

# 安定同位体分析のための植物体からの水の抽出について — ポット試験による検討 —

Extraction of Water from a Plant for Isotopic Measurement  
— Pot Experiments —

飯塚 幸子\*・山中 勤\*\*・田中 正\*\*

Sachiko IIZUKA\*, Tsutomu YAMANAKA\*\* and Tadashi TANAKA\*\*

## I はじめに

近年、乾燥・半乾燥地域を中心として、植物体内の水と深度別の土壌水の安定同位体組成から、植物の水利用戦略（吸水深度とその時間変化や植物種間の相違）を明らかにしようとする研究が数多く行われている（たとえば、Dawson and Ehleringer, 1991；Flanagan *et al.*, 1992；Ehleringer and Dawson, 1992；Dawson, 1993；Sugimoto *et al.*, 2002；Sugimoto *et al.*, 2003；荒田ほか, 2001；小島ほか, 2003；関谷・矢野, 2002；高橋, 1999；高橋・杉本, 1999）。こうした手法は日本などの湿潤地域でも適用可能なものであり、植物の水利用戦略についてさらに多くの知見が得られるものと期待できる。しかしながら、安定同位体分析に供するための植物体内からの水の抽出法に関しては、幾つかの文献で簡単に記載されているのみであり、その精度や問題点に関する詳細な検討はこれまであまりなされてこなかった。そこで本研究では、水抽出の際に真空蒸留法を用い、それが安定同位体組成に及ぼす影響を把握することを目的として、ポット試験を行

い、抽出法に関わる精度と問題点について検討を行った。

## II 方法

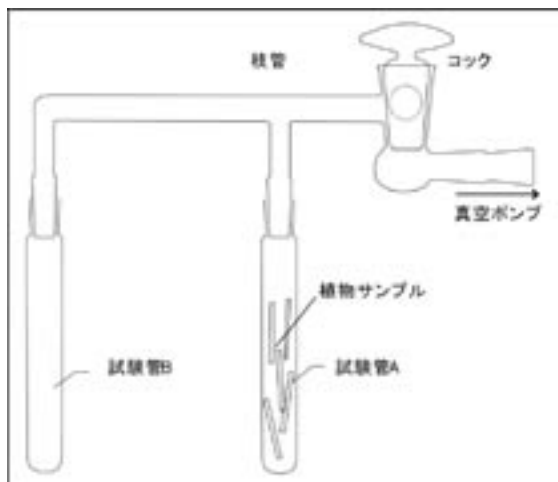
### 1. 真空蒸留

土壌などの多孔質媒体中に含まれる水分を抽出する方法としては、吸引法、遠心法、常圧蒸留法、真空蒸留法、および azeotropic 蒸留法（共沸蒸留法）などがあるが（山中・嶋田, 1997；杉本, 2002）、このうち植物体からの水抽出に適用可能なものは後三者の蒸留による方法である。この方法では、抽出過程で水の相変化を伴うことから、同位体分別が生ずる可能性がある。したがって、植物体中に存在する水は全量回収する必要があり、また抽出過程における外部水蒸気の混入にも注意しなければならない。回収率に関してはそれぞれの方法で明確な優劣はないが、外部水蒸気の混入に関しては、完全閉鎖系での真空蒸留が最も安全性が高いと考えられる。

本研究で用いた真空蒸留装置の模式図を第1図に示す。蒸留の工程は次の通りである。

\* 筑波大学第一学群自然学類（現：株式会社ジェイ・ワン）

\*\* 筑波大学陸域環境研究センター



第1図 真空蒸留装置の模式図

- 1) 枝管の接続部にシリコングリースを塗り、植物サンプルの入った試験管 A と空の試験管 B を接続する。
- 2) コックを閉めた状態で試験管 A を液体窒素で冷却し、植物サンプルを完全に凍結させる。
- 3) 枝管を真空ポンプに接続し、コックを開けて内部を十分に減圧した後 (5分程度)、コックを閉じる。このとき、試験管 A は液体窒素で冷却されたままであるので、植物体中の水が気化して散逸することはない。
- 4) 試験管 A の冷却を止め、湯煎にかける。また同時に、試験管 B を液体窒素で冷却する。この状態を続けることにより、植物体中の氷が融解し、気化する。気化した水蒸気は水蒸気圧の低い試験管 B に移動してそこで昇華 (気体→固体) して捕捉されるので、容器内は常に真空状態が保たれ、蒸留が速やかに進行する。

