

土壌腐植物質の定性・定量分析

1 はじめに

土壌には、リター、枯死根、動植物遺体、代謝産物、堆肥等の形で有機物が供給され、土壌生物の働き等により分解される。その過程で生物残さとして識別可能な形状を失ったものが“腐植”と定義される。土壌分析では一般的に2 mm以下の粒子（細土）を対象とすることから、細土中の有機物を腐植とみなすことが多い。腐植には、生体内にあったときと同じ化学構造を維持しているものと、環境中で酸化、加水分解、縮重合等の反応により化学構造が変化したものがある。後者の多くは構造中に着色部位をもち、“腐植物質”と呼ばれる。水環境中や大気中に存在する類似の物質も腐植物質や腐植様物質と呼ばれる。

2 腐植物質の定量と粉末試料の調製¹⁾

腐植物質は溶解性の違いに基づいて、フルボ酸（アルカリ・酸可溶）、フミン酸（アルカリ可溶・酸不溶）、ヒューミン（アルカリ・酸不溶）に分類されるが、正確な定量や精製は困難である。実際には、アルカリ溶液によって腐植を抽出し、酸性にした際に沈殿した画分をフミン酸とし、沈殿しない画分を酸性のままカラム法またはバッチ法によって非イオン性メチルメタクリル酸エステル樹脂 DAX-8 (Spelco) やポリビニルピロリドン樹脂と反応させた際に樹脂に吸着したものをフルボ酸とする。フルボ酸の量は、樹脂への非吸着画分を回収して全有機炭素計等により有機炭素 (C) 量を測定し、樹脂処理に用いた溶液中の有機 C 量から差し引くことで求める (C 量で表す)。粉末試料を得る場合には、アルカリ溶液を用いて樹脂から脱着回収し（一部回収できない）、カチオン交換樹脂を用いて H⁺ 型とした後凍結乾燥する。フミン酸の定量は、酸沈殿部をアルカリ溶液に

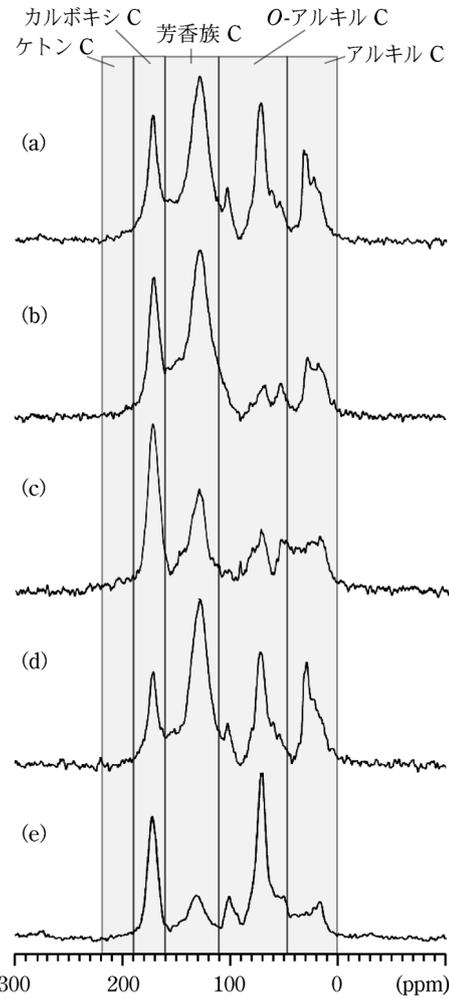
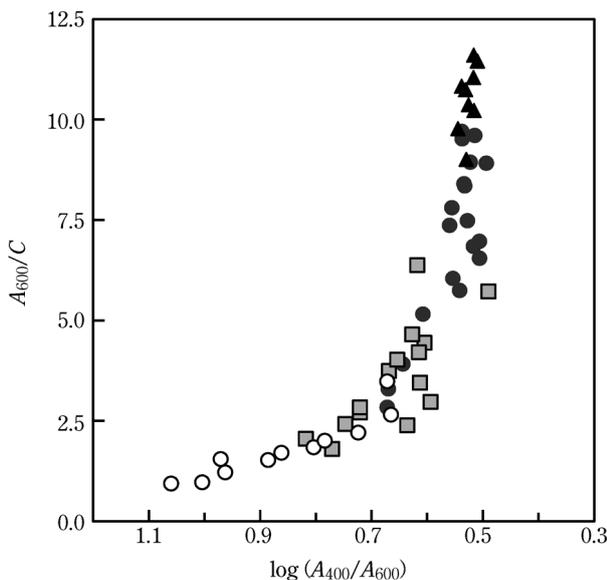


