

PEAT MOSH CHINA HUMIC SUBSTANCES PREPARATION AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES

立花陽子, 田和理市
(広島国際大学薬学部・薬物生体分析学教室*)

Preparation and Characterization of Humic Substances in Peat

Yoko TACHIBANA and Riichi TAWA

Laboratory of Medicinal and Biochemical Analysis, Faculty of Pharmaceutical Science,
Hiroshima International University

Summary

Humic substances (HS) are natural organic matters originated from plants which have been formed during the microbial degradation in soil and water. They show physical, chemical and biological activities and have been used for the soil supplement and the means for the purification of environment. The effects for the growth of plants and the thermal effects of peat have been also reported. In this study, HS were prepared from peat and were characterized by total polyphenol contents, UV-VIS and IR spectral analysis and high performance size exclusion chromatography (HPSEC), to improve the usefulness in the field of medicine. According to the IHSS (International Humic Substances Society) method, humic acid (HA) fraction and fulvic acid (FA-1~4) fractions were prepared. The yields of HA and FAs were 7.9 % and 0.2 %, respectively. The total polyphenol contents of HA (400 mg/g) was higher than those of FA-1~3 (260, 300, and 350 mg/g, respectively). The UV-VIS spectrum of HA showed λ_{max} at 215 nm and shoulder at 280 nm, on the other hand, those of FA-1~3 showed λ_{max} at 210~215 nm and shoulder at 330 nm. Based on the analysis of HPSEC, the molecular weight of HA distributed wide range ($10^2 \sim 10^4$) than FAs (10^3). Since both of HA and FAs contain polyphenol, they are expected as antioxidants.

腐植物質は土壌・水中に存在する植物が腐植して生じる有機物質で、世界各地に大量に分布する草炭の主成分である。アルカリおよび酸に対する溶解性からフミン酸 (HA)、フルボ酸 (FA) およびヒューミンに分けられる。いずれも単一の化合物ではなく、種々の官能基 (-COOH, -OH, -NH₂など) を有する不均一な混合物であり、分子量は数百から数十万にわたっている。また材料の産出地および調製法の違いにより、得られる腐植物質が異なる。このような理由により構造決定は極めて困難であり、平均化学構造モデル (Fig. 1) が提唱されている^{1,2)}。

腐植物質には物理的、化学的および生物学的作用が認められている。農業分野では保水性・緩衝剤的特性から土壌改良剤として利用され、環境衛生分野では金属イオンとの錯形成能による環境浄化の目的で活用されている。また、生物学的作用としては、主に植物の発芽・成長・病原菌に対する抵抗性および植物酵素活性に対する効果などが研究されてきた^{3,4)}。これらの効果は動物細胞に対しても期待できるものであり、腐植物質を含む温泉には血液循環の促進・外傷回復および皮膚保湿効果があると言われている⁵⁾。

腐植物質の医療分野における有効利用を目指して、PEAT MOSH CHINAからの調製法の検討および得られた試料の物理化学的分析を行った。すなわち、国際腐植物質学会 (IHSS) による方法に準じてHAおよびFAを分画調製し、得られた画分

*所在地：呉市広古新開5-1-1 (〒737-0112)

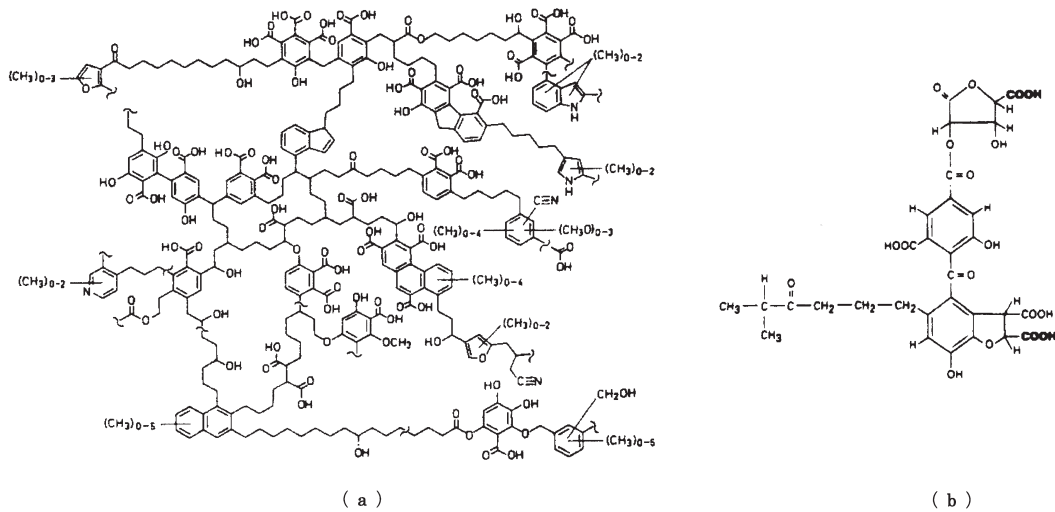


Fig. 1 The model structures of humic substances. (a) HA from soil; (b) FA from river.

