吸着画分の割合が、他の低地水田土より明らかに高く、その ΔE_{7-12} スペクトルも他の黒ボク土と同じI型であることが明らかになった。また、若い黒ボク土では、PVP吸着画分の ΔE_{7-12} スペクトルはII型に近いIII型であったが、吸着画分の割合は46.0%と高い値を示した。これらのことから、フルボ酸中の腐植物質もまた、黒ボク土においては、早くから蓄積され、その後、安定に保たれつつ、構造が変化していくことが推察された。ただし、重合に伴う分子量の増大や共役系の発達は、腐植酸画分への移行を意味することになるため、おそらく、両画分の間でかなりの行き来があるものと推察される。もし、腐植酸の酸化分解物がフルボ酸の主成分であるならば、A型腐植酸からできたフルボ酸はI型のスペクトル、Rp型腐植酸からできたフルボ酸はIII型のスペクトルをそれぞれ示すという対応関係は十分に成立しうると考えられる。

鈹質土壌では、腐植組成の分析結果から、ヒューミンの蓄積が先行することが推察された。赤黄色畑地土壌における厩肥の連用 (20t、50t、100t/ha、8年間) は、全有機物量と共に腐植酸の相対含量も増大させた。また、フルボ酸の相対含量は増大しなかったが、フルボ酸中の腐植物質の割合は増加した。フルボ酸の相対含量が増えなかったのは、易分解性有機物の消費が大きいためと考えられる。Rp型腐植酸 (低地水田土および赤黄色土由来) については、 ^{13}C -

NMRスペクトルに強いメトキシル基およびフェノールのシグナルがみられたことのほか、 ΔE_{7-12} スペクトルやIRスペクトルの類似から、リグニン様構造を多く含むことが推定された。これに対し、同一土壌より分離したフルボ酸のPVP吸着各画分では、IRスペクトルにはリグニン様構造の存在を示す吸収は認められず、また、 ΔE_{7-12} スペクトルにおいては、リグニンおよびRp型腐植酸でみられた360nmのピークが350nm付近に認められた。したがって、フルボ酸の方がより多くの変化を受けていることは明らかといえる。

褐色森林土では、有機物含量の増大に伴って、さらに腐植酸およびフルボ酸の蓄積がすすみ、それらの相対含量も増大していた。褐色森林土のフルボ酸では、また、先にも述べたように脂肪族成分の構造中への取込がすすんでおり、その分、糖含量が減少していた。

以上をもとに、フルボ酸中の腐植物質の生成、蓄積に関して次のように推論した。なお、I型、II型、III型はフルボ酸のイオン化示差スペクトルの分類（第3章第4項）である。まず、土壌に供給された有機物中のリグニンが部分分解後、再重合すると共に蛋白質、糖質と結合して、Rp型腐植酸となる。腐植酸は粘土鉱物あるいは金属と結合して、ヒューミンあるいは結合型腐植酸となる。腐植酸が増加すると、粘土表面に結合した腐植酸に吸着される遊離型腐植酸が増える。リグニンおよび腐植酸の一部はさらに低分子にまで分解され、酸化を受けて水溶性の腐植物質（フルボ酸-III型）となる。フルボ酸分子は、さらに低分子の芳香族カルボン酸を取り込んだり（エタノール可溶画分）、糖質やペプチドと結合して（エタノール不溶画分）、分子量1万から数万の物質となる。こうしてできたフルボ酸はさらに重合、縮合が進んで腐植酸となり、その腐植酸もまた、分解されてフルボ酸になる。これを繰り返すうちにフェノールやメトキシル基は徐々に減少し、代わりに微生物起源の脂肪族鎖が取り込まれる（II型）。腐植酸ではまた、蛋白質を失って分子量が低くなる、あるいは微生物の生産した色素を取り込むといった変化が起こる（P型、B型）。一方、黒ボク土では、腐植酸が酸化アルミニウムと結合して最初から遊離型腐植酸（RpあるいはP型）が蓄積する。一部はやはり分解、酸化してフルボ酸となる（III型）。腐植酸はアルミニウムを触媒として縮重合し（A型）、フルボ酸も

また腐植酸との行き来を繰り返して、縮合環を含むなど異なる構造をもつ分子へと変化していく（I型）。いずれの過程においても縮合あるいは重合によって、酸に対する溶解性を失ったものは腐植酸あるいはヒューミン画分へと移行するため、結果として、いずれの土壌においても吸光特性や分子量はあまり異ならない。

