

(研究課題名)

es-BANK 試料を活用した新たなノンターゲット分析スキームの構築と実用性評価

(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)

世の中に流通している膨大な種類の化学物質のうち、環境モニタリングや調査研究の対象とされているものは一部に過ぎず、化学物質の環境分布（汚染）の全様を知ることはできない。こうした状況の中、環境試料を長期に保存しておき、新たな汚染が明らかになった時点で過去に遡って分析を行うことを可能にする「環境試料バンク」の概念が 1970 年代に提唱された。環境試料バンクの意義として、過去に遡って分析を行えることの他に「過去に測れなかった環境汚染物質を最新の分析技術で新たに測定しなおす」ことが挙げられる。2005 年には、愛媛大学に生物環境試料バンク（es-BANK）が設立され、世界中から集められた鯨類や哺乳類、鳥類や魚類を含む様々な生物試料や環境試料が保存されている。

これまで申請者は、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な包括的二次元ガスクロマトグラフ（GC×GC）と高分解能飛行時間型質量分析計（HRTofMS）を組み合わせたシステムを用いて、環境試料ノンターゲット分析のための手法構築やデータ解析プログラムの開発を行ってきた⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾。この最新の分析手法を es-BANK に保管されていた貴重な堆積物コア試料に適用し、これまで着目されていなかった有機ハロゲン化合物を複数検出した。これにより、本手法の有用性が明らかになったと共に、環境試料バンクの重要性があらためて示された。

GC×GC - HRTofMS は、化合物同定力が高く、従来の GC-MS によるターゲット分析法と比較すると各段に多くの情報を得ることが出来る一方で、データ解析手法が煩雑であることや装置が高額であること等が普及を妨げている。そのため本研究では、相対的に安価で、質量スペクトルデコンボリューション処理などデータ解析の自動化が進んでいる GC - 低分解能 (LR) ToFMS の併用を試みる。すなわち、GC - LRToFMS を用いた環境試料ノンターゲット分析における化合物同定力の評価を行うと共に、GC×GC - HRTofMS と GC - LRToFMS 両手法を組み合わせた分析スキームの構築を検討する。

（研究方法）

試料は、es-BANK から譲渡された日本海堆積物コア 19 試料（SC-J-09-01～19）のうち、表層から 4～6 cm の試料を使用した。本コア試料は、JAMSTEC 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、マルチプルコアサンプラーが使用された。

本コア試料は、解凍して風乾させた後に均質化し、試料約 15 g を円筒ろ紙に入れてアセトンで 8 時間、次にトルエンで 8 時間ソックスレー抽出を行った。アセトン抽出液は約 3 mL まで濃縮後、トルエン抽出液と混合し、無水硫酸ナトリウムに通して脱水し、9 mL に定容した。そこから 1/3（3 mL）を分取し、50 μ L まで濃縮した後、粗抽出液 1 μ L を GC $\times$ GC - HRTofMS と GC - LRTofMS にてそれぞれ測定した。イオン化にはどちらも電子イオン化（EI）法を用い、データ取り込み速度は GC $\times$ GC - HRTofMS は 20 Hz、GC - LRTofMS は 10 Hz とした。GC $\times$ GC - HRTofMS データ解析には、ZOEX 社製 GC Image、NIST Mass Spectral Search Program の他、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⁾、塩素・臭素などの質量欠損（整数質量と精密質量の差）を利用したマススペクトル抽出が可能な “MDF”⁽³⁾ を用いた。GC - LRTofMS データ解析には、LECO 社製 ChromaTOF とマススペクトルライブラリー（NIST 他）を用いた。

まず GC $\times$ GC - HRTofMS で取得した堆積物コア粗抽出液データの網羅的解析を行い、検出された有機ハロゲン化合物の精密質量スペクトルと保持指標（RI）をインハウスライブラリーに登録した。次に、GC - LRTofMS を用いて同試料の測定を行い、得られたデータの質量スペクトルデコンボリューション処理を行った。その後、構築したインハウスライブラリーを用いた定性解析を行い、結果を評価した。

