

基礎講座

〔腐植物質研究の基礎講座〕

その2. 腐植物質の特性を見誤らないために

川東正幸*

1. はじめに

本誌の前月号（藤嶽, 2007a）において腐植物質の国際的調製法である IHSS 法が紹介された。この方法に則って腐植物質試料（以下、特に断らない限り試料と記述する。）を得たならば、その試料同士を「同じ土俵」で議論できるわけである。さらに付け加えると、頒布されている IHSS 標準または参照試料および日本腐植物質学会参照試料を使えば、全く不安なく腐植物質の分析を行い、そのデータを対象腐植物質試料の属性として解釈、公表することが可能なのである。このことは、大変重要なことであり、新たに腐植物質を研究対象とされた研究者にとって大変ありがたいことである。しかしながら、前月号第2節にあるように腐植物質はあらゆる環境に存在し、様々な由来をもち、様々な条件のもと、様々な反応過程を経て、生成した、または生成途中の産物であるので、代表の腐植物質（例えば学会標準試料や参照試料）を用いた研究成果のみで様々な環境の腐植物質の反応性や動態を説明することは難しい。従って、対象とする地域の腐植物質は自ら推奨法で調製し、それを分析に供することが望ましいのである。前回の記事で初めて、腐植物質の標準および参照試料について背景、意味、および調製方法を讀まれた読者の方は「腐植物質は捉えどころがなく、せっかく分析をしても試料間で比較ができないような場合もありそうだし、とっつきにくそうだ」と思われたかもしれない。しかし、多様な出自をもった腐植物質を「同じ土俵」の上に乗せる術がわかったので、是非、腐植物質というこの地球上に膨大に存在する有機炭素化合物群を様々な方向から光を当ててその生成、構造、機能の研究を進めて行きたいものである。

決まった条件で試料調製をして得たならば、あとは「同じ土俵」に乗った試料達をどんどん分析していけばよいのである。決まった調製過程を経て得た「画分」であることを認識した上で分析を進めていけばよいで

ある。ただし、多くの場合、どのような分析を行うにせよ、粉末状態で得た腐植物質試料に「何らかの処理」を加えることになるはずである。ここで、ちょっとした注意が必要である。ある分析のためにどのような処理を行ったか、その処理は適切であったか？ここで言う「適切」とは、「他の腐植物質のデータと比較可能」ということである。確かに、粉末試料の段階では「同じ土俵」に載っていたはずが、前処理を施すことによって「土俵を割る」ことになりかねないのである。本稿では、全ての分析について細かく述べるつもりは全くないし、著者にその能力もない。ここでは、ごく基本的な腐植物質の特徴と取扱扱いの注意点について例を挙げながら説明したいと思う。

2. 腐植物質とは…

前は同じ問に対して「由来や生成環境に基づいた答え」と「化学構造に基づいた答え」と「調製法に基づいた答え」が述べられ、さらに「由来や生成環境によって異なること」「調製法によって異なること」が説明されている。結論として、由来の異なる試料同士の比較を可能にするための「調製法（IHSS 法）」が紹介され、その過程を経て得た試料を「腐植物質」として論議することが書かれている。また、問答の中で質問者が「そういう画分の名前みたいなもので混ざりものなのですね」と言って納得しているくだりがあるが、その通りなのである。腐植物質はある手法を経て得た「画分」なのである。そこで、ここでは推奨法である IHSS 法の抽出過程から「腐植物質が端的にどういう画分（物質の集まり）であるか」というところから始めてみたい。

IHSS 法（土壌試料）と IHSS 法（水試料）をよくご覧いただきたい（前月号図1と2）。NaOH による処理を行っている箇所が何度もある。土壌や堆積物の場合、最初の塩酸処理で得た抽出溶液には着色は乏しく、何か

