

総説

腐植酸およびフルボ酸の蛍光成分*

青山 正和

弘前大学農学生命科学部

〒036-8561 青森県弘前市文京町3

Abstract

The fluorescence of humic acid (HA) and fulvic acid (FA) has been attributed to the fluorescent chemical structures present in the polydisperse molecules. However, when high-performance size exclusion chromatography was carried out on HA samples, the fluorescence-detected sharp peaks were eluted at the same elution volumes for all HA samples and later than the UV-detected broad peak which had different elution volume for each sample, suggesting that relatively low molecular size fluorescent substances existed as minor constituents. Gel filtration chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis confirmed that the fluorescent constituents of HAs were present in the low molecular weight fraction characterized by high aromaticity. The application of hydrophilic interaction chromatography (HILIC) to HAs enabled the separation of fluorescent and non-fluorescent fractions. Furthermore, the fluorescent fractions of HAs were successfully separated into many constituents by applying reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) with the addition of π - π interaction. FAs could be separated into more than 500 constituents by combining HILIC and RP-HPLC, most of which were fluorescent constituents with different fluorescent properties, and were estimated to consist of both humic and non-humic substances. Thus, it is clear that many fluorescent constituents with different fluorescence properties are involved in the fluorescence of HAs and FAs.

Keywords: electrophoresis, fluorescence, fulvic acid, HPLC, humic acid

1. はじめに

腐植酸とフルボ酸が蛍光を発することは古くから知られており (Schnitzer and Khan, 1972)、それらの蛍光特性が研究されてきた (Miano et al., 1988; Senesi, 1991)。従来、腐植酸とフルボ酸は多分散性の高分子であり、それらの分子内に蛍光を発する化学構造が存在することにより蛍光を発するとされ、置換された縮合芳香環構造が発蛍光団 (フルオロフォア) となっていると考えられてきた (Seitz 1981)。Levesque (1972)、Hayase and Tsubota (1985) や Ewald et al. (1988) は、腐植酸もしくはフルボ酸をゲルろ過や限外ろ過で分子量分画した後に蛍光強度を測定し、蛍光強度が分子量の減少とともに増加することを報告している。この現象は、高分子量画分ほど内部消光が大きいためと解釈されていた (Ewald et al., 1988)。一方、低分子量画分ほど蛍光が強いことは、低分子量の蛍光性物質が存在している可能性も考えら

れるが、この仮説に基づいた研究は行われていなかった。筆者が腐植酸について高速サイズ排除クロマトグラフィー (HPSEC) を行い、吸光と蛍光でピークを検出したところ、蛍光検出ピークが吸光検出ピークより遅れて溶出され、腐植酸によって吸光検出ピークの溶出位置が異なっても蛍光検出ピークは同じ位置に複数のピークとして溶出されることを見出した。筆者は、この結果が腐植酸中に比較的低分子量の蛍光性物質がマイナー成分として存在していると考えた (Aoyama, 1999; 2001)。この時から現在まで、筆者は腐植酸に含まれる蛍光性物質 (今後は蛍光成分と呼ぶ) が分離できないか様々な試みを行ってきた。また、フルボ酸については、最初は特定の成分が蛍光を発している証拠は得られなかった。しかし、各種の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 手法を適用したところ、フルボ酸が多くの構成成分に分離でき、ほとんどの構成成分が蛍光を発することを突き止めた。本稿では、筆者らのこれまでの研究を中心に、腐植酸およびフルボ酸

* Fluorescent constituents of humic and fulvic acids.

Corresponding author: M. Aoyama; E-mail address: aoyamam@hirosaki-u.ac.jp

の蛍光成分について概説したい。

2. 腐植酸中の蛍光成分の存在

堆肥および土壌由来の腐植酸についてHPSECを行うと (Aoyama, 1999; 2001)、吸光検出されるブロードなピークは腐植酸試料によって異なった位置に溶出されたが、蛍光検出されるピークは15以上のシャープなピークに分かれ、いずれの腐植酸試料でも各ピークの溶出位置は同じであった (図1)。この結果は、腐植酸の蛍光が腐植酸構成成分の一部のマイナー成分に由来するものであり、蛍光成分は堆肥および土壌由来の腐植酸に共通して存在していることを示した。また、腐植酸の蛍光成分は多くの成分から構成され、その組成は腐植酸ごとに異なっていることも判明した。さらに、蛍光成分の量は腐植化度によって異なり、A型の黒ボク土腐植酸やP型の褐色森林土腐植酸で多くてB型の沖積土腐植酸で少なく、Rp型の堆肥腐植酸では土壌腐植酸と比べて相当に少ないことが認められた。

この研究では、HPSECの溶離液として50mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) に、イオン性相互作用と疎水性

相互作用を軽減するために300 mMの塩化ナトリウムと20%のアセトニトリルを含有させており、吸光検出されるブロードなピークは排除限界 (V_0) と全浸透限界 (V_0+V_i) の間に溶出されたが、蛍光物質のピークは V_0+V_i より遅く溶出されるピークも認められた。このことから、蛍光成分の分離に関与する機構はサイズ排除だけでなく、カラムの固定相との相互作用も関わっていると考えられた。カラムとして用いたAsahipack GSシリーズはポリマー系カラムであり、メーカーの資料によれば、基本的にはサイズ排除モードのカラムであるが、溶離液条件によっては逆相やイオン交換モードなどの相互作用が発現するマルチモードカラムとされている。

一方、腐植酸の蛍光成分の化学的性状を解析するため、蛍光成分を多く含む画分を分取する手法について検討した (Aoyama, 1999)。その結果、蒸留水を溶離液としてセファデックスG-25を用いたゲルろ過により蛍光成分を多く含む画分と蛍光成分の少ない画分に分けることが可能になった。蛍光成分の少ない画分は V_0 の位置に溶出したが、蛍光成分に富む画分は V_0+V_i より遅れて溶出した。このことは、HPSEC の場合

