

〈論 文〉

湖沼堆積物中から抽出されたフルボ酸のXAD樹脂吸着による分画と錯化能力

白井 恵次* 岸野 拓男* 東 俊雄**
進藤 晴夫** 丸本 卓哉**

Fractionation of Fulvic Acid Extracted from Lake Sediments Using XAD Resins and the Metal Complexing Ability

Keiji USUI*, Takuo KISHINO*, Toshio HIGASHI**,
Haruo SHINDO** and Takuya MARUMOTO**

* Laboratory of Environmental Science, Ube College, Bunkyocho 5-40, Ube 755 Japan

** Department of Agrobiolgy, Yamaguchi University, Yoshida 1677-1, Yamaguchi 753 Japan

Abstract

Fulvic acid extracted from lake sediments was treated with Amberlite XAD-2 and XAD-8 resins. The metal complexing ability of the fulvic acid was measured at pH 6.0 with a Cu^{2+} titration method, in which free Cu^{2+} was determined with an ion selective electrode. A two binding site model, in which there are two kinds of the molecules having strong and weak complexing ability and they complex with metal ion at the ratio of 1:1, was employed for the determination of the stability constant and complexing capacity of the fulvic acid, because the hyperbolic approximation could apply to the Scatchard plot of the found values.

The stability constants of the fulvic acids having strong complexing ability and weak complexing ability were in the range of 6.33—7.12 and 4.35—4.66, respectively. Both colorless fractions of the fulvic acid which were not adsorbed on XAD-2 and XAD-8 resins had such a high complexing ability as 44 and 32 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively.

On the other hand, both colored fractions of the fulvic acid which were adsorbed on the resins had only little complexing capacity.

Key words: fractionation of fulvic acid, lake sediments, amberlite XAD resin, complexing capacity, stability constant

1. はじめに

湖沼水においては、フルボ酸が鉄と錯体を形成し、植物プランクトンの増殖に重要な役割を演じていることが報告されている¹⁾。小林ら²⁾は、金属錯化容量 (Complexing Capacity) と溶存鉄濃度との間に高い相関関係があることから、鉄は水中の溶存有機物と錯体

を形成して溶存していると推測している。また、そのような溶存有機物と結合した鉄が淡水赤潮藻類の増殖を促進することも報告されている³⁾。さらに、有害金属が腐植物質と錯体を形成することによって水中生物に対して無毒化されることも知られている⁴⁾。このように湖沼内の有機物 (腐植物質) の錯化能力は湖沼の富栄養化および生物の生存にとって重要な役割を担って

* 宇部短期大学環境科学研究所 〒755 山口県宇部市文京町5-40

** 山口大学農学部生物資源科学科 〒753 山口県山口市吉田1677-1

いる。

湖沼における腐植物質のほとんどは堆積物中に存在し、フラックスによる巻き上がりや濃度勾配によって湖水に回帰すると考えられている。したがって、堆積物中の腐植物質と金属との錯形成能力の評価が重要と考えられる。しかしながら、環境中の腐植物質は不特定の有機物集合体であるため、金属との錯形成能力の評価には、腐植物質全体で錯化される銅の量から求める銅錯化容量、および腐植物質全体を1つないし2つの配位子と見立て、その錯化能力の強さを示す条件安定度定数 (Conditional Stability Constant) が用いられている^{9)~9)}。また、西村は金属と配位子の錯形成の強さと量の両者を含む尺度として、金属錯化容量指数という概念を提案している⁴⁾。

腐植物質の一種であるフルボ酸はアルカリ性で抽出され強酸性で腐植酸と分離される有機物の集合体であり、腐植酸より高い錯形成能力や還元能力をもつことが報告されている^{10)~12)}。著者らは、湖沼堆積物中のフルボ酸に着目してその金属錯化能力を評価することを目的に研究を行ってきた。

