

ゲル濾過法によるフルボ酸の分画とそのキレート能について

山田秀和・米林甲陽・服部共生・森田修二

HIDEKAZU YAMADA, KOYO YONEBAYASHI, TOMOO HATTORI
and SHUJI MORITA

Fractionation of fulvic acids by gel filtration and their chelating ability.

要旨：Sephadex G-25 を用いるゲル濾過法で、土壤腐植のフルボ酸の分画とそのキレート能について二、三の検討を行なった。その結果、フルボ酸は分子量5000以上の高分子画分と、分子量5000以下の低分子画分から構成されており、ほとんどが低分子画分で構成されている事が示された。またフルボ酸には、糖に由来する還元性の低分子物質以外に高分子画分中にも多量の還元末端をもつ物質群が含まれる事が認められた。

Cu, Zn, Mn との反応性について検討した結果、フルボ酸は、 $Cu > Zn > Mn$ の強さの順位で金属と反応し、かつその反応は低分子画分に限られた。また赤外吸収スペクトルを用いて、フルボ酸と金属との結合形式を検討した結果、この反応は、フルボ酸のカルボキシル基を配位基とするキレート反応であると推定された。そして土壌の違いによるフルボ酸の金属との反応性の差異を、各フルボ酸の含有カルボキシル基量に基づくものと推定した。

フルボ酸の研究に、ゲル濾過法は有用な手段で、特に金属との反応の研究に有効な方法となりうると考えられた。

1 結 言

土壤有機物すなわち腐植は、便宜的に腐植酸、フルボ酸およびヒューミンに分別されている。こうして分別された各腐植物質についての研究を進めていく上で、往々困難を伴うのは、これらが化学構造や分子量等を異にする種々雑多な有機物の混在するヘテロな物質群から成るためである。このような腐植の多様性は、種々の土壌の特性を反映するものとしての意義を持ってはいるが、やはり腐植研究の一般化に障害となっている。そのため、腐植が内在しているであろう土壌の特性を損うことなく腐植を分画できる方法が望まれる。従来から、フルボ酸の研究には、イオン交換法や各種のクロマトグラフィーが試みられ、それぞれの特徴を示している。

一方最近では、フルボ酸の研究にもゲル濾過法の適用が試みられつつある^{1),2)}。ゲル濾過法は、原理的に物質をその分子サイズ（従って分子量）で分画するものであり、分画後、各画分の大よその分子量が評価しうる点は、従来の分画法に比べて大きな特色である。また本法は、強酸や強アルカリを用いる事なく溶出操作しうる点で、フルボ酸-金属イオン系のような場合にも適用しうると考えられる。

本報告では、ゲル濾過法によるフルボ酸の分画を試みると共に、フルボ酸と金属イオンとの反応の解析に適用を試み二、三の知見を得たので報告する。

2 実験方法

1. 供試土壌

実験には第1表に示す土壌4点の風乾細土を使用し

京都府立大学農学部土壌学植物栄養学研究室

Laboratory of Soil Science and Plant Nutrition, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto, JAPAN

要旨は昭和47年度日本土壌肥料学会大阪大会で発表
昭和50年7月26日受理

第1表 供試土壌とその一般的性質

略号	供試土壌と採取地	pH (1:5)		全炭素 (%)	粒径組成 (%)			
		H ₂ O	N-KCl		粗砂	細砂	シルト	粘土
KB	黒ぼく土, 兵庫県城崎郡神鍋	5.1	4.1	15.8	1.7	24.9	34.8	38.6
NA	褐色森林土, 奈良県宇陀郡曽爾村土屋原	4.7	3.7	4.13	50.1	21.2	15.6	13.1
NG	強グライ土, 新潟県巻町大字巻字新道	4.8	3.8	5.15	0.2	2.6	29.9	52.9
GF	黒泥埴壤土, 岐阜県山県郡高富町	5.6	4.8	20	3.7	10.8	25.7	18.0

た。なお報文中では、第1表に示した略号で供試土壌を表記することにする。また、第1表には供試土壌の一般的性質も併記した。

2. フルボ酸の抽出と精製

供試土壌 20g に、抽出液 (0.1M 水酸化ナトリウム溶液と 0.1M ピロリン酸 ナトリウム 溶液の等量混合物) 900ml を加え、時々振とうしながら 50°C で放置する。24時間経過後遠心分離法で上澄を分取し、残渣には、同じ抽出操作をもう一度繰り返す。以上の抽出操作で得られた上澄部に 3M 硫酸を加え pH を約 1 としたのち、室温下に静置する。24時間経過後、遠心分離法で上澄部の粗フルボ酸画分を得る。

