

## 基礎講座

## 〔腐植物質研究の基礎講座〕

## その1. 腐植物質試料を得るために～IHSS法

藤嶽暢英\*

## 1. はじめに

腐植物質は地球表層圏の土壌、河川、湖沼、地下水、海水、地質堆積物中に含まれる有機態炭素の大部分を占めており、生物活性、炭素循環、金属元素や環境化学物質の移行挙動などに深く関わりをもつ。したがって、この物質を研究対象とする分野は、土壌学、地球科学、分析化学、環境科学から、近年では工学系や医薬学系にまで非常に広範囲におよんでいる。

しかし、「腐植物質は化学構造が特定できるような、あるひとつの純物質を指しているのではない」という事実は、この研究やこれに関連した研究にこれから取り組もうと意気込む学生諸君や研究者諸氏に二の足を踏ませてしまう。腐植物質に限らず研究する上で実験素材の特性を十分に理解することは当然のことだが、腐植物質が重要な構成成分であると認識されている土壌学の教科書でも、腐植物質に関する説明には数頁しか割かれていないのが実情である。したがって、実際に腐植物質の粉末試料を実験素材として手にしても、この粉末をどう取り扱うべきなのか、このやり方でイメージする成果に導くことができるのか、などの答えを初心者（未経験者）が得るのは難しい。優れた教科書として真っ先に頭に浮かぶ「Humus Chemistry」(Stevenson, 1994) は、これから研究をおこなおうという諸氏には是非精読をお勧めするが、これを読破するのはもちろん容易なことではない。すなわち、腐植物質の研究に踏み出す最初の一步の敷居は初心者にとって明らかに高いといえる。

そうした背景を踏まえ、日本大学の川東正幸先生、南九州大学の柳由貴子先生にご協力頂き、2005年秋に腐植物質研究のビギナーズセミナーを神戸大学で開催した（詳細は本巻33頁を参照）。セミナーは腐植物質を研究する上での試料の取り扱い方をできるだけ実際に即して説明するという方針でおこなった。本稿はそのセミナー内容を文章に起こし、改訂を加えたものであ

る。シリーズ一回目の本稿では筆者が露払いとして腐植物質試料の分離精製法について概説する。

## 2. 腐植物質とは…

「腐植物質とはどんな物質ですか？」と問われると、筆者の場合ははじめに「土壌や河川をはじめとする地球表層圏の環境中に広く存在する天然有機高分子成分であり、生体成分を起源として化学的・生物的な生体外反応を通じて生成された黄色から黒色を呈する成分です」と答えている。「で、結局どんな成分ですか？」と問い返され、「リグニンやメラニン、メラノイジンなどの褐変物質をご存知ですか？そうした成分が分解や変質を受けたり、それらが生成されるのと同じような化学反応がさらに土壌や河川の中で起こって時間をかけてできた成分で、物質というより混合物の総称です」と答える。不安な表情でうなずく相手に「手法的にはこれこうやって…こうしてとれる茶色い成分です」と説明すると、「はあ、そういう画分の名前みたいなもので混ざり物なのですね」やっと思えが得られた表情になってもらえる。

ここまでの説明で相手が混乱気味になっているのに、腐植物質は起源物質や生成される環境が変わると性質が大きく異なることをどうしても説明しておく必要が有る。そこで、「例えば土壌の腐植物質の場合、植物や微生物の遺体が主な起源ですが、そうした材料物質の組成はそもそも気候や植生、地形などで異なる訳で、そうした土壌環境が異なると土壌の無機成分組成も変わってきますから、材料物質がそれらと反応して腐植物質ができる生成過程も変わってきます」と話を続ける。「つまり、褐色森林土と泥炭土ではもちろんのこと、同じ黒ボク土でも草地と林地の場合で腐植物質の特性は変わってきます」と駄目押しする。「では、河川の腐植物質は土壌のものと違うのですか」と切り返されるが、「腐植物質としての一定の共通した属性はあるので

\* 神戸大学農学部助教授（神戸市灘区六甲台町1-1）



すが、河川では周辺土壌から流れ込む成分に加えて、プランクトンも関与してきますし、土壌とは生成環境が異なるので違うといえども違いますね」と答えることになる。

ここまでの問答からわかるように、腐植物質を用いる研究では少なくとも研究目的に添った腐植物質試料を用意して研究を組み立てる必要がある。河川における腐植物質と鉄の相互作用を明らかにするために土壌の腐植物質を使って実験したのでは多くの場合、結果をそのまま生かすことは難しい。実験を計画するには元になる試料が潤沢に用意できることが必須であるが、市販のフミン酸などを用いる場合はそうしたことに充分注意する必要がある(後述4. 参照)。

厄介なことに、腐植酸やフルボ酸といっても分離精製法が異なれば得られる腐植物質の性質は違ったものになる、という重大な問題を述べなければならない。そこで、「土壌からの抽出剤や抽出回数が違えば、抽出量のみならず得られる成分の性質も異なるし、河川水に溶存する腐植物質を濃縮する手法なら、それが樹脂吸着法か膜濃縮法かでも大きく違ってきます」と続け、さらに、「灰分処理をおこなった場合とそれを省いた場合や、腐植酸の透析時にそれをアルカリに溶かしてから中性付近に調製して透析チューブに入れた場合とアルカリに溶かさずに水で懸濁分散させてチューブに入れた場合でも、その後の実験に大きな影響がでることになります」と説明する。「それじゃ、同じ川の水から得たフルボ酸といっても手法が違えばデータの比較ができなかったりするのですか、それは困った…」。