について、総ポリフェノール量、UV-VIS・IRスペクトルおよび高速サイズ排除クロマトグラフィー（HPSEC）による分子量分布の測定を行った。

実験方法

1. 腐植物質の調製

腐植物質の調製はIHSS法⁶⁾に準じて以下のように行った。北海道産ピートモス（高橋ピートモス工業：北海道石狩郡当別町）30 gを1 M NaOHでpH 7にしたのち、N₂ガス下0.1 M NaOH（600 mL）で時々振盪しながら室温で一晩抽出し、遠心分離（1,500 g, 15分間）して上清を得た。上清を3 M HClでpH 2に合わせ、16時間静置後遠心分離（1,500 g, 15分間）してFA画分（上清）とHA画分（沈殿）に分けた。HA画分を0.1 M KOHで溶解してKClを添加し、4時間静置後遠心分離（6,000 g, 20分間）により夾雑物を除いた。再度3 M HClでpH 2に合わせ、16時間静置後遠心分離（1,500 g, 15分間）して沈殿を得た。この沈殿を水に懸濁し、透析チューブ（スペクトラバイオテックメンブレン MWCO：3,500）に移して蒸留水で3日間、水を換えながら透析を行い、その後凍結乾燥した。FA画分はDAX-8（スベルコ）カラムにかけ、吸着分画を0.1 M NaOHおよび蒸留水で溶出し（FA-1～4）、陽イオン交換樹脂（Dowex 50w × 2）で脱塩後凍結乾燥した。

2. 総ポリフェノールの定量

フォルイン-デニス法⁷⁾に準じ、HAおよびFA-1～3中の総ポリフェノールの定量をGallic acid (GA)を標準物質として以下のように行った。試料（0.1 w/v % NaOH）100 μL、フェノール試薬（1 N）20 μLおよび0.2 w/v % Na₂CO₃（0.1 M NaOH）100 μLをよく攪拌し、室温で1時間放置後700 nmにおける吸光度を測定した。

3. UV-VIS・IRスペクトル

HAおよびFA-1～3（各0.2 mg/mL 0.1 w/v % NaOH）の200 nm～700 nmのUV-VISスペクトルをShimadzu UV-2450PCで測定した。HAのIRスペクトルをKBr錠剤法によりフーリエ変換赤外分光光度計Shimadzu IR-Prestageで測定した。

4. HPSEC

HAおよびFA-1～3の分子量の分布を以下の条件でHPSECにより測定した。カラム：Shodex SB-803 HQ（8.0 × 300 mm）、溶出液：50 mM リン酸緩衝液（PB）pH 7.0、流速：0.5 mL/min、検出：260 nm（Shimadzu SPD-6A）。分子量標準物質としてPolyethylene glycol (PEG) 20,000（平均分子量 20,000）、PEG 4,000（平均分子量 3,000）、PEG 400（平均分子量 400）、GA（分子量 188.13）を用いた。

結果および考察

北海道産ピートモス 30 g から腐植物質を調製し、HA (収率 7.9%) と FA-1~4 (収率 0.2%) を得た (Table 1)。HA と FA-1~3 について、GA を標準物質として、フォリン-デニス法により総ポリフェノールの定量を行い Table 1 の結果を得た。HA は約 400 mg/g で、各 FA (FA-1: 260 mg/g, FA-2: 300 mg/g, FA-3: 350 mg/g) よりも含量が高かった。

HA および FA-1~3 の UV-VIS スペクトルを測定し Fig. 2 の結果を得た。UV-VIS スペクトルは HA, FA-1~3 とともに 215 nm 付近に極大吸収があり、HA では 280 nm, FA では 330 nm 付近にショルダーが認められた。HA の IR-FT スペクトルをフーリエ変換赤外分光光度計で測定し、Fig. 3 の結果を得た。主な吸収帯の波数は $3,300-3,400\text{ cm}^{-1}$ (水酸基の νOH)、 $1,716\text{ cm}^{-1}$ (カルボニル基の $\nu\text{C=O}$)、 $1,608\text{ cm}^{-1}$ (芳香環の $\nu\text{C=C}$)、 $1,400-1,500\text{ cm}^{-1}$ (δCH)、 $1,226\text{ cm}^{-1}$ (カルボキシル基の $\nu\text{C-O}$ と δOH) で、泥炭土 HA の IR スペクトルと類似したパターンを示した⁸⁾。

