

研 究 解 説

フミン物質の分離・分画とキャラクターゼーション

Separation, Fractionation and Characterization of Humic Substances

篠 塚 則 子*

Noriko SHINOZUKA

複雑な化合物の混合物であるフミン物質を分離・分画する方法について解説し、また分画した成分のキャラクターゼーションの主要な方法を概説して研究例を挙げた。フミン物質には界面活性や種々の生理活性があり、これらの機能の高い成分を分取することを目的とした分画方法について検討した。分子量に基づく分画では界面活性の高い成分が高分子画分として得られることが明らかになっている。高速液体クロマトグラフィーを用いる分離により、特定の性質に基づいた機能性の高い成分を分取する可能性を示唆した。

1. 緒 言

フミン物質とは、土壤学の分野で腐植物質とよばれているもので、動植物が生命を失った後その遺骸が種々の変化を受け残った比較的安定な有機物のうち、蛋白質、炭水化物、アミノ酸などのように明確な化合物として識別されない物質の総称である。定義から明らかなように多種多様な有機化合物の混合物で、その化学的取り扱いには常に曖昧さをともなっているが、通常次のような特徴をもっている。すなわち、黄色から褐色に着色しており、水に溶けて酸性を示す多分散性の高分子電解質で、分子量は数百から数十万の分布がある。

フミン物質は土壌、堆積物、地表水、地下水、ピートなどに存在し、上述のように起源にかかわらない共通の性質を持つと同時に、それぞれの起源に特徴的な性質も持っている。土壌フミン物質については古くから研究が行われてきており、最近では分析機器の進歩とも相まって、土壌学、地球化学ばかりでなく、環境科学、医学、生理学等とかかわる広く学際的な研究が盛んに行われている¹⁻⁴⁾。

フミン物質にはいろいろな機能のあることが知られているが、界面活性⁵⁾、抗血液凝固性⁶⁾、抗ウイルス性⁷⁾などの生理活性も見出されて、フミン物質を新しい材料として利用する可能性が生じてきた。

本稿ではフミン物質の分離分画の方法と、各成分のキャラクターゼーションについて概説し、ついで界面活性や生理活性の高い成分の分取を目的とした分画の結果について述べる。

2. フミン物質の抽出と精製

2.1 土壌、堆積物中のフミン物質

フミン物質を抽出、精製するために、非常に多くの方法が用いられてきた。最近では国際フミン物質学会 (International Humic Substances Society, IHSS) によって定められた方法が一つの標準になっている。しかし、土壌の種類によっては変更したほうがよい場合もあるといわれている。土壌中において、フミン物質は種々の無機成分と結合して安定化されている。そこで、土壌中のフミン物質を抽出するための溶剤には、高分子と対イオンを溶解するかあるいは、対イオンを溶媒和して高分子を溶かすような物質が必要である。

土壌からフミン物質を分離する方法は、すなわちフミン物質の実験操作上の定義でもある。土壌フミン物質は土壌からアルカリ水溶液により抽出された有機物であり、そのうち酸性 ($\text{pH} < 2$) において沈殿する成分はフミン酸、残った成分はフルボ酸という。

土壌、堆積物からフミン物質を分離する操作は、試料を乾燥、粉碎してアルカリ水溶液を加えて抽出し、液を酸性 ($\text{pH} < 2$) にしてフミン酸を沈殿として得る。フルボ酸は残った水溶液から Amberlite XAD-8 樹脂に吸着させた後、溶離し凍結乾燥する。抽出液は IHSS 法では 0.1 M 水酸化ナトリウムを用いるが、名古屋法⁸⁾では 0.1 M 水酸化ナトリウムと 0.1 M ピロリン酸の混液を用いる。アルミニウムや鉄との結合が多い日本の土壌に対しては、ピロリン酸の混液がより効果的と言われている⁹⁾。