が抽出されてきたという印象をもたない。しかし、その残渣土壌に NaOH を加えるとこげ茶から黒色の濃い液体抽出物が得られる。いかにも「腐植物質参上！」といった感じである。また、天然水の場合も XAD-8 カラムに吸着していく様子を見てもあまり、腐植物質を得た印象はないと思う。しかし、そのカラムに NaOH を通じるとジワジワと黒っぽい、茶色っぽい腐植物質が重い腰を上げるように動き出す。「あ〜、出てきた。出てきた。」となんともいえない喜びを感じるはずである。そう、如何にも「腐植物質（の大部分）はアルカリ条件で溶ける」のである。もちろん、天然水中や土壌水中にも腐植物質は存在し、それらは中性や酸性条件でも「溶けて」いる。しかし、その試料を扱ってみるとわかるが、高濃度条件、低温条件や塩共存下ではアルカリ性溶液でなければ溶解しなくなってくる。とにかく、腐植物質はアルカリ性という条件でよく「溶ける」のである。

この溶解性は腐植物質の化学構造を反映している。多くの腐植物質は多量のカルボキシル基を持っており、それ以外にもフェノール性水酸基も持っている (Tsutsuki & Kuwatsuka, 1978, Yonebayashi & Hattori, 1988)。これらは、アルカリ性条件にあると電離をする。反応性の高い部位なので環境中では金属や酸化物との結合に関与するものと考えられている。要するに、アルカリ溶液はこれらの官能基部位を無機鉍物や金属から引き剥がすのである。引き剥がされた腐植物質はその反応部位をむき出しにして溶液中に出てくると考えられる。アルカリ性の場合にはカルボキシル基が電離しているので、腐植物質は負に帯電しており、それぞれの分子同士は反発しあって溶液中で分散状態にある。すなわち、溶解した状態にある。それを酸性条件にすると、官能基は水素化し、官能基同士の反発が抑制されるが、なお、溶解した状態を維持できるのが広義でのフルボ酸画分（アルカリ可溶且つ酸可溶）であり、分子間力で互いに引きつけ合い、凝集沈殿するのがフミン酸または腐植酸画分である。要するに、腐植物質は pH によって溶解性を変化させる電解質なのである。さらに、腐植酸は水素化した後に分子間力で凝集沈殿する物理的性質から高分子として考えられているため、高分子電解質ということになる。これまでの研究報告からフルボ酸も高分子電解質としての性質を持っていることがわかっている。すなわち、腐植物質は高分子電解質なのである。この点に留意すれば様々な一般的な分析法に供することが可能である。以下は参考まで

に著者が経験した腐植物質の試料処理の際の高分子電解質としての留意点を紹介したものである。

3. 高分子電解質としての腐植物質

天然高分子でも合成高分子でも高分子電解質は同じようなふるまいをする。すなわち、電離基（カルボキシル基や水酸基など）同士の分子内または分子間における反発によってもたらされる溶液中での挙動である。これには試料溶液濃度、pH、塩濃度が強く影響する。この3つの溶液条件が腐植物質の特性に及ぼす影響について見てみたい。

溶液濃度

腐植物質の溶液の性質が試料濃度に依存して変化することがある。図-1 に腐植酸溶液の溶液粘度の濃度依存性を示した。5-15 g L⁻¹ の範囲では粘度は濃度依存性を示さない。しかし、それよりも低い濃度域では急激に溶液粘度が高くなっている。これは、高分子電解質溶液の粘度によく見られる現象であり、低濃度域では分子内での荷電反発が強く、分子間力が乏しいために分子が可能な限り広がっていると解釈できる。腐植物質のサイズが濃度に依存して変化することがわかる。また、腐植物質は非常に広い分子量または分子サイズの分布をもった物質群（多分散性：後述）であり、その分布も濃度によって変化する。小角 X 線散乱から得られるサイズ分布では 5 g L⁻¹ よりも 10 g L⁻¹ の濃度条件の方が全体的に大きな粒径分布にシフトしていることがわかる（図-2）。恐らく、分子同士が凝集をしてより大きなサイズのものができてきたためと考えられる。

