

令和4年度伊藤光昌氏記念学術助成金(研究助成)成果報告書

研究課題番号	R4-R4
研究課題名	海洋におけるマンガンサイクルの解明に向けた3価マンガン測定法の確立
研究代表者	漢那 直也
所属・職 (または学年)	東京大学大気海洋研究所・助教

1. 背景

マンガン (Mn) は、生物にとって必須微量元素であること、物質の除去過程に深く関わっていることなど、海洋で重要な役割を担っている。Mn は、水圏環境中で主に3つの酸化状態を取るが、なかでも3価 Mn (III) の動態はよくわかっていない。海水中で、Mn (III) は天然の有機物 (リガンド) と錯体を形成して存在する (Madison et al., 2011)。Mn (III) 錯体は、電子供与体・受容体のどちらにもなり得るので、反応性が高いことが考えられる。Mn (III) 錯体が、粒子態有機炭素の酸化・分解を促進し、二酸化炭素の排出に寄与する機構 (Jones et al., 2018) は、地球温暖化との関わりを考える上で重要であろう。しかし、海洋における Mn (III) 錯体の濃度や分布に関する情報は、著しく不足している現状にある。海洋における Mn サイクルの解明に向けた基礎研究として、本研究では海水から Mn (III) 錯体を抽出する手法の検討を行った。

2. 方法

Mn (III) 錯体を海水から抽出するために、逆相系の固相抽出法を用いた (Jones et al., 2019)。Jones et al. (2019) で報告している従来法は、海水試料に競合リガンドとしてデフェロキサミン B (DFOB) 試薬を添加し、Mn (III) と結合している天然のリガンドを DFOB に置き換え、生成した Mn (III) -DFOB 錯体を固相抽出カラムにより海水から分離する手法である。本研究においても従来法を参考にし、固相抽出カラムは Oasis 社の HLB Plus Short Cartridge を用いた。実験に

使用した Mn (III) -DFOB 錯体、Mn (III) -マロン酸 (Malonate) 錯体、Mn (III) -クエン酸 (Citrate) 錯体は、Madison et al. (2011)、Jones et al. (2019) に従い調製した。Mn (III) 錯体の吸収スペクトルは、紫外可視分光光度計 (UV-1800, Shimadzu) を用いて 200 nm から 800 nm の波長領域で 1 nm ごとに測定した。Mn (III) 錯体の濃度は、既知のモル吸光係数 (ϵ) から計算した。

3. 結果と考察

従来法の固相抽出手順を踏襲したところ、カラムの繰り返し使用に伴って不純物がカラムから溶出し始め、操作ブランク値が上昇し、その結果 Mn (III) -DFOB 錯体の回収率が著しく低下することがわかった。そこで、固相抽出手順の最適化を行った (図1)。従来法と比較して、洗浄液 (1) 塩酸ヒドロキシルアミンおよび (2) 塩酸の濃度を 10 分の 1 に下げ、洗浄液 (3) を 100% メ

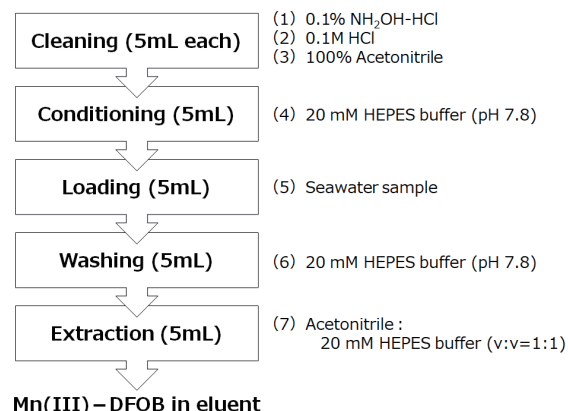


図1. 本研究で最適化した海水中の Mn (III) -DFOB 錯体の固相抽出の手順。試薬および海水試料は固相抽出カラムに 2.5 mL min⁻¹ で通液した。

