

## フルボ酸のゲルクロマトグラフィー

## Gel Chromatography of Fulvic Acid

齊藤喜二\*・早野茂夫\*

Yoshiji SAITO Shigeo HAYANO

自然環境中に存在する有機物は多くの種類の有機物から構成されているが、その主要な成分はフミン物質であるといわれている。フミン物質は別名腐植物質ともいわれ、生物体を構成する有機物が分解する過程で形成され、微生物に対し著しい抵抗性を示す一群の難分解有機物の総体である。ピート、腐食土、泥炭などの主成分はフミン物質であるといわれている。フミン物質は、一般に、アルカリ溶液中での挙動に基づいて分類され、最も簡単に分類すると次の三つに分けられる。(1)フミン酸(humic acid) - 希アルカリに溶解するが希鉱酸で酸性化した時沈殿するフミン物質、(2)フルボ酸(fulvic acid) - 希アルカリに溶解し酸性にもどした時沈殿せずに溶存しているフミン物質、(3)フミン物質(humin) - 希アルカリ及び希鉱酸に溶解しないフミン物質。以上の操作は、フミン物質の大部分がCa, Fe, Al, Mgなどの無機成分と不溶性の金属錯体を形成していると考えられるのでpHを上げて錯体を解離させフミン物質を抽出分離することに基づいている。海洋の有光層に存在する有機物の比率は、溶存有機物を100とすると、懸濁態有機物10、植物プランクトン0.2、魚0.002となり、海洋中に有機物の大部分は溶存有機物(Dissolved Organic Matter、略してDOMともいわれる)である。外洋水中に存在する溶存有機物起源はほとんど植物プランクトンに由来する。この溶存有機物の生分解速度の研究によると溶存有機物の約50%は安定で微生物により分解されにくいフラクションである。海洋の深さ約500m以深の溶存有機物は濃度がかなり一定(約0.5mgC/l)であり、大部分が生分解しない。これら安定な有機物はmarine humusあるいはwater humusと呼ばれ、海底沈積物から抽出したフミン物質、特にフルボ酸と密接な関係にあるのは疑いない。しかし、これらの海洋フミン物質の化学的及び物理的特性、化学構造などは現在のところ事実上未知である。

近年石油の流出事故が相つぎ、海洋に流出した石油系汚染物の挙動が注目されている。Boehm<sup>1)</sup>らの研究によると、海中に溶存している有機物はそれがない場合に比べてn-アルカン(n-C<sub>16</sub>及びn-C<sub>20</sub>)の溶解度を著しく増加させた。一方海底の沈積物からアルカリ抽出したフルボ酸塩溶液も同様にn-アルカンの溶解度を著しく増加させた。しかし、芳香族化合物(アントラセン、

フェナントレン、ジブチルフタレート)の溶解度には両者とも影響を及ぼさないことを示した。n-アルカンの場合、フルボ酸モノマーが塩の存在下でミセルを形成し、疎水性物質を可溶化していると考えられる。海洋の溶存有機物やフルボ酸は疎水性有機汚染物の分散、輸送、沈殿に重要な役割を果たしている。また、石油の起源及び蓄積にも深い関係があるともいわれている。われわれの研究室では海底沈積物からアルカリ抽出したフルボ酸が石油系汚染物の溶解度に及ぼす影響について研究している。並行して海洋フミン物質のキャラクタリゼーションを総合的に行っているが、その一環としてゲルクロマトグラフィーを用いて、フルボ酸の分子量分布の測定、分子量に基づく分画、種々の溶液条件下における溶存状態に関する研究を行っているのでその概要をここに報告する。

## フルボ酸のゲルクロマトグラフィー

ゲルクロマトグラフィーは分子のサイズにより分画するクロマトグラフィーであり、簡単で極めて有効な方法である。広い分子量分布をもつ天然起源の物質の分離、精製、分画に用いられ大いに成果をあげている。ゲルクロマトグラフィーの技術はフミン酸やフルボ酸のような化学的に密接な関係があり、巨大な分子量範囲をもつ多分散性化合物に用いると理想的である。フルボ酸のような多分散性化合物の特性は分子量とともに変わるから、分子量の違いにより分画し、それぞれのフラクションについて研究を行うことが重要となる。