土壌有機物（腐植）の酸およびアルカリ可溶成分であるフルボ酸は、腐植酸、ヒューミンとともに主要な腐植画分の一つであり、土壌環境中において、金属の移動や集積、植物や微生物に対する栄養の供給、pHや人工有機物に対する緩衝作用等、多くの役割を果たしていることが知られている。フルボ酸の化学構造の解明は、フルボ酸のこれら諸機能の解明や、土壌の生成機構の解明にとって重要な問題である。しかしながら、フルボ酸が複雑な高分子物質の混合物であるのに加え、これまで腐植の研究が腐植酸を中心に行なわれてきたため、その化学構造に関しては未だに不明な点が多い。

本研究は、フルボ酸の化学組成や構造を、その由来する土壌の種類および性質との関連、腐植酸の性質との関連に注目しながら、解明することを目的として以下の研究を行なった。

1. 各種土壌のフルボ酸含量と腐植組成

各種土壌型の土壌19種を用い、土壌の全炭素量とフルボ酸炭素量との間の関係を調べた。両者の間には、高い正の相関関係が認められ、土壌の種類が如何にかかわらず、有機物の蓄積に伴ってフルボ酸含量も増加することが示された。フルボ酸の全有機物に対する相対含量は、総体的にみると褐色森林土で最も高く、黒ボク土、低地水田土（灰色および褐色低地土）および赤黄色土の順であった。また、各種の土壌は特徴的な腐植組成（フルボ酸、腐植酸、ヒューミンの構成比）を示し、ヒューミン画分の含有率の差によって(a)褐色森林土および黒ボク土と、(b)低地水田土および赤黄色土の2グループに明確に分かれた。

2. フルボ酸のPVPによる分画

各種土壌のフルボ酸を、樹脂PVP（polyvinylpyrrolidone）に対する吸着性に基づいて、褐色の吸着画分と淡黄色の通過画分とに2分画した。フルボ酸のPVP吸着画分とPVP通過画分の元素組成、IRスペクトル、分子粒径

分布、 ^{13}C -NMRから算出した炭素組成等の諸性質は、両画分間で大きく異なっており、芳香環構造を中心とした高分子化合物である腐植物質は主に吸着画分に、炭水化物、ペプチド等の非腐植物質は主に通過画分にそれぞれ分画されたことを示した。

フルボ酸のPVP吸着画分、通過画分への分配割合、すなわち、腐植物質と非腐植物質の構成比は、明らかに土壌の種類によって異なっており、PVP吸着画分の割合は、褐色森林土>黒ボク土>低地水田土および赤黄色土であった。

PVP吸着画分のpH12-7 (ΔE_{7-12}) スペクトルおよびpH7-3 (ΔE_{3-7}) スペクトルは、土壌の種類に対応した3つのグループに分かれ、同画分の化学構造が土壌の種類によって異なることを示した。また、黒ボク土のフルボ酸が、縮合芳香環を含んでいることが推定された。

同一土壌から得られたフルボ酸PVP吸着画分と腐植酸の ΔE_{7-12} スペクトルは類似しており、各土壌におけるフルボ酸中の腐植物質と腐植酸の構造の類似を示した。一方、PVP通過画分の ΔE_{7-12} および ΔE_{3-7} スペクトルには、土壌間の差は認められず、いずれも側鎖に共役系をもたないフェノールが分配されたことを示した。

3. PVP吸着画分のエタノールに対する溶解性に基づく分画

フルボ酸PVP吸着画分を、さらにエタノールに対する溶解性に基づいて細分画した。両細画分への分配割合は、エタノール可溶画分がPVP吸着画分の主要成分であることを示した。

PVP吸着-エタノール可溶画分には、さらに腐植物質が濃縮され、窒素含量および糖含量はきわめて低く、一方、腐植酸に匹敵する高い芳香族炭素含有率を示した。しかしながら、可視部吸収は、腐植酸との間に依然として著しい差が認められ、腐植酸とフルボ酸中の腐植物質の違いは芳香環の数にはなく、その縮重合度にあることが明らかになった。

このほか、フルボ酸中の腐植物質と腐植酸の間には、窒素含量（腐植酸>フルボ酸）、分子量（腐植酸>フルボ酸）およびカルボキシル基含量（フルボ酸>腐植酸）に明確な差が存在することが明らかになった。

