

機関番号：24506

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20510014

研究課題名 (和文) 物理・化学特性に立脚した天然水中溶存有機物の分画と FT-ICRMS を用いた同定

研究課題名 (英文) Characterization of natural dissolved organic matter using Chemical and Physicochemical fractionation and FT-ICR MS analysis

研究代表者

杉山 裕子 (SUGIYAMA YUKO)

兵庫県立大学・環境人間学部・准教授

研究者番号：40305694

研究成果の概要 (和文)：C18, XAD 固相抽出により得られる天然水溶存有機物抽出物の化学的特徴を比較した。滋賀県琵琶湖北湖にて採取した湖水を C<sub>18</sub> 固相抽出ディスク・XAD 樹脂に担持させ、溶離した試料を三次元励起蛍光スペクトル測定・<sup>13</sup>C NMR 測定・フーリエ変換イオンサイクロトロン質量分析 (FT-ICR MS) を行い特徴を比較した結果、XAD 抽出においては蛍光性有機物や不飽和有機物が、C18 抽出においては多糖類が特徴的に吸着されていることが分かった。

研究成果の概要 (英文)：

Organic fractions separated from Lake Biwa surface water were subjected to C<sub>18</sub> and XAD SPE to be analyzed by Excitation-emission matrix (EEM) fluorescence spectroscopy, <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy, and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR MS). C<sub>18</sub>-DOM appeared to be rich in polysaccharides. From FT-ICR MS analysis, lignin-like molecules were found to be a main component of the both of C18 and XAD-DOM fractions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：溶存有機物、分画、FT-ICR MS

## 1. 研究開始当初の背景

天然水中の溶存有機物 (Dissolved Organic Matter, DOM) は大気中二酸化炭素に匹敵する現存量を有し、炭素の地球循環において無視できない成分である。また、DOM は錯生成などにより金属イオンを安定化し、あるいは懸

濁物やコロイド粒子に吸着してその表面電荷に影響を与えることにより無機元素の水圏における滞留時間に影響を与え、有機汚染物質とも錯生成などによりその水中での安定性や生物への毒性に影響を与える事が知

られている。それに加え、DOM は水圏への光の透過を支配し、バクテリア生産速度を支配することによって一次生産や微生物食物網などの水圏生態系にも大きな影響を与える。DOM はこれら様々な機能により、水圏における物質循環を支配しているため、その存在形態や存在量を把握することは非常に重要である。しかしながら、天然水、特に有色水系以外の水中溶存有機物濃度は 1 mg C/L 程度と非常に低く、化合物レベルではさらに低濃度であるため、分析法の限界から、従来溶存有機物の組成に関する研究は、有機物を分子サイズ、あるいは親水性-疎水性や酸-塩基などの分子の物理・化学的特性から相互に分離濃縮し、それぞれの分画について、固体  $C_{13}$ -NMR スペクトル分析や元素組成比分析、あるいは三次元励起蛍光分析など、総体としての性質を解明する、バルクキャラクタリゼーション法を主に用いて行われてきた。

今井らは、霞ヶ浦および流入河川水において、化学的性質(疎水性-親水性, 酸-塩基)による化学的分画法を溶存有機物に適用し、これと生分解実験を組み合わせた結果から、親水性酸が湖沼での COD 上昇に寄与する主な難分解性有機物であるということを報告した。化学操作により有機物を分離していくこの種の分画法は、操作自体に化学的意味があり、分離は有機分子の部分構造や官能基組成などを反映していると考えられるため分画法として一定の地位を確保している。また、この種の化学分画と分画有機物の機能性を結びつける研究も疎水性酸(いわゆる腐植酸)を中心に、数多く行われている。しかしながら、この図を構成するそれぞれの分画が含む有機物の分子種や起源に関する研究は進んでおらず、特に親水性の有機物に関しては全く行われていない。

