

陸水における金属の化学スペシエーション

丸尾雅啓*

1. はじめに

天然水における金属，特に重金属の挙動は，共存する溶存成分，特に無機陰イオン，溶存有機物 (Dissolved Organic Matter: DOM) との錯生成に支配される。金属の存在状態 (金属スペシエーション: metal speciation) は，生物への影響，元素の循環に大きく関わるので，共存物質について，配位子となる化合物の構造，錯化容量，生じた錯体の安定度などの情報を得る必要がある。生体試料なども含めたスペシエーション分析法については，Fieldman et al. (2009) の総説が参考となる。

一方で，DOM を構成する多様な化合物の組成・各化学種の濃度を全て明らかにすることは極めて困難な作業である。現在は種々の間接的な分析法から，錯化容量や条件安定度定数を決定したのち，配位子となる無機イオン (F^- , Cl^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} など) の濃度，pH，イオン強度に基づいた平衡計算を行うことにより，実際に錯生成している金属の濃度あるいは生物に影響を与える金属水和イオン (フリー金属イオン: free metal ion) や無機錯イオン濃度などを推定し，その値を解析に用いている。MINEQL+, WHAM など，化学スペシエーションを目的としたソフトウェアが開発され，種々の研究に用いられている。また，水環境中における金属の環境影響を評価する際は，化学スペシエーションの結果を用いて環境中の生物に影響を与える (bioavailable, または labile: 反応活性な) 形態の濃度を見積もっている。水

圏における金属の水生生物への急性毒性評価を行うモデル (BLM: Biotic Ligand Model あるいは Module) も実際に利用されている。

重金属の化学スペシエーション法は，海洋における研究 (Hirose, 2006; Hirose, 2007) から始まり，徐々に陸水に適用されるようになった。海水は塩分がほぼ一定かつ pH の変化も少ないため，測定条件が定めればそのまま他の海域に適用できる。しかし陸水 (淡水) の場合，一般に①共存する無機陰イオン濃度が低い (海水 35%，日本最大の面積を持つ琵琶湖の水は 0.1%程度)，② pH の変化が海水に比べて非常に大きい (海水 7.5-8.4: 一般に 8.2 程度の値を示すのに対し，琵琶湖の場合成層期は表水層で 8-9，深水層では 7 前後) という特徴がある (日本陸水学会，2006; 一色・宗林，2005)。

また湖による違いも大きい。pH の場合，宇曾利山湖 (火口湖) は 3.4-3.6，タンガニーカ湖 (構造湖) などアフリカ地溝帯の湖沼は 9-11，塩分についても，死海のようにほぼ飽和状態にあるものがある。人間活動の影響も大きく受けるので有機物濃度，質の変化も大きく，COD では，猪苗代湖 1.0 未満，琵琶湖 2.8，手賀沼 7.6-9.4 mgO_2/L 程度といったように水域により様々である。Vega et al. (2013) の研究ではライン川の河川水に溶存しているニッケルの約半分は，人工の配位子である EDTA の錯体であるとの評価結果が示されている。

なお淡水の場合，海水では問題となるカルシウムイオン，マグネシウムイオンなどの競争イ

*滋賀県立大学環境科学部准教授

オンの濃度は一般には海水より低いので、錯体の条件安定度定数2桁以上大きくなり、この結果として、銅(II)や鉄(III)の錯生成に海水以上に配位子が強く作用することになる。なおさら化学スペシエーションの重要性が高まる理由である。

2. スペシエーションに用いる電気化学分析法

2-1 競争配位子を用いるストリッピングボルタンメトリーによる金属滴定 (Competitive Ligand Exchange - Adsorptive Cathodic Stripping Voltammetry: CLE-ACSV)

