

報 文

生態系における腐植生成と脂肪族成分の変動

米 林 甲 陽

Chemical Alteration of Humic Substances as revealed by Component Analysis using Adsorption Chromatography

Koyo YONEBAYASHI

Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University

Summary

To estimate the average chemical structure of humic acids, structural parameters were calculated from the elemental and functional groups analysis and hydrogen distribution estimated by $^1\text{H-NMR}$: carbon aromaticity f_a , hydrogen to carbon ratio in hypothetical unsubstituted aromatic material Hau/Cau , and number of aliphatic substituent n_a . From the Hau/Cau value, condensation degree of aromatic ring was estimated. Number average molecular weight of humic acids were measured by the vapor pressure osmometry. Consequently, Andisol humic acids consist of a few structural subunits assumed to be condensed aromatic rings with short aliphatic substituents and many carboxyl and carbonyl groups. Aquent and Ochrept humic acids consist of many structural subunits assumed to be aromatic ring with relatively long aliphatic substituents.

Macroporous, nonionic Amberlite XAD-8 resin was used for fractionation of soil humic acids in order to reduce their complexity. H^+ -saturated humic acid was adsorbed onto the resin at pH 3 and fractionated into four components by stepwise elution using universal buffers adjusted to pH 7, to pH 11, water, and 50% ethanol. The first components consists of a few structural subunits, assumed to be condensed aromatic rings with short aliphatic substituents and many carboxyl groups. The second component was characterized by phenolic groups, and the third by relatively long aliphatic chains. The fourth component consists of many structural subunits, assumed to be aromatic rings with long aliphatic substituents. These components were termed as carboxylic, phenolic, semi-aliphatic, and aliphatic components, respectively. Andisol humic acids contained abundant amounts of carboxylic component. Aquatic sediment humic acids contained ample amount of aliphatic components. Phenolic component was dominant in humic acids of tropical peats sublayer soils.

Component analysis could lead to a new way to estimate the humification processes of humic substances.

Key words: Humic Substances, Structural Parameter, Adsorption Chromatography, $^1\text{H-NMR}$, Aliphatic Component

(Soil Phys. Cond. Plant Growth, Jpn., 65, 35-41, 1992)

土壌腐植物質は、無機成分と複合体を形成して安定に存在しており、その存在形態も多岐にわたっている。また、それ自身が複雑な高分子物質の混合物であるため、その化学構造を推定することは容易ではない。

最近、統計的構造解析法を腐植物質に適用して、平均

的な化学構造を推定することが出来るようになった。さらに、腐植物質を構造タイプの等しい構成成分に分別することが可能になったことから、腐植物質の生成過程における構造変化を推測することが出来る。

本稿では最初に、腐植物質の土壌中における存在形態を概観した後、土壌の違いが腐植酸の化学的性質にどの様に反映するかを述べる。次いで腐植酸の平均化学構造推定法と構成成分の新分別法を紹介し、最後に腐植物質の生成過程において構成成分の存在比がどのように変化

京都府立大学農学部 〒606 京都市左京区下鴨半木町

キーワード: 腐植物質, 構造指数, 吸着クロマトグラフィー, $^1\text{H-NMR}$, 脂肪族性成分

するかについてふれる。

1. 腐植物質の存在様式

有機・無機複合体を形成している無機質粒子の粒径によって、結合している腐植物質の性質は非常に異なっている。土壌を Na で飽和した後、超音波処理を繰り返して十分に分散させ、化学的にあまり変性させることなく、細粘土、粗粘土、シルト、細砂相当画分に分離して、有機物の性質を調べると、粒径による差異が認められる。有機物の集積度は、粒径が細くなるに従って増大し、細粘土複合体でやや減少する。有機物の C/N 比は粒径が細くなるほど減少する。また腐植酸の腐植化度は粒径の低下と共に上昇するが、細粘土複合体で低下する。これらの事は、粒径の粗い複合体には C/N 比の高い腐植植物遺体が主に存在し、もっとも腐植化度の高い腐植酸は粗粘土やシルト複合体を形成している事を意味している。細粘土は、微生物由来と考えられる腐植化度の低い腐植物質と複合体を形成している³⁾。