一方で、最近 20 年の間に分析機器、特に質

量分析器は急速に進歩してきた。イオンサイクロトロン共鳴型質量分析器(FT-ICRMS)の開発により、極めて分解能の高い質量分析が可能になり、この方法とエレクトロスプレーイオン化方式を組み合わせ、腐植物質などの天然有機物同定の試みがされるようになってきた。12 テスラの超伝導マグネットを備えた装置を使用すれば、 $m/z=400$  付近でピーク分解能( $m/\delta m_{50\%}$ ) 100 万以上を達成でき、総分子イオンピークの 70%程度のピークについて分子式を得ることが可能である。この装置により、溶存有機物の分子レベルでのキャラクタリゼーションの世界が拓かれつつある。

## 2. 研究の目的

我々は、天然水試料として琵琶湖水とその集水域の試料を用い、それらの溶存有機物を化学的特性および分子サイズにより分離し、各分画に含まれる有機物を FT-ICRMS を用いて網羅的に同定して化合物レベルでの情報を得るという手順で研究を進める。FT-ICR MS 分析により得られた分子式データから、たとえばそれぞれの分子式の元素比を用いて分画分子種の違いを推測・比較することができる。また、バルクキャラクタリゼーションによる分子量の分布や元素組成比、蛍光スペクトル、NMR スペクトルなどの特徴とこの質量分析結果を合わせ、それぞれの分画を構成する有機物の主な起源についても考察する。

## 3. 研究の方法

研究は、以下のように行った。

琵琶湖の北湖最深部 T1 地点および N4 地点において、年間約 4 回(5 月、8 月、11 月、2 月)のサンプリングを行い、琵琶湖溶存有機物を化学的特性および分子サイズにより分離した。濾過試料は神戸大農学部土壌学研究室所有の自動腐植物質抽出装置の GF/F

カートリッジを通過したものを採取することにより得、同装置より、さらに XAD 樹脂を通過した湖水も採取した。バルク溶存有機物、XAD 濃縮有機物、C18 濃縮有機物、高分子濃縮有機物、低分子有機物の 5 種の試料について、蛍光分析、質量分析(濃縮試料のみ)、NMR 分析(濃縮試料のみ)を行った。

#### 4. 研究成果

C<sub>18</sub> ディスク, XAD 樹脂への琵琶湖水中溶存有機物の吸着率はそれぞれ、43%, 39%であり、C<sub>18</sub> 法は XAD 法よりも高い吸着率で DOM を捕集していることがわかった。

両法により抽出された有機物に対し三次元励起蛍光測定を行った結果、どちらの試料においても 4 種類の腐植様蛍光ピーク (H-A (C<sub>18</sub> 吸着 DOM 試料 : Ex/Em = 330/409, XAD 吸着フルボ酸試料 : Ex/Em = 330/413 nm), H-B (C<sub>18</sub> 吸着 DOM 試料 : Ex/Em = 255/407, XAD 吸着フルボ酸試料 : Ex/Em = 265/410 nm), H-C (C<sub>18</sub> 吸着 DOM 試料 : Ex/Em = 340/452, XAD 吸着フルボ酸試料 : Ex/Em = 335/443 nm), H-D (C<sub>18</sub> 吸着 DOM 試料 : Ex/Em = 265/455, XAD 吸着フルボ酸試料 : Ex/Em = 270/450 nm)) が観測され、H-A のピーク位置の波長に蛍光を有し、よりモル吸光係数の大きい化合物が XAD 樹脂により捕集されていること、H-A のピーク位置が固相抽出試料において両者ともに湖水試料における H-A のピーク位置よりも長波長側で観測されたことから、より不飽和度の高い有機物が優先的に吸着捕集されていることが示唆された。

また、NMR 分析では、C<sub>18</sub> 固相抽出法の方が IHSS 法よりも多糖類の吸着捕集に優れているということが示唆された(図 1)。

FT-ICRMS 解析によると、C<sub>18</sub> 吸着 DOM 試料、XAD 吸着フルボ酸試料ともに、ほとんどの質量イオンピークが m/z 値 1000 以下で検出さ

