

限外ろ過法による UO_2^{2+} -フミン酸錯体形成の評価: 分子量・構造不均質性の効果

斉藤拓巳*1 長崎晋也*2 田中 知*1

フミン酸 (HA) は不均質な天然有機物質の一種であり, その錯体形成は複雑なものとなる. 本研究では, HA と放射性廃棄物処分等で問題となる UO_2^{2+} の錯体形成に関して, HA 中の複数の錯体形成サイトの存在に着目して評価を行った. HA は幅広い分子量分布を有しており, また, その構造が分子量によって異なることが報告されていることから, このような不均質性の寄与に関する知見を得るために, Gel Permeation Chromatography (GPC) によって得られた分子量の異なる HA フラクシオンと UO_2^{2+} の錯体形成量を限外ろ過法によって評価し, 得られた結果と蛍光クエンチング実験の結果との比較を行った. 未分画の HA に関して得られた錯体形成の安定度定数は 6.25 であり, 既往の研究で得られた値 (6.13 ~ 6.75) と同様であることがわかった. 一方, HA フラクシオンと UO_2^{2+} の錯体形成では, 安定度定数において, フラクシオン間の相違がほとんどないのに対して, 錯体形成に寄与するサイトの割合は低分子量のフラクションにおいて大きく, フラクシオンの構造の違いが錯体形成量に変化を及ぼしていることが示唆された. また, クエンチング実験の結果との比較から, HA の蛍光に関与しない錯体形成サイトがすべてのフラクションに含まれており, このようなサイトが安定度定数において, UO_2^{2+} と間でより安定な錯体を形成するサイトに対応していることが明らかになった.

Keywords: フミン酸, ウラニル, 錯体形成, 不均質性, 限外ろ過

The complexation relevant for humic acid (HA), one of natural organic matters, is complicated because of the heterogeneity of HA. In this work, the complexation between HA and UO_2^{2+} , whose environmental behavior is important in the radioactive waste management, was evaluated based on this heterogeneity, especially the presence of the multiple complexing sites in HA. HA is recognized to have a wide distribution of its molecular weight and the structural differences depending on its molecular weight. Therefore, for the better understanding of the effects of these heterogeneities, HA was fractionated by gel permeation chromatography (GPC) and the complexation between the obtained fractions and UO_2^{2+} was examined by ultrafiltration and compared with that by the fluorescence quenching experiment. The stability constant ($\log K$) of unfractionated HA was 6.25, which is similar as the reported values ($\log K = 6.13 \sim 6.75$). In case of HA fractions, the obtained stability constants were not different among them, in contrast, the numbers of the complexing sites were largest in the lowest molecular-weight fraction. This indicated the complexing amount between HA and UO_2^{2+} could be influenced by the structural difference in the HA fractions. The comparison between their results and those of the quenching experiments revealed that the complexing sites, which do not participate in the fluorescence of HA, were contained in all fractions and these site formed more stable complexes with UO_2^{2+} than the fluorescent sites.

Keywords: humic acid, uranyl, complexation, heterogeneity, ultrafiltration

1 緒言

腐植物質 (Humic Substances) は動植物の遺骸が分解縮合を経て生成する天然有機物であり, 環境中に普遍的に存在する. その特徴としては, 幅広い分子量分布 ($10^3 \sim 10^5 \text{Da}$) とともに, 芳香環とアルキル基からなる炭素骨格上にカルボキシル基やフェノール基等の官能基が不均質に分布した構造を有しており, 豊富な官能基の存在によって高分子電解質性を示すという点が挙げられる [1-2]. また, 腐植物質は重金属やアクチノイドなどの金属イオンに対する高い錯体形成能を有しており, これらのイオンの環境中での移動度や溶解度, 酸化・還元状態等の物理化学的性質を変化させることが知られている [3-9]. したがって, このような腐植物質による錯体形成は放射性廃棄物処分の安全評価に不確実性を与える主要因の 1 つであり, また, 土壌・水質汚染における汚染物質の生物学的利用能 (bioavailability) の評価や環境修復を考える上でも重要となる.

従来の研究では, 限外ろ過などによって腐植物質の分離を行った後, あるいはイオン選択性電極を用いて直接的に, 錯体形成していない金属イオン濃度を測定することで錯体形成量を評価することが多く行われてきた [10-16]. しかし, 腐植物質内部における複数の錯体形成サイトの存在やこのようなサイトの構造と錯体形成量の関係を直接扱った例は少ない. とくに, 放射性廃棄物処分で問題となるような極低濃度の金属イオンに対しては, 親和性の高いサイトのみが優先的に錯体形成に寄与することが想定されるため, 微視的な錯体形成サイトに関する知見が重要となる. 斉藤ら [17, 18] は, 代表的な腐植物質であるフミン酸 (Humic Acid, HA) と UO_2^{2+} との錯体形成を, HA 自体の蛍光のクエンチング現象を利用して評価し, 低分子量の HA フラクシオン中に UO_2^{2+} によって異なるクエンチングを受ける複数の錯体形成サイトの存在を報告している.

本研究は, 単に限外ろ過法によって HA- UO_2^{2+} 間の錯体形成のバルク量としての安定度定数を評価することにとどまらず, HA の官能基分布の不均質性, あるいは官能基周囲の異なる構造による立体効果も含めた複数の錯体形成サイトの存在に基づく錯体形成の評価を行うことを目的とした研究の一端である. とくに, HA の構造が分子量によって異なることから [1], Gel Permeation Chromatography (GPC) を用いて HA の分画を行い, 得られたフラクションと UO_2^{2+} の錯体形成量の評価を行った. また, 得られた結

Evaluation of the complexation between UO_2^{2+} and humic acid by ultrafiltration: effects of the heterogeneity of the molecular weight and structure, by Takumi Saito (takumi@flanker.q.t. u-tokyo.ac.jp), Shinya Nagasaki, Satoru Tanaka.