元素分析と ^{13}C -NMRおよび ^1H -NMRの結果から、エタノール可溶画分に含まれるベンゼン環の平均置換基数は4-5で、うちフェノール性水酸基を1つ含むことが推定された。また、カルボニル炭素含有率はいずれも30%を越えており、 Na^+ 型試料のIRスペクトルおよび ^{13}C -NMRは、ベンゼン環に複数のカルボキシル基がついているのみでなく、側鎖にもカルボキシル基が存在するほか、さらに、エステル、カルボニル基も存在することを示した。

一方、PVP吸着-エタノール不溶画分は、エタノール可溶画分の7-8倍の糖含量および2倍の平均分子量を示し、腐植物質と多糖とが結合した物質から成ることが推定された。

4. PVP通過画分のエタノールに対する溶解性に基づく分画

フルボ酸PVP通過画分もまた、エタノール可溶画分とエタノール不溶画分とに細分画した。両細分画への分配割合は、エタノール不溶画分がPVP通過画分の主要成分であることを示した。

PVP通過-エタノール不溶画分の主成分は多糖であり、芳香族炭素の含有率はPVP通過画分の1/2以下にすぎなかった。糖含量は土壌間で異なり、ペントース含量は低地水田土由来の試料で、ウロン酸含量は黒ボク土由来の試料で、それぞれ高い傾向が認められた。また、多糖の主要な結合形態は1-4結合であることが推察された。糖含量は、低地水田土、黒ボク土、褐色森林土の順で減少し、逆にその順で、飽和脂肪族炭素の含有率が高かった。

PVP通過-エタノール不溶画分はまた、全炭素の22-23%にあたるカルボニル炭素が含んでいた。そのうち、ウロン酸のカルボキシル基は10%前後にすぎず、主なものは脂肪族鎖についたカルボキシル基であると推定された。

一方、PVP通過-エタノール可溶画分は、糖含量が低く、構造中に長いアルキル鎖と多くの水酸基、カルボキシル基を含んでいることが明らかになった。エタノール可溶画分の重量平均分子量は9,000-11,000で、フルボ酸各画分中で最も小さかった。

PVP通過画分については、さらに、水-エタノールによる分別沈殿を行ない、同画分が糖鎖と脂肪族鎖の構成比が少しずつ異なるきわめて多種類の物質

から構成されていることを明らかにした。

以上のように本研究では、フルボ酸を、①腐植物質、②腐植物質と多糖を中心とする非腐植物質とが結合した物質、③多糖を中心とした非腐植物質および④脂肪族鎖を中心とした非腐植物質の4画分に分画した。各画分の多くの化学的性質は土壌間で類似しており、各画分の構成比が、各種土壌におけるフルボ酸の特徴を端的に示した。また、フルボ酸中の腐植物質の蓄積過程および構造が、腐植酸の蓄積や構造と密接に関連している反面、腐植酸とフルボ酸の間で分子量、縮重合度、カルボキシル基含量に明確な差が存在することを明らかにした。非腐植物質に関しては、土壌間で糖鎖と脂肪族鎖の割合あるいは糖組成が異なることを明らかにした。

謝 辞

本研究は、名古屋大学農学部教授楯塚昭三博士の御指導のもとに行なわれたものであります。本論文を終えるにあたり、氏の懇切なる御指導と御校閲の労に対して深く謝意を表します。

研究の遂行および論文の作成にあたり、多くの有益な御助言、御指導を賜りました名古屋大学農学部筒木潔博士に深く感謝いたします。

研究の遂行および論文の作成にあたり、その土壌学全般にわたる幅広い知識から貴重な御助言と、ときに叱咤激励を賜りました名古屋大学農学部助教授木村真人博士に深く感謝いたします。

また、数々の御助言や励まし、御協力を賜りました新井重光博士（現在農林省農業環境技術研究所）、片山新太博士、三輪教子博士をはじめとする名古屋大学土壌学研究室の皆様方に深く感謝いたします。

また、貴重な資料および試料を賜りました井藤和人氏（住友化学工業株式会社）に深く御礼申し上げます。

また、 ^{13}C -NMRの測定に御協力いただきました通産省工業技術院名古屋工業技術試験所の鳥山和美博士、岡崎正治博士に深く御礼申し上げます。

最後に故名古屋大学名誉教授熊田恭一博士に深く感謝いたします。氏は生前、わが国の腐植研究の第一人者として、多大な功績を残されました。氏の御指導を直接賜わる機会を決して多くはありませんでしたが、その著書をはじめ、いろいろな形で多くのことを学ばせていただきました。重ねて謝意を表します。