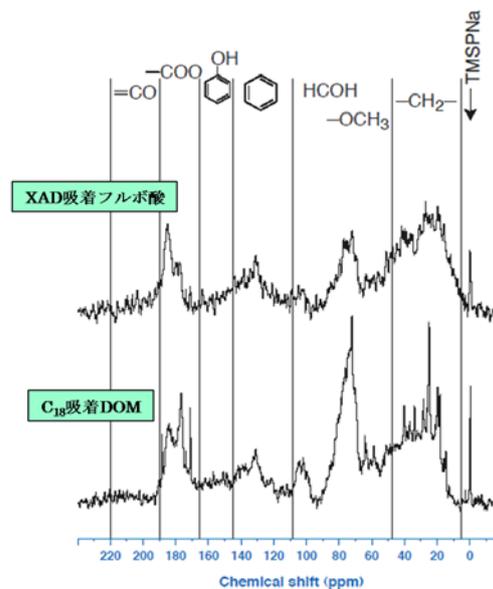


図 1 XAD 吸着フルボ酸・C<sub>18</sub> 吸着 DOM の NMR スペクトル

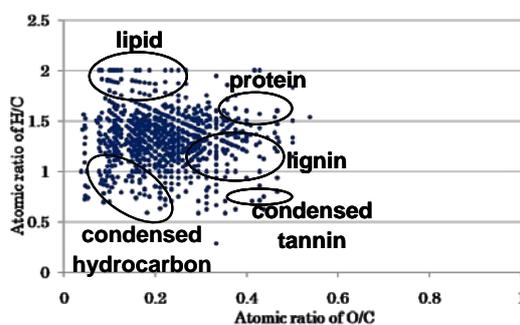


図 2 XAD 吸着フルボ酸の van Krevelen Diagram

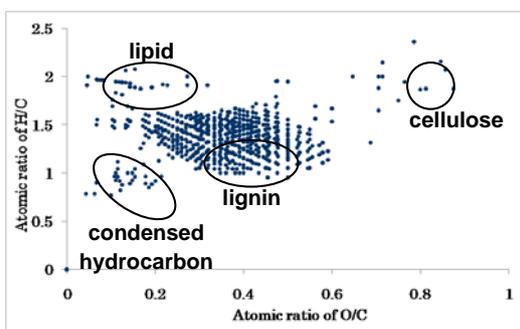


図 3 C<sub>18</sub> 吸着 DOM の van Krevelen Diagram

れ、両者の質量イオンピーク数はそれぞれ、1244, 447 であった。また、van Krevelen Diagram (図 2, 図 3) による解析により、C<sub>18</sub> 吸着 DOM 試料、XAD 吸着フルボ酸試料はともにリグニン様物質の領域に主に分布していることが示唆された。また、両試料に共通して脂質様物質、縮合型炭化水素が検出される

領域にピークが検出された。さらに、C<sub>18</sub> 吸着 DOM 試料には多糖類が、XAD 吸着フルボ酸試料にはタンパク様物質、縮合型タンニン様物質が加わっていることが示唆された。

また、高分子量分画試料、C<sub>18</sub> 吸着 DOM 試料の比較においては、両分画ともにリグニン様物質(H/C = 0.9–1.3, O/C = 0.3–0.5), タンパク様物質(H/C = 1.5–1.8, O/C = 0.4–0.5)を多く含んでおり、これに加え、高分子量分画試料には不飽和度の高いフミン酸(H/C = 0.2–0.7, O/C = 0.1–0.6)と加水分解性のタンニン(H/C = 0.5–1.0, O/C = 0.4–0.5)が、C<sub>18</sub> 吸着 DOM 試料には多糖類(H/C = 1.6–1.9, O/C = 0.8–0.9)と縮合型炭化水素(H/C = 0.4–1.0, O/C = 0.1–0.3)が含まれていることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① 杉山裕子: 近年の腐植物質分析法の展開 5. サイクロトロン質量分析, 日本土壤肥料学会誌, 査読有, 81, 162-167 (2010)
- ② Chizuru Wada, Kazuhide Hayakawa, Tomoyo Suzuki, Tetsu Kumagai, Yuko Sugiyama: Characterization of UV-absorbing Organic Matter in Lake Biwa Using High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 査読有, 30, 1520-1524 (2010)
- ③ Kazuhide Hayakawa, Yuko Sugiyama: Variability in downward attenuation of ultraviolet radiation in Lake Biwa, *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 査読有, 30, 1202–1206 (2009)
- ④ 早川和秀, 杉山裕子, 和田千弦, 鈴木智代, 丸尾雅啓, 永岡一樹, 竹田一彦, 中谷暢丈, 国歳拓, 杉山雅人: 紫外線が琵琶湖の水質へ及ぼす影響評価 - 紫外線吸収物質と光反応の検討 -, 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター試験研究報告, 査読無, 4, 74-92 (2009)
- ⑤ 杉山裕子, Patrick G. Hatcher, 鈴木智代, 和田千弦, 熊谷哲, 三田村緒佐武, 片野俊也, 中野伸一, 田中祐志, Valentin V. Drucker, Vladimir A. Fialkov, 杉山雅人: バイカル湖最深部における外来性溶存有機物の役割, 日本 BICER 協議会年報,

