

## 海水中の Fe(II)と Fe(III)の分別定量～さらなる海の豊かさの評価～

高橋 (田中) 美穂

東京海洋大学学術研究院海洋環境科学部門

### 概要

海水中では鉄濃度は極めて低く、2価鉄(Fe(II))と3価の鉄(Fe(III))の分離定量法は難しい。これらの定量方法の確立、測定感度などまだ解決すべき問題がある。海水中の Fe(II)と Fe(III)が定量できれば、海洋などの環境試料の測定のみならず、生体試料の機能の役割の分析にも役に立つと考えられる。海の豊かさを Fe(II)の濃度の高さで評価できれば、海水中の生物に対する活性も評価できると考えた。

そこで、本研究の特徴は、採水した場から、これらの錯体を形成させ、Fe(II)と有機錯体を錯形成させ、そのまま錯体をイオン化させて有機化合物測定用の質量分析計で感度を得ることを考えた。Fe(II)の酸化を防ぐため、安定な Fe(II)-1,10-フェナントロリン錯体を形成するように錯体化した。地下水中の Fe(II)はエレクトロスプレーイオン化質量分析計(ESI-MS)で測定されたが、海水中の Fe(II)の定量は塩類濃度が高いため困難である。Fe(II)の酸化を防ぐため、安定な Fe(II)-phen 錯体を形成するように錯体化した。

その結果、海水中の Fe(II)の定量は塩類濃度が高いため困難である。得られた汽水中(塩分 1%)の Fe(II)濃度は  $0.184 \pm 0.05 \mu\text{M}$  であり、誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)による全 Fe 濃度(total Fe)は  $0.70 \pm 0.05 \mu\text{M}$ 、Fe(II)/total Fe は汽水中の全 Fe の 26%であった。地下水中の Fe(II)濃度は  $0.146 \pm 0.002 \mu\text{M}$ 、total Fe は  $0.23 \pm 0.02 \mu\text{M}$  で、Fe(II)/total Fe は 63%であった。一方、多摩川では、Fe(II)濃度は  $0.230 \pm 0.013 \mu\text{M}$ 、ICP-MS による total Fe は  $0.59 \pm 0.06 \mu\text{M}$ 、Fe(II)/total Fe は 39%が得られた。

植物プランクトンにとって微量栄養素である微量の Fe(II)の存在が不可欠(あるいは必要)であり、一方、Fe(III)は植物プランクトンにとって有毒である。生物への栄養素となる Fe(II)は、海水の豊かさを示す重要なパラメーターとなる。Fe(II)の濃度が予想外に高い結果は、自然の河川水や海水の持続可能な環境がよく維持されていることを示している。

本研究では、HR(high-resolution)-ESI-MS の様々な角度から ESI-MS による Fe(II)の定量の高感度化を目指した。実際に塩を含む天然水試料の測定で同じ汽水域の水の Fe(II)の溶媒抽出の濃縮率を 1:1 と 1:2 とすることで  $0.1763 \pm 0.0176 \mu\text{M}$  の誤差、および 1:1 と 1:3 とすることで  $0.2544 \pm 0.025 \mu\text{M}$  という誤差範囲で再現性の確保も可能になった。今後、3.4%を超える塩濃度の高い海水中の極微量鉄の測定をする上では Fe の状態変化や夾雑物の影響を考えた前処理法の改良を行い、定量法の精度をより高いものにしていく必要がある。

### 1. 研究目的

地球環境においては、鉄(Fe)はイオンとして 2 価(Fe(II))と 3 価(Fe(III))が存在する。鉄は多くの生物にとって欠かすことのできない栄養素である。特に、海水中では鉄濃度は極めて低く、鉄コロイド凝固法で測定

すると  $0.01 \sim 10 \text{ nmol/L}^{1,2)}$ と報告されている。実際には、定量方法の確立、測定感度の問題などまだ解決すべき問題がある。海水や自然水中の鉄の生物学的利用能は、溶解性の高い Fe(II)に依存する<sup>3)</sup>。近年、生物代謝、酸素輸送とミトコンドリアにも、Fe(II)のみが利

用され、Fe(III)はミトコンドリア内部に入れないことが明らかになってきている<sup>4)</sup>。そのため、海洋中の鉄の存在形態や生物利用性を解明することは、海の砂漠化の改善につながり、近年、注目されているブルーカーボンによる二酸化炭素の固定にも役立つと考えた。

海水中の鉄の濃度は0.01~10 nmol/L<sup>1, 2)</sup>と報告されているが、実際にどの程度のFe(II)とFe(III)が存在しているかも明らかにされていない。これは、海水にも貧酸素域など海域による環境の変化、35%の塩が含まれていること、海洋生物が多く存在するため、多種の有機物が含まれ、炭化水素、タンパク質などが鉄イオンの酸化・還元によりにどのように寄与しているかも明らかになっていないことが理由である。さらに海洋底に硫酸還元菌なども生息し、酸化還元が海水中の鉄の分布を複雑にさせている。海水中のFe(II)とFe(III)が定量できれば、Fe(II)の価数別の定量は海洋などの環境試料の測定のみならず、生体試料の機能の役割の分析にも役に立つのではないかと考えられる。したがって、海の豊かさをFe(II)の濃度の高さで評価できれば、海水中の生物に対する活性も評価できると考えた。Linらは、海水中の鉄の測定について総括<sup>2)</sup>している。測定方法の違いにより長短があり、いずれの方法においても海水中の微量鉄濃度を直接、測定するための要件を満たしていない。現在海水中の鉄の定量に用いられる測定法は主に3種ある。

1) 誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)を用いた鉄の定量方法がある。海水の場合には、前処理として塩の排除が必要であり、様々な方法が開発されている<sup>5-11)</sup>。

2) 分光光度法では、高いモル吸光度( $\lambda = 562 \text{ nm}$ )を持つFe(II)-フェロジン((3-(2-ビピリジル)-5,6-ビス(4-フェニルスルホン酸)-1,2,4-トリアジン))錯体が用いられることが多い<sup>12)</sup>。

3) 海水中のFe(II)の濃度を求めるために、ボルタメトリ法も用いられる<sup>13-15)</sup>。船上で(*in situ*による)定量ができ、採水から測定までのFe(II)の酸化を極力防げる点でメリットがある。