粗フルボ酸画分は、活性炭 (あらかじめ希酸と水で十分洗浄しておく) に吸着させる。活性炭は水で洗浄した後 0.1M 水酸化ナトリウム溶液でフルボ酸を溶出し、次いでアンバーライト IR-120, IRA-400 で処理して、精製フルボ酸を得る。

以上の操作で得たフルボ酸は、減圧下で濃縮した後、冷蔵庫に保存し、適宜水で希釈して使用した。またフルボ酸の濃度は、立川⁹⁾の液体試料中の有機物の迅速比色法によって得た炭素含有量で表示した。

3. ゲル濾過の方法

Sephadex G-25 を直径 2.5cm のカラムにゲル層が 62.5cm になる様に詰めて使用した。試料 4.0ml を供試して、溶出剤として 0.1M KCl を用い溶出平均速度 6 ml/cm²・h の条件で操作し、溶出液は 10ml を 1 フラクションとして分取した。各フラクションについて、300nm での吸光度を測定してフルボ酸量とし、また還元力は、Park-Johnson 比色法⁴⁾によって得た還元糖量をグルコース量に換算して求めた。

フルボ酸と金属イオンを反応させる実験では、一定量のフルボ酸と金属イオン (銅, マンガン, 亜鉛の塩化物を使用) を混合した後 NaOH と HCl で pH を約 5 とし、直ちにゲル濾過に供試した。

金属イオンの定量は、各フラクションを直接原子吸光分析に供試して検量線法によって行なった。なお溶

出液中の KCl による分子吸収が懸念されたが、分子吸収の大きい短波長域に測定波長をもつ Zn (2139Å) でも KCl の影響は微少であり、補正は行なわなかった。原子吸光分析には、Jarrell Ash AA-80 型原子吸光光度計を使用した。

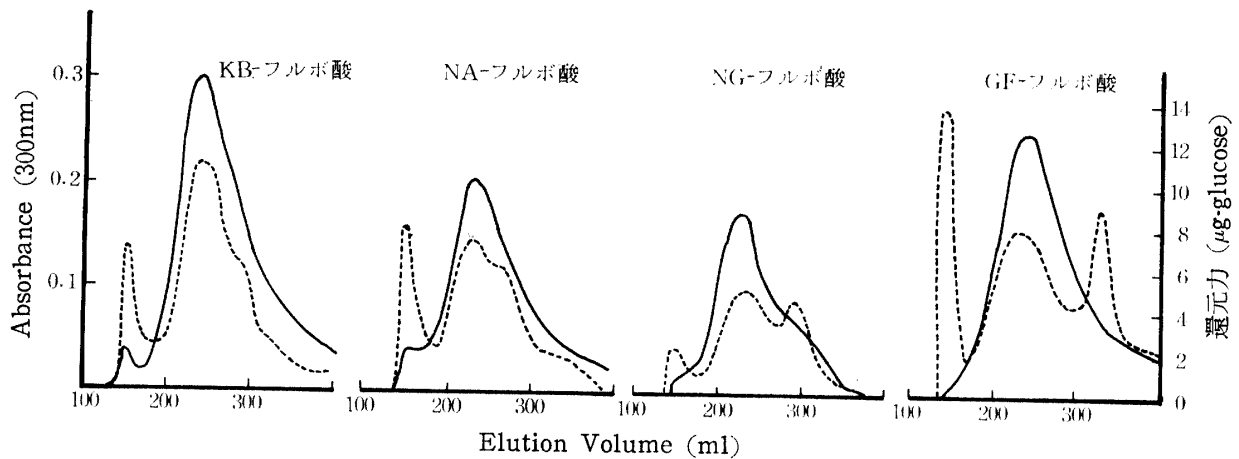
赤外吸収スペクトルの測定は、試料を凍結乾燥後 KCl 錠剤にして行なった。測定には、島津 IR-27C を使用した。