腐植物質の抽出法や分離法の研究は長年にわたって研究されてきた基本的課題であり、手法が異なれば得られるものがいかに異なるかという情報は枚挙にいとまがない。この問題に頭を抱え始めた相手に対する救いの手は、「ですから、国際腐植物質学会(International Humic Substances Society)では国際法(IHSS法)を定め、少なくとも手法上の違いでもたらされるデータや解釈の齟齬を最小限に留めることを提唱しているのです」の一言である。

IHSS法は腐植物質を得るための最適な手法というよりも、むしろ相互比較のために暫定的な申し合わせとして制定された手法であり、研究目的によっては明らかに短所となる点も指摘されている(Kuwatsuka et al., 1990; Watanabe et al., 1994)。しかし、「国際法があるならそれに従って試料を得れば、同じ土俵で議論ができるし、論文の公表時に手法上のクレームはつかな

いわけですね」と納得してもらえる。「ちなみに、国際学会ではいろいろな由来の腐植物質が標準試料や参照試料として頒布されていて、それらの試料や日本腐植物質学会が頒布している標準試料(正確には参照試料)もこの方法で調製されたものです」と補足する。表1に現在手に入る標準(参照)試料の一覧を示した。その他にもいろいろ説明すべきことがあると思いつつも、「それ以上のことはこうした参考文献をまずはご一読下さい(表2)」とすると「これは後で勉強しますが、とりあえずそのIHSS法というのはどんな方法でしょうか」と問われる。そこで、次節では、IHSS法について詳述する。

表1 国際腐植物質学会および日本腐植物質学会から頒布されている腐植物質標準(参照)試料

名称	起源	種類
<b>IHSS Standard Samples</b>		
Swanee River	米国河川水	HA/FA
Elliott Soil	米国モリソル土	HA/FA
Florida Peat	米国PEAT 1	HA/FA
Leonardite	米国リグナイト	HA
<b>IHSS References Samples</b>		
Swanee River	米国河川水	HA/FA
Nordic Aquatic	ノルウェー貯水池	HA/FA
Pony Lake	南極湖水	FA
Florida Peat	米国PEAT 1	HA/FA
Waskish Peat	米国PEAT 2	HA/FA
<b>JHSS References Samples</b>		
Inogashira	日本黒ボク土	HA/FA
Dando	日本褐色森林土	HA/FA

### 3. IHSS法について

IHSS法の手順はSwift(1996)に記載されており、IHSSの公式Webページ上でも公開されている(<http://www.ihss.gatech.edu/>)。この手順をフローチャートに表したものが図1である。

IHSS法は土壌(あるいは地質堆積物、その他の固体試料)から腐植物質を分離精製する手順であり、河川などの水溶液中の腐植物質を分離精製する手法はIHSS法として制定されていない。ただし、IHSSが頒布している河川由来の標準腐植物質試料の調製法が上述のWebページ上で公開されており、実質的にこの手法がIHSS法の水系試料版と認識されている。この手順を図2のフローチャートに表した。



表2 腐植物質に関する主な参考文献（和文）

著者(年)	題目と出版・雑誌名
熊田恭一(1982)	土壤有機物の化学(第2版), p.304, 学会出版センター
米林甲陽(1988)	腐植物質研究法. I, ペドロジスト, 32, 138~150
米林甲陽(1989)	腐植物質研究法. II, ペドロジスト, 33, 37~48
米林甲陽(1989)	腐植物質研究法. III, ペドロジスト, 33, 129~143
筒木 潔(1989)	7 土壤有機物. 季刊 化学総説 No.4 土の化学, 日本化学会編, p.81-95, 学会出版センター
米林甲陽(1993)	III 腐植物質の平均化学構造推定法および XAD 樹脂による分画法. 土壤構成成分分析法-新しい手法, 新しい考え方-, 日本土壤肥料学会編, p.55-80, 博友社
渡辺 彰(1994)	III 腐植酸, フルボ酸試料調製法とフルボ酸の分画法, 土壤構成成分分析法(III) -新しい手法・新しい考え方-, 日本土壤肥料学会編, p.59~83, 博友社
石渡良志, 筒木潔, 米林甲陽, 篠塚則子, 宮島徹, 河口英樹 (1995)	【特集】フミン物質とその水環境へのかかわり, 水環境学会誌, 18巻, 4号, 251-274
宮島 徹, 森めぐみ (1996)	腐植物質の溶液内錯平衡. 分析化学, 45巻, 5号, 369-399
藤嶽暢英(2002)	現代土壤学の断面 [15] -腐植物質の化学構造をどうイメージするか, 農業と園芸, 77巻, 3号, 403-411
米林甲陽(2002)	我が国の腐植物質研究とその展望 1. 腐植物質研究の成果と問題点, 日本土壤肥料学雑誌, 73巻, 5号, 549-554
渡辺 彰(2002)	我が国の腐植物質研究とその展望 2. 腐植物質の抽出および分画, 日本土壤肥料学雑誌, 73巻, 6号, 797-802
藤嶽暢英(2003)	我が国の腐植物質研究とその展望 3. 腐植物質分析の技術と今後期待される分析手法, 日本土壤肥料学雑誌, 74巻, 2号, 223-228
長尾誠也(2003)	我が国の腐植物質研究とその展望 4. 環境中での腐植物質の存在意義とその機能, 日本土壤肥料学雑誌, 74巻, 3号, 371-376
米林甲陽, 今井章雄, 福嶋正巳, 藤嶽暢英, 山本修一, 長尾誠也, 田中俊逸(2004)	【特集】水環境における腐植物質の役割と分析法の進歩, 水環境学会誌, 27巻, 2号, 75-99
筒木潔, 隅田裕明, 青山正和, 進藤晴夫, 宮島 徹, 川東正幸, 藤嶽暢英(2004)	陸域生態系での土壤有機成分の役割とその機能, 日本土壤肥料学会誌, 75巻, 4号, 511-517
石渡良志(2004)	日本腐植物質学会に至る経緯と今後の課題, Humic Substances Research, 1巻, 1号, 3-8
石渡良志(2004)	地球化学講座第4巻「有機地球化学」, 第5章. 腐植物質およびケロジェン, 石渡良志・山本正伸共編, p.121-158, 培風館