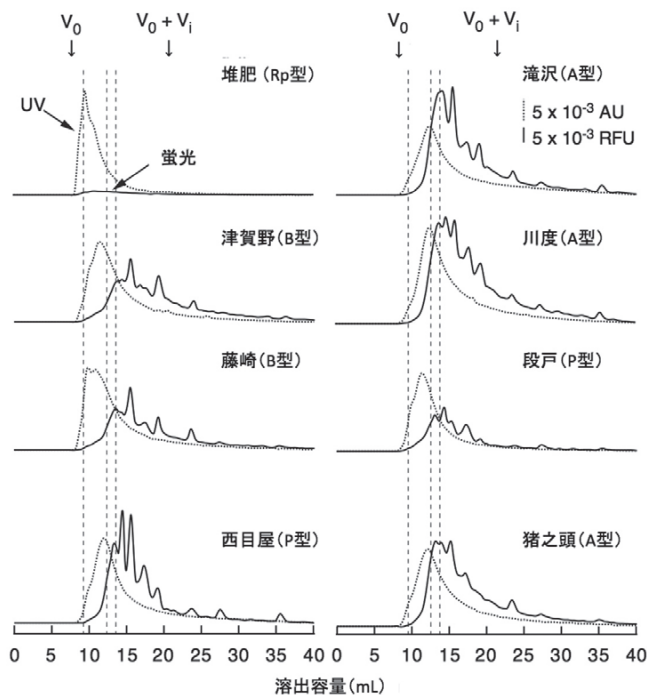


図1 腐植酸のサイズ排除クロマトグラム。

カラム: Asahipack GS-220HQ (7.6 mm I. D. × 300 mm) + GS-320HQ (7.6 mm I. D. × 300 mm)、溶離液: 300 mM NaClおよび20%アセトニトリルを含む50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0)、流速: 0.5 ml min⁻¹、検出: 280 nmでの吸光検出 (破線) および励起波長460 nm、発光波長520 nmでの蛍光検出 (実線)。

と同様に、蛍光成分がサイズ排除だけでなくゲルとの相互作用によっても分離されていることが示唆された。ゲルろ過により分けた画分についてHPSECを行うと、 V_0 の位置に溶出される画分のピークでは紫外吸収が強くて蛍光は弱い、 V_0+V_i より遅れて溶出された画分のピークでは蛍光が強くて紫外吸収が弱かった (図2)。ゲルろ過により分かれる2つの画分は、便宜的に蛍光の弱い画分を“腐植画分”、蛍光が強い画分を“蛍光画分”とした。

沖積土から調製したB型腐植酸と黒ボク土から調製したA型腐植酸についてゲルろ過を繰り返して腐植画分と蛍光画分を収集すると、蛍光画分として回収された有機態炭素の割合は、B型腐植酸では3%、A型腐植酸では18%であった (Aoyama et al., 2000)。また、蛍光画分の相対蛍光強度はA型腐植酸ではB型腐植酸より高かったが、いずれの腐植酸でも蛍光画分の相対蛍光強度は腐植画分の8~9倍強いことが認められた。紫外-可視吸収スペクトルを測定すると、同一濃度での紫外吸収はいずれの腐植酸でも腐植画分より蛍光画分で高く (280nmで1.5~1.8倍)、 $\Delta \log K$ と RF を計算すると、いずれの腐植酸でも蛍光画分はA型に分類された。さらに、CPMAS ^{13}C NMRスペクトルを測定すると、蛍光画分は、腐植画分と比べて芳香族炭素の割合が多く、いずれの腐植酸でも75%前後が芳香族炭

素であった (図3)。こうした結果から、芳香族構造の発達が蛍光画分における強い蛍光の原因と考えられた。

筆者らの研究の後、Trubetskaya et al. (2002) は、7 M尿素存在下で土壌腐植酸の分取サイズ排除クロマトグラフィーにより得た画分の蛍光スペクトルを測定し、低分子量画分で蛍光が強く、溶液pHを変えた場合の蛍光特性の変化からカルボキシ基および水酸基をもつ芳香族構造が腐植酸の蛍光に関与しているとした。Alberts and Takács (2004) は、土壌腐植酸のHPSECによって分取した画分の三次元蛍光スペクトルを測定し、低分子量画分に蛍光が偏在していることを報告している。また、Richard et al. (2007) も、7 M尿素存在下で黒ボク土腐植酸のサイズ排除クロマトグラフィーにより分取した画分の三次元蛍光スペクトルを測定し、やはり蛍光が低分子量画分に偏在することを報告している。さらに、Richard et al. (2011) は、7 M尿素存在下での限外ろ過により土壌腐植酸を分画して三次元蛍光スペクトルを測定し、腐植酸の蛍光成分は分子量5 kDa以下の画分に存在しており、5 kDより大きな画分では蛍光が観察されなかったとしている。これらの研究は、腐植酸の蛍光成分が比較的的低分子量であるとの点で筆者らの結果と一致していた。

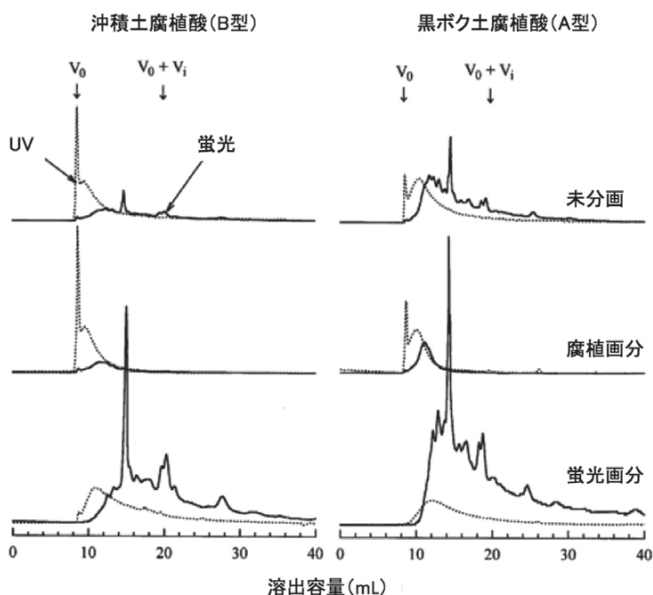


図2 腐植酸およびゲルろ過画分 (腐植画分、蛍光画分) のサイズ排除クロマトグラム。

カラム：Asahipack GS-220HQ (7.6 mm I. D. × 300 mm) + GS-220HQ (7.6 mm I. D. × 300 mm)、溶離液：300 mM NaClおよび20%アセトニトリルを含む50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0)、流速：0.5 ml min⁻¹、検出：280 nmでの吸光検出 (破線) および励起波長460 nm、発光波長520 nmでの蛍光検出 (実線)。

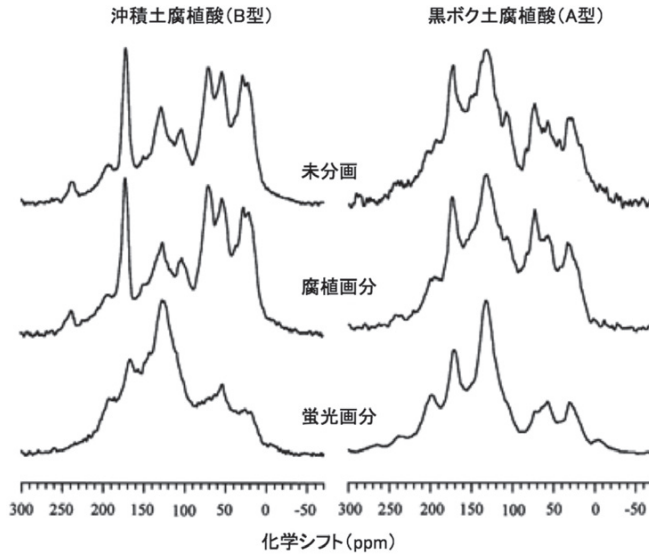


図3 腐植酸およびゲルろ過画分(腐植画分、蛍光画分)のCPMAS ^{13}C NMRスペクトル。

3. 腐植酸の蛍光成分の分離

前述のように、腐植酸の蛍光成分は芳香族性の高い低分子量画分に含まれることが分かったが、HPSECから多くの成分からなることが認められた。そこで、筆者らは、さらに多くの蛍光成分を分離するため、各種のHPLC手法や電気泳動法を適用した蛍光成分の分離法について検討を行った。