腐植物質は先に述べたように多くの親水性の官能基を持っている。同時に芳香族炭化水素や飽和脂肪族炭化水素を主体とした疎水性の構造部位も併せ持っている。図-3 に腐植酸溶液の表面張力の濃度依存性を示した。

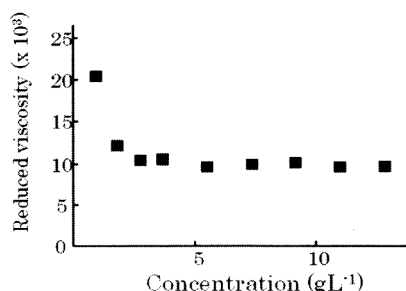


図-1 腐植酸溶液の溶液粘度の濃度依存性

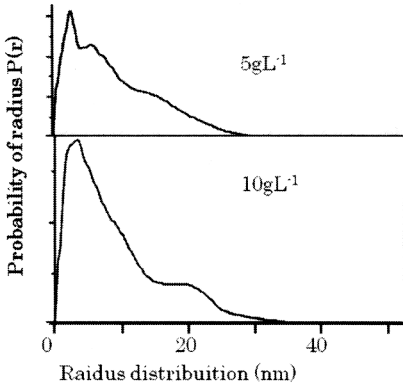


図-2 小角 X 線散乱法による腐植酸溶液の動径分布関数

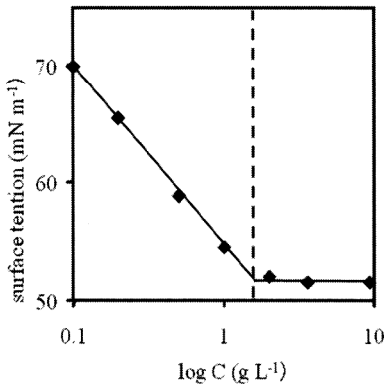


図-3 腐植酸溶液の表面張力の濃度依存性

濃度の増大に伴って、気-水界面の張力が減少している。親水性部位と疎水性部位をあわせもつ両親媒性物質は界面に吸着して溶媒の界面張力を減少させる、すなわち界面活性を示す。図-3において0.1-3g/L⁻¹までは腐植物質が水の表面に集まることによって水の表面張力を下げ続けている。それ以上の濃度では水面での腐植物質は飽和になっており、水の中で溶けるために疎水性部位を内側に向けたミセルを作っている可能性が考えられる。従って、この対象試料では約1g/L⁻¹の濃度を超えると分子同士が互いに疎水的な力によって結合して分子サイズや分子量が大きくなっていると考えられる。

以上のように、測定した濃度条件によって腐植物質の分子量や分子サイズといった物理的パラメーターが変わることは間違いない。要するに、腐植物質は溶液濃度に応じてフレキシブルにサイズと形が変わってしまう物質なのである。この他、最近、汎用される高速サイズ排除プログラム (HPSEC) においても濃度によってクロマトグラムの形状が変わるので要注意である。

