

様式3

愛媛大学沿岸環境科学研究センター
共同利用・共同研究拠点「化学汚染・沿岸環境研究拠点」
共同研究報告書

平成 29年 2月 28日

化学汚染・沿岸環境研究拠点 拠点長 殿

申請者（研究代表者）	家田 曜世
所属機関	国立環境研究所
職	研究員
氏名	家田 曜世

下記の共同研究について、別紙の通り報告します。

1 研究課題

底質中有機ハロゲン化合物のノンターゲット分析 ―精密質量スペクトルデータベースの構築と試料の網羅的比較解析―

2 研究組織

氏名	所属	職	分担研究課題
代表者 家田 曜世	国立環境研究所	研究員	
分担者 橋本 俊次	国立環境研究所	室長	
磯部 友彦	国立環境研究所	主任研究員	
拠点対応教員 国末 達也	愛媛大学	教授	

3 研究内容 （別紙）

(研究課題名)

底質中有機ハロゲン化合物のノンターゲット分析
ー精密質量スペクトルデータベースの構築と試料の網羅的比較解析ー

(共同研究者名)

家田曜世¹, 橋本俊次¹, 磯部友彦¹, 国末達也² (1: 国立環境研究所, 2: 愛媛大学)

(研究目的)

これまで愛媛大学を中心とした研究グループは、人工化学物質による広範囲の海洋環境汚染と海棲生物がそれらを高濃度に蓄積している実態を明らかにすると同時に、汚染の経路やその経過をたどる研究にも取り組み、数多くの成果を残してきた。その中には、過去(堆積当時)の環境中化学物質が保存されている柱状底質試料の層位別分析により、環境汚染の経時的変化を復元するような研究もあり、貴重な成果が報告されている。海洋環境における柱状底質試料は、採取が極めて困難であり、水深が深くなるに連れ、試料の希少価値は格段に高くなる。その様な貴重な試料の化学分析では、可能な限り多種類の物質を測定し、最大限の情報を引き出すことが理想的である。しかしながら、従来の分析手法には制約があり、限られた種類の物質しか測定されていないのが現状である。その一方で、近年、すでに残留性有機汚染物質 (POPs) に指定されている DDT や HCH のような農薬や PCB といった工業用化学物質と同様に、地球規模での環境汚染を引き起し、生物蓄積性や毒性も高いことから、POPs に追加指定される化学物質が増えつつある。それらの汚染実態の解明が急がれるとともに、POPs 候補物質の更なる探索にも関心が集まっている。

我々が開発した数千種類の成分を同時に測定可能な GC×GC-HRTOFMS システムによるターゲット・ノンターゲット分析法を底質試料の網羅的分析に用いることにより、これまで見落としていた化学物質の海洋水圏環境汚染の実態と経時的変化を明らかにし、かつ、環境汚染物質の地理的分布や特徴を知ることが出来ると期待される。この飛躍的な情報量の増加は、これまで限られた物質で議論されていた海洋環境における化学物質影響 (リスク) 研究の中身を大きく変える可能性があり、研究の大きな進展が期待できる。

ノンターゲット分析によって得られたデータの網羅的な定性解析には、精密質量

スペクトルデータベースを用いた検索が有用である。近年、様々な研究分野においてノンターゲット分析の重要性が認識され始めたのに伴い、MassBankなど参加型の精密質量スペクトルデータベースが構築されつつあるが、登録データはメタボロミクス分野が主である。環境試料のノンターゲット分析手法の開発に伴い、貴重な情報を蓄積し、将来にわたり環境分野で活用していくために、環境試料中に検出された化学物質による精密質量スペクトルデータベースの基盤構築が求められる。

よって本研究では、GC×GC-HRTOFMSによる底質試料のノンターゲット分析を行い、有機ハロゲン化合物をはじめとする様々な化学物質の網羅的な比較解析と精密質量スペクトルデータベースの基盤構築を行うことを目的とする。

(研究内容)

