

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

DOMの精密質量スペクトルの差異解析により、地点間・季節間での比較が可能か琵琶湖・淀川水系の水試料を用いて評価した。その結果、地点間の差は固相抽出であっても乾燥濃縮であっても類似した差を見出すことができ、また各地点の特性と矛盾のないものであった。比較的濃縮操作の自動化が簡単な固相抽出であっても倍率を上げれば十分乾燥濃縮と同等の傾向が得られることを示した。一方で、同一地点での季節間の変化は、地点間の差よりも総じて小さく、濃縮方法によって異なる傾向が得られる場合があり、更に長期的なモニタリングを継続して年間を通じたバックグラウンドスペクトルを得た上で差異解析を行うことが望ましいことを指摘した。

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。水道原水中の 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、一昨年度は精密質量分析を各種の水道原水に適用し、溶存有機物のパターンから水源のタイプが判別できること等を示した。また昨年度は、試料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い、場合によっては乾燥濃縮のほうが良いとの結果を得た。本年度は、昨年度確立した方法を、同一水系内の複数の地点や、同一地点でも採水時期が異なる試料に適用し、有機物組成の差や変動を捉えることができるか、また、乾燥濃縮と固相

抽出でその結果に差が見られるか検討を行った。

B. 研究方法

1. 試料及実験の構成

採水地点としては、琵琶湖淀川流域内の琵琶湖水 (大津港)、淀川水 (枚方大橋左岸)、桂川水 (下水処理施設放流口直下) の 3ヶ所を対象とした。また、これらの地点について夏季と秋季に採水を行い、地点間と採水時期の違いについて差異解析を行った。あわせて、藻類増殖時と非増殖時の琵琶湖水 (琵琶湖疏水) の DOM の精密質量スペクトルの比較を行った。

2. 固相抽出

昨年度同様、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を 20 mL/min で通水した (通水量は濃縮倍率によって適宜変更した)。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・乾固を行った後に超純水(以下 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。原則として濃縮倍率は 100 倍とした。試験管の容量が限られるため、10 mL の試料を 5 本用意し、それぞれ 2 mL まで濃縮した後混合し、再度合計 10 mL の試料とし、これを 0.5 mL となるように濃縮した。

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 MQW で再希釈を行った。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。測定条件は原則昨年度確立した方法と同様で、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。用いた分析条件を表 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再検討

PPL カートリッジを用いて 100 倍と 1000 倍に濃縮をした琵琶湖水(夏季)の精密質量スペクトルを差異解析で比較した(図 1 (左))。琵琶湖水の場合は、1000 倍の方がシグナルが大きいピークが多く見られ(図の第 1 象限にプロットが多いことに対応する)、1000 倍の方が強いシグナル強度または多種のピークが得られることが確認できる。TOC の回収率をみても(表 2 の右側の列)、100 倍と 1000 倍の回収率にはそれほど大きな差は見られず、琵琶湖淀川水系あるいは我が国の多くの水道水源(TOC がそれほど高くない状況を想定)について固相抽出を行う場合は、通水に要する時間も 100 分程度であることから、1000 倍程度

の濃縮倍率が適していると考えられる。

乾燥濃縮と固相抽出の TOC の回収率を比較すると、乾燥濃縮で 100 倍に濃縮した試料が 80%前後であるのに対し、固相抽出(表 1 中の PPL の列) 100 倍では、60%前後、1000 倍では 40-50%であった。このことから、乾燥濃縮の方が、平等な濃縮法といえるが、濃縮の手間(作業ステップ数や時間)、さらには共存無機イオンの影響が解釈を難しくする可能性を考慮すると、この程度のロスがあるとしても固相抽出に依存せざるを得ない場合もある。実際、固相抽出と乾燥濃縮を濃縮倍率 100 倍同士で比較すると(図 1 (右))、若干乾燥濃縮の方が有意に大きいピークがあるが、その数は限定的であり、少なくともイオン化する物質についてはそこまで濃縮方法バイアスが存在するとはいえない。上記のことを踏まえ、以下ではより実際の試料について、できる限り固相抽出による 1000 倍濃縮試料と乾燥濃縮による 100 倍濃縮試料を用いた分析結果を並列して表示し、比較することとした。