査読無, 6-11 (2008)

- ⑥ 杉山裕子, Patrick G. Hatcher, 三田村緒佐武, 片野俊也, 熊谷哲, 中野伸一, Valentin V. Drucker, Vladimir A. Fialkov, 杉山雅人: 超高分解能 FT-ICRMS を用いた天然水中未同定溶存有機物の解明, 地球化学, 査読有, 42, 163-175 (2008)
- ⑦ Tomoyo Suzuki, Yuko Sugiyama, Chizuru Wada, Tetsu Kumagai, Seiya Nagao, Toshiya Katano, Shin-ichi Nakano, Osamu Mitamura, Yoshiki Matsuura, V.V. Drucker, V.A. Fialkov, Masahito Sugiyama: Role of allochthonous organic matter in Lake Baikal investigated by a three-dimensional fluorescence excitation-emission matrix spectroscopy and high performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 査読有, 30, 469-476 (2008)
- ⑧ Toshiya Katano, Shin-ichi Nakano, Osamu Mitamura, Haruko Yoshida, Hisayuki Azumi, Yoshiki Matsuura, Yuji Tanaka, Hiraku Maezono, Yasuhiro Satoh, Takeshi Satoh, Yuko Sugiyama, Yasunori Watanabe, Tetsuro Mimura, Yuki Akagashi, Hiroshi Machida, Valentin V. Drucker, Irina Tikhonova, Olga Belykh, Vladimir A. Fialkov, Myung-Soo Han, Sung-Ho Kang, and Masahito Sugiyama: Abundance and pigment type composition of picocyanobacteria in Barguzin Bay, Lake Baikal, *Limnology*, 査読有, 9, 105-114 (2008)

[学会発表] (計 25 件)

- 1) 北野史子, 早川和秀, 西本鷹耶, 小島礼慈, 原都, 熊谷哲, 高橋勝利, 藤嶽暢英, 杉山裕子: 限外ろ過・C<sub>18</sub> 固相抽出法による琵琶湖溶存有機物の分離と特徴の比較, 日本陸水学会近畿支部会, 地方職員共済組合 有馬保養所 瑞宝園 (2011)
- 2) 小島礼慈, 杉山裕子, 早川和秀, 和田千弦, 石川阿奈子, 岡本高弘, 丸尾雅啓, 神澤真一, 奥村亮二, 藤原学, 熊谷哲: PARAFAC を使用した琵琶湖蛍光性 DOM の起源の推定, 日本陸水学会近畿支部会, 地方職員共済組合 有馬保養所 瑞宝園 (2011)
- 3) Fumiko Kitano, Takaya Nishimoto, Chizuru Wada, Tetsu Kumagai, Jun Shimano, Masahiro Maruo, Kumiko Tsuda, Hidekado Shirai, Nobuhide Fujitake, Kazuhide Hayakawa, Patrick Hatcher, Yuko Sugiyama: Chemical Characterization of Dissolved Organic Matter in Lake Biwa Using C<sub>18</sub> Solid Phase Extraction, PACIFICHEM, Hawaii (2010)
- 4) Fumiko Kitano, Takaya Nishimoto, Chizuru Wada, Tetsu Kumagai, Jun Shimano, Masahiro Maruo, Kumiko Tsuda, Hidekado Shirai, Nobuhide Fujitake, Kazuhide Hayakawa, Patrick Hatcher, Yuko Sugiyama: Chemical Characterization of

