

広島大学大学院 学生会員 ○廣田 健人  
広島大学大学院 正会員 尾崎 則篤  
広島大学大学院 正会員 金田一 智規  
広島大学大学院 正会員 大橋 晶良

1. はじめに

鉄は、生物にとって必須元素のひとつである。水環境中における鉄の生態学的役割を議論するためには、様々な形態で存在する鉄について、存在形態および動力学を把握することが重要である。存在形態を知るための測定法として溶存二価鉄の測定がある。これは、 $\text{Fe}^{2+}$ と選択的にキレート形成し発色する Ferrozine (FZ) をサンプル中に添加し、形成する  $\text{Fe(II)FZ}$  の発色の吸光度を測定することによって溶存二価鉄濃度を求めるものである<sup>1)</sup>。本研究では、河川水を対象とした溶存二価鉄測定において、時間の経過とともに  $\text{Fe(II)FZ}$  濃度が徐々に増加していく(図1に測定例を示す)メカニズムを既往の室内実験から得られた様々な力学定数と比較し、包括的に検討することを目的とした。FZ を添加すると、水中の  $\text{Fe}^{2+}$  は FZ と結合し除去されることになるが、除去される  $\text{Fe}^{2+}$  の濃度が継続的に上昇するということは動的平衡状態にあることを意味している。水中では  $\text{Fe}^{2+}$  は生物利用性が高い形態であると考えられている。 $\text{Fe}^{2+}$  の濃度は一般的にはごく低濃度であるが、実際にはこのような平衡の移動による生物への供給ポテンシャルが存在する可能性がある。

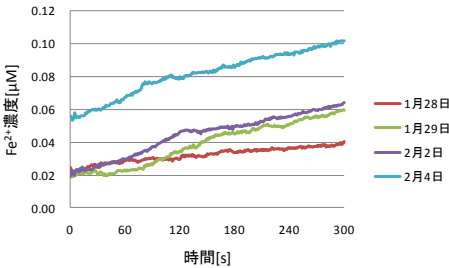


図1 FZ 添加後の経時変化の例 (黒瀬川)

2. 実験方法

2010 年 1 月下旬～2 月上旬に東広島市を流れる黒瀬川から採取した溶存態サンプル (全 4 サンプル) に対して基礎水質項目 (水温, pH, ORP, DO) および各種溶存鉄濃度 (全溶存鉄,  $\text{Fe}^{2+}$  濃度, AER スルー鉄, AER トラップ鉄: 図2) を測定した。サンプルは PTFE 製メンブレンフィルター (直径 47mm, 孔径 0.5 $\mu\text{m}$ : H050A047A, ADVANTEC 社製) を用いて減圧濾過を行った。鉄濃度の測定には FZ を用い波長 562nm での発色の吸光度を測定した。全溶存鉄はサンプルに塩化ヒドロキシルアンモニウムを加え還元した後、FZ で測定した。AER スルー鉄 (キレート鉄 ( $\text{FeL}$ ))

+イオン鉄) および AER トラップ鉄 (AFO : Amorphous Ferric Oxyhydroxide) は陰イオン交換樹脂 (AER : Anion Exchange Resin) (アンバーライト IRA400JCL, オルガノ社製) によってスルーまたはトラップされた全鉄である。

また、キレート形成による平衡移動実験を実施し、それらの結果に基づいて室内実験で得られている力学定数との比較を行った。

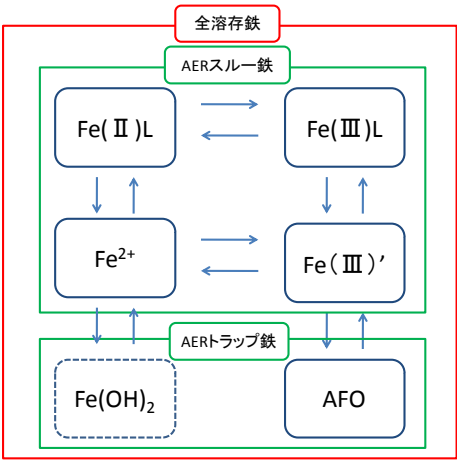


図2 対象とする鉄種 (L: リガンド)