粗粘土・腐植複合体は、熱重量分析の結果によれば、粗粘土 - Fe - 腐植または粗粘土 - Al - 腐植複合体を形成しており、アルカリ抽出される腐植物質は主に後者から抽出されている⁴⁾。

カオリナイト粘土に腐植酸を吸着させると、腐植酸は粘土鉱物外縁部だけでなく、粘土鉱物の結晶表面上に存在する成長ステップに吸着している事が明らかにされている⁵⁾が、天然の粘土・腐植複合体の場合もまったく同様である事が、デコレーション法を用いた電子顕微鏡観察で見いだされた⁶⁾。

また、腐植・粘土複合体の粘土鉱物がスメクタイトの場合、X線回折によれば腐植物質の一部はスメクタイトの層間に侵入吸着している⁷⁾。

2. 腐植酸の化学的性質による土壌の判別

土壌から抽出される腐植酸の化学的性質は土壌型によって異なっており、腐植酸の H/C 原子数比は、底質土、褐色森林土、沖積水田土壌、泥炭質土壌、黒ボク土壌の順に低下し、腐植酸 1% 溶液の 600nm における吸光係数はこの順に高まる。黒色化度の高まりは腐植化の進行を現すと考えられるため、腐植化にともなう化学変化を、H/C 及び O/C 原子数比の変化から類推すると(第 1 図)、脱メタン反応が起こっていることは明らかであるが、脱水反応は余り起こっていないように見える。しかし、官能基分析を行うと腐植化過程でカルボキシル基の増加とアルコール性水酸基の減少が起こっていることから、両

者の競合が O/C 比の変化を見かけ上少なくしていることがわかる⁸⁾。また、脱メタン反応に関しては ¹H-NMR 分析の結果からメトキシル基や脂肪族側鎖の離脱が起こることが確かめられている⁹⁾。

腐植化過程で起こる化学変化を検討するため、腐植酸の光学的特性値、元素分析値、官能基分析値、¹H-NMR 分析値について因子分析を行うと、4 因子によって全分散の 75% が説明される。第 1 表に示すように、第 1 因子は脂肪族鎖や窒素成分を現し、第 2 因子は官能基や光吸収特性を現し、第 3 因子は炭水化物、第 4 因子はラク톤環を現す。従って、腐植酸の腐植化は、まず側鎖と含窒素成分の変化となって現れるものであり、次いで光学的性質や官能基量に変化することになる¹⁾。

黒ボク土壌、石灰質土壌、褐色森林土、沖積水田土壌、泥炭質土壌、草地土壌、底質土について、因子分析で負荷量の高い腐植酸の化学的性質を基に、土壌型を判別するための判別分析を行った。腐植酸の判別基準から土壌の推定確率を求めると、41 試料中 40 試料は正しく分類さ

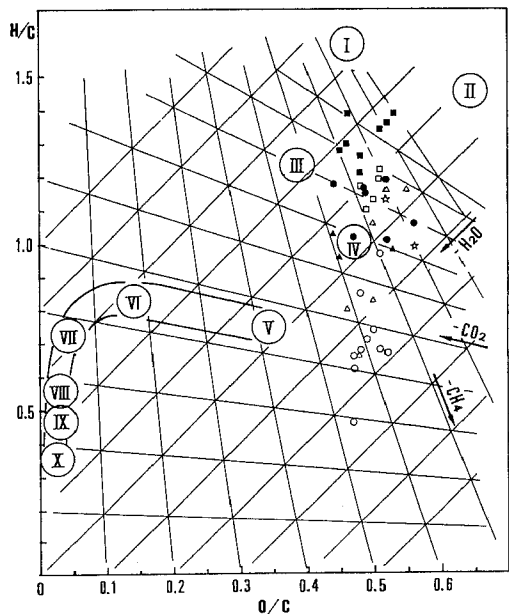


Fig. 1 Elemental composition of humic acids. Atomic H/C vs. O/C. I, plankton; II, wood; III, lignin; IV, peat; V, brown coal; VI, low rank bituminous coal; VII, medium rank bituminous coal; VIII, high rank bituminous coal; IX, semi-anthracite; X, anthracite. ○, Andisol; △, Mollisol/Vertisol; □, Ochrept; ●, Aquent; ▲, Histosol; ☆, Oxisol; ■, aquatic sediment.