2. 異なる地点間の差異解析

図 2 に琵琶湖水試料と桂川水試料を比較した結果を示す。左側が乾燥濃縮、右側が固相抽出の結果である。いずれの濃縮方法でも差のあったピークの分布傾向は類似しており、桂川水試料の方が濃度が高い物質が多数含まれていること、また少数ではあるが琵琶湖水にしか含まれていない、あるいは琵琶湖水の方が濃度が高い物質があることが示されている。この傾向は桂川水試料は有機物濃度が高く、下水処理水の影響を受けており琵琶湖水とは組成が大きく異なると推定されることを考えると妥当と判断できる。なお、固相抽出では TOC としてのロスがあることを先に指摘したが、差異解析の結果、同等の結果が得られることが確認できた。

次に同時期の琵琶湖水試料と淀川水試料の比較結果を図 3 に示す。図 2 同様、左側が乾燥濃縮、右側が固相抽出の結果である。まず、明瞭な傾向として図 2 と比べると有意差のあるピーク(物質)が少ない(つまり p 値を示す y 軸の数値が 2 を超えるものが少ない)。これは、淀川水の大部分が琵琶湖水に由来し、その組成に関してある程度の類似性があることを反映したものと考えられる。図 2,3 の結果から質量スペクトルの差は琵琶湖淀川水系の各地点あるいは水の流れを反映した妥当なものといえることができる。また、乾燥濃縮と固相抽出を比較すると、淀川の方が濃度の高い物質が多い(かつ有意差が明瞭)という傾向では一致しており、同等の結果が得られた。

図 4 は淀川水を基準に桂川水と差異解析を行ったものである。先述のように琵琶湖水と淀川水の類似性が高いため、当然ではあるが、図 2 同様桂

川水に特有の物質が多数検出されその傾向は、乾燥濃縮と固相抽出で同様であった。以上の3つの比較から、精密質量スペクトルの差異解析により同一水系内であってもその差を捉えることが可能であり、またこのことは固相抽出法によっても可能であることがわかった。

3. 季節間の比較

図5に琵琶湖水について夏季と秋季を比較したものを示す。第1象限にプロットがあれば、夏季が、第2象限にプロットがあれば秋季の方が大きいピークの存在を意味する。乾燥濃縮、固相抽出いずれの場合も夏季の方が濃度が高い物質が多い傾向にあったが、固相抽出の方が傾向がより明瞭であった。有機物の回収率は固相抽出の方が低いが、濃縮倍率が高いため明確な差が検出しやすくこのような結果になったものと考えられる。

淀川水の比較についても固相抽出では、夏季の方が高い物質が多いという琵琶湖水と同様の結果が得られたが、乾燥濃縮については、有意差のある物質がほとんど検出されなかった（逆に秋季の方が濃度が高い物質が少数存在した）（図6）。このように、試料によっては濃縮方法に依存して差異解析の結果が異なることがあるので注意が必要であることがわかった。

図7は桂川水について夏季と秋季で差異解析を行ったものである。固相抽出（右側）については、明瞭に夏季の方が多数の有機物が検出されているが、乾燥濃縮による場合は、夏季の方が高い物質も検出されたが、濃度の倍率は高くないものの秋季の方が高い物質が多数検出された。この2つの濃縮方法による差が何を意味するかは、今後もモニタリングを続け、他の水質指標との関連性を評価する必要があるが、濃縮方法により差異解析の結果に明瞭な違いが現れ得ることが示された。

4. 藻類増殖時と非増殖時の差異解析

琵琶湖水について、藻類の増殖が見られた場合（カビ臭物質の存在により確認）とそうでない場合（平常時）の間で、差異解析をした結果を、図8に示す。藻類増殖がない（少ない）場合の方が検出される物質数が多いという結果になった（注：試料量の関係で固相抽出により濃縮した場合の比較に限定している）。この結果は、藻類増殖時と非増殖時のDOM組成の変化を検知している

といえる。一方で、増殖時になぜ検出される物質が減少するのか、現段階では原因は不明であり、今後も長期的にモニタリングを続ける必要がある。

E. 結論

DOMの精密質量スペクトルの差異解析から、地点間・季節間での比較が可能か、琵琶湖淀川水系において調査を行った。その結果、地点間の差は固相抽出であっても乾燥濃縮であっても類似した差を見出すことができ、また各地点の特性と矛盾のないものであった。比較的濃縮操作の自動化が簡単な固相抽出であっても倍率を上げれば十分乾燥濃縮と同等の傾向が得られることがわかったのは重要な成果といえる。一方で、同一地点での季節間の変化は、地点間の差よりも総じて小さく、濃縮方法によって異なる傾向が得られる場合があり、更に長期的なモニタリングを継続して年間を通じたバックグラウンドスペクトルを得た上で差異解析を行うことが望ましいと考えられた。