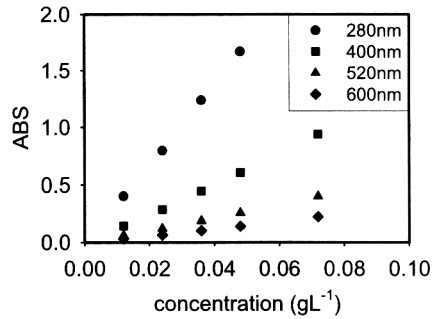


図-4 腐植酸溶液の濃度と吸光度の関係
図中の各数値は分光光度計の設定波長を示す。

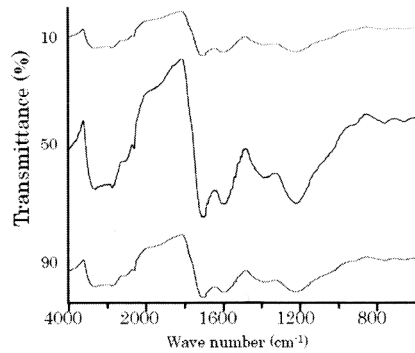


図-5 腐植酸の赤外吸収スペクトル
上端、下端のスペクトルはそれぞれ試料濃度が「薄すぎる」場合と「濃すぎる」場合を示す。

この場合は濃度に依存してサイズが変わっていることも考えられるが、注意を要するのはカラム樹脂担体への腐植物質の吸着である。高い濃度や多い供試量の場合、テーリングを起こさないまでも遅い保持時間への溶出容量の移動が生じる場合がある。そのまま、平均分子量を算出すると見かけ上小さな値を得ることになってしまう。腐植物質分析ハンドブックによると20mg/L程度の濃度が適切なようである (藤嶽2007a)。

補足として、腐植物質の分光分析においても試料濃度に留意する必要があることを述べておく。古くから腐植物質 (特に腐植酸) の特徴付けに用いられている紫外・可視分光光度計でも適切な測定濃度があり、腐植物質の由来によって異なるので、測定の都度、確認する必要がある。600nm における吸光度を0.1程度に調整してからの測定が一つの目安となる。また、波長を選べば Beer の法則が成立する (図-4) ので、予め検量線を作成した腐植物質試料の溶液濃度を算出することは可能である。但し、ユニバーサルに適用できる検量線の作成は無理なので、検量線と試料は1対1対応で

なければならない。赤外分光測定においても適切な測定濃度があり、図-5に示すように「濃すぎる」または「薄すぎる」でまともなシグナルが現れないことがある。腐植物質分析ハンドブックによると赤外分光分析のための適切な濃度は試料1mgに対し100mgの臭化カリウムを用いて作成したペレットでのスペクトルが良いようである(福嶋2007)。

溶液 pH

pH すなわち溶液中の水素イオン濃度に応じて、腐植物質の官能基の電離程度が変化するので、分子内および分子間の荷電反発の程度が異なり、その結果分子の形やサイズも変化する。図-6に溶液粘度の pH 依存性を示した。溶液 pH が9以上の場合、ほとんどの酸性官能基が電離しているため十分に広がった大きさで溶液内に分散していると考えられる。一方、pH 中性から酸性側にかけてサイズが小さくなっていく様子がわ