これらの文献情報を前にして、いざ実際に操作を進めようとしても、細かな面で戸惑うことが多い。例えば、アルカリ抽出後に酸沈殿で得た腐植酸画分のその後の操作に、「できるだけ少量の0.1M KOHで溶解後、KClの粉末を最終濃度0.3Mになるように添加し、遠心分離する」という操作がある（操作6を参照）。塩の添

加効果によって粘土などの不純物を凝集させて沈殿除去する操作である。この操作では腐植酸を完全に溶解させることが最も肝要となるが、暗褐色で高濃度の腐植酸溶液が溶けているかどうかを目視判断することは、初心者であった当時の筆者にとっては困難であった。また、KClを加えてどの程度時間が経てば遠心分離に



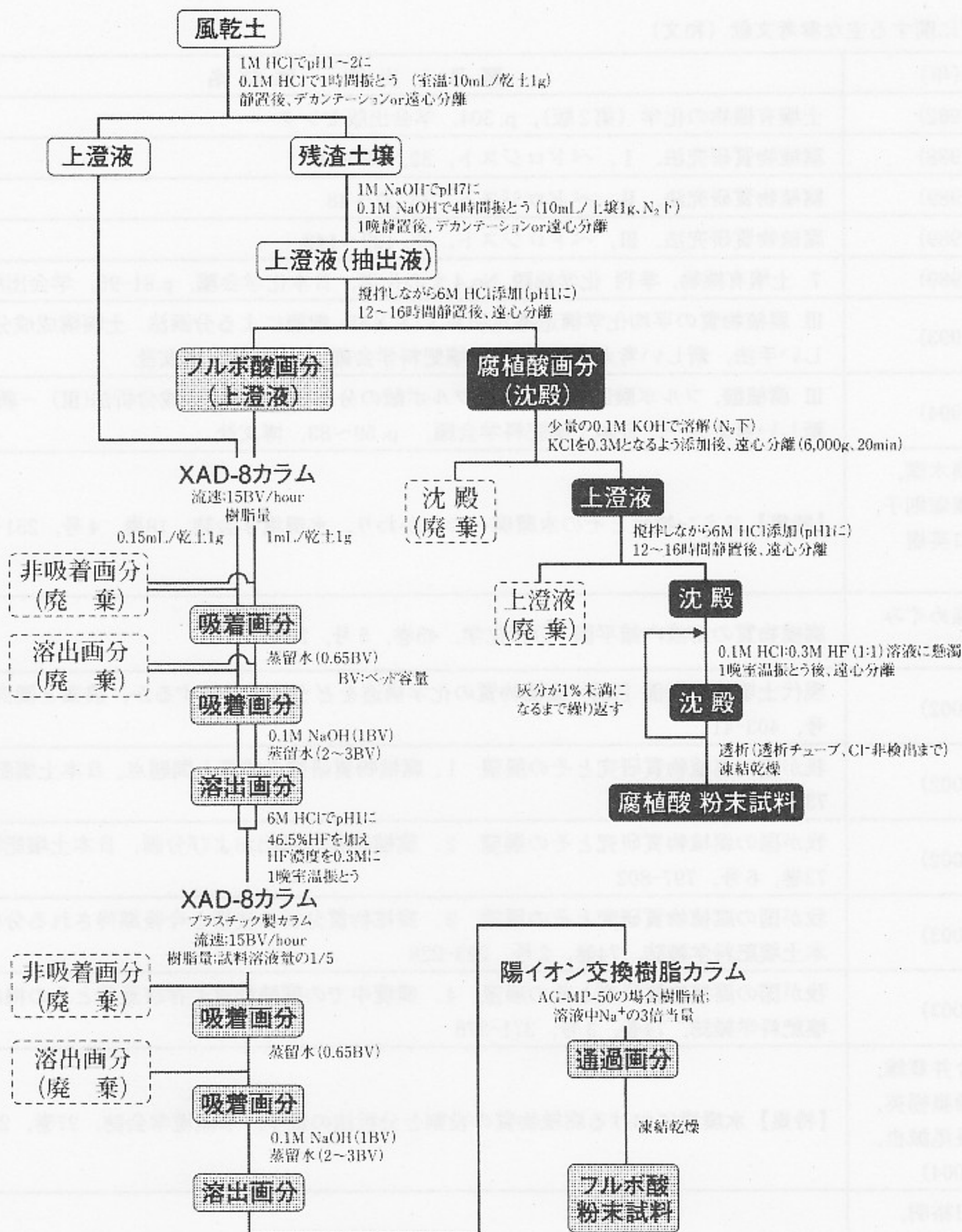


図1 IHSS法(土壌試料)のフローチャート

かかって良いのかが記述されておらず、塩添加後24時間までのデータを取ったことすらある。結局、1時間から24時間の間でそれほど違いはなく、むしろ添加後すぐに遠心し、一晩置いて念のためにもう一度遠心した方が効果的であった。

いずれにせよ、長年腐植物質や少なくとも土壌を取り扱ってきた研究室ではまだしも、未経験者にとってはいちいち不明な点が多く、これではせっかく統一法として推奨されていても手がける方は戸惑いが多い。

