

(研究課題名)

GC×GC-EI/ソフトイオン化-HRTOFMS と

精密質量情報を利用したデータ解析による有機ハロゲン化合物の網羅的探索
- 堆積物コア試料を用いた手法の評価 -

(共同研究者名)

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

(研究目的)

近年、欧米を中心に環境試料ノンターゲット分析のニーズが高まっている。これまで申請者らは、GC×GC-電子イオン化 (EI) -HRTOFMS を環境試料ノンターゲット分析に応用すべく、検討を行ってきた。GC×GC-EI-HRTOFMS は、高分離かつ広い質量範囲において精密質量スペクトルの取得が可能であり、従来の GC-MS 法などと比較して各段に多くの情報を得ることが出来る。その一方で、データ解析手法には未だ課題も多い。2019 年度の es-BANK 利用型共同研究では、熊本県河口域の表層堆積物を用いて GC×GC-EI-HRTOFMS による測定を行い、環境試料ノンターゲット分析におけるデータ解析ワークフローを提案すると同時に、手法の評価を行って国際誌に報告した⁽¹⁾。

2020 年度の es-BANK 利用型共同研究では、EI データの解析において見えてきた課題⁽¹⁾を克服すべく「不活性ガスを用いたソフトイオン化 GC×GC-HRTOFMS 法による日本海深海堆積物中有機ハロゲン化合物の網羅的探索」として、ソフトイオン化法の適用に取り組んできた。不活性ガスにはアルゴン (Ar) とヘリウム (He) を検討し、残留性有機汚染物質である芳香族有機ハロゲン化合物を対象として、フラグメントイオンの生成を最小限に抑え、分子イオンの高感度検出が可能なイオン化条件を見出した⁽²⁾。2020 年度の報告書では、本イオン化法を堆積物コア試料に試験的に適用し、未知化合物を含む有機ハロゲン化合物の探索を行った。

本年度は、兵庫県香美町沖の堆積物コア試料を EI 法とソフトイオン化法の 2 つを用いて GC×GC - HRTOFMS で測定し、独自のデータ解析プログラムやライブラリーを用いて解析を行うことで、これまで開発してきた GC×GC - HRTOFMS による環境試料ノンターゲット分析手法の評価を行う。具体的には、ソフトイオン化法として Ar によるイオン化法 (Ar イオン化法)⁽²⁾を適用し、データ解析手法とし

て、橋本が開発したソフトウェア「分子組成式に相当する同位体精密マススペクトルの抽出を行う”ComEX”⁽³⁾」を用いる。加えて、過去の報告⁽¹⁾で使用したライブラリーサーチのクライテリアを用いて、その際に見出した課題がどの程度解決できたか等、現時点における環境試料ノンターゲット分析手法の総合的な評価を行うことを目的とした。

(研究内容)

兵庫県香美沖堆積物コア 19 試料のうち、0～1 cm、6～7 cm、8～9 cm、12～14 cm、26～28 cm の粗抽出液について、GC×GC-HRTOFMS により測定を行った。イオン化には、EI 法と Ar イオン化法の 2 種類を用いた。各イオン化法で得られたデータに対し、精密質量情報等を利用した有機ハロゲン化合物の網羅的探索を行い、手法の評価を行った。

(試料)

es-BANK から譲渡された日本海（兵庫県香美町沖）深海堆積物コア 19 試料（試料番号：SC-J-09-01～19）を使用した。本試料は、東京大学大気海洋研究所の淡青丸 KT-11-9 次研究航海（2011 年 5 月 27 日～6 月 4 日）において、北緯 36°21.841′、東経 134°25.493′、水深 1296 m の地点から採取され、約 28 cm 長のコアは 1 cm（表層から 0～10 cm）および 2 cm（20～28 cm）の間隔でスライス後、冷凍保管されていた。コア試料の採取には、東京大学大気海洋研究所所有のマルチプルコアサンプラー（外径：89 mm、内径：82 mm）が使用された。