ここで用いたフルボ酸は小野湖 (山口県) 堆積物中から抽出したものであるが、地質の異なる他の3湖沼の堆積物から抽出したフルボ酸と銅との錯体の強い配位子と弱い配位子の条件安定度定数が pH6.0 でそれぞれ $\log K_1 = 6.74 \sim 7.45$, $\log K_2 = 4.63 \sim 5.04$ であったこと、河川水中の有機物に対してはそれぞれ $\log K_1 = 6.12 \sim 6.91$, $\log K_2 = 4.56 \sim 5.40$ ¹³⁾ と類似しており、わが国での他の湖沼堆積物中のフルボ酸や河川水中の有機物とも大差ないことが示された。本報告では、このフルボ酸を Amberlite XAD 樹脂イオン交換樹脂およびキレート樹脂などの樹脂により処理して精製^{7), 8), 14), 15)}したときに樹脂の非吸着部分と吸着部分の TOC および金属錯化容量を測定して比較検討したところ、XAD 樹脂処理により金属錯化能力を有する画分と、ほとんど有しない画分に分画できることを見出したので報告する。

2. 方法

2.1 試薬

分析に使用した試薬はすべて和光純薬工業社製の特級試薬を用いた。実験に使用した水は、イオン交換水を超純水製造装置 (ミリポア社製 Milli-Q II) で抵抗値 $10\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上に精製して使用した。Amberlite XAD-2 および XAD-8 樹脂は次のように精製した。すなわち樹脂 50g に対し 0.2N NaOH 300ml を加え 30 分間振とう後、汙過し、純水で洗浄した。洗浄液に TOC が検出されなくなるまでこの操作を繰り返した。また、

陽イオン交換樹脂 (Duolite C-20) およびキレート樹脂 (Chelex 100) も純水で洗浄液に TOC が検出されなくなるまで洗浄した。

2.2 湖沼堆積物のフルボ酸の抽出と樹脂処理

1992年10月24日、山口県宇部市の小野湖において湖沼堆積物をエックマンバージ式採泥器で採取し、ディープフリーザー中 (-85°C) で凍結保存した。これを必要に応じて室温で解凍、乾燥後乳鉢で磨砕し、0.42 mm の篩を通過させたものを 100g 採取し、次に述べるような方法¹⁶⁾でフルボ酸を抽出した。すなわち、この 100g に 0.5N NaOH 300ml を加え、 N_2 ガスでパブリングして空気を除き、上澄み液が無色になるまで繰り返し振とう抽出 (10個) した。次に、この抽出液を 6N HCl で pH2.0 にし、析出した沈殿物を遠心分離 (3,000 rpm) により除去した。この上澄み液をポアサイズ $0.45\ \mu\text{m}$ ニトロセルロース製メンブランフィルターで汙過してフルボ酸原液とした。

フルボ酸原液 (TOC として $9.05\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 20ml を次の①から⑦に示した処理を行ったのち、NaOH 溶液あるいは希硝酸数滴を加えて pH を 6.0 に調整した。続いて $0.45\ \mu\text{m}$ ニトロセルロース製メンブランフィルターで各処理液を汙過した後、その 5 ml に純水を加えて 100ml 定容とし、金属錯化能力と TOC 測定の試験溶液とした。

① NaOH 処理

NaOH 溶液数滴を加えて pH を 6.0 に調整し、30 分間攪拌した。

② キレート樹脂処理

キレート樹脂 (Chelex 100) 5.0g を添加し、30 分間攪拌したときの上澄液。

③ 強酸性陽イオン交換樹脂処理

強酸性陽イオン交換樹脂 (Duolite C-20) 5.0g を添加し、30 分間攪拌したときの上澄液。

④ Amberlite XAD-2 樹脂処理 (非吸着画分)

Amberlite XAD-2 樹脂 5.0g を添加し、30 分間攪拌したときの上澄液。

⑤ Amberlite XAD-8 樹脂処理 (非吸着画分)

Amberlite XAD-8 樹脂 5.0g を添加し、30 分間攪拌したときの上澄液。

⑥ Amberlite XAD-2 樹脂処理 (吸着画分)

Amberlite XAD-2 樹脂 5.0g を添加し、30 分間攪拌した後、樹脂を 0.2N NaOH 溶液 20ml で抽出したときの溶出液。

⑦ Amberlite XAD-8 樹脂処理 (吸着画分)

Amberlite XAD-8 樹脂 5.0g を添加し、30 分間攪拌した後、樹脂を 0.2N NaOH 溶液 20ml で抽出したときの溶出液。

2.3 金属錯化能力および TOC の測定

湖沼堆積物中のフルボ酸の金属錯化能力を測定する場合、天然の pH (本試料の間隙水の pH は 7.0) で行うことが望ましい。しかし、今回使用した銅イオン選択電極の測定可能 pH 領域を検討したところ、その pH 領域が 4.5~6.0 であったため、試験溶液の pH をそれに近い 6.0 に設定した。