3. 基礎水質項目および各種溶存鉄濃度の測定値

黒瀬川における基礎水質項目および各種溶存鉄濃度を表1に示す。

表1 黒瀬川の基礎水質項目および各種溶存鉄濃度

| 採水日   | 水温<br>[°C] | pH  | ORP[mV] | DO<br>[mg·L <sup>-1</sup> ] | 全溶存鉄<br>[μM] | $\text{Fe}^{2+}$<br>[μM] | AERスルー鉄<br>[μM] | AERトラップ鉄<br>[μM] | スルートラップ<br>[μM] |
|-------|------------|-----|---------|-----------------------------|--------------|--------------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| 1月28日 | -          | 6.8 | 367     | -                           | 0.99         | 0.02                     | 0.37            | 0.25             | 0.62            |
| 1月29日 | -          | 7.3 | 430     | -                           | 1.01         | 0.01                     | 0.66            | 0.27             | 0.93            |
| 2月2日  | 5.2        | 7.1 | 290     | 5.55                        | 2.11         | 0.01                     | 2.20            | 0.37             | 2.57            |
| 2月4日  | 3.3        | 6.9 | 327     | 6.14                        | 1.79         | 0.02                     | 1.32            | 0.44             | 1.76            |

基礎水質項目についてみると、pH は 6.8～7.3 であり、ORP は 290～430mV であった。DO は 5.55～6.14mg·L<sup>-1</sup> 程度であり、やや低めであった。

次に、各種溶存鉄濃度についてみると、 $\text{Fe}^{2+}$  濃度は 0.01～0.02 $\mu\text{M}$  程度であり、全溶存鉄 (0.99～2.11 $\mu\text{M}$ ) と比較するとその存在比率 ( $\text{Fe}^{2+}$ /全溶存鉄) は小さかった (0.005～0.02)。また、藤井ら<sup>2)</sup>によれば、キレート形成した  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{Fe(II)L}$ ) についても、 $\text{Fe(III)L}$  と比較するとその存在比率 ( $\text{Fe(II)L}/\text{Fe(III)L}$ ) は小さいことから (0.0001～0.01)、河川中において  $\text{Fe(II)}$  の存在比率は非常に少ないと考えられる。AER スルー鉄と AER トラップ鉄を足した値である

スルー+トラップについては、全ての測定で全溶存鉄とほぼ一致した。また AER スルー鉄と AER トラップ鉄の存在比率 (AER スルー鉄/AER トラップ鉄) は 1.5~5.9 と同程度であった。これらの結果から、濃度比は  $\text{Fe(III)L}$ ,  $\text{Fe(III)'}$ ,  $\text{AFO} \gg \text{Fe(III)L}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  であることがいえる。

4. 競合キレート実験

黒瀬川にて採取した溶存態サンプルに、FZ を添加した時の  $\text{Fe(II)FZ}$  の発色の経時変化を見ると、多くの測定で切片値を持ち、その後緩やかに上昇している (図 1)。切片値はフリーの  $\text{Fe}^{2+}$  濃度 (および瞬時の酸化還元生成物) と見なすことができるが、その後の緩やかな上昇は、① $\text{Fe(II)L}$  が FZ との解離的な交換反応により  $\text{Fe(II)FZ}$  に変化したもの、②様々な形態を含む  $\text{Fe(III)}$  が徐々に還元され  $\text{Fe(II)FZ}$  に変化したもの、を含んでいると推測した (図 3)。

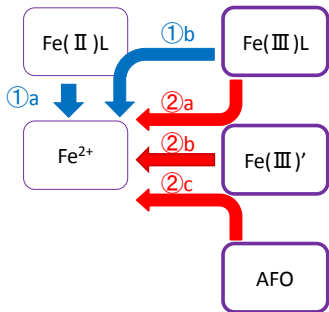


図 3  $\text{Fe}^{2+}$  に変わりうる経路

そこで、 $\text{Fe}^{2+}$  に選択的に結合する FZ と、 $\text{Fe}^{3+}$  に対して強い結合性を持つ EDTA を同時にサンプルに添加することで、①と②の分画を試みた。すなわち FZ を  $\text{Fe(II)L}$  の解離成分 (①) と結合させ、EDTA を  $\text{Fe}^{3+}$  と結合させる (②)。キレート形成した EDTA は波長 562nm で吸光を示さないの、その時の吸光度を測定することにより、上昇部分を①とみなすことができると考えた。