- Dissolved Organic Matter in Lake Biwa Using  $C_{18}$  and DAX8 Solid Phase Extraction, 日本腐植物質学会, 筑波大学 (2010)
- 5) 小島礼慈, 杉山裕子, 早川和秀, 和田千弦, 西本鷹耶, 石川向奈子, 丸尾雅啓, 神澤真一, 奥村亮二, 藤原学, 熊谷哲: PARAFACを使用した琵琶湖溶存有機物の三次元励起蛍光スペクトルの解析, 日本腐植物質学会, 筑波大学 (2010)
  - 6) 北野史子, 早川和秀, 西本鷹耶, 小島礼慈, 原都, 熊谷哲, 高橋勝利, 藤嶽暢英, 杉山裕子:  $C_{18}$  固相抽出・限外ろ過によって分画された琵琶湖溶存有機物の特徴の比較, 日本陸水学会第75回大会, 弘前大学 (2010)
  - 7) 小島礼慈, 杉山裕子, 早川和秀, 和田千弦, 西本鷹耶, 石川向奈子, 丸尾雅啓, 神澤真一, 奥村亮二, 藤原学, 吉岡崇仁, 熊谷哲: PARAFACを使用した琵琶湖溶存有機物の三次元励起蛍光スペクトルの解析, 日本陸水学会第75回大会, 弘前大学 (2010)
  - 8) 西本鷹耶, 早川和秀, 北野史子, 原都, 小島礼慈, 熊谷哲, 杉山裕子: 限外ろ過・ $C_{18}$  固相抽出による琵琶湖蛍光性溶存有機物の分画と北湖における鉛直分布の特徴, 日本陸水学会近畿支部会, 大学サテライト・プラザ彦根 (2010)
  - 9) 北野史子, 西本鷹耶, 和田千弦, 熊谷哲, 島野淳, 丸尾雅啓, 津田久美子, 白井秀門, 藤嶽暢英, 早川和秀, 杉山裕子:  $C_{18}$  固相抽出法を用いた天然水中溶存有機物の分画に関する基礎検討2, 日本陸水学会近畿支部会, 大学サテライト・プラザ彦根 (2010)
  - 10) 小島礼慈, 杉山裕子, 西本鷹耶, 北野史子, 原都, 早川和秀, 熊谷哲: PARAFACを使用した三次元励起蛍光スペクトルの解析, 日本陸水学会近畿支部会, 大学サテライト・プラザ彦根 (2010)
  - 11) Yuko Sugiyama, Patrick Hatcher, Tomoyo Suzuki Chizuru Wada, Tetsu Kumagai Osamu Mitamura, Toshiya Katano, Shin-ichi Nakano, Yuji Tanaka, Valentin Drucker, Vladimir Fialkov, Masahito Sugiyama: Riverine organic matter transport to the transition zone and deep water of L. Baikal studied by 3D Excitation-Emission Matrix fluorescence spectroscopy and ultra high resolution Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, "Actual Problems of Academic natural-Scientific Museum Activity", The International Museum Conference, Listvyanka, Russia (2010)
  - 12) 杉山裕子: バイカル湖・エニセイ川流域における溶存有機物の量的・質的遷移, 日本腐植物質学会, 兵庫県立大学 (2009)
  - 13) 西本鷹耶, 早川和秀, 北野史子, 原都, 小島礼慈, 熊谷哲, 杉山裕子: 限外ろ過・ $C_{18}$  固相抽出により分離される琵琶湖溶存蛍光性有機物の特徴の比較, 日本陸水学会第74回大会, 大分大学 (2009)
