

(63) クエン酸第二鉄錯体とシデロフォア desferrioxamine B のリガンド交換反応に及ぼすイオン強度とpHの影響

伊藤 紘晃^{1*}・藤井 学²・真砂 佳史¹・大村 達夫¹

¹東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 (〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-06)

²東京工業大学大学院理工学研究科土木工学専攻 (〒152-8552 東京都目黒区大岡山2-12-1-M1-4)

* E-mail: itohiro@water.civil.tohoku.ac.jp

クエン酸鉄錯体とシデロフォア desferrioxamine B のリガンド交換反応に及ぼすイオン強度とpHの影響を、イオン強度0.01-0.7 MとpH 6-9の範囲で調べた。また、条件付き安定度定数と錯形成速度定数を理論式により求めることで、リガンド交換反応速度定数のモデル推定値を算出し、測定値との比較を行った。反応速度定数は、イオン強度が低いほど高くなり、pHが高いほど高くなる傾向が見られた。イオン強度による影響は、モデル推定によって比較的良好に表すことができた。一方、初期の反応モデルではpHの影響を良好に表現することができず、このことから炭酸イオンがクエン酸鉄錯体の解離を促進している可能性が示唆された。本研究は沿岸域における鉄の動態を解明し、藻類による鉄利用性を評価するための基礎となる。

Key Words : iron, citrate, ligand exchange, pH, ionic strength

1. はじめに

鉄は藻類を含むほぼ全ての生物に必要な不可欠な微量必須栄養素であり、様々な水域において鉄が藻類の生育に大きく関わっている^{1,3)}。特に沿岸域においては、都市開発による鉄供給量変化が生態系に影響を及ぼすことが明らかにになってきている。たとえば、陸から沿岸域への鉄供給が減少することで、沿岸域藻類の生長が制限されるという報告がある⁴⁾。反対に、鉄が高濃度で沿岸域に供給されることにより毒性藍藻類が大量に発生することも報告されている⁵⁾。このような問題を防ぐためには、沿岸域への適切な鉄供給量に関する知見が必要となる。しかしながら、水中における鉄の化学的挙動の複雑さ故に、沿岸域における藻類の鉄利用性については未だに十分な知見が得られていない。

水中における鉄の形態は、おおまかに溶解性の無機鉄 (Fe(II) と Fe(III))、不溶性の酸化水酸化鉄 (Fe(III)OOH)、及び有機リガンド (L) が配位した溶解性の有機鉄錯体 (Fe(II)L と Fe(III)L) に分類される⁶⁾。沿岸域表層において、これらのうち、第一鉄種 (Fe(II) と Fe(II)L) は溶存酸素により第二鉄種 (Fe(III) と Fe(III)L) へとすぐさま酸化される。一般に、藻類が摂取できる鉄

化学種は溶解性の無機鉄に限られるが⁷⁾、中性pH付近において Fe(III) の溶解度は低く (e. g. pH 8においておよそ0.1 nM⁸⁾)、溶解性の無機鉄濃度は非常に低くなる。このような特性によって、沿岸域における主要な鉄の形態は Fe(III)L と Fe(III)OOH となる⁹⁾。沿岸域には陸域から腐植物質などの有機リガンドが供給されるため、 Fe(III)L が比較的高濃度で存在する⁹⁾。また Fe(III)L は、 Fe(III)OOH と比較して化学的反応性が高く¹⁰⁾、沿岸域藻類の鉄摂取に重要な役割を果たしていると考えられる。

藻類が鉄を効率的に摂取する方法として、(i) Fe(III) と特異的に親和性のあるシデロフォアを産出し、リガンド交換反応を経て形成されたシデロフォア鉄錯体を摂取する方法¹¹⁻¹³⁾、(ii) スーパーオキシドや還元酵素などの還元剤を生産し、還元反応を経て生成された Fe(II) を摂取する方法^{14, 15)}が知られている。シデロフォアによる鉄摂取は多くのシアノバクテリアや一部の真核藻類に見られる^{11, 12)}。シデロフォアは強力な鉄キレートであり、シデロフォア鉄錯体は、自然水中の有機鉄錯体とシデロフォアによるリガンド交換反応によって形成されると考えられる。

総括反応としてリガンド交換反応をとらえた場合、シデロフォア鉄錯体の生成は、有機鉄錯体と競合リガンド

であるシデロフォアによる2分子反応として表される。これまでに、リガンド交換反応の詳細な反応過程として、(i)有機金属錯体に直接競合リガンドが付加した状態の中間体を経て競合リガンドによる錯体が形成される機構(会合反応機構)と、(ii)初期の有機リガンドと錯形成していない溶解性の金属がわずかながら存在し、これが競合リガンドと反応する機構(解離反応機構)の2つの反応機構の存在が示されている^{16,18)}。微量な溶解性の無機鉄は初期の有機リガンドの濃度に依存するため、全体のリガンド交換反応速度は、有機鉄錯体とシデロフォアの他に初期有機リガンドの濃度からも影響を受けると考えられる。

pHやイオン強度は、金属や有機リガンドの反応性に影響を与える重要な因子である^{19,21)}。特に海水と淡水が混合する沿岸域においては、pHやイオン強度が時間的・空間的に変化する。したがって、沿岸域でのシデロフォアによる鉄利用性を適切に評価するために、これらの環境要因の影響を知ることは重要である。

本研究においては、初期錯体としてクエン酸鉄錯体を、シデロフォアとして菌類由来シデロフォアである desferrioxamine B (DFB) を用いて、リガンド交換反応に及ぼすイオン強度とpHの影響を調べた。クエン酸は沿岸域での有機鉄の挙動を調べる研究で使用される代表的なモデルリガンドである^{22,24)}。クエン酸の持つカルボキシル基とフェノール基は自然由来有機物にも広く見られる官能基であり、環境中での有機鉄の動態の研究に役立つと考えられる²⁵⁾。DFBはシデロフォアに広く見られるヒドロキサム基を有する。ヒドロキサム基は鉄と強い錯体を形成することが知られており、海水からの検出例も報告されていることから、海水中で鉄と錯体を形成するリガンドとして機能している可能性がある^{13,26)}。また、DFBは分子量や鉄との結合性に関して、海洋性植物プランクトン由来のシデロフォアと近い特徴を示すことが知られている^{13,26)}。

2. 反応モデル

リガンド交換反応は複数の錯形成と解離反応からなる複合反応である。本研究においては、錯体の平衡濃度から算出した条件付き逐次安定度定数(2)節a)項と、錯形成理論式により算出した錯形成速度定数(2)節b)項を(1)節に示す過去に構築された反応モデル²⁷⁾に組み込むことによって、リガンド交換反応速度定数の推定式にイオン強度やpHの変化を反映させた。本研究における反応速度定数及び条件付き逐次安定度定数の定義を付録1に示す。

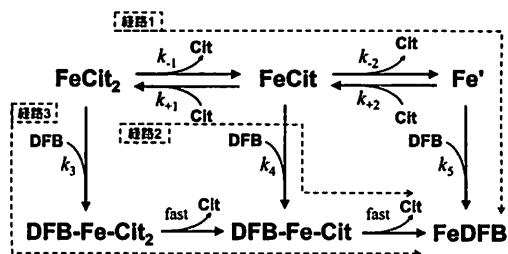


図-1. Ito ら²⁷⁾により示されたクエン酸鉄錯体と DFB のリガンド交換反応モデル。

(1) クエン酸鉄錯体とDFBのリガンド交換反応モデル

Ito ら²⁷⁾は、イオン強度0.5 M, pH 8.0の溶液中におけるクエン酸鉄錯体とDFBのリガンド交換反応を調べ、そのリガンド交換が図-1に示したような3つの反応経路により進行することを明らかにした。鉄に対するクエン酸の割合が高い場合(>20)、クエン酸鉄錯体のほとんど(>99%)は、鉄にクエン酸(Cit)が2分子結合した形態(FeCit_2)となる。すなわち、クエン酸鉄錯体とDFBからDFB鉄錯体(FeDFB)が形成される反応には、(1) FeCit_2 からクエン酸2分子が解離し、遊離した溶解性の無機鉄(Fe)とDFBが反応する経路、(2) FeCit_2 からクエン酸1分子が解離し、1対1結合のクエン酸鉄錯体(FeCit)が形成され、 FeCit とDFBが会合反応機構により反応する経路、(3) FeCit_2 とDFBが会合反応機構により反応する経路の3つの経路が存在すると考えられる。鉄に対するクエン酸濃度が十分高く、クエン酸のほとんどが錯形成していない状態で存在する場合(ie, $[\text{Cit}] \approx [\text{Cit}_T]$, $[\text{Cit}_T]$ はクエン酸の総濃度)、それぞれの反応経路によるリガンド交換反応速度定数($k_{\text{path}n}$; $n=1, 2, 3$)は次のように表されることが考えられる²⁷⁾。

$$k_{\text{path}1} = \frac{k_3}{K_{\text{FeCit}2} K_{\text{FeCit}}} \frac{1}{[\text{Cit}_T]^2} = k'_{\text{path}1} \frac{1}{[\text{Cit}_T]^2} \quad (1)$$

$$k_{\text{path}2} = \frac{k_4}{K_{\text{FeCit}2}} \frac{1}{[\text{Cit}_T]} = k'_{\text{path}2} \frac{1}{[\text{Cit}_T]} \quad (2)$$

$$k_{\text{path}3} = k_3 \quad (3)$$

ここで、式(1)と(2)において、 $k'_{\text{path}1}$ と $k'_{\text{path}2}$ を次のように定義した。

$$k'_{\text{path}1} = \frac{k_3}{K_{\text{FeCit}2} K_{\text{FeCit}}} = \frac{k_{-1} k_{-2} k_3}{k_{+1} k_{+2}} \quad (4)$$

$$k'_{\text{path}2} = \frac{k_4}{K_{\text{FeCit}2}} = \frac{k_{-1} k_4}{k_{+1}} \quad (5)$$

