

腐植物質の化学構造分析法

1. 腐植物質の分画精製法

3.1. 1 で述べた定義からわかるように腐植物質の構造は今日でも定まっていない。しかしながら多くの研究者がその構造を理解しようと研究している。研究者はどのように研究しているのだろうか？最も重要なことは腐植物質だけを土壌や水や堆積物から取り出すことである。腐植物質は生物由来のものであるから、生体を形成していた脂質、セルロース、タンパク質等が共存しているので、その中から腐植物質だけを取り出さなければならない。無事に取り出せば今度は定義に従ってフルボ酸、フミン酸、ヒューミンにきちんと分画する必要がある。この“きちんと”が非常に難しい。たとえば水酸化ナトリウム水溶液で土壌から腐植物質を溶出分離する場合も水酸化ナトリウム水溶液の濃度や加える量、抽出する時間や方法等が変わるだけで回収量はもとより得られた腐植物質の性質も異なることがある。世界中で腐植物質の研究が行われているが、分離精製法が少しでも異なれば実験結果を単純に比較することは難しくなる。したがって、統一的な分離精製法が望まれ、長年多くの研究者によって検討されてきた。

国際腐植物質学会では、その答えを提案している。それが IHSS 法と呼ばれており、異論はあるものの腐植物質を分離精製する手段の一つとして認知されている。この名称は国際腐植物質学会 (International Humic Substances Society) の頭文字をとって名付けられた。

IHSS 法は土壌や堆積物あるいはその他の固体試料から腐植物質を分離精製する方法であり、水溶性腐植物質の分離には適応されないが、IHSS 法に準ずる水溶性腐植物質の分離精製法が国際腐植物質学会のホームページ⁰⁾に掲載されており実質的に標準的な方法として認識されている。

IHSS 法の操作手順を **図 1** に、水溶性腐植物質の分離法の操作手順を **図 2** に示した。操作手順の詳細は国際腐植物質学会のホームページに詳しい。ここでは流れを簡単に紹介する。

落ち葉や樹皮など目視で確認できるものをできるだけ取り除いた風乾土をふるい分けして試料とする。試料土に塩酸水溶液を加えて上澄みと沈殿に分ける。沈殿は水酸化ナトリウム溶液を加えて上澄みと沈殿に分け、上澄みに塩酸を加えて沈殿をつくり、さらにフッ化水素酸を加えて灰分を除去したのち、透析により塩化物イオンを

除去し凍結乾燥させ、腐植物質を得る。また、フルボ酸は試料土に塩基水溶液を加えて得られる上澄み液を XAD-8 という疎水性樹脂を使って溶液中に溶解しているフルボ酸を樹脂に吸着させ、吸着していない成分を分離したのち水酸化ナトリウム水溶液で樹脂からフルボ酸を溶出させ、陽イオン交換樹脂に通したのち、凍結乾燥させて固体粉末を得る。非常に簡単に述べたが、これらの操作を丁寧に行い腐植物質を得るには、熟練した科学者でも 1 カ月近くかかるといわれており、非常に多くの手間と時間がかかる。試料によって異なるが、乾燥させた土壌 15 g から腐植物質 0.5~1 g、フルボ酸は 0.1~0.2 g が得られる。