引用文献

- Anderson, R.A. & Sowers, J.A. (1968), Optimum conditions for bonding of plant phenols to insoluble polyvinylpyrrolidone, *Phytochem.*, 7, 293-301.
- Arshad, M.A., Ripmeester, J.A. & Schnitzer, M. (1988), Attempts to improve solid state ^{13}C NMR spectra of whole minerals soils, *Can. J. Soil Sci.*, 68, 593-602.
- Bach Tuyet, L.T., Iiyama, K. & Nakano, J. (1985), Analyses of carboxymethylated polysaccharides by the use of ^1H -NMR. Preparation of carboxymethylcellulose from refiner mechanical pulp IV, *木材学会誌*, 31, 14-19.
- Ballard, T.M. (1971), Role of humic carrier substances in DDT movement through forest soil, *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 35, 145-147.
- Campbell, C.A., Paul, E.A., Rennie, D.A. and McCallum, K.J. (1966), Applicability of the carbon-dating method of analysis to soil humus studies, *Soil Sci.*, 104, 217-224.
- Chen, Y. (1986), Effects of humic substances on plant growth, IHSS 3rd International meeting. Abstracts of papers, p. 27.
- Chen, Y., Seneki, N. & Schnitzer, M. (1977), Information provided on humic substances by E_4/E_6 ratios, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 41, 352-358.
- Cheshire, M.V. (1979), Nature and Origin of Carbohydrates in Soils, Academic Press, London, 216pp.
- Clifford, M.N. (1974), The use of poly-N-vinylpyrrolidone as the adsorbent for the chromatographic separation of organic acids and other phenolic compounds, *J. Chromatogr.*, 94, 261-266.
- Donovan, J.W., Laskowski, M., Jr. & Scheraga, H.A. (1958), Influence of ionization of carboxyl groups on the ultraviolet absorption

- spectrum of lysozyme, *Biochem. Biophys. Acta*, 29, 455-456.
- Flaig, W., Beutelspacher, H. & Rietz, E. (1975), Chemical composition and physical properties of humic substances, in: J.E. Gieseking (Ed.), *Soil Components. Volume 1. Organic Components*, Springer-Verlag, New York, p. 1-211.
- Forsyth, W.G.C. (1947), Studies on the more soluble complexes of soil organic matter. I. A method of fractionation, *Biochem. J.*, 41, 176-181.
- Gerasimowicz, W.V. & Byler, D.M. (1985), Carbon-13 CPMAS NMR and FTIR spectroscopic studies of humic acids, *Soil Sci.*, 139, 270-278.
- Goh, K.M. (1970), Organic matter in New Zealand soils. Part 1. Improved methods for obtaining humic and fulvic acids with low ash content, *N. Z. J. Sci.*, 13, 669-686.
- Hatcher, P.G., Breger, I.A., Maciel, G.E. & Szeverenyi, N.M. (1985), Geochemistry of humin, in: G.R. Aiken, D.M. McKnight, R.L. Wershaw & P. MacCarthy (Ed.), *Humic Substances in Soil, Sediment, and Water*, John Wiley and Sons, New York, p. 275-302.
- Hatcher, P.G., Rowan, R. & Mattingly, M.A. (1980), ^1H and ^{13}C -N.M.R. of marine humic acids, *Org. Geochem.*, 2, 77-85.
- 菱田和己 (1989), 植物生長促進物質に関する土壌学的研究, 名古屋大学修士論文, 211pp.
- 深山政治, 井田明, 徳永美治, 森哲郎, 森田禧代子, 赤塚恵, 全窒素. 土壌養分測定法委員会編, 土壌養分分析法, 養賢堂, 171-177.
- 福井作蔵 (1969), 還元糖の定量法, 生物化学実験法 1. 東京大学出版会, pp. 55-59, 83-89.
- 石塚英弘 (1975), ^{13}C -NMRによる生体高分子の研究, 高分子のNMR(II) - 機器による高分子分析(VI) -, 化学同人, p. 189-210.
- 井藤和人 (1985), 土壌腐植の化学組成に関する研究, 名古屋大学修士論文, p. 166-195.