3 結果および考察

1. フルボ酸のゲル濾過

4 点の供試土壌より抽出精製したフルボ酸のゲル濾過の結果を第 1 図に示した。なお本研究の条件では、Elution Volume 150ml が分配係数 $K_d = 0$ すなわち Void Volume を、また Elution Volume 300ml が $K_d = 1$ を示す。KB や NA 土壌のフルボ酸ではゲル内に拡散し得ない分子量 5000 以上の高分子画分の存在が顕著に認められるが、ほとんどはゲル内に拡散可能な分子量 5000 以下の低分子画分から構成されている。Sephadex G-10 と G-75 を用いた予備実験で、いずれの供試土壌のフルボ酸も、それぞれ $K_d = 0$, $K_d = 1$ 附近に偏在する溶出傾向を示し、フルボ酸は主に分子量 5000~700 の範囲にある物質群から構成されているものと推定される。M. A. Rashid ら⁵⁾も、類似の傾向を海辺沈積物から抽出したフルボ酸について認めている。

土壌の腐植物質の研究にゲル濾過を適用する場合、特に腐植酸の場合にはゲルとの相互作用が著しく、吸着を起こし、そのため強アルカリ性で溶出する等の方法が講じられている。しかし、フルボ酸の場合には、ゲルとの相互作用は弱く、0.1M KCl で展開が十分可能であった。また溶出液の pH を中性から強アルカリ性に渡って変化させても、溶出パターンの変化はほとんど認められなかった。しかし、pH 約 3 以下の酸性条件では、溶出パターンは顕著な変化を示した。これは、フルボ酸のカルボキシル基やフェノール性水酸基



第1図 4点の供試土壌より抽出・精製したフルボ酸のゲル濾過
各フルボ酸とも 1.0mg Carbon を含む。鎖線は Park-Johnson 法で測定した
還元力を示す。
Sephadex G-25 を使用。

が酸性条件下で解離を抑制され、そのためフルボ酸に疎水的な傾向が強まりゲルとの相互作用が著しくなったためと考えられる。

次に、高分子および低分子画分の差異を検討するため、両画分の紫外吸収スペクトル、赤外吸収スペクトルの測定を行なった。その結果、紫外吸収スペクトルにおいて高分子画分では270~280nm に弱い肩状の吸収が、低分子画分では220~230nm に弱い吸収が認められた。また赤外吸収スペクトルでは、両画分いずれにも3400, 2900, 1700, 1620, 1400, 1250 cm^{-1} 附近に吸収が認められた。しかし、これらの吸収のうち aliphatic C-H 伸縮振動に基づくと考えられる 2900 cm^{-1} 附近の吸収および -C=O 伸縮振動に基づくと考えられる 1700 cm^{-1} の吸収は、高分子画分で強い吸収として認められ、また、この他 aromatic C-H に基づくと考えられる 3100 cm^{-1} の吸収は、高分子画分でのみ著しく強い吸収が認められた。これらの結果は、低分子画分に比べて高分子画分は、aliphatic な性格と共にかなり aromatic な性格を示しており腐植酸に近い性格のものではないかと考えられる。

第1図には、Park-Johnson 法で測定した還元力の変化についても示した。Park-Johnson 法は、ferricyanide が還元されて生じた ferrocyanide を青色の ferric-ferrocyanide $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ に変えて比色する還元糖の比色定量法として知られている。著者らは、この方法をフルボ酸に適用し、測定値をフルボ酸の還元力と呼ぶ事にし、還元力をグルコース量に換算して表示した。なお本法は、定量操作過程に加水分解反応を含まず従って遊離の還元基を定量する点、全還元基の定量を行なうアンソロン法とは異なる。

還元力のパターンをみると、 $\text{Kd} = 1$ 近くに顕著な

ピークの認められる NG および GF 土壌と、ピークの認められない KB および NA 土壌に区分される。この $\text{Kd} = 1$ 近くのピークはゲル内に拡散可能な低分子有機物で還元糖に由来するものと推定される。実際、土壌のアルカリ抽出物から酸沈殿法で腐植酸を除去して得たフルボ酸（本報でいう粗フルボ酸画分）中には、糖とウロン酸が19~25%も含まれている事が知られている⁶⁾。そして NG や GF 土壌で遊離の還元性物質が多かったのは、これらの土壌が還元条件下にあったため、有機物の酸化分解速度が遅く、そのため多量の還元性低分子有機物が蓄積したためと考えられる。一方 KB や NA 土壌は酸化条件下にあり遊離の還元性低分子有機物は少なく、反面酸化重合の結果一部が高分子化し分子量5000以上の画分を生成したのではないかと考えられる。