フミン酸の精製はフルボ酸の除去と灰分を減少させるた

* 東京大学生産技術研究所 第 4 部

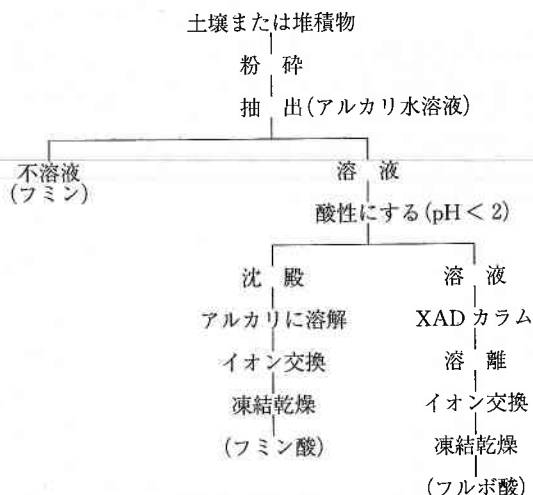


図1 固体試料からフミン物質の抽出

めに行われる。IHSS 法では灰分を減らすために、フッ化水素酸による処理と透析を行う。イオン交換樹脂による処理もよく行われている。

固体試料からの抽出の概略を図1に示した。

2.2 水中からフミン物質の分離

天然水中の有機物質には溶存有機物と粒子状有機物がある。通常 $0.45\ \mu\text{m}$ のフィルターを通過したものを溶存有機物としているが、便宜的に決めているにすぎない。水中フミン物質の研究はほとんど溶存状態のものについて行われており、フミン物質の濃度が高い熱帯の河川や沼の粒子状有機物は重要ではあるがあまり研究されていない。溶存有機炭素として地下水中の $20\ \mu\text{g/l}$ から河川水の $30\ \text{mg/l}$ の高濃度まで観測されている。フィルターには酢酸セルロースや硝酸セルロースのメンブランフィルターがよく用いられる。これらは使用前の洗浄に注意しなければならない。

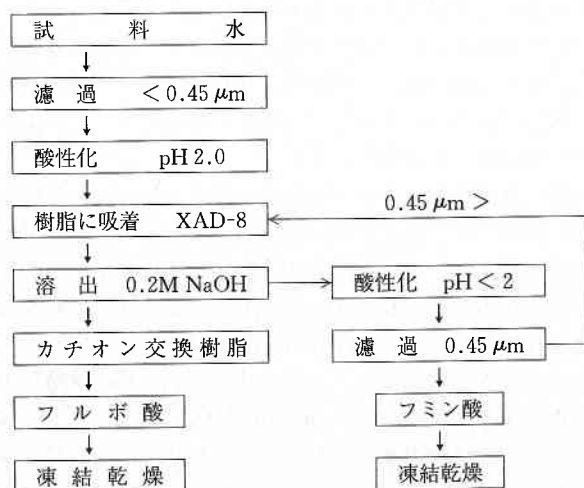


図2 水試料からフミン物質の分離

い。銀メンブランフィルター、ガラスファイバーフィルターが推奨されている。

分離濃縮法はいろいろあるが最も広く行われている樹脂への吸着を利用する方法について述べる。Thurman と Malcolm¹⁰⁾ が XAD-8 によりフミン物質を分離濃縮した方法の概略を図2に示す。

使用する樹脂の洗浄は非常に重要で、不十分な洗浄により樹脂中の不純物や種々の合成化合物をフミン物質と一緒に濃縮する危険がある。洗浄法は Thurman 等¹¹⁾ により詳しく述べられている。要点は1) 大量の $0.1\ \text{M}$ 水酸化ナトリウムによる洗浄、2) ソックスレー抽出器によるメタノール、アセトニトリル、ジエチルエーテルを用いた洗浄、でそれぞれ数日を掛けたほうがよいとされている。

3. 分 画

抽出したフミン物質は、分画する前にまず精製しなければならない。この場合精製の意味は非フミン物質を除くことであり、つまり炭水化物、蛋白質、脂質、低分子化合物などを除くことである。過去にはフミン物質を分画して単一の物質を得ようと試みられたこともあったが、現在では純粋な物質を得ることは期待せず、分画の目的はなるべく類似性の高い成分を得ることと考えられている。次に原理別に分画法について簡単に説明する。

3.1 溶解度に基づく分画

○pH：フミン物質の分類が水溶液の pH による溶解性の違いによっていることはすでに述べた。したがって pH によりフミン物質を分けることは、フミン酸、フルボ酸に分けるときの操作として用いられており、分画とは言い難い。