(方法)

堆積物コア 19 試料（約 40～100 g）は、解凍して風乾させた後に均質化し、重量を測定した。乾燥重量は、約 5～40 g であった。ガンマ線スペクトロメータ（低バックグラウンド N 型 Ge 半導体検出器）を用いて ²¹⁰Pb・¹³⁷Cs の測定を行い、各試料の堆積年代を推定した。²¹⁰Pb・¹³⁷Cs 測定後、19 試料のうち 5 試料を、5 g（試料：0～1cm、6～7 cm、8～9 cm）あるいは 10 g（12～14 cm、26～28 cm）を分取し、トルエンで 16 時間以上ソックスレー抽出を行った後、粗抽出液を 50 μL まで濃縮し、2 μL を GC×GC-HRToFMS にて測定した。イオン化には、EI 法と Ar イ

オン化法を適用し、1つの粗抽出液につき、各イオン化法で1回ずつ（計2回）測定を行った。Arイオン化法では、ネガティブイオンを検出した。

（研究成果）

2つのイオン化法における堆積物粗抽出液中有機ハロゲン化合物の検出力の比較

昨年度実施した Ar イオン化法での測定により、堆積物粗抽出液から検出された PCB209、HCB、天然起源の有機ハロゲン化合物 HNP（ハロゲン化メチルビピロール； $C_9H_3N_2ClBr_6$ ）、Unknown-Cl₄、Unknown-Br₂ の 5 つの化合物について、改めて EI 法により 5 つの試料（深さ 0～1 cm、6～7 cm、8～9 cm、12～14 cm、26～28 cm）を測定し、各化合物が検出可能か確認した（解析・同定方法は、昨年度と同様）。その結果、深さ 0～1 cm の底質試料中 PCB209 や HCB 等、Ar イオン化法のみで検出可能であった化合物が複数あった（表 1）。すなわち、試料のクリーンナップをしない環境試料ノンターゲット分析においては、Ar イオン化法を用いることにより、有機ハロゲン化合物の高感度分析が可能であると示唆された。また、Ar イオン化法による対象物質の検出感度は、EI 法よりも高く、本堆積物コア試料においては、最も環境汚染物質の濃度が高いと予想される深さ 6～7 cm の底質試料（推定堆積年：1974 年）において、両イオン化法での検出頻度が最も高かった。

表 1 堆積物コア試料（0～28 cm のうち 5 試料）における有機ハロゲン化合物の探索
- EI 法と Ar イオン化法での検出力の比較 -

試料深さ	推定堆積年	PCB-209*		HCB*		HNP(C ₉ H ₃ Br ₆ ClN ₂)**		Unknown-Cl ₄ ***		Unknown-Br ₂ ***	
		EI	Ar	EI	Ar	EI	Ar	EI	Ar	EI	Ar
0～1 cm	2009	×	○	×	○	×	○	○	○	×	○
6～7 cm	1974	○	○	○	○	○	○	×	×	×	○
8～9 cm	1956	×	×	○	○	×	×	×	×	×	×
12～14 cm	1901	×	×	×	×	×	×	×	○	×	○
26～28 cm	1733	×	×	×	×	×	×	×	○	×	○