また、 $K_{\text{FeCit}2}$ と K_{FeCit} は、それぞれ FeCit_2 と FeCit の条件付き逐次安定度定数である。

$$K_{\text{FeCit}2} = \frac{k_{+1}}{k_{-1}} = \frac{[\text{FeCit}_2]_{\text{eq}}}{[\text{FeCit}]_{\text{eq}} [\text{Cit}]_{\text{eq}}} \quad (6)$$

$$K_{\text{FeCit}} = \frac{k_{+2}}{k_{-2}} = \frac{[\text{FeCit}]_{\text{eq}}}{[\text{Fe}]_{\text{eq}} [\text{Cit}]_{\text{eq}}} \quad (7)$$

ここで、平衡状態にある化学種の濃度を添え字eqによって表した。一般に、式(1) - (3)はそれぞれの反応経路が卓

越する場合に成立する。全体のリガンド交換反応に対して複数の反応経路が寄与する場合には、共通する反応物の消費と生成に関する競合を考慮する必要がある。鉄に対するクエン酸の割合が高い場合 (> 20), 最終生成物であるFeDFB以外の鉄はほとんどがFeCit₂であるため (i.e., [FeCit₂] ≈ [Fe_T] - [FeDFB]), 経路3の反応は経路1や2の反応と競合しないと考えられる。経路1と2はFeCitを共通の中間生成物として持つが、クエン酸濃度が高くFeCitからのFeCit₂再形成速度が、後続のFeCitの解離によるFe形成 (経路1) やFeCitとDFBの反応によるDFB-Fe-Citの形成 (経路2) の速度を大きく上回る場合には、FeCit濃度が k_{-1} と k_{-1} のみによって決定づけられるために、経路1と2の反応が互いに競合しなくなると考えられる。

FeCit₂とDFBによるリガンド交換の総括反応は、反応速度定数を k_{overall} (M⁻¹s⁻¹) として、次のように表される。



$$\frac{d[\text{FeDFB}]}{dt} = k_{\text{overall}}[\text{FeCit}_2][\text{DFB}] \quad (9)$$

全体のリガンド交換反応が3つの経路により進行することを考えると、 k_{overall} は次のように表される。

$$\begin{aligned} k_{\text{overall}} &= k_{\text{path1}} + k_{\text{path2}} + k_{\text{path3}} \\ &= k'_{\text{path1}} \frac{1}{[\text{Cit}_T]^2} + k'_{\text{path2}} \frac{1}{[\text{Cit}_T]} + k_{\text{path3}} \\ &= \frac{k_5}{K_{\text{FeCit2}}K_{\text{FeCit}}} \frac{1}{[\text{Cit}_T]^2} + \frac{k_4}{K_{\text{FeCit2}}} \frac{1}{[\text{Cit}_T]} + k_3 \end{aligned} \quad (10)$$

この式により示されるように、 k_{overall} はクエン酸濃度に依存する。すなわち、リガンド交換反応が主として経路1により進行する場合、 k_{overall} は $1/[\text{Cit}_T]$ に関する二次式となり、経路2により進行する場合、 k_{overall} は $1/[\text{Cit}_T]$ に関する線形一次式となる。Itoら²⁷⁾はそれまでに報告されていた安定度定数と錯形成速度定数による推定と、反応速度定数の測定結果から、イオン強度0.5 M, pH 8.0の溶液中において、クエン酸鉄錯体とDFBのリガンド交換反応が主として経路2と3により進行しており、 k_{overall} は次のように表されることを報告している。

$$k_{\text{overall}} = k'_{\text{path2}} \frac{1}{[\text{Cit}_T]} + k_{\text{path3}} \quad (11)$$

また、経路1と3がリガンド交換反応の主要な経路となった場合には、 k_{overall} は次のように表されと考えられる。

$$k_{\text{overall}} = k'_{\text{path1}} \frac{1}{[\text{Cit}_T]^2} + k_{\text{path3}} \quad (12)$$

(2) イオン強度による影響

淡水中と比較して、海水中にはナトリウムや塩素をはじめとした様々なイオンが豊富に存在する。イオン濃度が高くなると、静電的相互作用が大きくなり、分子間の反応性が変化する。したがって、クエン酸や鉄の平衡濃度や錯形成速度定数は、イオン濃度による影響を受けると考えられる。

溶液中のイオンの存在量を示す指標として、イオン強度 (I) が広く用いられる。イオン強度は、分子の活量あるいはエネルギーポテンシャルへの静電的相互作用の影響を表す際に現れるパラメータであり、次式で定義される。

$$I = \frac{1}{2} \sum_i (x_i Z_i^2) \quad (13)$$

ここで、 x_i と Z_i は、化学種 i の濃度と電荷を表す。

a) 条件付き逐次安定度定数 K_{FeCit2} , K_{FeCit} とイオン強度の関係

静電的相互作用の大きさは分子の電荷に依存するため、反応モデルにイオン強度の影響を加味するためには、前節の反応式中で示したような化学種の電荷を考慮する必要がある。表-1に示したように、FeやCit, FeCit等の化学種は、プロトンの付加や加水分解によって、電荷の異なる複数の化学的形態をとる。したがって、式(6)と(7)に見られるような平衡濃度へのイオン強度の影響を考える場合、 K_{FeCit2} と K_{FeCit} は次のように表される。

$$K_{\text{FeCit2}} = \frac{\sum [\text{FeH}_h \text{Cit}_2]_{\text{eq}}^{h-3}}{\sum [\text{FeH}_h \text{Cit}]_{\text{eq}}^h \sum [\text{CitH}_h]_{\text{eq}}^{h-3}} \quad (14)$$

$$K_{\text{FeCit}} = \frac{\sum [\text{FeCitH}_h]_{\text{eq}}^h}{\sum [\text{FeH}_h]_{\text{eq}}^{h+3} \sum [\text{CitH}_h]_{\text{eq}}^{h-3}} \quad (15)$$

ここで、加水分解によって水酸基が付加された化学種を考える場合、OHをHに換え、 h は水酸基の数をマイナスで表現する (e.g., $\text{Fe}(\text{OH})_2 \text{Cit}_2^{3-} \equiv \text{FeH}_{-2} \text{Cit}_2^{3-}$)。

それぞれの化学種の平衡濃度は、特定のイオン強度の下で定義される条件付き安定度定数 $\beta'_{\text{M}_m\text{L}_l\text{H}_h}$ により表される。

$$\beta'_{\text{M}_m\text{L}_l\text{H}_h} = \frac{[\text{M}_m \text{L}_l \text{H}_h]_{\text{eq}}}{[\text{M}]_{\text{eq}}^m [\text{L}]_{\text{eq}}^l [\text{H}]_{\text{eq}}^h} = \frac{\gamma_{\text{M}_m\text{L}_l\text{H}_h}}{\gamma_{\text{M}}^m \gamma_{\text{L}}^l \gamma_{\text{H}}^h} \beta_{\text{M}_m\text{L}_l\text{H}_h} \quad (16)$$

ここで、 $\text{M}_m \text{L}_l \text{H}_h$ は、 m, l, h 分子ずつの金属種 (M), リガンド種 (L), プロトン (H) からなる化学種を表す。 $\beta_{\text{M}_m\text{L}_l\text{H}_h}$ は活量に対応して定義される安定度定数で、これは $I = 0$ の理想溶液中の条件付き安定度定数に等しい

(i.e., $\beta_{\text{M}_m\text{L}_l\text{H}_h} = \{ \text{M}_m \text{L}_l \text{H}_h \}_{\text{eq}} / (\{ \text{M} \}_{\text{eq}}^m \{ \text{L} \}_{\text{eq}}^l \{ \text{H} \}_{\text{eq}}^h}$)。また、 γ は添え字で示した各化学種の平均活動度係数である。水酸基が oh 個付加された化学種 $\text{M}_m \text{L}_l (\text{OH})_{oh}$ は $\text{M}_m \text{L}_l \text{H}_{-oh}$ と表現する。比較的高いイオン強度に対しても適用可能 ($I < 0.5$ M) なDavies式では、化学種 i の平均活動度係数は次のように表される^{28,29)}。

$$\log \gamma_i = AZ_i^2 \left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - bI \right) \quad (17)$$

ここで、 $A = 1.82 \times 10^6 (\epsilon T)^{-3/2}$ であり (ϵ と T は、それぞれ水中の比誘電率と絶対温度)、25 °Cの水中では-0.5となる。 Z_i は化学種 i の電荷を表す。 b は経験的に求められる定数であり0.2 - 0.3の値が報告されている^{28,29)}。本研究において扱った化学種の安定度定数を表-1に示した。

表-1. 本研究で使った安定度定数 (25 °C)