最初に、各種の物質の分離に広く使われているHPLC手法である逆相クロマトグラフィー(RP-HPLC)による腐植酸構成成分の分離を試みた(青山ら, 2002; 2003; 2006; 青山, 2008)。ポリマー系モノリスカラムを用いてpH勾配溶出とアセトニトリル濃度勾配溶出を適用したRP-HPLCを行うと、腐植酸が十数本のピークに分離することを見出した(青山ら, 2003; 2006)。蛍光は最初に溶出する親水性の高い成分で強く、遅く溶出するピーク、すなわち疎水性の高い成分ほど蛍光が弱くなり、最も遅く溶出する疎水性の高い成分はほとんど蛍光を発生しないことが認められた。蛍光の最も強い親水性成分は、赤外線吸収スペクトルの測定からカルボキシ基に富むとともに、銅イオンを添加すると錯体を形成して蛍光の消光が起こることが判明した(青山ら, 2006)。Trubetskoj et al. (2012)は、サイズ排除クロマトグラフィーで分画した土壌腐植酸の低分子量画分についてRP-HPLCを行い、筆者らと同様にRP-HPLCで最初に溶出する親水性の高い成分で蛍光が強いことを報告している。

次に、二次元電気泳動法を適用して腐植酸構成成分

の分離を検討した(Aoyama et al., 2010; Karim et al., 2013)。腐植酸の二次元電気泳動は、タンパク質の二次元電気泳動を参考に、等電点電気泳動(IEF)で等電点のちがいにより分離した後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)で分子サイズのちがいにより一枚のゲル上に展開した。二次元電気泳動を行うに際して、Trubetskoj et al. (1991)を参考に、IEFとPAGEのいずれも7M尿素存在下で行った。堆肥および土壌から調製した腐植酸について二次元電気泳動を行うと、いずれの腐植酸でも構成成分は主に等電点(PI)が3.0から4.5の領域の広い分子量範囲に展開された(図4左)。このように、腐植酸ではタンパク質とちがってスポットとして分離されなかったことから、腐植酸が化学組成および分子サイズの両面で連続的に変化する成分から構成されていることが示唆された。一方、LEDで青色光を照射すると、ゲルの下半分に緑色の蛍光が観察され、とくに泳動フロントの部分で強い蛍光が認められた(図4右)。ゲル上の緑色蛍光が認められた領域は濃く着色した部分とは重なっておらず、腐植酸中の蛍光成分は暗色成分の主要部分とは異なる物質であることが確認された。また、有機態炭素量の分析から、腐植酸の大部分は暗色の非蛍光成分からなり、蛍光成分の量はかなり少ないことが判明した。蛍光成分が濃縮されている泳動フロント部分の成分をゲルから抽出して拡散反射フーリエ変換赤外線吸収(DRIFT)スペクトルの測定を試みたが、微量のために明瞭なスペクトルは取得できなかった。Trubetskaya et al. (2011)は、7M尿素存在下での

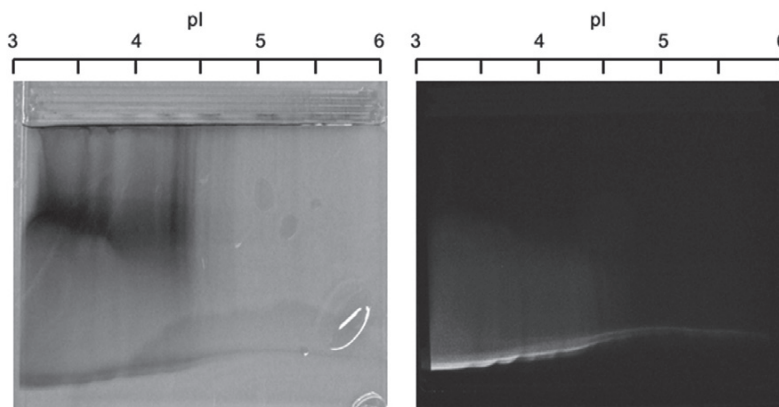


図4 腐植酸の二次元電気泳動によりゲル上に展開された腐植酸構成成分(左)と青色光下で観察された緑色蛍光(右)。

限外ろ過により分取したチェルノーゼム腐植酸のPAGEを7M尿素存在下で行い、ゲルに紫外線を照射すると、筆者らの研究と同様に泳動フロントの部分が強い蛍光を発することを報告している。

続いて、電気泳動で分離する蛍光成分を収集して分析するため、沖積土から調製したB型腐植酸と黒ボク土から調製したA型腐植酸について、分取電気泳動装置を用いて7M尿素存在下で分取PAGEを行った(Karim and Aoyama, 2013a; 2013b)。分取PAGEを行うと、最も泳動が速い画分で蛍光が最も強かった。泳動が速い画分は、含まれる腐植酸構成成分を回収するためにアルカリで溶出後に酸性化すると、暗色の沈殿が得られるだけでなく、上澄も褐色に着色しており、上澄の褐色成分はDAX-8樹脂への吸着により回収できた。沈殿と上澄の双方について蛍光検出によるHPSECを行うと、蛍光成分はいずれにも含まれることが確認された。沈殿と上澄の A_{600}/C と $\log(A_{400}/A_{600})$ を測定すると、沈殿はA型に分類されるのに対して、上澄はB型もしくはRp型に分類された。また、DRIFTスペクトルを測定すると、沈殿も上澄もカルボキシ基に富むことが認められた。

上述のように、腐植酸の分取PAGEを行った際に酸可溶となる蛍光成分が含まれていることが判明したため、酸可溶成分の分離と分析を行った(Aoyama, 2015)。分取PAGEにおける酸可溶成分の解離は、高濃度尿素による水素結合の切断や疎水性相互作用の低下に起因すると推定されたため、3種類の土壤腐植酸を7M尿素を含む0.1M NaOHに溶解し、16時間後にpH 1.0に酸性化して沈殿から酸可溶成分を分離した。酸可溶成分は、腐植酸の全有機態炭素の16~45%を占めており、その約半分がDAX-8樹脂に吸着された。 A_{600}/C と $\log(A_{400}/A_{600})$ を測定すると、DAX-8吸着画

