

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：14301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22760411
 研究課題名（和文）固相抽出－LC/MS法を用いた溶存有機物（DOM）の新規解析手法

研究課題名（英文）Development of Methodology for DOM Characterization
 in Combination with Solid-Phase Extraction and LC/MS

研究代表者
 日下部 武敏（KUSAKABE TAKETOSHI）
 京都大学・大学院工学研究科・特定研究員
 研究者番号：40462585

研究成果の概要（和文）：本研究では、流域圏における溶存有機物の役割や機能の解明に向け、固相抽出法およびLC/MS法を組み合わせた解析手法の開発を行った。最終的に10種類以上の固相カートリッジを用いて実験的な検討を実施した結果、本研究で開発した固相抽出法では溶存有機物の分画と同時に、共存する無機塩類の除去・有機物の濃縮の効果が期待できるものであった。LCについては、サイズ排除モードによる分離が第一選択であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The objective of this research was to propose a new methodology for DOM characterization in combination with solid-phase extraction and LC/MS. The solid-phase extraction developed in this research accomplished not only DOM fractionation, but also removal of coexisting inorganics and DOM concentration. It was suggested that a size exclusion (SEC) mode could be the first choice for DOM characterization.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：溶存有機物、固相抽出、LC/MS、流域圏、湖沼

1. 研究開始当初の背景

近年、湖沼において難分解性有機物の増加・蓄積が報告されるなど、水圏における有機物の動態や生態系への影響に注目が集まっている。琵琶湖をはじめとした湖沼では、様々な点源・面減対策が実施されてきたにもかかわらず、COD漸増やBOD/CODの乖離現象が観られる。水環境中には多種多様な溶存有機物（DOM）が遍在しているが、湖沼有機物

の発生源や水環境中における分解特性や環境動態、役割・機能については、ほとんど明らかにされていない。1970～80年代にかけて米国地質調査所（USGS）のグループによって、吸着樹脂とイオン交換樹脂を組み合わせることでDOMを6つの画分に分画する手法（XAD-8法）の開発が行われた。しかし、XAD-8法は樹脂洗浄や分画操作が非常に煩雑であるなどの実験操作上の課題があり、汎用的な手法とは

言い難い。一方、環境（有機）分析の場合、試料中の夾雑物が多く、マトリックスが複雑であるため、「分離」がとても重要な意味を持つ。すなわち、溶存有機物の抽出・濃縮と同時に、無機塩類をはじめとする妨害物質の除去が求められる。したがって、流域圏における DOM の役割や機能を明らかにするためには、水環境中の有機物全体を網羅的かつ定量的に検出できる解析・評価手法の新規開発が必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究課題は、流域圏における溶存有機物 (DOM) の機能や役割の解明に向け、固相抽出法および LC/MS 法を組み合わせた DOM 解析手法の新規開発を行うものである。

3. 研究の方法

(1) 固相抽出法は、試料の濃縮・精製において非常に優れた手法であり、操作性、簡便性、等の利点を持ち合わせている。さらに、現場での適用も可能なことから、湖沼の有機物研究においては有利な点であると言える。本研究では、市販されている複数の固相カートリッジを用い、様々な条件下で比較・検討することにより、有機物をその特性に基づいて複数の画分に分離・分取する条件の検討を行った。本研究では、固相カートリッジ (充填剤)、コンディショニング (洗浄) 方法等について検討を行い、溶存有機物をより詳細に分画するための固相抽出法を確立した。

(2) LC/MS 法は、分離モード (充填剤)、カラムサイズ、分離条件 (流速、移動相組成・pH、温度等)、検出方法 (電気伝導度、UV、蛍光、RI、MS、NMR 等) などのすべての点で適用範囲の広い手法であり、分離、分取、定性、定量等の目的に応じてカスタマイズすることが可能である。本研究では、LC 分離モード (逆相、サイズ排除、HILIC 等) を中心に、DOM の特性解析に適した条件の探索を行った。

4. 研究成果

(1) 固相抽出法の確立

本研究では、最終的に 10 種類以上の市販固相カートリッジを用いて、コンディショニング (洗浄) 方法、pH、通水速度、カートリッジの組み合わせ等について検討を実施した。その結果、コンディショニング操作は、3~4 個の固相カートリッジを直列に接続した状態で、メタノールを 1 mL/min の条件で 30 min (30 mL) 通水した後、続けて超純水を 3 mL/min の条件で約 1,000 mL 程度通水することで行った。本研究で検討を行った多くの固相カートリッジで、1 mL/min 程度の流速で 1,000 mL 程度の超純水を通水することで、溶存有機炭素 (DOC) 濃度を 0.1 mgC/L 以下