図2 黒ボク土 (a) 土壌, (b) フミン酸, (c) フルボ酸, (d) ヒューミン (アルカリ抽出残さ), (e) 酸可溶性腐植 (フルボ酸を含む) の ¹³C CP/PASS NMR スペクトル



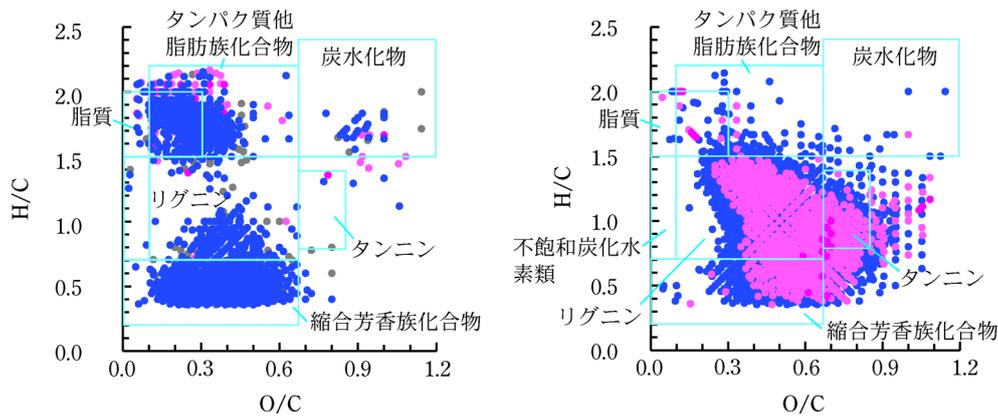
● : 黒ボク土, ▲ : 埋没黒ボク土, ■ : 褐色森林土, ○ : 赤黄色土, 灰色台地土および各種沖積土。

図1 各種土壌フミン酸の黒色度

再溶解させ、C 濃度を測定することで行う（全有機炭素計で測定する際は、リン酸緩衝液等で pH 5~6 まで希釈する）。粉末試料は、酸沈殿部をフッ化水素酸-塩酸で処理して粘土鉱物や金属を除去し、透析後凍結乾燥する。ヒューミンは、脂質、炭化物、生物残さに近い粒状有機物および鉱物に強く吸着しているために抽出されないアルカリ可溶性腐植を含んだ粗試料として扱われる。

3 分光化学的分析

腐植物質の定性分析、平均構造解析に用いられる。最も古くから定性分析に使われているのが、紫外可視吸収スペクトルと C 濃度の組み合わせであり、フミン酸に関しては 0.1 M NaOH を溶媒としたときの 400 nm と 600 nm の吸光度の比 $\log(A_{400}/A_{600})$ (スペクトルの傾きに相当する) と単位 C 濃度当たりの 600 nm の吸光度 A_{600}/C が黒色度を表すのに用いられる¹⁾。黒色度は多くの化学的性質と相関を示し、重複領域をもちつつ土壌分類と対応する (図 1)。同様の土壌間差はフルボ酸では認められない。



ピーク強度 (対数): ●, ≤ 6.0; ●, $6.0 \sim 6.5$; ●, $6.5 \sim 7.0$; ●, <math>7.0 <</math>

図3 黒ボク土フミン酸(a)およびフルボ酸(b)のFTICR-MS分析で帰属されたピークのH/C-O/C図⁴⁾

核磁気共鳴分析 (NMR) は、固体一次元 ^{13}C NMR の利用が最も多い。フッ化水素酸-塩酸処理により C 濃度を増大させつつ常磁性金属を除去することで、土壌からの抽出を行わずに測定が可能であるため、その汎用性は高い。主にスペクトルを化学シフトに基づき 4~8 の領域に区分し (図 2 参照)、各領域の積分シグナル強度比から C (官能基) 組成を算出することを目的とする。定量的なスペクトルは Direct polarization/マジック角度回転 (MAS) 法, ramp マルチ交差分極 (CP) MAS 法²⁾, ramp CP/phase adjusted spinning side band (PASS) 法³⁾により得られる。腐植画分間の違いはピークの有無よりも強弱にあり、フミン酸は芳香族 C, フルボ酸はカルボキシ C, ヒューミン (を含む画分) はアルキル C のシグナルがそれぞれ強いことで特徴づけられる (図 2)。また、フミン酸やヒューミンのスペクトルは土壌間差も大きく、フミン酸の芳香族 C % は A_{600}/C との間に高い正の相関を示す。