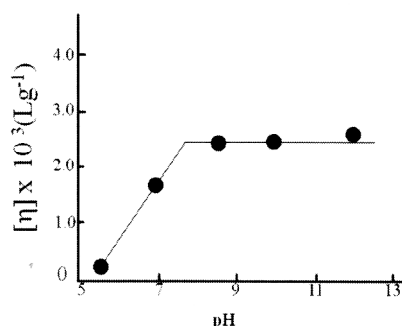


図-6 腐植酸溶液の極限粘度の pH 依存性
但し、0.1M NaCl のイオン強度を与えて測定した。

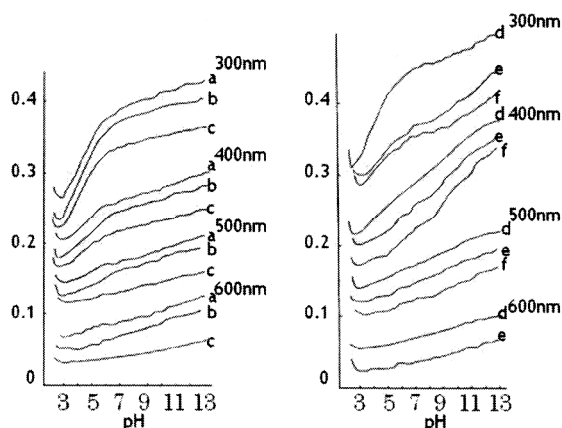


図-7 腐植酸溶液の紫外・可視波長における吸光度の pH 依存性

左図は腐植化度が高い腐植酸 (A 型腐植酸) であり、右図は腐植化度が比較的低い腐植酸 (B 型腐植酸)。各アルファベットは異なる土壌試料を示す。

かる。水素化することによって分子内の荷電反発がなくなり収縮した形になったものと考えられる。

酸性官能基の電離は分光分析にも影響を及ぼす。紫外・可視分光分析ではカルボキシル基の解離が吸光度を高めるために pH の上昇に応じて吸光度が高くなる(図-7)(Tsutsuki and Kuwatsuka, 1979)。その上昇程度は腐植物質の化学構造によって異なることがわかる。赤外分光分析においてもカルボキシル基の解離はスペクトルに現れる。アルカリ条件下でカルボキシル基が電離をすると図-8に示すように、炭素を中心としたカルボキシエノラートが生成するために、C-O 間の伸縮振動および変角振動に由来する吸収が観察され、逆にカルボキシル基において通常観察される C=O の伸縮振動や C-O の伸縮振動に由来する吸収が極端に弱くなる。従って、凍結乾燥試料を調製するときに酸性条件、すなわち完全に水素化してから透析した場合と中性やアルカリ性条件で透析した場合で、凍結乾燥後に得た粉末試料の分光特性が異なっているということになる。以上のように、分析に供する腐植物質溶液の pH 条件によってサイズと形状の物理的パラメーターと構造化学的情報は異なるということである。

溶液イオン強度

試料調製の際に濃度や pH よりもあまり意識されない条件ではないだろうか?しかし、脱塩が不十分な場合や試料の灰分含量が異なる場合において、調製した溶液試料のイオン強度は試料ごとに異なる可能性が考えられる。そうすると、試料ごとにイオン濃度のバックグラウンドが合わなくなり、それが試料の電離程度に影響を及ぼすことが考えられる。

図-9に塩の存在によって溶液粘度が著しく低下す

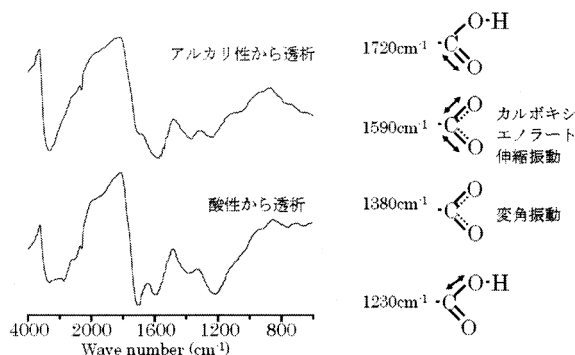


図-8 腐植酸溶液の赤外吸収スペクトル
アルカリ条件下から透析した場合と酸性条件下から透析した場合

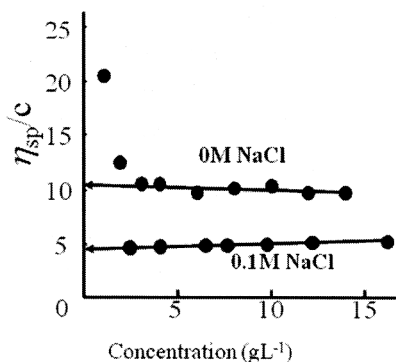


図-9 腐植酸溶液の還元粘度の濃度依存性
0.1M NaClを加えた場合と無添加の場合の比較

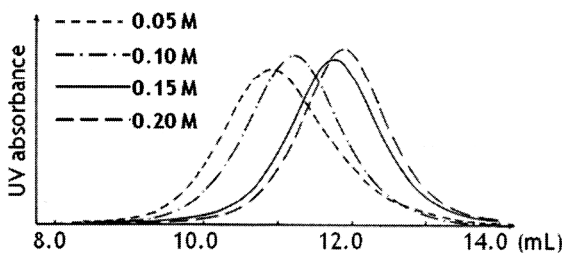


図-10 褐色森林土の次表層から採取した溶存有機物の
HPSECによるクロマトグラム
異なる添加塩濃度条件下での測定

の様子を示した。これは腐植物質上のカルボキシル基
対イオンであるナトリウムイオンが結合すること
によって負荷電が失われて、分子内における官能基間
の反発の抑制によりサイズが小さくなったためであると
推測される。さらに、共存塩存在下では低濃度域の粘
度の急激な増大、すなわちサイズの増大（分子の広が
り）が抑制されていることが確認できる。これは対イ
オンの解離した官能基への吸着によって高分子電解質
の性質が抑制され、通常の高分子と同様に扱えること
を示している。