また $\text{Kd} = 0 \sim 1$ に認められた還元力は、多糖類等の末端還元基に基づくものと考えられるが、どの様な官能基に基づく還元力であるのか、現時点では明確にし得ない。

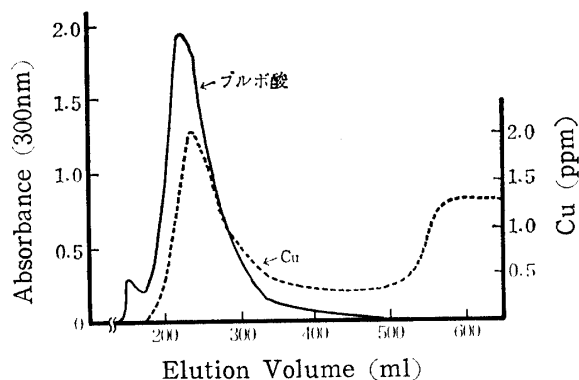
2. フルボ酸—金属反応系のゲル濾過

フルボ酸と金属とを反応させた場合の結果を、KB 土壌の場合を例に第2図~第5図に示した。

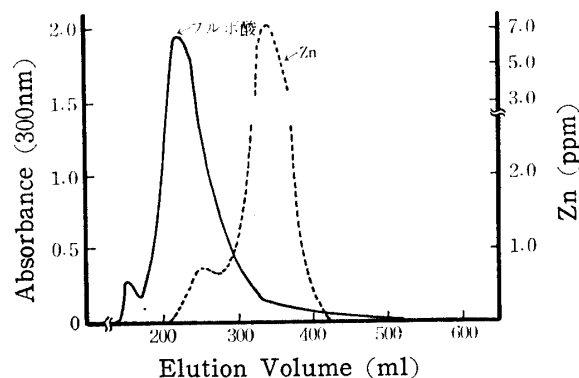
第2図には、Cu の場合の結果を示した。Cu は、フルボ酸の高分子画分中には存在せず、低分子画分中に見出され、各フラクション中の Cu 量はフルボ酸量に比例しており、フルボ酸と結合した Cu であると考えられる。一方 Elution Volume 530 ml から認められる Cu は、遊離のすなわちフルボ酸と反応しなかった過剰の Cu であると考えられる。第3図、第4図の Zn, Mn の場合には、遊離の Zn, Mn は $\text{Kd} = 1$ 近くに認められるのに対し、Cu の場合にはその溶出

位置が著しく遅れている。金属イオン類のゲル濾過に於いて、その溶出位置が溶出剤の種類や濃度によって変動する事は知られている⁷⁾が、第2図のCuの場合には、その変動が著しい。これは、キレート化し易いCuが、Sephadexのデキストラン連鎖に若干含まれているカルボキシル基と相互作用(いわゆるイオン効果)を生じたためと推測される。また溶出時のpHが5~6であるため、Cuの一部がCu(OH)⁺を生成してゲルとの相互作用を促進しているのではないかと考えられる。実際Cu²⁺+H₂O→Cu(OH)⁺+H⁺のpK_A=7.3⁸⁾から概算すると全Cuの内pH6では約 $\frac{1}{20}$ がCu(OH)⁺を生成するのに対し、Zn(pK_A=9.0⁸⁾、Mn(pK_A=10.6⁸⁾の場合には、pH6ではZn(OH)⁺やMn(OH)⁺の生成は微少で、アコ錯体が安定に存在できる。以上の推定を確認するため、溶出剤のpHを約3にして第2~4図と同様の実験を行なうと、Cu、Mn、ZnいずれもK_d=1の位置にシャープなピークを示して溶出するのが認められた。