○塩析：多価電解質であるフミン物質の挙動は他の電解質の存在に大きく影響される。多量の塩を加えることにより電荷の作用を抑制して沈殿を生じさせる現象を塩析という。フミン物質の分画に用いられた例としては Theny 等¹²⁾ が硫酸アンモニウムの濃度を増加させて沈殿を生成させた報告などがある。

○金属イオン：フミン物質は金属イオン (2, 3, 4, 価) と不溶性の塩を生成するので、 Cu(II) 、 Ni(II) 、 Zn(II) などを用いて沈殿として分離することができる。コントロールされた分画は難しい。

○有機溶媒：一般の抽出や連続抽出には有機溶媒が用いられることも多い。しかし、フミン物質の分画に用いられた例は少なく、フミン酸のアルカリ溶液をメタノールの割合を変えて分画した Kumada 等¹³⁾ の報告が主要なものである。水に不溶なベンゼンやヘキサンはフミン物質の分画にほとんど役に立たず、有機溶媒による分画のメリットは多くない。

3.2 分子サイズに基づく分画

フミン物質の分子量を測定することはいろいろな方法を用いて試みられており、数100～数10万、さらには100万のオーダーまで報告がある。分子量に基づく分画は、フミン物質のように広範囲に分子量分布をもつ高分子化合物にたいしては有効な方法であり、分画法としては最も成功している。

○ゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC)：本法は通常架橋したポリマー中に存在する孔の大きさを利用して分子サイズにより分離を行う方法で、蛋白質をはじめ多くの天然高分子物質の分離分画に用いられている。GPCは迅速、安価、応用範囲の広い方法で、分離、精製、分画が可能であり、また分子量測定、分子量分布測定も行うことができる。フミン物質への応用も多い。主要なゲルを表1¹⁴⁾にあげる。本法を適用する際の注意点をいくつか以下に記す。

まず、ゲルとフミン物質との相互作用がないことが前提である。試料の一部がゲルに吸着することにより分離が分子量だけに依存しなくなる。図3にフミン酸の Sephadex G-100 を用いたクロマトグラフィーを示す。NaCl を溶離液に用いるとカラム容量 (V_t) を越えて溶出があるがこれは可逆的吸着が起こるからである。電荷による吸引や反

表1 GPC に用いられるゲルと分子量範囲¹⁴⁾

Gel Type and Grade	Fractionation Range (Molecular Weight)	
	Proteins	Polysaccharides
<i>Sephadex</i>		
G-10	— 700	— 700
G-15	— 1,500	— 1,500
G-25	1,000— 5,000	100— 5,000
G-50	1,500— 30,000	500— 10,000
G-75	3,000— 80,000	1,000— 50,000
G-100	4,000— 150,000	1,000— 100,000
G-150	5,000— 300,000	1,000— 150,000
G-200	5,000— 600,000	1,000— 200,000
<i>Sephacrose</i>		
2B	$7 \times 10^4 - 40 \times 10^6$	$1 \times 10^5 - 20 \times 10^6$
4B	$6 \times 10^4 - 20 \times 10^6$	$3 \times 10^4 - 5 \times 10^6$
6B	$1 \times 10^4 - 4 \times 10^6$	$1 \times 10^4 - 1 \times 10^6$

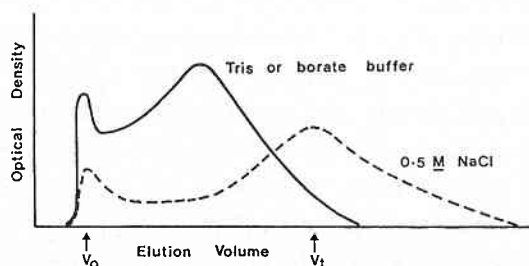


図3 Sephadex G-100 による土壌フミン酸のGPC¹⁵⁾

発がある場合にも分子量に基づく分離とは異なる結果となる。このような種々の問題は、適切な緩衝液を用いたり¹⁵⁾、ゲルを選択することによりかなり解決できるが、ゲルと試料の相互作用を完全になくすことは難しい。

次にゲルの製造元により記載されている分子量の範囲が問題になる。この値は既知分子量の蛋白質か多糖類によって得られたものであり、フミン物質の分画に対する分子量の範囲はこれらの値とはかなり異なったものである。蛋白質は固いコイル状で球形をしており、多糖類はこれよりもコイルが乱れていてフミン物質により近いと考えられる。