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 夏季採水時の試料の TOC と各濃縮法による回収率
(%で表示されている数字が回収率を示す)

濃縮法	MQW (mg/L)	淀川 (mg/L)	桂川 (mg/L)	琵琶湖 (mg/L)
乾燥濃縮 (100倍)	0.06 <	1.4 (84.7%)	2.3 (79.2%)	1.1 (74.6%)
PPL (100倍)	0.107	1.0 (64.3%)	1.7 (58.6%)	0.8 (56.0%)
1000倍濃縮	0.102	0.6 (38.9%)	1.49 (46.9%)	0.7 (48.4%)
濃縮前	0.06 <	1.6	3.0	1.5

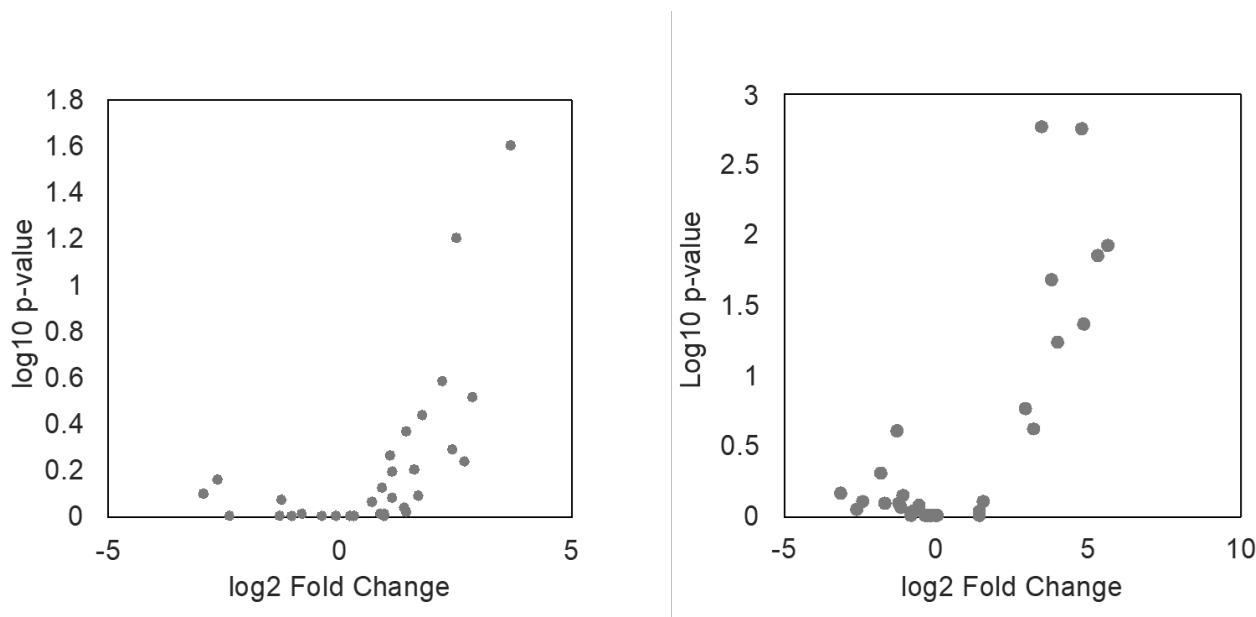


図 1 固相抽出による濃縮倍率の比較（左側，1000 倍と 100 倍）と乾燥濃縮と固相抽出の比較（右側，ともに 100 倍濃縮）。左側では 1000 倍の方がシグナルが大きい質量数について，右側では乾燥濃縮の方がシグナルが大きい質量数について右側（第 1 象限）にプロットが現れる。夏季における琵琶湖水の結果を示している。