分析法として大部分を占めてきたのは電気化学分析法、特にストリッピングボルタンメトリーである(横井, 2005; 他の分析法については丸尾(2014)に紹介したので割愛する)。天然水中に溶存している金属配位子の濃度(錯化容量)、錯体の安定度定数(条件安定度定数)決定のために以前より用いられている有力な方法である。電極にはつり下げ水銀滴電極(HMDE: Hanging Mercury Drop Electrode)

を用いる。一般には試水に対し一定量の競争配位子を添加し、段階的に対象金属イオンを添加しながらストリッピングボルタンメトリーにおける応答値の変化を読み取ることで、天然水に存在している配位子の錯化容量と安定度定数を評価する。いわゆる Ruzic - van den Berg の plot を用いることで、配位子濃度と金属錯体の条件安定度定数を導く手法である(Ruzic, 1982; van den Berg, 1982)。

筆者の研究室でも琵琶湖北湖の試料を用い、SA(salicylaldoxime)を競争配位子に用いた銅錯化容量の測定(Campos et al., 1994; Maruo & Oriens, 2006)を行ったところ、溶存態銅のほとんどを錯化できるだけの錯化容量と安定度定数が得られ(丸尾, 2006)、琵琶湖の場合も有機配位子が銅の動態を支配していることが示された(図1)。銅の毒性発現濃度は海水性植物プランクトンの場合で10-11mol/L程度とされている。琵琶湖水中の銅濃度は 10^{-8} mol/L程度とこの1,000倍の濃度を示す(一色・宗林, 2005)ので、有機物による錯生成が起こらなけ

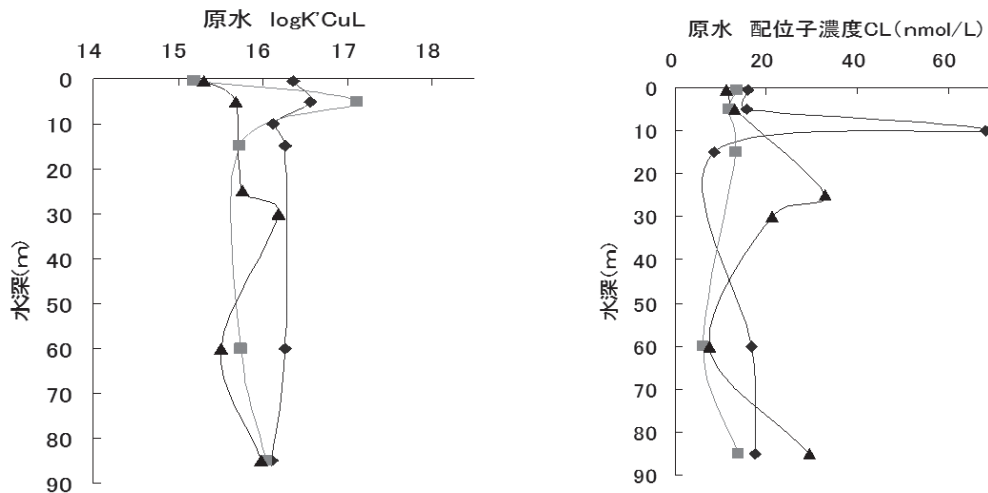


図1: CLE-ACSVによる琵琶湖水中配位子の安定度定数および配位子濃度の定量結果
試料: 琵琶湖水(北湖最深部付近 35° 22'N, 136° 06'E)
採取時期 ◆ 2008年7月 ■ 同9月 ▲ 同12月)

れば、植物プランクトンは過酷な環境におかれることになる (Croot et al., 2003).