HPSEC で分子量の分布を測定し、Fig. 4 の結果を得た。HA では分子量は数百から数万にわたり、FA-1~3 はいずれも数千くらいの分子量の分布を示した。これにより HA は FA-1~3 より分子量分布が広範囲にわたっていることが分かった。

北海道産ピートモスから調製した HA および FA-1~3 とともに高いポリフェノール含量を示したことから抗酸化活性を有することが予想される。FA を DAX-8 カラムからの溶出順に 1~4 に分け、分析を行ったが、総ポリフェノール含量にかなりの差があったものの UV-VIS スペクトル、HPSEC による分子量分布にはほとんど差が見られなかった。今後、種々の抗酸化活性試験を行い、総ポリフェノール含量と抗酸化活性との相関性について検討する。

Table 1 Yields of HA and FAs and their total polyphenol content.

Sample	Yield		Total polyphenol	
	g/30 g peat	(%)	mg / g	(%)
HA	2.366	(7.89)	421 ± 26.0	(42.1)
FA-1	0.008	(0.03)	258 ± 14.0	(25.8)
FA-2	0.022	(0.07)	299 ± 18.7	(29.9)
FA-3	0.017	(0.06)	346 ± 21.1	(34.6)
FA-4	0.008	(0.03)		n.d.

Values of total polyphenol content are means ± SD for 2 assays.
n.d.: not determined.

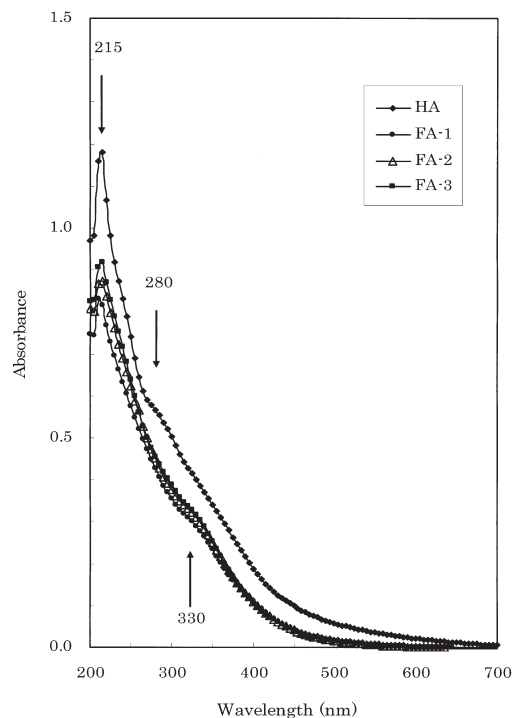


Fig. 2 The UV-VIS spectra of HA and FA-1~3.

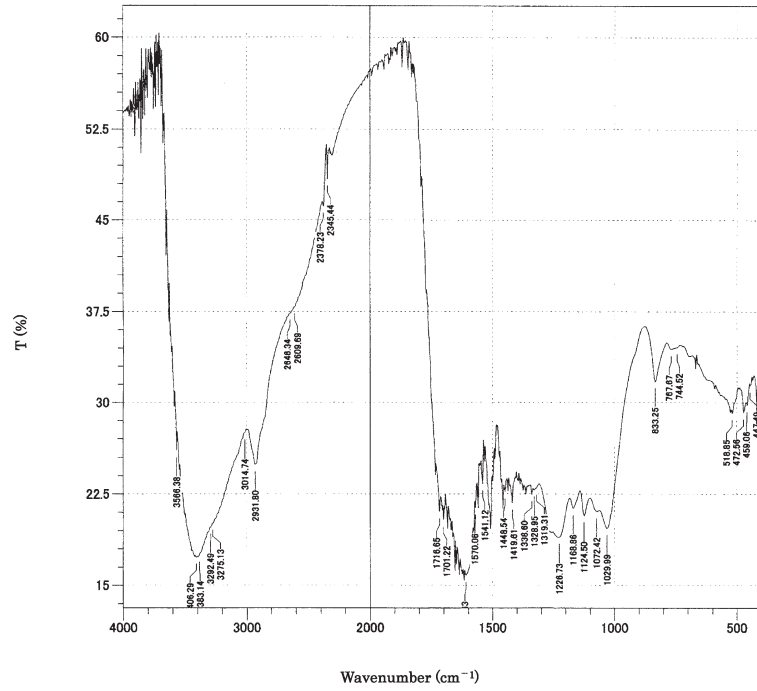


Fig. 3 FT-IR spectrum of HA.

