

総説

腐植物質の難分解性の鍵構造としての縮合芳香環構造

渡邊 彰

名古屋大学 大学院生命農学研究科
〒464-0814 名古屋市千種区不老町

Abstract

The wide range of turnover times for humic substances (HS) function as a regulator of the global carbon (C) balance, which may depend on the physical or chemical protection and inherent structural resistance of such substances to microbial attack. The intrinsic persistence of humic acids (HAs) appears to increase with increasing degree of structural modification (humification) and condensed aromatic structures may be key structures. In the present paper, the composition of condensed aromatic structures in HS as was analyzed using three methods: ruthenium tetra-oxide oxidation analysis, electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron mass spectrometry, and X-ray diffraction 11-band profile analysis are introduced. All the results suggested the presence of condensed aromatic structures, with up to 7, 10, and 37 rings in soil HAs, respectively, and the content of condensed aromatic structures, particularly those having a greater number of rings, was larger in the HAs with a higher degree of humification and a larger aromatic C content. The importance of char and a biogenic polynuclear quinone as potential sources of condensed aromatic structures in HS were also discussed. For dissolved organic matter (DOM) in river water belonging to various biomes, it was suggested that black nitrogen (N) represents a major component of the heteroaromatic N based on the positive correlation between heteroaromatic N and black C concentrations.

Keywords: Aromatic carbon; Char; Degree of humification; DOM; Fulvic acids; Humic acids

1. はじめに

土壌有機物 (SOM) は、炭素 (C) や窒素 (N) の循環や土壌肥沃性の維持において主要な役割を担っている。SOMの動態あるいは機能を評価する上で、SOMの主要成分である腐植物質の化学構造を理解することは重要である。例えば、腐植物質の多様な代謝速度は、化学構造に基づく微生物分解に対する耐性と物理的あるいは化学的な保護に依存している。かつて、SOMは「栄養腐植」：微生物のエネルギー源や植物の養分源となる相対的に分解されやすい物質群、と「耐久腐植」：長く安定に滞留して土壌の物理性（保水性、通気性、硬度等）や化学性（養分保持能、緩衝能等）に寄与する物質群、に分けて考えられていたことがあり、その際、腐植物質は主な耐久腐植と位置づけられていた。しかしながら、生物遺体から生成した初期の腐植物質が高い耐久性をもっているわけではなく、微

小団粒内への隔離や粘土鉱物への結合などによって分解を免れることで、長い時間をかけての構造変化、相対的に分解されにくい構造の濃縮が可能になるものと推察される。

腐植物質の化学構造に起因する分解耐性を評価する上で鍵となるのは縮合芳香族構造であると予想される。本稿では、主に各種土壌から分離した腐植物質特にフミン酸中の縮合芳香族成分の実体を複数の手法を用いて分析した結果を紹介するとともに、想定される縮合芳香族構造の起源について論じる。また、河川水中の溶存有機物 (DOM) に含まれる芳香族N量とブラックカーボン (BC) 量との関係についても触れる。

2. フミン酸の黒色度

生物遺体等の非腐植物質からの腐植物質の形成は、古くから「腐植化」と呼ばれてきた。また、高分子を

想定した腐植物質中では、その構成成分（構造単位）の全てが生体中に見られないものではなく、糖やアミノ酸、リグニンを構成するフェノール化合物等が初期構造を維持したまま部分構造として存在していると考えられており、それらの割合が減少する、あるいは二次的に生成した構造の変成が進むことで、全体として起源物質から構造特性が遠ざかることを「腐植化の進行」という言葉で表してきた。しかしながら、腐植化およびその進行を具体的な化学構造によって示すことが困難なため、それらはフミン酸においてはしばしば黒色の程度で評価され、黒色度が「腐植化度」と呼ばれてきた。この評価法は、他の腐植物質画分には適用できない。

黒色度は、フミン酸を0.1 M NaOHに溶かした際の、単位C濃度当たりの可視部（600 nm）の吸光度（ A_{600}/C ；分子量が不明な腐植物質に対し、この値が“吸光係数”と表記されることもある）と縦軸を対数値とした場合にほぼ直線となる可視・紫外線吸収スペクトルの傾き（400 nmと600 nmの吸光度の比の対数値； $\log(A_{400}/A_{600})$ ）の2つの変数を用いて表す（Ikeya and Watanabe, 2003；溶媒や波長、表記法は研究者によって異なる場合がある）。すなわち、黒色度は A_{600}/C が高いほど高く、 $\log(A_{400}/A_{600})$ が低いほど大きい。各種土壌のフミン酸の黒色度は広い範囲に分布し、かつしばしば土壌分類と対応する。日本の国土の33%を占めるとされ、主に火山灰を母材とする黒ボク土、特にその埋没A層に含まれるフミン酸は黒色度が高いものが多い。一方、フミン酸の黒色度の経時変化は、毎年有機物が供給される環境では、新たに黒色度の低いフミン酸が生成するため検出されにくい。有機物供給のない室内土壌培養では、開始4年後にはいずれの温度でも黒色度の有意な増大が認められた（図1 a）。フ