○：検出、×：非検出

* 標準物質にて確認

** Hoh et al. (4)のライブラリーにて確認

*** ブランクには非検出であることを確認

2つのイオン化法における堆積物粗抽出液の網羅的な定性解析結果の比較

次に、2つのイオン化法で取得したデータの網羅的な定性解析について比較すべく、深さ6~7 cmの底質試料（推定堆積年：1974年）のトータルイオンクロマトグラム（TIC）上で自動検出されたピーク（成分）のライブラリーサーチを実施した。ライブラリーサーチには、これまでEI法により構築してきた環境試料の精密質量スペクトルライブラリーその他、幾つかの標準物質をArイオン化法で測定して得られたライブラリーも使用した。EIデータのライブラリーサーチでは、マッチファクターの高い検索結果が多く得られ、検索精度が高いことが分かる。一方で、Arイオン化法で得られたデータでは、登録した標準物質に合致するものは多くなく、Arイオン化法によるマススペクトルライブラリーの充実が課題である。また、Arイオン化法では、芳香族高塩素化合物の分子イオンの高選択的検出が可能である一方、多くの塩素化合物や臭素化合物については、Cl⁻イオンとBr⁻イオンが検出されるため、それらを用いて有機ハロゲン化合物のスクリーニングが可能であると考えられる。その確認のため、Arイオン化法で得られたデータについて、ComEX⁽³⁾を用いて塩素（Cl）と臭素（Br）の同位体精密マススペクトルの抽出を行った。その結果、ClとBr合わせて200以上ものピークが検出され、それらはEIデータ（TIC上）で検出されたピークの保持時間とは異なるものがほとんどであった。すなわち、EIデータでは埋もれていた微小の有機ハロゲン化合物を抽出できた可能性があり、Arイオン化法の有用性が示された。

表2 堆積物コア試料(深さ6~7 cm)におけるEI法とArイオン化法での定性解析の比較

データ形式	項目	EI	Ar
TIC*	検出されたピーク数	3719個	7884個
	ライブラリーサーチのヒット率：MF** \geq 700	1884個	0個
	ライブラリーサーチのヒット率：RMF*** \geq 700	2441個	46個
	Mass errorが計算されたピーク****の割合	22%	61%
ComEX (Cl抽出)	検出されたピーク数	N/A	105個
ComEX (Br抽出)	検出されたピーク数	N/A	111個

* トータルイオンクロマトグラム、** Match Factor、*** Reverse Match Factor、

**** ライブラリーサーチの結果、候補1位に挙がった化合物の分子イオン(理論値)がデータ上のライブラリーサーチを行ったピークにも検出されていた場合に Mass error が計算される。

EI/Ar イオン化データを併用した堆積物粗抽出液中塩素化合物の解析

表 2 において、ComEX⁽³⁾を用いて Cl の同位体精密マススペクトル抽出 (Cl 抽出) を行った結果、105 個のピークが検出された Ar イオン化のデータと、同じ底質試料を EI で測定したデータの両方を利用して、塩素化合物の同定を試みた。105 個の Cl ピークのうち、EI データ (TIC) 上で自動検出されたピークと同じ保持時間を持つピークはなかったため、EI データ上で、ComEX で抽出された Cl ピークと同じ保持時間のマススペクトルをいくつか確認したところ、 m/z 315 付近に塩素特有の同位体パターンを持つマススペクトルを検出した。この成分のライブラリーサーチの結果、DDE ($C_{14}H_8Cl_4$) であると推測されたため、その精密質量数 m/z 315.9356 を用いて組成式計算をした結果、 $C_{14}H_8Cl_4$ の理論値 (m/z 315.9380) とよく一致し (mass error 7.8 ppm)、アルカンを用いた保持指標から、p,p'-DDE であると推測された。