（研究成果）

GC $\times$ GC - HRTofMS による堆積物コア粗抽出液中有機ハロゲン化合物の探索とユーザーライブラリーへの精密質量スペクトル・RI の登録

堆積物コア粗抽出液を GC $\times$ GC - HRTofMS にて測定し、データを解析した結果、

PCBs などの人為起源有機ハロゲン化合物だけでなく、天然起源の有機ハロゲン化合物 (HNP_s) を複数検出した。得られた HNP_s の精密質量マススペクトルは、MDF と ComEX を用いて処理を行った。図 1 にハロゲン化メチルビピロール ($C_9H_3N_2ClBr_6$) の例を示す。(a)は未処理のマススペクトル、(b)は MDF 処理後のマススペクトル、(c)は MDF 処理後に高質量側 (m/z 400-670) を抽出したマススペクトル、(d)は ComEX で $C_9H_3N_2ClBr_6$ に相当する同位体精密マススペクトルを抽出したものである。このうち(b)~(d)の 3 種をインハウスライブラリーに登録した。本研究では、6 つの HNP_s について計 18 個のマススペクトルと RI を試験的に登録し、GC - LRTofMS データの定性解析に利用することを試みた。

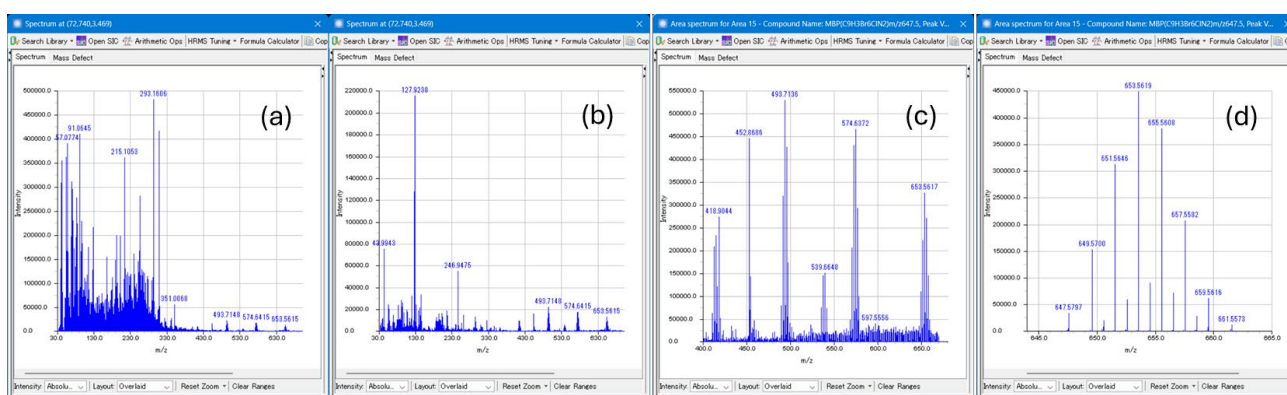


図 1 GC×GC - HRTofMS による堆積物コア粗抽出液中 $C_9H_3N_2ClBr_6$ の精密質量マススペクトル (a) 未処理、(b) MDF 処理、(c) MDF 処理後 m/z 400-670 抽出、(d) ComEX 処理

GC - LRTofMS による同試料の測定と質量スペクトルデコンボリューション処理・インハウスライブラリーを用いた定性解析

同粗抽出液を GC - LRTofMS で測定し、インハウスライブラリーに登録した 6 つの HNP_s がすべて検出されていることをマニュアル解析にて確認した。その上で、質量スペクトルデコンボリューション処理を行い、自動ピーク検出を行った後、インハウスライブラリーと市販のライブラリーを用いて全ピークの自動定性解析を行った。図 2 に GC - LRTofMS で得られた堆積物コア粗抽出液トータル

