

## 天然水に溶存する有機物の分子レベルでの キャラクタリゼーション

杉山 裕子\*

### 1. はじめに

溶存有機物 (Dissolved Organic Matter, DOM) とは、0.1~1.0 $\mu$ m の孔径のフィルタを通過する有機物と定義されている。天然水において、溶存有機物はたとえば海洋の有機炭素の90%以上を占め、溶存態炭素の大きな貯蔵庫であり、その貯蔵量 (~700Pg C) は大気中二酸化炭素量 (750Pg C) に匹敵する [1]。また、バクテリアの主要なエネルギー源であり [2]、水中への入射光を調節することにより水中での一次生産速度に影響を及ぼす [3] など、生態系を支配する重要な因子である。さらに、有害金属イオンや化学物質と錯生成することにより、その毒性を低減したり [4]、光増感物質として作用し、各種有機物の光分解を促進する [5] など、溶存化学物質の存在形態や水中での安定性に強い影響を及ぼしている。これらのことから、近年溶存有機物の化学的・生物化学的特性や分布などに関する研究は重要性を増してきた。

天然水中の溶存有機物は、腐植物質に代表されるような、生物体を起源とし、それらが土壌中や水中で生化学反応や光化学反応などを受け、変質した多種多様な有機物質の混合物である。分析機器および分離濃縮法の限界から、そのほとんどは分子レベルでは未同定の有機物 [6] として取り残され、溶存有機化合物の同定は、有機地球化学者にとって長年手の出せない問題であった。このため、溶存有機炭素濃度測定、元素組成比、バルク  $^{13}\text{C}$  同位体比、紫外吸収スペ

クトル測定、三次元励起蛍光スペクトル測定や固体  $^{13}\text{C}$ NMR のようなバルクキャラクタリゼーションが溶存有機物の特質を調べる主要な方法であった。しかし、近年の質量分析器の急速な進歩は、この状況を大きく変えつつある [7]。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、腐植物質や河川水中溶存有機物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 [8,9]。著者はフロリダ州立大学に設置されている National High Field Magnetic Laboratory において、当時世界最高性能であった9.4テスラの超伝導マグネットを備えた FT-ICRMS を用いて、バイカル湖に溶存する有機物の分子レベルキャラクタリゼーションを行なう機会に恵まれた。

バイカル湖は世界最大の貯水量 (23,000km<sup>3</sup>)、および水深 (1,643m) を誇り、世界最大の淡水の貯蔵庫である [10]。また、世界最古の湖のひとつであるにもかかわらず、富栄養化を逃れ、清澄な湖水を保持している。しかし、近年、富栄養化の兆しと思われる生態系の変化が観測され、近い将来における水質の悪化が危惧されるようになってきた [11]。

バイカル湖における溶存有機炭素 (DOC) 濃度は沖帯で1.0~1.3mgCl<sup>-1</sup>程度と低く保たれており [12,13]、北湖に流入する主要河川で

\*兵庫県立大学環境人間学部助教

あるバルグジン川河口から沖帯にかけての調査で、表層水中のDOC濃度が電気伝導度と相関することから、湖水の溶存有機物が主に河川から運ばれる陸起源物質であること[12]、三次元励起蛍光スペクトルの測定結果から、湖水中蛍光性有機物の大部分が陸起源腐植物質様蛍光ピークを有する有機物であり、沖帯においても底層水中の溶存有機物の60~70%が陸起源と結論付けられている[14]。このことから、気候の温暖化に代表されるような大きな環境変動により、集水域の植生や河川流量の変化が引き起こされ、結果としてバイカル湖水に大きな影響を与えることが予想されている。今後は、陸起源有機物や湖内自生有機物の分子レベルでのさらなるキャラクター化が必要である。

## 2. FT-ICRMS による溶存有機物の分析

少量の試料体積で、極めて多様な有機分子の混合物である溶存有機物試料に含まれる化合物を個別に同定するという目的において、FT-ICRMS に比肩する方法は今のところ見当たらない。FT-ICRMS は、約30年前から開発されてきた超高分解能質量分析法であり、たとえば現在では分子の結合 ( $\text{mass} \div 10^{11}$ ) までもを測定することが可能である[7]。