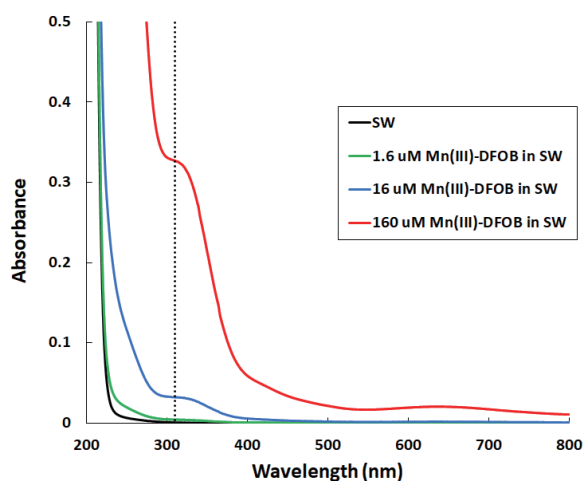


図2. 海水 (SW) 中の Mn (III) - DFOB 錯体の吸収スペクトル. 波長 310 nm (破線) における ϵ は $2.055 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$.

タノールから 100% アセトニトリルに変更した. 粘性が低いアセトニトリルを使用することでカラム圧を下げ, カラムの劣化を防いだ. また, 溶離液 (7) は 100% メタノールからアセトニトリルと 2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジン] エタンスルホン酸 (HEPES) バッファアの混合溶液に変更した. アセトニトリルに HEPES バッファアを加えたことで, Mn (III) - DFOB 錯体の回収率とその再現性が向上した.

本研究で調製した海水中の Mn (III) - DFOB 錯体の吸収スペクトルを図 2 に示す. Mn (III) - DFOB 錯体の吸収スペクトルは, 波長 310 - 320 nm 付近に変曲点が存在する.

固相抽出カラムを用いて, 試水中 (淡水および海水) の Mn (III) - DFOB 錯体の分離抽出実験

を行った. カラム通液後の試水の吸光度は, 波長 310 nm でほぼゼロを示したことから (図 3a), Mn (III) - DFOB 錯体がカラムに捕捉されたことがわかった. また HEPES バッファアを用いたカラム洗浄操作において, カラムに捕捉された Mn (III) - DFOB 錯体の流出が起らないことを確認した (図 3b). カラムに捕捉された Mn (III) - DFOB 錯体の回収率は, 淡水および海水でそれぞれ $98 \pm 0.3\%$ ($n=4$), $94 \pm 3\%$ ($n=4$) であった (図 3c: 海水を用いた場合の例).

Mn (III) - Malonate 錯体を含む海水に DFOB 試薬を添加し, Mn (III) - DFOB 錯体を調製した (図 4a). DFOB 試薬の添加後に, 吸収スペクトルの波長 310 - 320 nm 付近に変曲点が認められたことから, Mn (III) と結合している Malonate が DFOB と置き換わったことが確認できた. Malonate と DFOB の置換は 5 分以内に起こり, 生成した Mn (III) - DFOB 錯体は少なくとも 180 分間安定であることを予備実験で確認した. Mn (III) - Malonate 錯体から調製した Mn (III) - DFOB 錯体を固相抽出カラムで抽出した結果, 回収率は $92 \pm 0.2\%$ ($n=4$) であった (図 4b). 一方, 同様の実験を Mn (III) - Citrate 錯体に対して行ったところ, 吸収スペクトルの波長 310 - 320 nm 付近の変曲点が, Mn (III) - DFOB 錯体生成後と抽出後で異なった (図 4c, d). Mn (III) - Citrate 錯体から調製した Mn (III) -