まで抑制できることを実験的に確認した。イオン交換系固相カートリッジ 3 個を直列に接続した状態で、MQ 洗浄方法を検討した際の透過液 DOC 濃度の結果を一例として図 1 に示す。図 1 より、流速が遅い方が洗浄効率が高いことが分かる。原則として、サンプル供試直前にコンディショニング操作を行ったが、検水を供する直前にコンディショニング操作ができない場合には、固相カートリッジの使用直前に、流速 3 mL/min で 100 min (300 mL) 超純水を通水することでフラッシングを行うこととした。なお、本研究では、回収率などを検水と固相カートリッジ透過液の DOC 濃度を用いて評価することを踏まえ、固相表面を水試料になじみやすくするために使用するメタノールを除き、有機溶媒の使用による洗浄効果については検討していない。

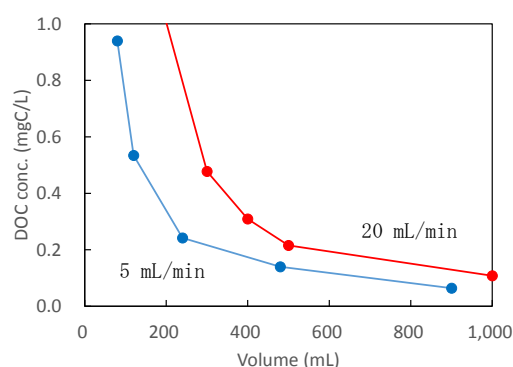


図 1 固相カートリッジの MQ 洗浄結果の一例 (イオン交換系固相カートリッジ 3 連)

次に、逆相系 (吸着系) 固相カートリッジに関しては、検水の pH をあらかじめ下げしておくことで、固相カートリッジへの保持が強くなることを確認した。吸着系固相カートリッジ A (スチレンジビニルベンゼン共重合体) を用いて HCl による pH 調整の影響を検討した結果を一例として図 2 に示す。図 2 より、pH 調整をすることで、検水 (河川水) を 1,000 mL 通水した時点で、固相カートリッジへの捕捉率が 14% から 48% に大幅に増加していることが分かる。このことは、pH を下げることで有機酸が遊離態になったことで説明できた。また、無機炭素 (IC) 濃度の高いサンプルでは、pH を下げることで気泡が多く発生するため注意を要することも判明し、必要に応じて脱気しなければならないことが分かった。

いずれの固相カートリッジについても、単体では DOC 回収率が十分とは言えず、組み合わせる必要があった。本研究では、文献調査および XAD-8 法を参考に、吸着系固相カートリッジに加え、陽・陰イオン交換系充填を組み合わせること、さらに検水の pH 調整を行うことで、より多くの DOM を回収することができるように工夫した。本研究で開

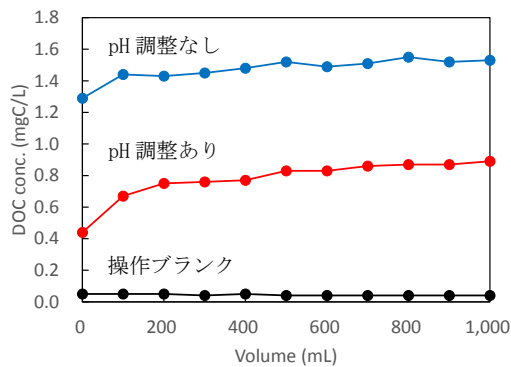


図2 固相カートリッジAにおけるpHの影響
(検水のDOC濃度は、1.74 mgC/L)

発した固相抽出法を琵琶湖北湖から採取した表層水に適用した例では、疎水性-中性 (HoN) 画分が 21%、塩基性 (Base) 画分が 18%程度となり、XAD-8 法と比較して高めの割合を示す結果となった。XAD-8 法との直接的な比較には意味はないが、本研究で開発した固相抽出法では、これまでより少なく評価されてきた画分を抽出できる可能性が示された。さらに、本法を霞ヶ浦 (西浦、北浦)、印旛沼、手賀沼から得た表層水、ならびに流入河川水、下水二次処理水に適用した結果、サンプルごとに異なる DOC 分布を示し、本法が DOM のキャラクタリゼーション・分類に適した手法であることが明らかとなった。ただし、各画分にどのような成分が対応するかあるいは XAD-8 法との差異については、タンパク質や糖類などの個別の物質群を用いて検討する必要がある。

(2) LC/MS 法の検討

本研究では、簡易でより一般的な四重極型質量分析計を用い、有機物特性解析に適した分離モード等について検討を行った。カラムの選定にあたっては、湖水中 DOM の物理化学的特性が広範囲にわたることを想定し、分離能に優れているとされる逆相 (RP) モードに加え、サイズ排除 (SEC) モード、近年注目されている HILIC モードを用いることとした。HILIC 分離モードでは、疎水性~親水性までの広範囲にわたる成分を分離することができること、移動相が有機溶媒リッチな条件で利用できるために固相抽出法や ESI-MS 法との相性がよいこと等の利点を考慮したためである。本研究で用いた試料は、琵琶湖北湖にて採取した後、GF/B 前ろ過、陽イオン交換による前処理を施し、逆浸透膜による濃縮を行ったものである。これに、同体積のアセトニトリルを加えて 2 倍希釈したものを供試した。ここで、添加溶媒としてアセトニトリルを選択したのは、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法では、対象化合物を溶解できること、微細な帯電液滴を形成させやすいこと、