今までの研究で用いられたゲルはほとんどセファデックスゲルであり、フミン物質の分画にこのゲルを用いると必ず吸着現象が起こると報告されている。フルボ酸はフミン化初期生成物あるいはフミン酸の分解物と考えられ、フミン酸と化学構造上かなり類似しているため、セファデックスゲルで分画する場合、ある程度の吸着が起こるものと推測できる。E. T. Gjessing<sup>2)</sup>は天然水中のフミン物質の分子量決定にセファデックスゲルG-200, G-100, G-75, G-50, G-25を用いて蒸留水で展開した。G-200, G-100, G-75を用いた場合、分配係数 $K_d$ が0~1の間で溶出したがG-50, G-25を用いた場合、フミン物質はゲル基質に不可逆な吸着を起こし、分画に失敗した。架橋度はG-200~G-25の順に大きくなり、ゲル上に存在する孔径は小さくなり、分画できる分子は小さくなる。明らかに吸着は架橋度の

\*東京大学生産技術研究所 附属計測技術開発センター

大きなゲルに対し著しい。DetermannとWalter<sup>3)</sup>は、セファデックスゲルとフェノール性化合物の親和力はセファデックスゲルのデキストラン部分よりむしろ架橋部分のエーテル結合と芳香環のπ電子に関連していることを示した。フミン酸やフルボ酸をセファデックスゲルで分画する場合、次に問題となるのはクーロン力による排除効果である。セファデックスゲルは架橋したデキストラン連鎖に微量のカルボキシルを含んでいるためゲルは負の電荷を帯び、溶質が正あるいは負に帯電している場合種々のイオン効果を引き起こす。酸のような負に帯電した分子は反発力を受け、ゲル粒子の孔の中に深く浸入することができず、溶出が早まり、実際より大きな分子としての溶出挙動を示す。逆に塩基のような正に帯電した分子は引力により溶出は遅れる。このイオン効果は架橋度が大きくなるに従い著しくなる。特に、イオン交換水を用いて溶離する場合、イオン効果はさらに大きくなりゲルは弱陽イオン交換樹脂として働き陽イオンは吸着され、陰イオンはゲル粒子の孔の中に入ることができず完全に排除される。このイオン効果は溶離液として0.02以上のイオン強度を持つ電解質溶液を用いれば除去されるといわれている。しかし、芳香族化合物やフェノール性化合物は電解質を含む溶離液で展開すると吸着が増加することが知られている<sup>4)</sup>。また吸着を引き起こす可能性のある部分を遮蔽する目的で、溶離液に芳香族化合物である0.2Nのサリチル酸ナトリウムを加えても効果がない<sup>5)</sup>。

以上のように、フミン酸やフルボ酸のような負に帯電し、芳香環をもつ物質をセファデックスゲルを用いて分子量の違いだけで分画するためには、イオン効果と吸着効果を同時に除去しなければならない。A. M. Posner<sup>6)</sup>はセファデックスゲルを用いてフミン酸の分画を行った。彼の方法は“Salt Boundary Technique”と呼ばれ、フミン酸試料に電解質(0.2Nの塩化アンモニウム)を添加し蒸留水で展開した。しかし、分子量の違いに基づいて溶離したという確かな証拠はない。R.S. SwiftとA. M. Posner<sup>7)</sup>は種々の溶離液系を用いてフミン酸の溶出挙動を研究し、大きなアンモニウムカチオンを含むアルカリ緩衝溶液を用いて展開すると分子量の違いだけに基づく溶出を行えたとした。

実験および考察

フルボ酸試料は1975年9月27日京浜工業地帯沿岸近くの緯度35°27'34" 経度139°38'42"の地点の深度5~6mの海底の表層(0~15cm位)から円筒形の鉄製採泥器を用いて採取した沈積物をアルカリ処理することで抽出した。抽出操作は次の如く行った。約250g(wet weight)の沈積物を1ℓのビーカーに取り、0.5NのNaOH水溶液を0.5ℓ加え、室温で、マグネチックスターラーを用いて24時間攪拌した。攪拌後、ろ紙でろ過し固形物を