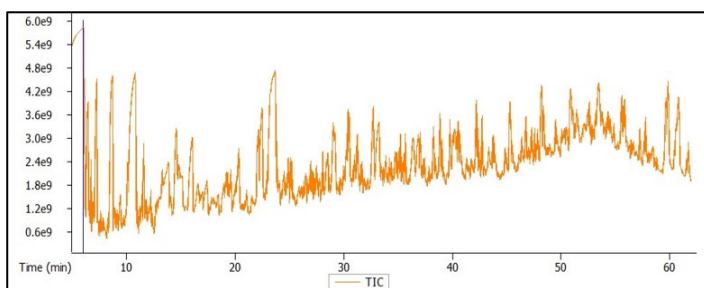


図 2 GC - LRTofMS による堆積物コア粗抽出液 TIC

表 1 GC - LRTofMS データの解析結果

ピーク検出	ピーク総数	MF $\geq$ 800	800 > MF $\geq$ 700	700 > MF
S/N = 10	5155	439	616	4100
S/N = 5	5158	439	616	4103
S/N = 3	5158	439	616	4103

イオンクロマトグラム (TIC)、表 1 に解析結果を示す。TIC 上には炭化水素系の UCM (Unresolved Complex Mixture) が広範囲に検出され、微量成分が埋もれていたものの、デコンボリューション処理後は 5000 以上のピークが自動検出された。ピーク検出の設定を $S/N=10, 5, 3$ と変更しても、検出されたピーク総数とライブラリーサーチの結果 (マッチファクター (MF)) は、ほぼ同じだった。

続いて各ピークの定性結果を確認したところ、インハウスライブラリーに登録した HNP がヒットしたピークは 1 つもなかった。そこで $C_9H_3N_2ClBr_6$ のマスクロマトグラム (EIC) を描いて確認したところ、その付近には 10000 倍以上の強度を持つ別の化合物由来のイオンが複数検出されており、デコンボリューション処理を行っても $C_9H_3N_2ClBr_6$ のピークトップ (RT 45.389 min) をとらえることが出来ていなかった (図 3 (b)(c))。また、 $C_9H_3N_2ClBr_6$ 直前のピーク (Peak No.3851; RT 45.377min) のマスペクトルを確認したところ、未処理データには $C_9H_3N_2ClBr_6$ 分子イオンが検出されていたものの (図 4 (b))、デコンボリューション処理後は確認できなかった (図 4 (c))。よって、デコンボリューション設定の最適化やさらなる分離が必要と考えられた。

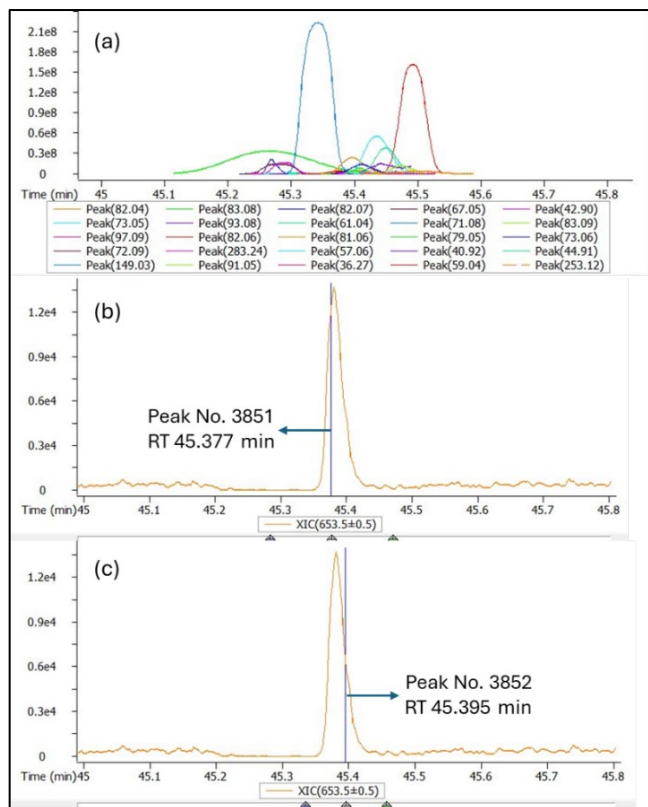


図 3 (a) GC - LRToFMS のデコンボリューション処理結果 (b) (c) $C_9H_3N_2ClBr_6$ の EIC と自動検出されたピーク位置

