

1. 高分解能液体クロマトグラフ質量分析計によるスクリーニング 分析調査に関する報告(その3)

中野 耕太
山田 圭一
今中 壮一

1. はじめに

高分解能液体クロマトグラフ質量分析計(以下、LC-HRMS)は精密質量を取得できることから、フラグメントイオンを構成している組成式を推定できるため定性分析に長けている。また、網羅的にピークを取得できることからデータの取りこぼしが少なく、一度データを取得しておけば、データを遡って照合することも可能である。こうしたLC-HRMSの利点を活かしてノンターゲットスクリーニング分析が近年試みられており¹⁾、試料に含まれる物質の網羅的な探索により得られた情報をデータベースの情報と照合することで、標準物質を用いなくても試料に含まれる物質の検出及び推定が可能となる。さらに、平常時にデータを蓄積し、水質事故発生時に平常時との差異を解析することで、水質事故原因物質を特定することも可能と考えられる。

本市ではこれまでに、LC-HRMSを用いたスクリーニング分析によって淀川水系および本市浄水場原水、処理過程水における農薬および人工甘味料の実態調査を行ってきた²⁾³⁾。本稿では、平常時データの蓄積を目的として、淀川水系における微量有機物についてLC-HRMSによるノンターゲットスクリーニング分析を行い、その存在実態を調査した結果を報告する。

2. 調査方法

2. 1 調査地点

本調査の採水地点を図-1に示す。淀川と上流3本川は地点①～⑧から令和3年10月に採水し、淀川に流入する支川⑨～⑬については淀川に合流する直前で令和4年3月に採水した。

2. 2 試薬

精製水は、水道水を超純水製造装置(Milli-Q Integral 10、Merck 製)で精製したものを使用した。メタノール(関東化学製または富士フイルム和光純薬製)及び酢酸アンモニウム(ジューエルサイエンス製)はLC/MS用を使用し、チオ硫酸ナトリウム(関東化学製)は特級を使用した。

2. 3 試料の採取及び前処理

試料水は15mLポリプロピレン製遠沈管(サンブラテック製)に採取し、満水にして直ちに密栓した。その後、試料量を10mLとし、1mLのメタノールを加えて混合した後、1.5mLポリプロピレン製遠沈管(アズワン製)に全量に移し入れ、8,000×gで20分間遠心分離を行った後の上清をスクリーバイアルに分取したものを検体とし、LC-HRMS分析に供試した。また、精製水を15mLポリプロピレン製遠沈管に採取し、試料水と同様の操作を施してブランク試料とした。

2. 4 分析装置

液体クロマトグラフ部 Vanquish Flex UHPLC (Thermo Fisher Scientific) と質量分析部 Q Exactive Focus (Thermo Fisher Scientific) により構成されたLC-HRMSを用いた。分析条件は既報⁴⁾のとおりとした。

2. 5 データ解析

データを解析するにあたりCompound Discoverer 3.2(Thermo Fisher Scientific)を用いてワークフロ



図-1 調査地点

ーを作成した。ワークフローの概略を図-2 に、各ノードにおける処理の詳細を表-1 に示す。また、ピークの検出及びグルーピング条件は表-2 のとおりとし、検出条件を満たしたピークを「検出」と分類し、グルーピング条件を満たしたピークは単一の物質としてまとめた。この処理によって組成式や推定構造が組み込まれたピークリストを作成し、そのデータを解析に供した。

2. 5. 1 データベース検索による候補物質探索

原水に含まれる未知ピークの候補物質を探索するため、検出された化合物の組成演算結果や計算分子量をもとに、ネットワーク経由でデータベース検索を行った。データベースは mzCloud⁵⁾及び Chemspider⁶⁾を使用した。

2. 5. 2 フラグメントイオンサーチによる構造推定

データベース検索により提示された候補物質について、Compound Discoverer の機能であるフラグメントイオンサーチ (FISh) を用いてその確からしさを推定した。FISh とは、候補物質から生成されると考えられるフラグメントイオンと未知ピークで観測されたフラグメントイオンを比較して未知ピークと候補物質との類似度を推定する手法である。本調査では、3 個以上の観測フラグメントイオンが理論フラグメントと一致し、かつ、その物質に特徴的なフラグメントイオンが検出された物質を「推定」と分類した。