測定に際して、FZ と EDTA の濃度比が重要となる。すなわち (1)  $\text{Fe(II)}$  に対して FZ が十分である (2)  $\text{Fe(III)}$  に対して EDTA が十分である (3) EDTA が  $\text{Fe(II)}$  と結合しない (4) FZ が  $\text{Fe(III)}$  と結合しない、という条件を満たさなくてはならない。

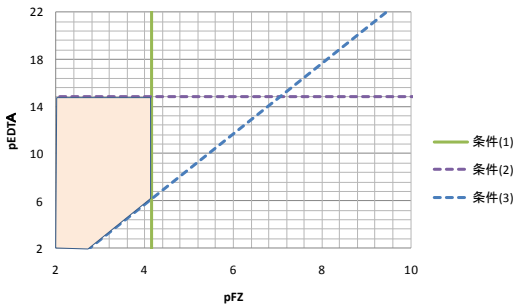


図 4 競合キレート実験が成立する濃度範囲 (pH=4)

これらの条件が成立する濃度範囲をそれぞれの平衡関係から計算した。まず、FZ, EDTA それぞれの  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  に対する条件付き安定度係数は以下のように定義される。

$$k_{\text{FZ}} = \frac{[\text{FeFZ}_3]}{[\text{Fe}][\text{FZ}]^3}$$

$$k_{\text{EDTA}} = \frac{[\text{FeEDTA}]}{[\text{Fe}][\text{EDTA}]}$$

また、条件(1)~(3)は 100 倍を目安とすると以下のように表される。

$$(1): \frac{[\text{FeFZ}_3]}{[\text{Fe}]} > 100$$

$$(2): \frac{[\text{FeEDTA}]}{[\text{Fe}]} > 100$$

$$(3): \frac{[\text{FeFZ}_3]}{[\text{FeEDTA}]} > 100$$

これらの条件を満たすように FZ, EDTA の濃度範囲を計算した。なお、(4)については、広い濃度範囲で成立すると考え検討しなかった。また、それぞれの条件付き安定度係数は文献から算出した<sup>3)4)</sup>。図 4 に pH=4 の場合の例を示す。実験に際しては、これを満たす FZ, EDTA 濃度で測定を行った。

その測定例を図 5 に、またサンプルデータを表 2 に示す。FZ のみの場合に見られた濃度上昇は、EDTA を共存させると大幅に減少したことが分かる。これらのことから、濃度の緩やかな上昇は  $\text{Fe(III)}$  の還元 (図 3 の②) が支配的な要因ではないかと考えられた。

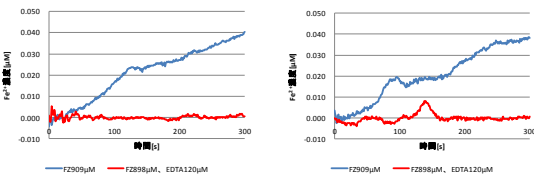


図 5 FZ+EDTA 添加後の経時変化の例

(左: 2月2日 右: 2月4日)

(それぞれの直線近似の切片値は予め差し引いた)

表 2 サンプルデータ

| 採水日   | 採水時の pH | 試薬添加量 [μM] |         | 試薬添加後の pH |         | 全溶存鉄 [μM] | $\text{Fe}^{2+}$ 濃度 [μM] | 傾き $[\text{M} \cdot \text{s}^{-1}]$ |                        |
|-------|---------|------------|---------|-----------|---------|-----------|--------------------------|-------------------------------------|------------------------|
|       |         | FZ         | FZ+EDTA | FZ        | FZ+EDTA |           |                          | FZ                                  | FZ+EDTA                |
| 1月28日 | 6.8     | 909        | 898,120 | 3.5       | 3.5     | 0.99      | 0.02                     | $5.2 \times 10^{-11}$               | $-2.0 \times 10^{-11}$ |
| 1月29日 | 7.3     | 909        | 898,120 | 3.9       | 3.9     | 1.01      | 0.01                     | $1.4 \times 10^{-10}$               | $7.9 \times 10^{-12}$  |
| 2月2日  | 7.1     | 909        | 898,120 | 3.9       | 4.0     | 2.11      | 0.01                     | $1.4 \times 10^{-10}$               | $3.5 \times 10^{-12}$  |
| 2月4日  | 6.9     | 909        | 898,120 | 4.4       | 4.2     | 1.79      | 0.02                     | $1.4 \times 10^{-10}$               | $4.9 \times 10^{-12}$  |