これまで海水中のFe(II)とFe(III)の価数別分別の報告としては、オレゴン州とワシントン州沖の極低濃度酸素棚水域の沿岸湧昇の濃度が報告されており、Fe(III)

17.0 ± 3.3 nmol/L および Fe(II) 10 - 25 nmol/L であった。それ以外のFe(II)濃度は報告されていない<sup>15, 16)</sup>。一般に、全鉄の濃度はICP-MSを使用して測定されることが多い。本研究では、エレクトロスプレーイオン化質量分析計(ESI-MS)を用いて地下水および汽水中のFe(II)濃度を測定する方法を検討した。Fe(II)と安定な錯体を形成する試薬としては、1,10-phenanthroline (phen)やFerrozine, 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine, 2,2-bipyridineなどのFe(II)と着色した錯体を形成する複素環アミンを利用した比色分析法(吸光光度法)がある。当然、吸光光度法だけでは、海水中のFe(II)の濃度を得るためには感度が不足している。本研究の特徴は、採水した場から、これら錯体を形成させ、Fe(II)と有機錯体を錯形成させ、そのまま錯体をイオン化させて有機化合物測定用の質量分析計で感度を得ることである。筆者は、ESI-MSによって、淡水および汽水域での全鉄濃度からFe(II)とFe(III)を定量することを既に報告した<sup>17, 18)</sup>。しかし、東京湾の汽水域におけるFe(II)濃度の測定にも感度の向上が必要であった。そのため、海の鉄の溶存状態のさらなる解明のために海水中の鉄の高感度に価数別定量する方法の開発に取り組んだ。ESI-MSにもそれぞれ性能があり、筆者は、high-resolutionの磁場型の質量分析を用いたが、それでも感度が不足しているため、感度向上を目指して研究を進めた。

## 2. 研究方法

### 2.1 試薬

FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (FeCl<sub>3</sub>; Aldrich Co.), 過塩素酸ナトリウム水和物(NaClO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O), 塩化カリウム, メタノール, アセトニトリル, 1-ヘプタノール, ベンゼン, ピリジン, ニトロベンゼン(NB)は富士フィルム和光純薬の特級試薬から入手した。鉄標準溶液 Fe 100 ppm, 1,10-フェナントロリン・一水和物(C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O: phenと記載する), 1-プロパノール, シクロヘキサン, ヘプタンを関東化学株式会社, 特級試薬から得た。NBを溶かさないう遠沈管として、オークリッジ遠沈管(ThermoFisher Sci.)を25°CでのFe(II)-錯体の抽出に使用した。5 μM FeCl<sub>2</sub>, 50 μM NaClO<sub>4</sub>を加えた水相を調製し、NBに溶解した50 μMのphenからなる有機溶液をストック溶液として使用し、実験に応じて適宜希釈液を調製した。50 μM phenのス

トック溶液から調製した。すべての水は、超純水を用い、Purelab Ultra system (比抵抗 18.2 MΩ・cm; ELGA, Veolia Water Tech)を用いた。

水相に FeCl<sub>2</sub> と NaClO<sub>4</sub> の水溶液 10 mL, 有機相に 10 mL の phen-NB 溶液を加え、遠沈管中で 20 分間振とうした。下層の有機相の揮発を防ぐため、上層の水相は分離しなかった。

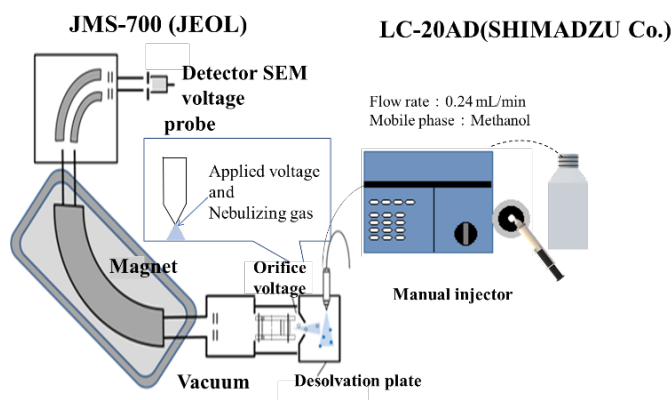
## 2. 2 装置条件

HR-ESI-MS (JEOL; JMS-700) は、2 つの測定モードで構成されている。1) 磁場を掃引する scan mode と 2) 磁場を固定して同じ  $m/z$  を測定する sim mode である。水相と有機相の測定にはポンプ (LC-20AD, 島津製作所) を JMS-700 に外部に接続した。この接続を **Figure 1** に示す。ESI-MS の装置条件を **Table. 1** に示す。全サンプルの 0.4 mL を 1 mL ガラスシリンジで有機相から採取し、インジェクターを使用し、ESI-MS に導入した。移動相にはメタノールを用い、0.20 mL/分の流速で 25 μL を導入した。

有機相の安定性を調べたところ、NB 中に phen を 3 日間溶解すると平衡に達することがわかった。SIM モードでの Fe(II) の定量は、 $m/z$  269.5 の [Fe(phen)<sub>2</sub>-NB]<sup>2+</sup> と  $m/z$  298.2 の [Fe(phen)]<sub>3</sub><sup>2+</sup> の 2 つのピーク面積を加えて調べた。全鉄濃度は、十分に希釈した後、ICP-MS (Agilent 7700x) で測定した。測定条件を **Table. 2** に示す。なお、さらに測定の感度を上げるために、ESI-MS のイオン化システムをすべて分解し、すべての測定条件を検討し直した。

## 2. 3 ICP-OES を用いたフェノール中の Fe(II) のキャリブレーション

100 μM FeCl<sub>2</sub> と 300 μM NaClO<sub>4</sub> を含む水溶液 10 mL と NB 中 1000 μM phen を含む有機溶液を 20 分間振とうした。抽出後、遠心分離により水相と有機相を分離し、水相を硝酸で 5 倍に希釈して最終的に 1% の硝酸とし、測定を行った。抽出前後の水相中の Fe(II) 濃度は、誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (iCAP 7400; Thermo Fisher Science 社製) を用いて測定、その条件を **Table. 3** に示した。鉄を正確に定量するため、1% 硝酸中濃度 0, 23, 100, 220 μM の鉄標準溶液を用いて検量線を作成した。ICP-OES で測定した検量線の直線性 R<sup>2</sup> = 1 が得られた。