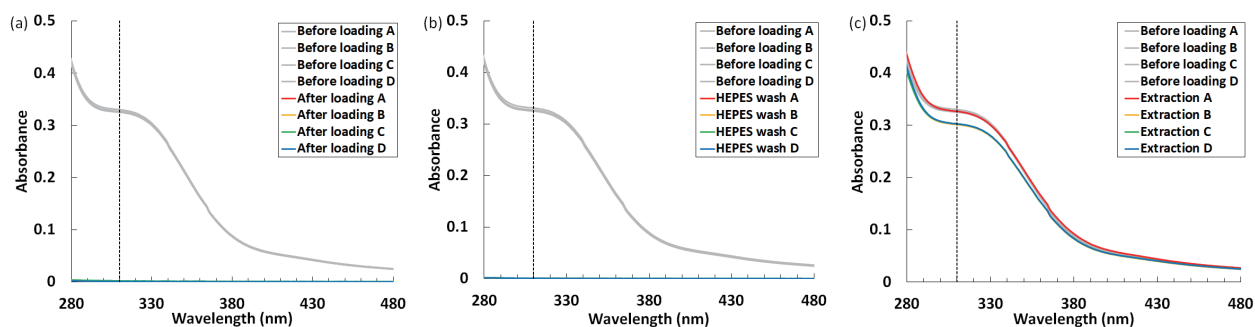


図3. 海水で調製した $160 \mu\text{M}$ の Mn (III) - DFOB 錯体を固相抽出カラムに通液して得られた吸収スペクトル. カラム通液前の試水の吸収スペクトル (図中の灰色の実線) を, (a) カラム通液後の試水の吸収スペクトル, (b) カラム洗浄後の洗浄液 (HEPES バッファア) の吸収スペクトル, (c) カラム通液後の溶離液の吸収スペクトルとそれぞれ比較した. 破線は波長 310 nm を示す. 実験は全て 4 連で行った.