2. 5. 3 候補化合物の同定

データベース検索の結果、候補物質として提示された物質のうち、当所で標準物質を所持している物質については標準試料を調製し、分析に供した。標準物質のピークと試料水中の未知ピークの保持時間及びフラグメントパターンを比較し、一致したものを「同定」と分類した。

2. 5. 4 主成分分析による微量有機物含有傾向の把握

スクリーニング分析により作成されるピークリストには数百～数万のピークが含まれるため、各々のピークを確認して試料の全体的な特徴や傾向などを把握することは困難である。そのため、多変量解析のひとつである主成分分析を用いて、試料の差異を視覚的に捉えられるようにすることを試みた。主成分分析とは、データに含まれる多数の因子を可能な限り情報損失が少なくなるよう主成分 (PC) に集約させる方法である⁷⁾。すべての化合物のピーク面積値を軸にとりて各試料の傾向を視覚化することは困難であるが、主成分分析によって情報をより少ない次元に集約することで試料間の類似度や特徴的な物質を視覚化することが可能である。

主成分分析の結果は主成分得点プロット及び因子負荷量プロットで表される。主成分得点プロットは、それぞれの試料に含まれる微量有機物の傾向を位置関係で表したもので、プロット間の距離が近ければその試料の性質は類似しており、反対に遠ければ差異が顕著であることを示している。また、因子負荷量プロットは、検出された物質が主成分にどの程度強く関与するかをプロットしたもので、その位置関係は主成分得点プロットと対応しており、各試料に特徴的な物質を絞り込むことができる。本調査では、Compound

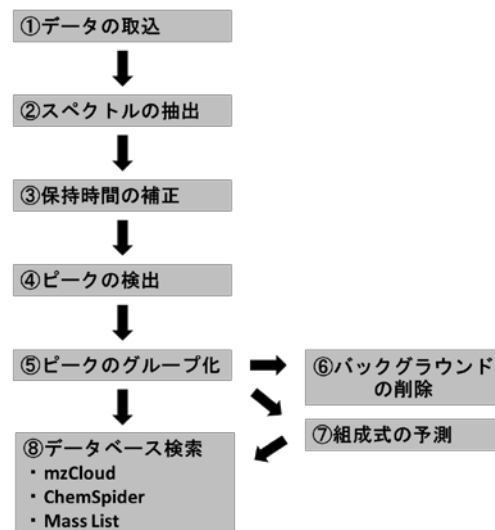


図-2 Compound Discoverer のワークフロー概略

表-1 各ノードの処理

ノード	処理の詳細
①	測定データの取り込みを行う。
②	取り込まれたスペクトルの保持時間を指定して抽出する。
③	試料間の保持時間を補正する。
④	ピークとして検出する面積値の閾値、検出が予測される付加イオン (H ⁺ , NH ₄ ⁺ 等)、組成式を予測する際の各元素数の範囲及び許容質量誤差を設定する。
⑤	プリカーサーイオンから付加イオンの組成を差し引き、単一の物質から複数のプリカーサーイオンが検出された場合はそれらのピークを同一の物質としてグルーピング化する。
⑥	ブランク試料と比較し面積値の比が一定以下のピークをバックグラウンドとして削除する。
⑦	組成式を予測するための各元素数、不飽和度数、水素原子数/炭素原子数比の範囲等を設定し、条件に合致する組成式を抽出する。
⑧	検出された精密質量から網羅的に物質を探索するために、データベースを指定して検索・照合を行う。

表-2 ピークの検出条件及びグルーピング条件

検出条件	
保持時間	2.5～20.5 min
ピーク面積	500,000以上
S/N比	3以上
変動係数(CV)(n=3)	50%以内
ブランク試料との面積比	5倍以上
グルーピング条件	
許容質量誤差	3 ppm以内
許容保持時間誤差	0.2 min以内

Discoverer に搭載された自動解析機能を用いて主成分分析を行った。各試料で検出された微量有機物のピーク面積値を因子とし、それぞれ第 1 主成分 (PC1) 及び第 2 主成分 (PC2) について 2 次的にプロットし、各試料水間の差異解析及び試料に特徴的な物質の抽出を試みた。

3. 結果及び考察

3. 1 微量有機物の探索と推定

淀川本川及び支川試料について図-2 のフローにしたがい解析を行ったところ、本川試料では 604、支川試料では 2,289 のピークが「検出」された。これらについてデータベース検索を行い、候補化合物が提示された物質については FISH によって確からしさの評価を行った。その結果、表-3 に示す物質が「推定」と分類された。表中の「本川」「支川」の欄に○印でどちらの試料で検出されたかを示しており、一例として、図-3 にフェキソフェナジン（抗アレルギー薬）の構造を、図-4 に FISH による未知ピークのフラグメントイオンとフェキソフェナジンの理論フラグメントイオンを比較した結果を示す。理論フラグメントイオンと一致したフラグメントイオンは緑色で表示されており、その構造の候補が示されているが、フェキソフェナジンのフラグメンテーションによって生成すると考えられた 39 個の理論フラグメントのうち、27 個が未知ピークで観測された。また、フェキソフェナジンのベンジル位に存在するヒドロキシ基が脱離したフラグメントイオンと考えられる m/z 484.28397 及び m/z 466.27380、ヒドロキシ基の脱離、カルボキシ基の開裂及びピペリジン環内にある窒素原子の α 開裂によって生成したフラグメントイオンと考えられる m/z 171.11679 が検出されたことから、フェキソフェナジンに特徴的なフラグメントイオンが検出されたと判断し⁸⁾、このピークはフェキソフェナジンによるものと推定した。

3. 2 推定された微量有機物の同定

次に、推定された物質のうち当所で標準物質を所持している物質について標準試料の分析を行い、保持時間やフラグメントパターンの比較を行ったところ、医薬品や農薬類等、計 32 物質が「同定」された。同定された物質は、表-3 の「同定」の欄に○印で示しており、一例として、支川試料で候補化合物として検出され、FISH によりトリメトプリム（抗菌薬）と推定された物質のピークとトリメトプリム標準試料のピークについて比較した結果を図-5 に示す。支川試料のピークと標準試料のピークの保持時間及びフラグメントパターンは一致しており、支川試料のピークはトリメトプリムであると同定された。医薬品や農薬類のほかには、 ϵ -カプロラクタム（樹脂原料）や 1,3-ジフェニルグアニジン（加硫促進剤）などの PRTR 法対象化学物質⁹⁾、スクラロースなどの食品添加物、リン酸トリス(2-クロロエチル)などのプラスチック添加剤も同定された。

これらの結果から、ノンターゲットスクリーニング分析によって河川水に含まれる種々の微量有機化合物を探索・推定し、推定された物質の標準試料を分析することで同定できることがわかった。ノンターゲットスクリーニング分析のデータが取得されていれば、後日取得した標準試料のデータと照合することで物質を同定することが可能であり、さらに、同定された化合物を Mass List に登録することで、以降のス

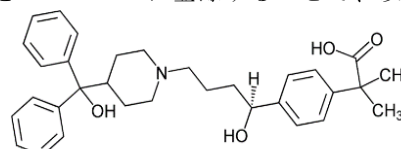


図-3 フェキソフェナジンの構造

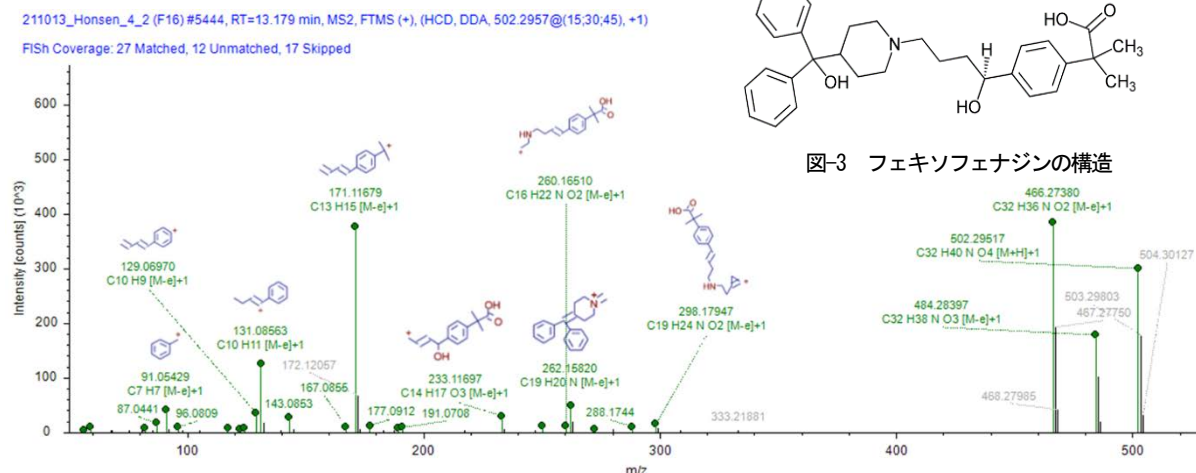


図-4 FISHによる未知ピークのフラグメントイオンとフェキソフェナジンの理論フラグメントイオンとの比較

クリーニング分析結果の解析においてこれらの物質を検出できることから、水質事故原因物質の特定に有用であると考えられる。

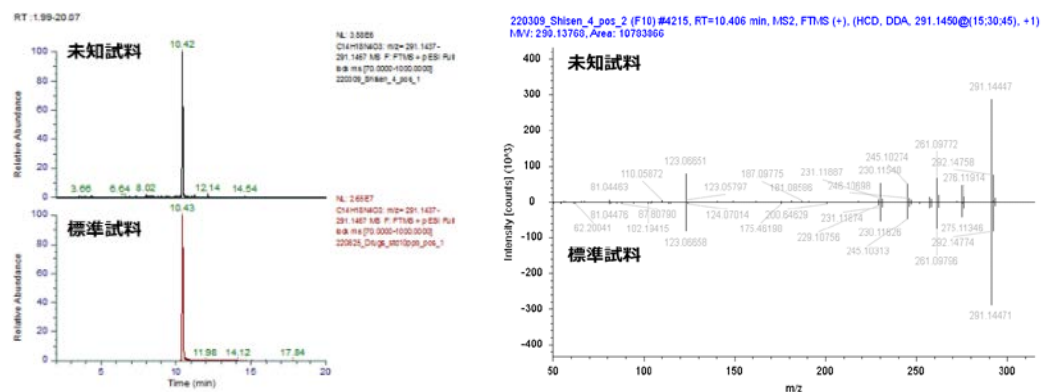


図-5 未知ピークとトリメトプリム標準試料の保持時間及びフラグメントイオンの比較

表-3 FISHにより推定された微量有機物と標準試料による同定

物質名	用途	本川	支川	同定	物質名	用途	本川	支川	同定
医薬品					農業類				
アテノロール	高血圧症治療薬	○	○	○	シウロン	除草剤（樹木等）	○	○	○
インドメタシン	抗炎症薬		○	○	ブロマシル	除草剤（樹木等）	○	○	○
エリスロマイシン	抗生物質		○	○	ヘキサジノン	除草剤（樹木等）	○	○	○
カルバマゼピン	抗てんかん薬	○	○	○	カルベンダジム	殺菌剤分解物（稲、野菜等）	○	○	○
クラリスロマイシン	抗生物質	○	○	○	アトラジン	除草剤（野菜等）		○	○
クロタミトン	鎮痛薬	○	○	○	デブコナゾール	殺菌剤（小麦等）		○	○
ジソピラミド	抗不整脈薬	○	○	○	カフェンストロール	除草剤（稲、芝）		○	○
ジルチアゼム	高血圧症治療薬		○	○	デフリルトリオン	除草剤（水稲）	○		○
スルピリド	抗精神病薬	○	○	○	ピラクロニル	除草剤（水稲）	○		○
トリメトプリム	抗菌薬	○	○	○	ピロキロン	除草剤（水稲）	○		○
ベザフィブラート	脂質異常症治療薬	○	○	○	フロモブチド	除草剤（水稲）	○	○	○
イルベサルタン	高血圧症治療薬	○	○		メトミノストロピン	殺菌剤（水稲）	○		○
テルミサルタン	高血圧症治療薬	○	○		その他の有機化合物				
シタグリブチン	糖尿病治療薬	○	○		スクラロース	食品添加物(甘味料)	○	○	○
ビルダグリブチン	糖尿病治療薬	○	○		カフェイン	食品成分、鎮痛薬	○	○	○
フェキソフェナジン	抗アレルギー薬	○	○		チアベンダゾール	食品添加物(ポストハーベスト農薬)		○	○
ピラスチン	抗アレルギー薬	○	○		ブリリアントブルーFCF	食品添加物(着色料)		○	
セチリジン	抗アレルギー薬	○	○		1,3-ジフェニルグアニジン	ゴム添加剤(加硫促進剤)	○	○	○
フレカイニド	抗不整脈薬	○	○		リン酸トリス(2-クロロエチル)	プラスチック添加剤(難燃剤)	○	○	○
レバミピド	胃薬	○	○		リン酸トリブチル	プラスチック添加剤(難燃剤)	○	○	○
リドカイン	鎮痛薬	○	○		リン酸トリフェニル	プラスチック添加剤(難燃剤)	○	○	○
ロサルタン	高血圧症治療薬	○	○		ベンゾトリアゾール	防食剤	○	○	○
ケトプロフェン	鎮痛薬	○	○		ε-カプロラクタム	樹脂原料	○	○	○
フェブキソスタット	痛風治療薬	○	○		ジシクロヘキシルアミン	防さび剤、染料原料など	○	○	
オルメサルタン	高血圧症治療薬	○	○		ポリエチレングリコール(PEG) (重合度5~20)	樹脂原料など	○	○	
ロスバスタチン	脂質異常症治療薬	○	○		ポリプロピレングリコール(PPG) (重合度4~12)	樹脂原料など	○	○	
フルコナゾール	抗真菌薬	○	○		ラウリルヒドロキシスルホベタイン	洗浄剤（両性界面活性剤）		○	
カルバマゼピン 10,11-エポキシド	抗てんかん薬代謝物	○	○		ポリオキシエチレンアルキルエーテル (C10,12,E.O.=3~6)	洗浄剤（非イオン界面活性剤）	○	○	
10,11-ジヒドロキシ-10,11- ジヒドロカルバマゼピン	抗てんかん薬代謝物	○	○		アルキルグルコシド(C=10,12,14)	洗浄剤（非イオン界面活性剤）	○	○	
スルファピリジン	抗リウマチ薬代謝物	○	○		ラウリルジメチルアミンオキシド	洗浄剤（非イオン界面活性剤）	○	○	

3. 3 主成分分析を活用した淀川水系に含まれる微量有機物の傾向把握

3. 3. 1 淀川本川

図-6 に本川試料の主成分分析の結果を示す。なお、図中の①～⑧は、図-1 に示す調査地点の番号を表している。主成分得点プロットにおいて、淀川各地点(⑤～⑧)の試料はそれぞれ近い位置に検出されていることから、調査日の淀川水質は採水地点によらず類似しており、淀川右岸側、左岸側で大きな水質の違いはなかったと考えられた。

一方、上流三川(②～④)を比較する

と PC1、PC2 とともに桂川(④)が他の試料と離れた位置に検出されたことから、桂川と他の河川(木津川、宇治川)では水質の差が大きいと考えられた。また、因子負荷量プロットでは、主成分得点プロットにおける④が位置する第3象限には他の試料の位置する象限よりも多くのプロットが集まっていたことから、桂川に特徴的な物質が多く存在していることがわかった。各プロットを詳細に調べたところ、桂川には前項にて同定・推定された医薬品や界面活性剤など生活排水由来と考えられる物質が多く存在したが、桂川宮前橋の上流部には下水処理場が存在するため、その影響を受けたものと考えられた。一方、瀬田川(①)、宇治川(③)及び木津川(②)がプロットされた第1象限には、水稻用の農薬が多く存在した。前報³⁾にも示したとおり、瀬田川、宇治川及び木津川は稲作の影響を強く受けており、この結果は妥当であると考えられた。

3. 3. 2 淀川支川

図-7 に支川試料の主成分分析の結果を示す。主成分得点プロットでは、安居川(⑫)の試料が PC1 において他の試料との距離が大きく、他の支川試料と水質の差が大きいことがわかった。また、因子負荷量プロットから、主成分得点プロットにおける⑫が位置する第2象限、及び穂谷川(⑨)、黒田川(⑩)、天野川(⑪)が位置する第1象限から多くの有機物が検出された。その一方、芥川(⑬)が位置する第4象限には、ほとんど有機物が検出されていないことから、他の支川と比較して含まれる有機物の種類は少ないと考えられた。また、第2象限に密集した因子負荷量プロットには医薬品が多く含まれていたため、安居川は生活排水あるいは下水処理水の影響を受けていることが考えられた。

以上の結果より、主成分得点プロットによって淀川本川・支川の水質傾向の違いを視覚的に把握することができることがわかった。また、因子負荷量プロットによって、医薬品や界面活性剤を多く含む河川の試料が他の河川試料と離れた位置にプロットされる等、含有する微量有機物の傾向の違いを説明することが可能であり、水源や浄水場原水のスクリーニングを定期的の実施し、平常時の測定データを蓄積しておくことで、水質事故発生時のデータと平常時のデータを比較し、水質異常原因物質を迅速に特定することができると思われる。

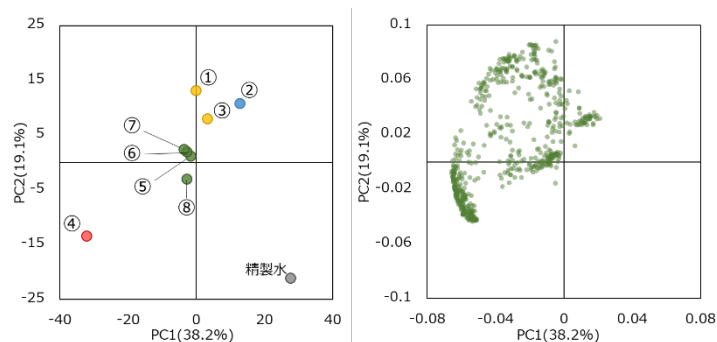


図-6 本川試料の主成分得点プロット(左)及び因子負荷量プロット(右)

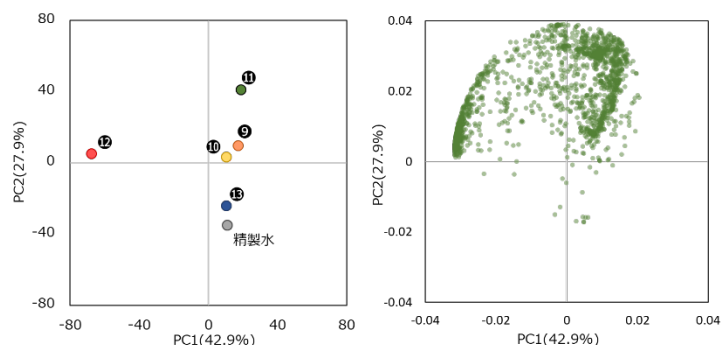


図-7 支川試料の主成分得点プロット(左)及び因子負荷量プロット(右)

4. まとめ

- 1) LC-HRMS によるノンターゲットスクリーニングによって、河川水中に存在する種々の微量有機物を探索し、標準品を用いなくても組成演算やデータベース検索及びFISHにより構造推定ができ、標準試料のデータと照合することで物質を同定可能であることがわかった。
- 2) 多変量解析のひとつである主成分分析を活用することで、淀川水系の微量有機物を含有傾向の違いを把握することができた。また、試料に含まれる微量有機物の種類や含量が異なる程、主成分得点プロット間の距離が大きくなる性質から、平常時水源や浄水場原水のデータを蓄積しておき、水質異常時に平常時のデータと比較することで、水質異常原因物質の特定が可能になると考えられた。

5. 参考文献

- 1) 石井淑大、栗栖太、畠山準、春日郁朗、古米弘明：入間川へ流入する有機汚濁物質と浄水処理後の残留状況のノンターゲットスクリーニング分析、環境科学会誌 33 (5)、pp. 79-89、2020
- 2) 外山義隆、平林達也、今中壮一：高分解能液体クロマトグラフ質量分析計によるスクリーニング分析調査に関する報告、大阪市水道局水質試験所調査研究ならびに試験成績 第 72 集、pp. 37-43、2020
- 3) 中野耕太、外山義隆、今中壮一：高分解能液体クロマトグラフ質量分析計によるスクリーニング分析調査に関する報告（その 2）、大阪市水道局水質試験所調査研究ならびに試験成績 第 73 集、pp. 29-36、2021
- 4) 中野耕太、外山義隆、今中壮一：高分解能質量分析計を用いた淀川水系における微量有機物のスクリーニング調査、令和 4 年度全国会議（水道研究発表会）講演集、pp. 638-639、2022
- 5) mzCloud： <https://www.mzcloud.org/>
- 6) Chemspider： <http://www.chemspider.com/>
- 7) 滝埜昌彦：データ処理手法及び多変量解析による LC/MS 分析の視覚化、分析化学、第 63 巻、第 6 号、pp. 497-513、2014
- 8) 中田尚男：有機偶数電子イオンのフラグメンテーションにおけるマスシフト則、Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan、50 巻 4 号、pp. 173-188、2002
- 9) 経済産業省：PRTR 制度 対象化学物質 第一種指定化学物質リスト
https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/law/pdf/211015class1.pdf