

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20380043

研究課題名(和文)

環境中における安定性の解明に向けた腐植物質の平均化学構造モデルの構築

研究課題名(英文)

Construction of model structure of humic substances toward the elucidation of their stability in the environment

研究代表者：

渡邊 彰 (WATANABE AKIRA)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：50231098

研究成果の概要(和文)：

腐植物質の平均化学構造モデルを構築してその環境中における安定化機構を解明するために、フミン酸の構造単位特に縮合芳香族成分組成、官能基組成の各種分析法を導入し、腐植化度、¹⁴C年代との関係を解析した。X線回折(XRD)プロファイルの11バンド解析により、ベンゼン環数4～37に相当する0.24～1.68 nmのC網面の存在とそれらの量および平均サイズが腐植化度、芳香族C含有率の増大に伴って増大することを明らかにした。また、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析を用いて鎖状および網状縮合芳香族酸11～69と最大24のビフェニル型化合物を見出し、それらの種類および量と腐植化度との相関関係を明らかにした。¹⁴C年代との関係から、ペリレン環以上の縮合芳香環の濃縮がフミン酸の構造的安定性の獲得に寄与していることが明らかとなった。また、PASSパルス系列を導入することで固体¹³C NMRスペクトルによるC官能基組成解析の定量性の向上を可能にした。

研究成果の概要(英文)：

Toward an elucidation of immobilization mechanism of humic substances in the environment based on the establishment of their average chemical structure model, structural units especially condensed aromatic components and composition of functional groups in humic acids (HAs) were investigated with regard to the degree of humification and then ¹⁴C age. The 11 band analysis of X-ray diffraction (XRD) profile succeeded in finding 0.24-1.68 nm C-layer planes corresponding to 4- to 3- ring condensed aromatic structure. Their mean size and contents increased with increasing degree of humification and relative abundance of aromatic C in HA molecules. Fourier transform-ion cyclotron mass spectrometry (FT-ICR/MS) detected 11-69 compounds of a series of linearly fused and net-like condensed aromatic acids with max 24 biphenyl-type compounds. The number and peak intensity of those components were also larger in the HAs with a greater degree of humification. Based on the relation to ¹⁴C age, it was concluded that the relative enrichment of condensed aromatic structures with ≥ 5 rings contributes to the enhancement of recalcitrance of HAs in soil. Quantification of C functional groups using solid-state ¹³C NMR spectroscopy was improved by introducing phase-adjusted spinning-sideband technique.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	12,600,000	3,780,000	16,380,000

研究分野：土壌圏物質循環学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：腐植物質、フミン酸、炭素貯留、炭素循環

1. 研究開始当初の背景

土壌に供給された有機物の一部は、微生物活動、化学反応の結果として、一連の暗色無定形の高分子物質群「腐植物質」へと変化する。腐植物質は平均滞留時間が 1000 年を越えることから (Stevenson, 1994) 一般に“難分解性”と考えられているが、その分解速度は多様であり、生物遺体から生成した初生腐植物質が好気条件下でさらなる酸化と縮重合を経る (腐植化の進行) ことで難分解性 (構造的安定性) が付加され、炭素 (C) 隔離能を発現すると考えられる。腐植物質の主画分であるフミン酸 (=腐植酸) に関しては、古くから黒色の程度に基づいて評価する腐植化度と化学的性質との関係について多くの研究が行われてきており、腐植化度と元素組成、含酸素官能基組成、糖・アミノ酸含量、分子サイズ分布等との対応が知られている (Kumada, 1987)。近年では、腐植化度と ^{13}C NMR に基づく C 組成 (Maie et al., 2002)、 ^{15}N NMR (Abe et al., 2005; Maie et al., 2006) あるいは X 線光電子分光法 (XPS; Abe and Watanabe, 2004) に基づく N 組成、ESR スペクトルから推定した有機フリーラジカル含量 (Watanabe et al., 2005)、熱的支援加水分解およびメチル化 (THM; Ikeya et al., 2004) やルテニウム四酸化物分解 (RTO; Ikeya et al., 2007) で得られる分解生成物との関係も明らかにされている。特に RTO 分析では、フミン酸が示す暗色の所以であるにも関わらず、これまでほとんど知見の無かった縮合芳香環成分 10 数種が見出され、腐植化度が高いほどその量と平均縮合度が高いことが示された。