**Fig. 1** LC-20AD と JMS-700 を結合した測定

**Table. 1** ESI-MS (JMS-700, JEOL) の測定条件

Ion mode	Positive ion mode
Sample injection	Infusion
Degree of vacuum (Pa)	$2.00 \times 10^{-4}$
Mass range ( $m/z$ )	10-1000
Flow rate (ml/min)	0.2
Needle voltage (kV)	1.4
Orifice1 voltage (V)	53.92
Ring lens voltage (V)	67.56
Ion guide voltage (V)	4.8
Orifice1 temperature (°C)	80
Desolvant plate temperature (°C)	250
Detector voltage (kV)	1
Drying gas flow rate (ml/min)	1.5
Nebulizing gas flow rate (ml/min)	1.5

**Table. 2** ICP-MS (Agilent 7700x) の測定条件

Analytical tuning mode	ultra-robust mode
Plasma Mode	UHM
RF power	1550W
Plasma gas	14 L/min
Carrier gas	0.24 L/min
Dilution gas	0.71 L/min
Collision cells	He 4.0 ml/min

**Table. 3** ICP-OES (iCAP 7400, Thermo fisher sci. co.) の装置条件

測定方向	ラジアル
RF power (W)	1150
冷却ガス (L/min)	12
補助ガス (L/min)	0.5
UV ネブライジングガス (L/min)	0.5
測定波長 (nm)	259.940

## 2. 4 地下水のサンプリング方法と準備

東京都の清徳寺(北緯 35°41'43", 東経 139°38'54")の地下水を2020年11月25日にサンプリングした。場所は杉並区で、関東ローム層に覆われた台地である。地下水サンプルは0.45 µm フィルター(GLサイエンス社製)を使用し、クリーンボトル(株式会社アスワン製, クラス1000のクリーンルームで洗浄, 和歌山CIC研究所製, クラス1000のクリーンルームで洗浄)を用い採取した。地下水ろ過試料のpHは7.1~7.3であった。サンプル温度は11~14°Cであった。(汽水, 2020年12月9日および2021年3月3日取得)。海水環境は通常, 5°C(冬)~25°C(暑い夏)である。この温度範囲での温度変動は, 海水温の上昇を意味しない。すべてのESI-MS測定は, 場からのサンプリングから2時間以内に行い, 温度はできるだけ20°Cに近づけた。

## 2. 5 汽水のサンプリング方法と準備

汽水は, 東京湾と高浜運河に囲まれた品川駅付近(北緯 35°37'33", 東経 139°44'46")で採取した。汽水試料は, 水面からの深さ2~5 mにおいてバケツで採取した。運河の塩分濃度は1%であった。サンプルは0.45 µmのフィルター(GLサイエンス社製)でろ過し, できるだけ早くクリーンボトル(class 1000のクリーンルーム)に採取した。これらのサンプルの標準溶液中のFe(II)濃度は, 0, 0.025, 0.05, 0.1, および0.2 µMを10 µM NaClO<sub>4</sub>で希釈した。単量体と二量体の質量比が一定になるように, 採水日の7日前に5000 µM phenのNB中ストック溶液を調製し, NBで希釈して10 µM phenを含む有機相を調製した。調製した各試料を実験室に運び, 5分以内にESI-MSでFe(II)を測定した。

## 2. 6 溶媒抽出によるFe(II)の高濃度化

溶媒抽出の特性において, 水相と有機相の体積比をかえることで, 水相のFe(II)の濃度を高くすることができる。そこで, Fe(II)溶液の濃度を一定にして, 有機相に抽出するときの体積比を検討した。これにより, 水相と有機相(実際にはNB-phen)の比を変えて, 溶媒抽出による高濃度化を試した。

## 3. 結果と考察

### 3. 1 ニトロベンゼン中のFe(II)-フェノール錯体の検出

Fe(II)<sup>19, 20</sup>の安定性定数(log<sub>10</sub> k = 21.1)は, 3-(2-ピリジル)-5,6-ジフェニル-1,2,4-トリアジン(PDTZ)とFe(II)

(log<sub>10</sub> k = 15.6)およびEDTA(log<sub>10</sub> k = 14.3)の安定性定数よりも高いため, Fe(II)の溶媒抽出のためのキレートとしてphenの使用が検討された<sup>21</sup>。pH 2~9の広い範囲で着色錯体を形成することは, 分光光度法において有利である。1,10-phenanthroline HCl(phen-HCl)を用いた水溶液中で, 絶対検量線による検出限界が13 nM, 標準添加法による多摩川中のFe(II)濃度が0.23 µMと, phen錯体によるFe(II)の存在が示唆されている<sup>17</sup>。ただし, この研究では, phenをキレートとして有機相に溶解し, 有機溶媒であるNBと過塩素酸ナトリウムがFe(II)-phenの対イオンとして作用した。ブランク溶液(50 µM phen)のマスマスペクトルをFigure 2aに示し, 同定された化学種をまとめた。m/z 181.1のピークは[H(phen)]<sup>+</sup>, これはOkabeら<sup>17</sup>も同定している。本研究では, NBとphenをH<sup>+</sup>, すなわち, [Na(phen)]<sup>+</sup> (m/z 202.8), [Na(phen)-MeOH]<sup>+</sup> (m/z 234.8), [Na(phen)-NB]<sup>+</sup> (m/z 326.1)および[Na(phen)]<sup>+</sup> (m/z 383.1)などのNa<sup>+</sup>-added phen species, Na<sup>+</sup>-added NB, 溶媒および移動体のメタノール相がすべて検出された。イオン化の際に生成されたのか, 化学反応によるものなのかは不明である。しかし, ブランク溶液にはわずかにFe(II)-phen種が検出された。これは, 試料導入系を移動相中の100%メタノールで洗浄したにもかかわらず, メタノールで除去できなかった。これは, 試料の導入と経路中の残留Fe(II)による可能性が高い。硝酸を用いた試みも失敗した。そのため, 以降のすべての実験では, ブランク溶液で検出されたFe(II)-フェノール化学種の強度を低下させるために, メタノールにNBを添加した。有機相では, 長期間の測定を行った場合, Fe(II)からFe(III)への酸化は否定できない。しかし, NBに抽出された後のFe(II)-phen錯体中のFe(II)は, NB中の溶存酸素濃度が極めて低いため, 酸化される可能性は低いと考えられる。ペンタクロロフェノール(PCP)を[Fe(phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>の対イオンとして用いてNBで抽出した実験では, 有機相に抽出された[Fe(phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>の吸光度が分光光度計で5時間抽出後も変化しなかったことが報告されており, このことからFe(II)は5時間安定である<sup>22, 23</sup>。したがって, サンプリング後5時間以内にFe(II)を測定し錯体形成することで, 天然水中のFe(II)の酸化を防ぐことができると考えられた。