ミン酸が分解する過程で可視部吸収を持たないか弱い成分が優先的に分解すれば黒色度は見かけ上増大するが、この試験の際には分解だけでは特に30°Cでの黒色度の増大を説明しきれなかったことから、暗色化が進行したと推察された。また、下層土壌（厚さ5 cm）から抽出したフミン酸をアセトン-0.01 M NaOH系を用いた分別沈殿（Kawasaki et al., 2015）により、黒色度が異なる画分へと細分画すると、黒色度と ^{14}C 年代との間に正の相関が認められる（図1 b）ことから、黒色度が高いほど土壌中で安定であることが分かる。

フミン酸中の脂肪酸やリグニン由来フェノール等の生体分子と共通する成分は一般的に黒色度の増大とともに減少する（図2；Ikeya et al., 2004）。一方、 ^{13}C NMRから求めた芳香族C%（全Cに占める割合）は A_{600}/C と正、 $\log(A_{400}/A_{600})$ と負の相関を示す（図3）。これらは、芳香族構造が黒色度に寄与していること、その際、リグニン残基のような単環構造は重要ではないことを示唆している。C組成と同様、フミン酸のN組成も黒色度と対応して遷移し、 A_{600}/C との間に芳香族N%は正、ペプチド/アミドN%は負の相関を示す（Abe and Watanabe, 2004）。後者は、黒色度が高いほどタンパク様物質の含有量が少ないことを意味する。以上のように、構造変化の指標として黒色度を使う合理性は、残存する生体分子が少ないことから説明され、また、フミン酸の黒色度と難分解性を評価する上で鍵となるのは単環ではなく縮合芳香族構造であることが推察される。

3. 腐植物質中の縮合芳香族構造

ここでは、腐植物質中の縮合芳香族構造に関する情報として、筆者らが行ってきた黒ボク土、褐色森林土、

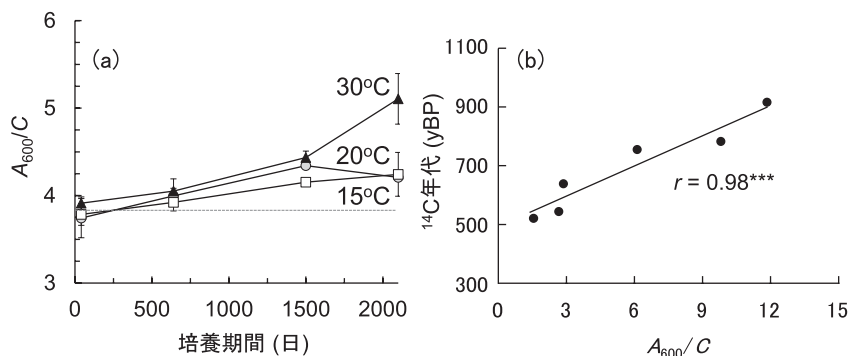


図1 (a) 褐色森林土の恒温培養におけるフミン酸の A_{600}/C の変化および (b) 埋没黒ボク土フミン酸細画分の A_{600}/C と ^{14}C 年代との関係。
(a) 中のバーは標準偏差 (n = 3)。

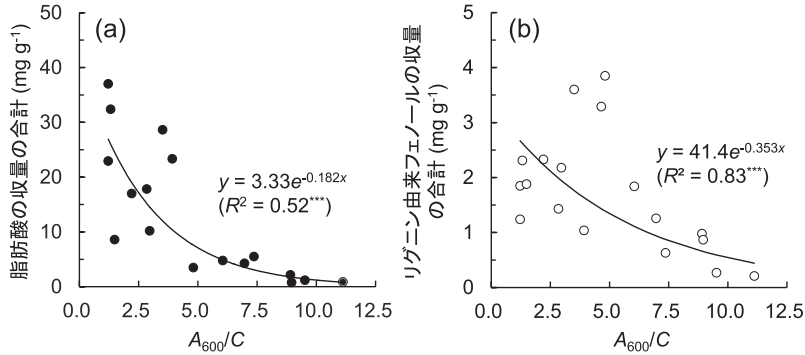


図2 フミン酸の黒色度と熱的支援加水分解およびメチル化GC/MSにおける (a) 脂肪酸類および (b) リグニン由来と推定されるフェノール類の収量との関係 (Ikeya et al., 2004 を改変)。