	Cit ³⁺	DFB ²⁺	CO ₃ ²⁻	OH ⁻	Cl ⁻	MES ³⁺	HEPES ⁰⁺
H ⁺	HClit ²⁺ ^a	5.96	HCO ₃ ^{-a}	H ₂ O ^a	14.00	HMES ³⁺ ^a	HHEPES ⁰⁺ ^a
	H ₂ Cit ²⁺ ^a	10.56	H ₂ CO ₃ ^a	10.33			7.56
	H ₃ Cit ⁰⁺ ^a	13.62		16.68			
Na ⁺	NaCit ²⁺ ^a	1.4	NaCO ₃ ^{-a}	1.27			
			NaHCO ₃ ^{0a}	10.08			
Fe ³⁺	FeHCit ²⁺ ^b	14.67	Fe(DFB) ²⁺ ^d	19.6			
	FeCit ⁰⁺ ^c	11.89	Fe(DFB) ²⁺ ^d	23.38	FeCl ²⁺ ^j		1.28
	Fe(OH)Cit ²⁺ ^b	10.25	FeHDFB ²⁺ ^e	33.38	FeCl ₂ ²⁺ ^j		1.16
	FeH ₂ Cit ₂ ²⁺ ^b	26.76	FeH ₂ DFB ²⁺ ^e	36.31			
	FeHCit ₂ ²⁺ ^b	23.80					
	FeCit ₂ ³⁺ ^b	19.44					
	Fe(OH)Cit ₂ ⁴⁺ ^b	13.68					
	Fe(OH) ₂ Cit ₂ ⁵⁺ ^b	6.58					
	Fe(OH) ₃ Cit ₂ ⁶⁺ ^b	-3.15					

^a Morel and Hering²⁸⁾, ^b Ribas et al.³²⁾, ^c Königsberger et al.³³⁾, ^d Evers et al.³⁴⁾, ^e Kiss and Farkas³⁵⁾, ^f Bruno and Duro³⁶⁾, ^g Byme et al.³⁷⁾, ^h Pham et al.²¹⁾, ⁱ Liu and Millero³⁸⁾, ^j Millero et al.³⁹⁾, ^k Goldberg et al.³⁹⁾

表-2. 本研究で使った $k_{-w(Fe)}$ (25 °C)

鉄化学種(Fe _i)	$k_{-w(Fe)} (s^{-1})$
Fe ³⁺	1.67×10^2 ^a
Fe(OH) ²⁺	4.5×10^5 ^a
Fe(OH) ₂ ⁺	1.0×10^6 ^a
Fe(OH) ₃ ⁰ (aq)	6.3×10^7 ^b
Fe(OH) ₄ ⁻	1.0×10^6 ^b
Fe(CO ₃) ₂ ⁻	1.0×10^6 ^b
FeCl ²⁺	- ^c
FeCl ₂ ⁺	- ^c
FeHCit ⁺	- ^c
FeCit ⁰	3.4×10^6 ^d
Fe(OH)Cit ⁺	3.4×10^6 ^d

^a Blesa and Matijevic⁴⁰⁾, ^b Pham et al.²¹⁾, ^c 本研究において、これらの化学種のフラクションは小さかったため、錯形成速度定数を算出する際には考慮しなかった。; ^d Fujii et al.³¹⁾

b) 錯形成速度定数 k_p とイオン強度の関係

錯形成反応は有機物と金属の2分子反応であるため、イオン強度の影響を受けると考えられる。錯体の形成は、(i) 金属とリガンドが水分子を介して接触することによる対イオン (外圏錯体) の形成と、(ii) 続いて生じる金属からの水分子の解離と空軌道へのリガンドの配位 (内圏錯体の生成) により達成される^{19, 29)}。この理論に基づいて算出された錯形成速度定数は、多くの場合、実際の観測結果と一致することが示されている (e.g., $I = 0.02$ ³⁰⁾, 0.3 ²⁹⁾, 0.5 ³¹⁾ M)。錯形成速度定数の理論式の詳細を付録2に記した。

FeとLによる錯形成速度定数 k_p ($p = +1, +2, 3, 4, 5$) は次式で表される。

$$k_p = \sum_i (\alpha_{Fe_i} \alpha_{L_j} K_{OS(Fe_i, L_j)} k_{-w(Fe_i)}) \quad (18)$$

ここで、 Fe_i と L_j は電荷の違いを反映したFeとLの化学的形態を表す。 α は添え字で示した化学種のフラクションを表す (e.g., $\alpha_{Fe_i} = [Fe_i] / \sum [Fe_i]$)。 $K_{OS(Fe_i, L_j)}$ は Fe_i と L_j による外圏錯体の条件付き安定度定数を表し、 $k_{-w(Fe_i)}$ は Fe_i からの水分子解離反応の速度定数を表す。 $K_{OS(Fe_i, L_j)}$ は静電的相互作用を考慮した上で確率的に導かれる (付録2)。Fe種に関する $k_{-w(Fe_i)}$ は、表-2に示した値が報告されている。したがって、平衡濃度を算出することにより、FeとCitまたはDFBによる錯形成速度定数 (i.e., k_2 と k_3) を算出できる。また、式 (18) に示した錯形成反応速度定数算出式は、FeCitとCitまたはDFBによる錯形成速度定数 (i.e., k_1 と k_4) の算出にも適用可能である³¹⁾。

イオン間の静電的な働きは、イオン強度が高いほど制限を受ける。静電的な力は、電荷の符号の異なるイオンの間では引力として働くため、イオン強度が高くなると、引力は弱まり、錯形成速度定数は低くなると考えられる。反対に、同符号の電荷を有するイオン間では、斥力が働くため、イオン強度が上昇すると、錯形成速度は上昇すると考えられる。

(3) pHによる影響

pHによる影響を表現する際にも、3章(5)節で示すような化学種の平衡計算によって条件付き逐次安定度定数と錯形成速度定数を算出する手法が有効と考えられる。表-1に示されるように、ほとんどの化学種では水素や水酸基の付加や脱離が生じている。すなわち、式(16)により表される化学種の組成は、pHの影響を大きく受ける。したがって、pHの変化は、式(14)、(15)で表される K_{FeO_2} と K_{FeO_3} に変化をもたらす。また、pHの変動に伴う化学種のフラクションの変化は、式(18)で表される錯形成速度定数にも変化をもたらす。

3. 実験方法

(1) 試薬およびストック溶液の作成

塩化ナトリウム (NaCl, 関東化学), 炭酸水素ナトリウム (NaHCO_3 , 関東化学) と HEPES (Sigma) または MES (Sigma) を精製水 (大和薬品) に加えることで、NaCl/ NaHCO_3 溶液を作成した。MESとHEPESは、複数の金属 (Mg, Ca, Mn及びCu) に関して錯形成能が低いことが報告されているバッファーである⁴¹⁾。これらの鉄との錯形成能に関する報告はなされていないが、鉄キレートであるクエン酸とDFBのリガンド交換反応には影響を及ぼさないと考えられる。イオン強度の影響を調べる実験においては、NaCl/ NaHCO_3 溶液中のNaCl濃度を0.01, 0.03, 0.1, 0.2, 0.5, 0.7 Mと変化させた。 NaHCO_3 濃度を0.001 M, HEPES濃度を0.001 Mとし、pHを8.0とした。pHの影響を調べる実験においては、NaCl/ NaHCO_3 溶液のpHを6.0から9.0まで、0.5ずつ変化させた。NaCl濃度を0.5 Mとした (i.e., $I=0.5$ M)。 NaHCO_3 濃度は、pHが9.0の条件のみ0.01 Mとし、他のpHでは全て0.002 Mとした。pH 6.0, 6.5においてはMESを、pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5においてはHEPESを用い、それぞれの濃度を0.01 Mとした。NaCl/ NaHCO_3 溶液は使用時以外25℃の暗室に保存した。

1.0 g/L 硝酸第二鉄溶液 ($\text{HNO}_3=0.2$ M, 和光純薬工業) を精製水で希釈し、0.5 mM Feストック溶液を作成した。0.1 M クエン酸ストック溶液を、クエン酸ナトリウム二水和物 (関東化学) を精製水に溶解させることで作成した。2.5 mM DFB ストック溶液は、Deferoxamine mesylate salt (Sigma) を精製水に溶解させることで作成した。クエン酸ストックおよびDFBストックはpHを6.0–9.0にそれぞれ調整したものを用意した。Cit と Fe の錯体 (FeCit 錯体) 溶液を準備する際に用いるバッファーとして、0.02 M の MES (Sigma), HEPES (Sigma) および炭酸水素ナトリウム溶液を作成した。MESはpHを6.0および6.5に、HEPESはpHを7.0, 7.5, 8.0および8.5に、 NaHCO_3 はpHを

9.0に調整したものをそれぞれ用意した。以上の試薬ストック溶液は、使用時以外4℃の暗室に保存した。

本実験に使用した全てのガラス容器は、分析前に0.1 M塩酸により洗浄した。pHの測定には、HM-20 pHメーター (TOK DKK) を使用した。pHの調整には、精製水により希釈した0.1, 0.5, 1, 5 M 塩酸または水酸化ナトリウム溶液 (関東化学) を使用した。実験はすべて25℃の恒温室で行った。

(2) FeDFB濃度の測定

DFBは鉄と錯形成することにより波長429 nm付近にピークを有する吸光を示す。本研究においては、10 cmセル分光器システム (Ocean Optics) を用い、波長429 nmにおけるFeDFB錯体の吸光度を測定することで、FeDFB濃度の形成速度を測定観察した²⁹⁾。安定した吸光度を得るため、750 nmにおける吸光度を用いてベースライン補正を行った。FeDFB 錯体のモル吸光度は $\epsilon_{429} = 2,900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であり、既往の文献値 ($\epsilon_{429}=2,800$ ²⁹⁾, $\epsilon_{429}=2,700$ ⁴²⁾ $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) と同程度であった。