分の腐植化度は未分画腐植酸よりかなり低かったが、沈殿画分では未分画腐植酸より高くなっていった。酸可溶成分の三次元蛍光スペクトルを測定すると、相対蛍光強度はDAX-8非吸着画分より吸着画分で強かったが、DAX-8吸着画分の発光波長は430~440nmであり、フルボ酸に近い波長であった。一方、DAX-8非吸着画分は、タンパク質様の蛍光を発することが特徴的であり、DRIFTスペクトルの測定からタンパク質と多糖に富んでいることが認められた。このように、腐植酸にはフルボ酸様およびタンパク質様の蛍光成分も含まれていることが明らかになった。Richard et al. (2011)も、7M尿素の存在下で限外ろ過により土壤腐植酸を分画した際に、分子サイズ0.5~1 kDaの画分は、分子サイズ>1 kDaの画分と比べて短い波長域に発光極大を持つことを報告しており、筆者の研究と同様にフルボ酸様の蛍光を発する成分が高濃度尿素存在下で解離することを示している。一方、Trubetskoj and Trubetskaya (2017)は、7M尿素存在下でのサイズ排除クロマトグラフィーによって分画したチェルノーゼム腐植酸の三次元蛍光スペクトルを測定し、タンパク質様蛍光は高分子量の画分で強く、低分子量画分では弱いとしている。

さらに、近年、RP-HPLCに替わるHPLC手法として注目されている親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)について検討を行った(青山, 2013; Aoyama, 2014)。HILICは順相クロマトグラフィーの一種であり、水と有機溶媒の混合溶液と、それより高極性の固定相を用いる分離モードである。HILICでは、RP-HPLCとは異なって有機溶媒の濃度を下げるにしたがって疎水性の強い物質から溶出され、親水性物質は強く保持される。土壤腐植酸についてスルフォベタイン基結合型カラムとアミド基結合型カラムを連結し

て超純水とアセトニトリルを溶離液としたHILICを適用したところ、蛍光成分が非蛍光成分から分離できることを見出した。分取した画分のHPSECを行なうと、蛍光成分が多数のピークに分離することが認められ、腐植酸中の蛍光成分が多く成分から構成されていることが確認できた。

HILICでの分離度の向上を目指してカラムおよび溶離液について検討したところ、ジオール基結合型カラムを用いて10mM酢酸アンモニウムとアセトニトリルによるグラジエント溶出を行うことによって分離が向上することが判明した (Aoyama, 2016)。この方法を適用したところ、アセトニトリル濃度の低下に伴って多くのオーバーラップした蛍光ピークとそれに続くブロードな蛍光検出ピークが溶出され、その後に蛍光をほとんど発しない吸光検出ピークが出現した。また、埋没黒ボク土腐植酸 (A型) からゲルろ過により得られた腐植画分と蛍光画分にこの手法を適用すると、腐植画分では蛍光成分がわずかで、蛍光画分では大部分が蛍光成分であることが確認された (図5)。HILICによって溶出されるピークを分取して三次元蛍光スペクトルを測定すると、溶出が遅いピークほど発光波長が長波長側へシフトした (480nmから550nmへ)。このように、腐植酸の蛍光成分が蛍光特性の異なる多

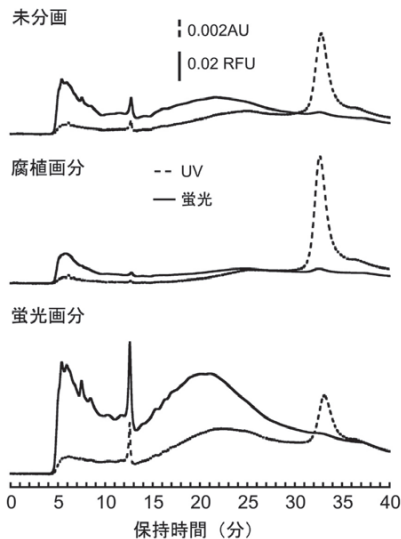


図5 埋没黒ボク土腐植酸およびゲルろ過画分 (腐植画分、蛍光画分) のHILICクロマトグラム。

カラム：YMC-Pack Diol-NP (4.6 mm I. D. × 250 mm)、溶離液：10 mM 酢酸アンモニウム+アセトニトリル (80%→50%)、流速：0.5 ml min⁻¹、検出：280 nmでの吸光検出 (破線) および励起波長275 nm、発光波長520 nmでの蛍光検出 (実線)。

くの構成成分からなることが明らかになった。

一方、別の分離法として π - π 相互作用を有するフェニルヘキシル基結合型カラムを用いたRP-HPLCを行ったところ (青山, 2018)、腐植酸を70以上のピークに分離することができた (図6)。この場合、逆相分離に加えて、カラムのフェニル基と腐植酸構成成分の芳香環との相互作用によって分離が達成されていると推定される。分離ピークの多くは、蛍光と吸光のいずれでも検出された。また、腐植酸によって蛍光成分の組成が異なっていることが判明した。さらに、蛍光成分のピーク強度は、HPSECを適用した場合と同じく、腐植化度の低いRp型腐植酸で低く、A型腐植酸で高いことが認められた。

このように、 π - π 相互作用を付加したRP-HPLCを適用すると、筆者が最初に手掛けたHPSEC (図1) と比べて著しく多くの腐植酸蛍光成分を分離することが可能になった。しかし、腐植酸をこの方法で直接分析すると各ピークは非蛍光性成分のピークと重なってしまうため、この手法をHILICと組み合わせることを考えた (青山, 2018)。まず、黒ボク土腐植酸についてジオール基結合型カラムを用いた分取HILICを行い、F1～3の画分に分けた (図7)。F1は最初に溶出される蛍光性成分であり、F3は遅れて溶出する紫外吸収の強い画分で、蛍光をほとんど示さず暗色を呈した。また、F1とF3の間に溶出されるブロードな蛍光ピークをF2とした。各画分はpHを1.0として沈殿を回収したが、F1とF2に関しては、上澄が着色していたため、上澄をDAX-8樹脂に吸着させた後、0.1M水酸化ナトリウムで脱着し、水素型陽イオン交換樹脂を通過させて中和した。F1沈殿、F1上澄、F2沈殿、F2上澄およびF3沈殿での有機態炭素の分布は、それぞれ7.5、1.4、11.2、2.4および47.1%であり、回収率は69.6%であった。

