

&lt;ノ - ト&gt;

## 湖沼堆積物から抽出したフルボ酸による リン酸カルシウムからのリンの溶出

白井 恵次\*      進藤 晴夫\*\*  
丸本 卓哉\*\*      岸野 拓男\*

### Release of Phosphorus from Calcium Phosphate by Fulvic Acid Extracted from Lake Sediments

Keiji USUI\*, Haruo SHINDO\*\*,  
Takuya MARUMOTO\*\* and Takuo KISHINO\*

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

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

#### Abstract

A release of phosphorus from calcium phosphate, iron(III) phosphate, and aluminum phosphate owing to the complex formation of their metals with fulvic acid was examined. Fulvic acid was extracted from lake sediments and treated with Amberlite XAD-8 resin. The non-adsorbed fraction of fulvic acid on the resin, which has highly  $\text{Cu}^{2+}$ -complexing capacity, was used in this study, because the adsorbed fraction has only little  $\text{Cu}^{2+}$ -complexing capacity as reported in our previous paper.

The non-adsorbed fraction was able to release phosphorus from calcium phosphate, but not from iron(III) phosphate, and aluminum phosphate. The application of X-ray analysis to the calcium phosphate indicated that the major component is hydroxyapatite. The stability constant of the  $\text{Cu}^{2+}$ -fractionated fulvic acid was determined to be  $2 \times 10^5$  ( $\log K=5.3$ ) and the average molecular weight of the fulvic acid was 1,026.

**Key words:** release of phosphorus, fulvic acid, molecular weight, lake sediments

#### 1. はじめに

小林ら<sup>1)</sup>は、EDTAを用いて、湖底堆積物中からのリン、鉄、アルミニウム、カルシウムおよびマグネシウムの溶出実験を行い、EDTAの持つ金属錯化能力がこの溶出に重要な役割を演じていると推論した。フルボ酸は腐植物質のうち、アルカリ可溶で酸でも沈殿しない有機物画分であり、その金属錯化能力は腐植酸に比べて強いことが報告されている<sup>2)</sup>。しかしながら、フルボ酸とリン酸塩との反応を論じた報告は見当たらない。

既報<sup>3)</sup>において著者らは、Amberlite XAD樹脂を用いて湖沼堆積物中のフルボ酸を分画し、無色で高い金属錯化能力を示す非吸着画分と有色で金属錯化能力をほとんど示さない吸着画分に大別できることを明らかにした。この非吸着画分をリン酸カルシウム、リン酸鉄およびリン酸アルミニウムに添加して溶出実験を行ったところ、リン酸カルシウムからリンの溶出が認められたので、その結果の概略を報告する。また、この画分の平均分子量についても併せて報告する。

\* 宇部短期大学附属環境科学研究所 〒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

## 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14 M $\Omega$ ·cm 以上に精製して使用した。Amberlite 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、ニトロセルロース製メンブランフィルター（0.45 $\mu$ m）で濾過し、純水で洗浄した。洗浄液の TOC 含量が無視できるまでこの操作を繰り返した。

### 2.2 フルボ酸の抽出と樹脂処理

山口県宇部市にある小野湖の堆積物をエックマンバージュ式採泥器で採取し、ディープフリーザー中（-85 $^{\circ}$ C）で凍結保存した。これを必要に応じて室温で解凍し、乾燥後乳鉢で磨砕し、0.42mm の篩を通過させた。この試料100g に、0.5N NaOH 300ml を加え、N<sub>2</sub> ガスでバ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回）した。次に、その抽出液を6N HCl で pH2.0 にし、析出した沈殿物を遠心分離（3000rpm）により除去した<sup>4)</sup>。この上澄み液をポアサイズ0.45 $\mu$ m のメンブランフィルターで濾過してフルボ酸原液とした。