試験溶液 50 ml をビーカーに採り、KNO₃ 溶液を加えてイオン強度を 0.10 に調整した。次に、25.0 ± 0.1°C に保った恒温槽中で、pH をあらかじめ 6.0 に調整した 0.629 mM Cu(NO₃)₂ 溶液で滴定した。Cu(NO₃)₂ 溶液を滴下した 1 分後に、遊離の銅イオンを銅イオン選択電極法 (東亜電波社製イオンメーター IM-20E, 銅イオン選択電極 Cu-125) により測定した。銅イオン濃度とイオン電極電位との間には Nernst の式が成立することを確認した。また、使用した電極の基準電位は 189.3 mV であり、これを用いて遊離の銅イオン濃度を計算した。各試験溶液の TOC の測定は島津製作所製 TOC 分析計 (TOC-5000 型) を用いて行った。

2.4 条件安定度定数と銅錯化容量の算出

フルボ酸は多種類の有機物集合体と考えられるので、金属イオンと 1:1 錯体のみを形成するとは限らない。しかしながら、箕浦・福島¹³⁾は、河川水の錯化能力の測定において、河川水中の有機物が錯化能力の強いものと弱いものの 2 種類から構成され、それらが銅と 1:1 錯体のみを形成すると仮定する Two binding site model を適用して、条件安定度定数および銅錯化容量を求めている。そこで、本研究では湖沼堆積物中のフルボ酸に対して、この Two binding site model が適用できるかどうか、双曲線近似¹⁷⁾を行って確認した。つまり、銅滴定によって得られた値を Scatchard plot¹⁸⁾し、この plot に対して双曲線を近似することができれば、この双曲線は互いに異なった 2 種類の条件安定度定数および銅錯化容量をもつことになる。

いま、フルボ酸が錯化能力の強い配位子 L₁ と弱い配位子 L₂ の 2 種類から構成され、銅とは 1:1 錯体のみを形成すると仮定し、その総濃度を N₁ および N₂ とすると、

$$N_1 = [L_1] + [CuL_1] \quad (1)$$

$$N_2 = [L_2] + [CuL_2] \quad (2)$$

また、それぞれの錯体の安定度定数を K₁ および K₂ とすると、

$$K_1 = [CuL_1]/[Cu][L_1] \quad (3)$$

$$K_2 = [CuL_2]/[Cu][L_2] \quad (4)$$

と表される。

銅の全濃度を T_{cu} とすると、

$$T_{cu} = [Cu] + [CuL_1] + [CuL_2] \quad (5)$$

式(1)~(5)を変形すると、

$$(T_{cu} - [Cu])/[Cu] = K_1 N_1 / (1 + K_1 [Cu]) + K_2 N_2 / (1 + K_2 [Cu]) \quad (6)$$

となる。

いま、配位子 L₁ のみが存在すると仮定すると、

$$T_{cu} = [Cu] + [CuL_1] \quad (7)$$

式(1), (2), (3)および(7)より

$$(T_{cu} - [Cu])/[Cu] = K_1 N_1 / (1 + K_1 [Cu]) = -K_1 (T_{cu} - [Cu]) + K_1 N_1 \quad (8)$$

同様に配位子 L₂ についても

$$(T_{cu} - [Cu])/[Cu] = K_2 N_2 / (1 + K_2 [Cu]) = -K_2 (T_{cu} - [Cu]) + K_2 N_2 \quad (9)$$

と表される。

以上のことから、式(6)は、式(8)および(9)で表される直線を合成したものとなる。すなわち、縦軸に (T_{cu} - [Cu])/[Cu] を、横軸に T_{cu} - [Cu] をとる Scatchard plot¹⁸⁾行くと Two binding site model の場合下方に湾曲した曲線が得られ、この曲線を Klotz M. and Hunston D.L. が行った方法¹⁹⁾で解析するとそれぞれの配位子に対応する 2 本の直線に分割される。この曲線が双曲線に近似することができれば、その 2 本の漸近線が上記 2 本の直線を表すことになり、Two binding site model が湖沼堆積物中のフルボ酸と金属との錯体形成能力の解析に適用できることになる。この方法により得られた 2 本の漸近線のそれぞれの傾きと切片から、錯化能力の強いフルボ酸と弱いフルボ酸の総濃度、つまり金属錯化容量 N₁, N₂ および条件安定度定数 K₁, K₂ が算出される。