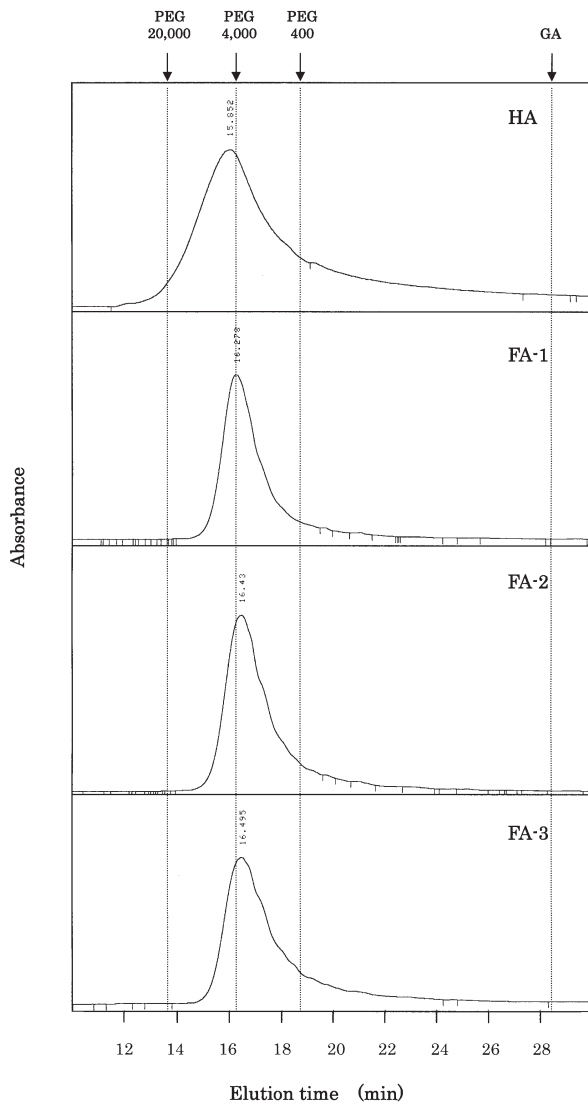


Fig. 4 HPSEC chromatogram of HA and FA-1~3. HPSEC was performed as follows : column, Shodex SB-803 HQ (8.0 × 300 mm) ; eluent buffer, 50 mM PB pH7.0 ; flow rate, 0.5 mL/min ; monitoring wavelength, 260 nm ; standard, PEG 20,000, PEG 4,000, PEG 400 and GA.

文 献

- 1) Schulten, HM and Schnitzer M (1991) A chemical structure for humic substances. *Naturwissenschaften* 78: 311-312.
- 2) Leenheer JA, Wershaw RL and Reddy MM (1995) Strong-acid, carboxyl-group structures in fulvic acid from the Suwannee river, Georgia. 2 Major structures. *Environ Sci Technol* 29: 399-405.
- 3) 山田パリーダ, 阿相圭介, 矢沢勇樹, 山口達明 (2002) 草炭, 風化炭から抽出したフミン酸, フルボ酸の植物生理活性効果, *土肥誌* 73(6) : 777-781.
- 4) Yamada P, Asou K, Adachi T, Yazawa Y and Yamaguchi T (2001) The growth promotion of rice root by humified substances extracted from peat and weathered coal. The 6th International Society for Root Research Symposium, Nagoya, Japan.
- 5) Kleinschmidt JG, Kleinschmidt JT, Erdl R and Brunner L (1985) Wärmetherapie mit Peloiden. *Z Phys Med Baln Med Klim* 14: 365-373.
- 6) International Humic Substances Society (1981) Outlines of extraction procedures.
- 7) Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult* 16(3): 144-158.
- 8) Fujitake N, Kusumoto A, Yanagi Y, Suzuki T and Otsuka H (2003) Properties of soil humic substances in fractions obtained by sequential extraction with pyrophosphate solutions at different pHs. III. FT-IR and ¹H NMR spectra of humic acids. *Soil Sci Plant Nutr* 49(3): 347-353.