

精密分析による水道水原水中溶存有機物の特性解析

研究代表者 秋葉 道宏
研究分担者 越後 信哉

厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業)
水道事業の流域連携の推進に伴う水供給システムにおける
生物障害対策の強化に関する研究
分担研究報告書

研究課題： 精密分析による水道水原水中溶存有機物の特性解析

研究代表者 秋葉 道宏 国立保健医療科学院 生活環境研究部 部長
研究分担者 越後 信哉 京都大学大学院 工学研究科 准教授

研究要旨

水中の DOM の組成やその変化を Orbitrap 質量分析計を用いて精密質量分析する場合に、感度（シグナル強度）と平等性（親水性と考えられる物質回収状況）の観点からは固相抽出よりも乾燥濃縮が優れていることを示した。また、炭素量の回収率もこの結果を支持するものであった。ただし、固相抽出による場合も、疎水性化合物のみが回収される等の極端なバイアスが存在することはなく、検体数が多い場合、塩分濃度が高い場合、あるいは高い濃縮倍率が要求される場合においては固相抽出法も選択肢となりうると考えられた。

A. 研究目的

溶存有機物 (Dissolved Organic Matter, DOM) は水中に含まれる有機物群のうち溶存態のもの総称で、天然由来 (土壌由来, 水系由来双方を含む) と人為由来両方起源の有機物が含まれる複雑な混合物である。DOM の組成は、生物障害の発生に関連して変化すると考えられ、十分な感度と選択性が実現できれば、障害を引き起こす微生物の増殖に先んじてその変化を捉え、生物障害の予測指標として活用することも期待できる。しかしながら、過去には、その複雑性のため、DOM の特性解析はカラムクロマトグラフィーによる分画やマクロ指標 (吸光度や蛍光) によることが多く、十分な情報を得ることができなかった。一方で、近年のフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計や Orbitrap 質量分析計を利用した精密質量技術の進展にともない、より詳細な DOM の解析に精密質量分析が応用できる可能性が示されてきた。このような状況を踏まえ、昨年度は精密質量分析を各種の水道原水に適用し、溶存有機物のパタンから水源のタイプが判別できること等を示した。

本年度は、DOM の精密質量分析において必要な前処理プロセスである濃縮操作について、濃縮方法の中でも特に用いられることの多い固相抽出と窒素吹付けによる乾燥濃縮について、全有機炭素 (Total organic carbon; TOC) の回収率、組成の変化 (濃縮の平等性) の 2 点の観点から比較を行った。

B. 研究方法

1. 試料及実験の構成

試料は実際の浄水場の急速ろ過水を用いた。まず、十分な感度が得られる試料の濃縮倍率について、TOC 回収率と Orbitrap 精密質量分析計を用いた精密質量スペクトルの 2 点に基づき検討を行った。次に、乾燥濃縮を行った試料と固相抽出を用いた濃縮を行った試料について比較を行った。この比較においても、TOC 回収率と Orbitrap 精密質量分析計を用いた検出結果の 2 つの観点から検討を行った。

2. 固相抽出

本研究では、近年溶存有機物の濃縮のための固相抽出のカートリッジとして一般的に用いられている逆相系のカートリッジである Bond Elut PPL カートリッジ (500 mg, 3 mL; アジレント・テクノロジー) を用いた。具体的な固相抽出の手順は以下通りである。まず 10 mL のメタノールを約 1 mL/min で通液し、その後 1M HCl 20 mL を約 1 mL/min で通液することでコンディショニングを行った。次に塩酸を用いてサンプルの pH を 2 に調整した。そして、コンセントレーター (CHRATEC SPC10 シリーズ, Waters) を用いてこのサンプル (0.1 L, 0.2 L, または 1.0 L) を 20 mL/min で通水した。その後、カートリッジの内部を洗浄するために 20 mL の 1M HCl を約 1 mL/min で通液し、この後カートリッジに保持された DOM を脱離するために、10 mL のメタノールを約 1 mL/min で通液した。DOM はこの 10 mL のメタノール中に回収されている。これの TOC を測定する場合は窒素吹き付け式試験管濃縮装置 (Dry Thermo Bath MG-2000; EYELA) を用いて蒸発・乾固を行った後に MQW に再溶解した。精密質量分析を行う場合