*1 東京大学大学院工学系研究科システム量子工学専攻 Department of Quantum Engineering and Systems Science, Graduate school of Engineering, The University of Tokyo
〒113-0032 東京都文京区本郷 7-3-1

*2 東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学専攻 Institute of Environmental Studies, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo
〒113-0032 東京都文京区本郷 7-3-1

果とクエンチング実験の結果との比較から、錯体形成サイトの分類およびその量的な比較を行った。

2 実験方法

2.1 HA の精製と分画

すべての実験において、純水は Milli-Q water (日本ミリポア社) を、試薬はとくに断らない限り和光純薬の特級のものを使用した。

HA は Aldrich 社から購入したものを、Kim ら[19]の方法に基づいて精製後、Shephadex G-50 (Amersham Pharmacia Biotec. Co.) を充填したカラムを用いて分画を行った[18]。得られたクロマトグラムの一例を Fig. 1 に示した。GPC では、早く溶出するフラクションほど、高い分子量を有していることから、本実験で得られた3つのフラクションの分子量は、 $F_a > F_b > F_c$ である。これらのフラクションと未分画の HA に対して、酸塩基滴定によりプロトン交換容量の評価[19]および島津社製 FTIR-8400 を用いた IR 測定 (KBr 錠剤法) による官能基特性の評価を行った。

2.2 錯体形成実験

実験はすべてバッチ法で行った。HA およびそのフラクション 20mg を 0.1M NaOH 10ml に完全に溶解させ、メスフラスコを用いて全量を 50ml とし、さらに、この溶液 10ml を分取し、200ml のメスフラスコを用いて濃度 20mg/l となるよう希釈した。その際、イオン強度が 0.1M となるように NaClO₄ を添加し、マイクロピペッターによって微量の HClO₄ と NaOH を添加して、pH を 4.00 ± 0.02 に調整した。UO₂²⁺ 溶液は 0.2M の原液を適宜希釈し、濃度 5×10^{-6} , 5×10^{-5} , 4×10^{-5} M の溶液を調整した。これらの溶液は HA の場合と

同様にイオン強度を 0.1M (NaClO₄) に、pH を 4.00 ± 0.02 に調整した。

調整した HA あるいはそのフラクション溶液 5ml を 15ml の蓋付き試験管に分取し、UO₂²⁺ 溶液を加えた後、pH = 4.00 ± 0.02 に調整した 0.1M NaClO₄ 溶液を添加して、最終的に HA およびそのフラクションの濃度 10mg/l, UO₂²⁺ 濃度が未分画の HA に関しては $5 \times 10^{-7} \sim 2 \times 10^{-5}$ M, HA フラクションに関しては $1 \times 10^{-6} \sim 2 \times 10^{-5}$ M の試料を各 UO₂²⁺ 濃度ごとに 3 本ずつ調整した。また、UO₂²⁺ を添加していないブランク試料も同様に調整した。すべての試料の pH を、 4.00 ± 0.02 に再度調整した後、25°C に設定した恒温振とう機で 24 時間振とうした。

HA 錯体とフリーの UO₂²⁺ を分離する方法として、遠心限外ろ過を行った。限外ろ過フィルターユニットは、分画分子量 3000 のセントリコン YM-3 (日本ミリポア社) を使用し、遠心機は ALLEGRA 21R (ベックマン・コールター株式会社) に C1015 ローターを装着したものをを使用した。一般的に、限外ろ過メンブレンからはグリセリンなどの不純物が溶出することが知られており、この影響を最小限に抑えるために、予め、0.1M NaClO₄ (4.00 ± 0.02) 溶液 1ml をフィルターユニットに入れ、7400×g の加速度で 45 分間遠心機にかけることで、ユニットの洗浄を行った[20]。また、既往の研究から、UO₂²⁺ の一部がメンブレンに保持される現象が報告されていることから、UO₂²⁺ のメンブレンに対する透過率を評価するための予備実験を行った[10]。初期濃度 $10^{-7} \sim 10^{-5}$ M の範囲の UO₂²⁺ 溶液を洗浄済みフィルターユニットに入れ、7400×g で 90 分間遠心分離を行い、ろ液中の UO₂²⁺ 濃度測定を行った結果、透過した UO₂²⁺ の割合は本実験での濃度範囲で 95.6%、つまり透過率として 0.956 という値が得られた。そこで、実試料においては、UO₂²⁺-HA 溶液 2.3ml を洗浄済みフィルターユニットに入れ、7400×g の加速度で 90 分間遠心機分離した後、ろ液中の UO₂²⁺ 濃度を測定し、上で得られた透過率で割ることで錯体形成していないフリーの UO₂²⁺ 濃度を得た。また、HA およびその錯体がメンブレンを透過することも考えられるが、UV/Vis 測定による評価からその寄与は数%程度であり、最終的に得られる logK の値に系統的な影響を及ぼさないとして評価を行った。

このようにして得られた錯体を形成していないフリーの UO₂²⁺ 濃度から、Kim, Czerwinski ら[21]によって提唱された Loading Capacity モデル (Metal Ion Charge Neutralization Model, LC モデル) を用いて、錯体形成の安定度定数 logK と錯体形成に寄与しうる最大の配位子の割合である LC の評価を行った。このモデルでは、プロトン交換可能な官能基が不均質に分布した構造を有するフミン酸の錯体形成反応に対して、Loading Capacity と呼ばれる規格化因子を導入することで、logK を実験条件に依存しない量として扱うことができ、異なる実験方法・条件に

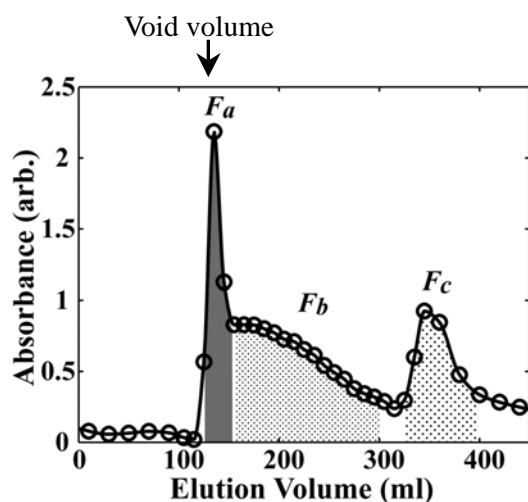
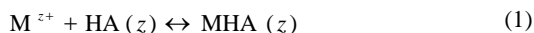


Fig.1 Gel permeation chromatogram of humic acid. Column size: 26 mm i.d. × 700 mm height; 10 ml aliquot of 1g/l HA; eluent: 1×10^{-3} M phosphate buffer (pH = 8); flow rate: 1 ml/min; UV detection wavelength: 254nm. The void volume was determined by the elution peak of Blue Dextran (2×10^5 Da).