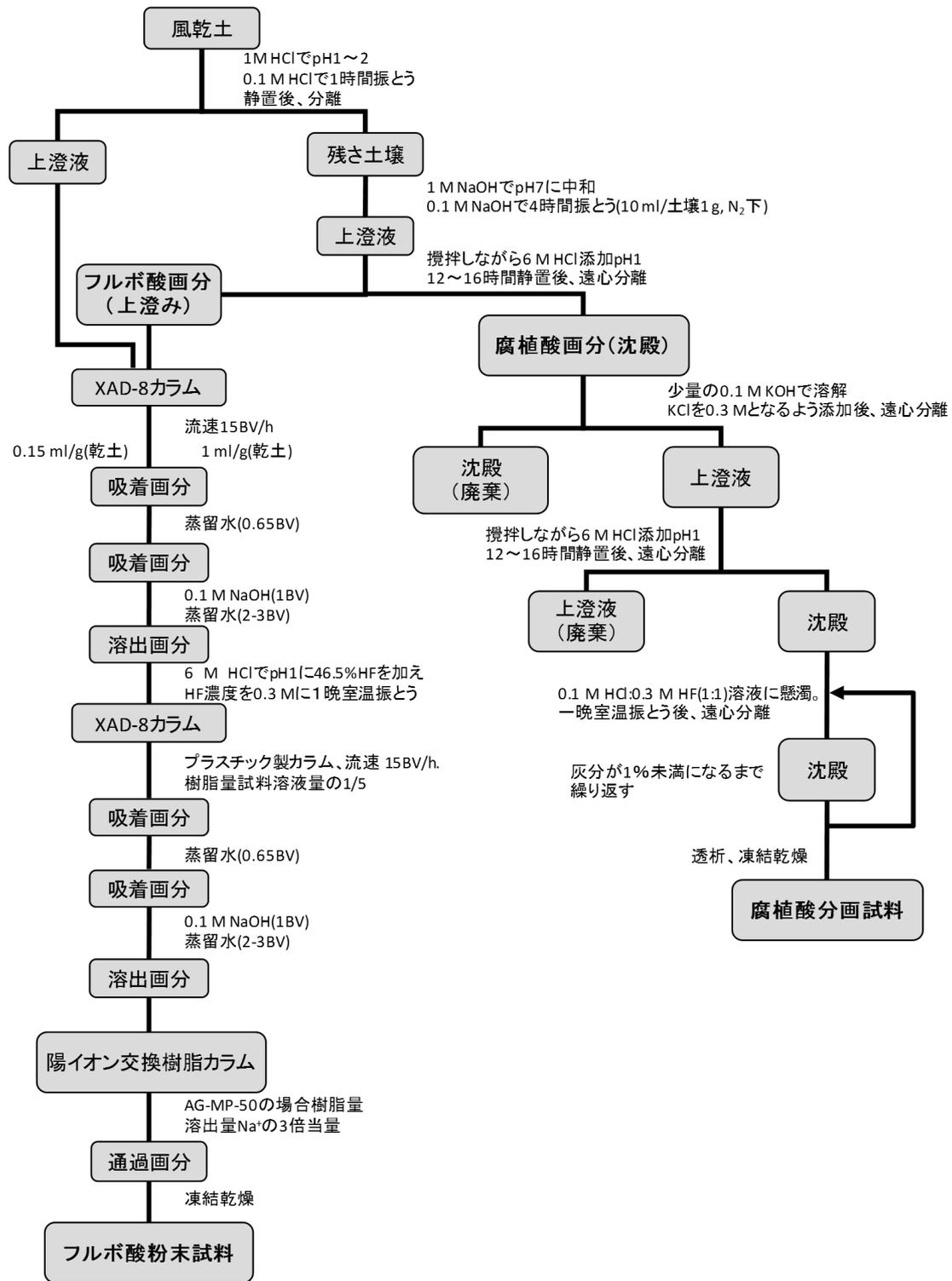


図 1 IHSS 法による土壤試料から腐植物質の分画

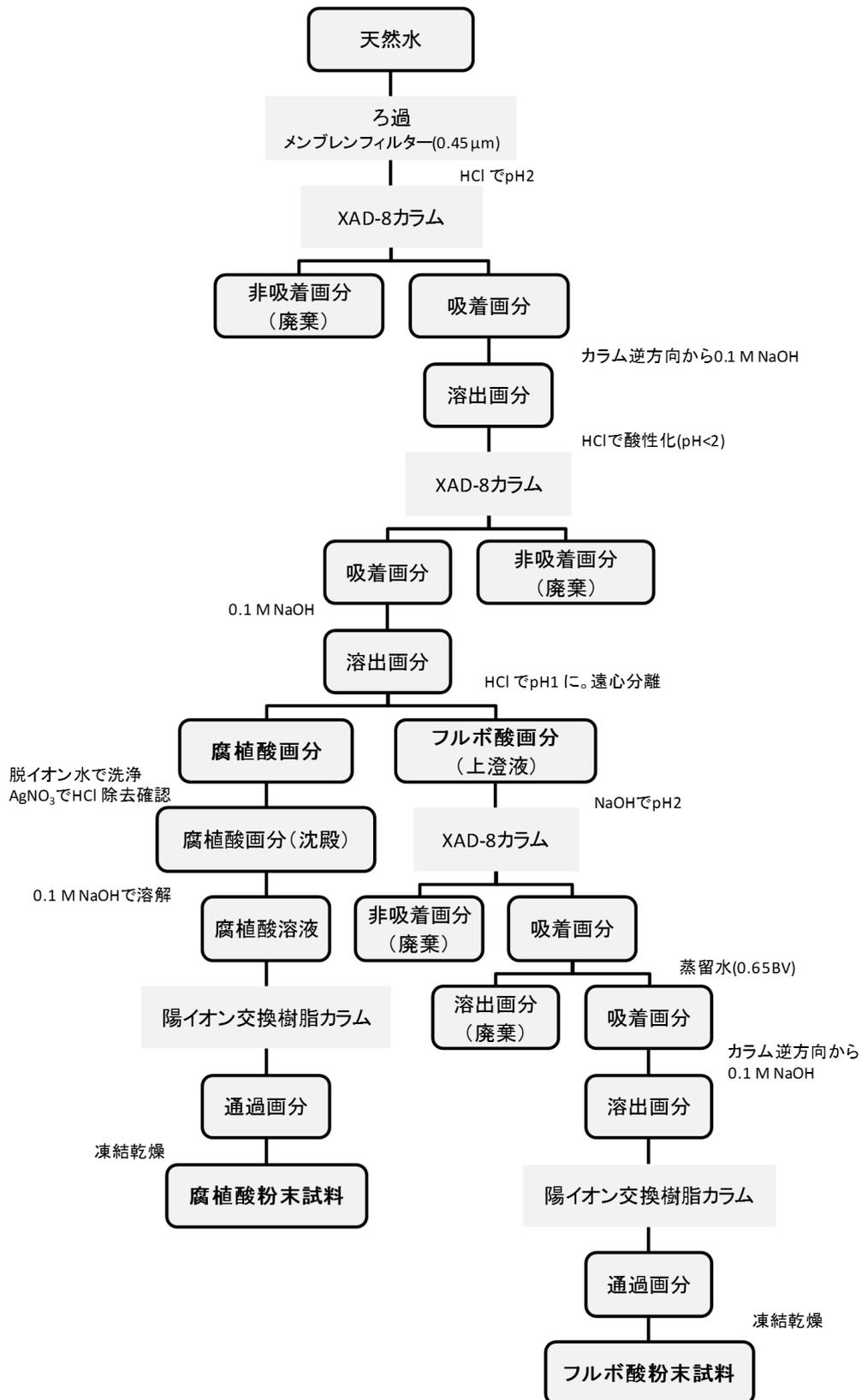


図 2 水試料からの腐植物質の分画

腐植物質の研究では、同じ原料を使えば誰が行っても確実に同じ量、同じ性質の腐植物質を得ることができるかが大きな課題となっている。IHSS 法は確立された手段ではなく、少なくとも世界中の科学者が議論を戦わせる土俵の一つを提供したに過ぎず、今後さらに改善されるべき要素を含んでいる。ちなみに国際腐植物質学会では、様々な腐植物質の標準試料を提供している。図 3 はホームページ (<https://ihss.humicsubstances.org/orders.html>) から引用したプライスリストの一部である。腐植物質の種類によるが、たとえば Suwannee 川から採取された“フミン酸標準物質Ⅱ”は 100 mg (0.1 g) の価格が \$ 175 である。\$ 1=90 円として 15,750 円である。高いと思われるかもしれない。しかし、この試料は先に述べた手順を正確に行い、かつ様々な分析結果が詳細に与えられている。この労力を考えれば決して高くはないであろう。