(3) リガンド交換反応速度の測定

2.0 mL ポリプロピレンチューブ内で、0.5 mM Fe ストック溶液50 μL と適量のCitストック溶液 (125–1,250 μL) を混合した後、20 mMバッファー溶液を250 μL 添加し、25℃の暗条件で1日置き平衡化させ、クエン酸鉄錯体溶液を用意した。バッファー溶液は、pH 6.0と6.5の実験にはMESを、pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5の実験にはHEPESを、pH 9.0の実験には NaHCO_3 を用いた。クエン酸鉄錯体溶液を、Fe濃度が1 μM , Cit 濃度が0.5 mMから5 mMとなるようにNaCl/ NaHCO_3 溶液に添加し、これをサンプル溶液とした。このサンプル溶液を10 cmシリンジキュベットに移し、吸光度をゼロに設定した後、DFB ストック溶液をDFB濃度が1 μM となるよう添加した。その後10 分間、FeDFB錯体の濃度変化を観察した。得られたFeDFB濃度の経時変化から、 FeCit_2 とDFBによるリガンド交換の総括反応速度定数 k_{overall} を算出した。

(4) モデル推定

表-1に示した安定度定数を用い、それぞれの化学種の平衡濃度を求めた。算出された平衡濃度を式(6)と(7)に適用することで K_{FeCit_2} と K_{FeCit} を算出した。また、平衡濃度から Fe_i と L_j のフラクション α_{Fe_i} , α_{L_j} を算出し (e.g., $\alpha_{\text{Fe}_i} = [\text{Fe}_i] / \sum [\text{Fe}_i]$)、これらと Fe_i と L_j の電荷により算出される $K_{\text{OS}(\text{Fe}_i, L_j)}$ 、及び表-2に示した $k_{-w(\text{Fe}_i)}$ を式(18)に適用することで k_4 と k_5 を算出した。これらの値を式(4)と(5)に代入することにより、 k'_{path1} と k'_{path2} の推定値を得た。また、これらの値を式(1)と(2)に適用す

ることで、各実験条件での k_{path1} と k_{path2} の推定値を得た。低NaCl濃度条件の下では、ストック溶液の pH調整時に添加したNaOHがイオン強度に影響を及ぼすため、各ストック溶液に添加したNaOHの濃度を平衡計算により推定し、反応溶液中のイオン強度と平衡濃度を算出する際に影響を加味した。また、イオン強度は、クエン酸等のイオン種の濃度も考慮して算出を行った。

平衡計算にはMINEQL+を用い、Davies式における定数 b は0.24とした⁴³⁾。FeCit種の $k_{-w(\text{Fe})}$ に関して、Fujiiら³¹⁾ は、 $\text{Fe}(\text{OH})\text{Cit}^-$ が98 %、 FeCit^0 が2 %を占める条件において、 $k_{-w(\text{Fe})}$ の平均値が $3.4 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ であったことを報告している。本研究の実験条件においては、常に $\text{Fe}(\text{OH})\text{Cit}^-$ のフラクションが大きかったため (> 98 %), $\text{Fe}(\text{OH})\text{Cit}^-$ と FeCit^0 の $k_{-w(\text{Fe})}$ を $3.4 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ とした (表-2)。 k_{path3} に関しては、モデル推定値を得ることはできない。本研究においては、測定された k_{overall} を式(11)に適用することによって、 k_{path3} の測定値を求め、 k_{path3} に対するイオン強度やpHの影響を調べた。以上により得られた k'_{path1} 、 k'_{path2} 、 k_{path3} を式(10)に代入することにより k_{overall} のモデル推定値を得た。本研究においては、比較的高いクエン酸濃度 (0.5 – 5 mM) に対して、その500から5000分の1の濃度の鉄とDFB ($[\text{Fe}] = 1 \mu\text{M}$, $[\text{DFB}] = 1 \mu\text{M}$) を用いており、この濃度条件においては、各反応経路間での中間生成物に関する競合は生じないと考えられる²⁷⁾。

4. 結果と考察

(1) リガンド交換反応に及ぼすイオン強度の影響

pH 8.0において、NaCl濃度を0.01 – 0.7 Mまで変化させることにより、異なるイオン強度の下で測定された総括反応速度定数 k_{overall} と $1/[\text{Cit}^-]$ の関係を図-2に示した。図-2より、イオン強度の上昇によってリガンド交換反応が減少すること示された。観察したNaCl濃度条件のうち、最も低い条件と高い条件を比較すると、NaCl濃度が0.01 Mから0.7 Mに上昇することで k_{overall} は1オーダー程度減少したことが分かる。観察した全てのイオン強度条件下において、 k_{overall} が $1/[\text{Cit}^-]$ の線形一次式として表されたことから、リガンド交換反応は主として経路2と3により生じていたと考えられる。 k_{overall} と $1/[\text{Cit}^-]$ の関係については、二次式を考慮した場合にも比較的良好な関係性が見られたが、NaCl濃度が0.7 Mの条件を除き、一次式の方がより強い相関関係が見られた。モデル推定から得られた k_{path1} と k_{path2} を比較した場合には、全ての条件において k_{path2} が k_{path1} を大きく上回っており、本研究の実験条件における主要な経路は経路2と3であったことが示

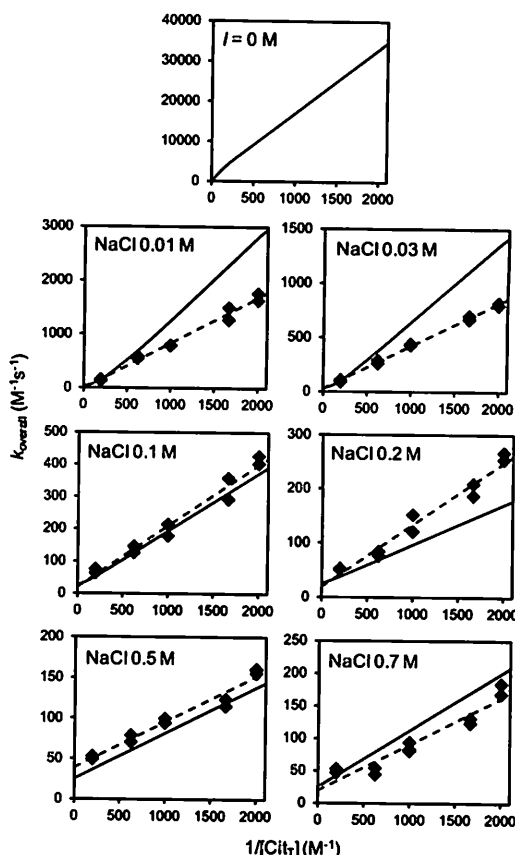


図-2 各イオン強度条件下における k_{overall} と $1/[\text{Cit}^-]$ の関係。◆は測定値を表す。破線は測定結果に式(11)をフィッティングすることにより得られた線形一次直線であり、実線はモデル推定値である。

された。NaCl濃度が0.7 Mの場合にも、一次式の当てはまりは比較的良好であったことから ($R^2 = 0.92$)、主要な経路は経路2と3であったと考えられる。

算出された k_{overall} と $1/[\text{Cit}^-]$ との関係から得られた k'_{path2} と k_{path3} に対するイオン強度 ($\approx [\text{NaCl}]$) の間には、イオン強度が高くなるにしたがい k'_{path2} が低くなる傾向が見られた (図-3 A)。一方、 k_{path3} はイオン強度が変化しても有意な変化を示さなかった (図-3 B)。測定された k_{path3} の平均値は $25 (\pm 8) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であり (括弧内は標準偏差, $n = 5$)、 $[\text{NaCl}] = 0.5 \text{ M}$ において測定された Itoら²⁷⁾ による測定値 ($18 (\pm 7) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) と近い値を示した。ここで、 $[\text{NaCl}] = 0.01 \text{ M}$ において観察された k_{path3} は負の値が得られたため、平均値の算出には用いなかった。分散分析の結果、 $[\text{NaCl}] = 0.01 \text{ M}$ と 0.5 M における k_{path3} は、他の濃度区との平均の間に有意な差 ($p < 0.05$) があった。 $[\text{NaCl}] = 0.5 \text{ M}$ における k_{path3} に関しては、Itoら²⁷⁾ によって $k_{\text{path3}} = 18 (\pm 7) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ という値も報告されていることから、 $[\text{NaCl}] > 0.03 \text{ M}$ においては k_{path3} はほとんど変化しないと考えられる。

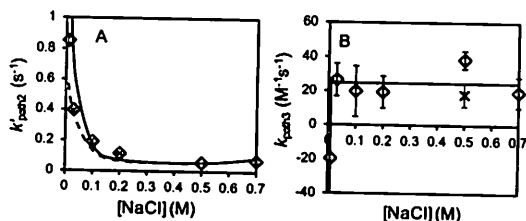


図3. イオン強度と(A) k'_{path2} および(B) k_{path3} の関係。◇とエラーバーは本研究による測定値とその標準誤差を表す ($n = 10$)。×とエラーバーは Ito ら²⁰⁾の研究による測定値と標準誤差を表す。A の実線と破線は、それぞれクエン酸濃度 0.5 mM と 5 mM におけるモデル推定値を表す。B の実線は $I = 0.01$ M 以外での測定値の平均を表す。