において得られた値を相互に比較することが可能となる。以下、このモデルの概略を説明する。

LC モデルでは、錯体形成反応は電荷 $z+$ を有する金属イオン M^{z+} が自身の電荷と同数のプロトン交換サイトを占有する電荷中性化プロセスとして記述される。



ここで、1 個の金属イオンの電荷を中性化するのに必要とされる錯形成サイトは単一の HA 上にあるとして、1:1 の反応が仮定されている。式(1)に基づいて、錯体形成の安定度定数は以下のように定義される。

$$K = \frac{[\text{MHA}(z)]}{[\text{M}^{z+}][\text{HA}(z)]_f} \quad (2)$$

ここで、 $[\text{MHA}(z)]$ は金属イオンのフミン酸錯体の濃度を、 $[\text{M}^{z+}]$ 、 $[\text{HA}(z)]_f$ はそれぞれ錯体形成していない金属イオン濃度および HA 濃度を表している。本実験においては、遠心限外ろ過によって得られたろ液中の UO_2^{2+} 濃度から $[\text{M}^{z+}]$ を決定し、その値と初期添加の UO_2^{2+} 濃度との差から $[\text{HA}(z)]_f$ が決定される。また、 $[\text{HA}(z)]_f$ は式(1)の説明からも明らかのように、プロトン交換サイトの量を反映したものであって、次式のように定義された実効的な HA 濃度を用いる。

$$[\text{HA}(z)]_f = \frac{(\text{HA})(\text{PEC})}{z} \quad (3)$$

ここで、(HA) は g/l 単位で表した HA 濃度であり、(PEC) は滴定などの手法で得られた HA のプロトン交換容量 (meq/g HA) である。このようにして、HA 濃度を mol/l 単位で表すことが可能となる。HA は高分子電解質としての性質を持っており、中性もしくは弱酸性領域において、不均質に分布したそのプロトン交換サイトは部分的にしかプロトン解離していない。また、HA が複雑な 3 次元構造を有しているために、金属イオンが接近できる官能基の数は制限される。従って、金属イオンが HA のプロトン交換サイトと結合できる割合は、pH やイオン強度、金属イオンの電荷、HA の起源に依存することとなる。これらの点は、構造の単純な低分子量の配位子との錯体形成の場合と大きく異なり、HA が関与する錯体形成反応の解析を複雑にしている。そこで、錯体形成に寄与しうる最大のサイトの割合である Loading Capacity(LC)を以下の式のように表し、このパラメータに HA の不均質性の効果をもたせることとする。

$$LC = \frac{[\text{MHA}(z)]_m}{[\text{HA}(z)]_f} \quad (4)$$

ここで、 $[\text{MHA}(z)]_m$ は形成しうる最大の錯体の濃度である。この LC を用いて、式(2)中の $[\text{HA}(z)]_f$ は次の式で表すことができる。

$$[\text{HA}(z)]_f = [\text{HA}(z)]_f LC - [\text{MHA}(z)] \quad (5)$$

式(2)、(5)から、安定度定数 K は以下の式で表すことがで

きる。

$$K = \frac{[\text{MHA}(z)]}{[\text{M}^{z+}][\text{HA}(z)]_f LC - [\text{MHA}(z)]} \quad (6)$$

LC は式(6)を線形化した次式を用いて決定される。

$$F = \frac{[\text{M}^{z+}][\text{HA}(z)]_f}{[\text{MHA}(z)]} \quad (7)$$

$$[\text{M}^{z+}] = LC \times F - \frac{1}{K} \quad (8)$$

2.3 UO_2^{2+} 濃度測定

ろ液中の UO_2^{2+} 濃度測定には、ランタノイドやアクチノイドに対する低濃度での定量測定に使用される発色試薬 Arsenazo-III (Aldrich Co.) による吸光度測定を利用した[22, 23]。Arsenazo-III (Arz) は、U(IV) と強酸溶液中 (> 3M) で、U(VI) と酸性溶液中 (pH = 1 ~ 3) で錯体を形成し、652nm における吸光度の増加を示すことから、予め、既知の UO_2^{2+} 濃度溶液に対する検量線を作成することで、未知の UO_2^{2+} 溶液の濃度測定が可能となる。

予備実験の結果、 10^{-7}M までの UO_2^{2+} 濃度の測定が可能であることが明らかになった。実試料の測定では、遠心限外ろ過によって得られた各試料のろ液から 2ml 分取し、10ml 試験管に移した後、校正済み濃度 $2.88 \times 10^{-5}\text{M}$ の Arz 溶液 (pH = 1.60 ± 0.02 , イオン強度 0.1M NaClO_4) 2ml 添加し、島津製 UV-3100 吸光度計を用いた UV/Vis 測定を行い、652nm における吸光度から、 UO_2^{2+} 濃度の評価を行った。ここで、 UO_2^{2+} 濃度の検量線は一連の測定の前には毎回作成することとした。

3 実験結果と考察

3.1 HA フラクシオンの特性評価

酸塩基滴定より求めた HA の PEC は、未分画の HA に対して 6.24 meq/g、 F_a 、 F_b 、 F_c に対しては、それぞれ、5.97、6.20、5.99 meq/g であった。GPC より得られた HA フラクシオンの中では、 F_b の PEC が最も大きく、この値はフミン酸のものに対応していることがわかった。これは Fig.1 のクロマトグラムからわかるように、このフラクションのフミン酸中に占める割合が大きいことに起因すると考えられる。しかし、他のフラクション (F_a 、 F_c) の PEC も 6 程度であり、 F_b と比べて大きな差が無いことがわかった。

未分画の HA とそのフラクションの IR スペクトルを Fig.2 に示す。HA 中には、赤外活性な官能基や構造が多数存在し、スペクトルはそれらの吸収が重なり合った複雑な形状をしており、特に、本研究において得られた未分画の HA の IR スペクトルは、既往の研究において精製済み Aldrich HA に関して得られている IR スペクトルと同様であった[19]。Table 1 に、HA の主要な赤外吸収バンドの帰属をまとめた[24]。3420-3380 cm^{-1} の吸収バンド (Peak1)

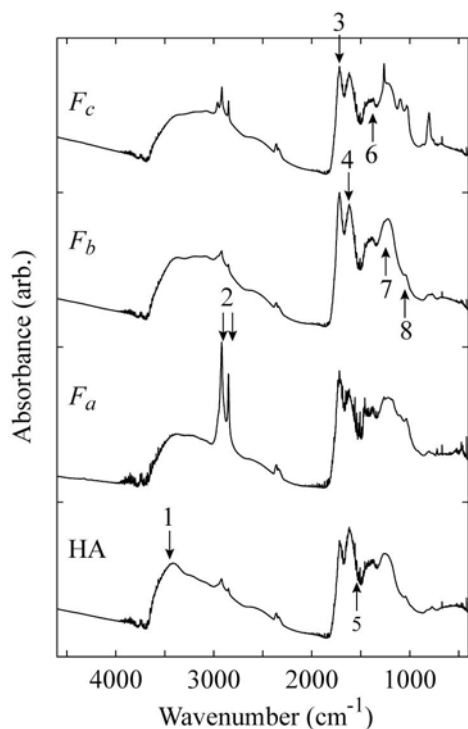


Fig. 2. IR spectra of HA and its fractions. KBr method: 3mg HAs in 300mg IR-grade KBr.