- 管家文左衛門 (1987), 糖組成からみた水田と畑土壌の特徴, 土肥誌, 58, 702-707.
- 管家文左衛門 (1988), 水田土壌中の炭水化物の組成と挙動, 福島県農業試験場特別研究報告 第4号, 38pp.
- Khan, S.U. (1973), Interaction of humic substances with bipyridylium herbicides, *Can. J. Soil Sci.*, 53, 199-204.
- Khan, S.U. & Schnitzer, M. (1971), Further investigations of the chemistry of fulvic acid, soil humic fraction, *Can. J. Soil Sci.*, 49, 2302-2309.
- Khan, S.U. & Sowden, F.J. (1972), Distribution of nitrogen in fulvic acid fractions extracted from the Black Chernozemic soils of Alberta, *Can. J. Soil Sci.*, 52, 116-118.
- Kogel, I., Zech, W. & Hatcher, P.G. (1988), Chemical composition of the organic matter in forest soils: the humus layer, *Z. Pflanzener-nahr. Bodenk.*, 151, 331-340.
- Kononova, M.M. (1966), *Soil Organic Matter; Its Nature, its Role in Soil Formation and in Soil Fertility*. 2nd Eng. Ed., Pergamon Press, Oxford. 544pp.
- コノノワ, M.M. 著, 管野一郎, 久馬一剛, 徳留昭一, 有村玄洋共訳 (1976), 土壤有機物, 農山漁村文化協会, 462pp.
- Kononova, M.M., Bel'chikova, N.P. & Nikiforov, V.K. (1958), Use of the chromatographic method in studying humic substances of the soil, *Sov. Soil Sci.*, 3, 285-292.
- 久保哲茂 (1983), 林野土壌の分布状態, 「日本の森林土壌」編集委員会編, 日本の森林土壌, p. 63-110.
- 熊田恭一 (1981), 土壤有機物の化学, 第2版, 学会出版センター, 304pp.
- Kumada, K. (1985a), Elementary composition and absorption spectra of humic and fulvic acids, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 31, 437-448.
- Kumada, K. (1985b), Ionization- and reduction-difference spectra of

- humic and fulvic acids, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 31, 449-461.
- Kumada, K. (1987), *Chemistry of Soil Organic Matter*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo., Elsevier, Amsterdam, 241pp.
- Kumada, K. & Aizawa, K. (1958), The infra-red spectra of humic acids, *Soil Plant Food*, 3, 152-159.
- Kumada, K. & Kawamura, Y. (1968b), On the fractionation of humic acids by a fractional precipitation technique, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 14, 198-200.
- Kumada, K., Sato, O., Ohsumi, Y. & Ohta, S. (1967), 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.
- 鍬塚昭三 (1984), 土壌の有機成分, 新土壌学, 朝倉書店, p. 39-54.
- Kuwatsuka, S., Tsutsuki, K. & Kumada, K. (1978), Elementary composition of humic acids. Chemical studies on soil humic acids. I, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 24, 337-347.
- 鍬塚昭三, 渡辺彰, 新井重光 (1986), フルボ酸の吸着樹脂による分画. 土壌フルボ酸の化学的研究(第1報), 日本土壌肥料学会中部支部第53回例会講演要旨集, p. 2.
- 鍬塚昭三, 渡辺彰, 永井雄太郎 (1988), P型腐植酸Pg画分の化学的性質, 日本土壌肥料学会講演要旨集第34集, p. 10.
- Kuwatsuka, S., Watanabe, A., Ito, K. & Arai, S., Comparison of two preparation method of humic and fulvic acids, IHSS method and NAGOYA method, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 投稿中
- Linehan, D.J. (1976), Some effects of a fulvic acid component of soil organic matter on the growth of cultured excised tomato roots, *Soil Biol. Biochem.*, 8, 511-517.
- Linehan, D.J. (1977), A comparison of the polycarboxylic acids extracted by water from an agricultural top soil with those extract-