なお、本報告では湖沼堆積物よりフルボ酸を抽出したので、金属錯化容量 N₁, N₂ および TOC の値は、乾燥堆積物 1 g 中の μmol 数および mg 数でそれぞれ表示した。

3. 結果と考察

湖沼堆積物などから抽出されたフルボ酸原液の pH は 2.0 と低いため、その金属錯化能力を環境水の pH で測定するためには pH を上げる必要があるが、その際この溶液に含まれている Fe, Al などが水酸化物として多量に析出する。これらにフルボ酸が吸着され、安定度定数や金属錯化容量の測定値に影響を与える可能性がある。これを避けるために陽イオン交換樹脂あるいはキレート樹脂などで金属イオンを除去することが一般に行われている。一方、Amberlite XAD 樹脂などでフルボ酸を吸着分離して精製することも行われてい

Table 1 Effect of resin treatment to fulvic acid solution prepared from lake sediments at pH 6.0 on the values of CSC, CC and TOC

No.	Resin treatment method	CSC* ¹		CC* ²			E ₄₀₀ * ³	TOC
		log K ₁	log K ₂	N ₁	N ₂	N ₁ +N ₂		
	No treatment (pH 2.0)	—	—	—	—	—	0.33	9.05
①	NaOH treatment	6.68	4.43	3.4	37.1	40.5	0.17	4.70(52)
②	Chelex 100 resin treatment	6.33	4.45	4.2	38.9	43.1	0.30	5.70(63)
③	Duolite C-20 resin treatment	7.12	4.35	1.1	28.8	29.9	0.27	5.16(57)
④	XAD-2 resin supernatant	6.81	4.66	3.9	41.0	44.9	0.03	4.70(52)
⑤	XAD-8 resin supernatant	6.49	4.39	1.7	31.1	32.8	0.02	6.24(69)
⑥	XAD-2 resin NaOH extract	little complexing ability with copper					0.20	3.40(38)
⑦	XAD-8 resin NaOH extract	little complexing ability with copper					0.27	2.62(29)

*1: CSC ; conditional stability constant

*2: CC ; complexing capacity

*3: E₄₀₀ ; Absorbancy at 400nmK₁ and K₂ are the conditional stability constants of the fulvic acid having the strong and weak complexing ability, respectively.N₁ and N₂ are the complexing capacity of the fulvic acids having the strong and weak complexing ability, respectively.

The values in parentheses express percentage distribution of TOC of each treatment solution to no treatment solution.

る。そこで、フルボ酸に対してこのような樹脂処理および pH の調整などの処理を行うことにより、その処理された画分の金属錯化能力がどの程度影響されるかを調べた。

各画分の条件安定度定数や銅錯化容量および TOC などの分析値を **Table 1** に示した。

3.1 NaOH による pH の調整および樹脂処理後の各画分中の TOC

各処理を行うことによるフルボ酸量の変化を TOC で検討したところ、①の NaOH 処理では、フルボ酸原液の 52% が処理液中に存在した。残りの 48% のフルボ酸は金属水酸化物と共沈したものと推測された。

②のキレート樹脂および③の強酸性陽イオン交換樹脂処理の場合、それぞれの処理液中に 63% および 57% のフルボ酸の TOC が存在した。④の XAD-2 樹脂処理の場合、フルボ酸の TOC の 52% が上澄液中に、また⑤の XAD-8 樹脂処理ではフルボ酸の TOC の 69% が上澄液中にそれぞれ存在した。一方、⑥の XAD-2 樹脂処理溶出液中および⑦の XAD-8 樹脂処理溶出液中には、フルボ酸の TOC の 38% および 29% がそれぞれ検出された。これらの樹脂処理の上澄液と溶出液の TOC の含量、すなわち、XAD-2 樹脂処理では④と⑥の含量、XAD-8 樹脂処理では⑤と⑦の含量が、それぞれ 90% および 98% となり、フルボ酸はこれらの XAD 樹脂処理により上澄液と溶出液の 2 つの画分にはほぼ完全に分画された。