1. Select Products				
International Humic Substances Society Price List for October 2011				
 <p>How to Order IHSS Products</p> <p>PDF - Current Price List</p> <p>Order IHSS Samples Online</p>  <p>Purchase Limits</p> <p>Terms of Sale</p> <p>Privacy Statement</p> <p>Pay Invoice with Credit Card</p> <p>Customer Service International Humic Substances Society 1991 Upper Buford Circle, Rm 439 St. Paul MN 55108 USA Tel: +1 (612) 625-4711 Fax: +1 (612) 626-1204 E-mail: ihss@umn.edu</p>  <p>2011-10-31</p> <p>ABOUT SSL CERTIFICATES</p>	Standard Humic and Fulvic Acids			
	Catalog Number	Description	Price	Number of Units
	2S101H	Suwannee River Humic Acid Standard II (100 mg)	175.00	<input type="checkbox"/>
	1S101F	Suwannee River Fulvic Acid Standard I (100 mg)	125.00	<input type="checkbox"/>
	2S101F	Suwannee River Fulvic Acid Standard II (100 mg)	125.00	<input type="checkbox"/>
	1S102H	Elliott Soil Humic Acid Standard (100 mg)	15.00	<input type="checkbox"/>
	3S102F	Elliott Soil FA Std III (100 mg) [TEMPORARY OUT OF STOCK]	0.00	<input type="checkbox"/>
	1S103H	Pahoee Peat Humic Acid Standard (100 mg)	15.00	<input type="checkbox"/>
	2S103F	Pahoee Peat Fulvic Acid Standard II (100 mg)	150.00	<input type="checkbox"/>
	1S104H	Leonardite Humic Acid Standard (100 mg)	5.00	<input type="checkbox"/>
1S104H-5	Leonardite Humic Acid Standard (5 g)	150.00	<input type="checkbox"/>	
Reference Humic and Fulvic Acids				
Catalog Number	Description	Price	Number of Units	
1R103H	Pahoee Peat Humic Acid Reference (100 mg)	10.00	<input type="checkbox"/>	
1R103H-2	Pahoee Peat Humic Acid Reference (2 g)	125.00	<input type="checkbox"/>	
1R105F	Nordic Aquatic Fulvic Acid Reference (100 mg)	75.00	<input type="checkbox"/>	
1R107H	Waskish Peat Humic Acid Reference (100 mg)	15.00	<input type="checkbox"/>	
1R109F	Pony Lake (Antarctica) Fulvic Acid Reference (100 mg)	150.00	<input type="checkbox"/>	
Reference Aquatic NOM				
Catalog Number	Description	Price	Number of Units	

図 3 IHSS 標準試料の価格表

2. 元素分析

文字通り腐植物質に含まれる炭素、水素、窒素、酸素原子の割合を質量パーセントで表したものである。ただし、酸素原子は通常 100 から炭素、水素、窒素の質量パーセントを差し引いて求めているので、ハロゲンや硫黄原子が多量に含まれている試料では誤差を含みやすい。構成成分の平均分子量がわかれば、平均構造を構成する原子数を求めることができる。腐植物質中の炭素含有量は 45~60%で

あり、石炭の液化油に比べると少ない。逆に酸素や窒素含有量は非常に多い。さらに、有用な情報を与えてくれるのが、H/C, N/C, O/C等の炭素原子に対する原子数比である。ベンゼンは H/C=1、シクロヘキサンは H/C=2、ナフタレン環は H/C=0.8 となり、芳香族縮合環が発達すれば 1 より小さく、飽和環状あるいは鎖状炭化水素を多く含めば H/C は 1 よりも大きくなることから、腐植物質中の平均的な基本骨格の状態を推定できる。N/C, O/C は値が大きくなるほど窒素や酸素含有量が多くなることを示すが、1 になることはまずなく、通常 N/C=0.1, O/C=0.7 以下である。アニリンの N/C は約 0.17、サリチル酸の O/C は約 0.38 である。また、燃焼率(CQ)や不飽和度(DU)、酸化度(ω)といった数値も腐植酸の構造を推測するうえで活用されている。

$$CQ = 4C / (4C + H - 3N - 2O)$$

$$DU = (2C + N - H) / 2C \times 100$$

$$\omega = (2O - H) / C$$

3. 官能基分析

これも文字通り腐植物質を構成する骨格構造に結合している置換基の種類や量を決める分析であり、腐植物質の物理化学的性質を推

定するうえで非常に重要である。

赤外吸収分光法（IR スペクトル）は有機化合物中に含まれる置換基類の定性には有用な分析手法であるが、カルボキシル基やフェノール性およびアルコール性水酸基、カルボニル基等の正確な量を求めるためには、現在でも化学分析が行われている。

カルボキシル基は酸塩基滴定法により求めることができる。フェノール性水酸基はフェノール試薬を用いて発色させ、720 nm の吸光度から求める方法が利用されている。

アルコール性水酸基はあらかじめ腐植物質中に含まれる全水酸基量を求め、フェノール性水酸基量を差し引くことで算出される。全水酸基量は主にアセチル化法により定量される。

4. 分子量測定

1) 平均分子量

腐植物質は分子構造が複雑かつ多分散性のため測定法によって異なる平均分子量が報告されている。平均分子量には、数平均分子量、重量平均分子量および z -平均分子量がある。数平均分子量は凝固点降下法や蒸気圧浸透圧法により測定され、重量平均分子量と z -平均分子量は光散乱法や超遠心法等により測定される。多成分分散系で

は数平均分子量が小さく、 z -平均分子量が大きく計測される。

これらの測定法の多くは、高分子電解質である腐植物質に塩を添加することによって、非電解質高分子と同じ扱いができるようにして計測されている。つまり、その分析資試料の pH、イオン強度、濃度によっては分子が会合を起し測定結果に影響を与える。

2) 分子量分布

クロマトグラフ法

平均分子量とともに重要となるのが分子量分布である。多成分からなる混合物の平均分子量が同じであっても構成する成分の分子量が似通っているのか、あるいはまったく異なるのかによって物理化学的性質は全く異なるからである。分子量分布は主にサイズ排除クロマトグラフィーにより測定される。この方法は多孔性ゲルの細孔径を制御することで分子の大きさによるふるい分けをする。ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) ゲルろ過クロマトグラフィー (GFC) が代表的なものである。