そこでこの場を借りて、IHSS法で土壌腐植酸の粉末

試料を0.5~1g(フルボ酸の場合は0.1~0.2g)得ようとした場合の手順について、できるだけ実際に即した形で説明する。参考文献の当該箇所やチャート図を参照しながら操作を確認してほしい。

#### 【IHSS法の詳細】

1) 植物根や落葉落枝、樹皮として目視確認できるものをできるだけ取り除いて2mmの篩を通した風乾土試料を用意する。この試料15gをポリ製蓋付300mL用遠沈管(以下遠沈管)に秤取り、1M塩酸20mLを加えて軽くゆすって懸濁させる。懸濁



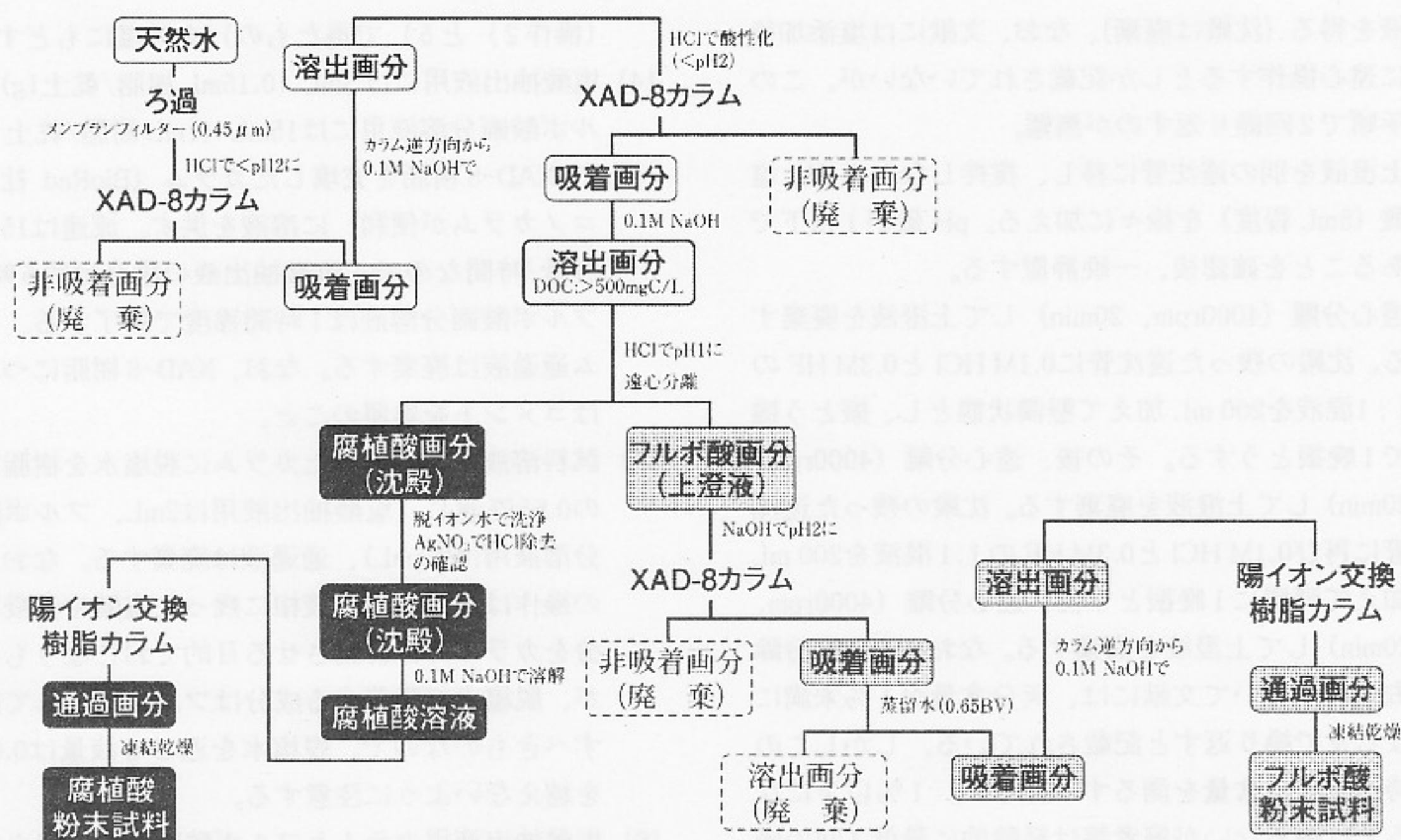


図2 IHSS法(水試料)のフローチャート

液の pH 値が 1～2 となっていることを pH 試験紙で確認する（これ以後の pH 値の確認はすべて pH 試験紙でおこなうが、例えばスリーバンド試験紙 (Macherey-Nagel 社製) が便利である)。その後、0.1M 塩酸 130mL を加え、振とう機で 1 時間振とうする。なお、一部の塩基性土壌を除けば通常はこの操作で土壌懸濁液の pH 値は 1～2 となるが、ならない場合はさらに 1M HCl を加える。

- 2) 遠心分離 (4000rpm、20min) で得た上澄液を No.2 ろ紙でろ過する。ろ液は暗所冷蔵保存し操作 13) へ。なお、文献にはろ過操作は記載されていないが、その後のカラム操作などへの影響を考えるとろ過した方が無難である。また、保存期間はせいぜい 2 週間程度までに留めないとカビ等が発生する可能性が有る。凍結保存は後に不溶物が生じることも多いので不可。操作 5) で得たフルボ酸画分についても同様の注意が必要。
- 3) 遠沈管に残った沈殿に 1M NaOH を 5～10mL 程度加えて懸濁し、懸濁液の pH 値が 7 以上になっていることを確認後、0.1M NaOH 140～145mL を加える。窒素置換 (遠沈管の気相部に N<sub>2</sub> ガスを送り、気相部のガスを窒素に置換する) 後に蓋を閉めて振とう機で 4 時間以上 (一晩まで) 振とうする。
- 4) 遠心分離 (9000rpm、30min) で得た上澄液を別の