は O-H あるいは N-H の伸縮振動に、 $3000-2920\text{cm}^{-1}$ の鋭い吸収ピーク (Peak2) はメチル基 (-CH₃) およびエチル基 (-CH₂) の伸縮振動に起因している。 $1730-1720\text{cm}^{-1}$ の吸収ピーク (Peak3) はカルボキシル基 (-COOH)、ケトン (>C=O)、脂肪族アルデヒドの C=O 伸縮振動によるもので、とくに、HA においてはその大部分がカルボキシル基に由来していると考えられる。 $1650-1630\text{cm}^{-1}$ の吸収ピーク (Peak4) は、主にカルボキシレート (-COO-) の O-C-O 非対称伸縮振動に帰属され、一部、ベンゼン環の C=C 伸縮振動、芳香族アルデヒド・ケトンの C=O 伸縮振動に帰属される。また、 $1560-1540\text{cm}^{-1}$ の吸収ピーク (Peak5) はベンゼン環の C=C 結合やアミドの N-H 変角振動に、 $1420-1320\text{cm}^{-1}$ の吸収バンド (Peak6) は脂肪鎖の C-H 結合の変角振動および O-H 結合の変角振動、カルボキシレートの O-C-O 結合

の原子価振動に、 $1225-1175\text{cm}^{-1}$ の吸収ピーク (Peak7) は、CO-Aryl 基の C=O 伸縮振動に、 $1050-1020\text{cm}^{-1}$ の吸収ピーク (Peak8) は C-OH および C-OR に、それぞれ帰属される。

ここで、GPC によって得られた 3 つのフラクションの IR スペクトルを見てみると、高分子量のフラクションである F_a のスペクトルには強い脂肪族由来のピーク (Peak2) が存在し、このフラクションが他に比べて脂肪鎖に富んでいることがわかった。また、すべてのフラクションにおいて、カルボキシル基に特徴的なピーク (Peak3, 4, 6) が存在していることから、カルボキシル基はすべてのフラクションに共通して含まれていることが確認された。さらに、 F_c のスペクトルでは、フェノールおよびエーテル由来の Peak8 が大きいことがわかった。また、同スペクトル中の 800cm^{-1} に存在する鋭いピークは置換されたベンゼンに起因するものと考えられた。これらの結果から、高分子量のフラクションは脂肪鎖に富み、一方、低分子量のフラクションは芳香性が高く、また、 UO_2^{2+} との錯体形成に寄与するカルボキシル基は全てのフラクションに含まれていることが結論付けられる。

3.2 遠心限外ろ過法による UO_2^{2+} -フミン酸錯体形成量評価

pH = 4.00 ± 0.02 、イオン強度 0.1M の条件下で、 $2.74 \times 10^{-5}\text{M}$ のプロトン交換サイトを持つ HA に Table 2 に挙げた濃度範囲で UO_2^{2+} を添加して、遠心限外ろ過法によって錯体形成量の評価を行った。ろ液中の UO_2^{2+} 濃度を測定し、メンブレンフィルタの透過率による補正を行って得られたフリーの UO_2^{2+} 濃度は Table 2 に示した通りであった。これらの値と全 UO_2^{2+} 濃度の差から、錯体形成している UO_2^{2+} 濃度の評価を行い、式(7)、(8)に従って、LC の評価を行った結果を Fig. 3 (i) に示した。LC = 0.238 が得られ、この LC を用いてフリーのフミン酸濃度の計算を行い、式(6)を用いて評価した錯体形成の安定度定数 ($\log K$) を Table 2 に示した。これらの $\log K$ の平均値は 6.25 ± 0.18 であり、この値は pH = 4 における HA と UO_2^{2+} の錯体形成に関して、一般的に報告されている値 ($\log K = 6.13 \sim 6.75$) と一致して

Table 1 The assignment of the major absorption bands in the IR spectrum of HA^[24].

Index	Wavenumber (cm ⁻¹)	Assignment
1	3420 - 3380	OH or NH stretching
2	3000 - 2920	CH stretching in CH ₂ or CH ₃ groups
3	1730 - 1720	C=O stretching in COOH group etc.
4	1650 - 1630	antisymmetric valence O-C-O bond vibrations in COO ⁻
5	1560 - 1540	aromatic C=C bond
6	1420 - 1320	deformation aliphatic CH bond or OH bond vibration, valence vibration of CO bond of phenols or symmetric valence vibrations O-C-O bond in COO ⁻
7	1225 - 1175	C=O stretching in CO-Aryl groups or CO stretching or COH deformation vibrations in -COOH
8	1050 - 1020	C-OH and C-OR groups

Table 2 The evaluation of $\log K$ of the complexation between HA and UO_2^{2+} : $LC = 0.239$

$[\text{HA}(\text{II})]_{\text{tot}}$ (mmol/l)	$[\text{UO}_2^{2+}]_{\text{tot}}$ (mmol/l)	$[\text{UO}_2^{2+}]$ (mmol/l)	$[\text{UO}_2\text{HA}(\text{II})]$ (mmol/l)	$[\text{HA}(\text{II})]_{\text{free}}$ (mmol/l)	$\log K$ (1/mol)
27.4	0.50	0.02	0.48	6.02	6.61
27.4	1.00	0.09	0.91	5.58	6.28
27.4	2.00	0.21	1.79	4.71	6.26
27.4	2.50	0.35	2.15	4.35	6.15
27.4	4.00	0.87	3.13	3.36	6.03
27.4	6.00	1.56	4.44	2.06	6.14
27.4	8.00	2.69	5.31	1.19	6.22
27.4	10.00	4.02	5.98	0.51	6.46
27.4	20.00	13.85	6.15	0.35	6.11

Mean value of $\log K = 6.25 \pm 0.18$

いることがわかった[10, 13, 25]. また, Fig. 3 (ii)は HA 中の全プロトン交換サイト濃度で規格化した UO_2^{2+} -HA 錯体濃度を同じように規格化した全 UO_2^{2+} 濃度に対してプロットしたグラフであり, 添加 UO_2^{2+} 量の増加に従って, HA- UO_2^{2+} の形成量が LC に対して飽和していく様子が確認された.