赤外分光分析は、少量の試料および短時間で官能基の定性分析が可能である。近年拡散反射フーリエ変換赤外分光法の利用が広がっており、波形分離の適用により指紋領域の解析精度が向上している。三次元蛍光分析は、平衡因子解析 (PARAFAC) 等との組み合わせにより、溶存有機物の組成解析に利用される。その際、いくつかの蛍光成分がフミン酸、フルボ酸に由来すると考えられているが、今のところ発蛍光団は特定されていない。固体表面分析法である X 線吸収端近傍スペクトル (XANES) や X 線光電子分光法 (XPS) は C の化学状態分析にも利用されるが、NMR では十分な感度を得にくい窒素や、硫黄の状態分析により有効である。

4 分解分析と質量分析

腐植物質の構成成分解析には各種分解分析や高分解能質量分析 (MS) が用いられる。多種類の成分を半定量的に分析できる熱的支援加水分解およびメチル化ガスクロマトグラフィー (THM-GC)/MS¹⁾では、各種脂肪酸カルボン酸類、フェノール類、ベンゼンポリカルボン酸類 (BPCAs) 等が検出される。アルキル化試薬抜き熱分解 GC や熱分解 MS は現在では利用されない。THM-GC/MS で検出できない縮合芳香族成分は、例えばルテニウム四酸化物 (RuO_4) 酸化分解¹⁾により BPCAs として検出され、生成した BPCA 種との対応関係から、分解前の縮合芳香族成分が推定される。

高分解能 MS の中で利用が多いのは、主にエレクトロスプレーイオン化法との組合せによるフーリエ変換イオンサイクロトロン (FT-ICR)/MS である。ネガティ

ブイオンモードにより、フミン酸、フルボ酸から質量電荷比 (m/z) 約 200~800 間に 1000~3500 程度のピークが検出され、800~2500 程度のピークについて組成式が同定される。それらのピークは原子数比 H/C-O/C 図中で、既知の有機物群との比較から特徴づけられたり (図 3)、二重結合等量 (DBE) の算出や Kendrick 質量欠損分析に用いられる⁴⁾。図 3 からは、フルボ酸中にはリグニンやタンニンと類似した元素組成を持つ成分が多く、フミン酸中にはより脂肪酸成分、縮合芳香族成分が多いことが分かる。フミン酸中のリグニン様ピーク、縮合芳香族ピークの強度の和は土壌によって多様であり、それぞれ黒色度との間に負および正の相関を示す。類似の関係は THM-GC/MS や RuO_4 酸化分解による分析結果でも認められ、フミン酸の構造評価に黒色度が有効であることを裏付けている。一方、いずれの手法も腐植物質構成成分の一部しか分析できないため、「既存の方法で検出されない」=「存在しない」、と解釈することは危険である。

5 おわりに

腐植物質の抽出・分画におけるアルカリ・酸の使用は変質を伴う可能性があること等から、腐植物質を artifacts とする説もある。しかし、影響の程度は不明であり、例えば図 2 の各腐植画分の収量と ^{13}C NMR 解析結果から推定した土壌有機物全体の C 組成は実測値と差はない。腐植物質のすべてが難分解性であるとの誤解や、全てが高分子であるとの認識は見直されてきているが、腐植物質の量や質が各土壌の特性の一つとして重要であることに変わりはない。より正確な定量法、マイルドで効果的な分離精製法、定量的な成分分析法等新たな分析技術の開発が望まれる。なお、今回紹介した分析法の詳細は、近く出版予定の「腐植物質分析ハンドブック 第 2 版」(日本腐植物質学会監修)に収められている。

文 献

- 1) 渡辺 彰, 藤嶽暢英, 長尾誠也編: “腐植物質分析ハンドブック—標準試料を例にして”, (2007), (三恵社).
- 2) R. L. Johnson, K. Schmidt-Rohr: *J. Magn. Reson.*, **239**, 44 (2014).
- 3) K. Ikeya, A. Watanabe: *Anal. Biochem. Chem.*, **408**, 651 (2016).
- 4) K. Ikeya, R. L. Sleighter, P.G. Hatcher, A. Watanabe: *Humic Sub. Res.*, **9**, 25 (2012).

[名古屋大学大学院生命農学研究科 渡辺 彰]