GPCを用いた研究から、フミン物質は多分散性があり、分子量は広範囲に分布していることが明らかになった。Cameron 等¹⁵⁾によれば、分離したフミン酸の分子量は2,000—1,500,000の範囲にあり、100,000近傍が最も多かった。分子量分布が広いことから、用いるゲルは一種類では全範囲を網羅できず幾種類も使用することになる。Sephadex G-25, G-75, G-200, Sepharose 6Bなどがフミン物質の分画によく用いられている。

○限外ろ過：既知の一定の径の孔を開けた膜を用いて分子サイズによってろ過する方法を限外ろ過という。膜の分子サイズの下限を示す孔径（カットオフ値）は50～1,000,000の範囲にあり、孔径は完全に均一というわけではないのでカットオフ値は厳密ではない。さらに、カットされる分子量は試料の電荷と分子の形状に依存する。フミン物質は電荷が多く、形状も不明なため、ろ過膜に記載されている分子量には十分注意しなければならない。

実験的には限外ろ過は簡単な方法である。底に膜をいれたセルに試料液を入れ、スターラーで攪拌しながら窒素ガスで圧をかけてろ過を行う。比較的多量の試料を迅速に分画するには便利な方法である。低分子量のカットオフ値を持つ膜を選べば、脱塩や濃縮の目的にも使用できる。ただし、分子量分布や分子量を決定するにはGPC程には適していない。

○遠心分離：超遠心分離法は通常、分子量測定に用いられるが、密度グラジエント、ゾーン遠心分離法を用いればフミン物質の分画を行うことができる。GPCや限外ろ過に比べると実験は面倒であるが、異なった方法により分画した結果を得ることは他の方法と比較する上で役に立つ。しかし、本法による測定例は多くない。

3.3 電荷に基づく分画

○電気泳動：電荷をもつ溶質が電場の中を移動することを利用して分離を行う。比較的新しい方法であるアクリルアミドゲルを用いる電気泳動、イソタコ電気泳動法などをフミン物質へ応用し分画した例がある。

○イオン交換：アニオン交換樹脂を用いる分画はあまり成功していないが、ポーラスなイオン交換材料-アニオン

交換ゲルやアニオン交換セルロースを用いると分画可能である。前処理的取扱に向いている。

3.4 吸着による分画

吸着剤を用いる分画である。フルボ酸成分は非フミン物質成分がかなり含まれている場合が多いので、フルボ酸の分画に向いている。吸着剤には活性炭、アルミナ、ゲルが用いられ、脱離には各種の有機溶媒や酸、塩基が用いられる。フミン物質の活性炭への吸着は強いので、脱離に強い試薬を使わねばならずフミン物質の分解が心配されることもある。

メチルメタクリル酸樹脂である XAD-8 は比較的弱い吸着剤なので水中からフミン物質を分離精製するのに用いられる。Yonebayashi 等¹⁷⁾は土壌フミン酸を XAD-8 に吸着させ、pH 勾配溶出により分画を行った。

4. キャラクタリゼーション

分離、濃縮、分画により得られたフミン物質についてそれぞれの性質を調べなければならない。フミン物質が多くの化合物の混合物であることにより、キャラクタリゼーションの方法にもいろいろな制約がある。以下に主要な方法について簡単に記す。

4.1 元素分析および官能基分析

元素分析は微量の試料で行えるので多くのフミン物質について測定されている。灰分が 5 % を超える場合には分析値にかなりの誤差があると考えられる。フミン酸は大体 50 % の炭素、5 % の水素、40 % 近い酸素より成っている。

主要な官能基はカルボキシル基、水酸基、カルボニル基、フェノール性水酸基である。カルボキシル基とフェノール性水酸基をあわせて全酸度という。全酸度およびカルボキシル基の測定法には土壌フミン物質を対象に普及している間接的な滴定法がある¹⁸⁾。最近では ¹³C-NMR の測定から各官能基の定量が行われるようになった。

4.2 スペクトルによるキャラクタリゼーション

○紫外、可視吸収スペクトル：フミン物質は特徴的な吸収をもたず、紫外部から長波長へ向かうにしたがって吸収は単調に減少する。土壌フミン物質については 465 nm と 665 nm の吸光度の比 (E₄/E₆) がフミン化度の指標と考えられており¹⁹⁾、低い値ほどフミン化が進んでいるとみなされる。吸収の生じる構造はわかっていないので、測定は手軽にできるが得られる情報は多くない。