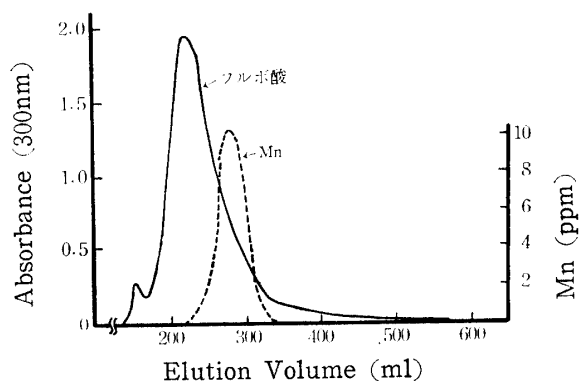
第3図、第4図には、ZnおよびMnの場合の結果



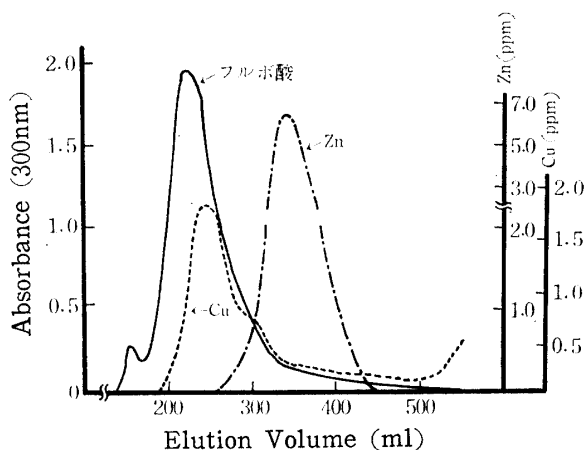
第2図 KB-フルボ酸—銅イオン混合系のゲル濾過
フルボ酸：4.8mgC, Cu (CuCl₂)：500μg
Sephadex G-25を使用



第3図 KB-フルボ酸—亜鉛イオン混合系のゲル濾過
フルボ酸：4.8mgC, Zn (ZnCl₂)：500μg
Sephadex G-25を使用



第4図 KB-フルボ酸—マンガンイオン混合系のゲル濾過
フルボ酸：4.8mgC, Mn (MnCl₂)：500μg
Sephadex G-25を使用



第5図 KB-フルボ酸—銅イオン—亜鉛イオン混合系のゲル濾過
フルボ酸：4.8mgC, Cu (CuCl₂)：400μg
Zn (ZnCl₂)：400μg, Sephadex G-25を使用

を示した。Cuと同様Znの場合も Elution Volume 250 ml にピークが認められる。しかしこの場合には、遊離のZnピークと一部重畳し、Cuの場合のように分離したピークを確認できなかったが、遊離Znの影響しないピーク前部の各フラクションについてみると、Zn量はフルボ酸量に比例しており、Znはフルボ酸と結合状態にあるものと考えられる。しかしZnの結合量は、Cuに比べて少く、例えばElution Volume 250 mlのフラクションで比較すると、フルボ酸の300nmでの吸光度がほとんど同一であるのに、Cuでは約2 ppmが結合し、Znでは約0.8 ppmの結合しか認められない。さらに第4図に示すMnでは、フルボ酸との反応はほとんど認められず、遊離のMnが溶出するだけである。

以上のように、pH 5~6の条件でのフルボ酸とCu、Mn、Zn等との結合力の強さには、Cu>Zn>Mnの

順位が存在する。そこでこの順位についてさらに検討を加えるため、フルボ酸に ① Cu と Zn, ② Cu と Mn, ③ Zn と Mn を同時に反応させる実験を行なってみた。その結果の一例を第5図に示した。①の Cu, Zn 共存の場合には、Cu の溶出パターンに変化は見られないが、Zn では、Zn 単独で反応させた場合(第3図)に認められた Elution Volume 250 ml 附近のピークが消失する。これは、フルボ酸は、Cu と Zn の共存下では Cu とのみ結合し、そのため Zn はフルボ酸と反応出来ず遊離するためと考えられる。また②, ③の場合には、Cu および Zn は Mn の共存によって溶出パターンに全く影響が認められず、フルボ酸に対する Mn の結合力は、Cu や Zn に比べてかなり弱い事を示している。