は濃縮後の試料（脱離後のメタノール溶液）を直接分析した。

3. 乾燥濃縮

窒素吹き付け式試験管濃縮装置(Dry Thermo Bath MG-2000; EYELA)を用いて試料に窒素を吹き付けながら温度を 40 °C 前後に保ち濃縮を行った。窒素は窒素ガス発生装置 (Model24F; システム・シンスツルメンツ)を用いて生成した。100 倍濃縮においては 10 mL の 5 つの試料を用意し、それぞれ 2 mL まで濃縮した後混合し、合計 10 mL の試料をさらに 0.5 mL まで濃縮した。20 倍の濃縮については、10 mL の試料を 0.5 mL まで濃縮した。10 倍濃縮においては 10 mL の試料を 1 mL まで濃縮した。

乾燥濃縮をおこなったそれぞれのサンプルを TOC 測定に用いる場合は、希釈後の倍率が 1 倍となるように希釈を行った。また精密質量分析に用いる場合は濃縮したサンプルをそのまま用いて分析を行った。

4. 精密質量分析

精密質量分析には Orbitrap 質量分析計(Q Exactive Focus, Thermo Fisher Scientific)を使用した。イオン化法は ESI のネガティブモードを用いて行った。サンプルの注入には付属の HPLC のポンプとオートサンプラーを用い、水とメタノールがそれぞれ 50%となるように 200 μ L/min にて送液している状態で、20 μ L 注入した。ただし、カラムによる分離は行わず、ランタイム（一回の分析時間は 10 分とした）。また、分解能は 70,000 で、スキャン範囲を $m/z=100-1500$ に設定して測定を行った。

イオン化条件の最適化最適化にあたっては、PPL カートリッジにより 100 倍濃縮したろ過水試料を用いて、スプレー電圧とキャピラリー温度の 2 点について検討した。スプレー電圧は 2.5, 3.5, 4.5kV の三段階で検討し、キャピラリー温度については 250 および 400 °C の二段階で検討を行った。最適化後の分析条件を表 1 に示す。

C. および D. 研究結果及び考察

1. 精密質量分析における DOM 分析に適した濃縮倍率の検討

PPL カートリッジを用いて、10 倍、20 倍、100 倍に濃縮をした対象試料（ろ過水）を TOC 測定、精密質量分析の二つの結果から、分析に適した濃縮倍率を検討した。

PPL カートリッジを用いて濃縮をした対象試料の TOC 測定結果を以下の表 2 に示す。また対象試料の濃縮を行わない場合の TOC は 0.97 mg/L であった。濃縮倍率が高くなるにつれて、TOC 回収率にはやや低下が見られるが、回収率は 60%前後と考えることができる。また、MQW でも 0.2 mg/L

程度のブランク値があることに注意が必要である。

次に上記試料の精密質量分析の結果を図 1 および 2 に示す。またここでは前述の通りキャピラリー温度、スプレー電圧についてはそれぞれ 400 °C, 4.5 kV とした。また、解析の段階ではピークエリアが 500000 以上のものを対象とした。

10 倍濃縮を行った対象試料と、100 倍濃縮を行った対象試料との比較において、10 倍濃縮の方がピークエリアの大きい物質も多々見受けられる。しかし、そのほとんどは有意水準が 10%以下のものである（図 1 において有意水準 10%のラインに線を引いてある）。それとは対照的に、100 倍濃縮では 10 倍濃縮と比較してピークエリアの大きくかつ有意水準も高い物質が多く検出されていることがわかる（左上の領域にプロットが多いことに対応）。このことから、10 倍濃縮よりも 100 倍濃縮の方が、より多くの物質を検出でき、濃縮倍率が高いほうが望ましいと考えることができる。

次に、20 倍濃縮を行った試料と 100 倍濃縮を行った試料を比較した。有意水準 10%に線を引き、これを基準に考えると、100 倍濃縮と 20 倍濃縮で検出できる物質の数に差が見られることがわかる。また有意水準 10%以上について考えると、20 倍濃縮において 100 倍濃縮よりもピークエリアが 2 倍以上となる物質が 5 つであるのに比べ、100 倍濃縮において 20 倍濃縮よりもピークエリアが 2 倍以上となる物質は 17 個検出された。このように低倍率では検出することのできない物質が数多く見られたため、本研究では濃縮倍率を 100 倍に設定した。また、これ以上の通水量の増大は必要とする試料量が大きくなり作業時間を要することとなる。このことから、これ以上の濃縮倍率についての検討は行わず、100 倍を基本的な濃縮倍率とし以降の検討を行った。