除去した。さらにろ液をガラスろ過器26G5を用いてろ過し黒褐色の溶液を得た。この溶液に1.0NのHClを加えpH 2.2にすると黄褐色のフミン酸が沈殿した。再びガラスろ過器26G5を用いてフミン酸を除去し、ろ液に1.0NのNaOHを加えてpH 7.0に調整した。この溶液が今回の実験に用いたフルボ酸であり、淡黄色を呈していた。なお、フルボ酸試料及び採取した沈積物は冷蔵庫の中で5℃前後の温度で保存した。このフルボ酸は脱塩及び精製を行っていないが紫外吸収や赤外吸収のスペクトルパターンは一般に報告されている土壌から抽出したフルボ酸のそれに類似していた。

一般にゲルクロマトグラフィーではゲル床の全容積 $V_t$ は式(1)のように表わせる。

$$V_t = V_o + V_i + V_g \dots\dots\dots (1)$$

ただし、 $V_o$ :ゲル粒子間の溶媒の容積

$V_i$ :ゲル粒子内部の溶媒の容積

$V_g$ :ゲル基質の容積

また、溶質の溶出容積 $V_e$ は分配係数 $K_d$ を用いて式(2)のように表わせる。

$$V_e = V_o + K_d V_i \dots\dots\dots (2)$$

したがって $K_d$ は式(3)のように表わせる。

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i} = \frac{V_e - V_o}{(V_o + V_i) - V_o} \dots\dots\dots (3)$$

用いたゲルはセファデックスゲルG-25 fineである。このゲルの分画可能な分子量範囲はペプチド及び球状タンパク質で1,000~5,000、デキストランで100~5,000といわれている。 $V_o$ を求めるためにBlue Dextran (MW=200万)を用いた。 $(V_o + V_i)$ を求めるためにアセトン(MW=58)、DNP-アラニン(MW=256)、オレンジG(MW=452)を用いたがDNP-アラニン、オレンジGは芳香環を含むため、溶離液の違いにより吸着効果あるいはイオン効果が著しく低分子量マーカーとして不適当であった。カラムはPharmacia製のガラスカラムK16/60を用いた。このカラムは内径16mm長さ60cmであり、両端にフローアダプターを付け長さが調節できる。ゲルの高さを38.7cmとしたので全ゲル床体積は77.8cm<sup>3</sup>である。溶離液の流速は0.454cc/minとし一定に保った。溶離液として0.25MのLiCl水溶液、純水、トリス緩衝液(トリアミノメタン50.2gと1Mの塩酸50mlに水を加え1ℓにしたもので、pHは9.15であった)を用いた。フルボ

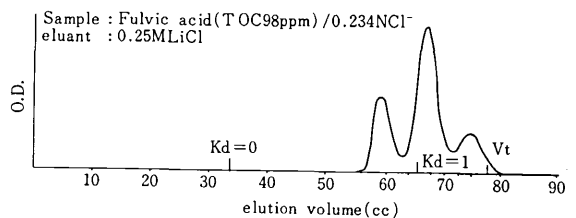


Fig.1-(a)

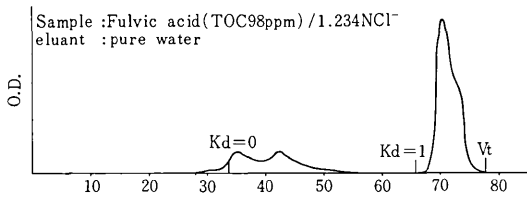


Fig. 2-(a)

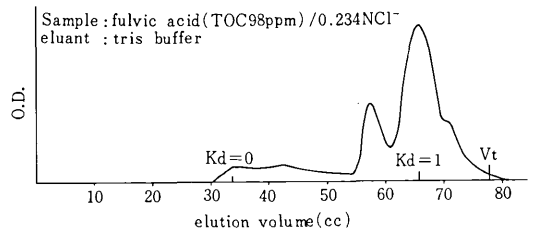


Fig. 3-(a)