れた¹⁾。このことは、腐植酸の分析値から腐植の生成した土壌環境を推察することが可能なことを意味している。

3. 腐植物質の平均化学構造

腐植物質は高分子化合物の混合物から構成されているため、化学分解によって得られる構成単位の化合物数は想像を絶する数となり、これらを同定して、もとの腐植物質を再構築することは非常に困難である。そこで、腐植物質と同様に混合物から構成されている石炭の化学構造を解明するために開発された統計的構造解析法¹⁰⁾を土壌腐植酸に適用した。この解析法は類似した構造を持つ物

質の集合体に対して、平均値としてその構造を把握するものである。元素分析値と¹H-NMRスペクトルを基に芳香族環と側鎖の炭素数を求め、芳香族指数、芳香環縮合度指数、芳香環置換度指数、脂肪族鎖指数などの構造パラメーターを計算し平均化学構造が推定される¹⁾。

腐植酸は石炭に比べカルボキシル基やカルボニル基などの官能基を多く含むため、Brownら¹¹⁾の構造指数計算法をそのまま適用できない。そこで、官能基はすべて芳香環に結合しており、ジフェニルやジフェニルメタン構造をとらないと仮定¹²⁾して計算法に改良を加えた。

元素分析、官能基分析、¹H-NMR分析の結果を基に、第2表に示すように、各種結合様式の水素数を求め、そ

Table 1 Factor loading matrix after varimax rotation.

Variable	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
E $\frac{1\%}{600}$	-0.52	<u>0.66</u>	-0.47	0.09
$\Delta \log K$	0.19	-0.65	0.60	0.07
Carbon	-0.68	0.21	-0.31	-0.56
Hydrogen	<u>0.74</u>	-0.52	0.36	-0.06
Nitrogen	<u>0.92</u>	-0.13	-0.03	0.07
H/C ratio	<u>0.77</u>	-0.48	0.37	0.02
O/C ratio	0.07	0.02	0.31	<u>0.82</u>
N/C ratio	<u>0.91</u>	-0.12	0.04	0.08
Carboxyl	-0.04	<u>0.84</u>	-0.15	-0.04
Phenolic OH	0.02	-0.46	0.08	-0.10
Carbonyl	-0.20	<u>0.81</u>	-0.16	0.00
Alcoholic OH	0.11	-0.19	<u>0.89</u>	0.07
α -CH ₃ , α -CH ₂	-0.52	0.34	0.21	-0.27
β -CH ₂ , β -CH	<u>0.65</u>	0.02	0.18	-0.55
Remote CH ₃	<u>0.82</u>	0.08	0.05	-0.43
OCH ₃ -H	0.12	-0.74	0.11	0.34
Lactone-H	-0.04	0.01	0.11	<u>0.63</u>
Aromatic-H	-0.54	<u>0.61</u>	0.23	-0.21

Table 2 Number of various types of hydrogen and carbon per molecule.
(Hypothetical molecular weight : 10000, SUS-1 ; Mollisol)

	COOH	C = O	Ph-OH	Al-OH	Lact.	Aro.	OCH ₃	H α	H β	H γ	Total
H	48	20	10	43	40	73	69	18	42	15	378
Cfun	48	20					23				91
C				43				9	21	5	78
Car	48	40	10	43		73	23	9			246
Ccor											43

Average molecular structure parameters, equations
 $H_{au}/C_a = Car / (Car + Ccor) = 246 / (246 + 43) = 0.85$
 $n = (C\beta + C\gamma) / C\alpha + 1 = (21 + 5) / 9 + 1 = 3.9$

$f_a = (Car + Ccor) / C = (246 + 43) / 458 = 0.63$
 $\sigma = (Car - C_{Aro}) / Car = (246 - 73) / 246 = 0.70$
 $Ccor = TC - Cfun - Cali - Car$