遠沈管に移し、6M 塩酸 (5mL 程度) を攪拌しながら徐々に加える。pH 値が 1 以下になったことを確認後、一晩静置する。残渣土壌は廃棄。

- 5) 遠心分離 (4000rpm、20min) で上澄液 (フルボ酸画分) と沈殿 (腐植酸画分) にわけける。上澄液は No.2 ろ紙でろ過する。ろ液は暗所冷蔵保存し操作 13) へ。
- 6) 遠沈管内の沈殿に脱塩水 50mL を加えて、振とう器で 1 時間程度激しく振とうする。固形物が分散し、充分懸濁状態となったところに 0.2M KOH 50～100mL を加えてゆるやかに攪拌し、pH 値が 12 以上となったことを確認する。なお、文献にはできるだけ少量の 0.1M KOH で溶解すると記載されているが、判断が難しいため、水でできるだけ分散させてから KOH 溶液を加え、pH 値を確認後、最終濃度が 0.1M となるように水を加えるようにしている。
- 7) 溶解した液に KCl 粉末を溶液の最終濃度が 0.3M になるように添加し (脱塩水 50mL + KOH 50mL の場合なら約 2.2g)、窒素置換後に振とう機で 1 時間振とうする。振とう後、遠心分離 (9000rpm、30min) して上澄液を得る (沈殿は廃棄)。上澄液を別の遠沈管にとり、窒素置換後、冷暗所に一晩静置し、その後再び遠心分離 (9000rpm、30min) して上澄



液を得る（沈殿は廃棄）。なお、文献には塩添加後に遠心操作するとは記載されていないが、この手順で2回繰り返すのが無難。

- 8) 上澄液を別の遠沈管に移し、攪拌しながら6M 塩酸（5mL 程度）を徐々に加える。pH 値が1以下であることを確認後、一晩静置する。
- 9) 遠心分離（4000rpm、20min）して上澄液を廃棄する。沈殿の残った遠沈管に0.1M HCl と0.3M HF の1:1混液を200 mL 加えて懸濁状態とし、振とう機で1晩振とうする。その後、遠心分離（4000rpm、20min）して上澄液を廃棄する。沈殿の残った遠沈管に再び0.1M HCl と0.3M HF の1:1混液を200 mL 加えて同様に1晩振とう後、遠心分離（4000rpm、20min）して上澄液を廃棄する。なお、この灰分除去処理について文献には、灰分含量が1%未満になるまで繰り返すと記載されている。しかしこの時点で灰分含量を測るすべはない。1%以下になるとは限らないが筆者等は経験的に最低3回の繰り返し処理をおこなっている。また、この処理は温度によって効果が大きく変わるので、室温25～30℃の環境でおこなうこと。
- 10) 沈殿の残った遠沈管に0.05M HCl 100mL を加えて懸濁状態とし、ただちに遠心分離（4000rpm、20min）して上澄液を廃棄する。なお、この操作はフッ酸塩酸混液の洗浄でその後の透析操作を少しでも短縮するためにおこなっているもので、文献には記載されていない。
- 11) 沈殿の残った遠沈管に脱塩水50mL を加えて懸濁・分散させ、これを透析チューブ（Visking社製透析チューブ：MWCO 10、000 dalton）に入れる。この場合のチューブサイズは43mm×400mm程度が妥当。チューブは脱塩水の入った2Lビーカーに入れ、日に2～3回脱塩水を交換し、最低4日間以上透析を続ける。透析外液に硝酸銀による塩素試験を施し、陰性になるまで透析を続けると文献に記載されているが、筆者等は電気伝導度計（測定値0.1mS/m以下）で確認している。
- 12) チューブ内の懸濁液を脱塩水で洗いながら500mL 容ポリ容器に移し、冷凍庫に入れて凍結させる（一晩）。凍結後の容器の蓋口部に No2 ろ紙をあてがい、輪ゴムでしっかりとろ紙を固定して凍結乾燥機に供する。約3日後に得られた乾燥物をメノウ乳鉢で粉碎・均一化して精製腐植酸試料とする。
- 13) 冷蔵保存していた塩酸抽出液とフルボ酸画分溶液

（操作2）と5）で得たもの）を常温にもどす。

- 14) 塩酸抽出液用には3mL（0.15mL 樹脂/乾土1g）、フルボ酸画分溶液用には15mL（1mL 樹脂/乾土1g）の XAD-8 樹脂を充填したカラム（BioRad 社のエコノカラムが便利）に溶液を供す。流速は15樹脂容量/時間なので、塩酸抽出液の場合は約5時間、フルボ酸画分溶液は1時間程度で終了する。カラム通過液は廃棄する。なお、XAD-8 樹脂についてはコメントを参照のこと。
- 15) 試料溶液を供し終えたカラムに脱塩水を樹脂容量の0.65倍通じ（塩酸抽出液用は2mL、フルボ酸画分溶液用は9.5mL）、通過液は廃棄する。なお、この操作はカラム内の液相に残った塩酸や非吸着成分をカラム外に排出させる目的でおこなうものだが、脱塩水で脱着する成分はフルボ酸として回収すべきものなので、脱塩水を通じる液量は0.65倍を越えないように注意する。
- 16) 塩酸抽出液用カラムとフルボ酸画分溶液用カラムの吸着成分を溶出するためにそれぞれ0.1M NaOH を1樹脂容量通じ、その後脱イオン水を3～5樹脂容量通じて溶出液を回収する。なお、文献にはカラム溶出操作は流路を逆方向にして溶出をおこなうと記載されているが特にその必要はない。
- 17) 両カラムから回収した溶出液を合わせて250mL 容ポリ容器に入れ、6M 塩酸（0.5～1mL 程度）を攪拌しながら加え、pH 値が1以下であることを確認する（容器中の液量は70～90mL 程度）。この溶液に最終濃度が0.3M になるように HF（46.5%）を加え（ポリ製スポイトで1mL 弱）、室温で一晩静置する。
- 18) 15mL（溶液量の1/5容量）の XAD-8 樹脂を充填したポリ製カラム（ルアーロック型の注射器で図3のようなものを自作すると便利）に溶液を供する（流速は15樹脂容量/時間）。カラム通過液は廃棄する。試料溶液を供し終えたカラムに脱塩水を樹脂容量の0.65倍通じ（この場合は9.5mL）、通過液は廃棄する。