- ① GC×GC-HRTOFMSによる底質中化学物質のノンターゲット分析法の開発
- ② 様々な底質試料中化学物質の網羅的な比較解析
- ③ GC×GC-HRTOFMSを用いた精密質量スペクトルデータベースの基盤構築

(研究成果)

① GC×GC-HRTOFMSによる底質中化学物質のノンターゲット分析法の開発

はじめに、有機ハロゲン化合物の混合標準溶液(ES-5521(CIL Inc.))を用いて測定条件の最適化を行った。次に、ノンターゲット分析で検出される数千ものピークの同定精度を上げるため、保持指標(RI)の算出を行った。具体的には、底質試料と同じ測定条件で炭化水素混合標準溶液(C₉~C₄₀)を測定し、炭化水素の溶出位置を基準として、試料中に検出された数千ピークに対しRI(900~4000)を求めた。算出したRIは、ライブラリーサーチのヒット率と共に化合物同定を行う際の指標とした。

さらにGC×GCデータ解析ソフトウェア(GC Image™)の改良を行い、ノンターゲット分析に役立つ新しい機能を追加した。具体的な内容は、以下のとおり。

- (A) 精密質量スペクトルをNIST14にて読み込み可能なファイルとして保存する機能
- (B) 分子イオンのマスエラーを自動で計算し、結果を表示する機能
- (C) 分子イオンの同位体パターン的一致率を自動で計算し、結果を表示する機能

なおこれらの機能は、最新版の GC Image™ に標準機能として追加されており、今後、世界中の GC×GC-HRTOFMS ユーザーの役に立つものと期待される。

② 様々な底質試料中化学物質の網羅的な比較解析

試料は、愛媛大学沿岸環境科学研究センター生物環境試料バンク(es-BANK)にて -20℃でユニパックに入れて冷凍保管されていた熊本県の河口や港付近の4種の底質試料(表層) No.5, NO.8, No.9, No.10 を用いた。試料の詳細は、以下のとおり。

(No.5) 熊本県北部で最も大規模な菊池川河口から 1 km 上流で採取。畜産業が盛ん。

(No.8) 熊本港フェリー発着場で採取。白川由来の汚染の存在が窺える。

(No.9) 熊本県南部の緑川河口で採取。浄化センターの排水などが流れてくる。

(No.10) 人口数百人の不知火地区の港で採取。コントロールとして利用可能。

底質試料は解凍後に約 20 g を分取し、風乾させた後に均質化した。得られた乾燥試料 4 g をアセトン：ヘキサン(1:1)で 16 時間ソックスレー抽出を行った後、濃縮した粗抽出液をヘキサンに転溶し、10%硝酸銀シリカゲルカラムに通した。得られた抽出液を 100 μL まで濃縮し、1 μL を GC×GC-HRTOFMS にて測定した。

測定データは、GC Image™ を用いて 2D map に変換し、トータルイオンクロマトグラム(TIC)上で自動ピーク検出を行った。ピーク検出後、すべてのピークを自動で NIST ライブラリーサーチ(以下、NIST 省略)にかけ、結果を Excel ファイルとし保存した。ライブラリーサーチには、後述③のユーザーライブラリーも使用した。

自動ピーク検出の結果、すべての底質試料で 7000~8000 個ものピークを検出した。しかしライブラリーサーチの結果、ヒット率が 800 以上だった化合物は全体の 1 %未満、700 以上 800 未満の化合物は全体の 15~35%となり、大半が未知化合物(高い確度での同定が不可能)であった。この理由として、自動ライブラリーサーチではピークトップの生のマススペクトル(バックグラウンドの差し引きは無し)が使用されるため、夾雑物の影響を受けた可能性や、TIC 上でのピーク自動検出時に、強度の弱いピークの検出がうまく出来なかった可能性が考えられた。