れそれぞれに対応する炭素数をすべて計算し、残りの炭素が芳香環の縮合環を形成していると考え、芳香族指数(f_a)、芳香環縮合度指数(Hau/Ca)、芳香環置換度指数(σ)、脂肪族鎖指数(n)を次のように計算した。

$$f_a = \text{芳香族炭素} / \text{全炭素}$$

$$\text{Hau/Ca} = \text{置換可能な芳香族炭素} / \text{全芳香族炭素}$$

$$\sigma = \text{既置換芳香族炭素} / \text{置換可能な芳香族炭素}$$

$$n = (\beta \text{位以上側鎖炭素} / \alpha \text{位側鎖炭素}) + 1$$

腐植化度が高まると芳香族指数は増加し、芳香環縮合度指数は減少した。モデル化合物の芳香環縮合度指数を参考にして腐植酸の縮合度を推定することが出来る。第3表に示すように、黒ボク土壌腐植酸のHau/Caは0.62~0.89であるため、縮合環数は2~4環、褐色森林土腐植酸では0.95~1.15であるためベンゼン環と推定された。その他の土壌腐植酸のHau/Caは0.74~1.18であり、縮合環数は1~2環と推定された。なお、底質土腐植酸の縮合度指数は1.15以上となり、縮合環数は1以下になることになる。直鎖状構造や飽和環の占める割合が高いためであり、飽和環数を別の計算法で求める必要がある¹⁾。

脂肪族側鎖を直鎖状と仮定すると、その長さは β 位以上炭素数と α 位炭素数の比から計算される。底質土腐植酸の脂肪族鎖の平均長さは非常に長く、炭素数13~19となる。褐色森林土腐植酸では炭素数4~6となり、埋没黒ボク土では非常に短く2以下となる。その他の土壌腐植酸の脂肪族鎖長さは3~13の範囲にあり、土壌型による一定の傾向は認められない¹⁾(第3表)。

腐植酸分子量は、その多分散性の故に、測定法によって非常に異なる平均分子量が報告されている。超遠心法(Mz)では22000~230000、光散乱法(Mw)では65000~66000、凝固点降下法(Mn)では25000などの報告がされている。数平均分子量(Mn)を蒸気圧浸透圧法によって測定する場合、腐植酸の水溶液中での解離に基づく誤差を補正しなければならない。Hansen & Schnitzerの方法¹²⁾に従いpHによる補正を行い数平均分子量を求めた。黒ボク土壌腐植酸の数平均分子量は1700~4600、

褐色森林土や沖積水田土壌腐植酸では7500~8900、底質土では3500~5600であった¹³⁾。また、分子量分布をゲル浸透クロマトグラフィーで調べると、黒ボク土壌腐植酸は比較的せまい分子量分布を示すが、その他の土壌腐植酸は非常に幅広い分子量分布を示した¹⁴⁾。このことから、平均分子量の絶対値を比較することは余り意味を持たないことになるが、平均化学構造を推定するためには必要に数値である。

底質土を除き、腐植化度の低い腐植酸ほど分子量が大きいのはリグニンなどの高分子構造が腐植酸中に存在するためであり、幅広い分子量分布を示す理由でもあろう。一方、腐植化度の高い腐植酸(黒ボク土)ほど平均分子量は小さいにもかかわらず、構造指数から推定される平均構造単位の芳香環数は大きく、構造単位の分子量は大きい。これは、腐植化度が低い場合は構造単位の連結数が多く、腐植化度が高いほど平均構造単位の連結数が少ないことを意味している。第2図に、非常に大胆ではあるが腐植酸の平均化学構造モデルを示した。しかし、これはあくまでも平均化された構造モデルであって、このような構造が実際に存在することを示しているわけではない。いずれにしても、腐植化の進行を分子量の変化から低分子化と考えるべきではない。腐植化の進行に伴う縮合環数の増加は構造指数の変化から明らかであり、低分子化した前駆物質が縮合して腐植化が進行すると考えられる¹⁵⁾。

4. XAD 樹脂による腐植物質の分画

腐植物質のより精密な特徴付けのためには、構造タイプの等しい化学的性質の類似した構成成分に分離することが重要となる。そのため古くから多くの試みがなされ、酸沈澱、塩析、金属塩による沈澱、溶媒抽出、イオン交換、電気泳動、液体クロマトグラフィーなどが行われてきた。液体クロマトグラフィーでは、分子の大きさ、イオン排除効果、アニオン交換樹脂との水素結合に基づく分離機構によって腐植物質が分離されてきている。しか

Table 3 Structural parameters of humic acids.