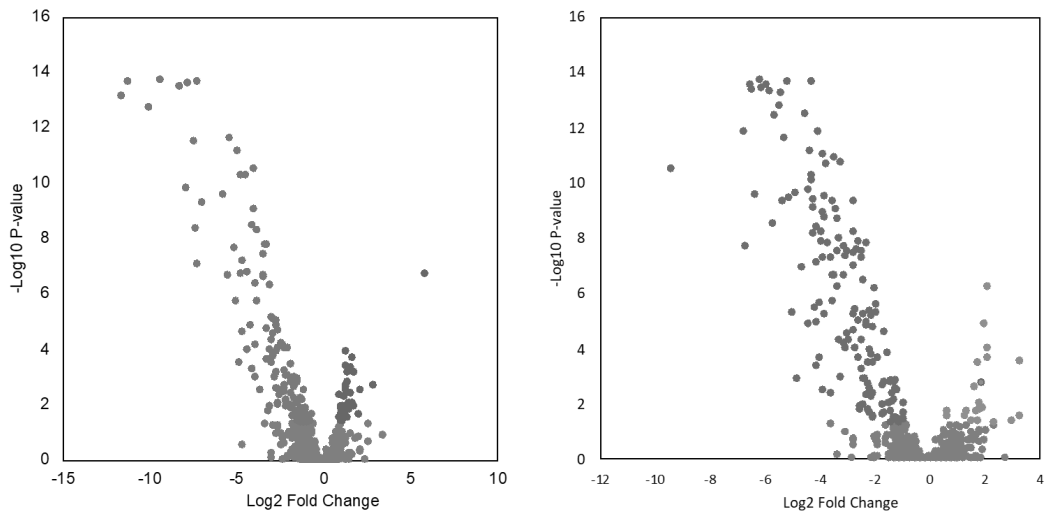


図2 琵琶湖水と桂川水（夏季）の比較（左側，乾燥濃縮；右側，固相抽出）. 琵琶湖水の方がシグナルが大きい質量数について右側（第1象限）にプロットが現れ，桂川水の方がシグナルが大きい質量数については左側（第2象限）にプロットが現れる.

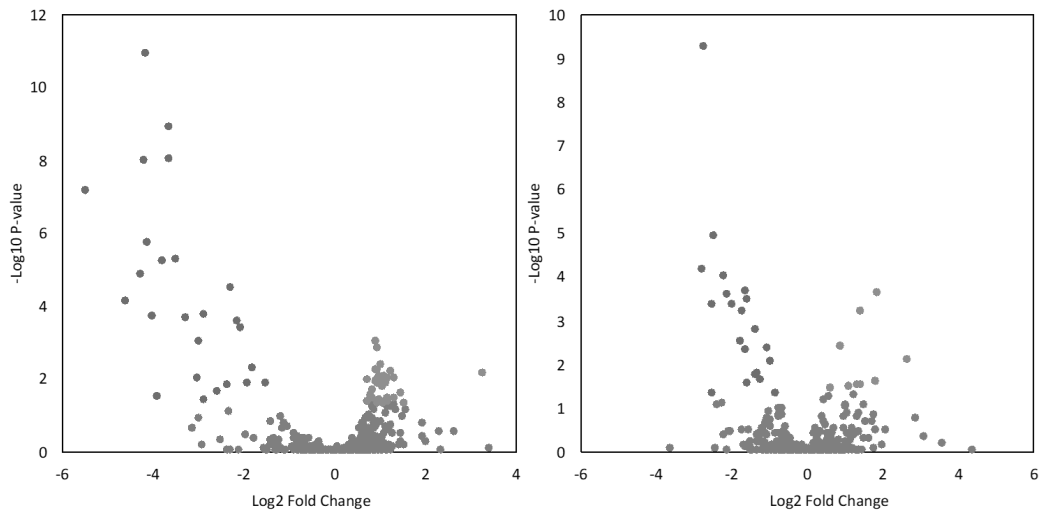


図3 琵琶湖水と淀川水（夏季）の比較（左側，乾燥濃縮；右側，固相抽出）. 琵琶湖水の方がシグナルが大きい質量数について右側（第1象限）にプロットが現れ，淀川水の方がシグナルが大きい質量数については左側（第2象限）にプロットが現れる.