○蛍光スペクトル：フミン物質は蛍光を発することは知られており、励起、発光スペクトルとも緩やかな山型を示す。したがって蛍光スペクトルからフミン物質の構造を特定するのは困難で、励起スペクトルから起源 (土壌、水、

など) を特定したり²⁰⁾、海水中のフルボ酸の定量²¹⁾などに利用されている。むしろフミン物質と他の物質との相互作用の研究に用いられる例が多い²²⁾。

○赤外吸収スペクトル：多くの場合フミン物質の測定は固体状態で行われる。混合物であるためブロードな吸収帯になるが、これらの吸収帯から官能基や部分的構造を推定することができる。本法は試料が数 mg で足りるので試料が少ない場合には重要な分析手段になる。

○¹H-NMR：比較的早くから応用され化学シフトの帰属もされている。

○¹³C-NMR：Wilson²³⁾は土壌有機物の ¹³C-NMR 測定をまとめて主要な化学シフトとその帰属を示した。いわゆる、CP/MAS (Cross-Polarization Magic Angle Spinning) 法が導入されて固体状態の測定が可能になり、官能基の測定、芳香族炭素量の見積りなど広く利用されるようになった。

4.3 分子量、分子量分布

混合物で多分散性を示すフミン物質の分子量を測定するのは簡単なことではないが、1) 分子構造の推定 2) 他物質との相互作用において化学量論的關係を明らかにできる。3) 起源別フミン物質の比較、等のために重要である。

平均分子量には数平均分子量 (M_n)、重量平均分子量 (M_w)、Z-平均分子量 (M_z) があり、測定法によって得られる分子量の種類は決まっている。M_n は束一的性質の測定、すなわち凝固点降下、蒸気圧浸透圧法などにより、M_w は光散乱法、沈降法などにより、M_z は超遠心法などによって得られる。

分子の大きさを測定する GPC、限外ろ過法、X 線小角散乱法なども応用されている。前述のように GPC、限外ろ過法は分画法としても用いられる。

5. フミン物質の分画とキャラクタリゼーションの例

5.1 限外ろ過による分画

海底堆積物から抽出したフミン酸を限外ろ過膜 (Amicon Co.) を用いて分画した結果を表 2 に示す²⁴⁾。これより、分子量 30 万以上の成分が 55 % に達していることがわかる。また、分子量の高い成分は炭素の含量も大きく、疎水性の大きいことも明らかである。各成分の表面張力測定結果を図 4 に示した。高分子量成分の表面張力は濃度とともに大きく減少し、他の成分より低濃度で会合体を作る傾向にある。分画した成分をさらにゲルクロマトグラフィーによって分子量分布を調べると図 5 のようになり、傾向としては限外ろ過による分離と一致した。これらの結果をみると、限外ろ過による分画は、分子量のシャープさはよくないが大幅なずれはないようである。最近の研究では、フミン物質の会合はかなり低濃度においても認められ

表 2 相模湾堆積物フミン酸の画分の元素組成

Sample	C (%)	H (%)	N (%)	Content (%)
Sagami-2	47.9	4.8	4.8	
A	51.0	5.4	5.2	54.9
B	49.5	5.0	5.4	20.3
C	45.0	4.1	5.2	3.3
D	44.5	4.0	4.8	5.1
E	29.2	2.7	2.9	15.4

(XM 300 はカットオフ値 300,000 を表す)