3.3 遠心限外ろ過法による UO_2^{2+} - F_a , F_b , F_c 錯体形成量評価

HA と同様の実験を分子量の異なる 3 つのフラクション (F_a , F_b , F_c) についても行った. 測定結果を, それぞれ Table 3, 4, 5 にまとめた. また, 式(7), (8)による LC の評価と全プロトン交換サイト濃度で規格化した UO_2^{2+} -HA フラクション錯体濃度を同じように規格化した全 UO_2^{2+} 濃度に対してプロットしたグラフを, それぞれ Fig. 4, 5, 6 の (i), (ii)に示した. 最も分子量の高いフラクション F_a に関

しては $LC = 0.241$, $\log K = 6.07 \pm 0.35$, F_b に関しては $LC = 0.250$, $\log K = 6.20 \pm 0.14$, 最も分子量の小さいフラクション F_c については $LC = 0.290$, $\log K = 6.07 \pm 0.09$ であった. これらの値の比較から, 安定度定数については, F_b が最も大きく, この値は HA について得られた値 (Table 2) に対応していることがわかった. これは, Fig. 1 の GPC クロマトグラムから明らかなように, このフラクションが HA 中に最も多く含まれているため, 未分画の HA に関して得られた巨視的な量である $\log K$ に対して, このフラクションの寄与が最も大きいことによるものと考えられた. しかし, フラクション間の相互作用によって未分画の HA の $\log K$ が影響を受けることも報告されていることから[26], 今後, HA の $\log K$ に対する各フラクションの定量的な寄与に関して詳細に検討していく必要がある. また, 他のフラクションの $\log K$ についても, F_b のものと比べてそれほど大きな差は無く, 限外ろ過で得られる平均量としての安定度定数

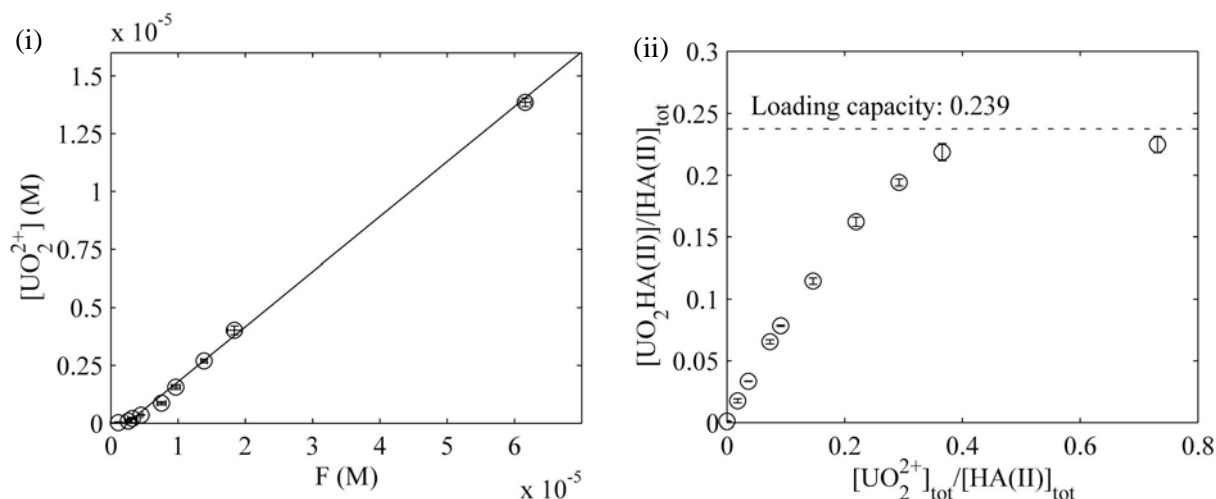
**Fig. 3.** Evaluation of LC of the complexation between HA and UO_2^{2+}

Table 3 The evaluation of logK of the complexation between F_a and UO_2^{2+} : $LC = 0.241$