2. 濃縮方法の比較

まず、回収率を比較するために 100 倍濃縮時の TOC の値（注：濃縮倍率で割り戻した値）を比較する。PPL カートリッジを用いた濃縮における回収率の平均が 53.5%であるのに対し、乾燥濃縮を行った場合の回収率の平均は 99%であり、回収率は乾燥濃縮を用いた場合の方が高いことがわかる。

次に、乾燥濃縮後のサンプル内の組成について精密質量分析で分析した。図 3 が乾燥濃縮と PPL カートリッジを用いた 100 倍での濃縮を差異解析により比較したものである。乾燥濃縮後のサンプルは PPL カートリッジを用いた濃縮後のサンプルよりも多くの物質が検出されていることがわかる（左上に検出される分子が多いことに対応）。

さらに、乾燥濃縮および PPL カートリッジを用いて 100 倍濃縮したサンプルのマススペクトルを

比較した(図4および5)。強度自体は乾燥濃縮後のサンプル方が数倍強いものの、 m/z が数百の位置に最大値をとる溶存有機物に特徴的なスペクトルの概形は両者でおおよそ一致している。このことから、乾燥濃縮で無機物同時に濃縮されてもイオン化の阻害はそれほど強くないことわかる。あわせて m/z が500以上の範囲について拡大した精密質量スペクトルを図6および7にまとめた。乾燥濃縮を行ったサンプルのみ、 m/z が900-1500の範囲でピークが観察された。このことから、乾燥濃縮において物質の変性や汚染発生し可能性が考えられる。もしくはPPLカートリッジを用いた濃縮において高分子の物質が保持されなかった可能性や、保持はされたが離脱されなかった可能性が考えられる。ここでブランク試験としてそれぞれの濃縮法を、淀川急速ろ過水を濃縮した手順と同じ方法でMQWを用いて行った。その結果、いくつかのシグナルはブランク試料に含まれることがわかったが、対象試料を乾燥濃縮した場合に検出されたピークのうち多くが、ブランク試験では検出されなかった。したがって対象試料について乾燥濃縮を行ったサンプルについて検出されたマススペクトルは実際に対象試料に由来するものであるといえる。逆にPPLカートリッジを用いた濃縮で特に m/z が900-1500の範囲でピークが検出できなかったのは、その範囲のDOMをPPLカートリッジでは濃縮できないためと解釈できる。

次に検出された分子組成について考察を行った。上述の条件で乾燥濃縮とPPLカートリッジを用いて100倍濃縮を行った試料の精密質量分析結果をMQWの精密質量分析結果と比較し、有意水準5%以下で2倍以上増加している物質の組成について探索した。その結果乾燥濃縮を行った後の試料では82個、PPLカートリッジを用いた濃縮では26個が条件を満たした。条件を満たした分子の組成比を図8および9に示す。親水性化合物はアミノ基やカルボキシル基といった官能基を有すると考えられるため、疎水性の物質と比較してN/CやO/C比が大きくなる。また一方で疎水性化合物はH/C比が大きくなることが考えられる。図11より、乾燥濃縮の方が多くのO/C比が高い物質、つまり親水性物質を検出していることがわかる。ただし、PPLによる濃縮であっても、同等

のO/C比の物質を検出しており、PPLが疎水性の物質のみを多く回収するといった極端なバイアスは認められなかった。以上のことから、乾燥濃縮はPPLカートリッジを用いた濃縮よりも有機物の回収率が高く、共存する塩分による阻害も少なく、平等かつ高感度で濃縮できる方法であることが明らかになった。今後の課題としては、塩分等の共存物質による解析の妨害(例えばアダクトの生成など)の評価が挙げられる。

E. 結論

水中のDOMの挙動をOrbitrap質量分析計を用いて精密質量分析する場合に、感度と平等性の観点からは乾燥濃縮が優れていることを示した。ただし、乾燥濃縮は作業時間を要するため、高感度分析や親水性が高い物質に注目する場合は、乾燥濃縮が良いが、PPLでも一定程度親水性物質も回収できており、試料量が必要な解析や実験を併用する場合にはPPLを用いることが適切な場合もあると考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1.論文発表