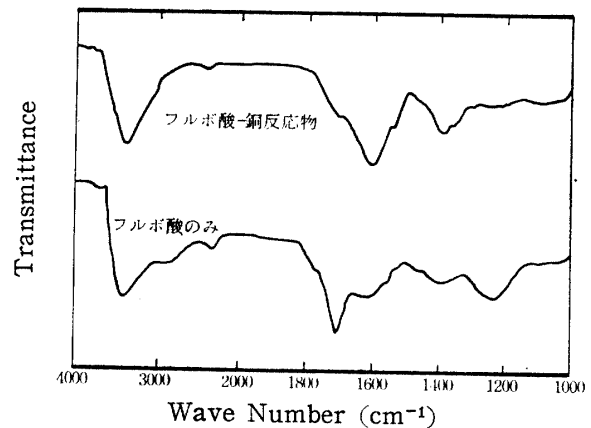
こうした結合力の強い金属イオンの共存で、より結合力の弱い金属イオンが遊離される現象は、土壤の化学反応の一つとして推測されている。吉田⁹⁾は、腐植質火山灰土壌の置換性アルミニウムの抽出に、微量の Cu^{++} の共存が効果的である事を示し、この理由として Cu がキレート状態の Al^{+++} と交換し、安定な Cu^{++} -有機物キレートを作るためであると推定しており、また R. S. Beckwith¹⁰⁾ も Cu^{++} によって Mn^{++} の遊離する事を示し、吉田と同様な交換メカニズムを推定している。著者らの結果は、フルボ酸についての結果ではあるが、Cu がフルボ酸と反応して、Zn との反応を抑制する等、吉田や Beckwith の推定を裏付けている。

従来から、M. Schnitzer¹¹⁾ を中心に、フルボ酸と各種金属との間の条件安定度定数が測定されているが、pH 5.0 でイオン交換平衡法で測定された値は、Cu, Zn, Mn でそれぞれ $10^{8.69}$, $10^{2.84}$, $10^{0.78}$ であり、 $\text{Cu} > \text{Mn} > \text{Zn}$ の順位を示している。著者らは、Zn の方が Mn より結合力の強い結果を得ているが、この違いは、供試土壌の違いや反応の速度論的な効果が影響しているためと考えられる。

さてフルボ酸と金属との反応が、従来から腐植-金属間の反応形式として推定されているキレート形成反応に基づくものか否かについて検討を加えるため、赤外吸収スペクトルの測定を行なってみた。その結果を第6図に示した。Cu との反応物は、第2図の Elution Volume 250 ml 附近のフラクションを用い、遊離のフルボ酸として精製フルボ酸を使用して測定を行なった。Cu との反応によって COOH の吸収を示す 1725 , 1200cm^{-1} の強度が低下し、 COO^- の吸収を示す 1610 , 1400cm^{-1} の強度が高まるのが認められ、カルボキシル基が解離し、 Cu^{++} と COO^- とが結合しているもの

と推定される。T. V. Drozdora¹²⁾, M. Schnitzer¹³⁾ からも同様の結果を報告しており、このようにフルボ酸は、Cu, Zn 等とカルボキシル基を介してキレートを形成して結合しているものと推定される。しかし、T. V. Drozdora¹²⁾ が主張しているフェノール性水酸基のキレートへの関与に対する証明をうる事は出来なかった。

一般に有機配位子と金属イオンとの安定な錯形成反応には、静電結合的な効果と共有結合的な効果が関与しているが、赤外吸収スペクトルでは、静電的な効果しか推定できないため、カルボキシル基以外の効果の寄与については推論し得なかった。

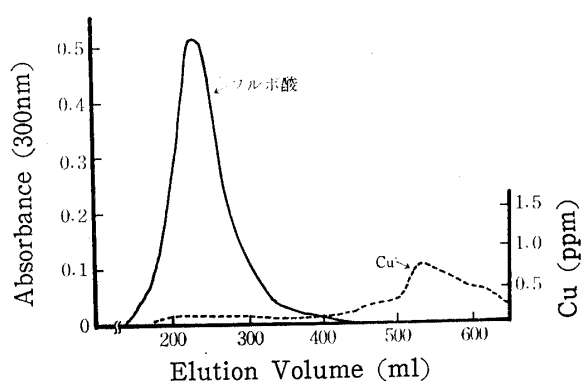


第6図 フルボ酸とその銅反応物の赤外吸収スペクトル

以上の結果からフルボ酸が Cu, Zn 等と反応する事を認めたが、第2図, 第3図から判るように、この反応は低分子画分に限られている。高分子画分は、腐植酸に近い性質と考えられるが、この画分とほとんど金属が反応しない理由については、現在の知見のみから明らかにし得ない。