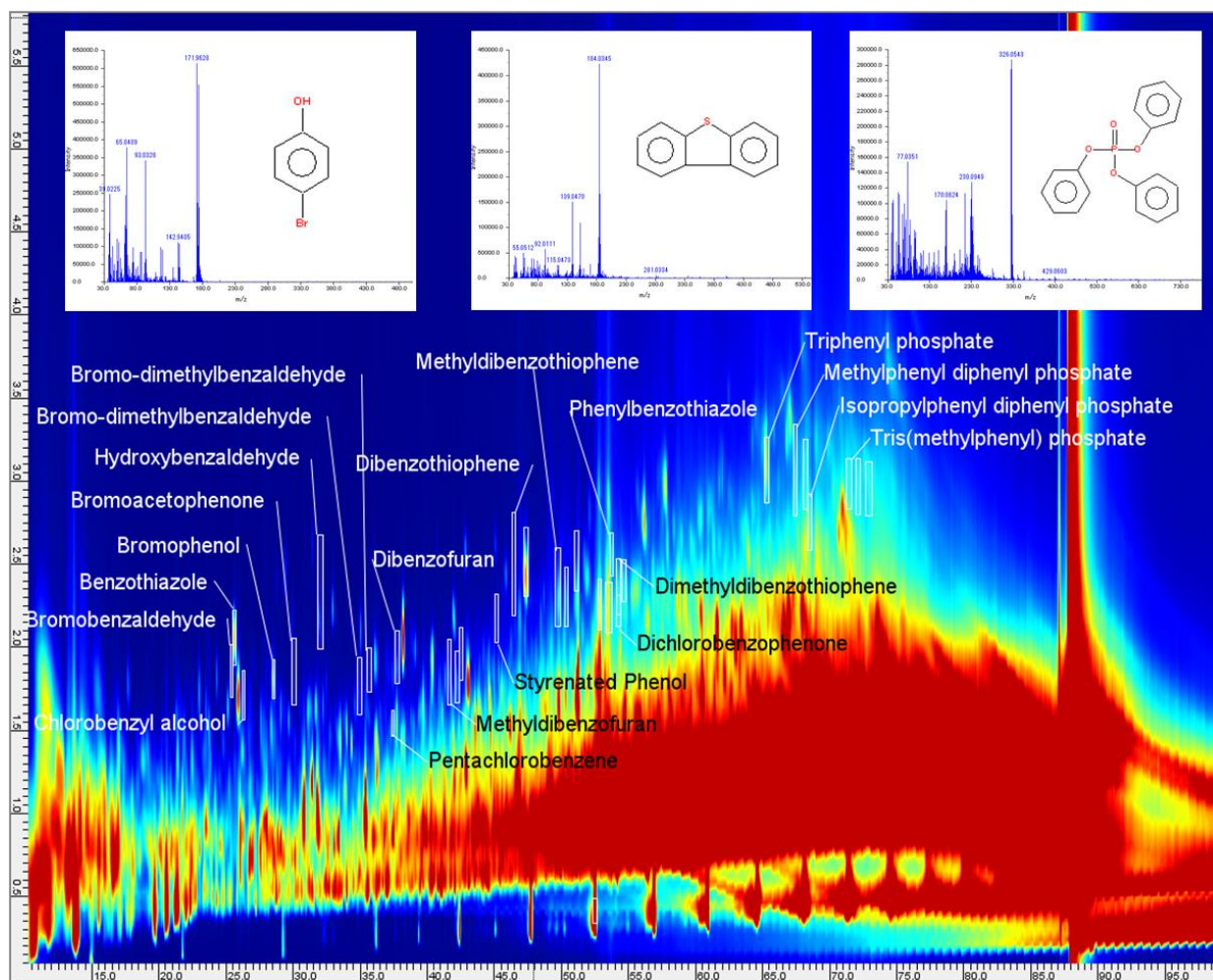
TIC 上に検出されたピークによる同定精度が低かったため、次に、国立環境研究所で開発した GC×GC-HRTOFMS 用のデコンボリューションソフトウェア

(NMFwithDBcreator)を用いてマススペクトルを分離し、TIC データから 4 つのデータを作成した。上記と同様の解析を行ったところ、デコンボリューション処理後は、全ての試料においてヒット率 700 以上の化合物の割合が 2~3 倍に増加した。よって、簡易な前処理で複雑なマトリックスを持つ環境試料の測定を行うノンターゲット分析では、GC×GC の二次元分離を用いても分離は十分ではなく、デコンボリューションによる追加のデータ処理が化合物同定に有効であることがわかった。