- ed by alkali, *J. Soil Sci.*, 28, 369-378.
- Lowe, L.E. (1975), Fractionation of acid-soluble components of soil organic matter using polyvinyl pyrrolidone, *Can. J. Soil Sci.*, 55, 119-126.
- Malcolm, R.L., Bloom, P., Clapp, E. & Bowles, C. (1988), ^{13}C -NMR characterization of soil interstitial waters and alkaline-soluble soil fulvic acids isolated by Polyclar AT, dialysis, and XAD-8 resin techniques, Abstracts of IHSS 4th international meeting.
- Maqueda, C., Morillo, E. & Pérez Rodríguez, J.L. (1989), Interaction in aqueous solution of certain pesticides with fulvic acids from a spodosol soil, *Soil Sci.*, 148, 336-345.
- 松田和雄 (1987), 多糖の分画, 生物化学実験法 20. 多糖の分離・精製法, 学会出版センター, p. 47-73.
- 松田治和 (1986), ^1H -NMR スペクトル, 機器分析のてびき (データ集) (増補改訂版), 化学同人, p. 15-30.
- Mehta, N.C., Dubach, P. & Deuel, H. (1961), Carbohydrates in the soil, *Ad. Carbohy. Chem.*, 16, 335-355.
- 三崎旭, 奥山隆, 石塚稲夫, 山川民夫, 音谷登, 吉沢善作 (1976), 化学的分解および修飾, 生化学実験講座 4. 糖質の化学一下, 日本生化学会編, 東京化学同人, p. 505-509.
- 諸星紀幸, 榑原彰 (1972), アルカリ処理によるリグニン分子の変化. NMR による側鎖の長さおよび芳香環縮合度の測定について, 木材学会誌, 18, 27-35.
- 望月武雄, 花田慧 (1965), 土壌フルボ酸組成と発病との関係. りんご紋羽病と土壌状態との関係について (第3報), 土肥誌, 36, 311-316.
- 村田富二郎 (1964), 石炭化学. 勁草書房, p. 81.
- Nissenbaum, A. & Schallinger, K.M. (1974), The distribution of the stable carbon isotope ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) in fractions of soil organic matter, *Geoderma*, 11, 137-145.

- Oden, S. (1919), Die Huminsäuren, *Kolloidchem. Beih.*, 11, 75-260.
- Ogner, G. & Schnitzer, M. (1971), Chemistry of fulvic acid, a soil humic fraction, and its relation to lignin, *Can. J. Soil Sci.*, 49, 1053-1063.
- 岡原光男 (1986), 赤外吸収スペクトル, 機器分析のてびき (データ集) (増補改訂版), 化学同人, p. 1-14.
- Preston, C.M. & Blackwell, B.A. (1985), Carbon-13 nuclear magnetic resonance for a humic and a fulvic acid: Signal-to-noise optimization, quantitation, and spin-echo techniques, *Soil Sci.*, 139, 88-96.
- Pretsch, E., Clerc, T., Seibl, J. & Simon, W. 著, 中西香爾, 梶原正宏, 堤憲太郎訳 (1982), 有機化合物スペクトルデータ集, 講談社サイエンティフィック, 326pp.
- Rice, J.A. & MacCarthy, P. (1988), Comments on the literature of the humin fraction of humus, *Geoderma*, 43, 65-73.
- 斉藤肇 (1986), 固体高分解能NMR, 科学と工業, 60, 473-479.
- 斉藤淳, 田中誠之 (1975), 高分子の¹³C-NMR化学シフト図表による解析. 高分子のNMR(II)-機器による高分子分析(VI)-, 化学同人, p. 91-120.
- Saiz-Jimenez, C. & de Leeuw, J.W. (1984), Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry of soil polysaccharides, soil fulvic acids and polymaleic acid, *Org. Geochem.*, 6, 287-293.
- Saiz-Jimenez, C. & de Leeuw, J.W. (1986), Chemical characterization of soil organic matter fractions by analytical pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry, *J. Anal. Appl. Pyrol.*, 9, 99-119.
- Scheraga, H.A. (1957), Tyrosyl-carboxylate ion hydrogen bonding in ribonuclease, *Biochem. Biophys. Acta*, 23, 196-197.
- Schnitzer, M. (1978), Humic substances: chemistry and reactions, in: M. Schnitzer, & S.U. Khan (ed.), *Soil Organic Matter*, Elsevier, Amsterdam, p. 1-64.