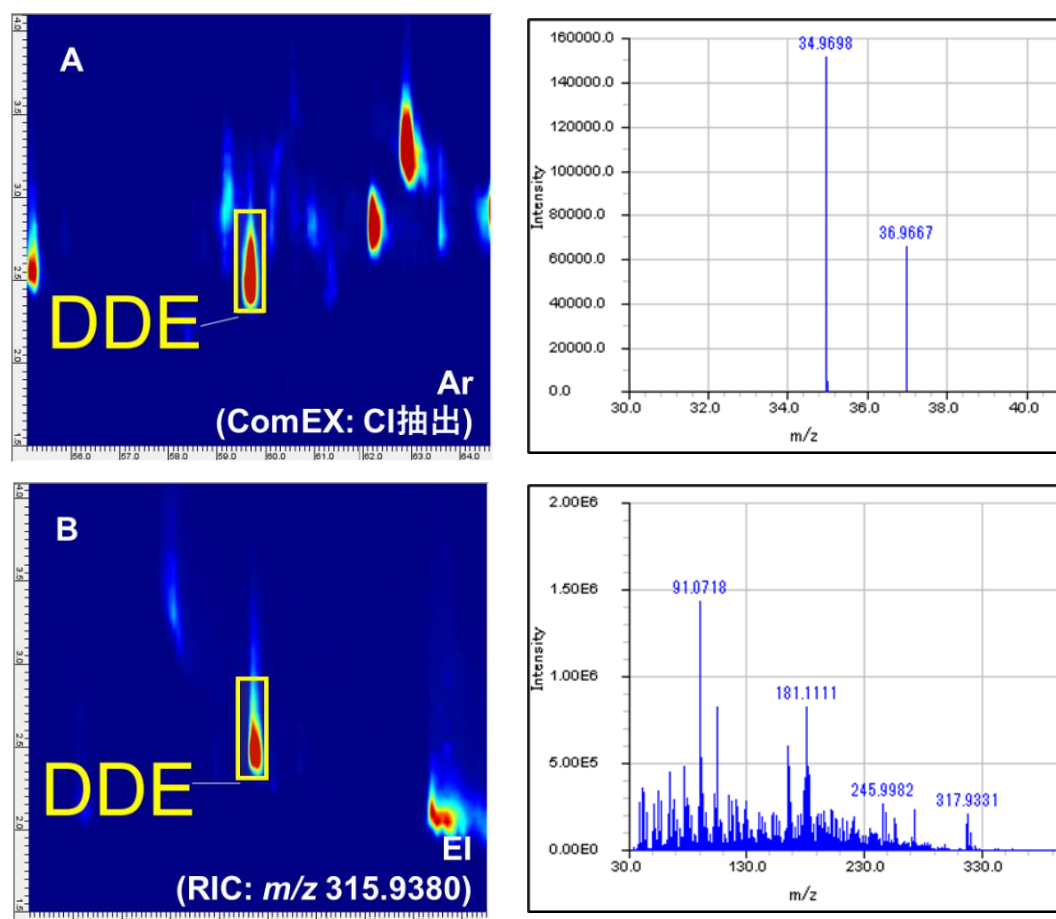


図 1 堆積物コア試料 (深さ 6~7 cm) における塩素化合物の探索

A : ComEX により Ar イオン化データから Cl (塩素) を抽出した 2D map とマススペクトル

B : DDE 分子イオンを用いた EI データのマスキロマトグラム (2D map) とマススペクトル

(まとめ)

EI 法と Ar イオン化法で得られた 2 つのデータを包括的に解析することで、網羅分析データの解析における同定精度を向上させることが可能であると示唆された。今後は、本コア試料に特徴的な化合物を見つけ出し、時系列解析を行うことで、未知化合物を含めた化学物質汚染の実態解明につなげたい。また今回は、データ容量の問題により精密質量スペクトルのデコンボリューションソフトウェアが使用できなかったが、今後、改良版にて解析を試みたい。

(参考文献)

- (1) Ieda T., Hashimoto S., Isobe T., Kunisue T., Tanabe S., *Talanta*, 194 (2019) 461-468
- (2) Ieda T., Hashimoto S., Tanabe K., Goto A., Kunisue T., *J. Chromatogr. A*, 1657 (8) (2021) 462571
- (3) Hashimoto S. et al., *J. Chromatogr. A*, 1282 (2013) p183-189
- (4) Hoh E. et al., *Environ. Sci. Technol.*, 46 (2012) p8001-8008

(謝辞)

表 1 に示した試料の推定堆積年につきまして、 ^{210}Pb ・ ^{137}Cs 測定と年代推定を行って下さった国立環境研究所 環境リスク・健康領域 基盤計測センター 環境標準研究室 室長 田中敦氏に対し、本研究協力についてご快諾頂いたこと、知見をご教示頂いたことに心より感謝いたします。