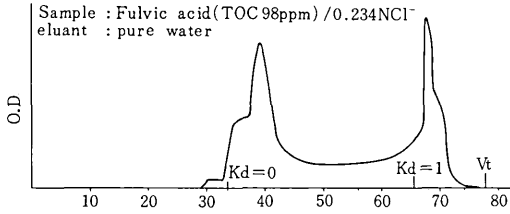


Fig. 2-(b)

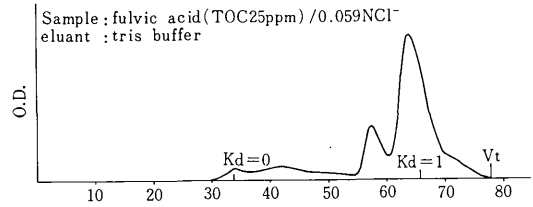


Fig. 3-(b)

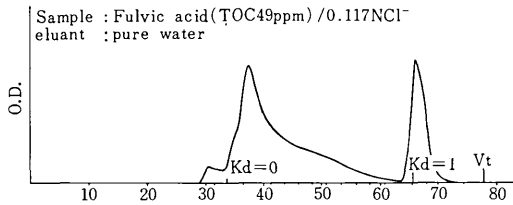


Fig. 2-(c)

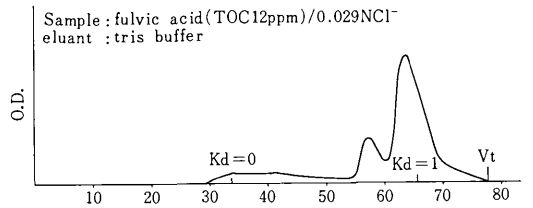


Fig. 3-(c)

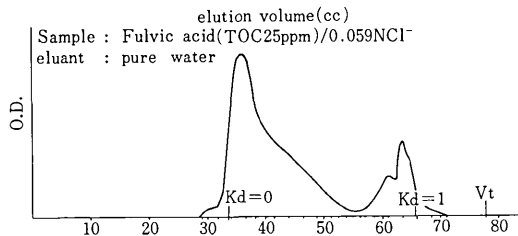


Fig. 2-(d)

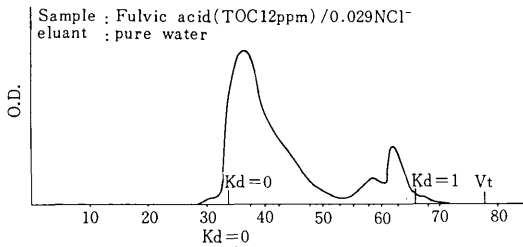


Fig. 2-(e)

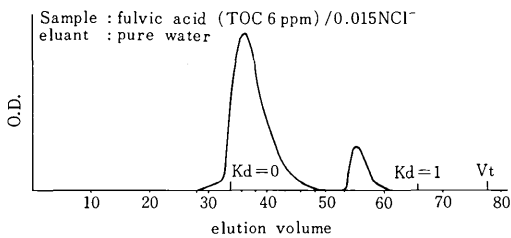


Fig. 2-(f)