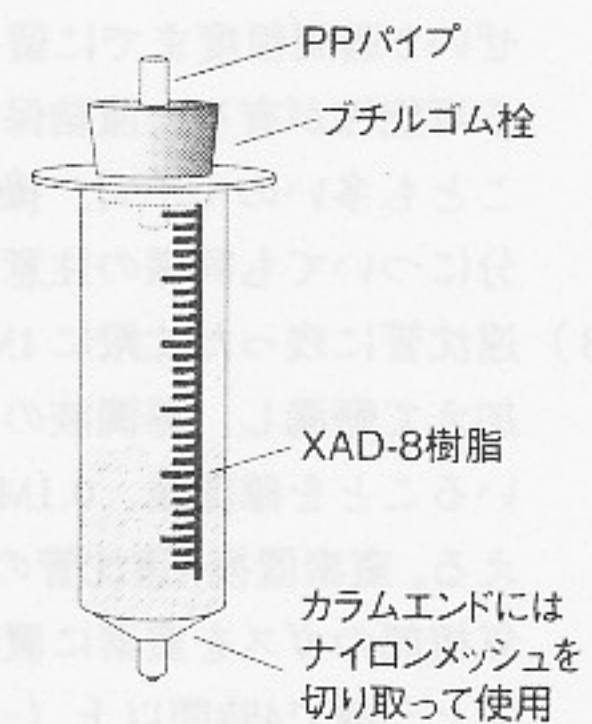


図3 自家製プラスチックカラム



- 19) 0.1M NaOH を1カラム容量通じ、その後脱イオン水を3カラム容量通じて溶出液を回収する。このアルカリ溶液はすぐさま陽イオン交換樹脂 (Bio-rad 社 AGMP-50、樹脂量3~5mL) に通じ、通過液を250mL 容ポリ容器に回収し、冷凍庫で凍結させる (一晚)。
- 20) 凍結後の容器の蓋口部に No2ろ紙をあてがい、輪ゴムでしっかりろ紙を固定して凍結乾燥機に供する。得られた乾燥物をメノウ乳鉢で粉碎・均一化して精製フルボ酸試料とする。

#### 【コメント】

- 1) ここでは黒ボク土と褐色森林土のA層土壌を例にしている。いずれの土壌でも腐植酸が1g (フルボ酸は0.1g) 程度得られるが、土壌の種類や層位に応じて多少異なる場合がある。定量分析をおこなえば、通常黒ボク土の方が有機物量は圧倒的に多く、腐植物質は多く得られるはずである。しかし、IHSS法は1回のアルカリ抽出操作で腐植物質を得るため、両土壌での収量差は思ったほど大きくはない。ちなみに、抽出残渣を廃棄せずに2回目のアルカリ抽出をおこなった場合、1回目の収量の3割程度が得られる。
- 2) Rohm & Haas 社の XAD-8 (メチルメタクリル酸エステル) 樹脂は既に製造中止のため、同等品として DAX-8 が Supelco 社から販売されている。IHSS ではその他、Polyclar (ポリビニルピロリドン架橋体) 樹脂などの使用も認めている。いずれにしても、購入した樹脂は使用前に十分な洗浄が不可欠であり、未洗浄の樹脂から溶出される不純物は炭素ベースで1000ppm に及ぶことが知られている (図4) (Thurman & Malcolm, 1981)。また、樹脂は多孔性ポリマーなので、カラム充填前に脱気操作を施す必要がある。なお、陽イオン交換樹脂についても図4に示した洗浄が必要である。
- 3) XAD-8 樹脂から吸着成分を溶出しても樹脂に依然として着色成分が残る。これらはメタノールである程度取り去ることができる。樹脂をビーカーに取り出し、バッチ法で水→メタノール→水→0.1M HCl →水→0.1M NaOH→水の工程を3回以上繰り返して洗浄すれば再利用できる。どうしても着色成分の除去が難しい場合はコメント1) に従って洗浄する。
- 4) 樹脂吸着法によらずに膜処理等でフルボ酸を濃縮脱塩する場合、 $Al^{3+}$  などによる共沈を防ぐために希

塩酸で膜処理や透析をおこない、多価カチオンを排除した後に脱塩水で透析する手順がコメントとして記載されている。ただし、こうして得られた試料はフルボ酸ではなく、フルボ酸画分と呼ぶべきであるとしている。

- 5) IHSS 法では塩酸抽出画分とフルボ酸画分を別々に樹脂吸着処理してから溶出液の段階で合わせると記述されている。しかし、あらかじめ両画分を一つにしてからカラム処理することに問題があるとは思えないので筆者等はその手法でフルボ酸を精製している。また、フルボ酸に対するフッ酸塩酸処理 (操作17~18) は1回となっているが、多くの場合2回繰り返した方が確実である。この場合、プラスチックカラムからのアルカリ溶出液をただちに酸性化してフッ化水素を添加し、一晚静置後、再度プラスチックカラムに供する。この吸着分画操作で収量は6割程度に下がる。