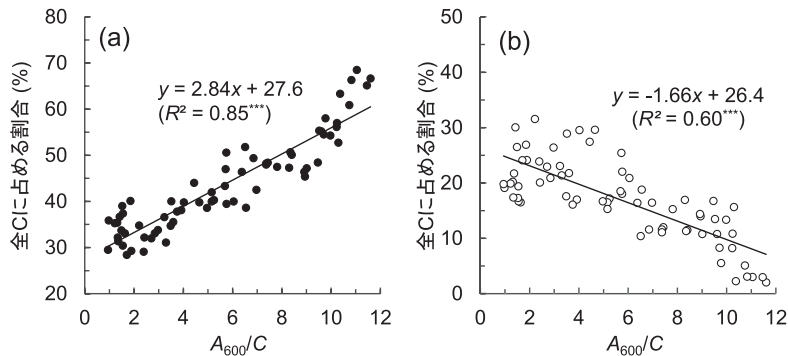


図3 各種土壌フミン酸の黒色度と¹³C NMRに基づく (a) 芳香族Cおよび (b) 脂肪族Cの相対含量との関係 (n = 72)。

沖積土など9～12土壌フミン酸と2～5土壌フルボ酸を用いた3種の方法、①四酸化ルテニウム (RuO₄) 酸化分解分析 (Ikeya et al., 2007)、②フーリエ変換イオンサイクロトロン質量分析 (FTICR-MS; Ikeya et al., 2012, 2015)、③X線回折 (XRD) 11バンドプロファイル分析 (Ikeya et al., 2011, 2012)、の結果を紹介する。

RuO₄酸化分解分析では、室温におけるRuO₄との反応によって縮合芳香環の外側に位置する環構造を開裂させる。分解生成物をメチル化後GC/MSおよびGCにより同定定量し、起源構造との関係に基づいて、縮合芳香環の種類と量を推定する (池谷・渡邊, 2007)。硝酸分解によるBCの定量 (Glaser et al., 1998) に似ているが、酸化分解法としてよりマイルドである。腐植物質からは2～6のカルボキシ基で置換された8種のベンゼンポリカルボン酸 (BPCAs) とカルボキシ基以外の側鎖も含む7種のBPCAsが検出され、ナフタレン (環数2) からコロネン (環数7) までの縮合芳香環の存在が推定された。フミン酸12試料に対して推定された縮合芳香族C量は3.8～35 mg C g⁻¹であ

り (図4)、黒色度 (A₆₀₀/C; r = 0.88***; 図5 a) および芳香族C含有率が高いほど大きかった。また、これらの値は¹³C NMRから推定した全芳香族Cの2～11% (図4) で、黒色度が低い試料では縮合芳香族C

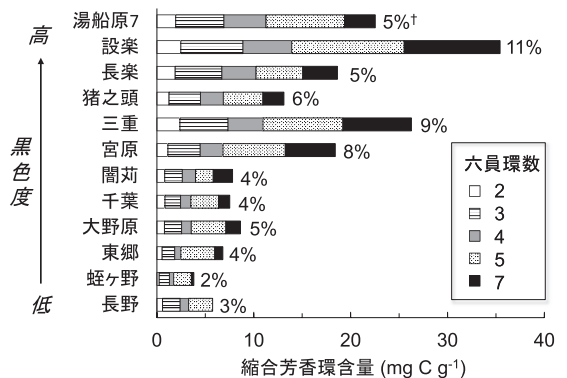


図4 フミン酸のRuO₄酸化分解で得られたBPCAsの収量から推定した縮合芳香環含量 (Ikeya et al., 2007をBPCA間のメチル化効率の違いを考慮して再計算した)。
† 全芳香族Cに占める割合。

量が小さいだけでなく、全芳香族Cに占める単環成分の割合が大きいことが示唆された。黒色度が高い試料でも、全芳香族Cに占める割合が10%前後にとどまったことより、この方法で検出できる上限（環数7）よりも大きい縮合芳香環の存在が推察された。

FTICR-MS分析では、最大6元素から構成される分子式 ($C_cH_hN_nO_oS_sP_p$) 800~2600が同定され、そのほとんどは、質量/電荷比 (m/z) 200~750に分布した。同定した分子式の原子数比H/CとO/Cを図 (van Krevelen図) にプロットし、既知の植物成分等の元素組成と比較したところ、黒色度の増大に伴って、リグニンと類似した分子式をもつピーク (リグニン様ピーク) 数が減少し、縮合芳香族類と推定されるピーク数が増大する傾向を示した。他の主要なピークは脂肪酸であり、フミン酸はこれら3グループの割合の違いによって特徴付けられる (DiDonato et al., 2016)。また、 m/z との関係から、リグニン様ピークはオリゴマーと予想される分子量の大きい成分がモノマーに相当する分子量の小さい成分より先に失われることが推察された。縮合芳香族様ピークの数124 (長野灰色低地土)