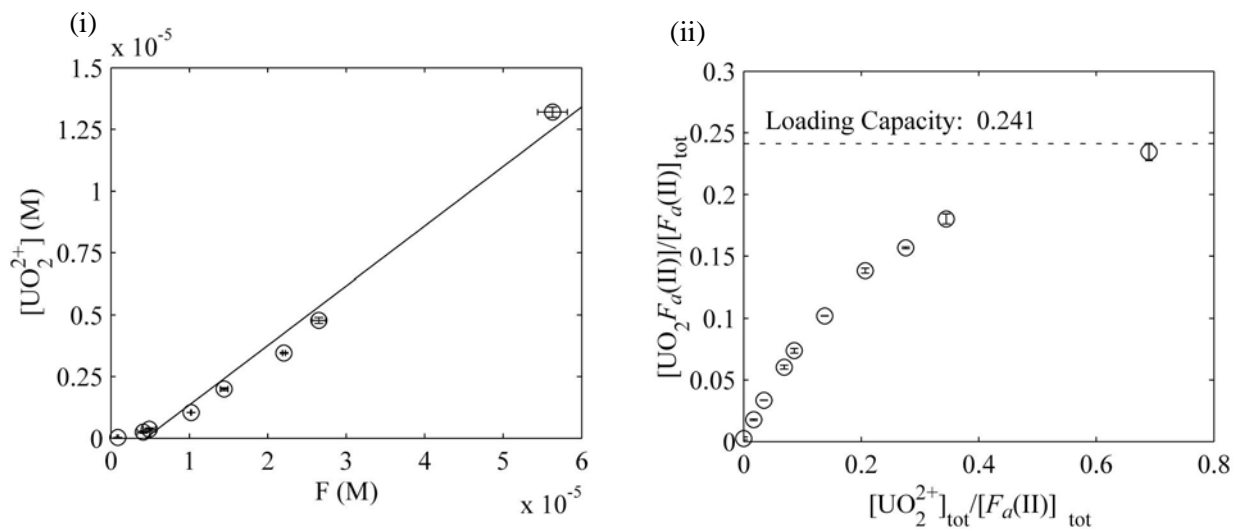
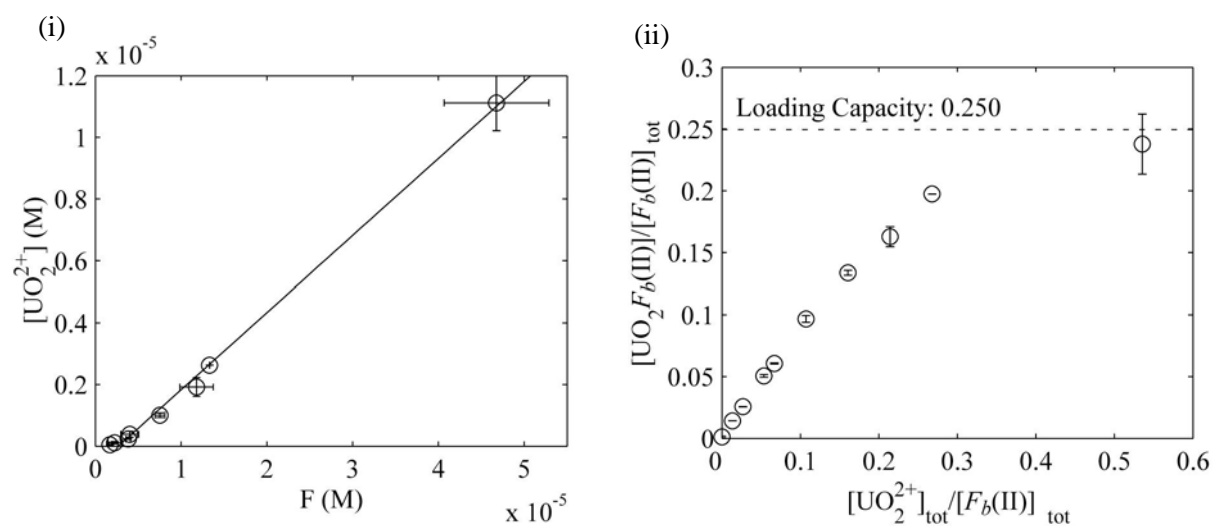
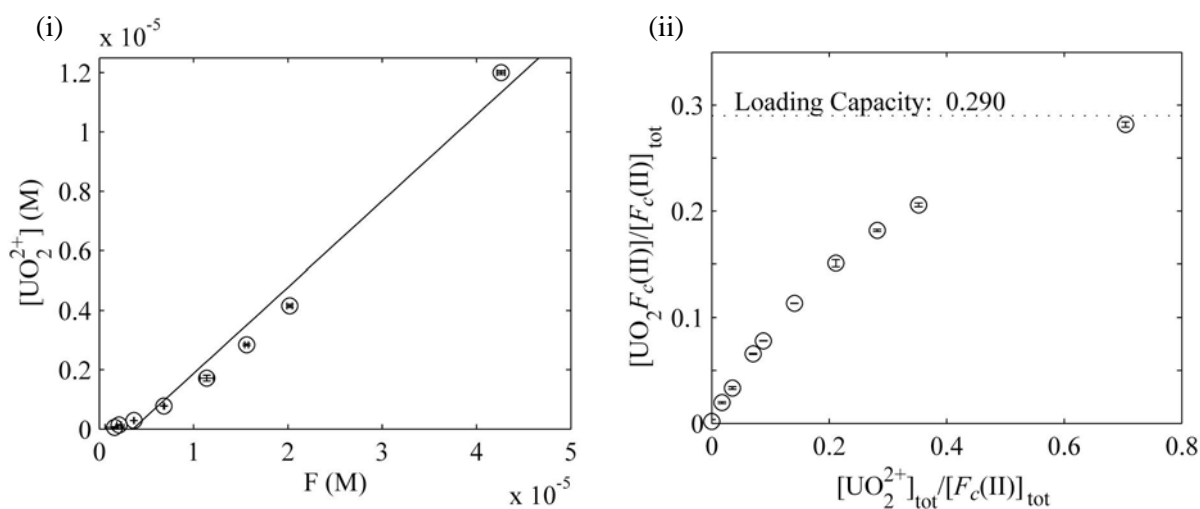
$[F_a(II)]_{tot}$ ($\mu\text{mol/l}$)	$[UO_2^{2+}]_{tot}$ ($\mu\text{mol/l}$)	$[UO_2^{2+}]$ ($\mu\text{mol/l}$)	$[UO_2F_a(II)]$ ($\mu\text{mol/l}$)	$[F_a(II)]_{free}$ ($\mu\text{mol/l}$)	logK (1/mol)
29.0	1.00	0.03	0.97	6.02	6.74
29.0	2.00	0.25	1.75	5.24	6.13
29.0	2.50	0.36	2.14	4.86	6.08
29.0	4.00	1.04	2.96	4.04	5.85
29.0	6.00	1.99	4.01	2.99	5.83
29.0	8.00	3.46	4.54	2.45	5.73
29.0	10.00	4.78	5.22	1.77	5.79
29.0	20.00	13.20	6.80	0.19	6.42
Mean value of logK = 6.07 ± 0.35					

Table 4 The evaluation of logK of the complexation between F_b and UO_2^{2+} : $LC = 0.250$

$[F_b(II)]_{tot}$ ($\mu\text{mol/l}$)	$[UO_2^{2+}]_{tot}$ ($\mu\text{mol/l}$)	$[UO_2^{2+}]$ ($\mu\text{mol/l}$)	$[UO_2F_b(II)]$ ($\mu\text{mol/l}$)	$[F_b(II)]_{free}$ ($\mu\text{mol/l}$)	logK (1/mol)
37.4	1.00	0.04	0.96	8.36	6.42
37.4	2.00	0.11	1.89	7.43	6.35
37.4	2.50	0.23	2.27	7.05	6.14
37.4	4.00	0.39	3.61	5.71	6.21
37.4	6.00	1.01	4.99	4.33	6.06
37.4	8.00	1.92	6.08	3.24	5.99
37.4	10.00	2.63	7.37	1.95	6.16
37.4	20.00	11.12	8.88	0.44	6.26
Mean value of logK = 6.20 ± 0.14					

Table 5 The evaluation of logK of the complexation between F_c and UO_2^{2+} : $LC = 0.290$