ここで問題となるのは、湯煎の温度と蒸留継続時間である。なぜなら、これらの設定の仕方によって回収率が変化する可能性があるからである。このため、本研究では後述するように複数の

条件で蒸留を行い、測定結果を比較した。なお、湯煎には広口フラスコと市販のホットプレートを用い (第2図)、温度計で水温を確認しながら加熱の程度を制御した。また、100℃以上に加熱する場合には内径 20 mm のパイプ用マントルヒーター (P-22, 東京硝子器械) とボルトスライダ (V-130-5, YAMABISHI) を用いた。

## 2. ポット試験の概要とサンプル採取

真空蒸留による抽出水が同位体分別の影響を受けているか否かを判断するには、同位体組成既知の水を吸わせた植物体から真空蒸留によって水を再抽出し、その同位体組成をもとの水の値と比較するのが最も直接的で確実である。

本研究では、樹高 1.5 m、地際の幹直径 2 ~ 3 cm 程度の稚樹を、直径 25 cm、深さ 20 cm のポリプロピレン製ポット (一般園芸用) に植えて用いた。また、ポット内には、土壌水採取用のサクシオンライシメータを 2 本挿入した。

土壌および植物体中の水を入れ替えるため、同位体組成既知の水 (一般水道水) を大量に散水し、重力排水させた後、数日放置する、というプロセスを 1 ~ 2 週間程度繰り返し行った。この際、水道水の同位体組成が日毎に変化する影響を除くため、実験開始時に十分な量の水を密閉ポリ



第2図 真空蒸留装置の概観



第3図 実験に用いたポット植栽のヒメリンゴ

タンクに汲み置きして用いた。また、蒸発による土壌水の同位体濃縮が生じないように、土壌表面をビニールで被覆した(第3図)。

植物体サンプルは園芸用鋏で切り取り、カッターで除皮した後、1～2 cm程度の薄片に裁断した。サンプルの保存には真空蒸留用の試験管をそのまま使い、2重シリコン栓で密封して冷凍保存した。

### 3. 安定同位体測定

水素・酸素安定同位体測定には、筑波大学生命環境科学研究科の質量分析計(MAT252, ThermoFinnigan)を使用した。水素については白金触媒を用いた水素ガス平衡法を用い、酸素については炭酸ガス平衡法を用いた。平衡時間はそれぞれ6時間と9時間である。

測定結果は、次式で定義される $\delta$ 値を用いて表記した。

$$\delta = \frac{R_{SA} - R_{ST}}{R_{ST}} \times 1000 \quad (\%) \quad (1)$$

ここで、 $R_{SA}$ と $R_{ST}$ はそれぞれ試料水と標準平均海水(V-SMOW)の同位体比(D/H or  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ )である。測定精度は、 $\delta\text{D}$ で $\pm 1\%$ 、 $\delta^{18}\text{O}$ で $\pm 0.1\%$ である。

## III 結果

### 1. 実験1

まず、入手が容易なヒメリンゴ(*Malus Prunifolia*)を用いて実験を行った。この時、採取する部位毎に水の同位体組成が同じであるか否かを確認するため、枝・幹・根からそれぞれ2つずつサンプルを採取した。このうち、1つは80℃で1.5時間(以下、条件A)、もう1つは80℃で1時間蒸留した後さらに140℃で1時間(条件B)と、温度と蒸留時間を変えて水分の抽出を行った。

採取した水の $\delta$ 値を土壌水・水道水の値とともに第1表に示す。まず、 $\delta^{18}\text{O}$ について見てみると、条件Aで根から抽出した水のみが特異な値を示し、これ以外は概ね互いに近い値をとることが分かる。特に、条件Aで枝と幹から抽出した水の $\delta$ 値は、水道水や土壌水の $\delta$ 値とほぼ一致している。これに対し、条件Bで抽出した水はやや大きめの値を示している。したがって、枝と幹

第1表 実験1における水素・酸素安定同位体組成の測定結果  
条件A・Bは真空蒸留時の条件；詳細は本文参照。

サンプル	$\delta^{18}\text{O}$ (‰)		$\delta\text{D}$ (‰)	
	条件A	条件B	条件A	条件B
枝からの抽出水	-4.7	-4.5	-60	-184
幹からの抽出水	-4.8	-4.6	-53	-180
根からの抽出水	-7.1	-4.2	-65	-178
土壌水	-4.9		-31	
水道水	-5.0		-32	