各実験条件下での K_{FeCit2} と k_4 の理論値を算出し、これらを式(5)に適用することで、 k'_{path2} に関する推定値を算出した (図3 Aの実線と破線)。また、推定された k'_{path2} と本研究において得られた k_{path3} の値 ($25 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) を式(11)に代入することで、 k_{overall} のモデル推定値を算出した (図2の実線)。図2では、イオン強度の影響が全くない状態を仮定した場合 (i.e., $I = 0 \text{ M}$) の k_{overall} のモデル推定値も示した。本研究の測定範囲では、NaCl濃度が0.7 Mから0.01 Mに減少すると k_{overall} が1オーダー程度上昇することが示されたが、イオン強度がより低くなり $I = 0$ の極限まで至ると、 k_{overall} はNaCl濃度0.01 Mの値からさらに1オーダー程度上昇することがモデル推定値から示された。図2に示されるように、クエン酸濃度が低くなると k_{overall} は上昇する。クエン酸濃度が0.5 mMからさらに減少した場合にも k_{overall} は上昇し続けると考えられるが、反応モデルの適用範囲に注意を払う必要がある。例えば、本研究における反応モデルはクエン酸鉄錯体のほとんどが FeCit_2 である条件を対象としているが、クエン酸濃度が低くなると FeCit や多核錯体 (e.g., Fe_2Cit_2) が優先するようになる⁴⁹⁾。推定された k'_{path2} は、イオン強度が低い場合にクエン酸濃度による影響を受けた。これは、本研究において用いた比較的高濃度のクエン酸 (0.5 – 5 mM) がイオン強度に影響しており (e.g., $[\text{NaCl}] = 0.01 \text{ M}$, $[\text{Cit}^-] = 0.5 \text{ mM}$ と 5 mM において、 $I = 0.019$ と 0.042 M)、また、低いイオン強度の下ではクエン酸濃度の変化がもたらす鉄錯体の平衡濃度の変化 (i.e., K_{FeCit2} と K_{FeCit} の変化) が大きかったためである。クエン酸濃度が低い場合、イオン強度の変化に伴う k'_{path2} の変化の傾向を良好に表すことができた。しかしながら、クエン酸濃度が高い場合、 $[\text{NaCl}] > \sim 0.05 \text{ M}$ の高いイオン強度の下では k'_{path2} を良好に推定できたものの、 $[\text{NaCl}] < \sim 0.05 \text{ M}$ の低いイオン強度の下で推定値が測定値よりも大きい値を示す傾向が見られた。 k_{overall} の推定精度は、このような k'_{path2} の推定精度と連動した。すなわち、 $[\text{NaCl}] \geq 0.1 \text{ M}$ の条件において、モデル推定値は実験結果を良好に再現できた。

一方で、 $[\text{NaCl}] = 0.01$ と 0.03 M の低いイオン強度の下では、クエン酸濃度が低い ($1/[\text{Cit}^-]$ が高い) 場合に、推定値は測定値よりも1.5倍程度大きく見積もられた。低いイオン強度条件下において大きな誤差が生じた原因としては、実験操作中のpH調整等に伴うイオン強度のずれが影響したことが考えられる。本研究においては、pH調整時に添加したNaOHの濃度を平衡計算により推定し、モデル推定値の計算時に影響を加味した。pH調整のために添加されたNaOHの濃度は、0.01 Mから0.02 M程度と推定された。しかしながら、推定されたNaOH濃度が実際に添加したNaOH濃度を正確に反映していたとは限らない。例えば、バッファのpH調整で添加するNaOH濃度は、多少推定値と一致しなくとも目的のpHが得られる。

図2に示されたように、クエン酸鉄錯体とDFBによるリガンド交換反応速度定数は、イオン強度の増加に伴って低下した。沿岸域におけるリガンド交換反応がイオン強度から同様の影響を受ける場合、河川から離れるにしたがい、リガンド交換反応速度が低下すると考えられる。一方で、リガンド交換反応速度定数はリガンド濃度によっても影響を受ける。河川水と海水との混合による有機物濃度の低下は、リガンド交換反応速度定数を上昇させると考えられる。

(2) リガンド交換反応に及ぼすpHの影響

NaCl濃度を0.5 Mとして観察したそれぞれのpH条件下で、総括反応速度定数 k_{overall} と $1/[\text{Cit}^-]$ との関係調べ (図4)、その傾きと切片を、それぞれ k'_{path2} と k_{path3} として得た (図5)。図4より、pHの上昇によってリガンド交換反応が上昇することが示された。上昇量は、8以下のpHにおいては緩やかで、pHが6.0から8.0に変化することによる k_{overall} の上昇は2倍程度であった。一方、pHが8を超えるると k_{overall} は急激に上昇し、pHが8.0から9.0に変化することで1オーダー程度の上昇が見られた。pH 6.0 – 8.0において算出された切片は正の値を示し、その値は前節で算出された k_{path3} ($25 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) と同程度であった (図5 B)。pH 6.0 – 8.0におけるリガンド交換反応は、主として経路2と3により進行したと考えられる。一方、pH 8.5と9.0において算出された切片は負の値を示した。このことは、全体のリガンド交換反応に対して経路1によるリガンド交換反応の寄与があったことを示唆する結果である。経路1が主要な反応経路となった場合、 k_{overall} は $1/[\text{Cit}^-]$ の二次式として式(12)のように表される。しかしながら、 k_{overall} と $1/[\text{Cit}^-]$ の間にはそのような関係は見られなかった (図6)。これらのことは、経路1と2による寄与は同程度で、優位な経路が存在しなかったことを示唆する結果である。そのため、pH 8.5と9.0におけるリガンド交換反応を理解するためには1, 2, 3全ての経

路による反応を考慮する必要があると考えられる。したがって、pH 8.5と9.0のそれぞれのpH条件において、式(10)の反応モデルを適用することが妥当と見なし、二次関数に対する最小二乗法により、測定された k_{overall} に対するフィッティングを行った(図4の2点鎖線)。ここで、 k_{overall} に対するクエン酸濃度の影響が非常に大きかったため、 k_{path3} に関しては有意な値を推定することができなかった。したがって、式(10)によるフィッティングに際して、pH 8.5と9.0においても $k_{\text{path3}} = 25 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であると仮定した。得られた k'_{path2} は図5 Aに◆で示した。 k'_{path1} と k'_{path2} は、それぞれpH 8.5において $6 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$ と 0.09 s^{-1} 、pH 9.0において $2 \times 10^4 \text{ Ms}^{-1}$ と 0.6 s^{-1} と求められた。

以上より得られた k'_{path2} とpHの間には、pHの上昇に伴い k'_{path2} が増加する傾向が見られた。その傾向は、pH 6.0–8.0においては緩やかであり、pH 8.0以降は急激であった(ie, pH 6.0, 8.0, 9.0における k'_{path2} は、それぞれ0.03, 0.06, 0.6 s^{-1})。 k'_{path2} に関して、イオン強度による条件付き安定度定数の変化と錯形成速度定数を用いることで、推定値を算出した(図5 Aの破線)。しかしながら、pH変化に伴う k'_{path2} の変化は、測定値と推定値で反対の傾向を示し、pH 8付近以外では推定値と測定値は一致しなかった。推定された条件付き安定度定数や、錯形成速度定数を確認したところ、 FeCit_2 の安定度定数 K_{FeCit_2} の推定値はpHの上昇と共に増加し、それによって k'_{path2} が減少する傾向が見られた(式(5))。測定結果では、pHの上昇と共に k'_{path2} が増加しており、この間に K_{FeCit_2} は減少していると考えられる。pHが上昇すると、 $\text{Fe}(\text{OH})_3\text{Cit}_2^{6-}$ のような、水酸基を多く含む化学種の割合が増加し、また、このような化学種の平衡を考えることで導き出される FeCit_2 種の条件付き安定度定数 K_{FeCit_2} は減少する。

SundaとHuntsman²⁰は、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)鉄錯体の条件付き安定度定数について、pHが7.7から9.0に上昇することで安定度定数が600分の1に減少したことを報告している。SundaとHuntsmanは、このように安定度定数を減少させる主たる要因は、pHの上昇により水酸基を含むEDTA鉄錯体が多く形成されることで、錯体の解離が促進されるためであると考察しており、また、このようなpHの影響はEDTA鉄錯体に限らないことを論じている。したがって、 FeCit_2 と FeCit に関して、表-1に示したような詳細な形態ごとに異なる解離速度定数を考えることで、pHと k'_{path2} の変化を示すことができるかもしれない。しかしながら、本研究でこのようなアプローチを試みた結果、pHと k'_{path2} の変化を良好に表すことはできなかった。