- Schnitzer, M. (1985), Nature of nitrogen in humic substances, in: G.R. Aiken, D.M. McKnight, R.L. Wershaw & P. MacCarthy (Ed.), *Humic Substances in Soil, Sediment, and Water*, John Wiley and Sons, New York, p. 303-328.
- Schnitzer, M. (1986), Binding of humic substances by soil mineral colloids, in: P.M. Huang & M. Schnitzer (ed.) *Interactions of soil minerals with natural organics and microbes*, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, p. 77-101.
- Schnitzer, M. & Barton, D.H.R. (1963), A new experimental approach to the humic acid problem, *Nature*, 198, 217-219.
- Schnitzer, M. & Khan, S.U. (1972), *Humic Substances in the Environment*, Marcel Dekker, Inc., New York. 327pp.
- Schnitzer, M. & Kodama, H. (1976), The dissolution of micas by fulvic acid, *Geoderma*, 15, 381-391.
- Schnitzer, M. & Poapst, P.A. (1967), Effects of a soil humic compound on root Intitation, *Nature*, 213, 598-599.
- Schnitzer, M. & Preston, C.M. (1986), Analysis of humic acids by solution and solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 50, 326-331.
- Schnitzer, M. & Skinner, S.I.M. (1968), Gel filtration of fulvic acid, a soil humic compound, in: *Isotopes and Radiation in Soil Organic Matter Studies*, Intern. Atomic Energy Agency, Vienna, p. 41-55.
- 志村憲助, 江尻慎一郎, 吉田充輝, 石原弘章 (1978), ゲル濾過法. 生物化学実験法11, 学会出版センター, 236pp.
- 白谷良輔, 熊田恭一 (1973), 腐植酸の元素組成. 腐植酸の化学的性質に関する研究 (第2報), 土肥誌, 44, 121-125.
- Sowden, F.J. & Deuel, H. (1961), Fractionation of fulvic acid from the B horizon of a podzol. *Soil Sci.*, 91, 44-48.
- Sowden, F.J., Griffith, S.M. & Schnitzer, M. (1976), The distribution

- of nitrogen in some highly organic tropical volcanic soils, *Soil. Biol. Biochem.*, 8, 55-60.
- Steelink, C. & Petsom, A. (1987), Structural features of lignins and humic substances as revealed by spin-echo and broadband decoupled C-13 NMR spectroscopy, *Sci. Total Environ.*, 62, 165-174.
- Stevenson, F.J. (1982), *Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reactions*, John Wiley and Sons, New York, 443pp.
- Stevenson, F.J. (1985), Geochemistry of soil humic substances, in: G.R. Aiken, D.M. McKnight, R.L. Wershaw & P. MacCarthy, (Ed.), *Humic Substances in Soil, Sediment, and Water*, John Wiley and Sons, New York, p. 13-52.
- Swift, R.S. (1985), Fractionation of soil humic substances, in: G.R. Aiken, D.M. McKnight, R.L. Wershaw & P. MacCarthy (Ed.), *Humic Substances in Soil, Sediment, and Water*, John Wiley and Sons, New York, p. 387-408.
- Swincer, G.D., Oades, J.M. & Greenland, D.J. (1968), The isolation of polysaccharides from soil. Studies on soil polysaccharides. I, *Aust. J. Soil Res.*, 6, 211-224.
- 立川凉 (1966), 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.
- Tegelaar, E.W., de Leeuw, J.W. & Saiz-Jimenez, C. (1989), Possible origin of aliphatic moieties in humic substances, *Sci. Total Environ.*, 81/82, 1-17.
- 寺島典二 (1982), 物理的性質, 中野準三編, *リグニンの化学—基礎と応用—*, ユニ出版株式会社, p.169-210.
- Theng, B.K.G. & Posner, A.M. (1967), Nature of the carbonyl groups in soil humic acid, *Soil Sci.*, 104, 191-201.
- 筒木潔 (1979), 土壌腐植酸に関する化学的研究, 名古屋大学学位論文, 246pp.

- 筒木潔, 熊田恭一 (1980), 腐植酸の化学, 肥料科学, 3, 93-131.
- Tsutsuki, K. & Kuwatsuka, S. (1978a), Composition of oxygen-containing functional groups of humic acids. Chemical studies on soil humic acids. II, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 24, 547-560.
- Tsutsuki, K. & Kuwatsuka, S. (1979a), Amino acid, phenol, and sugar composition in the acid hydrolysable fraction of humic acids. Chemical studies on soil humic acids. IV, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 25, 29-38.
- Tsutsuki, K. & Kuwatsuka, S. (1979b), Degradation of humic acids with potassium hydroxide. Chemical studies on soil humic acids. V, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 25, 183-195.
- Tsutsuki, K. & Kuwatsuka, S. (1979d), pH-dependent nature of the ultraviolet and visible absorption spectra of humic acids. Chemical studies on soil humic acids. VII, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 25, 373-384.
- Tsutsuki, K. & Kuwatsuka, S. (1984), Molecular size distribution of humic acid as affected by the ionic strength and the degree of humification, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 30, 151-162.
- Tsutsuki, K. & Kuwatsuka, S. (1989), Determination of molecular weights of humic acids by pressure measurement and by permeation chromatography on controlled pore glass, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 35, 393-403.
- 筒木潔, 武内良恵, 渡辺彰, 鍛塚昭三 (1989), 埋没泥炭土壌における年代経過に伴う腐植の性質の変化—愛知県南設楽郡作手村大野原湿原堆積物の有機物組成—, 大野原湿原研究会報告集, 1, 42-52.
- 山田富貴子 (1986), 赤外線吸収スペクトル法, 機器分析のてびき (1) (増補改訂版), 化学同人, p. 1-20.
- 米林甲陽 (1988), 生態系における腐植物質の化学構造と植物成育促進に関する研究, 昭和62年度科学研究費補助金研究成果報告書, 80pp.