FT-ICRMS の中心部には、各辺 1 cm 程度の立方体の質量分析セルがあり、強磁場が常にそのセルに垂直に作用している。また、磁場に対し平行方向にイオンの回転位相を整え回転半径を大きくするプレート電極1対と、イオンの検出を行うプレート電極1対がそれぞれ向かい合うように設置されている。イオン源で生成したイオンがそのセルに導入されると、磁場に対して垂直に円運動(イオンサイクロトロン運動)をし始める。当初ランダムに円運動をしているイオンは、この円運動と同じ周波数の交流電圧

を加えることにより、交流電圧と共鳴して軌道を大きく(励起)し、集まって円運動する(位相が揃う)ようになる。この円運動の軌道半径はイオンの速度と質量/電荷に比例して大きくなる。位相が揃い、ひとかたまりに回転運動を行っているイオンは、検出を行うプレート電極に周期的に近づくことにより、正弦波状の誘導電流を生じ、この誘導電流強度の時間変化をフーリエ変換することにより共鳴周波数が得られ、マススペクトルを得ることができる[15]。

## 3. 試料の採取と処理

質量分析には、2005年8月3日にバイカル湖北湖盆に流入する主な河川であるバルグジン川河口において採取した表層水試料(Sta0)と、同8月4日にバイカル湖沖合い最深部(Deep)において採取した水深5mの試料を用いた。試料は、各3リットル程度採取し、濾過後濃塩酸を添加してpH2程度に調整し、溶存有機物を $\text{C}_{18}$ 固相抽出ディスク(Empore, 3M)に担持した。担持された溶存有機物を80%メタノール溶液10mlにより溶離し、日本に持ち帰ったあと、窒素吹き付けにより溶媒を蒸発させてアメリカに運び、再び80%メタノール溶液を加えた後質量分析器により測定した。

## 4. 質量分析とデータ解析

$\text{C}_{18}$ 濃縮された試料は、National High Magnetic Field Laboratory (Tallahassee, FL)において、9.4テスラの超伝導マグネットを備えたFT-ICR質量分析器により測定された。測定は、ネガティブイオンモードで行い、イオン化はエレクトロスプレーイオン化法、ニードル電圧は-2.0kVに設定し、インフュージョン分析により行った。

腐植物質や天然水中溶存有機物試料を測定し

た場合に ESI イオン化法で得られるピークは、ほとんどが1価イオンのピークであることが知られている[16]。このことは、多くのピークについて、 $1.0033m/z$ の間隔をあけて $^{13}C$ 同位体ピークが見られることから容易に確かめられる。

インフュージョン分析により得られる質量スペクトルには、通常数千のピークが検出される。この膨大なデータを処理する方法として、Kendrick mass 分析がある。Kendrick mass 分析は、最初に石油化学分野で提案され、使われてきた方法であり、同じ基本構造を持つが、 $-CH_2$ の数だけが異なるような一連の化合物群を取り出すことができる方法である[17]。

Kendrick mass 分析では、まず、次式により測定された質量を“Kendrick mass”に変換する。

$$\text{Kendrick mass (KM)} = \text{IUPAC mass} \times (14.0000 \text{ Da} / 14.01565 \text{ Da})$$

得られた Kendrick mass と、Kendrick nominal mass の差が Kendrick mass defect (KMD) である。

$$\text{Kendrick mass defect (KMD)} = \text{Nominal Kendrick mass} - \text{Kendrick mass}$$

KMDは、同じ基本構造を持つが、 $-CH_2$ の数だけが異なるような一連の化合物群について同値となる。この、同じKMDを有する有機物群を取り出し、それぞれの示性式を決定していくことにより、効率的に分子の同定を進めることができる。

## 5. 結 果

### 5-1. バイカル湖DOMの質量スペクトルの特徴

FT-ICR 質量分析の結果得られた Deep 水深 5 m のマススペクトルを図1に示す。エレクトロスプレーイオン化法は、先に述べたように最もソフトなイオン化法として知られており、フラグメントイオンがほとんど生じないため、得られたピークはほとんどが分子イオンピークであると考えることが出来る。バイカル湖水の質量分析の結果、主に  $m/z = 300 \sim 600$  の範囲で、2,000を超えるピークが検出された ( $S/N > 5$ )。図2は、同じマススペクトルの  $m/z = 397.100 \sim 397.200$  を拡大し、ピークの同定結果を合わせて示したものである。