これらの分離方法はあくまでも分子の“大きさ”によってふるい分けするのであり、厳密には分子量とは異なることに注意しなければならない。また、分子量マーカーと呼ばれる標準サンプルの同一

条件下でのクロマトグラフィーと比較した相対的値である。GPC による平均分子量測定値は、用いた分子量マーカーによって同一サンプルでも値が大きく異なってくるので、この方法では慎重にマーカーを選択し、明示しなければならない。日本腐植物質学会が提供している標準土壌サンプルに関して GPC による分子量分布とそのマーカーによる分子量値の違いを図 4 示す。また、その他のサンプルについての結果を表 1 に示す。

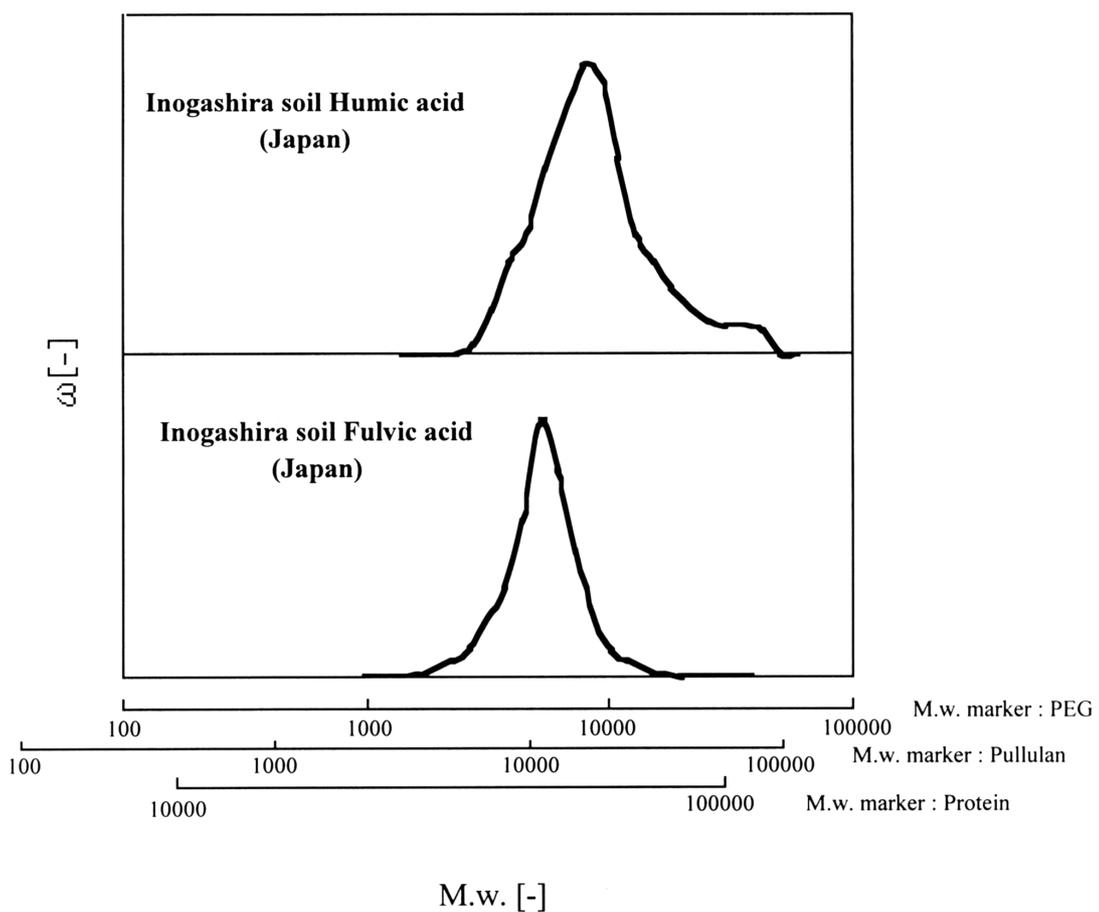


図 4 GPC 法による分子量分布と標準マーカー

表 1 GPC 法による平均分子量のマーカによる違い

原料	分画試料	分子量マーカ		
		PEG	プルラン	タンパク質
アンドソル	フミン酸	9900	13000	40000
	フルボ酸	7600	9800	36000
トロピカル	フミン酸	3800	8200	39000
ピート	フルボ酸	2700	6000	33000
風化炭	フミン酸	6000	8000	36000

PEG:ポリエチレングリコール

多くの研究から湖沼堆積物のフミン酸やフルボ酸中に含まれる分子は分子量 700 程度から 100,000 を超える範囲で存在し、フミン酸は 100,000 を超えるような大きな分子が 43~70%を占めると報告されている。 それに対してフルボ酸中の分子は 70~75%が 100,000 未満の分子量を持つ。

MALDI-TOFMS 法

TOFMS とは、飛行時間型質量分析装置 (Time of flight mass spectrometry) の略で、イオン化された試料分子のマスとその飛行

時間によって分析する装置である。MALDI は、Matrix-assisted laser desorption ionization の略で、マトリックスを用いることによって試料のイオン化を促進させる手法のことである。(年田中耕一氏のノーベル化学賞の対象となったことで有名である。) マトリックスとなる分子は、試料の分子よりも紫外線である窒素レーザーを多量に吸収し、急速に加熱されて気化(昇華)しやすい。急速加熱条件下では有機分子は分解反応よりも気化が促進されたため、分子量 100,000Da を超えるタンパク質のような分子でもフラグメント化せずにイオン化が可能となる。

日本腐植物質学会が提供している標準試料について MALDI-TOFMS 測定した結果を図 5 に示す。フミン酸とフルボ酸の分子量分布の違いが明らかであるが、一部は重なりあっていることがわかる。