~1008 (設楽黒ボク土) で、それらのピーク強度の和は黒色度 (A_{600}/C , $r = 0.96$, $P < 0.005$; 図5b; $\log(A_{400}/A_{600})$, $r = -0.88$, $P < 0.005$) および芳香族C含有率 ($r = 0.78$, $P < 0.01$) との間に有意な相関を示した。また、 m/z が大きい領域の縮合芳香族様ピークの数および強度は、黒色度が高いフミン酸ほど大きかった。さらに、カルボキシ基を特徴的な官能基として行ったKendrick mass defect (KMD) 分析 (Kramer et al., 2004) において、31、73、39ピークがそれぞれ鎖型 (環数2~7)、網型 (環数3~10)、ピフェニル型 (環数2~6) 縮合芳香族酸である可能性が示された。それらの数もまた黒色度が高いフミン酸ほど多かった。

フルボ酸のFTICR-MS分析 (Ikeya et al., 2012) ではリグニン様ピーク、縮合芳香族様ピーク、タンニン様ピークが大部分を占めており、カルボキシ基に対して行ったKMD分析では環数2~7の縮合芳香族酸の存在が示唆された。

非晶質C物質のXRDプロファイルには、002、10、11と呼ばれる3つのバンドが認められ (図6)、その

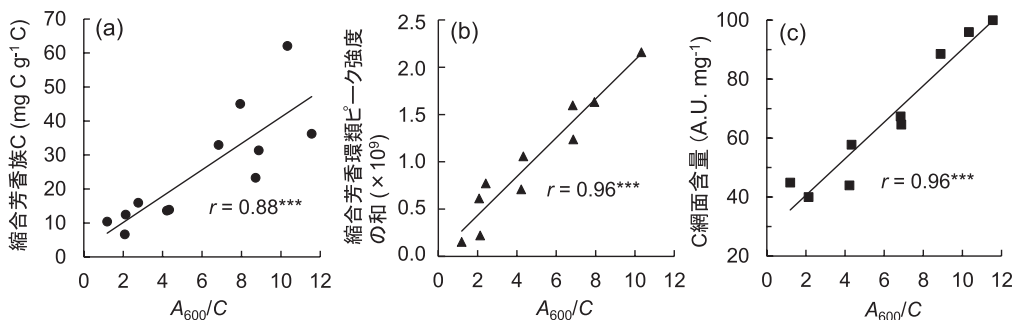


図5 (a) RuO_4 酸化分解分析、(b) FTICR-MS分析、(c) X線回折11バンドプロファイル分析によるフミン酸中の縮合芳香族成分量と黒色度との関係。A.U. = Arbitrary unit.

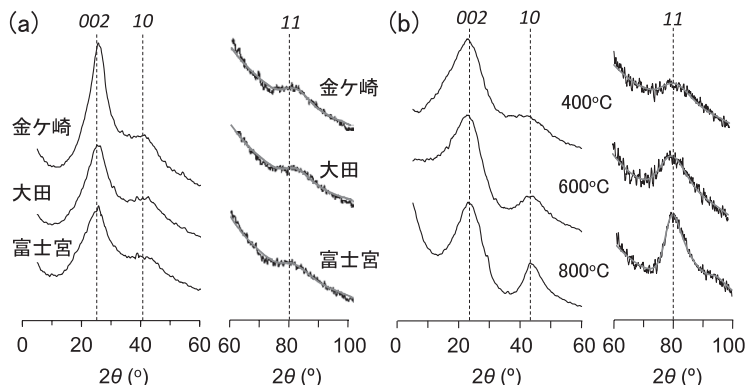


図6 (a) 3種の埋没A層土壌から分離した炭化物および (b) ニセアカシア材から異なる温度で調製したバイオ炭のX線回折プロファイル (Sultana et al., 2010; Lu et al., 2016)。11バンドは6倍に拡大してある。灰色の曲線はフィッティングで得た理論11バンド。
†加熱時間はいずれも1時間。

うち11バンドがC網面のサイズ分布の分析に利用できる。各試料の11バンドプロファイルを一連のC網面モデルの理論散乱プロファイルにフィッティングすることによりC網面のサイズ分布を求め、相対C網面含量を11バンド面積により比較した。フミン酸の11バンドは弱いものの2%以内の誤差でフィッティングが可能であったが、フルボ酸からは解析可能な強度の11バンドは検出されなかった (Ikeya et al., 2012)。土壌フミン酸9試料のXRD 11バンドプロファイル分析で得られたC網面サイズ分布は0.48~1.68 nm (環数4~37の縮合芳香環に相当する; 図7に例を示す) であった。したがって、土壌フミン酸中には一般的にRuO₄酸化分解分析やFTICR-MS分析では検出できない大きな縮合芳香環が存在していると考えられる。また、C網面の平均サイズおよび相対含量はいずれも黒色度が高いフミン酸ほど高かった。相対含量には最大2.5倍の差が認められ (図5c)、よりサイズが大きいC網面において試料間差が顕著であった。