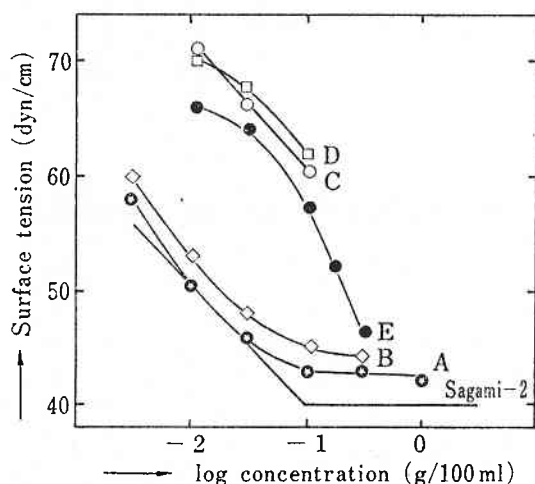


図 4 分画成分の濃度と表面張力の関係

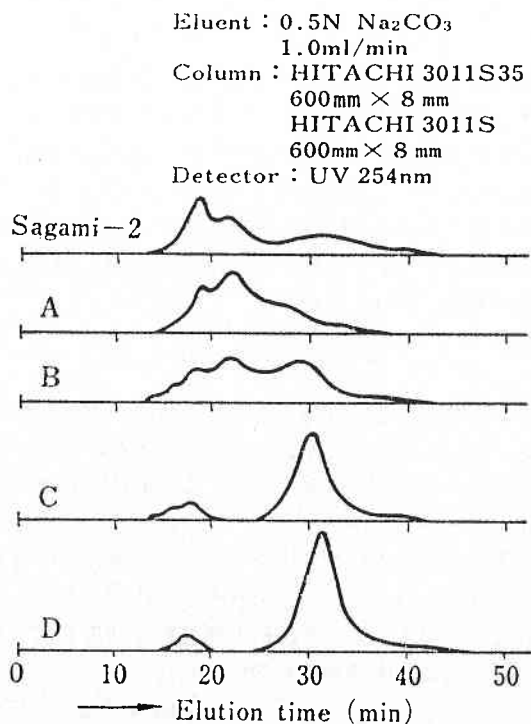


図 5 分画成分の GPC

る²⁵⁾ので、ろ過の過程における会合には十分注意する必要がある。

フミン酸の高分子量成分が低分子量成分にくらべて界面活性が高いことは他にもいくつか報告がある⁵⁾。

5.2 吸着クロマトグラフィーによる分画

Yonebayashi 等¹⁷⁾は XAD-8 を用いて土壌フミン酸を分画し、各成分のキャラクタリゼーションを行った。まず、pH グラジエント溶出により 4 つのピークに分離したがいずれも不完全なので、pH7, 11 の緩衝液、水、50% エタ

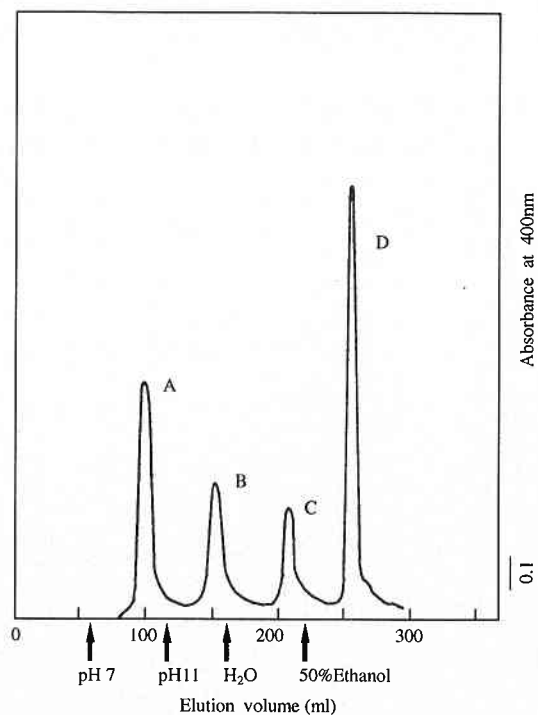
表 3 吸着クロマトグラフィーによる分離成分の性質¹⁷⁾

	A	B	C	D
カルボキシル基	4.2	4.0	3.2	2.5
カルボニル基	6.6	5.4	3.8	1.3
フェノール性水酸基	0.8	1.2	1.1	0.5
アルコール性水酸基	4.6	4.3	1.3	5.5
芳香族プロトン	66	53	51	16
ラクトンプロトン	12	15	13	24
メトキシルプロトン	13	20	12	16
α 位脂肪族プロトン	3	3	3	4
β 位脂肪族プロトン	3	5	17	35
γ 位脂肪族プロトン	3	4	4	5

官能基は meq/g で、各種プロトンは $^1\text{H-NMR}$ のスペクトルに占める割合 (%) で表した。

腐植酸は Inceptisol から抽出した。

(A, B, C, D は図 6 と同記号)

図 6 吸着クロマトグラフィーの段階溶出曲線¹⁷⁾

ノールによって段階的に溶出を行い、4成分に分離した(図6). 各成分の性質を表3に示す. この結果からAはカルボキシル性, Bはフェノール性, Cは準脂肪族性, Dは脂肪族性成分と名づけている.