フルボ酸原液20ml に Amberlite XAD-8 樹脂5.0g を添加し、30分間攪拌したときの上澄み液を非吸着画分とした。この画分に NaOH 溶液あるいは希硝酸数滴を加えて、pH6.0（イオン選択電極での測定の上限）に調整した。つづいて、0.45 $\mu$ m のメンブランフィルターで濾過した後、その5 ml に純水を加えて100ml に定容した。この溶液を金属錯化能力、TOC および平均分子量測定用の試験溶液とした。TOC の測定は、島津製作所製 TOC 分析計（TOC-5000型）を用いた。一方、リン酸塩からのリンの溶出試験に対しては、pH7.0 に調整した後、上記と同様に100ml に定容した溶液を用いた。

### 2.3 リン酸塩からのリンの溶出

リン酸塩としてリン酸第二鉄（FePO<sub>4</sub>·nH<sub>2</sub>O）、リン酸アルミニウム（AlPO<sub>4</sub>）およびリン酸三カルシウム（和光純薬工業は、リン酸三カルシウムとして市販しているが、これは Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ではなく、主成分はヒドロキシアパタイト Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub> の形態をとる。その X 線回折の結果は後述する。）を用いてリンの溶出実験を行った。各リン酸塩0.2g を精秤し、それに前記の試験溶液0, 1, 2, 5, 10ml を添加した後、純水を加えて約95ml とした。次に、この溶液に希塩酸または希水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH を7.0 に調整

した後、純水を加えて100ml に定容した。各リン酸塩と水との溶解平衡は、ほぼ5分後に達したが、安全を見越してこれらを振とう器で30分間振とう後、0.45 $\mu$ m のメンブランフィルターで吸引濾過した。濾液中のリン量をモリブデン青法<sup>5)</sup>で測定するとともに、それぞれの溶液の TOC、鉄、アルミニウムおよびカルシウム濃度も測定した。金属の定量は、日立製170-A 型原子吸光光度計で行った。なお、濾液の pH を測定したところ、いずれも6.9~7.1の範囲内にあり、反応中の pH はほぼ7 に保たれていることを確認した。

### 2.4 リン酸カルシウムの X 線回折

Fig. 1 にヒドロキシアパタイト（和光純薬工業社製のカラムクロマト用）および本実験で用いたリン酸三カルシウムの X 線回折結果を示した。本実験で用いたリン酸三カルシウムの反射強度はヒドロキシアパタイトに比べて小さいが、両者の回折パターンは非常に良く一致しており、リン酸三カルシウムの主成分は結晶化度の低いヒドロキシアパタイトであると考えられた。

### 2.5 フルボ酸の平均分子量の測定

フルボ酸の平均分子量の測定には、Buffle ら<sup>6)</sup>の方法を若干修正した松永らの方法<sup>7)</sup>を用いた。すなわち、式(1)のように Cu<sup>2+</sup> の錯体形成の度合いを  $\alpha$  とした場合に得られる式(2)の左辺に対し  $\alpha/[Cu^{2+}]_T$  をプロッ

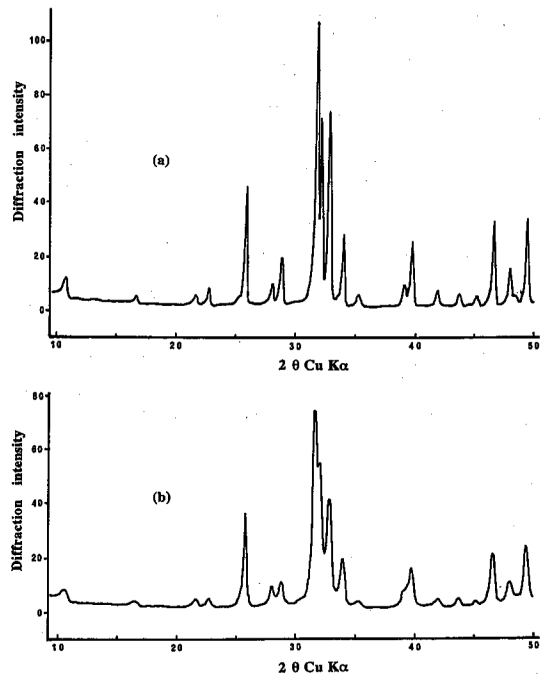


Fig. 1 X-ray diffraction patterns of hydroxylapatite (a) and calcium phosphate (b)