なお CL-AdCSV 法は用いる競争配位子の濃度および目的とする金属の間に生じる錯体の安定度定数によって、検出できる安定度定数の範囲 (detection window) が 2~3 桁に規定される。この範囲からはずれた配位子は検出されないため、スペシエーションの実態を必ずしも反映しない場合がある。複数の濃度段階あるいは配位能が異なる複数種の競争配位子を用いた分析により、より正確な金属スペシエーションが可能となる。実際に 3 段階の安定度を設定して湖水中配位子の分析を行った例もある (Xue & Sunda, 1997) が、実験が煩雑になることも否定できない。

2-2 Pseudopolarography (anodic stripping voltammetry: ASV の一種)

pseudopolarography は、競争配位子の性質や detection window の制約によって検出できない超高安定度の配位子検出に用いられる (Croot et al., 1999)。ASV 分析を行う際に、対象とする金属イオンを予想される配位子濃度に対し過剰となるよう添加したのち、濃縮電位を負方向に段階的に変化させながら、ストリッピングボルタンメトリーを行い、電極に還元濃縮された金属 (濃縮時に金属: 酸化数 0 となり、配位子とは分離されている) の酸化電位における電流値を測定し、あたかもポーラログラフィーを行っているかのように濃縮電位に対して得られた電流値をプロットし、曲線から半波電位を求める。配位子と結合している金属イオンの還元電位は、錯生成によってより錯体により安定化するに従って負方向に移動するので、安定度定数既知の配位子における半波電位と安定度定数の関係を求め、これと未知配位子の半

波電位を比較することによって、未知配位子と金属の安定度定数を推定することができる。配位子濃度についての情報を得ることは困難であるが、幅広い範囲の安定度定数をもつ配位子の検出が可能である。Croot et al. (1999) は沿岸海水において銅に対し安定度の高い錯体を形成する配位子の存在を認めている。Wiramanaden et al. (2008) は、シアノバクテリアに銅ストレスを与えて培養した海水に、pseudopolarography を適用し、高安定度の錯体を形成する配位子の生産を認めている。さらに ESI-MS により銅と結合した錯体の検出にも成功した。本法と ACSV を併用し、さらに質量分析などと結合させることで水中金属配位子の全体像をつかむ可能性が示されるようになった。淡水での適用例は少ないが (Tsang et al., 2006)、海水の場合よりさらに安定な結合を持つ配位子の検出が期待される。筆者は琵琶湖試料および韓国東岸の汽水湖である永郎湖の試料について pseudopolarography を適用したところ、いずれの試料においても -1.0V よりも電位において電流値の上昇が見られ、通常の ACSV 法では検出されない配位子の存在が示唆された (図 2)。

3. 分光光度法を用いる逆滴定法: Fe(II) に対する配位子の錯化容量および安定度定数の決定

金属の錯化容量測定に関する研究では、濃度を変えながら金属を添加する金属滴定法 (forward titration) によるものが大半であったが、近年は金属の濃度を一定に保ちながら、競争配位子の濃度を段階的に変化させる手法: 逆滴定法 (reversed titration) が試みられている。金属滴定法は、金属に対して過剰に存在している配位子の評価に適しているのに対し、逆滴定