LC カラムとの相性などを考慮したためである。DOM 中には、多種多様な物理化学的特性を有する物質が混在していることから、すべての成分について分離、イオン化等の条件を最適化することは困難であり、非現実的である。そこで、本研究では、文献調査等に基づいて、添加剤として酢酸アンモニウム (AcONH_4) 25 mM を加えた系を用い、主に分離モードについて検討を行った。RP モード、HILIC モードおよび SEC モードの LC カラムを用い、湖水中 DOM の特性把握を目的として、琵琶湖 DOM の LC/MS 測定を実施した。四重極 MS では精密質量などの情報が得られないため、ここでは主にトータルイオンクロマトグラム (TIC) においてより良い分離能等が得られるように条件の検討を行った。したがって、本条件でイオン化しない (しにくい) 成分については過少評価されていることに注意しなければならない。本研究で使用した複数の逆相系カラムでは、DOM 成分の多くを保持することができないことが明らかとなった。これは、一般に、我が国の淡水系 DOM の主要成分は酸性画分であり、かつ親水性が高いことによるものと考えられた。一方、HILIC 系カラムでは、充填材の表面官能基の特性の違いに起因してクロマトグラムの形状は異なるものの、逆相系カラムと比べてよい保持挙動が観られた。DOM は多種多様な官能基を有しており、充填剤との相互作用も多様であることから、それらの差異に基づいて分離 (保持) されたものと考えられた。しかし、現時点では保持の再現性が十分とは言えず、カラムの平衡化等が今後解決すべき検討課題として残った。次に、SEC 分離モードは、一般的に逆相系モードなどの他の分離モードと比べて分離能は劣るものの、DOM の基本的特性である分子サイズ (分子量) 情報が得られる点で非常に優れた手法であると言える。さらに、最近では原理的に有機物全量を検出可能な全有機炭素 (TC) 検出器との接続が行われるなど、DOM の特性解析では必要な不可欠な分離モードとなっている。以上のことを踏まえ、本研究ではサイズ排除 (SEC) による分離モードが第一選択と考えられた。SEC カラムの充填剤基材は、大きくポリマー系、シリカ系の 2 種類がある。さらに、SEC モードを主体としつつも、移動相条件によって逆相モードや HILIC モード、イオン交換モードなどを組み合わせて使用できるマルチモードカラムも市販されており、最終的には、研究対象や研究目的などに応じて、研究者が選択しなければならない。今後は、2 次元 LC なども視野に、複数の LC 分離モードを組み合わせた解析手法の開発を続けていく必要がある。

本研究では、固相抽出法と LC/MS 法を組み合わせた DOM 解析手法の開発を行った。すべ

ての組み合わせを実験的に検討することは困難ではあるが、流域圏における湖沼有機物の役割や機能の解明に向けて本法の有効性を示すことができた。本法の構築により、有機物に関する質的（定性）情報が飛躍的に増加することが予想され、これらの（統計）解析・データマイニング手法についての検討が今後必要となる。最終的には、得られた膨大なデータの網羅的評価・解析によって、湖沼有機物あるいは難分解性有機物の役割や機能、環境動態、生態影響等を明らかにしていきたいと考えている。

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1件）

- ① 目下部武敏、秋田泰典、大谷壮介、岡本高弘、早川和秀、清水芳久、琵琶湖北湖表層における天然有機物（NOM）の分解特性、環境システム計測制御学会誌、査読有、17巻、2012、102-111。
http://www.eica.jp/search/paper_read.php?id=1037

〔学会発表〕（計3件）

- ① 目下部武敏、秋田泰典、大谷壮介、岡本高弘、早川和秀、清水芳久、琵琶湖北湖表層における天然有機物（NOM）の分解特性、第24回環境システム計測制御学会研究発表会、2012年10月26日、横浜市開港記念会館。
- ② T. Kusakabe, Y. Akita, S. Otani, M. Nishida, T. Okamoto, K. Hayakawa, M. Minami, Y. Okumura, Y. Shimizu, Seasonal Variation in Biodegradability of Natural Organic Matter (NOM) in the Northern Lake Biwa, JAPAN, The IWA World Water Congress & Exhibition, 2012年9月16日～21日、BEXCO, Korea.
- ③ Y. Akita, T. Kusakabe, S. Otani, M. Nishida, T. Okamoto, K. Hayakawa, Y. Okumura, M. Minami, Y. Shimizu, Biodegradability of Lake Biwa Natural Organic Matters in Summer and Autumn, The 14th World Lake Conference, 2011年10月31日～11月4日、Austin Convention Center, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

目下部 武敏 (KUSAKABE TAKETOSHI)

京都大学・大学院工学研究科・特定研究員

研究者番号：40462585