Soil Group	Number	f_a	Har/Car	n
Andisol	10	0.59~0.75	0.62~0.89	1.4~13.1
Mollisol/Vertisol	6	0.52~0.69	0.74~1.01	2.5~10.1
Inceptisol(Ochrept)	5	0.45~0.51	0.95~1.15	4.1~6.4
Entisol(Aquent)	7	0.51~0.61	0.84~1.14	3.9~12.1
Histosol	3	0.58~0.62	0.84~0.93	3.8~8.9
aquatic sediment	8	0.35~0.48		12.9~19.4

し何れの分画法も、各種腐植物質から構造タイプの等しい構成成分を分画できるものではなかった。

MacCarthy ら¹⁶⁾と Thurman & Malcolm¹⁷⁾は、非イオン性疎水性樹脂 XAD-8 を用い、水成腐植酸を pH 2 で吸着させ pH 勾配による溶出を行うと、2つの溶出ピークが得られることを認めた。これは、pKa の異なる成分が pH 上昇と共に解離し、樹脂から脱着するためである事がモデル化合物を用いて確かめられた。しかし、土壤腐植酸は XAD 樹脂に吸着する以前に pH 2 で一部洗脱し、pH12でも溶出しにくい部分が多い。

著者らは、水素型にした土壤腐植酸の水溶液が約 pH 3 を示すため、pH 3 緩衝液で緩衝化した XAD 樹脂に H⁺型腐植酸を吸着させた後、段階溶出によって4成分に分離する手法を開発した²⁾。溶離液を、pH 7, pH11緩衝液(0.02M-リン酸, 酢酸, ホウ酸の等モル溶液+NaOH), 水, 50%エタノールの順に溶離すると、まず pH 7 で腐植酸のカルボキシル基が解離して親水性となって溶出する。次いで pH11 でフェノール性水酸基が中和されて親水性が高まり脱着する。水溶媒でカラムが脱塩されると比較的疎水性の成分が溶出し、アルコール性溶媒によってさらに疎水性な成分が脱着する。

このことは、腐植化度の異なる黒ボク土壌、褐色森林土、沖積水田土壌、泥炭質土壌腐植酸の4成分を分離し、その化学性を元素分析、官能基分析、¹H-NMR 分析で調べて確かめられた¹⁸⁾。溶出順に A, B, C, D とすると、いずれの腐植酸も炭素含量は A < B < C < D の順に高く、酸素含量は A > B > C > D の順に低下した。カルボキシル基、カルボニル基は A > B > C > D の順に低下し、フェノール性水酸基含量は B 成分で高く、アルコール性水酸基は D 成分でもっとも高い(第4表)。また、¹H-NMR による芳香族プロトンの存在割合は A > B > C > D の順

に低下し、芳香環から β 位以上の脂肪酸プロトンの割合は A < B < C < D の順に高まる(第5表)。

従って、成分 A はカルボキシル基とカルボニル基が多く、側鎖は短く芳香環が発達している。成分 B は A の特徴に加えてフェノール性水酸基が多い。成分 C は比較的長い側鎖を持つ。成分 D は非常に長い側鎖を持ち、芳香環は発達しておらず、アルコール性水酸基が多い。このように生成過程の異なる腐植酸を、化学的性質の類似した構成成分に分離することが出来たため、これらの成分をカルボキシル性成分、フェノール性成分、準脂肪族性成分、脂肪族性成分と呼ぶ¹⁸⁾。

腐植物質の各成分の存在割合は土壌によって異なり、4成分の存在割合の違いこそが、腐植酸自体の性質の違いを支配するものである。準脂肪族性成分はいずれの土壌でも非常に少ないため、脂肪族性成分と合わせて第3図に示した。フルボ酸と黒ボク土壌腐植酸はカルボキシル性成分が非常に多く、底質土腐植酸は脂肪族性成分が非常に多い。熱帯泥炭土壌下層土の腐植酸はフェノール性成分が多く、褐色森林土や沖積水田土壌腐植酸