Bates⁴⁹は競合リガンドとしてトランスフェリンを用いた研究を行い、クエン酸鉄錯体のリガンド交換反応が炭酸によって促進されることを示した。Batesらは炭酸

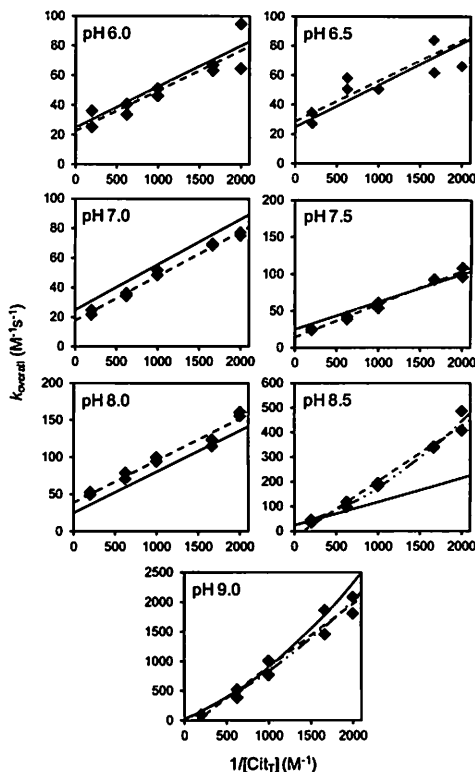


図4. 各pHにおける k_{overall} と $1/[\text{Cit}]$ の関係。◆は測定値を表す。破線は測定結果に式(7)をフィッティングすることにより得られた線形一次直線であり、実線は炭酸イオンの影響を考慮した場合の推定値を表す。pH 8.5と9.0における2点鎖線は、それぞれのpH条件の下で、経路1, 2, 3全てを考慮したフィッティングの結果を表す。

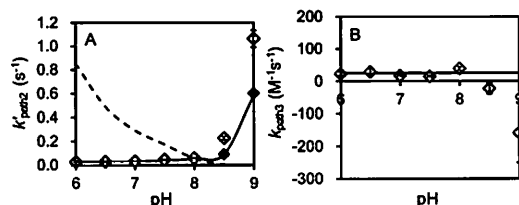


図5. pHと(A) k'_{path2} および(B) k_{path3} の関係。◇とエラーバーは測定値とその標準誤差を表す ($n = 10$)。◆はpH 8.5と9.0それぞれのpH条件で、経路1, 2, 3全てを考慮したフィッティングから得られた値である。Aの破線は安定度定数のイオン強度補正と錯形成理論によるモデル推定値を表し、実線は最終的に得られたモデル推定値を表す。Bの実線は本研究で得られた k_{path3} の推定値であり、 $[\text{NaCl}] = 0.03 - 0.7 \text{ M}$ における測定値の平均に等しい。

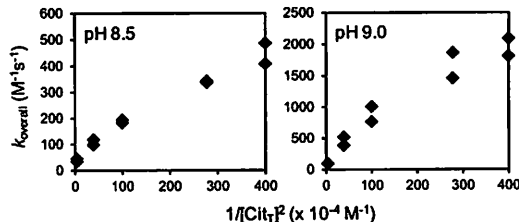
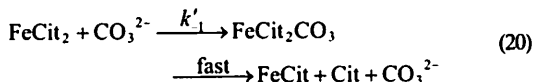


図6. pH 8.5と9.0における k_{overall} と $1/[\text{Cit}]^2$ の関係。

がクエン酸鉄錯体に作用することで、反応性の高い中間体が形成され、リガンド交換反応が促進されると考察している。本研究においては、pHが8から9に上昇する場合に、著しいリガンド交換反応の促進が見られた。このような傾向は、炭酸種のフラクシヨンの変化と一貫性を持つ。すなわち、pHが8から9に上昇する間、水素分子を含む炭酸種である H_2CO_3 と HCO_3^- のフラクシヨンが減少する一方で、水素分子を含まない CO_3^{2-} のフラクシヨンが増加する。このことから、本研究では FeCit_2 の解離反応が、これまで考慮していた1分子反応



の他に、次に示すような CO_3^{2-} との2分子反応によっても進行すると考えられる。



ここで、反応中間体の詳しい形態に関する知見はないため、仮に $\text{FeCit}_2\text{CO}_3$ と表した。式(20)を仮定した場合、 k'_{path2} は次式により表されると考えられる。

$$k'_{\text{path2}} = \frac{(k_{-1} + k'_1[\text{CO}_3^{2-}])k_4}{k_{-1}} \quad (21)$$

したがって、実験により得られた k'_{path2} に式(21)をフィッティングすることで(図5 Aの実線)、 k_{-1} と k'_1 に関してそれぞれ 0.0025 s^{-1} と $150 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ が得られた。ここで、 k_{-1} と k_4 は式(18)により算出される理論値を用いた。pHの影響を表すために仮定した反応モデルを図-7に示す。また、 FeCit_2 の解離反応速度の変化を考慮することで、経路1によるリガンド交換反応速度定数は次のように表されると考えられる。

$$k'_{\text{path1}} = \frac{(k_{-1} + k'_1[\text{CO}_3^{2-}])k_5}{k_{-1}K_{\text{FeCit}}} \quad (22)$$

式(21)と式(22)を考慮することにより、 k_{overall} は次のように表される。

$$\begin{aligned} k_{\text{overall}} &= \frac{(k_{-1} + k'_1[\text{CO}_3^{2-}])k_5}{k_{-1}K_{\text{FeCit}}} \frac{1}{[\text{Cit}_T]^2} \\ &+ \frac{(k_{-1} + k'_1[\text{CO}_3^{2-}])k_4}{k_{-1}} \frac{1}{[\text{Cit}_T]} + k_{\text{path3}} \end{aligned} \quad (23)$$

式(23)により k_{overall} のモデル推定値を算出したところ(図4の実線)、pH 8.5の場合を除いて、実験で得られた k_{overall} の変化を良好に表すことができた。pH 8.5と9.0においては、経路2, 3に加え経路1も全体のリガンド交換反応に寄与すると考えられる。 k_{overall} のモデル推定値の算出では、 k'_{path2} に関するフィッティングから得られた k_{-1} と k'_1 が k'_{path1} の推定にも用いられているが、pH 8.5においては、経路1によるリガンド交換反応の影響を過小評価してしまい、クエン酸濃度が低い場合に k_{overall} の推定値と測定値に2倍程度の誤差が生じた。一方で、pH 9.0において、経路1によるリガンド交換反応の影響ま

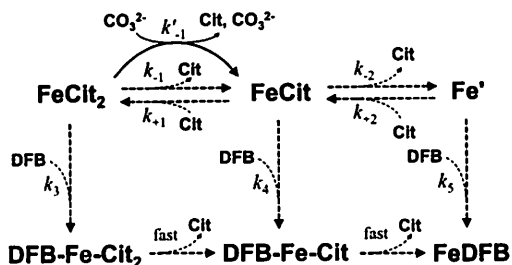


図-7. 本研究において pH の影響を表すために仮定したリガンド交換反応モデル。実線の矢印は本研究において新たに考慮した反応を表す。破線の矢印は従来の反応モデルにおいて考慮されてきた反応を表す。

で含めて、全体のリガンド交換反応速度定数を良好に再現することができた。pH 8.5での結果に見られるような誤差が生じた原因は、 CO_3^{2-} によって FeCit_2 の解離が促進されるという仮定が正しくなかったか、あるいは他にも考慮すべき反応が存在するためと推察される。 CO_3^{2-} の影響を考慮することで全体的なpHの影響を良好に表現できたことから、pHによってフラクシヨンが大きく変動するなんらかの化学種がリガンド交換反応に関わっていると考えられる。

代表的な河川水中のpHは7付近であるのに対して⁴⁶⁾、海水中的のpHは8付近の値をとる⁴⁷⁾。すなわち、河川水と海水が混合することでpHが上昇すると考えられる。クエン酸鉄錯体とDFBによるリガンド本研究に関して、8以下におけるpHの影響は比較的小さかった(e.g., 8.0における k_{overall} はpH 7.0の2倍程度、図-4)。一方で、pH 8以上においては、pHの増加により k_{overall} が飛躍的に上昇することが明らかとなった。沿岸域におけるリガンド交換反応がイオン強度から同様の影響を受ける場合、リガンド交換反応速度定数の変化は、海水のpHの高さに大きく依存すると考えられる。

(3) 二価金属による影響との比較

沿岸域においてリガンド交換反応に影響を及ぼす他の環境要因として、CaやMg等、海水中に豊富に存在する二価金属イオンの影響が考えられる。伊藤ら⁴⁸⁾はリガンド交換反応に影響を及ぼす環境要因として、CaとMgの影響を調べ、特にMgがクエン酸鉄錯体とDFBのリガンド交換反応に大きく影響し、Mg濃度が0 Mから海水中的の濃度レベルである50 mMに上昇することで、 k_{overall} が60倍程度上昇したことを報告している。本研究においては、イオン強度が0, 0.01, 0.7 Mと増加するに従い、 k_{overall} が1オーダーずつ減少することが示された。平均的な河川と海水中的のイオン強度は $\sim 0.002 \text{ M}$ から 0.7 M ²⁹⁾であり、河川から海洋へ至るまでに k_{overall} はおおよそ1オーダー減少すると考えられる。したがって、イオン強度による影響はMgによる影響とほぼ相殺されると予測される。また、

pHの影響に関して、一般的な河川のpHレベルが(7付近)から海洋のpHレベル(8.0)に至る k_{overall} の変化は2倍程度であり、通常、Mgやイオン強度の影響と比較するとpHの影響は少ない。一方でpHが8.5程度まで上昇するような場合にはpHの影響も重要となる。