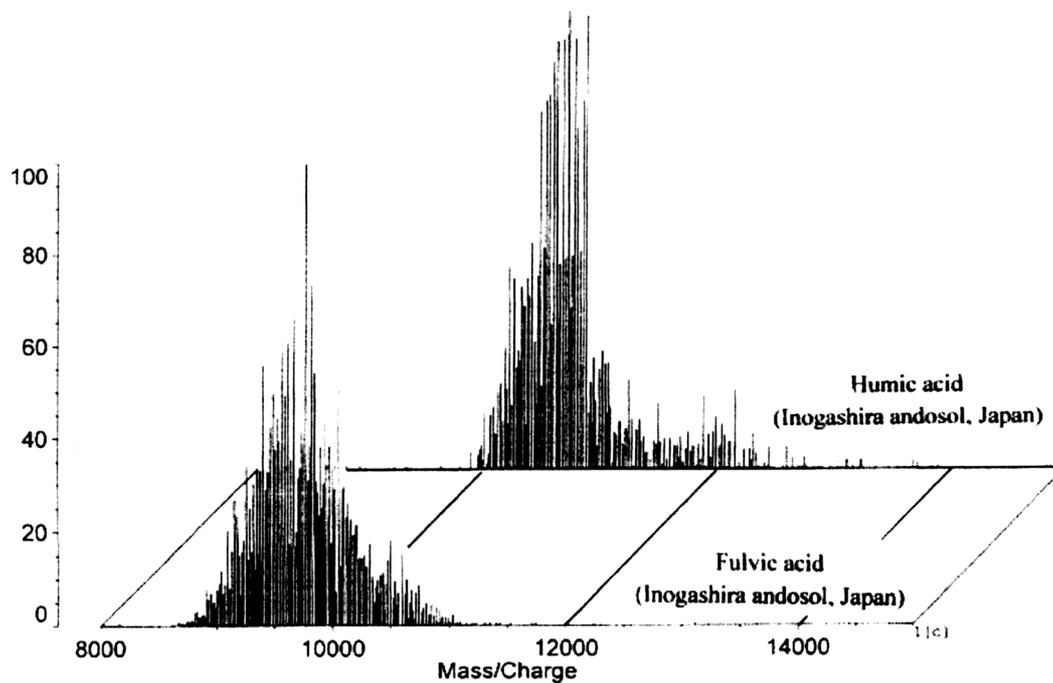


図 5 日本腐植物質学会の標準試料（フミン酸、フルボ酸）の MALDI-TOFMS スペクトル

5. 磁気共鳴スペクトル（NMR）による水素分析・炭素分析

水素や炭素は有機化合物の骨格形成に寄与する原子であり、それらの存在形態を明らかにすることは構造を明確にする上で有用である。こうした情報は核磁気共鳴分光法（NMR スペクトル）が利用される。NMR スペクトルでは分子を構成する原子核の情報を得ることができ、 ^1H -NMR では分子中の水素原子の存在形態と存在割合を推定できる。また、 ^{13}C -NMR は分子中の炭素原子の存在形態と存在割合を推定できる。

腐植物質の分子構造をみると、芳香環に属する炭素や水素、脂肪族に属する炭素や水素があり、脂肪族には芳香環に直接結合している炭素 (α 炭素)、 α 炭素に結合している水素 (α 水素)、 α 炭素に結合している脂肪族炭素 (β 炭素)、 β 炭素に結合している水素を β 水素、脂肪族側鎖の末端に結合している炭素 (γ 炭素)、 γ 炭素に結合している水素を γ 水素と呼び、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルでは上記の水素分布から構造を推定する。NOE 法を使うと、直接結合していないが近接する水素の様子も観測でき、有機化合物の立体構造の推定に有用である。

固体 NMR

液体試料の場合は、試料溶液中での分子の回転速度が速く、すべての異方性が平均化されて一つの化学シフトを示すが、固体資料では異方性が高いためスペクトルの信号は幅広くなり当初は測定できなかった。ところが、高出力デカップリングによって $^{13}\text{C-}^1\text{H}$ 間の相互作用をなくし、角度 $54^\circ 44'$ の磁場の中で試料を回転させて (マジック角回転、MAS) 異方性による線幅に広がりを抑え、交差分極 (CP) を行って固体の ^{13}C 核の緩和時間が長いことが解決できることが見いだされた。いわゆる CP/MAS (Cross-Polarization/Magic -Angle

sample Spinning) である。この方法では、NOE がほとんど問題にならないとされており、緩和時間が短く積算効率が高く、試料の溶解性を考慮する必要がない利点を持っている。このような CP/MAS¹³C-NMR 測定法の発達により腐植物質分子の炭素種別がかなり明確に判明するようになった。

化学シフトの領域と対応する炭素種別の帰属は、表 2 のように定められている。具体的なスペクトルと帰属例を図 6 に示す。

表 2 ¹³C - NMR の化学シフト領域と炭素種帰属

Shift range [ppm]	Possible assignments
0-50	Unsubstituted saturated aliphatic C
50-60	N-Alkyl(e. g., amino acid-, peptide, and protein-C) + methoxyl C
60-110	Aliphatic C-O (notably carbohydrates)
110-160	Aromatic C, consisting of unsubstituted and alkyl substituted aromatic C(110-150ppm) and phenolic C(150-160ppm). Alkenes also resonate in this region
160-190	Carboxyl C(includes the carboxylate ion, COO ⁻)
190-230	Ketonic C=O of esters and amides

(Stevenson, 1994)