3.2 各処理液の銅錯化能力

①から⑦の各画分について、銅滴定—イオン選択電

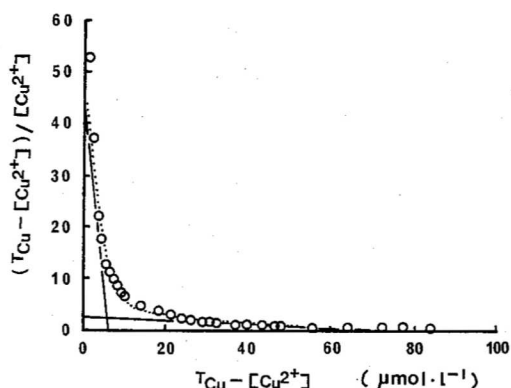


Fig. 1 Scatchard plot of the Cu²⁺ titration of fulvic acid solution prepared from lake sediments (○). The pH of the solution was adjusted to 6.0 with NaOH. The hyperbolic approximation to the Scatchard plot was expressed as the dotted curve.

極検出法で得られた測定値に対する Scatchard plot を行った。銅錯化容量がほとんど無く、Two binding site model が適用できなかった⑥および⑦以外の画分では、いずれも双曲線近似が可能であった。①の画分での双曲線近似を **Fig. 1** に示した。この図から分かるように、双曲線近似を行った結果は、実測値とほぼ一致した。このことから、供試湖沼堆積物中のフルボ酸の条件安定度定数と銅錯化容量は、Two binding site model により決定できることが示された。

①～⑤の各画分の条件安定度定数についてみると、

いずれも $\log K_1 = 6.33 \sim 7.12$, $\log K_2 = 4.35 \sim 4.66$ となり、ほぼ同じ値が示された。このことは、本研究で得られたフルボ酸が、約100倍程度、錯化能力の強さが異なる二種類に大別できることを示唆している。表中の N_1 および N_2 は、錯化能力の強いフルボ酸と弱いフルボ酸それぞれの銅錯化容量を意味している。①～⑤の各画分の銅錯化容量 N_1 は、 $1.1 \sim 4.2 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ と、 N_2 の $28.8 \sim 41.0 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ に比べて $1/10 \sim 1/40$ 程度低い値を示した。このことは、本研究の供試フルボ酸はその大部分が錯化能力の弱い画分から構成されていることを示唆している。

前述したようにフルボ酸原液を XAD-2樹脂あるいは XAD-8樹脂で処理すると、樹脂に吸着される画分と、されない画分にほぼ完全に分画された。また、両樹脂処理による非吸着画分は、フルボ酸の TOC のそれぞれ52%および69%を占めていた。湖沼堆積物中のフルボ酸の樹脂吸着において、このような結果を示した報告はほとんどないが、箕浦・福島¹³⁾は、XAD-2樹脂処理で吸着される河川水中有機物濃度は約50%であったことや XAD-2樹脂に吸着されない安定度の高い配位子の存在を示唆している。

これらのことから、XAD樹脂によるフルボ酸の非吸着画分が相当量存在することが明らかである。さらに、銅錯化能力は吸着した画分の⑥および⑦にはほとんど認められなかった。以上の結果と非吸着画分の着色度 (E_{400}) が吸着画分よりも10倍低く、ほとんど無色であったことから、フルボ酸の錯化能力の評価には、XAD樹脂に吸着されない無色フルボ酸の方が重要であることが示された。

4. ま と め

湖沼堆積物中よりフルボ酸を抽出し、その抽出液をキレート樹脂、イオン交換樹脂、XAD-2樹脂および XAD-8樹脂を用いて処理を行い、その処理液について銅錯化能力を Two binding site model を用いて検討した。

1) 各処理液を用いて条件安定度定数をもとめたところ、フルボ酸は $\log K_1 = 6.33 \sim 7.12$ および $\log K_2 = 4.35 \sim 4.66$ を持った約100倍程度錯化能力の異なる二種類のものに大別でき、その大部分が弱い錯化能力を有するフルボ酸で構成されていることが示唆された。

2) フルボ酸は XAD-2 および XAD-8樹脂処理により、吸着画分と、非吸着画分にほぼ完全に分画された。吸着画分のフルボ酸には錯化能力がほとんど認められなかった。一方、非吸着画分のフルボ酸はほぼ無色で銅錯化容量として $33 \sim 45 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ の錯化能力が認められた。さらに、その量は TOC 値から判断すると