次に自動解析結果を詳細に確認したところ、有機ハロゲン化合物やリン系難燃剤などの環境汚染物質は、わずかしが含まれていなかった。そこでマニュアルでの解析を試みた結果、臭素や塩素、硫黄やリン、あるいは酸素を含んだ化合物を多く同定した。各化合物のマススペクトルは、バックグラウンドの差し引き後にライブラリーサーチをかけ、ヒット率が 700 以上であることを確認し、分子イオンが検出されている化合物については、マスエラーも確認した。さらにライブラリーに RI が登録されている化合物については、測定データ上で算出した RI とのずれが±20 以内であることを確認した。以下の表に、同定した化合物のうち代表的なものを示す。これらの化合物は、強度や異性体組成は底質ごとに異なっていたものの、全ての試料から検出された。よって今後は、試料保管中に汚染を受けていないか確認をするため、ユニパックの溶出試験を行いたい。また分子イオンが検出されていない化合物については、夾雑物質とのマススペクトルの分離や組成式推定が困難だった。そのため将来的には、分子イオンの高感度検出が可能な手法の併用が望まれる。

Compounds	Formula	Exact mass	Group	RT I (min)	RT II (sec)	RI	NIST RI
Bromobenzaldehyde	C ₇ H ₅ BrO	183.9524	Br	25.3	1.7	1224	N/A
Bromophenol	C ₆ H ₅ BrO	171.9524	Br	28.6	1.7	1297	1293
Bromoacetophenone	C ₈ H ₇ BrO	197.9680	Br	30.0	2.0	1330	N/A
Bromo-dimethylbenzaldehyde	C ₉ H ₉ BrO	211.9837	Br	35.0	2.1	1451	N/A
Chlorobenzyl alcohol	C ₇ H ₇ ClO	142.0185	Cl	26.2	1.7	1245	N/A
Pentachlorobenzene	C ₆ HCl ₅	247.8521	Cl	37.4	1.5	1512	1511
Dichlorobenzophenone	C ₁₃ H ₈ Cl ₂ O	249.9952	Cl	54.2	2.3	2000	N/A
Benzothiazole	C ₇ H ₅ NS	135.0143	S	25.5	2.0	1229	1229
Dibenzothiophene	C ₁₂ H ₈ S	184.0347	S	46.3	2.4	1757	1766
Methyldibenzothiophene, 1-methyl	C ₁₃ H ₁₀ S	198.0503	S	51.1	2.4	1900	1907
Phenylbenzothiazole	C ₁₃ H ₉ NS	211.0456	S	53.7	2.6	1981	N/A
Dibenzothiophene, 2,8-dimethyl-	C ₁₄ H ₁₂ S	212.0660	S	52.8	2.1	1955	1947
Triphenyl phosphate	C ₁₈ H ₁₅ O ₄ P	326.0708	P	65.2	3.1	2396	2387
Methylphenyl diphenyl phosphate	C ₁₉ H ₁₇ O ₄ P	340.0864	P	67.3	3.2	2481	N/A
Isopropylphenyl diphenyl phosphate	C ₂₁ H ₂₁ O ₄ P	368.1177	P	68.4	2.8	2524	N/A
Tris(methylphenyl) phosphate	C ₂₁ H ₂₁ O ₄ P	368.1177	P	72.2	2.8	2685	2680