残念ながら、ここで紹介した3種の結果を直接比較することはできないが、全ての結果は黒色度と縮合芳香環含量との間に正の相関が存在することを示した。有意な正の相関は芳香族C含量との間にも認められたが、相関係数は常に黒色度と比較して低かった。また、図5からは分からないが、縮合芳香環含量の増大とともに縮合芳香族構造の組成がよりサイズの大きい方向へ拡大する傾向も認められた。

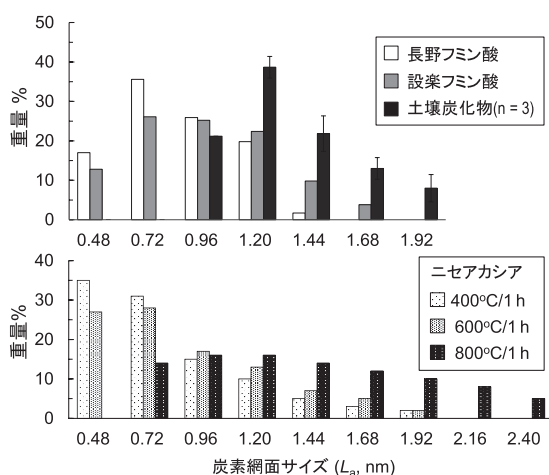


図7 フミン酸と埋没土壌から分離した炭化物 (上段) およびニセアカシア材から異なる温度で調製した炭化物 (下段) のC網面サイズ分布の比較 (Sultana et al., 2010; Ikeya et al., 2012; Lu et al., 2016)。

土壌炭化物の値は3土壌の平均値。バーは標準偏差。

4. 縮合芳香族構造の起源

腐植物質中の縮合芳香族構造は、環境中で熱的・非熱的反応により生成するか微生物が生産する色素に由来すると推察される。熱的に生成した縮合芳香環を腐植物質の構成成分とすることには異論もあろうが、日本では、黒色度の高いフミン酸を多量に含む黒ボク土の存在により、以前から想定されてきた (進藤, 2013)。常温での生成に関しては、例えば、Waggoner et al. (2015) がリグニンをフェントン反応によって生成するヒドロキシラジカルに曝露することで、FTICR-MSにおいて縮合芳香族様ピークとして検出される構造が有意に形成されることを示しており、フルボ酸やDOMから検出される8環程度までの縮合芳香環であれば、リグニンだけでなくタンニン等生物由来の芳香族化合物から常温で生成しうると考えられる。ここでは植物炭化物と糸状菌が生成する4,9-dihydroxyperylene-3,10-quinone (DHPQ) 誘導体に着目する。後者は様々な土壌のフミン酸から検出されるが、元々ポドゾル中のフミン酸から見つかったもので、色素の影響が可視・紫外線吸収スペクトルに有意に現れることで、 $A_{600}/C - \log(A_{400}/A_{600})$ 図において他のフミン酸とは異なる領域に分布することからP型とされ、色素はアルカリ性で緑色を呈するためPgと命名された (Sato and Kumada, 1967)。

図6は、土壌からHF-HCl処理と重液処理によって分離した炭化物 (Sultana et al., 2010) とニセアカシアから異なる温度で調製したバイオ炭 (Lu et al., 2016) のXRDプロファイルであり、後者の結果からより高温で調製したバイオ炭ほど11バンドが強い、すなわちC網面が発達していることが分かる。図7上段では、2種の土壌フミン酸と3土壌から分離した炭化物および異なる温度で調製したバイオ炭のXRD 11バンドプロファイル分析に基づくC網面サイズ分布を比較している。土壌炭化物のC網面サイズは0.96~1.92 nmに分布し、環数14~52の縮合芳香環に相当した。これらの知見は、炭化物がフミン酸中のサイズが大きい縮合芳香族成分の主起源である可能性を示唆している。一方、図7下段に示したバイオ炭の分析結果では、調製温度が400°Cと600°Cの場合には、最大C網面サイズが土壌炭化物と同じであったのに対し、土壌炭化物からは検出されなかったサイズの小さいC網面も検出された。もし、土壌炭化物も生成当時はサイズの小さいC網面を含んでいたとすると、それらはサイズの大きい成分よりも早く失われたと予想されるが、酸化分解過程でその一部がフミン酸の構成成分となった可能

性もありうる。ただし、熱的に生成した縮合環と常温で生成した他の成分がどのように結合しているのかは今のところ不明であり、別々に存在している（炭化物物を含む）可能性を含め、今後の課題である。