### 3. 2 NB 中の Fe(III)とフェノールの抽出妨害

ESI-MS の試料導入系に電圧を印加すると、Fe(III)が Fe(II)に還元される可能性があり、Fe(II)の正誤判定につながる可能性がある。そこで、この可能性を排除するために、1  $\mu$ M Fe(III)を含む水相と混合した後の有機相のマススペクトルを得た。検出された主な化学種は [H(phen)]<sup>+</sup> ( $m/z$  181.0) で、他に NB に由来する [Na(phen)]<sup>2+</sup> ( $m/z$  383.1)などのピークが高強度で検出された。[H (phen)]<sup>+</sup> ( $m/z$  181.0)はほぼ 100%存在し、[Fe(phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> ( $m/z$  298)は 0.88%存在した(Figure 2b)。Fe(III)に由来するピークは検出されず、このスペクトルは 50  $\mu$ M の phen を含むブランク溶液のマススペクトルと類似していた。1  $\mu$ M Fe(III)の有無にかかわらず、NB 中の Fe(II)-phen 種の強度は、ほぼ同じか、それ以下であった。NB 溶液中の Fe(II)-phen 化学種の定量値に影響を及ぼさなかった。したがって、Fe(III)の共存は、NB

を用いた抽出における Fe(II)-フェノールの定量値および錯形成に影響しないと結論した。

質量分析部にイオン化した試料を導入する際、ESI-MS は「Tuning に関する様々な条件」(Table. 1)である分析部の真空度 (Pa) , 移動相の導入速度 (mL/min) , キャピラリーに印加するニードル電圧 (kV) , オリフィス 1 電圧 (V) , オリフィス 2 電圧 (V) , レンズ電圧 (V) , オリフィス温度 (°C) , 脱溶媒プレート温度 (°C) などの条件を Tuning してイオン検出能率を上げる操作している。そこで Table. 1 によって得られた測定条件をさらに検討した。ESI-MS の測定条件において、脱溶媒プレートの温度を 350°C , イオン検出器のプリアンプ 1 倍, アンプ増幅度 1 倍に設定し, SCAN モードにて測定を行った。移動相の流速は 0.05 mL/min に固定し, 移動相の速度を制御して, 測定し感度を 5 倍上げた。

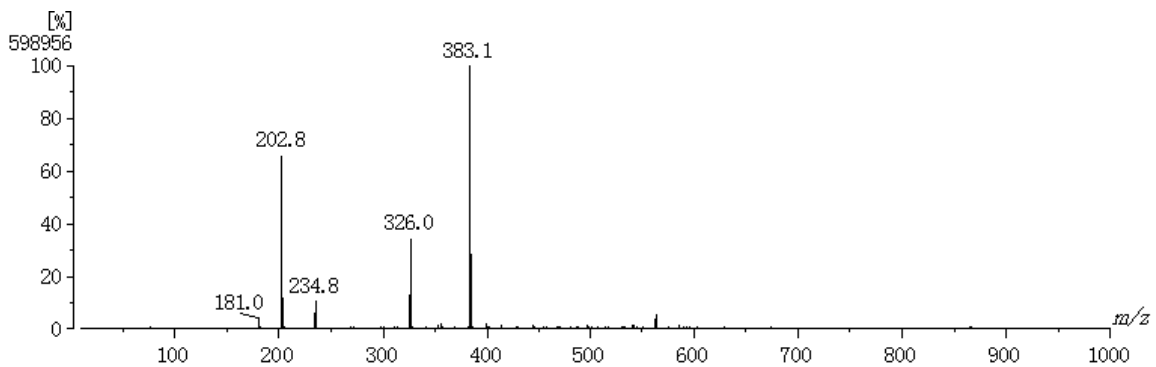


Fig. 2a NB 中の phen の ESI-MS スペクトル

$m/z$  181.0; [H(phen)]<sup>+</sup>,  $m/z$  202.8; [Na (phen)]<sup>+</sup>,  $m/z$  234.8; [Na(phen)-MeOH]<sup>+</sup>,  $m/z$  326.1; [Na(phen)-NB]<sup>+</sup>, }  $m/z$  383.1; [Na(phen)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>.

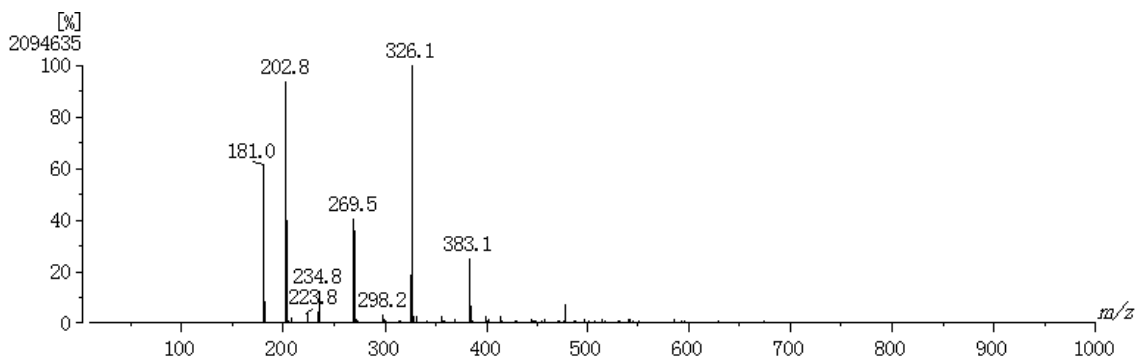


Fig. 2b NB に phen と Fe(II)を加えて Fe(II)-phen を錯形成したときの ESI-MS スペクトル

$m/z$  181.0; [H(phen)]<sup>+</sup>,  $m/z$  202.8; [Na (phen)]<sup>+</sup>,  $m/z$  223.8; [Fe(phen)<sub>2</sub>-MeOH]<sup>2+</sup>,  $m/z$  234.8; [Na(phen)-MeOH]<sup>+</sup>,  $m/z$  269.5; [Fe(phen)<sub>2</sub>-NB]<sup>2+</sup>,  $m/z$  298.2; [Fe(phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>,  $m/z$  326.1; [Na(phen)- NB]<sup>+</sup>,  $m/z$  383.1; [Na(phen)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>.