5. まとめ

本研究では、クエン酸鉄錯体とDFBのリガンド交換反応に及ぼすイオン強度とpHの影響を調べた。また、それらの影響を考慮して算出されたクエン酸鉄錯体の条件付き逐次安定度定数と錯形成速度定数を従来のリガンド交換反応モデルに組み込むことで、リガンド交換反応速度定数のモデル推定を行い、測定値との比較を行った。イオン強度による影響に関して、イオン強度が上昇するにしたがい、クエン酸鉄錯体とDFBのリガンド交換反応速度定数が低下する傾向が示された。イオン強度の影響は、モデル推定値によって比較的良好に表現することができた。pHによる影響に関して、pHが上昇するにしたがい、クエン酸鉄錯体とDFBのリガンド交換反応速度定数は上昇し、特に8以上のpHにおいてその変化が大きくなることが明らかとなった。一方、初めに想定したモデル式では、pHによる影響を表すことはできなかった。pHによる影響は、 CO_3^{2-} が作用することによってクエン酸鉄錯体の解離反応が促進される反応を仮定することで推定できる可能性が示された。沿岸域においては、イオン強度やpHが空間的・時間的に変化し、それに伴いリガンド交換反応速度も変化する。本研究において得られた知見は、今後、環境水中で生じているリガンド交換反応を理解する際の有用な知見となると考えられる。リガンド交換反応は環境中の鉄の動態を理解する上で重要な反応であり、本研究結果は藻類の鉄利用を理解する上での基礎となる。

謝辞：本研究は、特別研究員奨励費(21・5243)の援助を受けて行われた。

付録1. 本研究にて用いた反応速度定数と条件付き安定度定数の定義

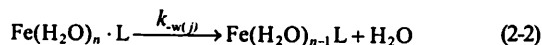
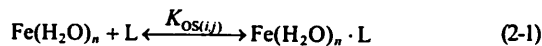
- k_{-1} : FeCit^2 が FeCit と Cit に解離する反応の速度定数 (s^{-1})
- k_{-1} : FeCit と Cit による FeCit_2 形成の速度定数 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
- k_{-2} : Fe^2 と Cit による FeCit 形成の速度定数 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
- k_3 : FeCit_2 とDFBによるDFB- FeCit_2 形成の速度定数 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
- k_4 : FeCit とDFBによるDFB- FeCit 形成の速度定数 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
- k_5 : Fe^2 とDFBによる FeDFB 形成の速度定数 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
- K_{FeCit_2} : FeCit と Cit による FeCit_2 形成の条件付き逐次安定

度定数 (M^{-1})

K_{FeCit} : Fe^2 と Cit による FeCit 形成の条件付き逐次安定度定数 (M^{-1})

$k_{\text{path } n}$: 経路 n によるクエン酸鉄錯体とDFBのリガンド交換反応速度定数 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)

付録2. 外圏・内圏錯体を考慮した錯形成速度定数の導出
鉄と有機リガンドによる外圏錯体と内圏錯体の形成反応は次のように表される。



ここで、 $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_n$ はFeの加水分解生成物を表す。 $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{L}$ と $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_{n-1} \text{L}$ はそれぞれFeとリガンドの外圏および内圏錯体、添え字 n はFeに配位している水分子の数を示す。各化学種の電荷と付加している水素および水酸基は省略した。 $K_{\text{OS}(\text{Fe}, \text{L}_j)}$ (M^{-1})は外圏錯体の安定度定数、 $k_{-w(\text{Fe})}$ (s^{-1})は $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_n$ からの水分子の解離速度定数を表す。表-1に示したように、 Fe^2 や L は電荷の異なる複数の化学的形態をとる。 $K_{\text{OS}(\text{Fe}, \text{L}_j)}$ と $k_{-w(\text{Fe})}$ は、それぞれの化学種 Fe_i 、 L_j の組み合わせに対して定義される。一般に、金属からの水分子の解離が錯形成反応の律速段階であるため、その後に生じるリガンドの開環反応は省略した。また、リガンドからの水分子の解離は金属からの水分子の解離に比べて非常に速いため無視できる。

式2-1, 2-2より、 Fe_i と L_j による内圏錯体の形成反応速度式、すなわち錯形成反応全体の反応速度式は次式で表される。

$$\frac{d[\text{Fe}_i \text{L}_j]}{dt} = K_{\text{OS}(\text{Fe}_i, \text{L}_j)} k_{-w(\text{Fe}_i)} [\text{Fe}_i] [\text{L}_j] \quad (2-3)$$

外圏錯体の安定度は、分子間の静電的相互作用に依存し、その安定度定数は次式に従う^{19,28,29}。

$$K_{\text{OS}(\text{Fe}_i, \text{L}_j)} = \frac{4000\pi N_A^3 f_z^2}{3} \exp \left[\frac{-Z_{\text{Fe}_i} Z_{\text{L}_j} e^2}{4\pi\epsilon_0 \epsilon k T a} \right] \quad (2-4)$$

ここで、 e は電気素量 ($1.6 \times 10^{-19} \text{ C}$)、 N_A はアボガドロ定数 ($6.0 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)、 k はボルツマン定数 ($1.4 \times 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$)、 T は絶対温度 (298 K)、 ϵ_0 は真空での誘電率 ($8.85 \times 10^{-12} \text{ C}$)、 ϵ は25°Cにおける水の比誘電率、 a は外圏錯体におけるリガンドと金属イオンについてそれぞれ中心間の距離 ($5.0 \times 10^{-10} \text{ m}$)を表す。 f_z は分子間イオン活動度係数であり、Davies式では次のように表される。

$$\log f_z = A Z_{\text{Fe}_i} Z_{\text{L}_j} \left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - bI \right) \quad (2-5)$$

リガンド交換反応モデル式中に現れる錯形成反応速度定数($e.g., k_{-1}, k_4$)は、存在する全ての鉄化学種とリガンド化学種同士の反応による錯形成反応の足し合わせであるため、錯形成反応は次のように表される。

$$\begin{aligned}\frac{d[\text{FeL}]}{dt} &= \sum_{i,j} \left(X_{\text{Fe}i} X_{\text{L}j} \frac{d[\text{Fe}_i \text{L}_j]}{dt} \right) \\ &= \sum_{i,j} (K_{\text{OS}(\text{Fe}_i \text{L}_j)} k_{-w(\text{Fe}_i)} [\text{Fe}_i][\text{L}_j]) \\ &= \sum_{i,j} (\alpha_{\text{Fe}i} \alpha_{\text{L}j} K_{\text{OS}(\text{Fe}_i \text{L}_j)} k_{-w(i)}) [\text{Fe}][\text{L}]\end{aligned}\quad (2-6)$$

ここで、 α は添え字で示した化学種のフラクションを表す (e.g. $\alpha_{\text{Fe}i} = [\text{Fe}_i] / \sum [\text{Fe}_i]$)。式(2-6)より、FeとLによる錯形成速度定数は式(18)で表される。