共存塩の効果は HPSEC のクロマトグラムでも確認
できる。図-10に TSK ゲルにおける腐植物質の共存塩
濃度依存性を示した (Berden and Berggren, 1991)。添
加塩濃度の増加に伴って腐植物質の溶出容量が大き
くなっている様子がうかがえる。素直に解釈すると、共
存塩の解離官能基への吸着によって分子内荷電反発が
抑制された結果、分子のサイズが小さくなったと考え
られる。一方で、ゲル素材と腐植物質双方がもつ負
荷電が対イオンの吸着によって抑制されたため、ゲル
素材と腐植物質が可逆的吸着相互作用を生じて溶出時
間が遅くなったとも考えられる。いずれにせよ、異なる

塩濃度条件で SEC のクロマトグラムの形状は変わ
ってしまうのである。先に述べたように試料調製の際に
生成する塩量の違いがどの程度影響しているのかを知
ることは容易ではない。そのことよりも、実際に試料
間で比較する際にその影響を無視できる状態で比較す
ることが望ましい。例えば、腐植物質のサイズに関わ
る測定を実施するときには高分子電解質の性質がなくな
るように支持塩を加えることである。多くの場合、
0.1M 程度の一価の強電解質 (NaCl など) を含むよう
に試料調製すると解離官能基の影響を抑えられる。あ
まり高い濃度での強電解質の添加は試料に沈殿を起
こさせることがある (フルボ酸であっても) ので勧めら
れない。また、二価の塩 (CaCl₂ など)、重金属を含む
塩はかなり低濃度でも沈殿がしやすい。

4. 腐植物質の多分散性

腐植物質は所定の処理を経て得た「画分」であり、
広い分子量、サイズ範囲をもった物質群である。それ
を溶解して得た溶液は「多分散」である。これまでに
も、腐植物質のサイズについて述べてきたが、すべて
平均的な値として扱ってきた。多分散の試料に対して
分子量や分子サイズの平均値は以下の式から算出でき
る。

$$\textcircled{1} \quad \bar{M}_w = \frac{\sum_{i=1}^n (M_i^2 \times N_i)}{\sum_{i=1}^n (M_i \times N_i)}$$

$$\textcircled{2} \quad \bar{M}_n = \frac{\sum_{i=1}^n (M_i \times N_i)}{\sum_{i=1}^n (N_i)}$$

$$\textcircled{3} \quad R_H = \frac{\sum_{i=1}^n (R_{Hi} \times N_i)}{\sum_{i=1}^n (N_i)}$$

ここで、 \bar{M}_w は重量平均分子量であり、 \bar{M}_n は数平均
分子量である。 R_H は流体力学的粒子半径である。 M_i
は系内の或る分子の分子量であり、 N_i はその分子数
である。

①、②式の比である： $D = \bar{M}_w / \bar{M}_n$ が多分散性である。
①や②式から算出される分子量が「2万」や分子サイ
ズが R_H で「3nm」といっても図-2や図-10で見ると
様々な値の平均値なのである。より確かな値を得る
ためには多分散性を減少させるしかない。これにはい
くつかの分画法が有効であるが、これまでも述べた
ように濃度、pH、イオン強度の条件を統一しておか
ないと物理的に分画できない。表-1に3つの異なる土
壌から得た腐植酸の分子量および R_H を示した (Kawahigashi

表-1 高速サイズ排除クロマトグラフィーから算出した重量平均分子量(\bar{M}_w)、数平均分子量(\bar{M}_n)、多分散性(D)および流体力学的半径(R_H)