3. FZ 添加による長期の濃度上昇

次に、黒瀬川サンプルに対して FZ909μM を添加後、長期 (1 日以上) にわたって濃度上昇を観察した (図 6)。添加後の pH については、表 2 と対応するが、2月4日分については、酢酸アンモニウム 1mM を添加し、pH6.6 に調整している。グラフを見ると初期には濃度は大きく上昇し、その後緩やかになっている。これは、図 3 のように②a~c の経路で  $\text{Fe(III)L}$ ,  $\text{Fe(III)'}$ , AFO が還元されたと考えられ

る．そこで、これらの濃度の減少を見るために全溶存鉄と測定値の差分を取った．ただし、AFO は安定と考え、 $\text{Fe(III)}$ 、 $\text{Fe(III)L}$  の和となる AER スルー鉄（主に  $\text{Fe(III)L} + \text{Fe(III)}$  と考えられる）との差を取った．図 7 に差分の減少の自然対数値を示す．

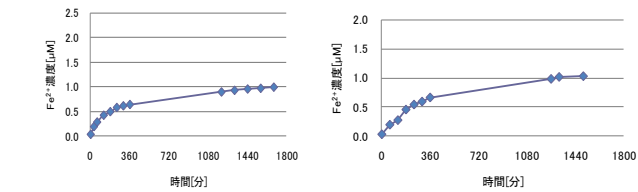


図 6 FZ 添加後の経時変化 (FZ=909μM)  
(左：2 月 2 日 右：2 月 4 日)

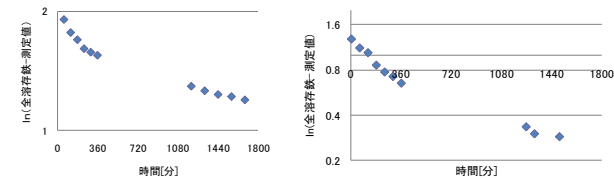


図 7  $\ln(\text{全溶存鉄}-\text{測定値})$  の経時変化  
(左：2 月 2 日 右：2 月 4 日)

その結果、図 7 の傾き（速度定数）は実験初期よりも後期に小さくなっていることが分かった．そこで、傾きは二つに分けられると考え、初期の傾きが  $\text{Fe(III)}$ （図 3、②b）、後期の傾きが  $\text{Fe(III)L}$ （図 3、②a）ではないかと予想した．そして、それぞれの初期濃度および速度定数（ $k_1$ 、 $k_2$ ）を求め、室内実験において得られている速度定数との比較を試みた．

実験値から速度定数を求めるために、図 7 における回帰直線から傾きおよび切片値を求めた．そして傾きを速度定数、切片値を濃度とした．その際、まず反応の遅い傾き（ $k_2$ ）から求め、反応の速い傾き（ $k_1$ ）については、 $k_2$  の傾きを持つ成分を差し引くことで求めた．

結果を表 3 に示す．

表 3 速度定数の実験値および理論値 2)5)6)

|       | 実験値                      |                           |                             |                             | 理論値                                                               |                                                                      |                                                                      |                                                                   |
|-------|--------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
|       | $\text{Fe(III)}$<br>[μM] | $\text{Fe(III)L}$<br>[μM] | $k_1$<br>[s <sup>-1</sup> ] | $k_2$<br>[s <sup>-1</sup> ] | $\text{Fe(III)} \Rightarrow \text{Fe}^{2+}$<br>[s <sup>-1</sup> ] | $\text{Fe(III)L}_1 \Rightarrow \text{Fe(III)}$<br>[s <sup>-1</sup> ] | $\text{Fe(III)L}_2 \Rightarrow \text{Fe(III)}$<br>[s <sup>-1</sup> ] | $\text{Fe(II)L} \Rightarrow \text{Fe}^{2+}$<br>[s <sup>-1</sup> ] |
| 1月29日 | -                        | -                         | -                           | $6.1 \times 10^{-3}$        | -                                                                 | -                                                                    | -                                                                    | -                                                                 |
| 2月2日  | 0.54                     | 1.66                      | $1.9 \times 10^{-4}$        | $3.3 \times 10^{-3}$        | $2.3 \times 10^{-3}$                                              | $1.2 \times 10^{-3}$                                                 | $4.9 \times 10^{-5}$                                                 | $6.5 \times 10^{-4}$                                              |
| 2月4日  | 0.51                     | 0.85                      | $1.3 \times 10^{-4}$        | $1.2 \times 10^{-3}$        | $2.5 \times 10^{-3}$                                              | -                                                                    | -                                                                    | -                                                                 |