該当なし

2.学会発表

該当なし

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む。)

1.特許取得

該当なし

2.実用新案登録

該当なし

3.その他

該当なし

表 1 分精密質量分析の条件

LC部		MS部	
機種	UltiMate 3000 UHPLC (Thermo Fisher Scientific)	機種	Q Exactive Focus
移動相	A液：MQW B液：メタノール	スキャンタイプ	Full MS
溶離条件	アイソクラティック (A,B液 50%)	ランタイム (分)	5
注入量 (μL)	20	イオン化法	HESI-
流量 (μL/分)	200	スキャン範囲	100-1500
分離カラム	なし	解像度	70000
		スプレー電圧 (kV)	4.5
		キャピラリー 温度 (°C)	400

表 2 PPL カートリッジによる回収率

濃縮倍率	MQW (mg/L)	ろ過水 (mg/L)	回収率 (%)
10 倍	0.248	0.857	63%
20 倍	0.274	0.853	60%
100 倍	0.215	0.751	55%

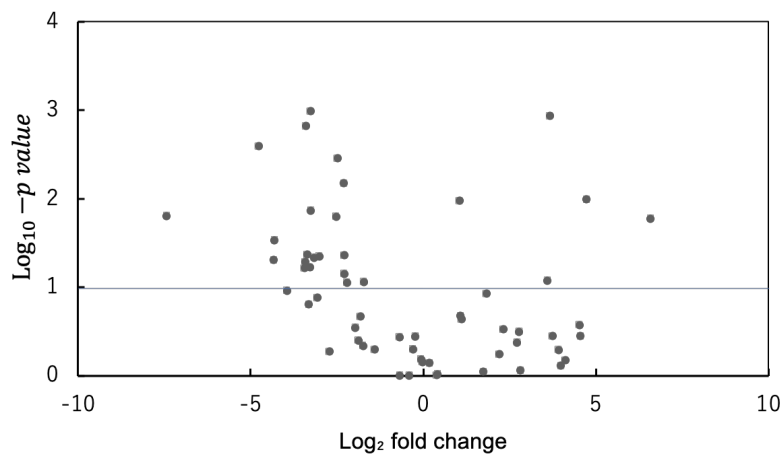


図 1 10 倍濃縮と 100 倍濃縮の比較（左側（横軸が負）のプロットは 100 倍の方が大きく、右側（横軸が正）のプロットは 10 倍の方が大きく検出されたシグナルを意味する。横線は有意水準 10% に対応）

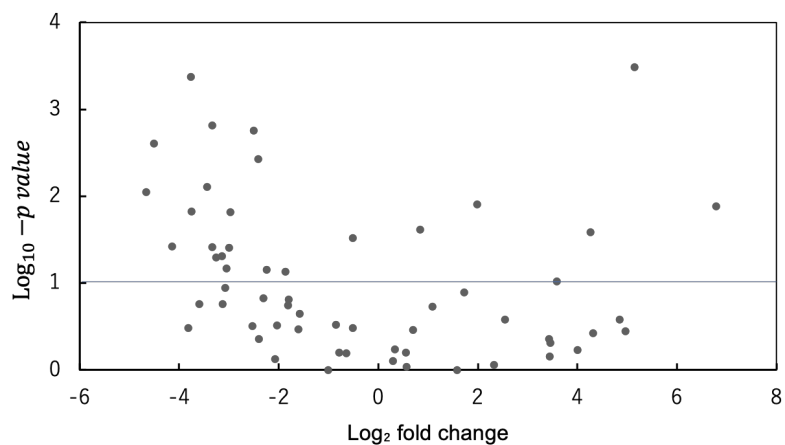


図2 20倍濃縮と100倍濃縮の比較（左側（横軸が負）のプロットは100倍の方が大きく、右側（横軸が正）のプロットは20倍の方が大きく検出されたシグナルを意味する。横線は有意水準10%に対応）