酸原液の全炭素量, 無機炭素量, 有機炭素量は全有機炭素 (TOC) 分析計で決定され, それぞれ, 135 ppm, 37 ppm, 98 ppm であった. 塩素イオン濃度は銀滴定で決定され 0.234 N であった. フルボ酸試料はそのままあるいは水で希釈して用いた. 試料の添加量は 0.45 cc あるいは 0.23 cc である. 検出は日本分光製の紫外分光計 UVIDEC 100 型を用いた. 検出波長は 225 nm である. 分子量の違いだけに基づく分画を行うためには次の条件を満たすことが必要である. (1) 溶質の溶出容積が溶質濃度や流速に依存しない. (2) 溶出物のすべて (最後のピーク) が少なくとも全カラム容積  $V_t$  の内部で溶出される. Fig. 1-(a) は溶離液として 0.25 M の LiCl 水溶液で展開した時のクロマトグラムである. 他のクロマトグラムと較べて溶出が遅れ排除領域に全くピークが見られずほとんどが分画限界の低分子量側に溶出している. この理由として比較的高い濃度の電解質溶液を溶離液として用いたため, イオン効果は除去できたが, 同時に, ゲルの水和水もある程度脱水されたと考えられる. このため, フルボ酸分子はゲル基質により接近し, 疎水部分との相互作用, あるいはゲル基質とフルボ酸分子に存在すると考えられる芳香環の  $\pi$  電子に基づく吸着力が増加したと推測できる. イオン効果と吸着効果が等しくなる電解質濃度を定めることは困難である. Fig. 2-(a)-(f) は電解質を含む試料を純水で溶離した時のクロマトグラムである. (a) はフルボ酸試

料(全有機炭素98ppm, 塩素イオン濃度 0.234 N)に NaCl を加えて, 塩素イオン濃度 1.234 Nにし, 全有機炭素は98ppmの試料のクロマトグラムである。(b)はフルボ酸試料そのままを用いた時のクロマトグラムである。(c)~(f)はフルボ酸試料に純水を加え, 倍々に希釈した試料のクロマトグラムである。この方法は Posner<sup>6)</sup> の "Salt-Boundary Technique" に対応する。この方法で展開した時に示す挙動は一般的に高分子量側と低分子量側の二つに大きなピークがあらわれることが知られている。試料濃度が減少するにつれて早く溶出する傾向を示し全体的に高分子量側にシフトする。この理由として, 試料の濃度が減少するにつれてイオンによる遮蔽効果は減少する。フルボ酸分子とゲル上の電気二重層は溶液内部に伸び, その結果, 有効溶質分子の大きさは大きくなり, ゲルの有効な孔の大きさは小さくなり, フルボ酸の溶出が早まると考えられる。試料濃度により溶出パターンが変化するので妥当な方法とはいえない。Fig.3-(a), (b), (c)は溶離液としてトリス緩衝液を用いて展開した時のクロマトグラムである。(a)はフルボ酸試料(TOC 98ppm, 塩素イオン濃度 0.234 N)のクロマトグラムであり, (b)は純水で4倍に, (c)は8倍に希釈した試料のクロマトグラムである。試料濃度が変化してもクロマトグラムは大きな変化を受けないしゲルクロの条件を満たしているので, 他の場合と較べてより明確に分子量の違いで分画できたといえる。球状タンパク質とフルボ酸がセファデックスゲルに対して

同じ溶出挙動を考えると, 球状タンパク質あるいはペプチドの分子量の対数と溶出溶積に関し直線関係が成立するとして, フルボ酸の分子量は1,000付近及びそれ以下が大部分を占め,  $K_d = 0.75$ 付近に中位のピーク(1,500位か)が見られるが, 他は5,000以上及び5,000~1,000の分子が連続的存在すると考えられるがこれだけでは確かなことはいえない。今後の課題として, 透析法によるフルボ酸溶液の脱塩及び精製, 蒸気圧測定による平均分子量の測定, セファデックスゲルG-15及びG-50の使用, 分子量既知のフルボ酸類似分子の溶出挙動との比較, 他の溶離液系やゲルの使用, 採取地点が異なる場合の地域特異性, 抽出条件及び方法の違いによる分子量分布の変化などが挙げられる。(1977年1月10日受理)

#### 参 考 文 献

- 1) P. D. Boehm and J. G. Quinn, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **37**, 2459 (1973)
- 2) E. T. Gjessing, *Nature*, **208**, 1091 (1965)
- 3) Determann and Walter, *Nature*, **219**, 604 (1968)
- 4) B. Gelotte, *J. Chromatog.*, **3**, 303 (1960)
- 5) J. Porath, *Biochem Biophys. Acta*, **39**, 193 (1960)
- 6) A. M. Posner, *Nature*, **198**, 1161 (1962)
- 7) R. S. Swift and A. M. Posner, *Soil Science* **22**, 237 (1971)