1 月 29 日分については図 7 の段階で傾きが一つだったため、その分の傾きと、計算できる理論値のみを示した．理論値の導出方法を示す．

$\text{Fe(III)} \Rightarrow \text{Fe}^{2+}$  はスーパーオキシドにより生じると考えられるが、直接導出することが困難であった．そこで、河川において  $\text{Fe}^{2+} \rightleftharpoons \text{Fe(III)}$  の平衡状態が成り立っていると仮定し

て藤井ら 2) が採用した  $\text{Fe}^{2+} \Rightarrow \text{Fe(III)}$  の定数を使用し、それに対して黒瀬川の採水時 DO 濃度を乗じて求めた． $\text{Fe(III)L} \Rightarrow \text{Fe(III)}$  の速度定数については、藤井ら 5) が自然有機リガンドに対して複数の計算をしており、その平均値を採用した．リガンドの結合強度が弱いもの（ $\text{L}_1$ ）と強いもの（ $\text{L}_2$ ）があると仮定していた為、それぞれの場合について計算した． $\text{Fe(II)L} \Rightarrow \text{Fe}^{2+}$  については、Rose ら 6) が求めた自然有機リガンドを用いた測定の平均値を使用した．これによれば、 $\text{Fe(III)L}_1 \Rightarrow \text{Fe(III)}$  については、ほぼ  $\text{Fe(III)} \Rightarrow \text{Fe}^{2+}$  と同じ値であった．

比較の結果、 $k_1$  については、予想と異なり  $\text{Fe(III)} \Rightarrow \text{Fe}^{2+}$  の速度定数より 1 オーダー程度低い値となった．むしろ  $\text{Fe(III)L}_2 \Rightarrow \text{Fe(III)}$  の速度定数に近いものとなった．また、理論値では  $\text{Fe(II)L} \Rightarrow \text{Fe}^{2+}$  の速度定数と同程度だが、図 5 より  $\text{Fe(II)L} \Rightarrow \text{Fe}^{2+}$  という反応の可能性は低い．したがって、最初の傾きについては  $\text{L}_1 \sim \text{L}_2$  の間の結合を持つリガンドと結合した  $\text{Fe(III)L}$  の還元ではないかと考えられた． $k_2$  については、予想通り  $\text{Fe(III)L}_2 \Rightarrow \text{Fe(III)}$  の速度定数と同程度となった．また、1 月 29 日分についての速度定数は、他の実測値の  $k_2$  と同程度であった．

これらの比較結果は実験条件（pH など）の違いもあることから、正確な比較は難しいが、図 6 において観測されているものは  $\text{Fe(III)L}$  であり、図 7 において観察される傾きの違いは、リガンドの結合力の違いによるものではないかということが示唆された．

#### 4. まとめ

黒瀬川から採取した溶存態サンプルに対して基礎水質項目と各種溶存鉄濃度を測定した． $\text{Fe(II)}$  は  $\text{Fe(III)}$  よりも非常に少ないことが分かった．

FZ と EDTA を同時に添加する競合キレート実験を行った．FZ のみ添加の場合に見られた濃度上昇が  $\text{Fe(III)}$  の還元によるものと示唆された．

FZ 添加による長期の濃度上昇について測定し、その値から速度定数を求めた．また、既往の室内実験から得られている定数と比較した．FZ 添加後の濃度上昇には、二つの傾きを持つことが分かった．それらは  $\text{Fe(III)L}$  であり、リガンドの結合力の違いによって速度定数が異なるということが示唆された．

#### 参考文献

- 1) 尾崎ら、(2009)環境工学研究論文集、46、545-551.
- 2) 藤井、大村、(2009)環境工学研究論文集、46、593-603.
- 3) 木村優、溶液内の錯体化学入門、共立出版株式会社、1991.
- 4) Turner et al.、(1981)Geochemical and Cosmochemical acta vol.45、855-881.
- 5) 藤井ら、(2007)水環境学会誌 30、5、267-275.
- 6) Rose and Waite、(2003)Marine Chemistry、84、85-103.