	\bar{M}_w x 10 ³	\bar{M}_n x 10 ³	D	R_H (nm)
MK				
100K	117.6	50.0	2.4	6.4
30K	58.3	36.6	1.6	4.7
10K	35.4	24.0	1.5	3.5
5K	22.8	14.7	1.5	2.6
Unfractionated	64.8	25.7	2.5	3.7
HT				
100K	82.3	35.8	2.3	5.3
30K	44.1	21.9	2.0	3.7
10K	32.6	21.3	1.5	3.4
5K	18.8	11.7	1.6	2.3
Unfractionated	49.4	20.6	2.4	3.2
FJ				
100K	32.8	18.2	1.8	3.1
30K	22.2	13.1	1.7	2.7
10K	17.3	10.1	1.7	2.4
5K	14.8	9.2	1.6	2.2
Unfractionated	21.0	11.6	1.8	2.6

画分名のKはkiloの略であり、それぞれの数値を1000倍した数値が分画に用いた限界ろ過膜の見かけの分画分子量となる。

et al., 2005)。限外濾過法による分画試料は元の試料よりも多分散性が低下しているが、当然のことながら単分散系 (D=1) にはなっていない。また、限外濾過法やゲル濾過法を用いるとその分画範囲から見かけ上の分子量を与えることができるが、別の方法で求めた分子量とは異なることがわかる。さらに、同じ画分同士でも由来の異なる試料同士では分子量もサイズも異なっていることがわかる。従って、分取用の分画法で分離して得た画分同士は相対的に大きさが異なるけれども、決して指定された分離膜や分離孔径で分離されているのではないことがわかる。このことは、試料間で物理的なパラメーターを比較するときによく注意しなければいけない点である。一方、各画分が分離・分画されているときの条件と各画分の分子量や分子サイズを測定するときの条件は同じではないので表に示した値の分子量やサイズのものが実際に分画過程で分離されているとは必ずしも言えないのである。

5. 試料調製に関する注意点

・アルカリ溶液の濃度と量

粉末の腐植物質試料を溶解するとき (特に腐植酸) には0.1M 程度の水酸化ナトリウムをよく使用する。多

く加えれば、当然溶けやすい。しかし、その後、pH調整が必要なのであれば、水酸化ナトリウムの使用量には気をを使う必要がある。大量に使用すると pH が上がりすぎてしまい、酸を加えてpHを戻す必要が生じる。酸を加えたと同時に塩も生成する。先に示したように、共存塩は腐植物質の解離基に吸着して、諸特性に影響を及ぼす可能性がある。従って、試料調製時の塩生成はできる限り避けたい。しかし、所定の pH を少しでも超えてしまうと失敗となり、試料を透析して回収する羽目になるのか、または試料を捨ててしまうことになるのか? ちょっと止まってよく考えてみたい。もし、その実験で支持塩を0.1M NaCl になるように添加するのであれば、多少の生成塩は誤差になるかもしれない。それを計算できるようにするためにも、試料の溶解時には加えたアルカリ溶媒の濃度と添加量は記録しておいた方が良い。

・添加塩濃度

先述したように試料溶液にある程度の塩濃度を与えておくと、試料から出てくる望ましくない塩の影響を抑制することができる。しかし、加えすぎると腐植物質が沈殿するので要注意である。また、塩を添加していることを忘れて、試料回収のためにエバポレーターによる濃縮操作を行ってしまうとすぐに沈殿を生じる。塩と共にナス型フラスコに付着した腐植物質は殊のほかとれにくいので、塩を加えているときには濃縮操作は避けたい。試料回収のためには、まず透析をすることである。