黒ボク土断面の分析では、フミン酸の黒色度や芳香族C含有率はしばしば堆積初期2,000~3,000年の間に増大する (Watanabe and Takada, 2006)。湯船原 (静岡県) 断面中の最下層埋没腐植層である湯船原7 (10,000 yBP) から抽出したフミン酸は、FTICR-MSやX線回折11バンド分析に基づく縮合芳香族成分含量 (図5、 $A_{600}/C = 11.6$) が各種表層土壌中のフミン酸よりも高く、微生物の活性や環境条件が表層とは異なるとはいえ、それらが他の成分よりも土壌中で安定であることが推察できる。湯船原断面では、表層から3,000 yBPの層にかけてBC含有率も増大し、以深の層のBC含量はフミン酸の芳香族C量の3~4倍高いため、フミン酸中の縮合芳香族Cの給源として十分な量であると考えられる。一方、湯船原7層中のフミン酸とヒューミンの ^{13}C NMRスペクトルを比較すると、ヒューミンではアルキルC、*O*-アルキルCのシグナルが顕著に認められ、脂肪族成分が物理的あるいは化学的保護を受けて残留していることが推察された (杉浦ら, 2015)。このことは、 ^{13}C NMRだけでは判別はつかないが、生物由来の芳香族Cにも類似の保護を受けて残留しているものが存在する可能性を示唆している。

Pgは、燕 (新潟県) 埋没腐植層から抽出したフミン酸からSephadex G-50を用いて精製し、FTICR-MS分析に供した (Ikeya et al., 2013)。図8は燕フミン酸と精製時に得られた2つのPg画分 (G1、G2) の可視・紫外線吸収スペクトルとFTICR-MS分析に用

いたG2の ^1H および ^{13}C NMRスペクトルであり、Watanabe et al. (1996) は、NMRの結果よりG2中のCの28%がDHPQに由来すると推定している。DHPQを含む色素を生産する微生物としては、菌根菌である*Cenococcum*がよく知られており、色素はその耐久形態である菌核中に見出される。生存環境の悪化などによって菌核が形成された後、事態が好転せず、微生物が死ぬと、色素も分解されてフミン酸から見つかるようになると推察される。Pgを含むフミン酸は、ロシア、英国、米国、インドネシア、ニュージーランド等様々な国の土壌から検出されている (Kumada, 1987)。

燕PgのFTICR-MS分析では、DHPQおよびその誘導体と推定される27以上の成分が検出され (図9)、分子式が同定された全ピーク強度の和の40%を占めた。重要な点は、それらのうち26ないし27ピークは同時に解析したPgによる特異的な吸収を示さない3土壌のフミン酸からも検出されたことである。それらのフミン酸において、Pgに関連するピークは、他の縮合芳香族様ピークよりも強度が強く、その和は同定された全ピーク強度の和の1.0~1.5%を占めた。これらのことは、土壌微生物が産生した着色化合物が腐植物質中の縮合芳香族構造の起源として重要であることを強く示唆している。

5. 河川水中にDOMとして存在する芳香族N濃度とBC濃度との関係

縮合芳香族構造はDOM中にも存在する。異なる気候区分、生物群系に属する6河川水から限外濾過 (>

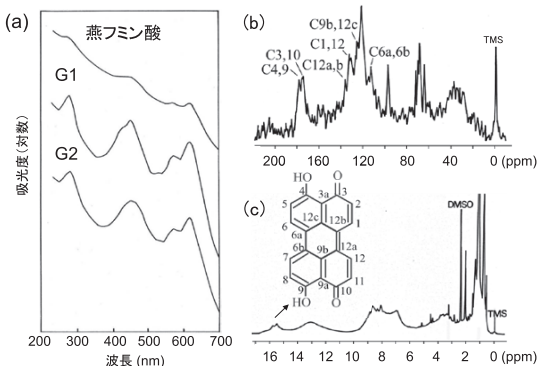


図8 (a) 燕P型フミン酸と同試料から分離したPg (G1およびG2) の可視・紫外線吸収スペクトル、(b) G2の ^{13}C NMRスペクトルおよび (c) G2の ^1H NMRスペクトル (Watanabe et al., 1996)。TMS = trimethylsilane; DMSO = dimethylsulfoxide。