については同位体分別の影響はほとんどなく、条件 A と B の比較では A の方が良好であると言える。なお、条件 B で根から抽出した水は相対的にやや高い  $\delta$  値を示しており、条件 A の場合と同様に、他のサンプルに比べて誤差が大きくなっている。この原因については現段階で断定はできないが、土粒子中の結晶水の混入、あるいは根の呼吸で生じた炭酸ガスとの間の同位体交換などが可能性として考えられる。

一方、植物体から抽出した水の  $\delta D$  は水道水・土壌水と比較して明らかに低い値を示しており、特に条件 B で抽出した水の値は 150% 以上低い値を示す。条件 A と B を比較すると、B の方がより多くの水を回収できると考えられるため、同位体分別が生じていたとしても、相対的に高い値を示すはずである。にもかかわらず、著しく低い値を示すことは、相変化に伴う同位体分別以外の誤差要因が存在することを示唆している。この点については、次章で詳しく議論する。

## 2. 実験 2

次に、抽出水の同位体組成の再現性と樹種間の差異を確認するため、コロラドトウヒ (*Picea pungens*) とシラカシ (*Quercus myrsinaefolia*) を用い、それぞれの枝から 3 サンプルずつを採取して、真空蒸留を実施した。蒸留時間は 1.5 時間、加熱温度は 80 °C とした。なお、実験 1 の結果を考慮し、水素の同位体測定は行わなかった。

コロラドトウヒから抽出した水の  $\delta^{18}O$  の平均値 (-5.24%) は土壌水の値 (-5.40%) とほぼ等しく、標準偏差も 0.04% と質量分析計の分析誤差よりも小さかった。一方、シラカシから抽出した水の平均値 (-4.53%) は土壌水の値 (-5.25%) より約 0.7% 大きくなっていった。しかし、標準偏差も 0.20% と大きく、ポットでの栽培期間中における水の入れ替えが不十分であった可能性を考えると、有意な差とは言い難い。

以上の結果から明らかなように、酸素同位体に

については、ヒメリンゴ同様、真空蒸留の過程における同位体組成の変化はほとんど生じておらず、 $\delta$  値の再現性は質量分析計の精度と同程度、もしくはやや低い程度である。

## IV 考察

実験 1 の結果からわかるように、真空蒸留による抽出水の  $\delta D$  値は異常な値を示す。こうした現象はこれまであまり知られていないが、最近、杉本 (2002) も同様の報告をしている。ただし、杉本がシベリアの植物から抽出した水の  $\delta D$  ( $\approx -20 \sim -170\%$ ) は、同じ水の  $\delta^{18}O$  ( $\approx -20\%$ ) と比較すると異常に高い値と言え、本研究とは逆の傾向を示している。

杉本 (2002) は  $\delta D$  の異常の原因として、植物体内の代謝産物 (有機物) が、白金触媒による水素ガス平衡反応を阻害したか、あるいは白金触媒の存在下で水-有機物間の水素同位体交換が生じたか、どちらかであろうと推測している。

一般に、植物体中の脂質成分 (揮発性油分を含む) の  $\delta D$  は極めて低い (米山, 1987)。そこで、これが本研究における  $\delta D$  の過小評価の原因であると想定して、固形パラフィンを用いて油分を吸着除去した後同位体分析を行ったが、測定値の異常は改善されなかった。

一方、植物体内の有機物の OH 基に含まれる水素原子は、周囲の水分子の水素原子と容易に交換されることが知られており (米山・笹川, 1994)、これが  $\delta D$  の異常の原因である可能性がある。しかし、これらの有機物の  $\delta D$  値は逆に周囲の水の同位体組成に影響されるので、本研究における著しい過小評価を十分に説明できるものではない。したがって、現段階では幾つかの要因は考えられるものの、 $\delta D$  の測定値の異常について原因を特定するのは困難である。

なお、海外の研究者による報告では、植物体からの抽出水の  $\delta D$  は概ね妥当な値を示すこと

が多いが（例えば，Dawson，1993），Lin and Sternberg（1993）の海岸湿性植物の研究のように，10‰程度 $\delta D$ が低くなるという報告もある。彼らはこの観測結果から，根における吸水時の同位体分別機構が存在するという仮説を立てているが，本研究同様，同位体分析時の有機物等の影響である可能性も否定できないと思われる。つまり， $\delta D$ の異常は植物種ごとに傾向が異なっている可能性があり，今後もさらにその原因を検討してゆく必要がある。

## V まとめ

酸素同位体に関してはほとんど組成を変えることなく，真空蒸留によって植物体から水を抽出できることが確認された。この際，80℃で1.5時間程度の蒸留時間が必要十分であった。しかしながら，水素同位体に関しては明らかに低すぎる値が得られ，その原因の究明は今後の課題である。