多様な分子の混合物であるフミン酸について構造を決定することは極めて困難であるが、フミン酸の環境中における安定性や機能を理解する上で平均構造を明らかにすることは重要である。平均構造の推定には、元素組成や官能基組成とともに構造単位に関する情報が不可欠であるが、これまで最もよく引用されてきた Schulden and Schnitzer (1997) の構造モデルでは、構造単位の多くが分解中の変性が免れない熱分解分析で検出されたものであるため信憑性に欠け、縮合芳香環成分についての情報も乏しい。また、上述のようにフミン酸の構造は腐植化度の進行に伴って遷移するのにも関わらず、腐植化度の違いを考慮したモデルは無い。しかしながら、腐植化のどの段階のフミン酸分子が卓越するかは土壌によって異なっており、気候変動・環境変化に対する感受性、機能性に差をもたらしていると予想されることから、腐植化度の違いを表現できる平均構造モデルの重要性は明らかである。

2. 研究の目的

本研究は、土壌有機 C の主要形態であり、多様な滞留時間と各種官能基の存在によって C 循環および土壌の生物生産性と深く結びついている腐植物質のうち、アルカリ可溶・酸不溶性画分であるフミン酸を対象とし、腐植化度の違いを反映した平均化学構造モデルを構築することを最終的な目的とする。本申請研究においては、フミン酸の構造単位、特に高い芳香族性、難分解性および暗色の所以とされる縮合芳香環組成の解明、平均糖鎖構造の解明、各種固体 ^{13}C NMR 法による平均 C 官能基組成の解明、および ^{14}C 年代と腐植化度との関係に基づく腐植化の進行に伴う構造遷移の解明を目的とした。

3. 研究の方法

1) X 線回折 (XRD) プロファイルおよび透過型電子顕微鏡 (TEM) による縮合芳香環の解析

先行研究 (Ikeya et al., 2007) における各種土壌フミン酸の RTO 分析では、ナフタレンからコロネンに至る縮合環を検出することに成功した。しかしながら、GC/MS、GC で同定、定量できたのは分解生成物の <10% にすぎず、ガス化しにくいより縮合度の高い芳香環の存在が予想された。そこで、固体のまま縮合環構造を解析できる方法として、XRD プロファイルおよび TEM による分析を検討した。

黒ボク土、褐色森林土等から腐植化度の異なるフミン酸 11 点を調製 (NAGOYA 法; Kuwatsuka et al., 1992) し、X 線回折装置・島津 XRD6100 を用いて XRD プロファイルを測定した。C 網面の二次元格子構造に由来する 11 バンド ($2\theta = 80^\circ$) を、低結晶性炭素材料用解析ソフト Carbon Analyzer DiHiGa series (菱化システム) を用いて一連の縮合芳香環モデルの理論散乱強度にフィッティングさせることで、C 網面のサイズ分布を推定した (Fujimoto, 2003; Fujimoto and Shiraishi, 2004)。また、同じ試料について、日立 H-600 形電子顕微鏡を用いて TEM 観察を行った。

2) フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析 (FT-ICR/MS) による成分解析

FT-ICR/MS 分析では、小数点以下第 5 位まで示される分子量から導かれる示性式に基づいて混合物中に含まれる分子の化学構造を推定できる。本研究では、HF 処理による灰分除去と陽イオン交換樹脂処理による H 型への十分な変換の後、水/メタノールを溶媒とした電子イオン化スプレー法により、12 Tesla Apex Qe FTICR-MS (Bruker Daltonics) を用いて腐植化度の異なるフミン酸 6 点の FT-ICR MS スペクトル ($m/z < 2000$) を測定した。C、H、O から成る化合物を主な対象とし、H/C-O/C ダイアグラムを用いてピーク組成の比較を行うとともに KMD 解析により縮

合芳香族酸成分の同定を試みた。

3) ^{14}C 年代測定と各種構造特性分析に基づく安定性に関わる構造因子の解析

宮崎大学演習林にて採取した褐色森林土から調製、分画 (0.01 M NaOH—アセトン系を用いた分別沈殿) した ^{14}C 年代の異なるフミン酸画分 4~6 点について、平均分子量 (高速サイズ排除クロマトグラフィー)、C 官能基組成 (^{13}C CPMAS NMR)、N 官能基組成 (XPS)、縮合芳香環組成 (RTO および XRD 分析) を測定し、土壤中におけるフミン酸の安定性に関わる構造因子を解析した。