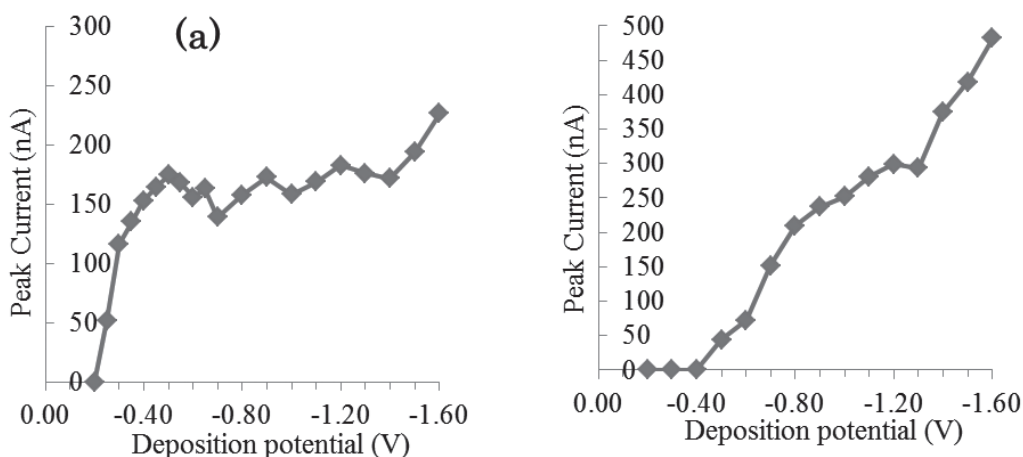


図 2： pseudopolarography による (a) 琵琶湖および (b) 永郎湖（韓国江原道東草市）試料の解析
琵琶湖（2008 年 7 月採取，北湖最深部付近 35° 22'N, 136° 06'E）深度 10m；最大深度 89m，永郎湖（2010 年 12 月採取，湖心付近 38° 22'N, 128° 58'E）深度 4m；最大深度 5m 程度。いずれも Cu40 nmol/L を添加して測定。EDTA 添加時にえられる (E1/2: -0.46 V) よりも負の電位で電流値上昇が見られる。

法は金属とほぼ同濃度か、それ以下の濃度で存在している非常に結合性の高い配位子の検出に適している。このことから、実際に結合に関与している配位子の情報を得ることができる。

検出法の大半は現在も電気化学分析法によっているが、LWCC (Liquid Waveguide Capillary Cell) と呼ばれる 500-2500mm の光路長を持つキャピラリーセルが現場分析に用いられるようになり、検出限界が向上したことを背景に、分光光度法による錯化容量測定法が試みられている。Statham et al. (2012) は、Fe(II) に選択的な比色試薬である PDTS (通称 Ferrozine) を競争配位子とし、逆滴定によって海水中の Fe(II) に対する配位子錯化容量と条件安定度定数を測定した。この研究に用いられている PDTS は海水中でも競争する主成分イオンの影響をほとんど受けず、淡水環境にも容易に適用できると期待された。

Fe(II) に対する錯化容量の測定を試みるきっかけとなったのは、淡水環境における Fe(II) 定量値が手法によって大きく異なる可能性が示さ

れたことである。好氣的条件かつ中性の湖水に溶存している Fe(II) は熱力学的には不安定と考えられており、光化学反応（フェントン反応など）によって表面近く的水中で生成することが知られている (Kuma et al., 1992; Kuma et al., 1995; Maruo et al., 2010) が、短時間のうちに再び Fe(III) に変化すると考えられてきた (Emmenegger et al., 2001)。一方ある種の水中微生物は、Fe(III) を自ら Fe(II) に還元し、天然配位子から遊離した後に再酸化して自らの持つ配位子によって摂取すると考えられている。生物の利用しやすい形態として、Fe(II) の存在量については外洋においても注目され、ルミノール-過酸化水素への Fe(II) 発光触媒作用を用いた測定結果が示されているものの、その濃度は非常に低く、sub nmol/L 以下とされている (Roy et al., 2008)。

淡水においてもいくつかの定量結果が示されており、筆者らが PDTS を比色試薬に用いる固相抽出-分光光度法を用いて測定した結果、琵琶湖では通常 5~20nmol/L が溶存している

と考えられる (丸尾ほか, 2007; Maruo et al., 2010). また Lake Kinneret でも同様の方法を用い, 数 10nmol/L 程度と比較的高濃度の Fe(II) が検出されている報告がある (Sivan et al., 1998). これに対し外洋で用いられてきた化学発光法を湖水に適用した例では, Fe(II) の濃度は 0.1~0.9nmol/L (Lake Greifen, Switzerland) と, 1桁以上低い値が報告されている (Emmenegger et al., 2001).

この理由は完全には明らかにされていないが, 原因として, ① Fe(II) 濃度が水域の環境によって, 大きく変化する, ②各分析法が異なる形態の鉄(II)を捉えている, のいずれかが考えられる. そこで両方の分析法を用いて同時に同じ試料を定量, 比較することとした. 外洋海水の場合は極低濃度であることから比較は困難と考えられるため, 適度の Fe(II) を含んでいる琵琶湖試料を用いて両方の分析法から得られる値を比較することにした.