#### 【水試料の場合】

紙面の都合上水試料の精製法についての詳細は割愛するが留意事項を幾つか述べておく。

- 1) 水試料から腐植物質を得る場合、炭素ベースで数十 ppm レベルの有機物が溶存する河川 (主に周辺流域にピート地帯が含まれる河川で有色の河川水) なら100~200L 程度の試料水で腐植物質の採取が充分可能である。しかし、我が国の河川や湖沼の水は1ppm レベルの非有色水が中心であるため1000L 規模の試料水を必要とする。腐植物質の濃度が希薄なため、特に樹脂からの不純物による汚染が危惧される。したがって、樹脂洗浄を図4の手順で厳密におこなわなければならない。
- 2) 土壌フルボ酸の樹脂吸着では pH 値を1に調整して XAD-8 に供するが、腐植物質が希薄な水試料では多量の試料水が必要となり、pH 値を1に調整するのに多量の塩酸を必要とする。したがって、水試料では pH 値を2に調整する。
- 3) フッ酸塩酸処理による灰分除去の操作は特に明記されていない。しかし、これをおこなわなければ灰分量は20%以上になることも珍しくない。従って、筆者等は土壌の腐植酸とフルボ酸の精製手順に準じてこの操作を施している。

#### 4. 標準 (参照) 試料と市販試料について

これまで述べたように、IHSS 法にせよ他の方法にせ



## XAD-8樹脂 (40~60mesh) の洗浄

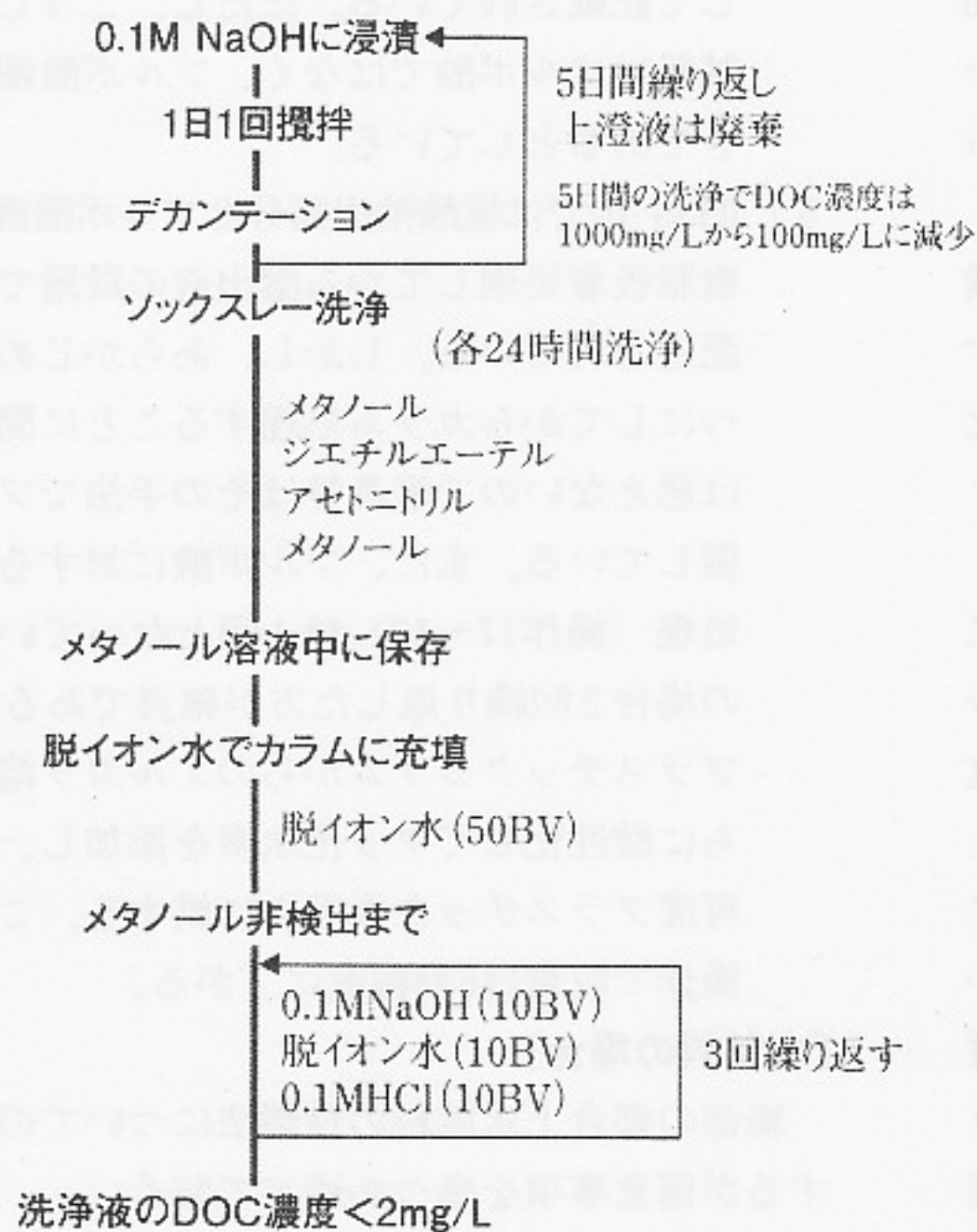
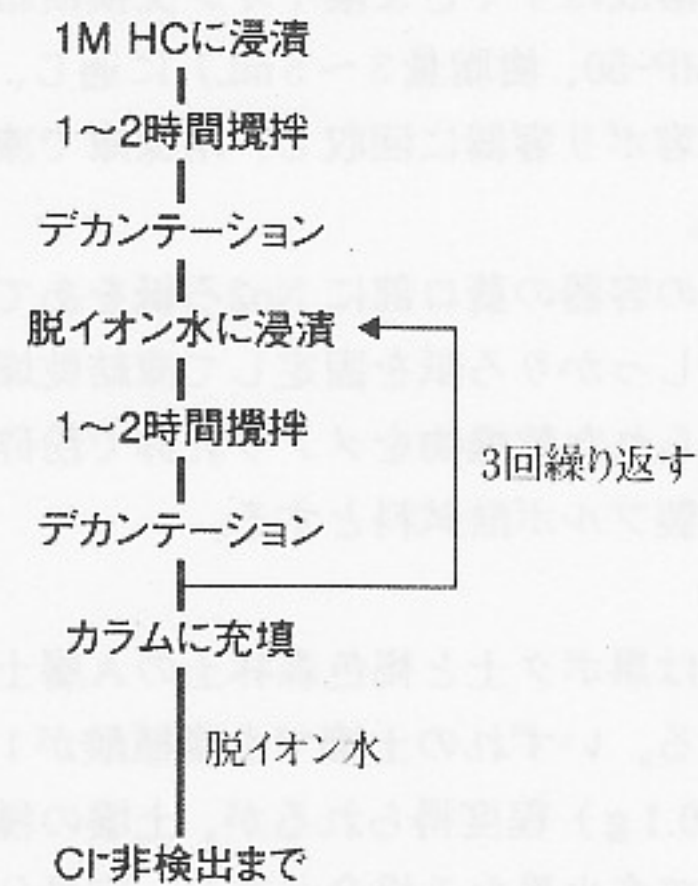
AG MP-50 陽イオン  
交換樹脂の洗浄