### 3. 3 phen を用いた溶媒抽出における Fe(II)の抽出率

有機相と水相の Fe の分配比は  $\log D = 2.4$ , 抽出率は Fe(II)-phen の計算では 99.6%であった。山本らが報告した Fe(II)の分配比 ( $\log D$ ) は 1.0 以上<sup>22)</sup>であることから, Fe(II)の抽出率は最大でも 90%であり, Fe(II)の抽出が容易であることがわかる。したがって,  $\text{NaClO}_4$  を対アニオンとし phen をキレートとして, NB を有機溶媒として水相中の Fe(II)を抽出する方法は, Fe(II)の定量に適用可能であると判断した。NB と phen は柔らかい酸や塩基と結合しやすく, 互いに高い親和性を持つ。金属イオン  $\text{Na}^+$  または Fe(II)は, phen と直接結合して金属-phen 錯体を形成し, 有機相中で NB と相互作用して  $[\text{Na}(\text{phen})\text{-NB}]^+$  または  $[\text{Fe}(\text{phen})_2\text{-NB}]^{2+}$  を形成する。言い換えれば, NB は水分子よりも phen に対して高い親和性を持つため, Fe(II)をカプセル化した phen は効率的に有機相に抽出される。Yamamoto らは, これは NB の誘電率が大きく, Fe(II)-phen が水中よりも NB に溶媒和しやすい結果であると指摘し<sup>22)</sup>, 高い抽出率を説明している。

### 3. 4 Fe(II)-phen 錯体の NB およびブランク中での安定性

Fe(II)-phen 溶液の有機相における化学種もブランク試料と同様に, 1 日目から増加し, 3 日目で平衡に達すること, また ( $[\text{Na}(\text{phen})_2]^+$  を除く) phen に  $\text{H}^+$  や  $\text{Na}^+$ , メタノールが付加した化学種は 1 日目から減少傾向にあり, 時間をかけて phen 錯体が分解傾向にあることがわかった。しかし,  $[\text{Na}(\text{phen})_2]^+$  ( $m/z$  383.1) のみは 1 日目から増加傾向にあり, 3 日目ごろに平衡に達するが, これらは, 他の phen の付加錯体がすべて  $\text{Na}^+$  を付加させて安定になった。以上の観察から, 3 日目以降のブランク溶液の平衡状態は,  $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$  が容易に形成されるような状態である。ESI-MS が NB 溶液の溶解状態を完全に反映していないことは興味深い。抽出された NB 中の  $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$  (およびその誘導体分子) は, ESI-MS のイオン化過程で  $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$  から phen が分離するため, 真空中では不安定と考えられ, 得られた  $[\text{Fe}(\text{phen})_2]^{2+}$  は周囲の NB 中では不安定 (溶媒和が低い) であり, メタノールも多量に存在する。検出された化学種は  $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ , phen-NB 周辺の NB とメ

タノール付加体であると推察される。この項は”分析化学 70(4-5) 277-282 (2021)”にまとめており, phen 錯体を調製するとき, 3 日以上 phen と NB を平衡に置くことにした。

### 3. 5 NB 中の phen を用いた溶媒抽出による天然水中の Fe(II)の定量

天然水中の Fe(II)の定量には, 他の金属の干渉が定量分析に影響することがある。特に, ニッケル (Ni, 質量数 58.69) は phen と錯体を形成し, 質量数が Fe (質量数 55.85) に近いが, ESI-MS (JMS-700) の SIM モードでは, Fe(II)の定量における Ni(II)の影響は, 分解能が高いために分離可能である。現在, 実験の分解能は 1000 に設定されている (JMS-700 で得られる分解能は  $\Delta m/m = 100000$ )。したがって, Fe(II)-phen 化学種と Ni(II)-phen 化学種を別々に測定することができる。

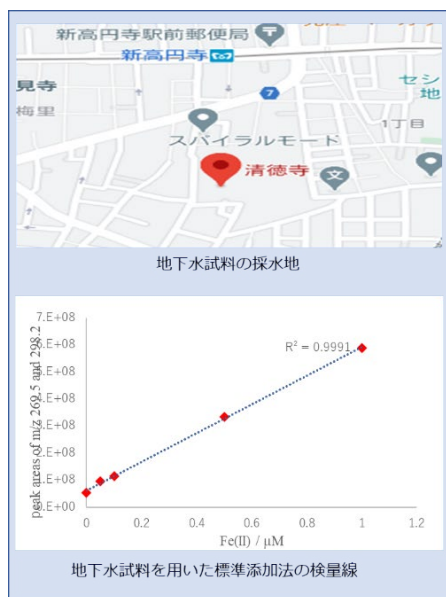
標準添加法による地下水の測定: 標準添加法による Fe(II)の検量線は  $R^2 = 0.991$  を得た。地下水中の Fe(II)濃度は  $0.146 \pm 0.002 \mu\text{M}$  であった。これを Figure 3 に示す。ICP-MS を用いた全鉄の定量は,  $0.230 \pm 0.02 \mu\text{M}$  を得た。Fe(II)は全 Fe の 63~64% である。多摩川 (東京都と神奈川県の間を流れる一級河川) の Fe(II)濃度を  $0.23 \mu\text{M}$ , 総 Fe 濃度を  $0.59 \pm 0.06 \mu\text{M}$  と報告している<sup>17)</sup>。ここで, Fe(II)が全鉄分の 39%を占めると計算された。多摩川の鉄濃度が高いのは, 河川水に含まれるフルボ酸やフミン酸などの腐食性物質や人工的に溶出させた河川水によるものと考えられる。また, 多摩川と荒川の水系の性質の違いも考えられる。地下水のサンプリング地点から 14.5 km 離れた岡部らが採取した表流水に比べて, 空気による酸化の影響を受けにくい地下水を直接汲み上げたことが, Fe(II)の割合が高い理由と考えられる。