琵琶湖水を採取し, 採水口にフィルターを設置してろ過したのち, 直ちに船上で化学発光分析を行うこととした. PDTs による分光光度法については試薬の添加を船上で行い, 氷冷試料を下船直後に研究室で処理した. また操作上の誤差を最小限にするため, 同一の標準溶液を使用し, 各々の定量性を確認した. 測定は成層の最も安定している 9 月と全循環期にあたる 2 月に行った. その結果は季節によらず, 化学発光法によって得られた値が常に分光光度法のものに比べて 1/10~1/1000 程度となった. 両方の分析法で得られる Fe(II) の形態は同じではないことが明らかになった. 化学発光法は, 比較的弱い錯体を形成しているもの, あるいは一般にフリーイオンと呼ばれているもののみを検出している可能性がある. 一方分光光度法の場合, 有機錯体を形成しているものや, コロイド態に

含まれているものも測定している可能性がある. ろ過した状態で 6 時間ほど放置した琵琶湖水でも, 分光光度法で得られる Fe(II) の定量値は変化しないことから, Fe(II) の大部分は安定な形態をとっていると考えられた. また EDTA などの配位子は, 分光光度法における反応速度を著しく低下させることも明らかになった. 水中の Fe(III) の還元および錯生成による安定化が, Fe(II) の過大評価を招く可能性も示唆されているが, PDTs については適切な pH 条件では顕著な影響は見られないことも確認されている (丸尾ほか, 2010). 錯生成が Fe(II) の安定化に寄与し, 同時に化学発光法での検出を妨げる因子となっている可能性がある. このため Statham et al. (2012) の手法を用い, 琵琶湖水について Fe(II) の錯化容量測定を試みたところ, 条件安定度定数は $\log K'_{ML}$ として 12.1~13.0, 錯化容量として 19~36nmol/L の範囲の値を得ることができた. 他の重金属イオンの競合を考慮しない状態ではあるが, 通常溶存している Fe(II) の濃度から判断すると, 99% 以上の Fe(II) を錯化するだけの配位子が存在することを確認した. 今後, 配位子の特定, またコロイド様の Fe(II) の存在について検証を行う必要がある. また, ここまで配位子というと有機化合物であることを前提に論じてきたが, 配位子のある部分は硫化物であることも明らかになっており, 少なくとも銅や亜鉛の硫化物錯体は, 好氣的条件下でも数ヶ月程度の半減期を持つことが確かめられている (Rozan et al., 2000). また, 硫化物以外のチオール類も安定な配位子を形成しうる (Superville et al., 2013) ことから, これらの化合物について配慮したスペシエーションを行う必要がある.

4. おわりに

本稿で紹介した配位子のキャラクタリゼーションは、水圏の鉄・銅はじめとする微量金属を軸とした物質循環を考えるのに有用な手法である。その一方で水中の溶存配位子そのものの同定はほとんど達成されていない。最終的にはほぼ全ての配位子の構造、濃度、寄与率を明らかにすることが理想である。分画・分離とESI-MSなどの質量分析を組み合わせることで一応の成功を見た例はある（Ross et al., 2003; Wiramanaden et al., 2008）が、通常は配位子全体としての定性、あるいは特定の配位子の定量のみにとどまっている。

逆の視点から見ると、生物において各個体それぞれの挙動、群集としての挙動が異なるように、化学においても配位子群全体の持つ機能や共存する物質間の相互作用を考慮して水圏における役割を理解する必要がある。どちらの方向へ今後すすんでゆくのかは明らかではないが、幅広い視野での取組が望まれる。