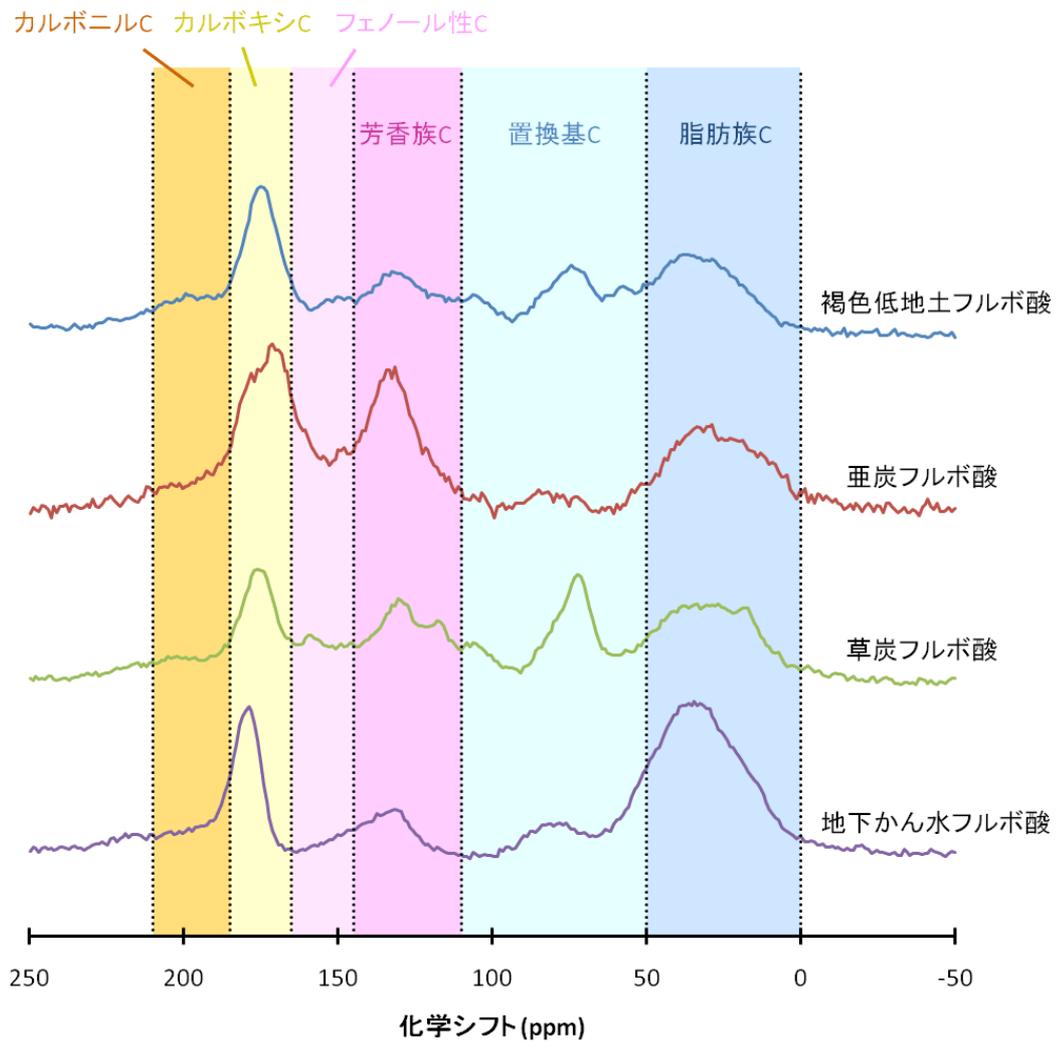


図6 各種フルボ酸の ^{13}C -NMRスペクトルと炭素種帰属

さらに、DEPT法、QUAT法を利用することでメチル、メチレン、メチン、4級炭素の存在比を観測できる(図7)。これらの情報に基づき、平均的な分子骨格を推定することができる。