これらの画分についてフェニルヘキシル基結合型カラムを用いてRP-HPLCを行うと、F1上澄とF2上澄で50以上の蛍光検出ピークが分離された (図8)。一方、F1とF2の沈殿部でも多くの蛍光検出ピークが認められたが、同一炭素濃度での蛍光ピークの強度はF1、F2とも上澄と比べて遥かに低かった。F3沈殿についても蛍光検出によりピークが認められたが、ピーク強度はF1沈殿、F2沈殿よりかなり低かった。このように、腐植酸の蛍光成分は、これまでの研究と比べて遥かに多いことが判明した。個々の蛍光ピークを分取して三次元蛍光スペクトルを測定すると、蛍光極大の励起波長と発光波長はピークによって少しずつ異なる

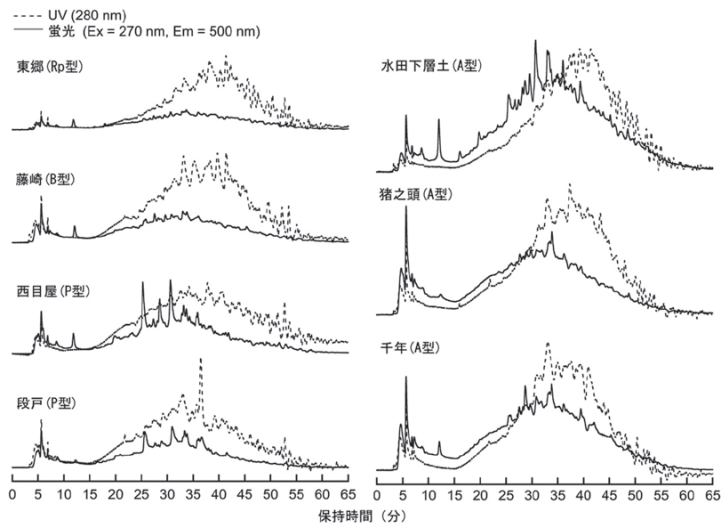


図6 腐植酸のRP-HPLCクロマトグラム。

カラム：InertSustain Phenylhexyl (4.6 mm I.D.×250 mm)、溶離液：10 mM ギ酸アンモニウム (pH 4.5) + メタノール (10%→90%)、流速：0.5 ml min⁻¹、検出：280 nmでの吸光検出 (破線) および励起波長270 nm、発光波長500 nmでの蛍光検出 (実線)。

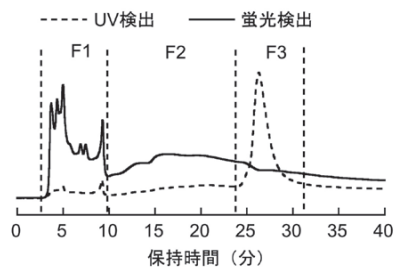


図7 黒ボク土腐植酸の分取HILICクロマトグラム。

カラム：Inertsil HILIC (10 mm I.D.×150 mm)、溶離液：10 mM ギ酸アンモニウム+アセトニトリル (80%→50%)、流速：2.5 ml min⁻¹、検出：280 nmでの吸光検出 (破線) および励起波長270 nm、発光波長500 nmでの蛍光検出 (実線)。

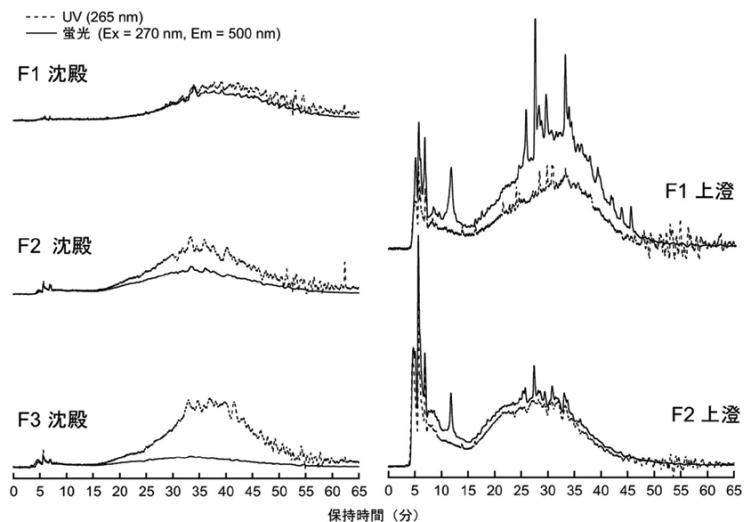


図8 分取HILICで分画した黒ボク土腐植酸のRP-HPLCクロマトグラム (クロマトグラフィーの条件は図6と同じ)。

た。蛍光ピークの発光波長は、F1 上澄では430～480nm、F2 上澄では480～510nm、F1 沈殿では480～500nm、F2 沈殿では510～520nm、F3 沈殿では520～540nm の範囲にあった。HILICで遅く溶出される画分ほど蛍光成分の発光波長が長くなるのは前述の結果と同じであり、溶出の早いF1の酸可溶蛍光成分は発光波長が短いフルボ酸様の蛍光を示した。さらに、F1 上澄およびF3 沈殿においては、タンパク様の蛍光を示すピークも認められた。フォトダイオードアレイ検出器を用いて紫外-可視吸収スペクトルを測定すると、F1 上澄とF2 上澄での蛍光ピークは紫外部に特異な吸収を示し、可視部の吸収が弱い場合が多かったが、F1～F3の沈殿の蛍光ピークは紫外部から可視部にかけて吸光度が徐々に低下する腐植物質に特徴的な吸収スペクトルを示した。

以上のように、腐植酸の蛍光成分は、非常に多くの成分からなることが認められたが、HILICを適用することによって、蛍光成分を非蛍光成分から分離することが可能となった。さらに、 π - π 相互作用を付加したRP-HPLCを適用することによって蛍光成分が数多くの構成成分からなっていることが判明した。蛍光成分の一部は、高濃度尿素存在下や高濃度のアセトニトリルやメタノール存在下でのHILICによって酸可溶成分として分離され、フルボ酸様の蛍光を発する成分も含まれた。現在のところ、腐植酸中の蛍光を発する成分の実体は特定できていないが、紫外・可視吸収スペクトルから、アセトニトリル存在下でのHPLCで酸可溶となる蛍光成分の多くは非腐植物質の可能性があるので、酸で沈殿する蛍光成分は腐植物質であると推定される。

4. フルボ酸の蛍光成分の分離

筆者らが最初に行ったHPSECによる蛍光成分の研究では、腐植酸とともにフルボ酸の分析も行った(Aoyama, 2001)。フルボ酸のPVP吸着画分と非吸着画分のHPSECを腐植酸の場合と同じ条件で行い、励起波長360nm、発光波長450nmで検出すると、いずれのフルボ酸画分でも蛍光検出ピークは吸光検出ピークよりわずかに遅く溶出した。しかし、溶出容量の範囲は蛍光検出ピークも吸光検出ピークもほとんど変わらず、特定の成分が蛍光を発しているという証拠は得られなかった。前述のAlberts and Takács (2004)もフルボ酸のHPSECを行っているが、吸光ピークと蛍光ピークがほぼ重なることからフルボ酸全体が蛍光を発していると推定している。