第2図~第5図は、KB 土壌のフルボ酸についての結果であるが、NA 土壌のフルボ酸についても、ほとんど同様の結果が得られた。しかし、NG や GF 土壌のフルボ酸の場合には、反応性の強い Cu の場合でもほとんど反応せず、第7図に GF 土壌のフルボ酸の結果を示したが、そのキレート力は著しく低下しているのが認められる。前述した様に、フルボ酸と金属とのキレートがカルボキシル基を介して生起しているものとするれば、NG や GF 土壌のフルボ酸のカルボキシル基量が、KB や NA 土壌のフルボ酸に比べて少量であるため、金属との反応性が弱いのではないかと考えられる。米林¹⁴⁾は、コロイド滴定法によって、今回供試したものと同一土壌から抽出精製した腐植酸のカルボキシル基とフェノール性水酸基の含有量を測定してい

るが、その結果によれば、フェノール性水酸基の含有量に大差はみられないが、カルボキシル基量は、KB 土壌、NA 土壌でそれぞれ 5.80, 5.25 meq/g であるのに、NG 土壌、GF 土壌ではそれぞれ 2.30, 3.70 meq/g と低値を示している。そして、腐植酸と類似の傾向がフルボ酸のカルボキシル基量にも存在し、金属との反応性の強さに差異を生じているものと推定される。このことは、還元下で生成した NG や GF 土壌は、腐植の酸化が不十分のため、生成するカルボキシル基量が、好気的な KB や NA 土壌に比べて少ないためと考えられる。



第7図 GF-フルボ酸—銅イオン混合系のゲル濾過
フルボ酸：1.6mgC, Cu (CuCl₂)：500 μ g
Sephadex G-25を使用

以上のように、ゲル濾過法は土壌有機物と金属との反応の研究に有用な手段を提供するものと思われる。またゲル濾過法を錯体の結合比や安定度定数を測定する一手段としての研究も盛んで、すでに DNA と Cu

との安定度定数等が測定されており、今後フルボ酸—金属イオン系への適用が期待される。

引用文献

- 1) M. Schnitzer, S. I. M. Skinner : Isotope and Radiation in Soil organic matter studies ; **41**, 41 (1968)
- 2) 加藤忠司 : 土肥誌, **45**, 234 (1974)
- 3) 立川 涼 : 土肥誌, **37**, 28 (1966)
- 4) 福井作蔵 : 還元糖の定量法, p. 17, 東大出版会 (1969)
- 5) M. A. Rashid, L. H. King : Geochim. Cosmochim. Acta., **33**, 147 (1969)
- 6) 大塚紘雄 : 土肥誌, **46**, 180 (1975)
- 7) 武内次夫, 森 定雄 : ゲルクロマトグラフィー (応用編), p. 377, 講談社 (1972)
- 8) G. シャルロー : 改訂版定性分析化学 (曾根ほか訳), p. 377, 共立出版 (1974)
- 9) 吉田 稔 : 土肥誌, **39**, 510 (1968)
- 10) R. S. Beckwith : Aust. J. of Agri. Reser., **6**, 685 (1955)
- 11) M. Schnitzer : Intern. Congr. Soil Sci., **9**, 633 (1968)
- 12) T. V. Drozdora : Soviet Soil Sci., **10**, 1393 (1968)
- 13) M. Schnitzer, S. I. M. Skinner : Soil Sci., **96**, 86 (1963) ; **99**, 278 (1965)
- 14) 米林甲陽 : 未発表

Summary

The some nature and properties of fulvic acids were studied using gel filtration technique. Fulvic acids were extracted from 4 soils which derived under oxidative or reductive conditions. All fulvic acid desalted with ion exchanger, was separated on Sephadex G-25 gels with N-KCl as eluant into two fractions with distribution coefficient (K_d) of 0 and approximately 0.6, respectively. The larger molecular weight fraction, minor fraction, had a molecular weight in the range of 5000 or higher, and the smaller, major fraction, had a molecular weight in the range from 700 to 5000. The former fraction contained some components which was rich in reductive end

group.

To determine the affinity between fulvic acids and metal ions, fulvic acid solution containing metal ions adjusted to pH 5-6, was eluted on Sephadex G-25 by the same way. The results showed that only the low molecular fraction could react with metal ions, and the strength order of affinity were Cu > Zn > Mn. By infrared spectroscopy, it was concluded that the reaction was the chelation which the COOH group, as rigand, of fulvic acids coordinated to metal ions. The affinity of fulvic acids extracted from the soils which derived under oxidative condition were stronger than that under reductive condition. And it was estimated that

the differences of the affinity depended on the COOH contents of fulvic acids.

The results presented in this paper show

that the Sephadex gel filtration is a promising technique for studying the reactions of fulvic acids with metal ions.