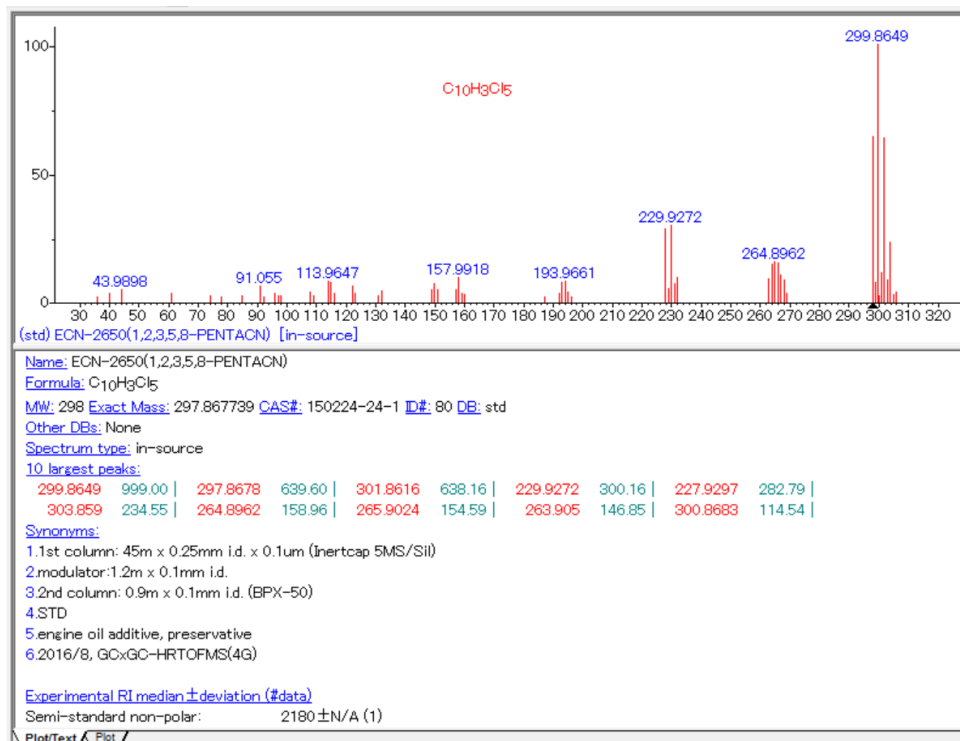
マニュアルでの解析後、上述の自動解析結果を再度確認した結果、多くの化合物は、自動解析においても同定されていたが、ヒット率が 700 未満だったことがわかった。その原因として、デコンボリューションを用いても夾雑物質のマススペクトルとの完全分離が難しかった可能性や、ピーク強度が小さかった可能性が考えられた。以下に、堆積物 No.5 の 2D map(TIC)と化合物の同定結果を示す。



③ GC×GC-HRTOFMS を用いた精密質量スペクトルデータベースの基盤構築

精密質量スペクトルデータベースを構築するため、まず POPs や PCBs、PCNs や PBDEs などの有機ハロゲン化合物やリン系難燃剤の標準溶液と、RI 用の炭化水素混合標準溶液の測定を行った。測定後、データの中央付近の保持時間に溶出するカラムブリード(m/z 281.0517)を用いてドリフト補正を行った後、GC Image™で 2D map を作成した。各ピークの同定と RI の算出を行い、ピークトップの精密質量マススペクトルを .mzXML 形式で保存した。保存したファイルを NIST14 で読み込み、

化合物名、組成式、精密質量スペクトル、RI、分析カラムなどの情報をユーザーライブラリーに登録し、底質試料の解析に用いた。以下に、5 塩素化ナフタレンの登録例を示す。



底質 No.5 に検出された未知化合物についても、試験的に登録を行った。実試料中のマススペクトルのため、夾雑物質の影響を受けていたものの、作成したデータベースを他の底質試料の解析に使用した結果、全

ての試料中に存在することがわかり、データベースの有用性を確認できた。この未知化合物の同定は困難だったが、底質試料特有の化合物である可能性も考えられるため、引き続き検討を行いたい。

(今後の課題)

- ① 未知化合物の同定精度を上げるため、分子イオンの高感度検出を目的としてGC×GC-HRTOFMSを用いた網羅分析におけるソフトイオン化法の検討を行う。
- ② 試料保存時の汚染の影響を調べるため、ユニパックの溶出試験を行う。
- ③ バックグラウンド差し引き後の精密質量スペクトルをデータベースに登録できるようにGC×GCデータ解析ソフトウェア(GC Image™)の改良を行う。