図2より、この質量分析器が非常に高い分解能でピークを検出していることが分かる。図に示した矢印は36.4mDaの  $m/z$  差を示しており、分子内における  $CH_4$  と  $O$  の違いに相当する。このように、FT-ICRMS を用いると、複雑な分子ピークは高い分解能で相互分離され、同定が可能になる。本装置のピーク分解能は、例えば  $m/z = 400$  付近の分子ピークにおいては、300,000 ( $m/\delta m_{50\%}$ ) 以上と計算された。

### 5-2. The van Krevelen Diagram によるDOMのキャラクタリゼーション

同定された有機物群を視覚的に比較できる方法として、van Krevelen Diagram[18]がある。図3はバルグジン川河口部 (Sta0) および最深部 (Deep) 5 m で採取された試料のピーク同定結果から作成された van Krevelen Diagram である。

縦軸には H/C 元素組成比、横軸には O/C 元素組成比をプロットしてあり、1点が1分子イオンピークに相当する。さて、模様のように

見える van Krevelen Diagram であるが、様々な情報を視覚化している。例えば、ある直線に沿って点が並んでいる場合、直線に沿って並んだ有機分子群は、同種の分子構造（アルキル鎖など）をもつ有機物群が、特定の元素比の官能基を得る、あるいは失っていく変化を示している。直線を  $H/C = -a(O/C) + b$  としたとき

に、メチレン基（ $-CH_2$ ）の付加/脱離は、 $a = 2$  で示される。同様に、水素化/脱水素化は鉛直方向の直線、脱水は  $a = -2$ 、酸化/還元は水平方向の直線で、それぞれ示される。