謝 辞

水環境の研究に関わる最初のきっかけそして数々の助言をくださいました、故中山英一郎先生に御礼申し上げます。本稿で紹介した研究を進めるにあたり、貴重な意見をくださいました、大田啓一先生（現滋賀県立大学学長）、横井邦彦先生（大阪教育大学）に感謝申し上げます。

実験に協力いただきました小畑元先生（東大大気海洋研）、K. J. Orians 先生（AEOS, UBC, Canada）、滋賀県立大学湖沼環境実験施設の海外文一郎様、研究室の学生諸氏（小沢佳那子、楯敬介、永岡一樹、徳永萌、小林一星、柳沼勇多、小山和香）に感謝します。

この研究の一部について日本学術振興会の科学研究費：基盤研究（C）No. 19510010、同

No. 23510010、基盤研究（B）21310007による補助を受けました。ここに記して謝意を表します。

引用文献

- Campos M. L. A.M., van den Berg C. M. G. (1994) Determination of copper complexation in sea water by cathodic stripping voltammetry and ligand competition with salicylaldoxime. *Anal. Chim. Acta*, 284, 481-496.
- Croot P. L., Moffet J. W., Luther III G. W. (1999) Polarographic determination of half-wave potentials for copper-organic complexes in seawater. *Mar. Chem.*, 67, 219-232.
- Croot P. L., Karlson B., van Elteren J. T., Kronn J. J. (2003) Uptake and efflux of ^{64}Cu by the marine cyanobacterium *Synechococcus* (WH7803). *Limnol. Oceanogr.*, 48, 179-188.
- Emmenegger L., Shonenberger R., Sigg L., Sulzberger B. (2001) Light-induced redox cycling of iron in circumneutral lakes. *Limnol Oceanogr.*, 46, 49-61
- Fieldman J., Salaün P., Lombi E. (2009) Critical review perspective: Elemental speciation analysis methods in environmental chemistry-moving towards methodological integration. *Environ. Chem.*, 6, 275-289.
- Gibbon-Walsh K., Salaun P., van den Berg C. M. G. (2012) Pseudopolarography of copper complexes in seawater using a vibrating microwire electrode. *J. Phys. Chem. A*, 116, 6609-6620.
- Hirose K. (2006) Chemical Speciation of trace metals in seawater: a review. *Anal. Sci.*,