5.3 液体クロマトグラフィーによる分画

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によりフミン物質を分析する試みは多いが既知の物質をマーカーにしての分析はなかなか難しい. しかし, 充填剤を選択すれば特定の性質をもつ成分を分けるために有効に利用できると思われる.

河川フルボ酸を HPLC により分離し, 吸収スペクトルによりキャラクタリゼーションを行った結果²⁶⁾は次のようである. Suwannee 川より採取したフルボ酸 (IHSS 精製) を予備的に疎水性の強い成分と親水性の強い成分に分け, さらに各成分をクロマトグラフィーにより分離した. 図7にクロマトグラムを示す. 図中ピーク3の成分には発色団が含まれており, 密な構造をしていると考えられる. 疎水性の強い成分は全体の約30%であり, クロマトグラムから一定のユニットが繰り返す構造であることがわかった. またこの繰り返しのユニットには共役した脂肪族ケトンとフェノール性化合物が含まれている.

筆者等は海底堆積物より抽出したフミン酸をその疎水性に基づいて分離することを試み, まず種々のカラムを用いて HPLC により分離挙動を調べた²⁷⁾.

用いたカラムの充填剤はシリカゲルに種々の炭化水素を修飾したもので, クロマトグラムを図8に示す. C-8およびC-18による分離が比較的良好に行われていることがわかる.

C-18 カラムを用い溶離液のメタノールの割合を変えると, メタノールの割合が多いほど保持時間は短くなるが,

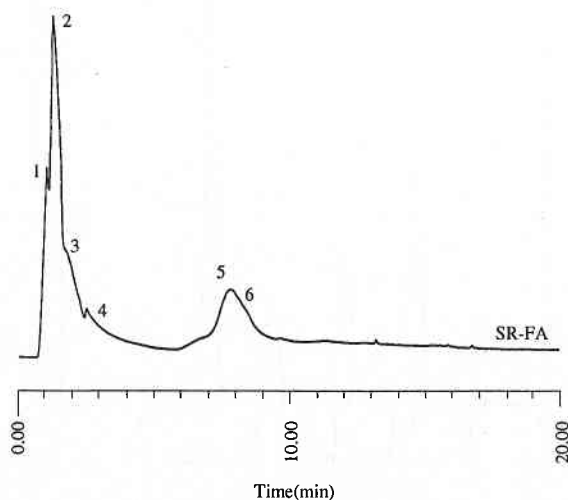


図7 フルボ酸の HPLC (UV 検出)²⁵⁾

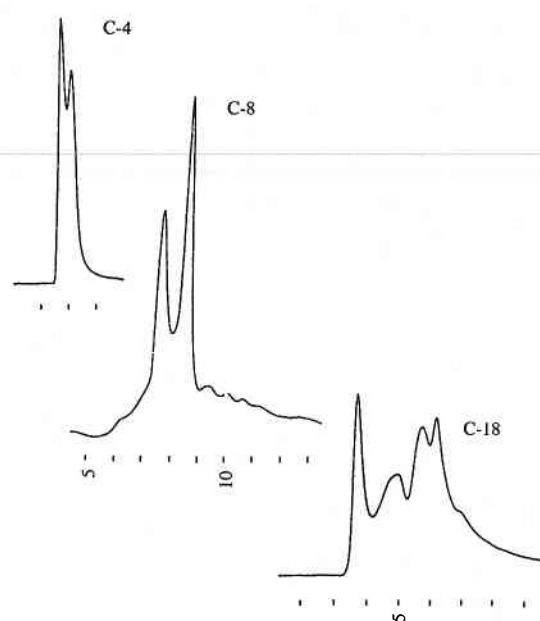


図8 海洋堆積物フミン酸の HPLC (横軸は min)