### 3. 6 汽水中における $\text{Na}^+$ による ESI-MS のイオン化抑制

汽水の塩濃度は約 1% である。NB で抽出された Fe(II)-phen 錯体は, ESI-MS 測定でイオン化が抑制されることなく, 観察された。すなわち, 汽水中の塩類, 特に硫酸イオンや塩化物イオンなどの高濃度の陰イオンは, 溶媒抽出によって得られた。汽水 (pH 7.54) 中の Fe(II)の定量結果を Figure 4 に示す。検量線は  $R^2 = 0.993$  の高い直線性を示し, 汽水中の Fe(II)は

0.184 ± 0.05 μM が得られた。汽水の中的全鉄の定量は ICP-MS の測定で、0.70 ± 0.05 μM であった。Fe(II)は全鉄量の 26%を占め、河川からの Fe(II)の流入は比較的高いままであった。多摩川の河川試料<sup>17)</sup>の Fe(II)濃度が約 39%であり、この汽水試料が還元性であることも明らかである。さらに、汽水域では、Fe(II)濃度と全 Fe 濃度が多摩川試料よりも低く、凝集による Fe(III)の沈殿が起こっていると推定される。一般に、高濃度の Fe(III)を含む水酸化鉄は、錯体化した Fe(II)よりも凝集しやすいので、これは理解できる。海水中の海底に沈殿した

鉄は、嫌気的環境で Fe(II)に還元され、その一部は海水中に溶出するが、溶出した Fe(II)は酸化されて再び沈殿する。採水地点は海面から 3~5 m と浅く、海水表層の水であっても、海底の嫌気性環境で生成し Fe(II)の影響を受ける可能性が高い。Fe(II)と Fe(III)の濃度は、ワシントン州沿岸やオレゴン州の湧昇海域の海水中のそれぞれの濃度よりも 1 桁高かった<sup>15)</sup>。我々は、沿岸域の濃度よりも低い濃度の Fe(II)を測定するという困難な課題を今後の研究のために検討している。



採水地：清徳寺(杉並区) 緯度35度41分43秒  
経度139度38分54秒

採水日：2020年11月25日

地下水試料は0.45 μm のフィルターに通した直後に検量線試料に添加

水相(10 mL)：0~1 μM FeCl<sub>2</sub>、50 μM NaClO<sub>4</sub>  
有機相(10 mL)：50 μM phen

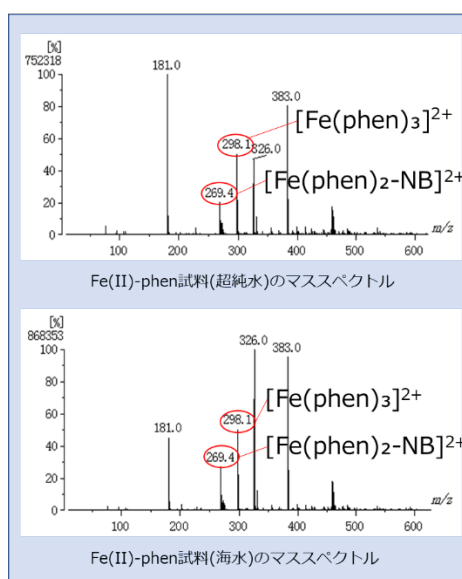
ESI-MSで[Fe(phen)<sub>2</sub>-NB]<sup>2+</sup> と [Fe(phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>の化学種のみを測定しFe(II)を定量

[Fe<sup>2+</sup>] = 0.146 ± 0.002 μM

[Fe<sup>2+</sup>+Fe<sup>3+</sup>] = 0.230 μM (ICP-MS Agilent7800)

本方法による天然水中の Fe(II)の定量が可能

Fig. 3 地下水中の Fe(II)の定量



・ Fe(II)-phen試料(超純水)

水相(超純水)：5 μM FeCl<sub>2</sub>、50 μM NaClO<sub>4</sub>  
有機相：50 μM phen

・ Fe(II)-phen試料(海水)filtered

水相(海水)：5 μM FeCl<sub>2</sub>、50 μM NaClO<sub>4</sub>  
有機相：50 μM phen

塩濃度：0.9 % (海水は薬水橋前で採水)

	[Fe(phen) <sub>2</sub> -NB] <sup>2+</sup>	[Fe(phen) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup>
超純水	150817	377422
海水	234540	436002

海水中のFe(II)をNB中へ抽出し塩の影響を受けずにFe(II)を検出



本方法が海水中のFe(II)の定量に適応可能

Fig. 4 ESI-MS を用いた海水に含まれる Fe(II)の測定

### 3. 7 溶媒抽出による Fe(II)の濃縮

Fe(II)溶液の濃度を一定にして、有機相に抽出するときの体積比を検討した。これにより、水相と有機相(実際には NB-phen)の比を変えて、溶媒抽出による高濃度化を試した。振とう時間も検討し、FeCl<sub>2</sub>溶液を一定にして、NB-phenの体積を変化させた。実験室内での実験で溶媒抽出による Fe(II)-phen 錯体の濃縮が可能であるとわかった。そこで、2023年12月20日と26日の試料溶液で比べた。体積比が同じ1:1の溶媒抽出であっても、Fe(II)の濃度0.1587 μMと0.2794 μMと得られた。振とう時間を30分から60分にしたために、抽出効率が高くなったとも考えられ、採水した日によって、元来、微量な成分である Fe(II)濃度が大きく異なるとも考えられることがわかった。

先の汽水域において再現性を確かめるため、3倍濃縮と2倍濃縮を行い、同じ値が出るかを確かめた。どちらも濃縮をしていない溶液に比べ検量線の精度がやや落ちたが、Fe(II)の濃度は20日の採水では0.1763 ± 0.0176 μM、26日の採水では0.2544 ± 0.025 μMとおおよそ10%の誤差範囲に収まった。中心値はほぼ同じであっても、前処理の工程や天然水中の夾雑物による濃縮効率の低下を考慮すると体積比を変えての溶媒抽出における定量ではおおよそ10%程度の誤差が含まれると推察される。