その後、スルフォベタイン基結合型カラムとアミド基結合型カラムを連結して超純水とアセトニトリルを溶離液としたHILICをフルボ酸にも適用したところ(青山, 2013; Aoyama, 2014)、腐植酸と同様に蛍光成分が非蛍光成分から分離できた。ただし、フルボ酸では腐植酸とちがって非蛍光成分の割合は小さかった。一方、分取した蛍光成分のHPSECを行っても、腐植酸のように多数の蛍光ピークには分かれなかった。そこで、腐植酸に適用したジオール基結合型カラムを用いたHILICを行うと(Aoyama, 2016)、腐植酸と同様にアセトニトリル濃度の低下に伴って多数の蛍光ピークが溶出され、ついでブロードな蛍光ピークが溶出されたが、腐植酸と異なって蛍光を示さない吸光検出ピークはほとんど出現しなかった。溶出した蛍光ピークを分取して三次元蛍光スペクトルを測定すると、ピークによって蛍光波長が異なることが認められた。さらに、HILICによるフルボ酸構成成分の分離を向上させるため、カラムや溶離条件の検討を行ったところ(青山, 2017)、アミド基結合型のカラムを用いることによって多数のピークに分けることに成功し、蛍光検出されたピークは70以上に及んだ。

一方、腐植酸で多くの蛍光成分に分離できることが認められた π - π 相互作用を加味したRP-HPLCをフルボ酸についても検討した。その結果、腐植酸の分離に用いたフェニルヘキシル基結合型カラムではなく、ペンタプロモベンジル基結合型カラムを用いてRP-HPLCを行うことによって(Aoyama, 2018)、土壌フルボ酸を70以上のピークに分離できることが判明した。そこで、アミド基結合型カラムによる分取HILICにより黒ボク土フルボ酸をF1～10の10画分に分けた(図9)後、各画分についてペンタプロモベンジル基結合型カ

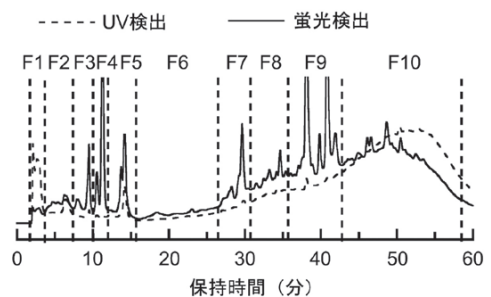


図9 黒ボク土フルボ酸の分取HILICクロマトグラム。

カラム: InertSustain Amide (10 mm I.D.×150 mm)、溶離液: 10 mM ギ酸アンモニウム+アセトニトリル(85%→65%)、流速: 2.5 ml min⁻¹、検出: 265 nmでの吸光検出(破線)および励起波長265 nm、発光波長440 nmでの蛍光検出(実線)。

ラムを用いたRP-HPLCを行った（図10）。各画分は、RP-HPLCによって多くのシャープなピークに分離され、全画分を併せると500以上のピークが確認された。また、F7～10の画分では、シャープなピークとともにブロードなピークも観察された。ブロードなピークは、吸光検出ピークと蛍光検出ピークがほぼ同じ形状で分布していたが、シャープなピークは、蛍光が強いピークと吸光が強いピークとが混在していた。フォトダイオードアレイ検出器を使った紫外-可視吸収スペクトル測定から、シャープなピークの大部分は紫外領域のみに吸収を持ち、ピークによっては紫外領域に特異な吸収をもっていたのに対して、ブロードなピークは紫外領域から可視領域まで吸光度が減少する腐植物質に特有なスペクトルを示した。このことから、フルボ酸は紫外吸収の強いほぼ無色の物質と可視光を吸収する暗色の物質から構成されており、前者のそれぞれが単一物質である非腐植物質であるのに対して、後者は腐植物質と推定され、強度は様々ではあるが、いずれも蛍光を発していると考えられた。また、ブロードなピークは、仔細に見ると数多くのピークが連続的に

連なって山型をなしており、腐植物質が化学構造の連続的に遷移する物質群から構成されていることを覗かせた。

各画分の蛍光検出ピーク（合計70ピーク）を分取して三次元蛍光スペクトルを測定すると、蛍光極大の励起および発光波長はピーク間で異なり、フルボ酸が異なる発蛍光団を有する分子から構成されていることが認められた。各ピークの蛍光極大の励起および発光波長をプロットすると（図11）、蛍光極大は未分画フルボ酸の蛍光極大付近に比較的多く、未分画フルボ酸の示す蛍光スペクトルが個別の蛍光成分の示す蛍光が統合されたものであることを示唆した。また、励起波長260～290nm、発光波長320～350nmの範囲に蛍光極大を有するタンパク質もしくはペプチドと推定される成分も含まれていた。Ma and Green (2008) は、フルボ酸の分取薄層クロマトグラフィーを行い、紫外線照射によって蛍光を発したバンドの抽出液について三次元蛍光スペクトルを測定し、バンドによって励起波長と発光波長がそれぞれ異なっていることを報告している。彼らの結果も筆者の研究と同様に、フルボ酸が異なる発蛍光団を有する成分から構成されていることを示している。

さらに、土壌から水で抽出される水溶性フルボ酸および湖水フルボ酸についてHILICを行ったところ、土壌フルボ酸と比較して、遅く溶出される暗色の程度が高く、親水性の強い画分が少ないことが認められた（青山ら, 2019; Aoyama, 2019）。さらに、HILICで分け

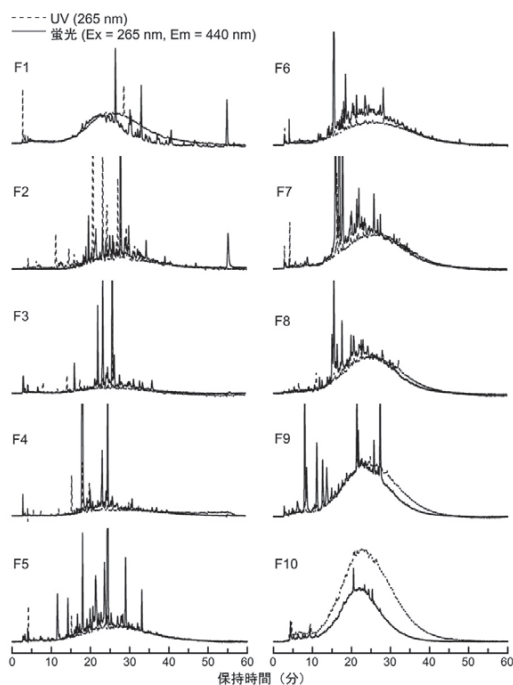


図10 分取HILICで分画した黒ボク土フルボ酸のRP-HPLCクロマトグラム。

カラム：Cosmosil PBr (4.6 mm I.D.×250 mm)、溶離液：0.2% ギ酸+アセトニトリル (5→65%)、流速：1.0 ml min⁻¹、検出：265 nmでの吸光検出（破線）および励起波長265 nm、発光波長440 nmでの蛍光検出（実線）。