- 22, 1055-1063.
- Hirose K. (2007) Metal-organic matter interaction: ecological roles of ligands in oceanic DOM. *Appl. Geochem.*, 22, 1636-1645.
- Kuma K., Nakabayashi S., Suzuki Y., Kudo I., Matsunaga K. (1992) Photo-reduction of Fe(III) by dissolved organic substances and existence of Fe(II) in seawater during spring blooms. *Mar Chem*, 37, 15-27.
- 一色健司, 宗林由樹: 編 藤永太一郎: 監修 (2005) *海と湖の化学*. 京都大学学術出版会, 京都.
- Kuma K., Nakabayashi S., Matsunaga, K. (1995) Photoreduction of Fe(III) by hydroxycarboxylic acids in seawater. *Water Res*, 29, 1559-1569.
- Maruo M., Orians K. J. (2006) Determination of Copper Complexation in Freshwaters of West Canadian Lakes by Electrochemical Analysis. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 29, 1481-1486.
- 丸尾雅啓, 戸田全則, 左部智子, 小畑元 (2007) 琵琶湖表層水及び流入河川水中に存在する鉄(II)の濃度分布と存在形態, *陸水学雑誌*, 68, 415-423.
- Maruo M., Tate K., Ohta K., Hayakawa K. and Obata H. (2010) Vertical distribution of iron(II) and its relation to organic substances in Lake Biwa, Japan. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 30, 1379-1383.
- 丸尾雅啓, 永岡一樹, 小林一星, 小沢佳那子, 小畑元 (2010) 水圏試料中微量溶存鉄(II)の比色定量における至適 pH 条件に関する再検討. *分析化学*, 59, 1143-1147.
- 丸尾雅啓 (2011) 琵琶湖の水環境. *機能水研究*, 6, 11-14.
- 丸尾雅啓 (2014) 天然水中の金属配位子の分析: 進歩総説. *ぶんせき*, 470, 71-76.
- 日本陸水学会: 編 (2006) *陸水の事典*. 講談社, 東京.
- Ross A. R. S., Ikononou, M. G., Orians, K. J. (2003) Characterization of copper-complexing ligands in seawater using immobilized copper(II)-ion affinity chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Mar. Chem.*, 83, 47-58.
- Roy E. G., Wells M. L., King D. W. (2008) Persistence of iron(II) in surface waters of the western subarctic Pacific. *Limnol Oceanogr*, 53, 89-98.
- Rozan T. F., Lassman M. E., Ridge D. P., Luther III G. W. (2000) Evidence for iron, copper and zinc complexation as multinuclear sulphide clusters in oxic rivers, *Nature*, 406, 879-882.
- Ruzic I. (1982) Theoretical aspects of the direct titration of natural waters and its information yield for trace metal speciation. *Anal. Chim. Acta*, 140, 99-113.
- Sivan O, Erel Y, Mandler D, Nishri A (1998) The dynamic redox chemistry of iron in the epilimnion of Lake Kinneret (Sea of Galilee). *Geochim Cosmochim Acta* 62, 565-576.
- Statham P. J., Jacobson Y., van den Berg C. M. G. (2012) The measurement of organically complexed Fe(II) in natural waters using competitive ligand reverse titration. *Anal Chim Acta* 743, 111-116.
- Superville P.-J., Pizeta I., Omanovic D., Billon G.

- (2013) Identification and on-line monitoring of reduced sulphur species (RSS) by voltammetry in oxic waters. *Talanta*, 112, 55-62.
- Tsang J. J., Rozan T. F., Hsu-Kim H., Mullaugh K. M., Luther III G. W. (2006) Pseudopolarographic determination of Cd^{2+} complexation in freshwater. *Environ. Sci. Technol.*, 40, 5388-5394.
- van den Berg C. M. G. (1982) Determination of copper complexation with natural organic ligands in sea water by equilibration with MnO_2 I Theory. *Mar. Chem.*, 11, 307-322.
- Vega, F. A., Weng, L. (2013) Speciation of heavy metals in River Rhine. *Water Res.*, 47, 363-372.
- Wiramanaden, C. I. E., Cullen, J. T., Ross, A. R. S., Orians, K. J. (2008) Cyanobacterial copper-binding ligands isolated from artificial seawater cultures. *Mar. Chem.*, 110, 28-41.
- Xue, H., Sunda, W.G. (1997) Comparison of $[Cu^{2+}]$ measurements in lake water determined by ligand exchange and cathodic stripping voltammetry and by ion-selective electrode. *Environ. Sci. Technol.*, 31, 1902-1909.
- 横井邦彦 (2005) ストリッピングボルタンメトリー. *ぶんせき*, 141-146.
- 付記：文中で紹介したモデル・ソフトウェアに関する URL を以下に記します (全て 2014 年 10 月 25 日, 筆者最終確認).
- 〈スペシエーションについて〉
- MINEQL+4.6, Environmental Research Software, <http://www.mineql.com/>
- Visual MINTEQ: A free equilibrium speciation model ver.3.0 KTH, Department of Land and Water Resources Engineering, <http://www2.lwr.kth.se/English/OurSoftware/vminteq/>
- 〈生態影響評価〉
- BLM - Biotic Ligand Model (HDR/HydroQual Inc., USA) http://www.hydroqual.com/wr_blm.html
- Water Quality Standards Academy: Special Interest Modules. Copper Biotic Ligand Module (EPA: United States Environmental Protection Agency, USA) http://water.epa.gov/learn/training/standardsacademy/blm_index.cfm