また、一連の有機化合物群は、それぞれある一定範囲の  $H/C$  および  $O/C$  比を有することから、同定された有機物がどのような種類のも

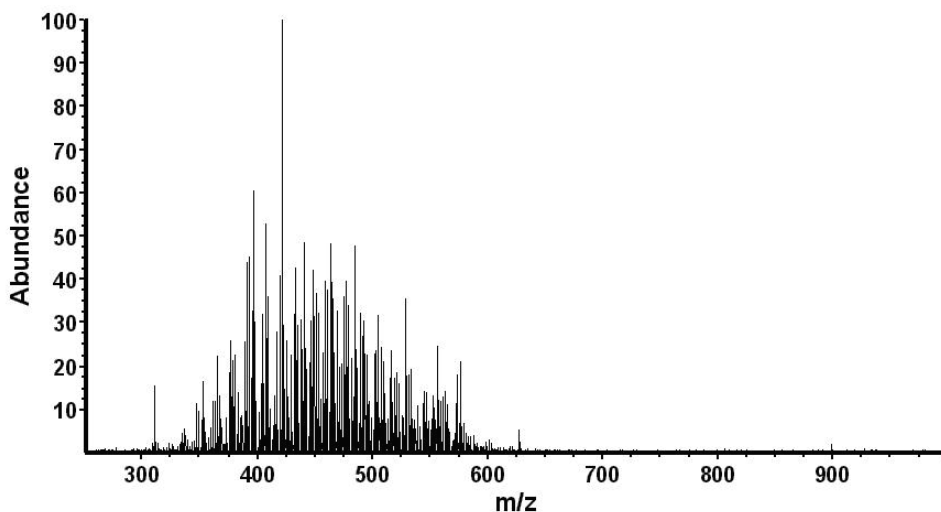


図1 Deep (5 m) の ESI-FT-ICR マススペクトル

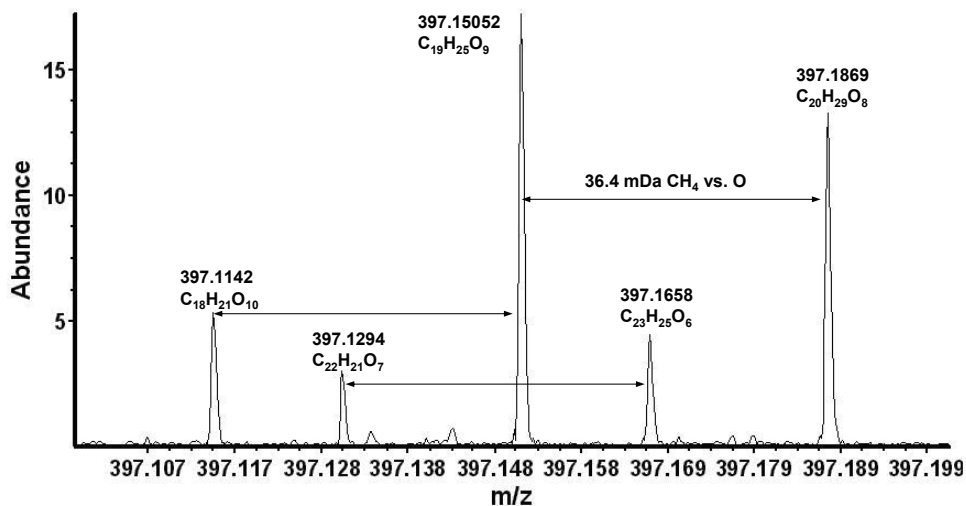


図2 Deep (5 m) の ESI-FT-ICR マススペクトル ( $m/z = 397.100 \sim 397.200$ )

のであるのか、大まかにグループ化することが可能である。図3(a)に大まかな有機化合物の取り得る範囲をグループごとに円および楕円で示した[9]。Sta0においては、典型的な河川水起源DOMの分布が得られた。腐植物質試料でよく観測される、Lignin および Charcoal Humic Acid の領域に主に分布し、それに加えて、

Condensed Hydrocarbon の領域にもピークが検出された。Condensed Hydrocarbon は、Black carbon, あるいは分子状炭素などと呼ばれ、地球表層に存在する有機炭素の主要な形態の1つとして注目され始めている。主に植物の燃焼過程で発生すると考えられており、亜熱帯域や熱帯域での自然火災・あるいは化石燃料

図3(a)

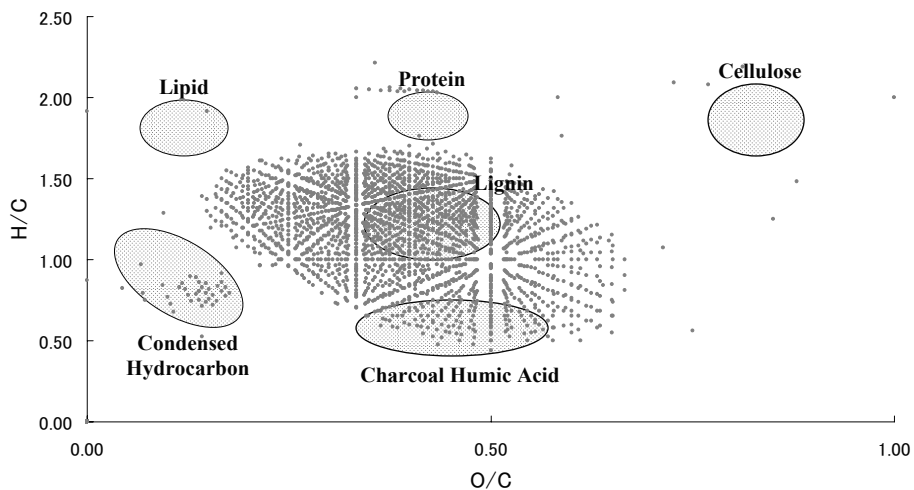


図3(b)