トすれば、その切片と傾きからフルボ酸の平均分子量  $Mw$  と銅との安定度定数  $\beta$  が算出できる。フルボ酸の  $pK_a$  値は4.2であるといわれている<sup>9)</sup>ので  $pH6.0$ の実験条件下では完全に解離していると考えられる。

$$\alpha = \frac{[L]_T}{[Cu^{2+}]_T} \quad (1)$$

ここで、 $[Cu^{2+}]_T$ は  $Cu^{2+}$ の全濃度を、 $[Cu^{2+}]$ は水和した  $Cu^{2+}$ 濃度を示した。

$$Y = \frac{[L]_T}{[Cu^{2+}]_T} \cdot \frac{\alpha}{\alpha - 1}$$

$$= Mw + \frac{Mw}{K} \cdot \frac{\alpha}{[Cu^{2+}]_T} \quad (2)$$

ここで、 $[L]_T(g \cdot l^{-1})$ はフルボ酸の全濃度、 $Mw$ および  $K$ は、それぞれフルボ酸の平均分子量および銅との安定度定数を示す。また、フルボ酸の全濃度  $[L]_T(g \cdot l^{-1})$ は、ロータリーエバポレーター(東京理化学機社製 NN型)で  $65^\circ C$ の条件で濃縮したものを白金るつばにとり、 $65^\circ C$ で48時間乾燥させた重量と、それを  $500^\circ C$ で1時間電気炉(アドバンテック東洋社製 OPM-50型)で焼成した重量との差から求めた。

### 3. 結果と考察

湖沼堆積物からのリンの溶出にはフルボ酸の持つ金属錯化能力が関与するのではないかと推定される。そこで、高い錯化能力を示すフルボ酸画分について、どのリン酸塩と反応し、どの程度のリン酸イオンを遊離するか調べた。Fig. 2に示したように、リン酸塩としてリン酸第二鉄およびリン酸アルミニウムを用いた場

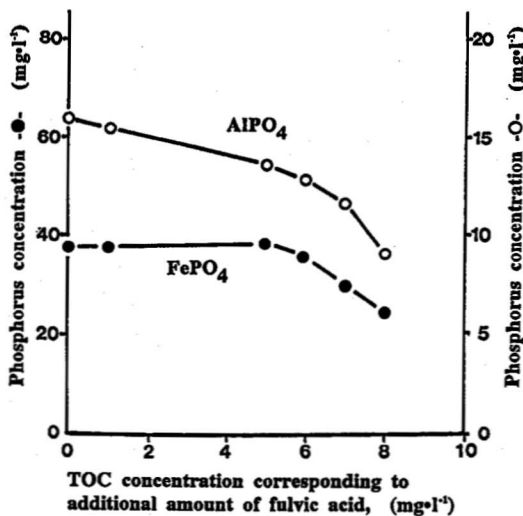


Fig. 2 Changes of phosphorus concentration accompanying to addition of fulvic acid to aluminum phosphate and iron phosphate