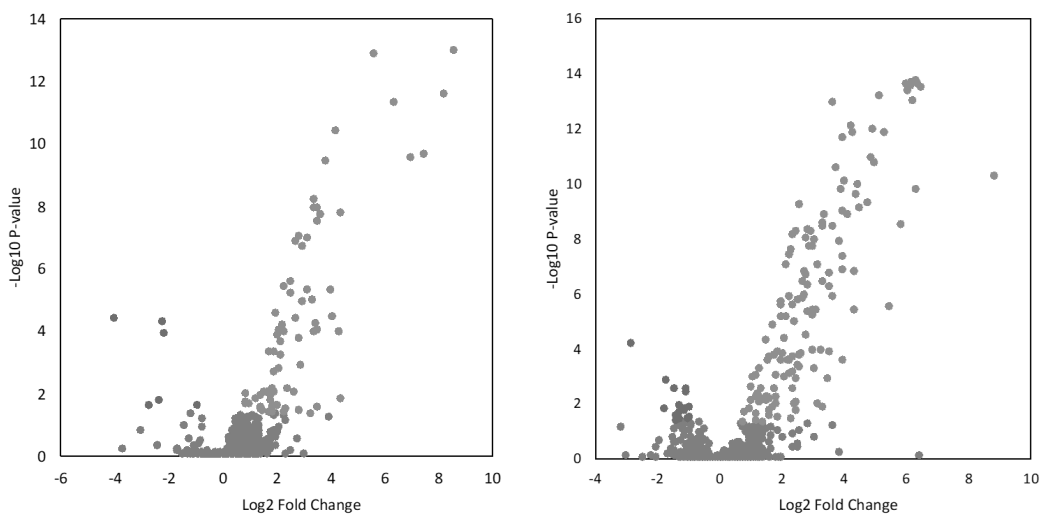


図4 淀川水と桂川水（夏季）の比較（左側，乾燥濃縮；右側，固相抽出）. 淀川水の方がシグナルが大きい質量数について右側（第1象限）にプロットが現れ，桂川水の方がシグナルが大きい質量数については左側（第2象限）にプロットが現れる.

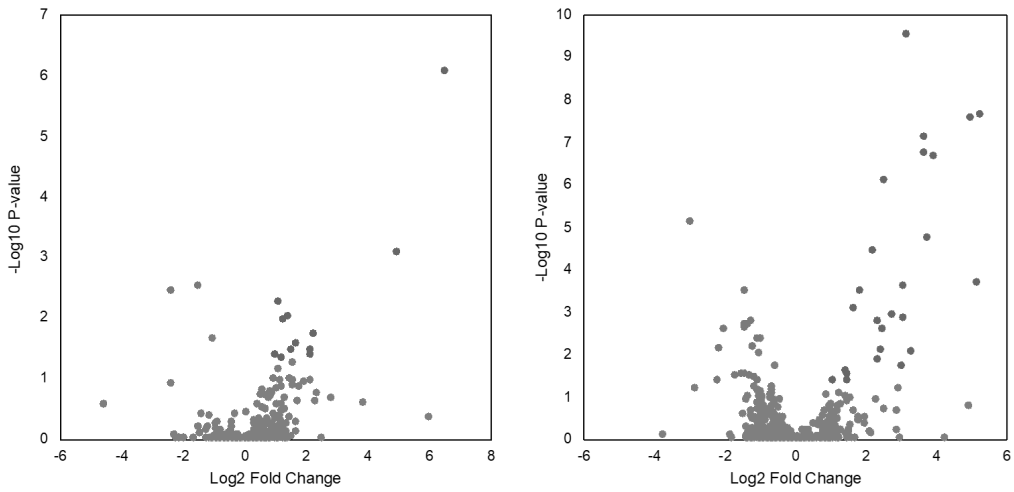


図5 琵琶湖水についての夏季と秋季の比較（左側，乾燥濃縮；右側，固相抽出）。夏季の方がシグナルが大きい質量数について右側（第1象限）にプロットが現れ，秋季の方がシグナルが大きい質量数については左側（第2象限）にプロットが現れる。