4) 各種パルス系列による固体 ^{13}C NMR スペクトルの測定

現在、固体 ^{13}C NMR による腐植物質の C 官能基組成分析において汎用的に用いられている Ramp 交差分極—マジック角度回転 (CPMAS) 法は、機種によっては定量精度を低下させるスピニングサイドバンド (SSBs) の除去が不可能であり、一般的に SSBs の除去に用いられる Total Suppression of Spinning Sideband (TOSS) 法では定量性が保証されていない。そこで、これまで腐植物質への適用例がなかった定量的な SSBs 除去法である Phase-Adjusted Spinning-Sideband (PASS) 法の導入を検討し、Ramp CPMAS、CP/TOSS との比較を行った。さらに、ピーク分離が困難な官能基 C を分別定量するために Dipolar Dephasing と PASS 法、CSA フィルター法との組み合わせをそれぞれ検討した。

5) メチル化—加水分解—アセチル化による糖鎖構造の解析

箱守法を用いてフミン酸をメチル化した後、硫酸加水分解、アセチル化し、生成した中性糖誘導体を GC/MS (島津 Parvum 2) を用いて同定、定量 (内部標準法) した。この方法ではメチル化された水酸基とアセチル化された水酸基から、糖鎖中の遊離の水酸基とエーテル結合の数と位置が推定される。

まず、主要 7 糖の部分メチル化誘導体の GC/MS データベースを作成した。次いでフミン酸の誘導体化を行い、腐植化度に関わらず >90% を得た。しかしながら、アセチル化試料の分析で検出された糖由来ピークは、1-4 または 1-6 結合に関わる 3 種のヘキソースのみであり、着色物質の除去あるいは加水分解条件の改善が必要と考えられた。

4. 研究成果

1) XRD および TEM 分析による縮合芳香環の解析

フミン酸の XRD プロファイルには、002 ($2\theta = 25^\circ$)、10 ($2\theta = 40^\circ$)、11 の 3 つのバンドが認められた (Fig. 1)。11 バンドは、微弱ではあったが全てのフミン酸から解析可能な強度で検出することができた。解析の結果、全てのフミン酸中にベンゼン環数 4~19 に相

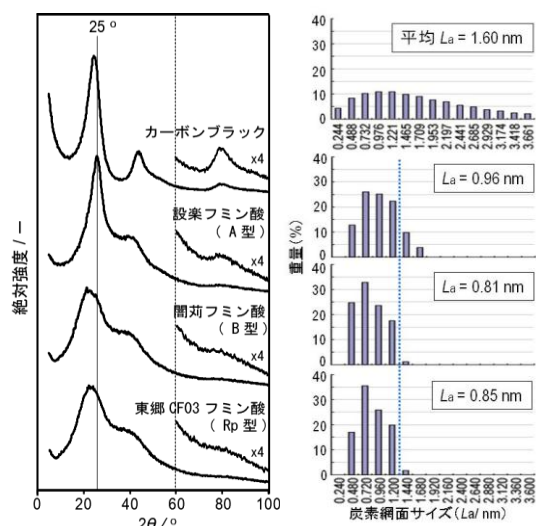


Fig. 1. 各型フミン酸の XRD プロファイル (左) と 11 バンド解析に基づく C 網面サイズ分布 (右; 四角内は平均サイズ)

当する 0.24~1.20 nm の C 網面が存在すること、腐植化度の増大に伴って、最大 1.68 nm (環数 37 の縮合環相当) までの C 網面が含まれること、全 C 網面含量を示す 11 バンド強度は腐植化度の上昇と対応して増大すること ($P < 0.005$) が明らかになった (Fig. 2)。縮合環数 7 以上に相当する C 網面含量は芳香族 C 含有率との間に高い正の相関 ($P < 0.005$) を示し、腐植化の進んだフミン酸ほど縮合芳香族構造が全芳香族構造に占める割合が大きくなることが推定された。

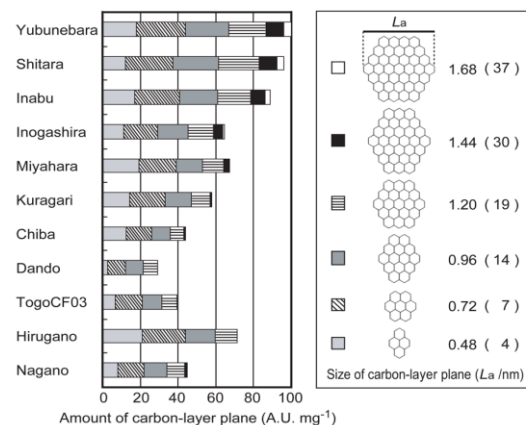


Fig. 2. 各種土壌フミン酸の C 網面含量の比較

また、類似の結果は、腐植集積量の大きい中国のモリソルのフミン酸や水田下層土の結合型フミン酸からも得られ、母材や生成および腐植化過程が異なっても腐植化度を基準とすることで包括的な比較や評価が可能であることが明らかとなった。