参考文献

- 1) Sunda W. G. and Huntsman S. A.: Iron uptake and growth limitation in oceanic and coastal phytoplankton. *Mar. Chem.*, Vol. 50, pp. 189-206, 1995.
- 2) Martin J. H. and Fitzwater S. E.: Iron deficiency limits phytoplankton growth in the northeast Pacific subarctic. *Nature*, Vol. 331, pp. 341-343, 1988.
- 3) Nagai T., Imai A., Matsushige K. and Fukushima T.: Effect of iron complexation with dissolved organic matter on the growth of cyanobacteria in a eutrophic lake. *Aquat. Microb. Ecol.*, Vol. 44, pp. 231-239, 2006.
- 4) Lewitus A. J., Kawaguchi T., DiTullio G. R. and Keesee J. D. M.: Iron limitation of phytoplankton in an urbanized vs. forested southeastern U.S. salt marsh estuary. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, Vol. 298, 233-254, 2004.
- 5) Albert S., O'Neil J. M., Udy J. W., Ahem K. S., O'Sullivan C. M. and Dennison W. C.: Blooms of the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* in coastal Queensland, Australia: disparate site, common factors. *Mar. Pollut. Bull.*, Vol. 51, pp. 428-437, 2005.
- 6) Liu X. and Millero F. J.: The solubility of iron in seawater. *Mar. Chem.*, Vol. 153, pp. 255-262, 2002.
- 7) Hudson R. J. M. and Morel F. M. M.: Iron transport in marine phytoplankton: kinetics of cellur and medium coordination reactions. *Limnol. Oceanogr.*, Vol. 35, pp. 1002-1020, 1990.
- 8) Liu X. W. and Millero F. J.: The Solubility of iron hydroxide in sodium chloride solutions. *Geochim. Cosmochim. Acta*, Vol. 63, pp. 3487-3497, 1999.
- 9) Bruland, K. W., Rue, E. L.: In the *Biogeochemistry of Iron in Seawater*, Turner, D. R., Hunter, K. A., Eds.; Wiley: New York, Ch. 6, pp 255-289, 2002.
- 10) Kuma, K., Tanaka, J. and Matsunaga, K.: Effect of natural and synthetic organic-Fe(III) complexes in an estuarine mixing model on iron uptake and growth of a coastal marine diatom, *Chaetoceros sociale*. *Marine Biology*, Vol. 134, 761-769, 1999.
- 11) Sunda, W. G.: In the *Biogeochemistry of Iron in Seawater*, Turner, D. R., Hunter, K. A., Eds.; Wiley: New York, Ch. 3, pp 41-84, 2002.
- 12) Hutchins, D. A., Witter, A. E., Butler, A. and Luther, G. W.: Competition among marine phytoplankton for different chelated iron species. *Nature*, Vol. 400, pp. 858-861, 1999.
- 13) Witter, A. E., Hutchins, D. A., Butler, A. and Luther, G. W. III.: Determination of conditional stability constants and kinetic constants for strong model Fe-binding ligands in seawater. *Mar. Chem.*, Vol. 69, pp. 1-17, 2000.
- 14) Rose, A. L., Salmon, T. P., Lukondeh, T., Neilan, B. A. and Waite, T. D.: Use of superoxide as an electron shuttle for iron acquisition by the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 39, pp. 3708-3715, 2005.
- 15) Hernandez, M. E. and Newman, D. K.: Extracellular electron transfer, *Cehd. Molec. Life Sci.*, Vol. 58, pp. 1562-1571, 2001.
- 16) Hering, J. G. and Morel, F. M. M.: Kinetics of Trace Metal Complexation: Ligand-Exchange Reactions, *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 24, pp. 242-252, 1990.
- 17) Shuman M. S.: Dissociation pathways and species distribution of aluminum bound to an aquatic fulvic acid, *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 26, pp. 593-598, 1992.
- 18) Celso, V., Murimboh, J., Salam, M. S. A. and Chakrabarti, C. L.: A Kinetic Study of Nickel Complexation in Model Systems by Adsorptive Cathodic Stripping Voltammetry, *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 35, pp. 1084-1089, 2001.
- 19) Eigen M. and Wilkins R. G.: Kinetics and mechanism of formation of metal complexes, In *Mechanisms of Inorganic Reactions, Advances in Chemistry Series No. 49*, Marmann R. K., Fraser R. T. and Bouman J. eds., American Chemical Society, Washington DC, pp. 55-80, 1965.
- 20) Sunda W. and Huntsman S.: Effect of pH, light, and temperature on Fe-EDTA chelation and Fe hydrolysis in seawater, *Mar. Chem.*, Vol. 84, pp. 35-47, 2003.
- 21) Pham A. N., Rose A. L., Feitz A. J. and Waite T. D.: Kinetics of Fe(III) precipitation in aqueous solutions at pH 6.0-9.5 and 25 °C, *Geochim. Cosmochim. Acta*, Vol. 70, pp. 640-650, 2006.
- 22) Faust B. C. and Zepp R. G.: Photochemistry of aqueous iron(III)-polycarboxylate complexes: roles in the chemistry of atmospheric and surface waters, *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 27, pp. 2517-2522, 1993.
- 23) Rose A. L. and Waite T. D.: Kinetics of iron complexation by dissolved natural organic matter in coastal waters, *Mar. Chem.*, Vol. 84, pp. 85-103, 2003.
- 24) Fujii M., Ito H., Rose A. L., Waite T. D. and Omura T.: Superoxide-mediated Fe(II) formation from organically complexed Fe(III) in coastal waters, *Geochim. Cosmochim. Acta*, Vol. 72, pp. 6079-6089, 2008.
- 25) Tipping E.: *Cation Binding by Humic Substances*, Cambridge University Press, New York, 2002.
- 26) Macrellis, H. M., Trick, C. G., Rue, E. L., Smith, G. and Bruland, K. W.: Collection and detection of natural iron-binding ligands from seawater, *Mar. Chem.*, Vol. 76, pp. 175-187, 2001.
- 27) Ito H. Fujii M., Masago Y., Yoshimura C., Waite T. D. and Omura T.: Mechanism and kinetics of ligand exchange between ferric citrate and desferrioxamine B, *J. Phys. Chem. A*, Vol. 115, pp. 5371-5379, 2011.
- 28) Morel F. M. M. and Hering J. G.: *Principles and Applications of Aquatic Chemistry*, Wiley, New York, 1993.
- 29) Lin C. and Rorabacher D. B.: Electrostatic effects in coordination kinetics. Reaction of nickel(II) ion with a cationic unidentate ligand as a function of solvent dielectric, *Inorg. Chem.*, Vol. 12, pp. 2402-2410, 1993.
- 30) Jones A. M., Phan A. N., Collins R. N. and Waite T. D.: Dissociation

- kinetics of Fe(III)- and Al(III)-natural organic matter complexes at pH 6.0 and 8.0 and 25 °C, *Geochim. Cosmochim. Acta*, Vol. 73, pp. 2875-2887, 2009.
- 31) Fujii M., Rose A. L., Waite T. D. and Ormura T.: Effect of divalent cations on the kinetics of Fe(III) complexation by organic ligands in natural waters, *Geochim. Cosmochim. Acta*, Vol. 72, pp. 1335-1349, 2008.
 - 32) Ribas X., Salvado V. and Valiente M.: The chemistry of iron in biosystems. Part 2. A hydrolytic model of the complex formation between iron(III) and citric acid in aqueous solutions, *J. Chem. Res.*, Vol. 332, pp. 2533-2553, 1989.
 - 33) Könisberger L., Könisberger E., May P. M. and Hefter G. T.: Complexation of iron(III) and iron(II) by citrate. Implications for iron speciation in blood plasma, *J. Inorg. Biochem.*, Vol. 78, pp. 175-184, 2000.
 - 34) Evers A., Hancock R. D., Martell A. E. and Motekaitis R. J.: Metal ion recognition in ligands with negatively charged oxygen donor groups. Complexation of Fe(III), Ga(III), In(III), Al(III), and other highly charged metal ions, *Inorg. Chem.*, Vol. 28, pp. 2189-2195, 1989.
 - 35) Kiss T. and Farkas E.: Metal-binding ability of desferrioxamine B, *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry*, Vol. 32, pp. 385-403, 1998.
 - 36) Bruno J. and Duro L.: Reply to W. Hummel's comment on and correction to "On the influence of carbonate in mineral dissolution: I. The thermodynamics and kinetics of hematite dissolution in bicarbonate solutions at T = 25 °C" by J. Bruno, W. Stume, O. Wersin, and F. Brandberg, *Geochim. Cosmochim. Acta*, Vol. 64, pp. 2173-2176, 2000.
 - 37) Byne R. H., Luo Y., R. and Young R. W.: Iron hydrolysis and solubility revisited: observations and comments on iron hydrolysis characterizations, *Mar. Chem.*, Vol. 70, pp. 23-35, 2000.
 - 38) Millero F. J., Yao W. and Aicher J.: The speciation of Fe(II) and Fe(III) in natural waters, *Mar. Chem.*, Vol. 50, pp. 21-39, 1995.
 - 39) Goldberg R. N., Kishore N. and Lemmen R. M.: Thermodynamic quantities for the ionization reactions of buffers, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, Vol. 31, pp. 231-370, 2002.
 - 40) Blesa M. A. and Matijevic E.: Phase transformations of iron oxides, oxohydroxides, and hydrous oxides in aqueous media, *Adv. Colloid Interface Sci.*, Vol. 29, pp. 173-221, 1989.
 - 41) Good, N. E., Winget, G. D., Winter, W., Connolly, T. N., Izawa, S. and Singh, R. M. M.: Hydrogen ion buffers for biological research, *Biochem.*, Vol. 5, pp. 467-477, 1966.
 - 42) Faller, B. and Nick, H.: Kinetics and mechanism of iron(III) removal from citrate by desferrioxamine B and 3-hydroxy-1,2-dimethyl-4-pyridone, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 116, pp. 3860-3865, 1994.
 - 43) Schecher W. D. and McAvoy D. C.: MINEQL+: A software environment for chemical equilibrium modeling, *Comput. Environ. Urban Syst.*, Vol. 16, pp. 65-76, 1992.
 - 44) Silva A. M. N., Kong X., Parkin M. C., Cammack R. and Hider R. C.: Iron(III) citrate speciation in aqueous solution, *Dalton Transactions*, pp. 8616-8625, 2009.
 - 45) Bates G. W., Bullups C. and Saltman P.: The kinetics and mechanism of iron(III) exchange between chelates and transferrin I. the complexes of citrate and nitrilotriacetic acid, *J. Biol. Chem.*, Vol. 242, pp. 2810-2815, 1967.
 - 46) 国立天文台：理科年表，丸善，2011.
 - 47) Bemer E. K. and Bemer R. A.: Global Environment: water, air and geochemical cycles, Prentice Hall, New Jersey, 1996.
 - 48) 伊藤紘晃，藤井学，佐々木史織，Waite T. D., 大村達夫：二価金属存在下におけるクエン酸第二鉄錯体と Desferrioxamine B のリガンド交換動力学，環境工学研究論文集，44 巻，pp. 115-125，2007.

(2011.5.30 受付)

Effect of Ionic Strength and pH on Ligand Exchange Reaction between Ferric Citrate Complex and Siderophore Desferrioxamine B

Hiroaki ITO¹, Manabu FUJII², Yoshifumi MASAGO¹ and Tatsuo OMURA¹

¹Department of Civil and Environmental Engineering, Tohoku University

²Department of Civil and Environmental Engineering, Tokyo Institute of Technology

Effects of ionic strength and pH on the ligand exchange reaction between ferric citrate complex and siderophore, desferrioxamine B were examined in the rate of ionic strength 0.01-0.7 M and pH 6-9. The observed rate constants were compared with those estimated with theoretically determined conditional stability constants and complexation rate constants. The rate constants of ligand exchange reaction increased as ionic strength decreased and as pH increased, respectively. The observed rate constants were relatively well explained with the estimated values. On the other hand, the initially assumed reaction model failed to describe the effect of pH, with implying the stimulated dissociation of ferric citrate complex by carbonate ion. This study will provide the fundamental knowledge which lead to the description of ion transformation and evaluation of iron availability by algae in coastal waters.