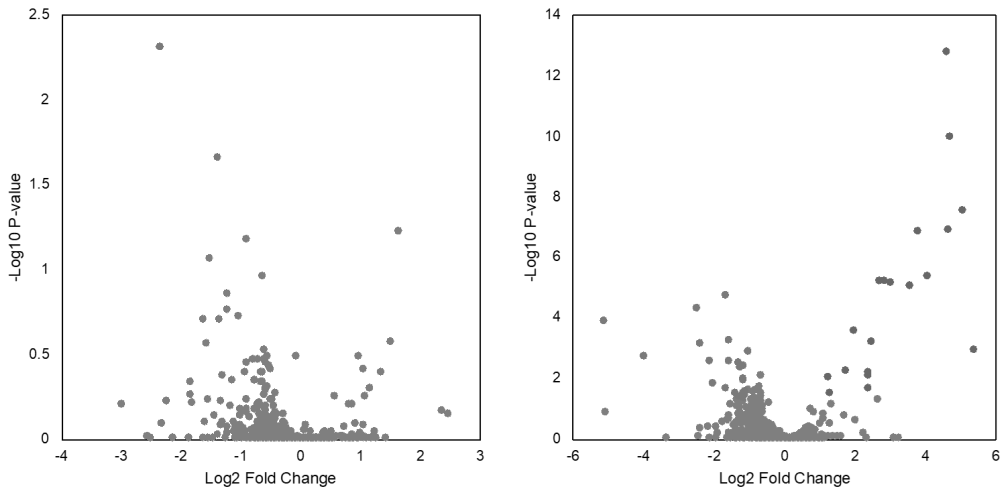


図6 淀川水についての夏季と秋季の比較（左側，乾燥濃縮；右側，固相抽出）。夏季の方がシグナルが大きい質量数について右側（第1象限）にプロットが現れ，秋季の方がシグナルが大きい質量数については左側（第2象限）にプロットが現れる。

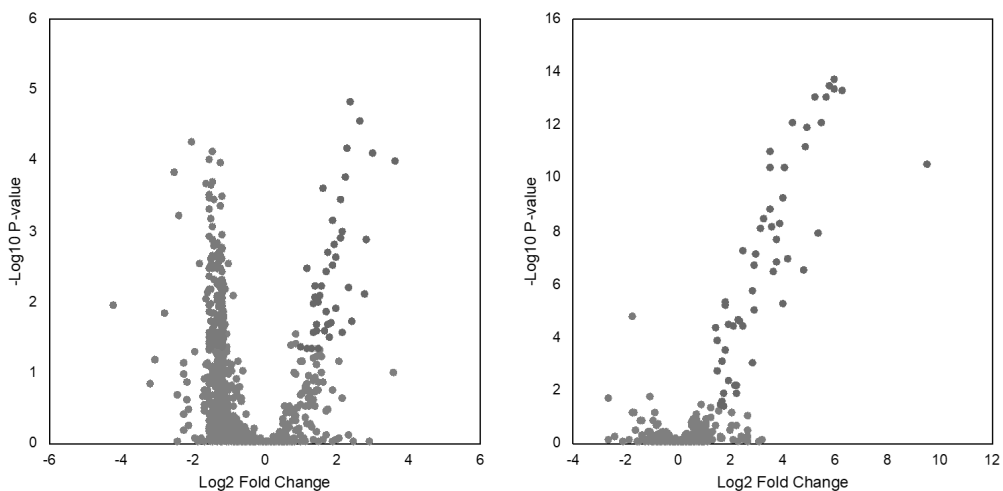


図7 桂川水についての夏季と秋季の比較（左側，乾燥濃縮；右側，固相抽出）。夏季の方がシグナルが大きい質量数について右側（第1象限）にプロットが現れ，秋季の方がシグナルが大きい質量数については左側（第2象限）にプロットが現れる。

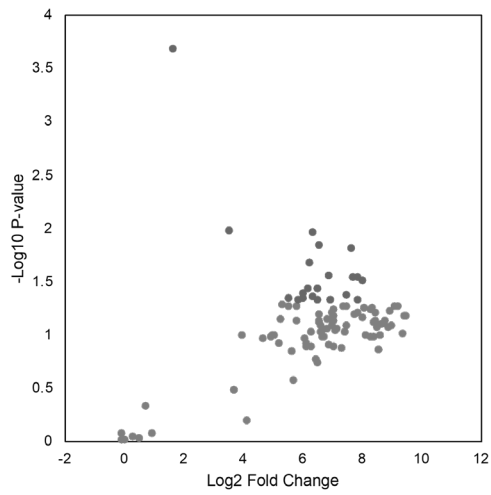


図8 藻類非発生時と発生時の比較（左側，乾燥濃縮；右側，固相抽出）. 非発生時の方がシグナルが大きい質量数について右側（第1象限）にプロットが現れ，発生時の方がシグナルが大きい質量数については左側（第2象限）にプロットが現れる.