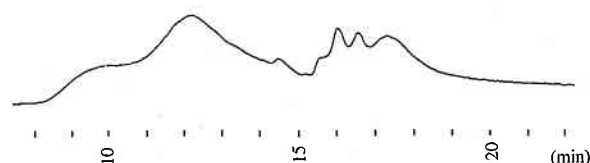


図9 分取用カラムによるフミン酸のクロマトグラム

分離はよくない. 分取用のカラム (20×300 mm) を用いて分離した結果, 図9のように大きく3成分に分かれることがわかったものの, 充填剤への吸着が強く分取には至らなかった. フミン酸水溶液は酸性にしたり, アルコール濃度を高くすると溶解度が減少するので注意が必要であり, 溶離液を更に工夫することにより疎水性の違いに基づく分離が可能になると思われる.

6. 結 語

フミン物質の分離・分画の方法と一般的なキャラクタリゼーションの方法について概説し, 具体例をいくつか挙げた. 分子サイズによる分画により, 高分子量成分は界面活性の高いことが明らかになった. 機能性の高い成分を分離することにはまだ成功していない. フミン物質を利用するために, 機能と組成との関係を解明し, 特定の機能を持った成分を分取できるような方法の開発を続ける予定である. 本研究の一部は本所奨励研究費により行った.

(1994年8月12日受理)

参 考 文 献

- 1) I.H. Suffet and P. MacCarthy (Eds.): Aquatic Humic Substances, Influence on Fate and Treatment of Pollutants, American Chem. Soc., Washington DC (1989).
- 2) B. Allard, H. Boren and A. Grimvall (Eds.): Humic Substances in the Aquatic and Terrestrial Environment, Springer-Verlag, Berlin (1991).
- 3) 篠塚則子: 生産研究, 45, 486 (1993).
- 4) N. Senesi and T.M. Miano (Eds.): Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health, Elsevier, Amsterdam (1994).
- 5) 篠塚則子: 表面, 31, 205, (1993).
- 6) H. Kubler, in Ref. (2) p. 429.
- 7) R. Klotzing and B. Helbig, in Ref. (2) p. 407.
- 8) K. Kumada: Chemistry of Soil Organic Matter, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo (1987).
- 9) K. Yonebayashi and T. Hattori, Soil Sci. Plant Nutr., 34, 571 (1988).
- 10) E.M. Thurman and R.L. Malcolm: Environ. Sci. Technol., 15, 463 (1981).
- 11) E.M. Thurman, R.L. Malcolm and G.R. Aikin: Anal. Chem. 50, 775 (1978).
- 12) B.K.G. Theng, J.R.H. Wake and A.M. Posner: Plant and Soil, 29, 305 (1968).
- 13) K. Kumada and Y. Kawamura, Soil Sci. Plant Nutr., 14, 198 (1968).
- 14) R.S. Swift: Humic Substances in Soil, Sediment, and Water, Chap. 15, p.369, John Wiley & Sons, New York (1985).
- 15) R.S. Swift and A.M. Posner: J. Soil Sci., 22, 237 (1971).
- 16) R.S. Cameron, B.K. Thornton and A.M. Posner: J. Soil Sci., 23, 394 (1972).
- 17) Y. Yonebayashi and T. Hattori: Geoderma, 47, 327 (1989).
- 18) M. Schnitzer and S.V. Kahn: Humic Substances in the Environment, Chapter 3, John Wiley & Sons, New York (1972).
- 19) M.M. Kononova: Soil Organic Matter, p.101, Pergamon, London (1966) など
- 20) N. Senesi, T.M. Miano and M.R. Provenzano: in Ref. (2), p. 63.
- 21) K. Hayase and H. Tsubota: Geochim. Cosmochim. Acta, 49, 159 (1985).
- 22) N. Shinozuka: Anal. Sci., 7, Supplement 1087 (1991).
- 23) M.A. Willson: NMR Techniques and Applications in Geochemistry and Soil Chemistry, p. 70, Pergamon Press, Oxford (1987).
- 24) S. Hayano, N. Shinozuka and M. Hyakutake, J. Japan Oil Chem. Soc., 31, 357 (1982).
- 25) N. Shinozuka and Y. Nihei, in Ref. (4), p. 889.
- 26) F.Y. Saleh et al, in Ref. (2), p. 47.
- 27) 篠塚則子, 李章瑋: 第32回油化学討論会要旨集, p. 156 (1993).