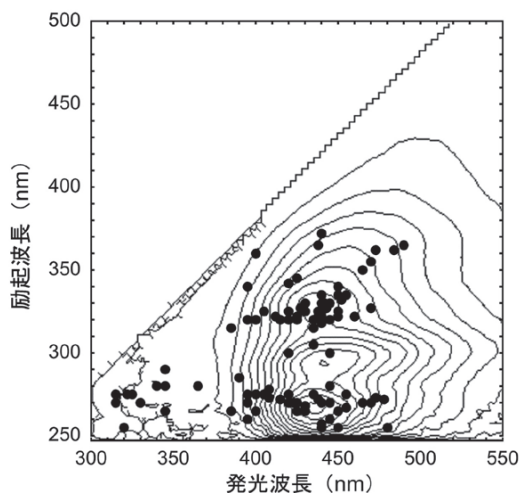


図11 黒ボク土フルボ酸の三次元蛍光スペクトルならびにHILIC画分のRP-HPLCにおける蛍光検出ピークの励起および発光波長（●）。

た画分について π - π 相互作用を付加したRP-HPLCを行うと、土壌フルボ酸と比べて非腐植物質と考えられる蛍光成分が少なく、腐植物質による蛍光が主体であることが認められた(青山ら, 2019; Aoyama, 2019)。このことは、土壌フルボ酸を構成する蛍光性の非腐植物質は水では溶出しにくく、水圏における土壌由来の蛍光性物質が主に土壌フルボ酸中の腐植物質であることを示唆している。

5. おわりに

筆者の腐植研究は、主に腐植酸・フルボ酸の蛍光成分に関して行ってきたものである。腐植酸の蛍光は、筆者が腐植酸中の一部の成分によって発せられていることを見出すまで、多分散性の高分子である腐植酸の分子内に存在する化学構造に由来すると考えられていた。そこで、筆者は腐植酸やフルボ酸の本体である“腐植物質”より“蛍光物質”は何かということに興味をもって研究を進めてきた。最初は、腐植酸の緑色成分のように、土壌のアルカリ抽出時に紛れ込んでくる天然成分と考えていた。しかし、緑色成分のもととなるペリレンキノンのような特定の物質を見つけることはできなかった。替わってわかったのは、腐植酸・フルボ酸中の蛍光成分は、非常に多くの物質から構成され、腐植物質とおそらくは化学物質として特定できそうな非腐植物質とからなることであった。

近年、腐植酸やフルボ酸が高分子有機物ではなく、比較的分子量の有機分子が水素結合や疎水性相互作用などの弱い結合で集合した超分子構造をとっているという見解が主流になりつつある(Piccolo, 2001; Simpson et al., 2002; Sutton and Sposito, 2005)。この説が正しいとすると、腐植酸およびフルボ酸中の蛍光成分は、腐植物質、非腐植物質のいずれも、非蛍光成分とともに腐植超分子を構成していると考えられることができる。このため、腐植酸とフルボ酸の構成成分をすべて分離して化学種を同定することができれば、腐植酸・フルボ酸の化学構造を解明する大きな手がかりとなる。筆者らの研究に基づけば、腐植超分子は、高濃度尿素やアセトニトリルの存在下で個々の構成分子に解離するものと推定される。ただし、現在のところ、腐植酸およびフルボ酸の構成成分はすべて解離しているとは考えられず、とくに腐植物質と推定した成分はさらに分けることができる可能性が高い。このため、腐植酸およびフルボ酸をさらに多くの構成成分に分けるHPLC手法の開発を行うとともに、分離した腐植酸・フルボ酸構成成分を質量分析により網羅的に解

析を行うことが腐植酸・フルボ酸の化学構造の解明に繋がると考える。

謝辞

本稿は、これまで筆者が行ってきた研究を元に取り纏めたが、腐植酸・フルボ酸の分析に際して名古屋大学・渡邊 彰先生、金沢大学・長尾誠也先生ならびに帯広畜産大学名誉教授・筒木 潔先生には大変お世話になりました。実際の研究を進めるに当たっては、弘前大学の学生諸君には多大なお世話になり、とくに博士課程学生であったSaiful Karim君には電気泳動による腐植酸の分析に注力していただきました。また、ノースイースタン大学・Geoffrey Davies教授には、腐植酸の蛍光の研究を開始した当初に注目し、激励していただいたことがその後の研究の展開に繋がりました。さらに、ロシア科学アカデミー・Oleg Trubetskoj博士、Olga Trubetskaya博士ご夫妻には腐植酸・フルボ酸の蛍光成分に関してIHSSの場で有益な議論をしていただきました。皆様には、心から感謝の意を表します。

引用文献

- Alberts, J. J. and Takács, M. (2004) Comparison of the natural fluorescence distribution among size fractions of terrestrial fulvic and humic acids and aquatic natural organic matter. *Org. Geochem.* **35**, 1141-1149.
- Aoyama, M. (1999) Chromatographic separation of fluorescent substances from humic acids. In: *Understanding Humic Substances: Advanced Methods, Properties and Applications*, Davies G., Ghabbour E. A., Eds.: The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 179-189.
- Aoyama, M., Watanabe, A. and Nagao, S. (2000) Characterization of the 'fluorescent fraction' of soil humic acids. In: *Humic Substances: Versatile Components of Plant, Soil and Water*, Ghabbour E. A., Davies G., Eds: The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 125-133.
- Aoyama, M. (2001) Do humic substances exhibit fluorescence? In: *Understanding and Managing Organic Matter in Soils, Sediments, and Waters*, Swift R. S., Spark, K. M., Eds: International Humic Substances Society, Inc., St. Paul, USA,