  - 14) 北野史子, 西本鷹耶, 和田千弦, 熊谷哲, 津田久美子, 白井秀門, 藤嶽暢英, 早川和秀, 島野淳, 丸尾雅啓, 杉山裕子: 固相抽出を用いた琵琶湖溶存有機物の化学分画に関する基礎的研究1, 日本陸水学会第74回大会, 大分大学 (2009)
  - 15) Yuko Sugiyama, Patrick Hacher, Tetsu Kumagai, Valentin Drucker, Vladimir Fialkov Toshiya Katano, Osamu Mitamura, Shin-ichi Nakano, Masahito Sugiyama: Survival of riverine organic matter in the deep layer of L. Baikal, The 24th International Meeting on Organic Geochemistry, Bremen, Germany, (2009)
  - 16) 和田千弦, 早川和秀, 一瀬諭, 熊谷哲, 杉山裕子: 琵琶湖水および起源の明白な水試料を用いた湖水 DOM 特性の把握と起源の検討, 日本陸水学会近畿支部会, 大阪府立大学 (2009)
  - 17) 西本鷹耶, 北野史子, 和田千弦, 杉浦嘉一, 熊谷哲, 早川和秀, 杉山裕子: 琵琶湖溶存有機物の分子サイズ別分布と3次元蛍光スペクトルの特徴について, 日本陸水学会近畿支部会, 大阪府立大学 (2009)
  - 18) 北野史子, 西本鷹耶, 和田千弦, 島野淳, 丸尾雅啓, 津田久美子, 藤嶽暢英, 早川和秀, 熊谷哲, 杉山裕子:  $C_{18}$  固相抽出法を用いた天然水中溶存有機物の分画に関する基礎検討, 日本陸水学会近畿支部会, 大阪府立大学 (2009)
  - 19) 橋田紳乃介, 杉山裕子, 熊谷哲: キャピラリー電気泳動法を用いた土壤中腐植物質の分析条件の検討, 日本分析化学会第57年会, 福岡大学 (2008)
  - 20) 和田千弦, 早川和秀, 江口あや, 鈴木智代, 熊谷哲, 杉山裕子: 高速液体クロマトグラフィー・キャピラリーゾーン電気泳動を用いた琵琶湖水中に溶存する紫外線吸収物質の分画, 日本分析化学会第57年会, 福岡大学 (2008)
  - 21) 杉山裕子, Patrick Hacher, 熊谷哲, Valentin Drucker, Vladimir Fialkov, 片野俊也, 三田村緒佐武, 中野伸一, 杉山雅人: バイカル湖深層水における河川起源溶存有機物の保存, 日本地球化学会第55回大会, 東京大学 (2008)
  - 22) 早川和秀, 和田千弦, 江口あや, 杉山裕子, 永岡一樹, 丸尾雅啓: 琵琶湖の水中紫外線環境と水質や生物への影響, 日本陸水学会第73回大会, 北海道大学 (2008)
  - 23) 和田千弦, 早川和秀, 鈴木智代, 熊谷哲, Patrick Hatcher, 杉山裕子: LC/MS および FT-ICRMS を用いた琵琶湖溶存有機物中の親水性紫外線吸収物質の同定, 日本陸水学会第73回大会, 北海道大学 (2008)
  - 24) 西本鷹耶, 北野史子, 和田千弦, 杉浦嘉一, 熊谷哲, 早川和秀, 杉山裕子: 琵琶湖溶存有機物の分子サイズ別分布と分光学的特徴について, 日本陸水学会第73回大会, 北海道大学 (2008)
  - 25) 早川和秀, 和田千弦, 杉浦嘉一, 鈴木智代, 杉山裕子, 丸尾雅啓: 琵琶湖の水中紫外線

環境と溶存有機物の光漂白, 2008 年日本  
有機地球化学シンポジウム, 名古屋大学  
(2008)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 裕子 (SUGIYAMA YUKO)

兵庫県立大学・環境人間学部・准教授

研究者番号: 40305694

(2) 研究分担者

早川 和秀 (HAYAKAWA KAZUHIDE)

滋賀県琵琶湖環境科学研究センター・琵琶

湖環境研究部門・主任研究員

研究者番号: 80291178