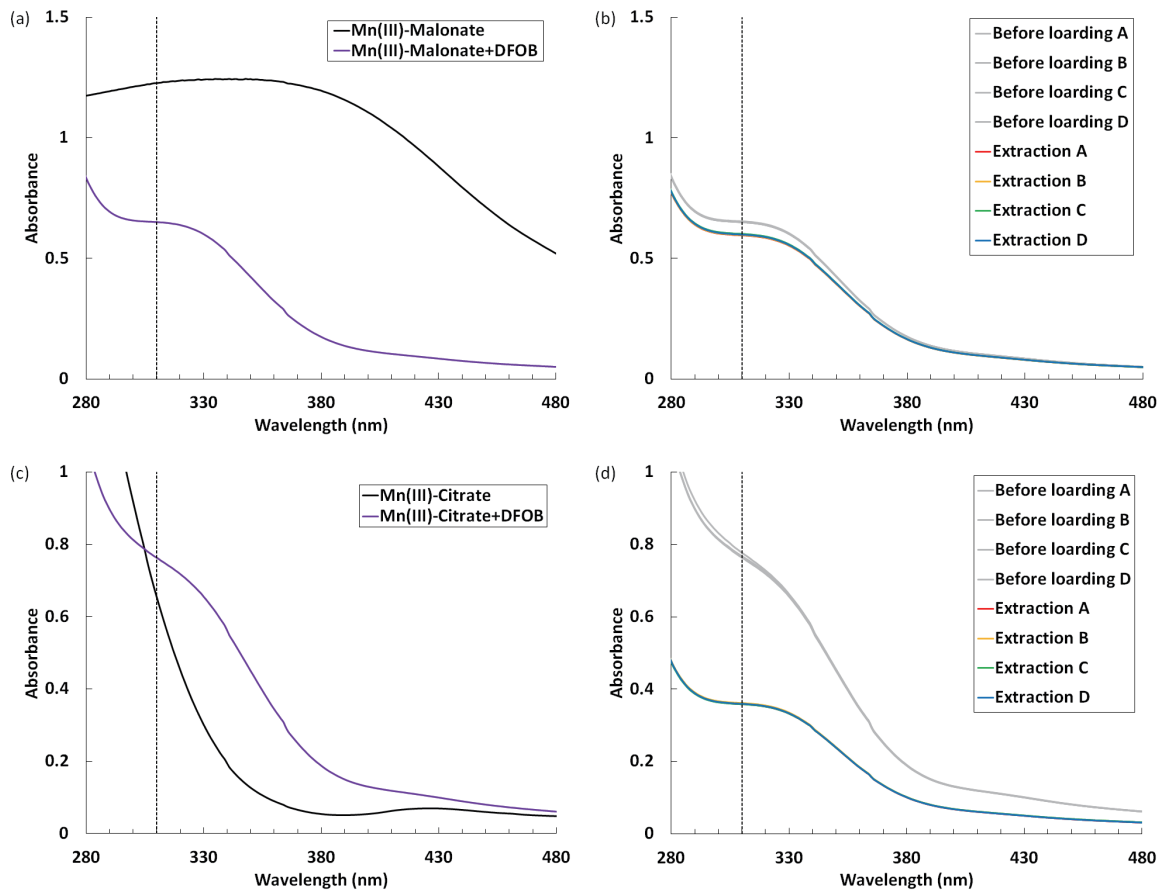


図 4. 海水で調製した (a) $94 \mu\text{M}$ の Mn (III) - Malonate 錯体および (c) $226 \mu\text{M}$ の Mn (III) - Citrate 錯体に、DFOB 試薬を添加して得られた吸収スペクトル。DFOB 試薬は、Mn (III) 錯体濃度の 5 倍濃度になるように試水へ添加した。(b) Mn (III) - Malonate + DFOB 錯体および (d) Mn (III) - Citrate + DFOB 錯体を固相抽出カラムに通液して得られた吸収スペクトル。カラム通液前の試水の吸収スペクトルを、カラム通液後の溶解液の吸収スペクトルとそれぞれ比較した。破線は波長 310 nm を示す。実験は全て 4 連で行った。

DFOB 錯体の回収率は $47 \pm 0.4\%$ ($n=4$) と低い値を示したことから (図 4d), Mn (III) と結合している Citrate の一部は DFOB と置換されないことが考えられた。

本研究で検討した海水中の Mn (III) 錯体の抽出法は、Mn (III) と結合している天然のリガンドと DFOB との置換により生成した Mn (III) - DFOB 錯体を分離・回収する手法である。しかし、2 価 Mn (II) が海水中に存在すると、Mn (II) が DFOB によって酸化され、Mn (II) に由来する Mn (III) - DFOB 錯体が生成する。その結果、本来目的とする天然の Mn (III) 錯体の回収率を過大評価してしまう恐れがある。そこで、Mn (II) に由来する Mn (III) - DFOB 錯体の生成速度を求めたところ、海水中では $0.96 \mu\text{M min}^{-1}$ であり、淡水中の生成速度に比べて 9 分の 1 ほど

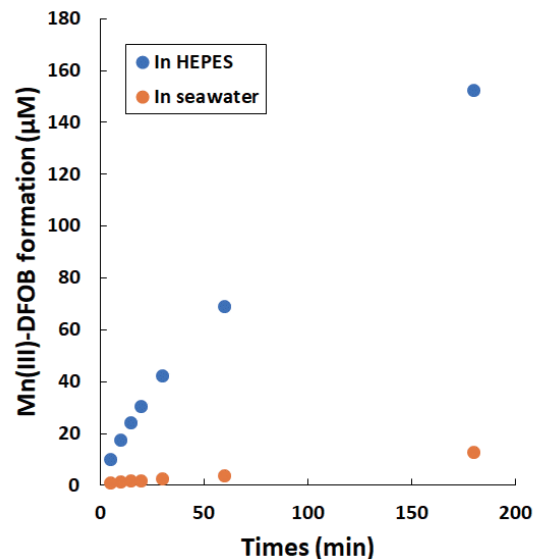


図 5. 淡水 (HEPES バッファー) および海水で調製した $500 \mu\text{M}$ の Mn (II) に、DFOB 試薬を添加して得られた Mn (III) - DFOB 錯体濃度の時間変化。DFOB 試薬は、Mn (II) 濃度の 3 倍濃度になるように試水へ添加した。

小さいことがわかった (図 5)。海水中では、カルシウムイオンやマグネシウムイオンなどのカチオンが DFOB と結合するため、淡水に比べ Mn (II) に由来する Mn (III) -DFOB 錯体の生成速度が比較的遅かったことが考えられる。したがって、Mn (II) が Mn (III) 錯体の回収率に与える影響は、海水試料に対しては比較的小さいが、Mn (III) -DFOB 錯体の抽出操作は速やかに行う必要がある。これに関連し、Mn (III) と錯体をつくる天然のリガンドを同定し、DFOB との置換速度を事前に把握することが重要である。

4. 今後の課題

本研究で検討した海水中の Mn (III) 錯体の抽出法は、DFOB と置換できないリガンドの存在や、Mn (II) による妨害など、解決すべき課題が残っている。また外洋域で低濃度の Mn (III) 錯体を定量的に分離抽出できるかどうかは鍵であり、さらに抽出した Mn (III) 錯体をどのような分析法で測定するべきかを注意深く検討していく必要がある。