- pp. 125-131.
- 青山正和・長尾誠也・E. A. Ghabbour・G. Davies (2002) 腐植酸の逆相HPLC、日本腐植物質学会第18回講演会講演要旨集、pp. 25-26.
- 青山正和・渡辺 彰・長尾誠也・E. A. Ghabbour・G. Davies (2003) モノリスディスクカラムを用いた腐植物質の逆相HPLC、日本腐植物質学会第19回講演会講演要旨集、pp. 33-34.
- 青山正和・荒谷崇史・渡辺 彰・筒木 潔 (2006) モノリスディスクカラムを用いた腐植物質の逆相HPLCにおいて分離する成分の性状、日本腐植物質学会第22回講演会講演要旨集、pp. 40-41.
- 青山正和 (2008) モノリスチューブカラムを用いたHPLCにより分画した腐植物質のDRIFTスペクトル、日本腐植物質学会第24回講演会講演要旨集、pp. 8-9.
- Aoyama, M., Karim, S. and Okuyama, Y. (2010) Two-dimensional gel electrophoresis of humic acids. In: *Advanced in Natural Organic Matter and Humic Substances Research 2008-2010*, Vol. 1, González-Pérez J. A., González-Vila F. J., and G. Almendros G. Eds: DigitalCSIC, Madrid, Spain, pp. 27-30.
- 青山正和 (2013) 親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) による土壌腐植酸およびフルボ酸中の蛍光成分の分離、日本腐植物質学会第29回講演会講演要旨集、pp. 15-16.
- Aoyama, M. (2014) Isolation of fluorescent constituents from soil humic and fulvic acids by hydrophilic interaction chromatography. *Geophys. Res. Abstr.* **16**, EGU2014-2036.
- Aoyama, M. (2015) Separation of acid-soluble constituents of soil humic acids by dissolution in alkaline urea solution and precipitation with acid. *Chem. Biol. Technol. Agric.* **2**, 16.
- Aoyama, M. (2016) Fluorescent properties of soil humic and fulvic acids revealed by hydrophilic interaction chromatography and excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy. The 18th Meeting of the International Humic Substances Society, O1-10.
- 青山正和 (2017) 親水性相互作用クロマトグラフィーによる腐植酸・フルボ酸構成成分の分離、日本腐植物質学会第33回講演会講演要旨集、pp. 19-20.
- 青山正和 (2018) 高速液体クロマトグラフィーによる土壌腐植酸構成成分の解析、日本土壌肥料学会講演要旨集 **64**、10.
- Aoyama, M. and D. Sawame (2018) Separation of the constituents of fulvic acids by HILIC and RP-HPLC. The 19th Meeting of the International Humic Substances Society, O1-1.
- Aoyama, M. (2019) Comparison of constituents of dissolved organic matter in soil and lake water by two-dimensional HPLC. 7th International Symposium on Soil Organic Matter Oral Abstracts, p. 4.
- 青山正和・前田和輝・入戸野 理 (2019) 高速液体クロマトグラフィーによる土壌フルボ酸と湖水フルボ酸の構成成分の比較、日本腐植物質学会第35回講演会講演要旨集、pp. 49-50.
- Ewald, M., Berger, P. and Visser, S. A. (1988) UV-visible absorption and fluorescence properties of fulvic acids of microbial origin as functions of their molecular weight. *Geoderma* **43**, 11-20.
- Hayase, K. and Tsubota, H. (1985) Sedimentary humic acid and fulvic acid as fluorescent organic materials. *Geochim. Cosmochim. Acta* **49**, 159-163.
- Karim, S. and Aoyama, M. (2013a) Separation of humic acid constituents by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of concentrated urea using a preparative electrophoresis system. In: *Functions of Natural Organic Matter in Changing Environment*, Part 1, Xu, J., Wu, J., He, Y., Eds: Springer, Netherlands, pp. 135-140.
- Karim, S. and Aoyama, M. (2013b) Fractionation of the constituents of soil humic acids by preparative polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of concentrated urea. *Soil Sci. Plant Nutr.* **59**, 827-839.
- Karim, S., Okuyama, Y. and Aoyama, M. (2013) Separation and characterization of the constituents of compost and soil humic acids by two-dimensional electrophoresis. *Soil Sci. Plant Nutr.* **59**, 130-141.
- Levesque, M. (1972) Fluorescence and gel filtration of humic compounds. *Soil Sci.* **113**, 346-353.
- Ma, X., and Green, S. A. (2008) Fractionation and spectroscopic properties of fulvic acid and its extract. *Chemosphere* **72**, 1425-1434.
- Miano, T. M., Spósito, G. and Martin, J. P. (1988)

- Fluorescent spectroscopy of humic substances. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **52**, 1016–1019.
- Piccolo, A. (2001) The supramolecular structure of humic substances. *Soil Sci.* **166**, 810–832.
- Richard, C., Guyot, G., Rivaton, A., Trubetskaya, O., Trubetskoj, O., Cavani, L. and Ciavatta, C. (2007) Spectroscopic approach for elucidation of structural peculiarities of Andisol soil humic acid fractionated by SEC-PAGE setup. *Geoderma* **142**, 210–216.
- Richard C., Coelho C., Guyot G., Shaloiko L., Trubetskoj O. and Trubetskaya O. (2011) Fluorescence properties of the <5 kDa molecular size fractions of a soil humic acid. *Geoderma* **163**, 24–29.
- Simpson, A. J., Kingery, W. L., Hayes, M. H. B., Spraul, M., Humpfer, E., Dvortsak, P., Kerssebaum, R., Godejohann, M. and Hofmann, M. (2002) Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. *Naturwissenschaften* **89**, 84–88.
- Sutton, R. and Sposit, G. (2005) Molecular structure in soil humic substances: the new view. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 9009–9015.
- Schnitzer, M. and Khan, S. U. (1972) *Humic Substances in the Environment*. Marcel Dekker, Inc., New York, p. 55.
- Seitz, W. R. (1981) Fluorescence methods for studying speciation of pollutants in water. *Trends Anal. Chem.* **1**, 79–83.
- Senesi, N., Miano, T. M., Provenzano, M. R. and Brunetti, G. (1991) Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Sci.* **152**, 259–271.
- Trubetskaya, O. E., Trubetskoj, O. A., Guyot, G., Andreux, F. and Richard, C. (2002) Fluorescence of soil humic acids and their fractions obtained by tandem size exclusion chromatography–polyacrylamide gel electrophoresis. *Org. Geochem.* **33**, 213–220.
- Trubetskaya, O. E., Shaloiko, L. A., Demin, D. V., Marchenkov, V. V., Proskuryakov, I. I., Coelho, C. and Trubetskoj, O. A. (2011) Combining electrophoresis with detection under ultraviolet light and multiple ultrafiltration for isolation of humic fluorescence fractions. *Anal. Chim. Acta* **690**, 263–268.
- Trubetskoj, O. A., Kudryavceva, L. Y. and Shirshova, L. T. (1991) Characterization of soil humic matter by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of denaturing agents. *Soil Biol. Biochem.* **23**, 1179–1181.
- Trubetskoj, O. A., Richard, C., Guyot, G., Voyard, G. and Trubetskaya, O. E. (2012) Analysis of electrophoretic soil humic acids fractions by reversed-phase high performance liquid chromatography with on-line absorbance and fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* **1243**, 62–68.
- Trubetskoj, O. A. and Trubetskaya, O. E. (2017) Three-dimensional fluorescence analysis of chernozem humic acids and their electrophoretic fractions. *Eurasian Soil Sci.* **50**, 1018–1024.