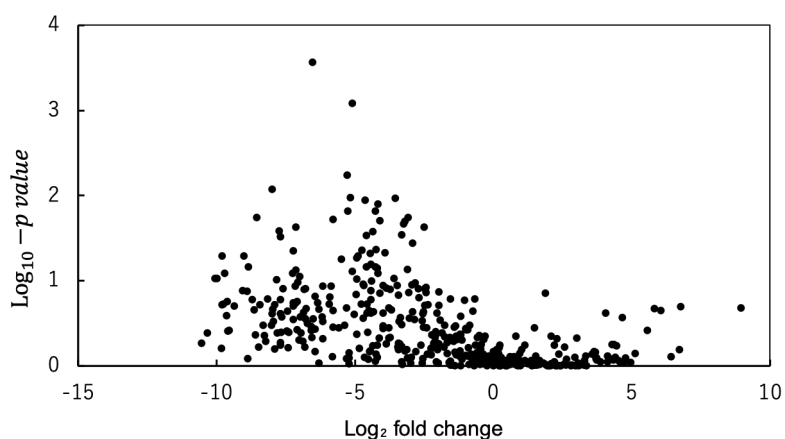


図3 PPLカートリッジを用いて100倍濃縮した試料と乾燥濃縮により100倍濃縮した試料の検出状況の比較（左側（横軸が負）のプロットは乾燥濃縮の方が大きく、右側（横軸が正）のプロットは固相抽出の方が大きく検出されたシグナルを意味する）

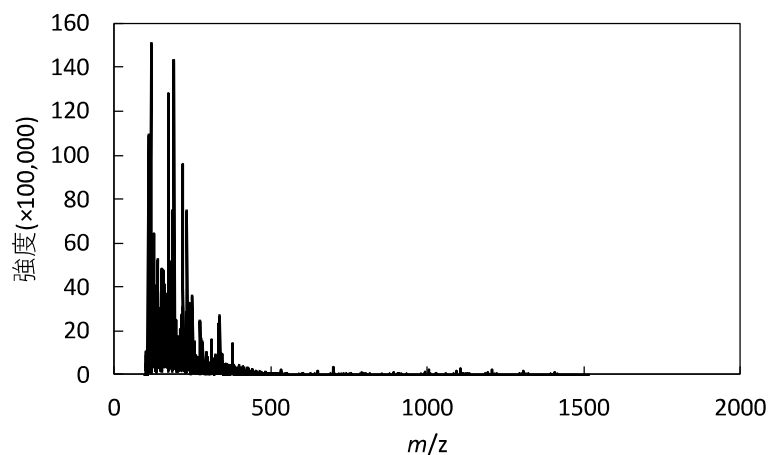


図4 PPLカートリッジによる濃縮後試料の精密質量スペクトル

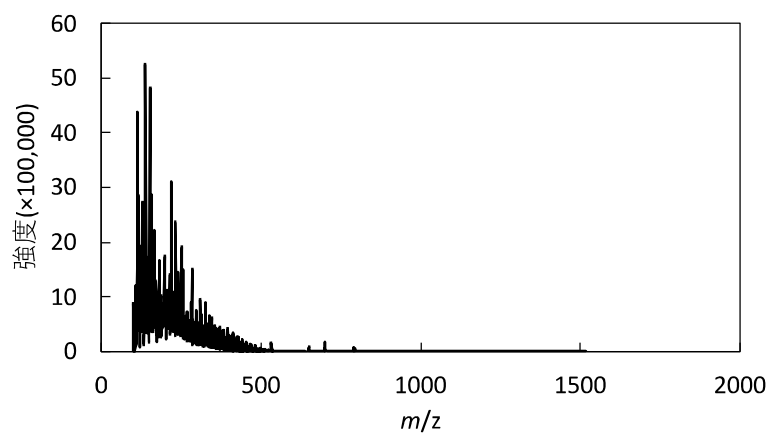


図5 乾燥濃縮による濃縮後試料の精密質量スペクトル

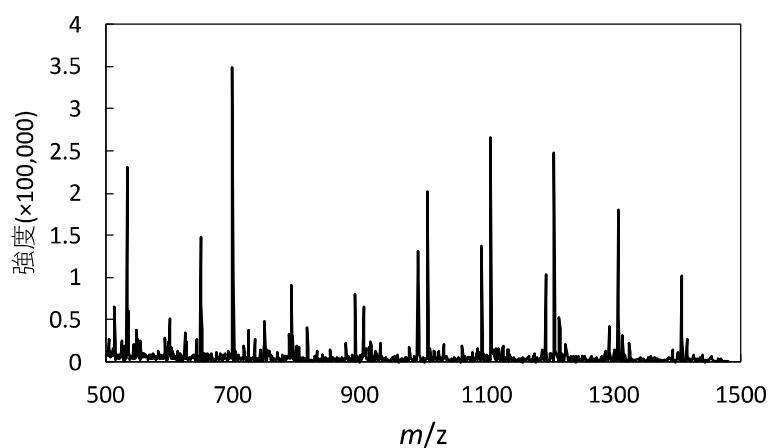


図6 乾燥濃縮による濃縮後試料の精密質量スペクトル($m/z > 500$)