合にはリン酸イオンの遊離は認められなかった。これらの場合、反応液が次第に濁り、沝液中のリン量は低下した。これは明らかにリンの水酸化鉄や水酸化アルミニウムへの吸着を示すものであり、湖沼堆積物中のフルボ酸は、リン酸鉄およびリン酸アルミニウムの溶解能力を有しないものと推定した。一方、フルボ酸とリン酸カルシウムとの反応では、Fig. 3に示したように、リンおよびカルシウムの溶出が認められた。この場合、TOC 1 mg あたりのカルシウムの溶出量は、0.22mg (5.49  $\mu$ mol)であった。前報<sup>9)</sup>で示したように、このフルボ酸画分の金属錯化容量は  $32.8 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 、TOCは  $6.24 \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ であった。フルボ酸がカルシウムと1:1錯体を形成した場合、金属錯化容量は、TOC 1 mg あたり  $5.26 \mu\text{mol}$ となり、本報告で得られた値と近似した。また、TOC 1 mg あたりの全リンの溶出量は0.09mg (2.96  $\mu$ mol)であった。この値は、ヒドロキシアパタイト ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ )から溶出する全リン量の理論値 (3.16  $\mu$ mol)と良く一致した。さらに、乾燥堆積物 1 g 中に含まれているこのフルボ酸がリンを溶出させるポテンシャルを上記の値を用いて試算すると  $6.24 \times 0.09 = 0.56 \text{mg}$ となる。著者らは本堆積物中のリンの形態別分析を行い、この堆積物 1 g 中にカルシウム態リンとして0.21mg 含まれることを報告した<sup>9)</sup>。上記の試算値はこの値を大きく上回っており、堆積物中からのカルシウム態リンの溶出に関してフルボ酸が無視できない役割を演じていることが推測され

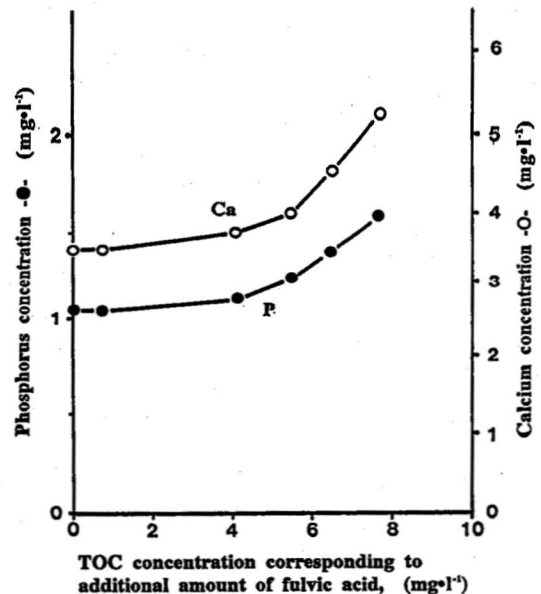


Fig. 3 Changes of phosphorus concentration accompanying to addition of fulvic acid to calcium phosphate

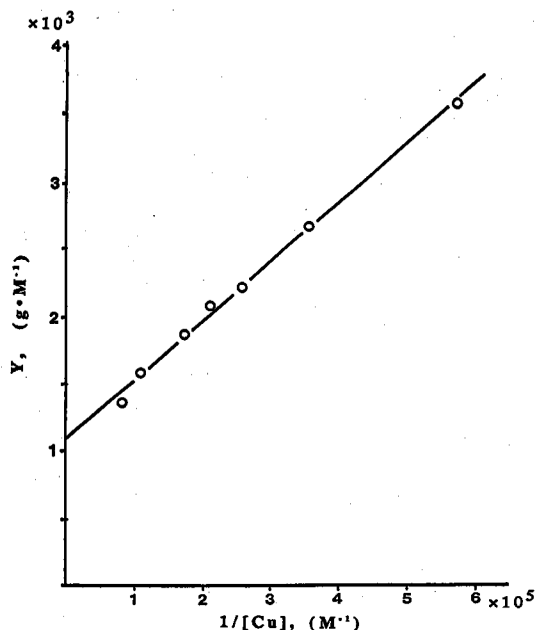


Fig. 4 Relationship between  $Y$  and  $1/[Cu]$  according to eq.(2)

る。

錯化能力のあるフルボ酸画分の平均分子量をその濃度  $[L]_r$  を使用して求めた。すなわち、その濃度  $[L]_r$   $0.1138\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  を式(2)の左辺に代入し、 $1/[Cu]$  との関係プロットして Fig. 4 に示した。最小二乗法で求めた回帰直線式は、 $Y=1,026+4.68\times 10^{-3}(1/[Cu])$  となった。この直線の Y 軸との切片より、供試フルボ酸画分の平均分子量は 1,026 となり、直線の傾きから条件安定度定数  $\log K$  は 5.34 となった。これらの値は従来報告されている土壌のフルボ酸の平均分子量 640~999<sup>10)</sup> や条件安定度定数  $\log K$  4.8~5.9<sup>7)</sup> と近似していた。