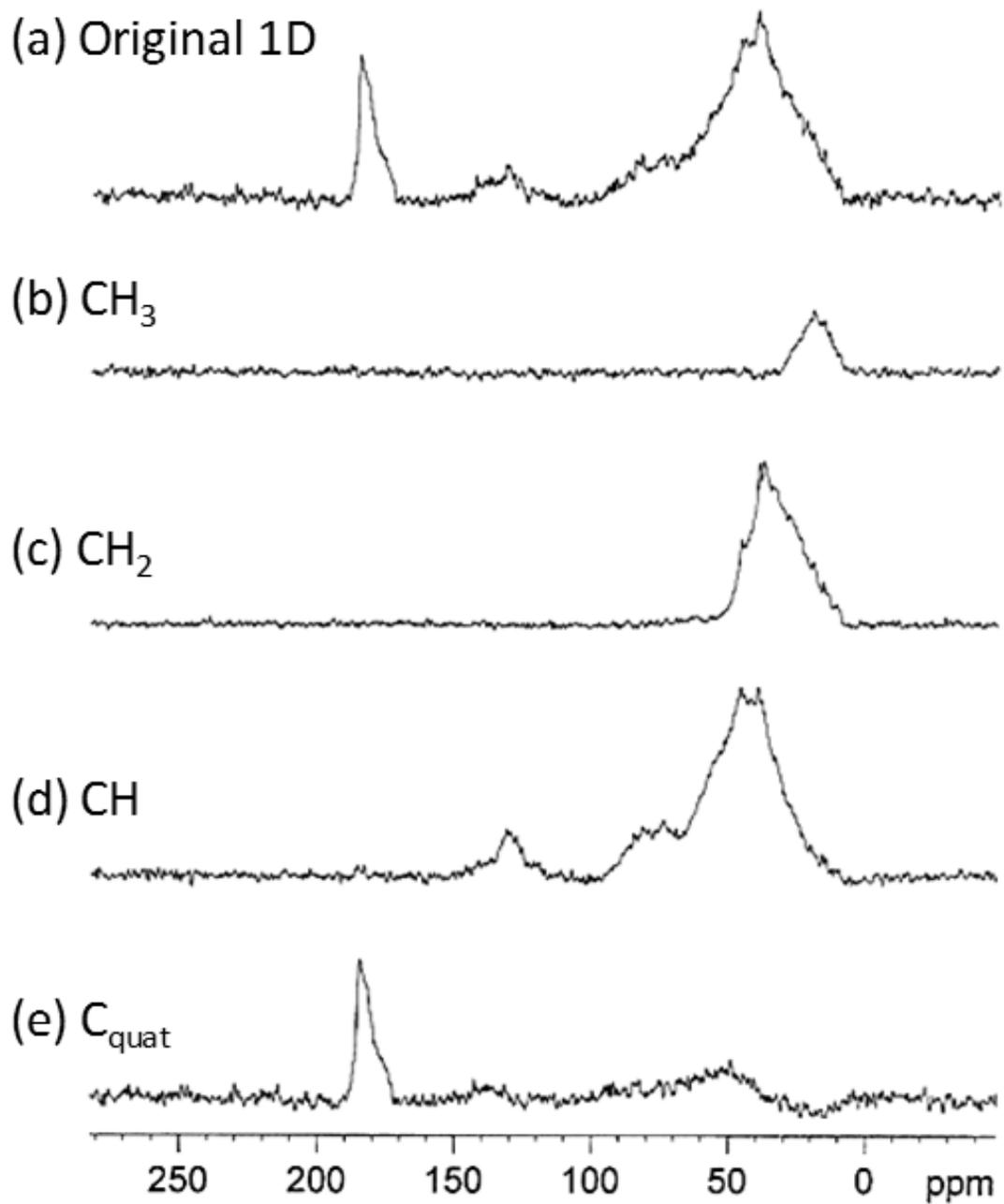


図7 各種測定法によるフルボ酸の¹³C-NMRスペクトル
 (a)完全デカップリング、(b)-(d)DEPT法、(e)QUAT法、(f) (b)-(d)の総和

6. 電子スピン共鳴によるフリーラジカル濃度の測定

電子スピン共鳴 (ESR, Electron spin resonance) は電子スピン

に基づく常磁性種の磁場中での電磁波吸収、放射現象のことである。
ESR スペクトルシグナルの形から定性分析が、強度から定量分析ができるが、対象が常磁性物質であることもあって適用範囲は制限される。

腐植物質の ESR シグナルは、常温においてきわめて安定・永続的であり、自由電子に近い g 値を保っているが、超微細構造は通常現れず、 g 値=2.0 付近に一本のスペクトルが観測されるのみである一例を図 8 に示す。腐植物質分子のラジカル構造は図 9 に示したようなセミキノン構造によるものとされているが、その他の構造も考えられ確定的なものではない。

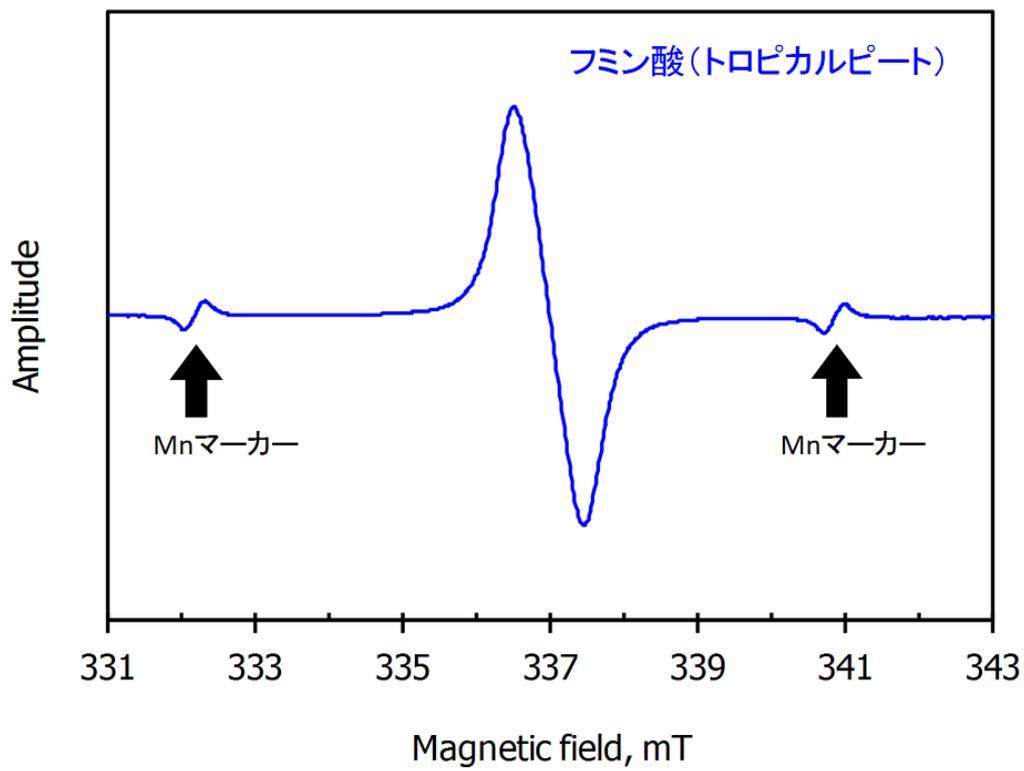


図8 フミン酸のESRスペクトル

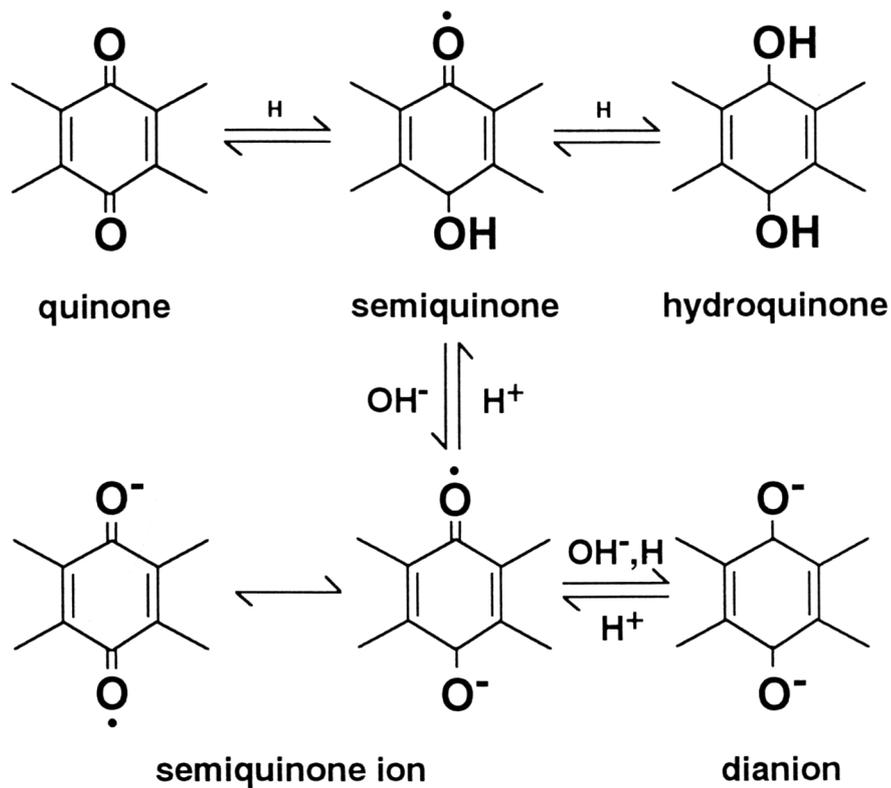


図9 腐植物質中のラジカル構造モデル

g 値は内部標準（通常 MnO_2 ）との差から求められる。ラジカル濃度の計算は、濃度既知の標準物質（DPPH, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl）を添加して同一条件で測定し、ベースラインと上下のスペクトルの間の面積から求められる。