- 米林甲陽 (1988), 腐植物質研究法. I, ペドロジスト, 32, 138-150.
- 米林甲陽, 服部共生 (1977), 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.
- Yonebayashi, K. & Hattori, T. (1989), ^1H -NMR and IR spectra of humic acids. Chemical and biological studies on environmental humic acids. II, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 35, 383-392.
- 吉田重方, 吉田光二, 熊田恭一, (1985), 鈳質畑地における厩肥の施用効果—8年間の連用試験を顧みて—, 肥料科学, 8, 113-135.
- Yoshida, M., Sakagami, K., Hamada, R. & Kurobe, T. (1979), Characteristics of polysaccharides in hydrolysates of fulvic acid and in ethanol precipitates from fulvic acid in buried humic horizon. Studies on the properties of organic matter in buried humic horizon derived from volcanic ash. IV, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 25, 217-224.
- Wagner, G.H. & Stevenson, F.J. (1965), Structural Arrangement of functional groups in soil humic acid as revealed by infrared analyses, *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 29, 43-48.
- Wershaw, R.L. (1985), Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy for determining functionality in humic substances, in: G.R. Aiken, D.M. McKnight, R.L. Wershaw & P. MacCarthy (Ed.), *Humic Substances in Soil, Sediment, and Water*, John Wiley and Sons, New York, p. 561-582.
- Wilson, M.A. (1981), Applications of nuclear magnetic resonance spectroscopy to the study of the structure of soil organic matter, *J. Soil Sci.*, 32, 167-186.
- Wilson, M.A. & Goh, K.M. (1983), N.M.R, spectroscopy of soils. Structure of organic materials in sodium deuterioxide extracts from Patua Loam, New Zealand, *J. Soil Sci.*, 34, 305-313.
- Wilson, M.A., Collin, P.J. & Tate, K.R. (1983), ^1H -nuclear magnetic resonance study of a soil humic acid, *J. Soil Sci.*, 34, 297-304.

Watanabe, A. & Kuwatsuka, S., A triangular diagram of humus compositions in various types of soil, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 投稿中

報文目録

1. Watanabe, A., Tsutsuki, K. and Kuwatsuka, S.: ^{13}C -NMR investigation of humic and fulvic acids obtained from some typical Japanese soils., *Sci. Total Environ.*, 81/82, 195-200 (1989).
2. Watanabe, A. and Kuwatsuka, S.: A triangular diagram of humus compositions in various types of soil., *Soil Sci. Plant Nutr.*, 投稿中.
3. Watanabe, A. and Kuwatsuka, S.: Fractionation of soil fulvic acids using polyvinylpyrrolidone and their ionization difference spectra., *Soil Sci. Plant Nutr.*, 投稿中.
4. Kuwatsuka, S., Watanabe, A., Ito, K. and Arai, S.: Comparison of two preparation methods of humic and fulvic acids, IHSS method and NAGOYA method., *Soil Sci. Plant Nutr.*, 投稿中.
5. Watanabe, A. and Kuwatsuka, S.: Chemical characteristics of soil fulvic acids fractionated using polyvinylpyrrolidone (PVP)., *Soil Sci. Plant Nutr.*, 投稿中.

参考論文目録

1. 新井重光, 渡辺 彰, 高木賢二, 筒木 潔: 大野原泥炭層の土壤化学的解析—特に黒ボク土に関連した性質について., ペドロジスト, 32, 16-25 (1988).
2. 筒木 潔, 武内良恵, 渡辺 彰, 楯塚昭三: 埋没泥炭土壤における年代経過に伴う腐植の性質の変化—愛知県南設楽郡作手村大野原湿原堆積物の有機物組成., 大野原湿原研究会報告集, I, 42-52 (1989).
3. 新井重光, 渡辺 彰, 高木賢二, 筒木 潔: 大野原湿原堆積物の土壤化学的解析—特に黒ボク土に関連した性質について., 大野原湿原研究会報告集, I, 56-60 (1989).