$[F_c(II)]_{tot}$ (mmol/l)	$[UO_2^{2+}]_{tot}$ (mmol/l)	$[UO_2^{2+}]$ (mmol/l)	$[UO_2F_c(II)]$ (mmol/l)	$[F_c(II)]_{free}$ (mmol/l)	logK (1/mol)
28.4	1.00	0.05	0.95	7.29	6.38
28.4	2.00	0.14	1.86	6.37	6.33
28.4	2.50	0.29	2.21	6.02	6.11
28.4	4.00	0.78	3.22	5.01	5.92
28.4	6.00	1.72	4.28	3.96	5.80
28.4	8.00	2.84	5.16	3.08	5.77
28.4	10.00	4.16	5.84	2.39	5.77
28.4	20.00	12.00	8.00	0.24	6.45
Mean value of logK = 6.07 ± 0.29					

Fig. 4 Evaluation of LC of the complexation between F_a and UO_2^{2+} Fig. 5 Evaluation of LC of the complexation between F_b and UO_2^{2+} Fig. 6 Evaluation of LC of the complexation between F_c and UO_2^{2+}

はフラクションによって大きく異なっていないことがわかった。一方、*LC* については、 F_c が最も高く 29%であった。この結果は、高分子量のフラクションが脂肪鎖を多く含み、3 次的に複雑な構造をしているのに対して、低分子量のフラクションは芳香環とカルボキシル基などの官能基に富んだ構造をしているため、 UO_2^{2+} が接近できる錯体形成サイトの割合が大きいことによると考えられた[1, 24, 27]。また、未分画 HA の *LC* は 0.239 であり、 F_a , F_b , F_c のいずれの *LC* よりも小さく、これらの算術平均では表しえないことがわかった。福岡ら[26]は分画によって得た HA フラクションを再び混合することで作成した試料の UV/Vis スペクトル、蛍光スペクトル、IR スペクトル、 Cu^{2+} に対する錯体形成能、そして GPC における溶出挙動を調べ、これら結果を各フラクションの算術和と比較した結果として、フラクション間での分子間水素結合などの分子間相互作用や電荷移動機構による分子間の凝集の効果によって、錯体形成サイトが遮蔽される可能性を報告している。したがって、上述の *LC* における相違は、このような分子間相互作用の影響を反映したものであると考えられる。しかし、現段階では、各フラクションがフミン酸中に占める割合は明確でなく、このような分子間相互作用や凝集の効果の定量的な評価は行えていない。したがって、今後、3 つのフラクションの HA 中に占める量的な情報を評価すると共に、ある一定の割合でこれらのフラクションを混合したサンプルを作成し、その性質がフラクションの算術和とどの程度異なるのか評価する必要があるといえる。

3.4 錯体形成パラメータの比較: クエンチング実験と遠心限外ろ過実験

HA は様々な官能基や芳香環などの共役二重結合系（蛍

光団) を有しており、可視光を吸収することで蛍光を発する。この HA の蛍光は金属イオンとの錯体形成によってクエンチングまたはエンハンストされる。とくに、 UO_2^{2+} との錯体形成の場合、HA の蛍光団は不活性化され、蛍光のクエンチングが起こる。このクエンチング挙動は波長によって異なり、Aldrich HA では UO_2^{2+} との錯体形成によって異なるクエンチングを受ける成分（クエンチングサイト）が存在する[17]。また、このようなクエンチングサイトの大部分は低分子量のフラクション F_c に含まれていることが報告されている[18]。

遠心限外ろ過法によって得られた錯体形成パラメータを、クエンチング実験によって未分画の HA および F_c に対して評価された錯体形成パラメータ[17, 18]と共に Table 6 にまとめた。ここで、*LC* との比較を行うために、クエンチング法における各成分のサイト濃度の合計を、プロトン交換容量より式(3)を用いて計算した全フミン酸濃度に占める割合に換算を行っている。Table 6 より、 UO_2^{2+} と錯体を形成するフミン酸中のサイトの中で、約半数が蛍光のクエンチングを伴うサイトであり、これは低分子量のフラクション F_c にも含まれているとみなせる。残りのサイトはフミン酸の蛍光に関与しないサイトであり、*LC* の比較から、このようなタイプのサイトは F_a , F_b の全サイト、そして、 F_c のサイトの約半数に対応していると考えられる。また、安定度定数の比較から、後者のタイプのサイトはクエンチングサイトよりも安定度定数で 1 桁ほど安定な錯体を形成するサイトであることがわかった。しかし、Fig. 1 の GPC クロマトグラムに基づいて 3 つのフラクションの量を評価した場合、 F_c に含まれるクエンチングサイトの寄与は明らかにフミン酸濃度の *LC* の 1 割程度であり、クエンチング実験の結果と異なる。この相違が上述の分子間相互作用の

Table 6 The comparison of the complexing parameters between the fluorescence quenching[17, 18] and ultracentrifuge experiments

	logK		LC	
	$\log K_{app,1}$	$\log K_{app,2}$	C_{L1} (mol/l)	C_{L2} (mol/l)
<i>Fluorescence quenching</i>				
Humic acid	5.07 (0.09)	4.70 (0.20)	0.128	2.24 (0.09) 1.28 (0.04)
F_c	5.05 (0.14)	4.58 (0.28)	0.141	1.27 (0.09) 2.74 (0.13)
<i>Ultrafiltration</i>				
Humic acid	6.25 (0.18)		0.239	
F_a	6.07 (0.35)		0.241	
F_b	6.20 (0.14)		0.250	
F_c	6.07 (0.29)		0.290	

効果によるものと考え、この効果は蛍光に関与しない錯体形成サイトに大きな影響を及ぼしていることが示唆される。

4 結言

GPCによって得られたHAフラクションと UO_2^{2+} の錯体形成量を遠心限外ろ過法によって測定し、LCモデルを用いて錯体形成パラメータを評価することで、Aldrich HAにおける分子量や分子構造の相違が、HA中のプロトン交換可能なサイトのうち UO_2^{2+} との錯体形成に寄与するサイトの割合であり、HAの不均質性を反映しているLCに大きく現れていることが分かった。とくに、低分子量のフラクションにおいてLCが大きく、このフラクションにおいて、 UO_2^{2+} が接近できる錯体形成サイトの割合が大きいことが示唆された。また、蛍光クエンチング法によって得られた結果との比較から、全てのフラクションに、錯体形成によってHAの蛍光がクエンチングを受けないようなサイト、つまり、HAの蛍光に関与しないサイトが存在し、このようなサイトがより安定な錯体を形成するサイトに対応していることが分かった。このように、HAの微視的な構造や分子量の相違に基づく錯体形成の評価は、起源の異なる腐植物質間での錯体形成挙動の相違や実環境における様々な土壌コロイド共存下での腐植物質の錯体形成能を理解するために必要不可欠であり、今後、詳細に研究を行っていく必要がある。