細見ら<sup>11)</sup> および城<sup>12)</sup> は、堆積物中のリンの形態別分析とリンの溶出実験を行い、カルシウム態リンの無機リンに対する存在割合は、大阪湾では 33~67%、霞ヶ浦では 38% であるが、カルシウム態リンの溶出は認められなかったと報告している。しかしながら、本研究の結果は、フルボ酸がヒドロキシアパタイトの可溶化を促進することを示した。ヒドロキシアパタイトが、湖沼堆積物中に存在する重要なリン酸塩の一種である<sup>13)</sup> ことを考慮に入れると、得られた結果は、湖沼堆積物からのリンの溶出におけるフルボ酸の役割が無視できないことを示唆している。

#### 4. 結 論

湖沼堆積物から抽出したフルボ酸を Amberlite

XAD-8 樹脂により処理し、得られた金属錯化能力の高い非吸着画分を用いて、リン酸カルシウム、リン酸第二鉄およびリン酸アルミニウムからリンの溶出を検討した。その結果、非吸着画分はリン酸カルシウムからリンを溶出したが、リン酸第二鉄およびリン酸アルミニウムからリンを溶出できなかった。また、この非吸着画分の平均分子量は 1,026 であり、条件安定度定数  $\log K$  (pH6.0) は 5.34 と計算された。供試したリン酸カルシウムの X 線回折結果は、その主成分がヒドロキシアパタイトであることを示した。

#### 謝 辞

本研究に対し有益な御助言ならびに X 線回折による分析を行っていただいた山口大学名誉教授 東 俊雄先生に深謝いたします。

(原稿受付 1994年1月21日)

(原稿受理 1994年7月8日)

#### 参 考 文 献

- 1) 小林節子, 西村肇 (1988) 好気下における底質からのリンの溶出に及ぼす錯形成物質の影響, 水質汚濁研究, 11, 647-653.
- 2) Scheffer and Schachtschabel 著, 佐々木清一, 長谷川寿喜訳 (1979) 土壌学, 博友社, 東京.
- 3) 白井恵次, 岸野拓男, 東俊雄, 進藤晴夫, 丸本卓哉 (1993) 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, 水環境学会誌, 16, 690-695.
- 4) 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.
- 5) Murphy, J. and Riley, J.P. (1962) A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters, *Anal. Chem.*, 27, 31-36.
- 6) Buffle, J., Greter, F. and Haerdi, W. (1977) Measurement of complexation properties of humic and fulvic acids in natural waters with lead and copper ion-selective electrodes, *Anal. Chem.*, 49, 216-222.
- 7) Matsunaga, K., Negishi, M. and Fukase, S. (1979) Stability constant of copper with fulvic acid, *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 30, 301-305.
- 8) Wilson, D.E. (1977) Effects of humic materials, *Limnol. Oceanogr.*, 22, 281-288.
- 9) 白井恵次, 東俊雄 (1991) 湖沼および河川底質の還元溶解性鉄リン, 宇都短期大学学術報告, 28, 45-49.
- 10) Hayes, M.H.B., McCarthy, P., Malcolm, R.L. and Swift, R. (1989) Humic substances II, in "Search of Structure", p 537, John Wiley & Sons Ltd., England.
- 11) 細見正明, 須藤隆一 (1979) 湖沼底泥からのリン溶出に関する研究, 水質汚濁研究, 2, 157-162.
- 12) 城久 (1983) 大阪湾底泥に含まれるリンの存在形態と溶出画分, 日本水産学会誌, 49, 447-454.
- 13) Stumm, W. and Morgan, J.J. (1970) Aquatic chemistry, p. 516, Wiley Interscience publ.