溶媒抽出による Fe(II)-phen 錯体の濃縮の実験で、研究室の試薬と超純水を用いた溶媒抽出においては再現性が認められたが、汽水域の天然水試料の場合、体積比1:1の溶媒抽出では検量線の精度も高い定量値を得られた。体積比を1:2、1:3と変化させた濃縮においては検量線の直線性も下がり、Fe(II)濃度の定量値にも誤差が認められた。天然水試料中には塩類や Fe(III)などの夾雑物が含まれるため、Fe(II)の抽出が阻害されることや Fe(III)が時間経過に従い還元され Fe(II)濃度に測定誤差を与えた可能性があり、今後さらなる条件の検討や改良を行い、この誤差をできるだけ小さくする必要がある。

### 4. 結論と今後の課題

鉄濃度の測定が困難であることに加え、海水中の Fe(II)と Fe(III)を分離・定量するには、何らかの前処理、例えば分離効率の高い固体抽出法や液-液抽出法を開

発し、その後、HR-ESI-MSを用いた検出法を検討するしかない。

問題点としては、

- 1) Fe(II)は Fe(III)に酸化されやすい。
- 2) 海水中に溶存する全 Fe(total Fe)の濃度が低い。
- 3) 海水の塩分濃度は Total Fe の濃度に比べて非常に高く、ICP-OES、ICP-AES、有機物用質量分析計(ESI-MS)などの検出系やネブライザーに塩が析出し、分析が困難になる。

そのため、さらに溶媒抽出や測定条件などを精査し、感度を倍程度上げた。Fe(II)の酸化を防ぐため、安定な Fe(II)-phen 錯体を形成するように錯体化した。地下水中の Fe(II)は ESI-MS で測定されたが、海水中の Fe(II)の定量は塩類濃度が高いため困難である。得られた汽水域中の Fe(II)濃度は0.184 ± 0.05 μMであり、ICP-MSによる全 Fe濃度(total Fe)は0.70 ± 0.05 μM、Fe(II)/total Feは汽水域中の全 Feの26%であった。地下水中の Fe(II)濃度は0.146 ± 0.002 μM、total Feは0.23 ± 0.02 μMで、Fe(II)/total Feは63%であった。一方、多摩川では、Fe(II)濃度は0.230 ± 0.013 μMであり、ICP-MSによる total Feは0.59 ± 0.06 μM、Fe(II)/total Feは39%であった<sup>17)</sup>。これらは、大気中の酸素による Fe(II)の Fe(III)への暴露が、この河川水と汽水における主要な要因であるという考えと一致している。汽水域の Fe(II)濃度が高い場合、Fe(II)の総含有量は、大気からの酸化と海底からの低酸素状態に由来する。

Fe(II)は、海水中だけでなく大気中でも容易に酸化される。海水の豊かさを示す重要なパラメーターは、植物プランクトンにとって微量栄養素である微量の Fe(II)の存在であり、一方、Fe(III)は植物プランクトンにとって有毒である。Fe(II)の濃度が予想外に高いということは、自然の河川水や海水の持続可能な環境がよく維持されていることを示している。しかし、ESI-MSだけでなく、ICP-MSのようなネブライザーを使用する質量分析計でも、海水中の塩がイオン化を阻害する。本研究では、HR-ESI-MSの様々な角度から ESI-MSによる Fe(II)の定量の高感度化を目指した。分析機器の条件を変えることや溶液の濃縮を行うことで Fe(II)-phen 錯体の検出強度を高められた。実際に塩を含む天然水試料の測定では、濃縮率を1:1と1:2とすることで0.1763 ± 0.017 μMの誤差、および



1:1 と 1:3 とすることで  $0.2544 \pm 0.025 \mu\text{M}$  という誤差範囲で再現性の確保も可能になった。今後、3.4%を超える塩濃度の高い海水中の極微量鉄の測定をする上では Fe の状態変化や夾雑物の影響を考えた前処理法の改良を行い、定量法の精度をより高いものにしていく必要がある。

## 6. 文献

1. F.J. Millero, W. Yao, J. Aicher, The speciation of Fe(II) and Fe(III) in natural waters, *Mar. Chem.* 50 (1995) 21-39, [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(95\)00024-L](https://doi.org/10.1016/0304-4203(95)00024-L).
2. M. Lin, X. Hu, D. Pan, H. Han, Determination of iron in seawater: From the laboratory to in situ measurements, *Talanta* 188 (2018) 135 - 144, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.05.071>.
3. F.M.M. Morel, A.B. Kustka, Y. Shaked, The role of unchelated Fe in the iron nutrition of phytoplankton, *Limnol. Oceanogr.* 53 (2008) 400 - 404, <https://doi.org/10.4319/LO.2008.53.1.0400>.
4. S. Levi, E. Rovida, The role of iron in mitochondrial function, *BBA* 1790 (2009) 629 - 636, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.09.008>.
5. Y. Sohrin, S. Iwamoto, S. Akiyama, T. Fujita, T. Kugii, H. Obata, E. Nakayama, S. Goda, Y. Fujishima, H. Hasegawa, Determination of trace elements in seawater by fluorinated metal alkoxide glass-immobilized 8-hydroxyquinoline concentration and high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry detection, *Anal. Chim. Acta* 363 (1998) 11-19, [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00074-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00074-9).
6. A. Milne, W. Landing, M. Bizimis, P. Morton, Determination of Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd and Pb in seawater using high resolution magnetic sector inductively coupled mass spectrometry (HR-ICP-MS), *Anal. Chim. Acta* 665 (2010) 200-207, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.03.027>.
7. J. Wu, Determination of picomolar iron in seawater by double  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  precipitation isotope dilution high-resolution ICPMS, *Mar. Chem.* 103 (2007) 370-381, <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2006.10.006>.
8. S. Sadeghi, V. Ashoori, Iron species determination by task-specific ionic liquid-based in situ solvent formation dispersive liquid-liquid microextraction combined with flame atomic absorption spectrometry, *J. Sci. Food Agr.* 97 (2017) 4635-4642, <https://doi.org/10.1002/jsfa.8335>.
9. T. Minami, W. Konagaya, L. Zheng, S. Takano, M. Sasaki, R. Murata, Y. Nakaguchi, Y. Sohrin, An off-line automated preconcentration system with ethylenediamine-triacetate chelating resin for the determination of trace metals in seawater by high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 854 (2015) 183-190, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.11.016>.
10. K.W. Bruland, R.P. Franks, G.A. Knauer, J.H. Martin, Sampling and analytical methods for the determination of copper, cadmium, zinc, and nickel at the nanogram per liter level in sea water, *Anal. Chim. Acta* 105 (1979) 233-245, [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)83754-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)83754-5).
11. D.V. Biller, K.W. Bruland, Analysis of Mn, Fe Co, Ni, Cu, Zn, Cd, and Pb in seawater using the Nobias-chelate PA1 resin and magnetic sector inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), *Mar. Chem.* 130 (2012) 12-20, <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2011.12.001>.
12. L.L. Stookey, Ferrozine - a new spectrophotometric reagent for iron, *Anal. Chem.* 42 (1970) 779 - 781, <https://doi.org/10.1021/ac60289a016>.
13. E.L. Rue, K.W. Bruland, Complexation of iron(III) by natural organic ligands in the Central North Pacific as determined by a new competitive ligand equilibration / adsorptive cathodic stripping voltammetric method, *Mar. Chem.* 50 (1995) 117-138, [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(94\)90012-4](https://doi.org/10.1016/0304-4203(94)90012-4).
14. M. Gledhill, C.M.G. van den Berg, Determination of complexation of iron(III) with natural organic complexing ligands in seawater using cathodic