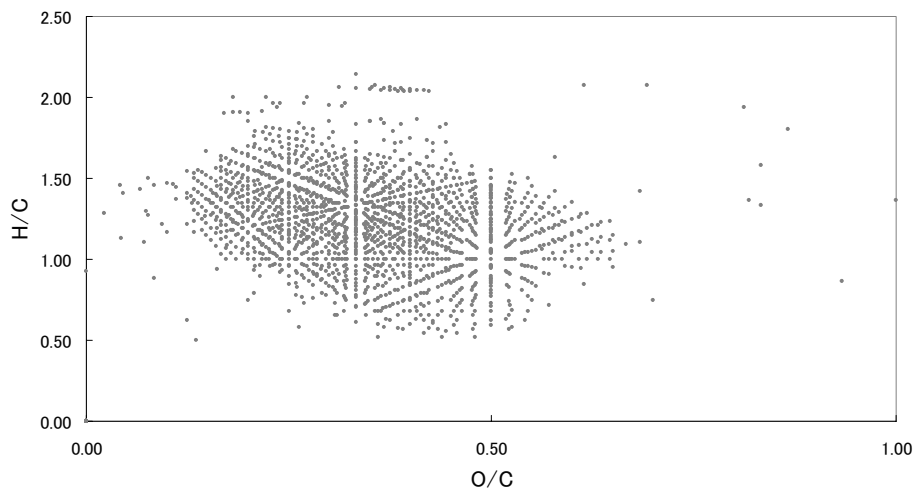


図3 バイカル湖DOMの質量分析結果より得られた van Krevelen Diagram (a): Sta0 (0 m) 試料; (b): Deep (5 m) 試料)

や薪の燃焼などの人間活動が主な排出源である。水への溶解度が低いことから、主に土壌に存在する。今回の結果は寒帯で人口密度が小さいシベリア地域においてもこれらの物質が水中に存在していることを示しており、興味深い。

また、図3(a)と(b)を比較すると、河川水中溶存有機物と沖合の湖水との有機物組成の違いも明らかになる。

すなわち、河口 (Sta0) と沖合試料で、Lignin および Charcoal Humic Acid の領域のピークに関して大きな違いは見られなかったが、河口で検出された Condensed Hydrocarbon の領域のピークは沖合試料では検出されず、沖合試料では Protein の領域に非常に強い分子ピーク群が出現した。同定の結果、それらは  $C_{18}H_{37}O_7S$  ( $m/z = 397.22649$ ),  $C_{20}H_{41}O_8S$  ( $m/z = 441.25275$ ),  $C_{22}H_{45}O_9S$  ( $m/z = 485.27899$ ) などの一連の有機硫黄化合物であることが判明した。これらの高い H/C 比を有する (多くは飽和している) 有機硫黄化合物群は、湖内生物活動起源の有機物であると考えられる。

すなわち、河川から供給された腐植物質はほぼそのまま沖合に運ばれるが、沖合では活発な生物活動により有機硫黄化合物群に代表されるような自生性溶存有機物が加わるということが分子レベルで明らかとなった。この一連の有機硫黄化合物群の存在についてはまだ世界的にも報告がほとんどなく、今後さらに分子構造などについての検討を進めていくことが重要である。

自生性の溶存有機物の代表物質としては炭水化物が挙げられるが、残念ながら  $C_{18}$  固相抽出における回収率が低いこと、エレクトロスプレーイオン化法によるイオン化効率がタンパクや腐植物質などに比べると低いことから、今回の測定では炭水化物のピークはほとんど検出できな

かった。しかしながら、近年新しく実用化された大気圧光イオン化法 (APPI) を適用すれば、低極性分子や中性分子も効率的に検出できることがわかっている [7]。

今後は、超高分解能質量分析器を用いて、海洋深層水を含めた様々な天然水における溶存有機物の同定がされ、有機化合物のデータベース化が進められるであろう。また、このデータベースにより、水圏において様々な機能を担っている溶存有機物を、化合物レベルで明らかにし、詳しい動態解析を行うことが可能になるものと期待される。

## 6. 謝 辞

本調査は、文部科学省科学研究費補助金 (No. 14255015, 代表: 京都大学人間・環境学研究科杉山雅人教授) による補助を受けて行った。また、FT-ICRMS 分析を行うにあたり、米国 National Science Foundation (CHE-008 9147, 代表: Ohio State University, Professor Patrick G. Hatcher) からの補助を受けた。