・緩衝液の種類と濃度

電解質の性質を抑制するためにも、pH を維持するためにも緩衝液を利用することは多い。腐植物質の抽出と溶解によくピロリン酸緩衝液を用いる。ピロリン酸は非常に粘性が高い液体であるので、この緩衝液で調製した溶液試料は濃縮乾固ができない。他の緩衝液を用いた場合でも、その試料溶液を濃縮すると塩が析出してくるので、やはり濃縮前の透析操作は必要になるであろう。トリスアミノメタンのような有機炭素を含む緩衝液を使った場合は、その後の炭素濃度の測定ができなくなるので要注意である。

・濃縮操作

先の説明文にも何度かエバポレーターの使用が出てくる。水溶液系で実験をすることが多いので、濃縮操作ではエバポレーターで水を蒸発させることになる。有機溶媒の場合と異なり、水はエバポレーターで飛ばすにくい。温度を上げると揮発しやすくなるが、沸騰も

起きる。腐植物質も天然の有機化合物なので分解や変性が心配であるため、あまり温度を上げないことである。著者は40℃程度で行っているが、突沸して腐植物質溶液が吸い込まれることもあるので、エバポレーターの濃縮操作は慎重に行う必要がある。乾固寸前も突沸して、高濃度、高粘性の試料が吸い込まれて回収に苦労することもあるので注意を要する。

・透析操作

試料調製および試料回収のときに必要な操作である。透析チューブはフルボ酸ならば孔径が分画分子量 (Molecular Weight Cut Off) 500程度のもので、腐植酸ならば MWCO10,000程度のものである。外液には純水を使い、1日に2回程度交換し、外液の電気伝導度が 0.1mS/m 程度になるまで繰り返す。フルボ酸や溶存有機物の場合、低分子のものが漏出してきることがあるので、陽イオン交換樹脂カラムの利用を推奨する。但し、陽イオン交換後の腐植物質試料は共存する酸によって強酸性になっている。

6. まとめ

腐植物質試料の調製は大変労力を要する作業である。また、その元の試料である土壌、天然水および堆積物も限りある試料であると同時に確実な再現性を伴って常に準備できる試料ではない。従って、一回の抽出調製作業で得た腐植物質試料は極めて貴重なのである。その試料を種々の分析に供することになると、毎回使い捨てでは「もったいない Mottainai」のである。元素分析や官能基分析など止むを得ず試料を消費する分析もあるが、多くの分光分析や物理分析は再利用可能である。その時に、元通り試料を原点に戻すことが重要である。そのためには透析、濃縮、凍結乾燥などの手間暇かかる作業が必要なのである。原点に戻った試料

の再利用のときには分析に応じた試料処理が必要であるが、その際には常に腐植物質が高分子電解質であることを念頭に浮かべていただきたい。そして、濃度、pH、イオン強度には細心の注意を払って試料調製をしていただきたい。

参考文献

- Berden, M. and Berggren, D. (1990) Gel filtration chromatography of humic substances in soil solutions using HPLC-determination of the molecular weight distribution. *J. Soil Sci.*, 41, 61-72
- Kawahigashi, M., Sumida, H. and Yamamoto, K. (2005) Size and shape of soil humic acids estimated by viscosity and molecular weight. *J. Colloid Int. Sci.*, 284, 463-469.
- 藤嶽暢英 (2007a) 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 Humic Substances Res., 3, 1-9
- 藤嶽暢英 (2007b) 腐植物質分析ハンドブッカー標準試料を例にして pp.83-88、三恵社
- 福嶋正巳 (2007) 腐植物質分析ハンドブッカー標準試料を例にして pp.83-88、三恵社
- Tsutsuki, K. and Kuwatsuka, S. (1978) Chemical studies on soil humic acids II. Composition of oxygen-containing functional groups of humic acids. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 24, 547-560
- Tsutsuki, K. and Kuwatsuka, S. (1979) Chemical studies on soil humic acids VI. Absorbance-pH curves of humic acids. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 25, 365-371
- Yonebayashi, K. and Hattori, T. (1988) Chemical and biological studies on environmental humic acids I. Composition of elemental and functional groups of humic acids. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 34, 571-584