総フルボ酸のうち52～69%の割合を占めていた。

以上のことから、種々の有機物からなる湖沼堆積物中のフルボ酸の金属錯化能力には、これらの XAD樹脂に吸着されない画分が大きな役割を演じていることが判明した。

謝 辞

本研究は平成4年度の財団法人私学研修福祉会および宇部短期大学特別研究費の援助を得て行った。また、TOCの測定に関し山口大学工学部の浮田正夫教授に御協力いただいた。関係各位に感謝の意を表す。

(原稿受付 1993年6月7日)

(原稿受理 1993年8月4日)

参 考 文 献

- 1) Matsunaga, K., Negishi, M. and Fukase, S. (1979) Stability constant of Copper with fulvic acid, *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, **30**, 301-305.
- 2) 小林節子, 西村肇 (1988) 富栄養湖の金属錯化容量, 水質汚濁研究, **11**, 647-653.
- 3) Nishio, T. and Ishida, Y. (1990) Organically bound iron in lake sediments and its availability to *Uroglana americana*, a freshwater red tide chrysophyceae, *Jpn. J. Limn.*, **51**, 281-291.
- 4) 西村雅吉 (1979) 天然水の金属錯化容量, 環境水に排出された重金属イオンの安定化, 化学の領域, **33**, 535-540.
- 5) Langford, C.H., Wong, S.M. and Underdown, A.W. (1981) The interaction soil fulvic acid with precipitation hydrous ferric oxide at pH=6, *Can. J. Chem.*, **59**, 181-186.
- 6) Schnitzer, M. (1969) Reaction between fulvic acid, a soil humic compound and inorganic soil constituents, *Soil. Sci. Soc. Amer. Proc.*, **33**, 75-81.
- 7) Mantoura, R.F.C. and Riley, J.P. (1975) The use of gel filtration in the study of metal binding by humic acids and related compounds, *Anal. Chim. Acta*, **78**, 193-200.
- 8) Hirata, S. (1981) Stability constants for the complexes of transition-metal ions with fulvic and humic acids in sediments measured by gel filtration, *Talanta*, **28**, 809-815.
- 9) Ralph, E.T. and Weber, J.H. (1981) Determination of complexing capacity of fulvic acid for copper(II) and cadmium(II) by dialysis titration, *Anal. Chem.*, **53**, 337-342.
- 10) Scheffer and Schachtschabel 著, 佐々木清一, 長谷川寿喜訳 (1979) 土壌学, 博友社, 東京.
- 11) Skogerboe, R.K. and Wilson, S.A. (1981) Reduction of ionic species by fulvic acid, *Anal. Chim.*, **53**, 228-232.
- 12) Neubecker, T.A. and Allen, H.E. (1983) The measurement of complexation capacity and conditional stability constants for ligands in natural waters, *Water Res.*, **17**, 1-14.
- 13) 箕浦加穂, 福島和夫 (1988) 銅滴定—イオン選択電極検出による河川水の錯体形成能力の評価, 地球化学, **22**, 47-54.
- 14) Bresnahan, W.T., Grant, C.L. and Weber, J.H. (1978) Stability Constants for the complexation of Copper (II) ions with water and soil fulvic acids measured by an ion selective electrode, *Anal. Chem.*, **50**, 1675-1679.

- 15) Figura, P. and McDuffie, B. (1979) Use of chelex resin for determination of labile trace metal fractions in aqueous ligand media and comparison of the method with anodic stripping voltammetry, *Anal. Chem.*, **51**, 120-125.
- 16) Hirata, S. (1983) Molecular weight and trace metal distributions in fulvic and humic acid fractions of coastal marine sediments, *J. Ocean Soc. Jap.*, **39**, 203-210.
- 17) 石居進, 河野晴也, 若林克己, 和田勝, 窪川かおる (1983) ライフサイエンス・パソコンシリーズ実用プログラム集, pp. 93-109, 培風館, 東京.
- 18) Scatchard, G. (1949) The attractions of proteins for small molecules and ions, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **51**, 660-672.
- 19) Koltz, I.M. and Hunston, D.L. (1971) Properties of graphical representations of multiple classes of binding sites, *Biochem.*, **10**, 3065-3069.