## 7. 参考文献

- [1] Siegenthaler U., Sarmiento J.L.: Atmospheric carbon dioxide and the ocean, *Nature*, 365, 119-125 (1993)
- [2] Tranvik L.J.: Allochthonous dissolved organic matter as an energy source for pelagic bacteria and the concept of the microbial loop, *Hydrobiologia*, 229, 107-114 (1992)
- [3] Arts M.T., Robarts R.D., Kasai F., Waiser M.J., Tumber V.P., Plante A.J., Rai H., de Lange H.J.: The attenuation of ultraviolet radiation in high dissolved

- organic carbon waters of wetlands and lakes on the northern Great Plains, *Limnol. Oceanogr.*, 45 292–299 (2000)
- [4] Witters H.E., Van Puymbroeck S., Vanderborcht O.L.J. : The effect of humic substances on the toxicity of aluminium to adult rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Biol*, 37, 43–53 (1990)
- [5] Okamura H., Sugiyama Y.: Photo-sensitized degradation of Irgarol 1051 in water, *Chemosphere*, 57, 739–743 (2004)
- [6] Hedges J.I., Eglinton G., Hatcher P.G., Kirchman D.L., Arnosti C., Derenne S., Evershed R.P., Kogel-Knabner I., de Leeuw J.W., Littke R., Michaelis W., Rullkoter J.: The molecularly-uncharacterized component of nonliving organic matter in natural environments, *Org Geochem*, 31, 945–958 (2000)
- [7] Mopper K., Stubbins A., Ritchie J.D., Bialk H.M., Hatcher P.G: Advanced instrumental Approaches for characterization of marine dissolved organic matter: extraction techniques, mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Chem. Rev.*, 107, 419–442 (2007)
- [8] Kujawinski E.B., Freitas M.A., Zang X., Hatcher P.G., Green-Church K.B., Jones R.B. The application of electrospray ionization mass spectrometry (ESI MS) to the structural characterization of natural organic matter, *Org Geochem*, 33, 171–180 (2002)
- [9] Kim S., Kramer R.W., Hatcher P.G. Graphical method for analysis of ultra-high-resolution broadband mass spectra of natural organic matter, the Van Krevelen Diagram, *Anal Chem*, 75, 5336–5344 (2003)
- [10] 森野浩, 宮崎信行: バイカル湖 — 古代湖のフィールドサイエンス —, 東京大学出版会 (1994)
- [11] Watanabe Y., Drucker V.V.: Phytoplankton blooms in Lake Baikal, with reference to the lake's present state of eutrophication, In *Ancient lakes, Their cultural and biological diversity*, Kenobi productions, Belgium, 27–225 (1999)
- [12] Yoshioka T., Ueda S., Khodzher T., Bashenkhaeva N., Korovyakova I., Sorokovikova L., Gorbunova L.: Distribution of dissolved organic carbon in Lake Baikal and its watershed, *Limnology*, 3, 159–168 (2002)
- [13] Sugiyama Y., Anegawa A., Kumagai T., Sugiyama M., Harita Y., Hori T. Distribution of dissolved organic carbon in lakes of different trophic-types, *Limnology*, 5, 165–176 (2004)
- [14] Yoshioka T., Ueda S., Khodzher T., Bashenkhaeva N., Tomberg I., Gorbunova L., Khanaev I., Zhdanov A.: Dissolved organic matter in Lake Baikal and its watershed: a possible tool for studying the interaction between terrestrial and freshwater environments. In *New scope on sustainable watersheds in east Asia*, DIWPA series vol.3, 71–80 (2002)

- [15] Marshall A.G., Hendrickson C.L., Jackson G.S., Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer, *Mass Spec. Rev.*, 17, 1-35 (1998)
- [16] Stenson A. C., Landing W. M., Marshall A. G., Cooper W. T.: Ionization and Fragmentation of Humic Substances in Electrospray Ionization Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 74, 4397-4409 (2002)
- [17] Kendrick E.: A mass scale based on  $\text{CH}_2 = 14.0000$  for high resolution mass spectrometry of organic compounds, *Anal. Chem.*, 35, 2146-2154 (1963)
- [18] Van Krevelen D.W.: Graphical-statistical method for the study of structure and reaction processes of coal, *Fuel*, 29, 269-284 (1950)