なお、002 バンドプロファイルは網面積層数を示した。および層間距離に関する情報をもっているが、フミン酸では γ バンド等周辺

のシグナル強度が大きかったため解析が不可能であった。

一方、フミン酸中の C 網面サイズは最も腐植化度が高い試料でも、対照試料として用いたカーボンブラックと比較すると明らかに小さかった (Fig. 1)。TEM 観察においても、カーボンブラックに見られたような積層構造はいずれのフミン酸中にも認められず、グラファイト様構造が未発達であることが明らかになった (Fig. 3)。

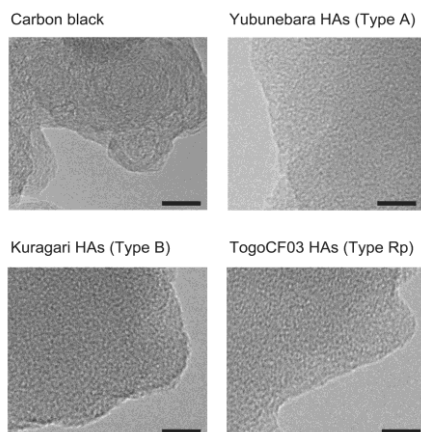


Fig. 3. 土壌フミン酸とカーボンブラックの TEM イメージ。バーは 10 nm。

2) FT-ICR/MS による構成成分解析

FT-ICR/MS では、 m/z 200~700 の分子ピークが 2600~3500 検出され、そのうち C、H、O から構成されている化合物は 970~1700 で全体の 34~55% を占めた (Fig. 4)。検出されたピークには C_{12} ~ C_{26} 脂肪族モノカルボン酸、 C_{11} ~ C_{31} 脂肪族ジカルボン酸、リグニン類様物質が含まれていた。リグニンやタンパク様物質を起源とする化合物数は、腐植化度の増大とともに減少し、設楽 A 型フミン酸ではリグニン由来ピークはわずか 5 であった (Fig. 5)。一方、縮合芳香族化合物のピーク数は腐植化度の低い Rp 型フミン酸で少ない傾向を示した。

縮合芳香族酸についての詳細な解析では、RTO 分析、XRD 分析で見つからなかった新

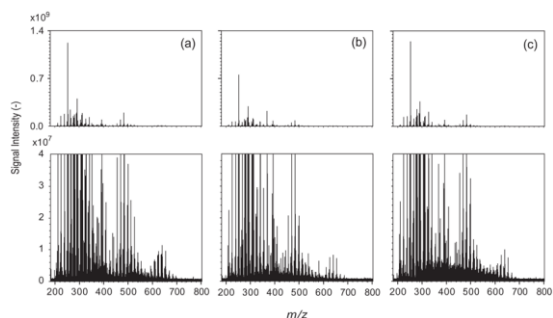


Fig. 4. 長野 Rp 型 (a)、關荊 B 型 (b)、設楽 A 型 (c) フミン酸の FT-ICR/MS スペクトル (下図は 100 倍拡大)

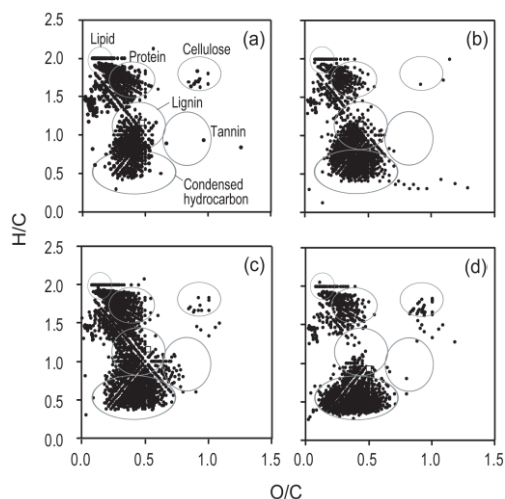


Fig. 5. 各型フミン酸の FT-ICR/MS で検出された化合物の H/C—O/C 分布。(a) 長野 Rp 型、(b) 軽ヶ野 Rp 型、(c) 關荊 B 型、(d) 設楽 A 型。