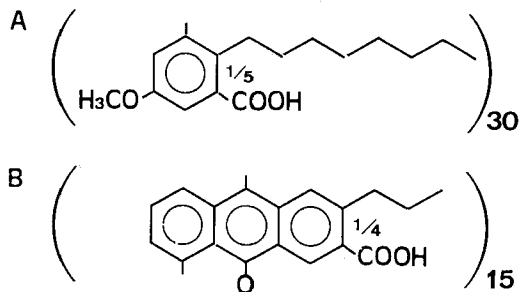


Fig. 2 Hypothetical average chemical structure of humic acids. A, Aquent; B, Andisol.

Table 4 Elemental and functional group compositions of the four components of Inceptisol and Entisol humic acids.

Humic acid	Component	C (%)	H (%)	N (%)	O (%)	H/C atomic ratio	O/C atomic ratio	functional groups (meq/g)			
								COOH	C=O	phenolic-OH	alcoholic-OH
Inceptisol	A	49.0	3.8	2.9	44.3	0.93	0.68	4.2	6.6	0.8	4.6
	B	50.0	4.5	3.4	42.1	1.08	0.63	4.0	5.4	1.2	4.3
	C	53.4	5.1	3.4	38.1	1.15	0.54	3.2	3.8	1.1	1.3
	D	58.1	6.6	3.5	31.8	1.36	0.40	2.5	1.3	0.5	5.5
Entisol	A	48.3	3.9	4.1	43.7	0.96	0.68	4.2	5.0	0.7	1.7
	B	51.4	4.1	4.3	40.2	0.97	0.59	3.7	ND	1.1	ND
	D	55.9	6.2	4.5	33.4	1.33	0.45	2.2	1.7	0.6	5.9

Components A, B, C, and D were eluted with universal buffer adjusted to pH 7, to pH 11, water, and 50% aqueous ethanol, respectively.

Table 5 Proton distribution of the four components of Inceptisol and Entisol humic acids

Humic acid	Component	Aromatic -H (%)	Lactone -H (%)	OCH ₃ -H OH-H (%)	α -H CH ₂ , CH-H (%)	β -H CH ₂ , CH-H (%)	γ -H CH ₃ -H (%)
Inceptisol	A	65.5	12.0	13.0	3.2	2.9	3.4
	B	52.8	15.3	20.1	3.2	5.1	3.5
	C	50.8	12.8	12.1	3.3	16.8	4.2
	D	16.3	24.2	15.7	3.9	35.0	4.9
Entisol	A	16.7	42.3	27.7	6.2	4.3	2.8
	B	16.8	43.5	25.2	5.9	5.1	3.6
	C	16.1	33.7	33.9	2.2	9.3	4.8
	D	12.4	5.1	50.5	1.9	22.1	7.9

Components A, B, C, and D were eluted with universal buffer adjusted to pH 7, to pH 11, water, and 50% aqueous ethanol, respectively.

The area of each peak in the ¹H-NMR spectra is given as the percentage of the total area of all the peaks in the spectrum.

引用文献

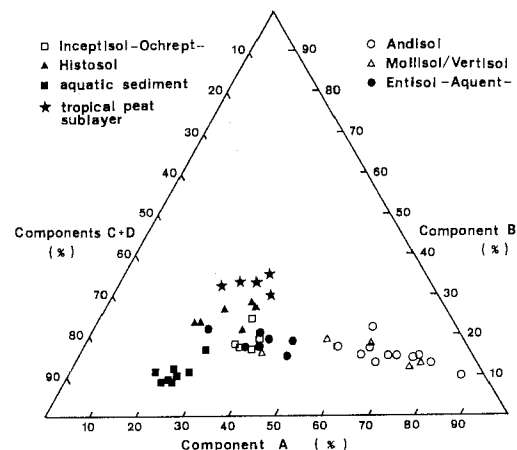


Fig. 3 Distribution of soils in the triangular diagram for humic acids components. A, carboxylic; B, phenolic; C, semi-aliphatic; D, aliphatic component.