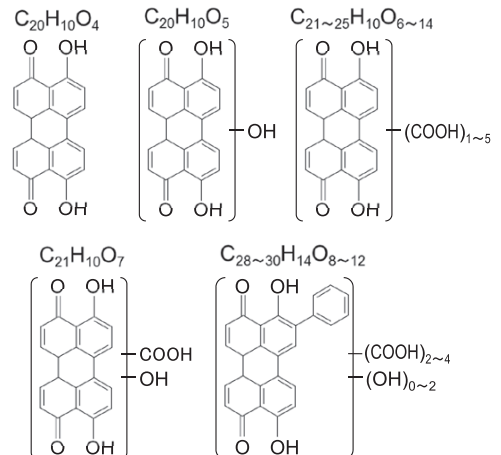


図9 燕Pg (G2) のFTICR-MS分析において検出されたDHPQおよびその誘導体の例 (Ikeya et al., 2013)。

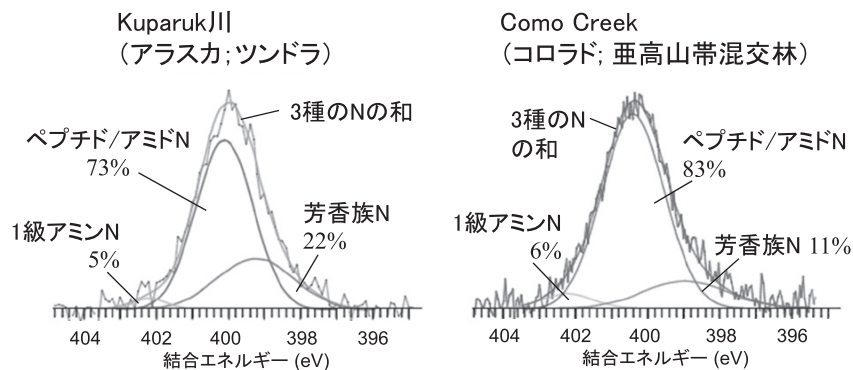


図10 河川水中のDOMのXPS N1s スペクトルおよびその波形分離の例 (Jaffe et al., 2012)。数字は各Nが全Nに占める割合。

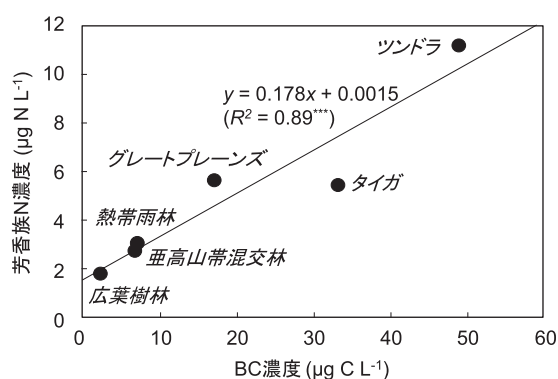


図11 各種生物群系に属する河川水中にDOMとして存在しているBC濃度と芳香族N濃度との関係 (Ding et al., 2014)。

1 kDa) によってDOM (UDOM) 試料を精製し (Jaffé et al., 2012)、XPS N 1s スペクトルから推定した全Nに占める芳香族Nの割合 (芳香族N%; 図10) とBC含量との関係を解析した (図 11)。BC含量は硝酸分解で得られるBPCAsの定量から推定した (Ding et al., 2012)。UDOM中の芳香族N%は11~22%で、しばしば黒色度の高いフミン酸中の芳香族N%に匹敵する高い値を示した。また、それらの値を河川水中の濃度に換算すると1.8~11 $\mu\text{g N L}^{-1}$ であり、BC濃度 (2.3~49 $\mu\text{g C L}^{-1}$) との間に有意な正の相関を示した。これらの結果は、UDOM中の芳香族NとBCとの関連を示唆しており、高い芳香族N%には‘ブラックN’が寄与していると考えられた。その後、Wagner et al. (2015) は、土壌水抽出液中のDOMをFTICR-MSを用いて分析し、Nを含む縮合芳香族化合物が一般的に数百以上含まれていることを示し、炭化物の風化過程で溶けやすくなったもの等が陸域から河川に溶出し

ている可能性を示唆した。

謝辞

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金 (Nos. 18510010、19405021、20380043、23310005、23405047、16H04890) による支援を受けて行われた。

引用文献

- Abe, T. and Watanabe, A. (2004) X-ray photoelectron spectroscopy of nitrogen functional groups in soil humic acids. *Soil Sci.* 169, 35–43.
- DiDonato, N., Chen, H., Waggoner, D. and Hatcher, P. G. (2016) Potential origin and formation for molecular components of humic acids in soils. *Geochim. Cosmochim. Acta* 178, 210–222.
- Ding, Y., Yamashita, Y., Dodds, W. and Jaffé, R. (2012) Dissolved black carbon in grassland streams: Is there an effect of recent fire history? *Chemosphere* 90, 2557–2562.
- Ding, Y., Watanabe, A. and Jaffé, R. (2014) Dissolved black nitrogen (DBN) in freshwater environments. *Org. Geochem.* 68, 1–4.
- Glaser B., Haumaier L., Guggenberger G. and Zech W. (1998) Black carbon in soils: the use of benzenecarboxylic acids as specific markers. *Org. Geochem.* 29, 811–819.
- Ikeya, K. and Watanabe, A. (2003) Direct expression of an index for the degree of humification of humic acids using organic carbon concentration.