しい化合物を含むベンゼン環 2~7、カルボキシル基 1~8 の鎖状縮合芳香環、ベンゼン環 3~10、カルボキシル基 1~8 の網状縮合芳香環、および各種ビフェニル型化合物の存在が推定された (Fig. 6)。鎖状および網状縮合芳香族酸に由来するピーク数は 11~69 と試料間で多様であり、腐植化度が高いフミン酸で多く、ピーク強度も強い傾向が認められた。縮合芳香族酸に由来するピーク強度の和は腐植化度との間に高い正の相関 ($P < 0.005$) を示したが、芳香族 C 含有率との相関は有意ではなかった。

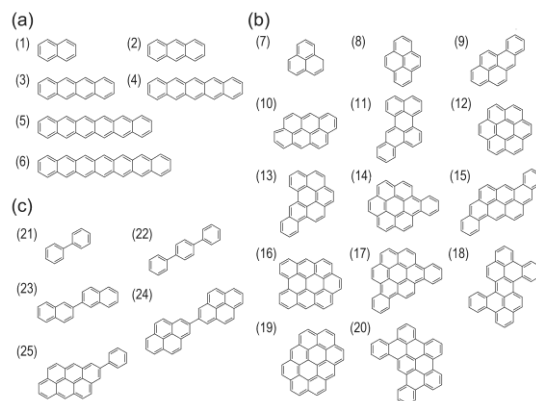


Fig. 6. フミン酸の FT-ICR/MS で検出された主な鎖状縮合芳香環 (a)、網状縮合芳香環 (b)、およびビフェニル型芳香環 (c) 成分。

3) ^{14}C 年代との関係に基づくフミン酸の安定性に関わる構造因子の解析

宮崎フミン酸の RTO 分析では、ベンゼン環数 2~7 の縮合芳香環に由来する各種ベンゼンポリカルボン酸が検出され (Fig. 7)、分解生成物の総量 ($44 \sim 111 \text{ mg g}^{-1}$) はより古い画分ほど大きい傾向を示し、その差は主に縮合度が高い (ベンゼン環数 5~7) 成分に由来す

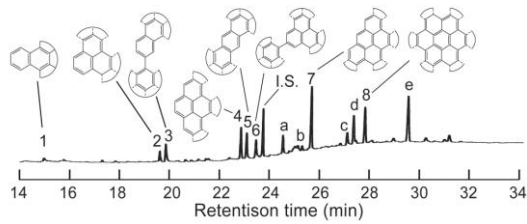


Fig. 7. 宮崎フミン酸 (推定 ^{14}C 年代 325 yBP) の RTO 分解生成物メチル化誘導体の FID-GC クロマトグラムと各生成物の推定起源構造。I.S., 内部標準 (ノナデカン酸メチルエステル)。ピーク No. 1、2~3、4~6、7、8 はベンゼン-ジ、トリ、テトラ、ペンタおよびヘキサカルボン酸メチルエステル。ピーク No. a~e はカルボキシル基以外の側鎖も含むベンゼンポリカルボン酸。

Table 1. ^{14}C 年代の異なるフミン酸画分から得られた縮合芳香環由来分解生成物の収量 (mg g^{-1})

起源構造中の ベンゼン環数	推定 ^{14}C 年代 (yBP)			
	530	325	223	147
2 (No. 1, 3)*	6.0	3.8	6.4	5.6
3 (No. 2, 5, 6)	15	9.8	15	11
4 (No. 4)	7.9	5.9	7.0	5.0
5~7 (No. 7, 8)	35	21	17	8.7
不明 (No. a~e)	47	27	18	14
合計	111	68	63	44

*Fig. 7 中のピーク No.。

る分解生成物の収量に起因していた (Fig. 8)。XRD 分析においては、サイズが大きい C 網面構造 ($\sim 1.68 \text{ nm}$; ベンゼン環数 ~ 37) はより古い画分においてのみ検出され、 ^{14}C 年代が古くなるほどベンゼン環数 7 以上の縮合芳香環含量が増大し、平均縮合度も大きくなる事が明らかになった (Fig. 8)。これらの結果は、HPSEC から求めた平均分子量の増大、固体 ^{13}C NMR による芳香族 C 含有率の増大と対応しており、さらに、XPS (N1s) 分析より全 N に占める芳香族 N の割合も古いフミン酸ほど高いことが分かった。以上のように、