参考文献

- [1] Schnizer, M. and Khan, S. U.: *Humic Substances in the Environment*, Marcel Dekker, Inc., New York (1972).
- [2] Ziechmann, W.: Evaluation of Structural Models from Consideration of Physical and Chemical Properties. In: *Humic Substances and their Role in the Environment* (F. H. Frimmel, R. F. Christian, eds.). John Wiley & Sons, New York (1988).
- [3] Choppin, G. R.: The Role of Natural Organics in Radionuclide Migration in Natural Aquifer Systems. *Radiochim. Acta* **58/59**, 113-119 (1992).
- [4] McCarthy, J. F., Czerwinski, K. R., Sanford, W. E., Jardine, P. M. and Marsh, J. D.: Mobilization of transuranic radionuclides from disposal trenches by natural organic matter. *J. Contam. Hydrol.* **30**, 49-77 (1998).
- [5] Murphy, R. J., Lenhart, J., Honeyman, B. D.: The sorption of thorium (IV) and uranium (VI) to hematite in the presence of natural organic matter. *Colloid and Surface A* **157**, 47-62 (1999).
- [6] Zeh, P., Kim, J. I., Marquardt, C. M., Artinger, R.: The Reduction of Np(V) in Groundwater Rich in Humic Substances. *Radiochim. Acta* **87**, 23-28 (1999).
- [7] Benes, P., Kratzer, K., Vlckova, S., Sebestova, E.: Adsorption of Uranium on Clay and the Effect of Humic Substances. *Radiochim. Acta* **82**, 367-373 (1998).
- [8] Zuyi, T., Taiwei, C., Jinzhou, D., XiongXin, D. and Yingjie, G.: Effect of fulvic acids on sorption of U(VI), Zn, Yb, I and Se(IV) onto oxides of aluminum, iron and silicon. *Applied Geochemistry* **15**, 133-139 (2000).
- [9] Wittbrodt, P. R., Palmer, C. D.: Reduction of Cr(VI) in the Presence of Excess Soil Fulvic Acid. *Environ. Sci. Technol.* **29**, 255-263 (1995).
- [10] Czerwinski, K. R., Buckau, G., Scherbaum, F., Kim, J. I.: Complexation of the Uranyl Ion with Aquatic Humic Acid. *Radiochim. Acta* **65**, 111-119 (1994).
- [11] Kim, J. I., Rhee, D. S., Wimme, H., Buckau, G. and Klenze, R.: Complexation of Trivalent Actinides Ions (Am^{3+} , Cm^{3+}) with Humic Acid: A Comparison of Different Experimental Methods. *Radiochim. Acta* **62**, 35-43 (1993).
- [12] Dierckx, A., Maes, A. and Vancluysen, J.: Mixed Complex Formation of Eu^{3+} with Humic Acid and Competing Ligand. *Radiochim. Acta* **66/67**, 149-156 (1994).
- [13] Lenhart, J. J., Cabaniss, S. E., MacCarthy, P., Honeyman, B. D.: Uranium(VI) complexation with citric, humic and fulvic acid. *Radiochim. Acta* **88**, 345-353 (2000).
- [14] Benedetti, M. F., Milne, C. J., Kinniburgh, D. G., Van Riemsdijk, W. H. and Koopal, L. K.: Metal Ion Binding to Humic Substances: Application of the Non-Ideal Competitive Adsorption Model. *Environ. Sci. Technol.* **29**, 446-457 (1995).
- [15] Lubal, P., Fetsch, D., Široký, D., Lublová, M., Šenkýr and Havel, J.: Potentiometric and spectroscopic study of uranyl complexation with humic acids. *Talanta* **51**, 977-991 (2000).
- [16] Christl, I., Chris, J. M., Kinniburgh, D. G. and Kretzschmar, R.: Relating Ion Binding by Fulvic and Humic Acids to Chemical Composition and Molecular Size. 2. Metal Binding. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 2512-2517 (2001).
- [17] Saito, T., Nagasaki, S. and Tanaka, S.: Evaluation of the complexation behavior between humic acid and UO_2^{2+} with fluorescence spectroscopy and its mixture analysis. *Radiochim. Acta* **90**, 27-33 (2001).
- [18] Saito, T., Nagasaki, S. and Tanaka, S.: Molecular Fluorescence Spectroscopy and Mixture Analysis for the Evaluation of the Complexation between Humic Acid and UO_2^{2+} . *Radiochim. Acta* (in press).
- [19] Kim, J. I., Buckau, G., Duschner, H., Pasros, N.: Characterization of humic and fulvic acids from Gorleben groundwater. *Fresenius J. Anal. Chem.* **338**, 245-252 (1990).
- [20] Fujii, T., Fujiwara, K., Yamana, H. and Moriyama, H.: Raman spectroscopic determination of formation constant of uranyl hydrolysis species $(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_2^+$. *J. Alloys and Compounds* **323-324**, 859-863 (2001).

- [21] Kim, J. I. and Czerwinski, K. R.: Complexation of Metal Ion with Humic Acid: Metal Ion Charge Neutralization Model. *Radiochim. Acta.* **73**, 5-10 (1996).
- [22] Rohwer, H., Rheeder N. and Hosten E.: Interactions of uranium and thorium with arsenazo III in an aqueous medium. *Anal. Chim. Acta* **341**, 263-268 (1997).
- [23] Rohwer, H., Collier N. and Hosten E.: Spectrophotometric study of arsenazo III and its interactions with lanthanides. *Anal. Chim. Acta* **314**, 219-223 (1995).
- [24] Fukushima, M., Tanaka, S., Nakamura, H. and Ito, S.: Acid-base characterization of molecular weight fractionated humic acid. *Talanta* **43**, 383-390 (1996).
- [25] Lubal, P., Fetsch, D., Široký, D., Lublová, M., Šenkýr and Havel, J.: Potentiometric and spectroscopic study of uranyl complexation with humic acids. *Talanta* **51**, 977-991 (2000).
- [26] Fukushima, M., Tanaka, S., Nakamura, H., Ito, S., Haraguchi, K. and Ogata, T.: Copper(II) binding abilities of molecular weight fractionated humic acids and their mixtures. *Anal. Chim. Acta.* **322**, 173-185 (1996).
- [27] Shin, H. S., Monsallier, J. M. and Choppin, G. R.: Spectroscopic and chemical characterization of molecular size fractionated humic acid. *Talanta* **50**, 641-647 (1999).