- stripping voltammetry, *Mar. Chem.* 47 (1994) 41–54, [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(94\)90012-4](https://doi.org/10.1016/0304-4203(94)90012-4).
15. M.C. Lohan, K.W. Bruland, Elevated Fe(II) and dissolved Fe in hypoxic shelf waters off Oregon and Washington: An enhanced source of iron to coastal upwelling regimes, *Environ. Sci. and Tech.* 42 (2008) 6462–6468, <https://doi.org/10.1021/es800144j>.
16. M.C. Lohan, A.M. Aguilar-Islas, K.W. Bruland, Direct determination of iron in acidified (pH 1.7) seawater samples by flow injection analysis with catalytic spectrophotometric detection: Application and intercomparison, *Limnol. Oceanogr. Meth.* 4 (2006) 164–171, <https://doi.org/10.4319/lom.2006.4.164>.
17. S. Okabe, K. Oda, M. Muto, Y. V. Sahoo, M. Tanaka, Speciation and determination of iron in aqueous solution and river water by high-resolution electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Molecular Liquids* 329 (2021) 115532. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115532>
18. K. Oda, K. Ii, Y.V. Sahoo, K. Takahashi, M. Tanaka\*, Ferrous determination in ground and brackish water by high-resolution electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Molecular Liquids*, 391, Part B, 123316 (2023) <https://doi.org/10.1002/rcm.9644>
19. C.R. Gibbs, Characterization and application of ferrozine iron reagent as a ferrous iron indicator, *Anal. Chem.* 48 (8) (1976) 1197, <https://doi.org/10.1021/ac50002a034>.
20. A.E. Martell, R.M. Smith, *Critical stability constants*, Plenum Press, New York and London, 1974, p. 251.
21. S.E. Pepper, M. Borkowski, M.K. Richmann, D.T. Reed, Determination of ferrous and ferric iron in aqueous biological solutions, *Anal. Chim. Acta* 663 (2010) 172–177, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.01.056>.
22. Y. Yamamoto, T. Tsunehiko, T. Takao, Transference of water to the nitrobenzene phase for the extraction of tris(1,10-phenanthroline)iron(II) chelate salts, *Chem. Lett.* 1 (1972) 459–461, <https://doi.org/10.1246/cl.1972.459>.
23. Y. Yamamoto, E. Sumimura, K. Miyoshi, T. Tominaga, Conductance of tris(1,10-phenanthroline)iron(II) and tris(2,2'-bipyridine)iron(II) halides and perchlorates in water and nitrobenzene in relation to solvent extraction of the ion pairs, *Anal. Chim. Acta* 64 (2) (1973) 225–233, [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)82440-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)82440-5).

## Determination of Fe(II) and Fe(III) in Seawater - for Evaluation of Ocean Wealth

Miho Tanaka Takahashi

Tokyo University of Marine Science and Technology

### Summary

Iron is an essential nutrient for many organisms. The concentration of iron in seawater is reported to be extremely low, ranging from 0.01 to 10 nmol/L when measured by the iron colloid coagulation method. In reality, there are still problems to be solved, such as the establishment of quantitative methods and the sensitivity of measurement. The bioavailability of iron in seawater and natural water depends on highly soluble Fe(II). Recently, it has become clear that only ferrous ion, Fe(II) is utilized for biological metabolism, oxygen transport and mitochondria, while ferric ion, Fe(III) cannot enter the mitochondria. Therefore, we believe that elucidating the existence form and bioavailability of Fe(II) in the ocean will lead to the improvement of ocean desertification, and will also be an indicator of the abundance of the ocean which has been the focus of much attention in recent years.

The concentration of iron in seawater has been reported to be 0.01-10 nmol/L, but the actual amount of Fe(II) and Fe(III) present in seawater has not been clarified. If the richness of the ocean can be evaluated by the concentration of Fe(II), the activity of Fe(II) on organisms in seawater can also be evaluated. Currently, there are three main methods used for the determination of iron in seawater.

To prevent Fe(II) oxidation, Fe(II) was complexed to form stable Fe(II)-phen (1,10 phenanthroline) complexes. Fe(II) in groundwater was measured by ESI-MS, but determination of Fe(II) in seawater is difficult due to high salt concentrations. The obtained Fe(II) concentration in brackish water was  $0.184 \pm 0.05 \mu\text{M}$ , and the total Fe concentration (total Fe) by ICP-MS was  $0.70 \pm 0.05 \mu\text{M}$ , Fe(II)/total Fe being 26 % of total Fe in brackish water. The Fe(II) concentration in groundwater was  $0.146 \pm 0.002 \mu\text{M}$ , total Fe was  $0.23 \pm 0.02 \mu\text{M}$ , and Fe(II)/total Fe was 63 %. On the other hand, in the Tama River, the Fe(II) concentration was  $0.230 \pm 0.013 \mu\text{M}$ , total Fe by ICP-MS was  $0.59 \pm 0.06 \mu\text{M}$ , and Fe(II)/total Fe was 39 %. These are consistent with the idea that exposure of Fe(II) to Fe(III) by atmospheric oxygen is a major factor in this river water and brackish water. In brackish waters with high Fe(II) concentrations, the total Fe(II) content comes from oxidation from the atmosphere and hypoxia from the seafloor.