7. 紫外可視分光光度法による土壌フミン酸の分類

腐植物質の定義からわかるように、腐植物質は黄色～黒色の色を帯びている。着色の程度を定量的に評価するために、紫外・可視吸

光光度法（UV-Vis スペクトル）が利用される。一般的に腐植物質の UV-Vis スペクトルは特徴的な吸収を示さず、短波長～長波長にかけて指数関数的に減少する（図 1 0）。

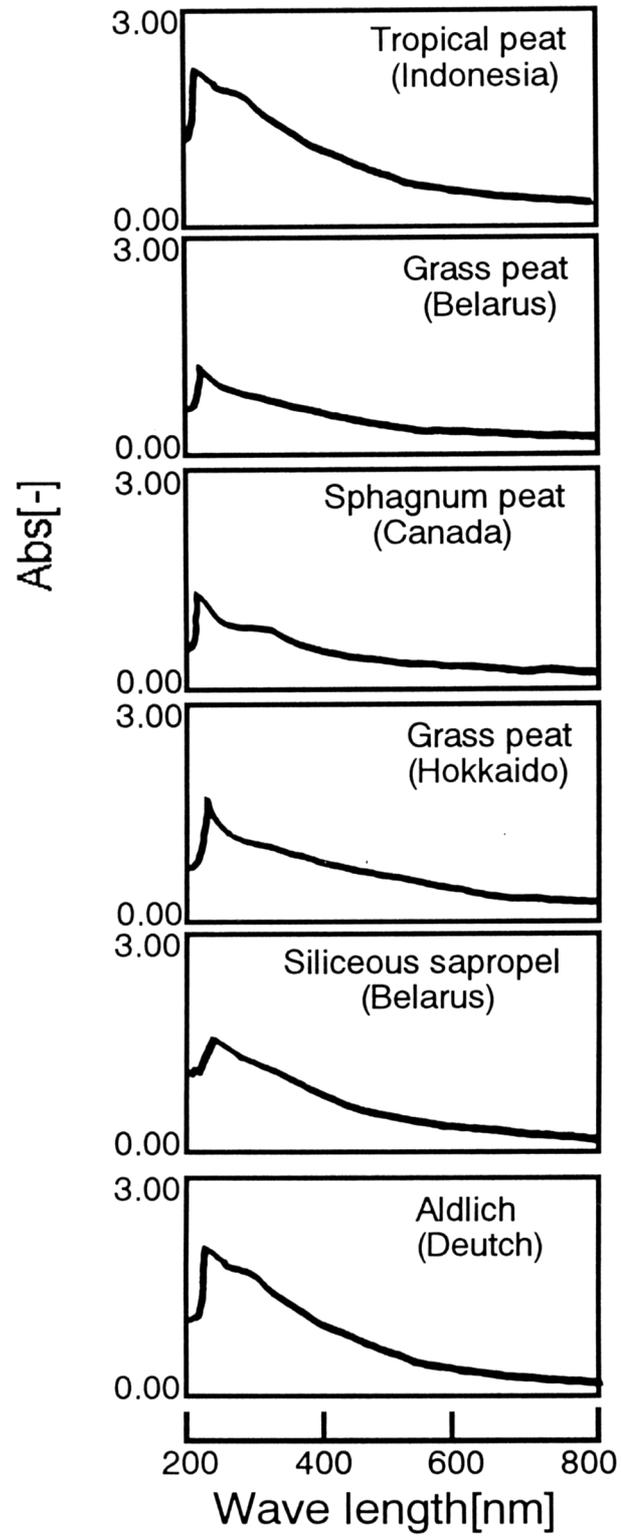


図 10 各種原料から抽出したフミン酸の UV-Vis スペクトル

そこで可視領域である 400 nm と 600 nm における吸光度の対数の差 $\Delta \log K$ を求め、評価基準としている。簡単に言えば $\Delta \log K$ は主に青い光(400 nm)と緑色の光(600 nm)の吸収比率を示し、 $\Delta \log K$ が小さいほどフミン酸中の構造中には共役が拡大した構造を多くものが多い。また、フミン酸においては RF 値(フミン酸溶液の 600 nm における吸光度 K_{600} を同溶液 30 ml に 0.02 M $KMnO_4$ 溶液を加え溶液が着色するまでの消費量(ml)で割った値を 1,000 倍したもの)も評価基準として利用されている。 RF 値は腐植酸の着色の程度と酸化しやすさの比率である。過マンガン酸溶液は主にフミン酸中の不飽和結合を酸化すると考えられる。 RF 値が大きいほど着色が濃く、酸化の程度は小さい。横軸に $\Delta \log K$ 、縦軸に RF 値をとり、様々な原料から採取されたフミン酸の結果をプロットすると、おおむね 4 種類のカテゴリー A、B、Rp、P 型に分類できることが知られている(図 1 1)。A 型フミン酸は黒ボク土や石灰質土壌から採取されるフミン酸に多く、最も腐植化度(腐植化の程度)の高いフミン酸とされている。B 型フミン酸は褐色森林土壌から採取されるフミン酸に多く含まれ、A 型と Rp 型の中間に位置する。Rp 型は灰色低地土や赤黄色土、泥炭土に含まれる。P 型は高山の草原土壌や褐色森林土か