- Soil Sci. Plant Nutr.* **49**, 47–53.
- Ikeya, K., Yamamoto, S. and Watanabe, A. (2004) Semiquantitative GC/MS analysis of thermochemolysis products of soil humic acids with various degrees of humification. *Org. Geochem.* **35**, 583–594.
- 池谷康祐・渡辺 彰 (2007) ルテニウム四酸化物酸化分解分析. 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」, p. 130–138, 三恵社, 名古屋.
- Ikeya, K., Ishida, Y., Ohtani, H., Yamamoto, S. and Watanabe, A. (2007) Analysis of polynuclear aromatic and aliphatic components in soil humic acids using ruthenium tetroxide oxidation. *Eur. J. Soil Sci.* **58**, 1050–1061.
- Ikeya, K., Hikage, T., Arai, S. and Watanabe, A. (2011) Size distribution of condensed aromatic rings in various soil humic acids. *Org. Geochem.* **42**, 55–61.
- Ikeya, K., Sleighter, R. L., Hatcher, P. G. and Watanabe, A. (2012) Compositional features of Japanese Humic Substances Society standard soil humic and fulvic acids in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and X-ray diffraction profile analysis. *Humic Sub. Res.* **9**, 25–33.
- Ikeya, K., Sleighter, R. L., Hatcher, P. G. and Watanabe, A. (2013) Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometric analysis of the green fraction of soil humic acids. *Rap. Commun. Mass Sp.* **27**, 2559–2568.
- Ikeya, K., Sleighter, R. L., Hatcher, P. G. and Watanabe, A. (2015) Characterization of the composition of soil humic acids using Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Geochim. Cosmochim. Acta* **153**, 169–182.
- Jaffé, R., Yamashita, Y., Maie, N., Cooper, W. T., Dittmar, T., Dodds, W., Jones, J., Miyoshi, T., Ortiz-Zayas, J. R., Podgorski, D. C. and Watanabe, A. (2012) Dissolved organic matter in headwater streams: compositional variability across climatic regions. *Geochim. Cosmochim. Acta* **94**, 95–108.
- Kawasaki, S., Ikeya, K., Sugiura, Y. and Watanabe, A. (2015) Changes in the composition of humic acids in various upland field soils with a continuous organic amendment as revealed by fractional precipitation analysis. *Soil Sci. Plant Nutr.* **61**, 450–460.
- Kramer, R. W., Kujawinski, E. B. and Hatcher, P. G. (2004) Identification of black carbon derived structures in a volcanic ash soil humic acid by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 3387–3395.
- Kumada, K. (1987) *Chemistry of Soil Organic Matter*, 241 pp., Elsevier, Amsterdam.
- Lehmann, J. and Kleber, M. (2015) The contentious nature of soil organic matter. *Nature* **528**, 60–66.
- Lu, G.-Y., Ikeya, K. and Watanabe, A. (2016) Size distribution of carbon layer planes in biochars from different plant type of feedstock with different heating temperatures. *Chemosphere* **163**, 252–258.
- Sato, O. and Kumada, K. (1967) The chemical nature of the green fraction. *Soil Sci. Plant Nutr.* **4**, 121–122.
- 新藤晴夫 (2013) 黒色土壌有機物の生成・蓄積における植物炭化物の役割. 日本土壌肥料学会編「土と有機物—炭素の隔離と貯留」, p. 58–103, 博友社, 東京.
- 杉浦幸希・渡邊 彰 (2015) ¹³C CP/PASS NMRによる各種土壌ヒューミンの構造特性評価. 日本腐植物質学会第31回講演要旨集, 39–40.
- Sultana, N., Ikeya, K., Shindo, H., Nishimura, S. and Watanabe, A. (2010) Structural properties of plant charred materials in Andosols as revealed by X-ray diffraction profile analysis. *Soil Sci. Plant Nutr.* **56**, 793–799.
- Waggoner, D. C., Chen, H., Willoughby, A. S. and Hatcher, P. G. (2015) Formation of black carbon-like and alicyclic aliphatic compounds by hydroxyl radical initiated degradation of lignin. *Org. Geochem.* **82**, 69–76.
- Wagner, S., Dittmar, T. and Jaffé, R. (2015) Molecular characterization of dissolved black nitrogen via electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Org. Geochem.* **79**, 1480–1489.
- Watanabe, A., Fujimori, H., Nagai, Y., Miyajima, T. and Kuwatsuka, S. (1996) Analysis of the green fraction of humic acids. *Eur. J. Soil Sci.* **47**, 197–

204.

Watanabe, A. and Takada, H. (2006) Structural stability and natural ^{13}C abundance of humic acids in buried volcanic ash soils. *Soil Sci. Plant Nutr.* **52**, 145–152.