## 謝辞

同位体分析の実施にあたって，筑波大学生命環境科学研究科の藪崎志穂氏には懇切なる指導をいただいた。また，杉本敦子教授（北海道大学），辻村真貴講師（筑波大学），ならびに李 勝功博士（科学技術振興機構）には，植物体からの水抽出に関して，貴重な情報と資料の提供をいただいた。本研究は，文部科学省科学研究費補助金（若手研究B：15740289）および筑波大学学内プロジェクト（奨励研究）の補助を受けて実施された。

## 文献

荒田美美子・松尾奈緒子・大手信人・杉本敦子・張 国盛・王 林和・吉川 賢（2001）：臭柏 (*Sabina vulgaris* Ant.) と烏柳 (*Salix*

*cheilophila* Schneid.) の吸水深度に関する考察—水の安定同位体比を用いて。日本緑化工学会誌，**27**，258-260。

小島紀徳・池田裕弥・加藤 茂・松本 剛・濱野裕之・岡田直紀・坪山良夫・斉藤昌宏・安部征雄・高橋伸英・山田興一（2003）：安定同位体比分析を用いた豪州乾燥地域における樹木の水源推定に関する研究。水文・水資源学会誌，**16**，518-526。

杉本敦子（2002）：水循環研究のための水の安定同位体比サンプリング解析システムの開発。平成11年度～13年度科学研究費補助金（基盤研究（B）(1)）研究成果報告書，1-16。

関谷信人・矢野勝也（2002）：水素の安定同位体自然存在比から評価した植物が利用する水資源の由来。根の研究，**11**，35-42。

高橋和志（1999）：水の安定同位体比による植物の水利用の研究。根の研究，**8**，13-16。

高橋和志・杉本敦子（1999）：水の安定同位体比の利用による「植物・植生と水の関わり」の解析。日本生態学会誌，**49**，59-62。

山中 勤・嶋田 純（1997）：安定同位体分析のための信頼性ある簡便な土壤水採取法の提案。水文・水資源学会誌，**10**，181-184。

米山忠克（1987）：土壤—植物系における炭素，窒素，酸素，水素，イオウの安定同位体自然存在比：変異，意味，利用。日本土壤肥科学雑誌，**58**，252-268。

米山忠克・笹川英夫（1994）：土壤—植物系における炭素，窒素，酸素，水素，イオウの安定同位体自然存在比：1987年以降の研究の進歩。日本土壤肥科学雑誌，**65**，585-598。

Dawson, T. E. (1993): Water sources of plants as determined from xylem-water isotopic composition: perspectives on plant competition, distribution and water relations. Ehleringer, J. R., Hall, A. E. and Farquhar, G. D. eds.: *Stable Isotopes and Plant Carbon-Water Relations*,

- Academic Press, 465-496.
- Dawson, T. E. and Ehleringer, J. R. (1991): Streamside trees that do not use stream water. *Nature*, **350**, 335-337.
- Ehleringer, J. R. and Dawson, T. E. (1992): Water uptake by plants: perspectives from stable isotope composition. *Plant, Cell and Environment*, **15**, 1073-1082.
- Flanagan, L. B., Ehleringer, J. R. and Marshall, J. D. (1992): Differential uptake of summer precipitation among co-occurring trees and shrubs in a pinyon-juniper woodland. *Plant, Cell and Environment*, **15**, 831-836.
- Lin, Guanghi and Sternberg, L. da S. L. (1993): Hydrogen isotopic fractionation by plant roots during water uptake in coastal wetland plants. Ehleringer, J. R., Hall, A. E. and Farquhar, G. D. eds. : *Stable Isotopes and Plant Carbon-Water Relations*, Academic Press, 497-510.
- Sugimoto, A., Yanagisawa, N., Naito, D., Fujita, N. and Maximov, T. C. (2002): Importance of permafrost as a source of water for plants in east Siberian taiga. *Ecological Research*, **17**, 493-503.
- Sugimoto, A., Naito, D., Yanagisawa, N., Ichiyanagi, K., Kurita, N., Kubota, J., Kotake, T., Ohata, T., Maximov, T. C. and Fedorov, A. N. (2003): Characteristics of soil moisture in permafrost observed in East Siberian taiga with stable isotopes of water. *Hydrological Processes*, **17**, 1073-1092.
- (2004年6月11日受付, 2004年9月10日受理)