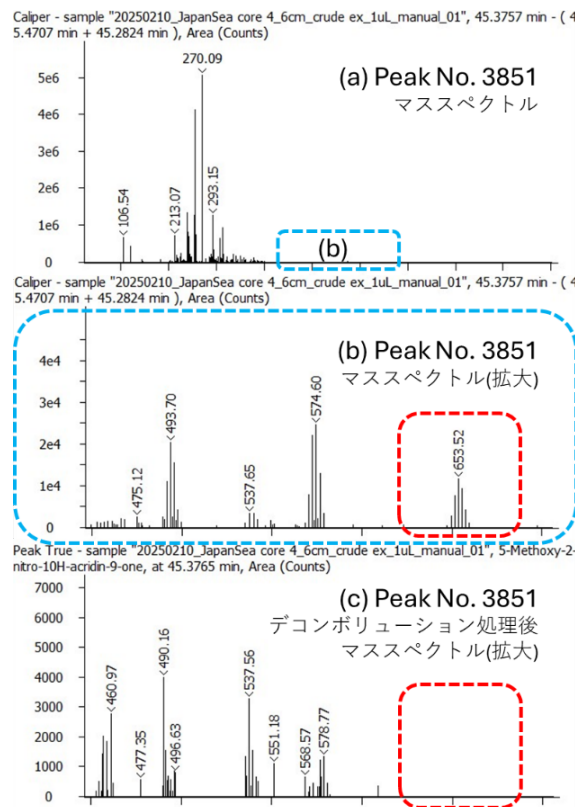


図 4 Peak No.3851 (a)未処理マスペクトル (b)拡大 (c) デコンボリューション処理後マスペクトル

表 2 に、ライブラリーサーチの結果、候補 1 位だった化合物のうち、RI が登録されていた化合物の数と RI がヒットした化合物（誤差±20 以内）の数を示した。候補 1 位

の化合物のうち、RI が登録されていた化合物は 1/3～1/2 と少なく、さらに RI がヒットした化合物は、その 1/5～1/3 まで絞られた。具体的には、ライブラリーサーチの結果 MF≥800 だった 439 ピークのうち、RI がヒットした化合物は、多環芳香族炭化水素（PAHs）やメチル化 PAHs、ブロモフェノールやチオフェン類など、わずか 75 ピークであった。GC では、従来から化合物同定に RI が活用されており、環境試料ノンターゲット分析においても有用である。引き続きインハウスライブラリーには精密質量マススペクトルと共に RI を登録し、化合物同定において活用すると共に、同定した化合物の RI については論文等で公表していきたい。

（今後の課題）

GC×GC - HRTofMS を用いて高分離・高選択的なデータの取得と質の高い精密質量スペクトルデータベースの構築を行い、分離は劣るものの汎用性の高い GC - LRTofMS を用いて試料測定と構築したデータベースを利用した自動定性解析を行う分析スキームを検討した結果、質量スペクトルデコンボリューション処理における微量の有機ハロゲン化合物の選択的な抽出は困難であり、化合物同定は難しかった。そのため、さらなるクロマト分離やデコンボリューションの工夫が必要であると考えられる。前者については、汎用性の高い GC を基本としつつ、カラムの液相の種類や分離条件を最適化したい。後者については、現在、橋本が非負値行列因子分解（NMF）を用いた新たなデコンボリューションソフトウェアを開発しており、申請中の 2025 年度 LaMer 共同研究において、その性能を評価したい。

（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

表 2 GC - LRTofMS 解析結果における RI

	MF≥800	800>MF≥700
ピーク数	439	616
RI登録数	211	206
RIヒット数	75	43