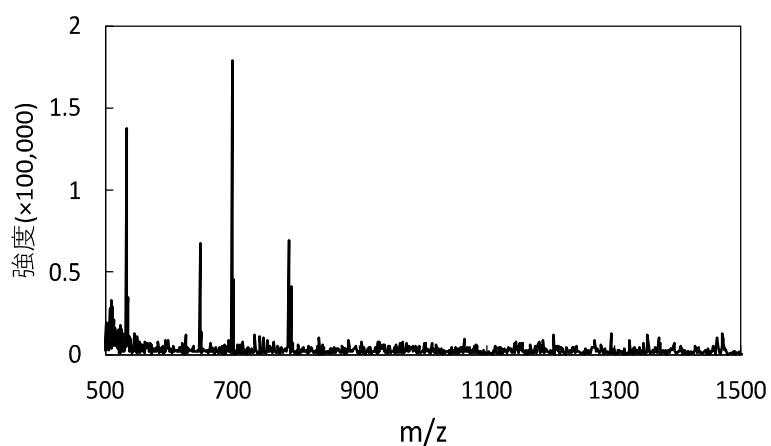


図7 PPL カートリッジによる濃縮後試料の精密質量スペクトル($m/z > 500$)

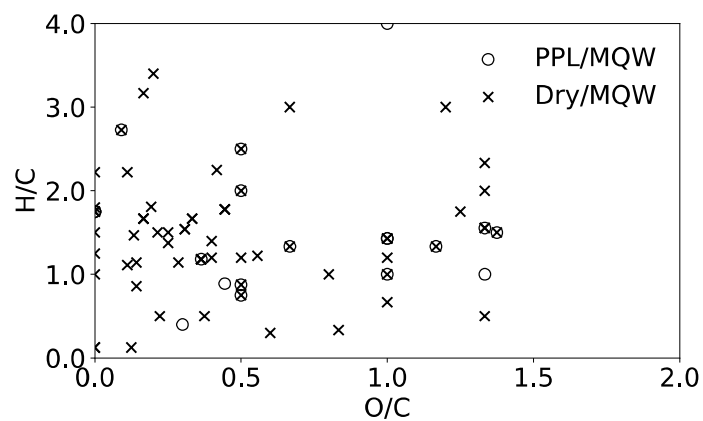


図8 検出された各 m/z の O/C 比と H/C 比 (PPL/MQW: 固相抽出による試料と超純水ブランクを比較して検出された m/z, Dry/MQW: 乾燥濃縮による試料と超純水ブランクを比較して検出された m/z)

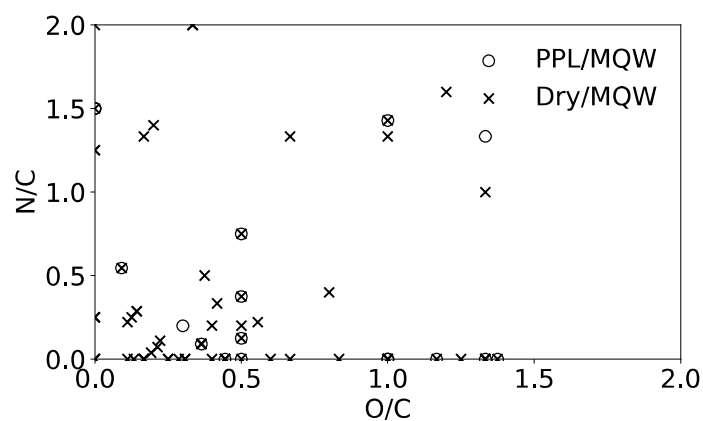


図9 検出された各 m/z の N/C 比と H/C 比 (PPL/MQW: 固相抽出による試料と超純水ブランクを比較して検出された m/z, Dry/MQW: 乾燥濃縮による試料と超純水ブランクを比較して検出された m/z)