図4 XAD-8およびAG-MP-50樹脂の洗浄法

表3 市販されている主な腐植酸試料

製造元	製品名
Aldrich	humic acid sodium salt
Fluka/Tridom	humic acid
Ega Chemie	sodium humate
Merck	humic acid
Light	humic acid
Wako	humic acid
Nakarai	himic acid

よ、腐植物質を調製するにはたいへんな手間と労力がかかる。IHSS法で風乾土壌試料から腐植酸とフルボ酸の粉末を手にするまでには腐植物質を専門に扱う研究環境でもおよそ1ヶ月かかる。しかも、土壌の種類や水試料の特性が腐植物質の性質を左右するのであれば、当然採取すべき土壌や水の選定、基本的調査や一般分析データが不可欠になる。腐植物質そのものを研究対象に据えている場合はまだしも、相互作用や生物活性などの機能研究や利用研究を想定している場合、試料調達はこれから研究を始めようとするものにとっての大きな負担である。

腐植物質は幾つかの試薬会社から製品として販売されており、比較的安価に容易に手に入る(表3)。しかし、これらの試料(試薬)は製造原料や手法が明らかでない。多くの場合、ピート(泥炭土)か石炭(亜炭・褐炭・草炭など)の類いと予想されているが、少なくとも筆者が手元に持つデータや Malcolm and MacCarthy (1986)の報告によれば、土壌や河川のものとは大きく特性が異なる。したがって、予備検討レベルで使用するのならまだしも、本実験で利用するのは基本的に推奨できない。もしどうしても市販品(例えば最も有名なAldrich社製の腐植酸)を利用するならば、少なくともフルボ酸的成分(おそらく腐植酸製造プロセスで二次分解産物として派生した成分)や灰分を取り除くための操作が最低必要となる。すなわち、アルカリ溶解と酸沈殿を繰り返しおこない、フッ酸塩酸処理による灰分除去を通常より多くおこなった上で透析・凍結乾燥を経るといった、再調製が必要となる。

一方、IHSSや本学会で頒布している試料は市販品にくらべれば遥かに高価であるが、由来や精製法はもとより、基本的な分析データも添付・保証されている。しかし、標準試料は従来にない新しい機器への適用時



などに目的が限定されており、参照試料はあくまでも自らが調製した試料との比較対照として利用することを前提としている。やはり、研究目的に沿った試料を自ら調製するのが最善策である。

#### 参考文献

- Kuwatsuka, S., Watanabe, A., Itoh, K., Arai, S. (1992) Comparison of two methods of preparation of humic and fulvic acids, IHSS method and Nagoya method. *Soil Sci. Plant Nutri.*, 38, 23-30.
- Malcolm, R.L. and MacCarthy, P. (1989) Limitations in the use of commercial humic acids in water and soil research. *Environ. Sci. Technol.*, 20, 904-911.
- Stevenson, F.J. (1994) *Humus Chemistry: genesis, composition, reactions*, John Wiley & Sons, Inc., New York
- Swift, R.S. (1996) Organic matter characterization (Chap. 35). *In Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical methods*, Ed. D Sparks, A Page, P Helmke, R Loeppert, P Soltanpour, M Tabatabai, C Johnson, and M Sumner, Soil Sci. Soc. Am. Book Series: 5, p. 1018-1020, Soil Sci. Soc. Am., Madison
- Thurman, E.M. and Malcolm, R.L. (1981) Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.*, 15, 463-466.
- Watanabe, A., Itoh, K., Arai, S., Kuwatsuka, S. (1994) Comparison of the composition of humic and fulvic acids prepared by the IHSS method and Nagoya method. *Soil Sci. Plant Nutri.*, 40, 601-608.