は中間的性質を示す¹⁸⁾。

腐植化の進行とともに腐植酸の側鎖の長さが減少することを平均化学構造から推定したが、腐植酸の成分組成も腐植化にともない脂肪族性成分が減少していることが認められる。従って、腐植化過程は、側鎖の長い脂肪族性成分が脱離して、芳香環の発達したカルボキシル性成分の存在割合が増加することを意味していると推定される。このように、腐植酸の成分組成分析法は、腐植化過程を考察する有効な手法となると考えられる。

- 1) Yonebayashi, K. and Hattori, T.: Numerical classification and structural features of soil humic acids. Trans. XIV Congr. Inter. Soc. Soil Sci. V, 230-235 (1990)
- 2) Yonebayashi, K. and Hattori, T.: A new fractionation of soil humic acids by adsorption chromatography. Geoderma, 47, 327-336 (1990)
- 3) 米林甲陽・久馬一剛・川口桂三郎: 土壌中の有機・無機複合体とその有機物の特性, 土肥誌, 45, 416-420 (1974)
- 4) 米林甲陽・久馬一剛・川口桂三郎: 土壌中の有機物・粘土複合体の熱重量分析, 土肥誌, 45, 421-425 (1974)
- 5) 米林甲陽・服部共生: カオリナイト表面にみられる結晶成長ステップについて - デコレーション法・電子顕微鏡観察による -, 土肥誌, 47, 349-354 (1976)
- 6) 米林甲陽・服部共生: デコレーション法による粘土・腐植複合体表面の電子顕微鏡観察, 土肥誌, 47, 355-360 (1976)
- 7) 米林甲陽: 土壌中の有機・無機複合体に関する研究, 京都府大学報・農学, 28, 121-171 (1976)
- 8) Yonebayashi, K. and Hattori, T.: Chemical and biological studies on environmental humic acids. I. Composition of elemental and functional groups of humic acids. Soil Sci. Plant Nutr., 34, 571-584 (1988)
- 9) Yonebayashi, K. and Hattori, T.: Chemical and biological studies on environmental humic acids. II. ¹H-NMR and IR spectra of humic acids. Soil Sci. Plant Nutr., 35, 203-212 (1989)

- 10) Brown, J.K. and Ladner, W. R. : A study of the hydrogen distribution in coal-like materials by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy II ·· A comparison with infra-red measurement and the conversion to carbon structure. *Fuel*, **39**, 87-96 (1960)
- 11) 岡 宏・佐々木満雄・伊藤光臣・鈴木 章：泥炭フミン酸の構造に関する研究(1) — NMRによる泥炭フミン酸の構造解析一, *燃協誌*, **48**, 295-302 (1969)
- 12) Hansen, E. H. and Schnitzer, M. : Molecular weight measurements of polycarboxylic acids in water by vapor pressure osmometry. *Anal. Chim. Acta*, **46**, 247-254 (1969)
- 13) 米林甲陽：講座, 腐植物質研究法, III, ペドロジスト, **33**, 129-143 (1989)
- 14) Yonebayashi, K. and Hattori, T. : Surface active properties of soil humic acids. *Sci. Total Environ.*, **62**, 55-64 (1987)
- 15) 米林甲陽：土壤腐植物質の化学構造と機能に関する研究, *土肥誌*, **61**, 231-234 (1990)
- 16) MacCarthy, P., Peterson, M. J., Malcolm, R. L., and Thurman, E. M. : Separation of humic substances by pH gradient desorption from a hydrophobic resin. *Anal. Chem.*, **51**, 2041-2043 (1979)
- 17) Thurman, E. M. and Malcolm, R. L. : Structural study of humic substances : new approaches and methods. *In* "Aquatic and Terrestrial Humic Materials", Eds. R. F. Christman and E. T. Gjessing, pp. 1-23, Ann Arbor Sci., Michigan (1983)
- 18) 米林甲陽・山田 亨：XAD樹脂吸着クロマトグラフィによる腐植酸の成分組成, *土肥要旨集*, **38**, 印刷中 (1992)
(受稿年月日1992年2月20日)