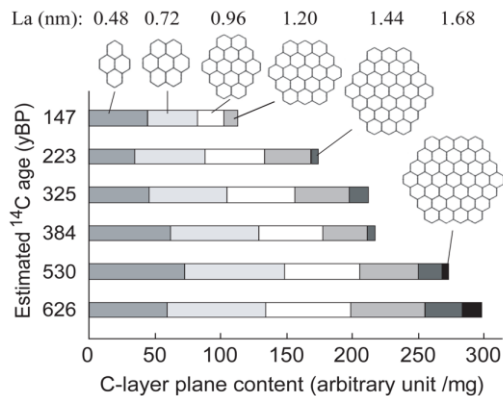


Fig. 8. XRD 分析に基づく ^{14}C 年代の異なるフミン酸画分中の各種 C 網面含量

フミン酸の続成過程における構造的安定化の方向性が明らかになった。

4) 各種パルス系列による固体 ^{13}C NMR スペクトル

フミン酸の CP/PASS 分析ではサイドバンド次数 8 の際に有効なスペクトルが得られ (Fig. 9)、SSBs 補正による誤差の回避が可能となった。CPMAS では測定できないカルボニル C が 2.4~3.5%C 含まれること、CP/TOSS では %芳香族 C が 6~7% 低く見積もられることが示された。H と直接結合していない C および DD/PASS および CSA フィルターによる分析条件は現在試行を続けている。

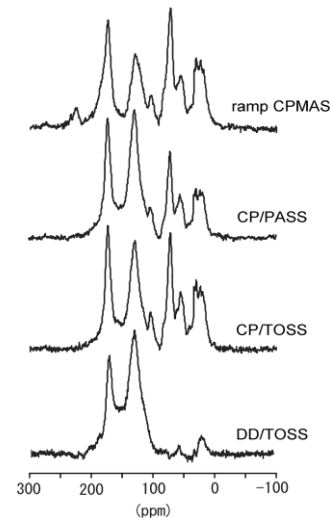


Fig. 9. 各種パルス系列で測定した猪之頭 A 型フミン酸の固体 ^{13}C NMR スペクトル

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Ikeya, K., Hikage, T., Arai, S., and Watanabe, A. 2011: Size distribution of condensed aromatic rings in various soil humic acids. *Organic Geochemistry*, 42(1), 55-61.
- ② 渡邊 彰 2010: 近年の腐植物質分析法の展開—6. 固体高分解能 NMR 法, *土肥誌*, 82(4), 394-401.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 池谷康祐・斎藤徳之・日影達夫・大谷 肇・渡邊 彰: X 線回折プロファイルおよび透過型電子顕微鏡観察による土壌フミン酸の縮合芳香族構造の解析。日本土壌肥料学会 2008 年度愛知大会、2008 年 9 月 9 日、名古屋市立大学
- ② 池谷康祐・斎藤徳之・日影達夫・大谷 肇・渡邊 彰: 腐植化度の増大とグラファイト様構造の発達: X 線回折プロファイルからのアプローチ。日本腐植物質学会第 24 回講演会、2008 年 11 月 5 日、北海道大学
- ③ 池谷康祐・Hatcher P.G.・大谷 肇・渡邊 彰: 土壌腐植物質の FT-ICR MS スペクトル解

析、日本腐植物質学会第 25 回講演会、2009 年 11 月 25 日、兵庫県立大学

④ Watanabe A. : Structural property responsible for recalcitrant nature of soil organic carbon. International Symposium on Soil Quality and Management of World Mollisols、2010 年 7 月 13 日、Harbin、China

⑤ Watanabe A., Ochi S., Kato C., Ikeya K., and Nakamura T. : Relationship between ^{14}C age and structural property of humic acids. 19th World Congress of Soil Science、2010 年 8 月 5 日、Brisbane、Australia

⑥ 池谷康祐・Sleighter R.L.・Hatcher P.G.・渡邊 彰 : 土壌フミン酸の FT-ICR MS スペクトル解析。日本土壌肥料学会 2010 年度大会、2010 年 9 月 9 日、北海道大学

⑦ 渡邊 彰・越智翔一朗・加藤千鶴・池谷康祐・中村俊夫 : 腐植物質の土壌中における構造的安定性。日本土壌肥料学会 2010 年度大会、2010 年 9 月 9 日、北海道大学

⑧ 池谷康祐・眞家永光・王 光華・渡邊 彰 : 土壌フミン酸の炭素構造解析—逐次抽出画分間の比較。日本腐植物質学会第 26 回講演会、2010 年 11 月 30 日、筑波大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 彰 (WATANABE AKIRA)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・
教授
研究者番号 : 50231098

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし