

## <特集論文>

# 天然有機物質の質量分析条件の検討とその適用

Analytical Optimization of the Mass Spectrometry for Measuring the Molecular Weights of NOM

池田和弘<sup>1\*</sup>, 清水芳久<sup>1</sup>, 日下部武敏<sup>1</sup>, 松井三郎<sup>2</sup>

<sup>1</sup>京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター

<sup>2</sup>京都大学大学院地球環境学堂

Kazuhiro Ikeda<sup>1\*</sup>, Yoshihisa Shimizu<sup>1</sup>, Taketoshi Kusakabe<sup>1</sup> and Saburo Matsui<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Research Center for Environmental Quality Management, Kyoto University

<sup>2</sup>Graduate School of Global Environmental Studies, Kyoto University

### Abstract

Analytical parameters in mass spectrometry were evaluated in order to measure the molecular weight distribution of NOM (Natural Organic Matter). Ionic strength of sample, sheath gas pressure, tube lens voltage, and heated capillary temperature strongly affected mass spectrum, while NOM concentration and pH of sample did not. The apparent molecular weight distribution and structural information of NOM were obtained from the mass spectrometry. It was found that some NOMs have  $-CH_2-$  based structures in their lower molecular weight regions.

**Keywords:** NOM, mass spectrometry, electrospray ionization, molecular weight distribution, structural information, optimum analytical parameters

## 1. はじめに

水環境中に普遍的に存在する天然有機物質 (NOM) は、多分散で複雑な混合物であり、存在する場所、季節によって異なる構造、構成を持ち、それゆえ異なる物理化学的性質を有する<sup>1)</sup>。また、NOM の主要な構成要素であるフミン質は、疎水性酸の性質を持つが、その多くの成分は構造的には未同定あるいは未帰属となっている。NOM は、有害な汚染物質を収着あるいは結合し、その水環境中での挙動や毒性に影響を与えることが知られている。一方、水処理過程においても消毒副生成物の前駆物質となり、また、汚染物質の処理効率に影響を与えることが知られている。それゆえ、水環境中における汚染の予見やその工学的な管理、ヒトの健康リスク管理にとって、NOM の構造特性を理解し、NOM と汚染物質の収着・結合特性や消毒剤などとの反応性などとの関係を把握することは極めて重要となる。

NOM の分子量分布は、化学構造を解析する上で最も基本的な情報である。また、フミン質の平均分子量とフミン質の疎水性有機汚染物質に対する収着係数の間に正の相関が報告されていることなどから、汚染物質との反応性を予想・把握するための主要な情報と考えられる。これまで、NOM の分子量分布は、主にサイズ排除クロマトグラフィーや膜分離法によって測定されてきた。しかし、前者には NOM とカラム担体との相互作用が溶出時間へ影響することや NOM 成分の濃度が主として吸光度で測定されるが、各成分の吸光特性が異なるため、個数と完全には対応しないことなどの問題が存在する。後者には、NOM と膜素材との相互作用が膜透過に影響を与えることや有限な数の膜分離装置により分子量分布を決定するためには分布形を予測しなければならないなどの問題が存在する。また、両者とも分子量は分子サイズから決定されるため、NOM の分子量を決定するためには、分子サイズと分子量の関係が NOM のものと同様な標準物質を必要とする。また、装置内での挙動も NOM と類似でなければならない。しかし、NOM の構造特性が未知な以上、そのような標準物質の選定は極めて難しい。

質量分析法は上述したような標準物質を必要としない

\*〒520-0811 大津市由美浜 1-2

TEL : 077-527-6221 FAX : 077-524-9869

E-mail : ikeda@biwa.eqc.kyoto-u.ac.jp

分子量分布の測定法として期待されている。質量分析法は、かつてはイオン化法がハードなものであったため、イオン化の際にフラグメントが生じることから、NOMの分子量分布分析というよりは構造解析によく用いられてきた。それに対しソフトなイオン化法、たとえばエレクトロスプレーイオン化法(ESI)はこの問題を回避しようと考えられる。また、ESIを用いた質量分析法では、試料量はごく少量でよく、試料は水など極性の高い溶媒に溶かして測定するため、溶存態のNOMの測定には有利な測定法と言える。90年代後半から何人かの研究者がESI-MSを用いて、NOMの質量分析を行ってきた<sup>2)-7)</sup>。しかし、その分析条件の検討はごく限られた範囲であり、十分とは言いがたい。そこで本研究ではESI-MSを用い、NOMの主要な構成成分であるフルボ酸の分析を通して、溶液の組成や質量分析計のパラメーターに関する分析条件を検討し、分子量分布測定のための最適分析条件を確立した。また、その条件を用い、いくつかのNOMの質量分析を行った。

## 2. 実験方法

### 2.1 測定試料

質量分析法の最適分析条件の検討には、Suwannee River Fulvic Acid (SRFA)を用いた。決定した最適分析条件による分子量分布の測定は、Suwannee River Natural Organic Matter (SRNOM)、Nordic Fulvic Acid (NFA)、Nordic Humic Acid (NHA)を対象に行った。これらはいずれもInternational Humic Substances Societyから購入し、精製を行わずに使用した。NOMは超純水に溶かし保存液を作成し、同じく所定の濃度と組成の酢酸アンモニウム緩衝液の保存液と混合させ、そこに同体積のメタノールを加え、測定試料とした。また、NOMの入っていないブランクを同じ方法で作成した。NOM濃度は保存液のTOCを測定(TOC5000A, 島津製作所)することで計算した。使用した試薬はすべてWakoから購入した試薬特級グレード以上のものである。試料調製および保存はすべてガラス製かテフロン製の器具を用い、試料調製は質量分析の直前に行った。

### 2.2 質量分析

質量分析はエレクトロスプレーイオン化法四重極質量分析計(TSQ7000, Thermoelectron)を用いて行った。

このタイプの質量分析計は汎用的に使用されつつある測定機器である。質量分析計のチューニングとキャリブレーションはThermoelectronが定めた方法に従い、MRFA-Myoglobinを用いて行った。試料はシリンジポンプを用い質量分析計に流速5  $\mu\text{L}/\text{min}$ で導入した。質量分析はポジティブイオンモードで行い、 $m/z$ (イオンの質量/価数)が10 - 2500の範囲で5秒に1回のスキャンで得たマススペクトルを20スキャン積算した。ただし、最適分析条件決定後のNOMの分析の際は $m/z$ は100 - 2500の範囲とした。最終的なマススペクトルはNOMを分析した直後にブランクを分析し、それを差し引くことで得た。

## 3. 実験結果

### 3.1 質量分析条件の検討

NOMの質量分析によって得られたマススペクトルがその分子量分布に対応するためには、①イオン化の際にフラグメントが生じないこと。②イオン化の際に溶媒や塩のアダクトが生じないこと。③すべてのNOM成分が均一に(同じ効率で)イオン化すること。④NOM成分は1価にイオン化し、2価以上の多価イオンは生成しないこと。⑤溶液中のNOMが凝集あるいは分解しないこと。があげられる。本研究では質量分析条件として、溶液の組成(NOM濃度、イオン強度およびpH)と質量分析計の装置パラメーター(シースガス圧、ヒーティッドキャピラリー温度およびチューブレング電圧)に注目し、そのマススペクトルへの影響を見ることで、上述の条件をできるだけ満たす分析条件を検討・決定した。その影響評価は、すべてのイオンが1価であると仮定して計算した、マススペクトル中のピークに対応する成分の平均分子量(上述の条件が満たされるとき、これはNOMの真の平均分子量に相当する。)と観測されたピークの総数に対応するトータルイオン強度を用いて行った。NOMがよくイオン化するとトータルイオン強度は上昇するが、フラグメントが生じてもトータルイオン強度は上昇するため、平均分子量の変化をみて総合的に考察する必要がある。

評価方法は、まず分析の標準条件を定め、その中のひとつの分析条件を変化させ影響をみることにした。その標準条件は、NOM濃度: 200 mgC/L、イオン強度およびpH: 6 mM酢酸アンモニウムと6 mMアンモニア、シースガス圧: 60 psi、ヒーティッドキャピラリー温度: 200  $^{\circ}\text{C}$ およびチューブレング電圧: 100 Vとした。なお、

**Table 1** The effect of the SRFA Concentration on mass spectrum

| SRFA Concentration (mgC/L) | Averaged molecular weight | Total ion intensity |
|----------------------------|---------------------------|---------------------|
| 20                         | 609                       | $1.8 \times 10^7$   |
| 50                         | 667                       | $3.0 \times 10^7$   |
| 100                        | 663                       | $3.9 \times 10^7$   |
| 150                        | 662                       | $4.0 \times 10^7$   |
| 200                        | 644                       | $4.2 \times 10^7$   |

**Table 2** The effect of Ionic strength on mass spectrum

| Ionic strength          | Averaged molecular weight | Total ion intensity |
|-------------------------|---------------------------|---------------------|
| Ammonium acetate (2mM)  | 512                       | $1.2 \times 10^8$   |
| Ammonia (2mM)           |                           |                     |
| Ammonium acetate (6mM)  | 642                       | $1.8 \times 10^8$   |
| Ammonia (6mM)           |                           |                     |
| Ammonium acetate (10mM) | 589                       | $1.8 \times 10^8$   |
| Ammonia (10mM)          |                           |                     |
| Ammonium acetate (15mM) | 577                       | $1.7 \times 10^8$   |
| Ammonia (15mM)          |                           |                     |
| Ammonium acetate (20mM) | 539                       | $1.6 \times 10^8$   |
| Ammonia (20mM)          |                           |                     |

本実験で検討を行わなかった分析条件にイオン化モード、有機溶媒の比率と種類がある。ポジティブイオンモードの選択は、モデル NOM のネガティブイオンモードでの分析により多価イオンが生成した報告<sup>4)</sup>とフラグメントが生じやすいという報告<sup>8)</sup>を受けてのものである。ただし、ポジティブイオンモードではナトリウムなどのアダクトがよく生じるという報告<sup>7)</sup>がある。しかし、これは厳密な脱塩により避けられる可能性があるため、比較すれば良い分析条件と考えられる。また、有機溶媒としてメタノールを同体積加えたのは、アセトニトリルよりメタノールのほうが高い感度が得られるという報告<sup>7)</sup>と有機溶媒の比率が低いと高分子の NOM のイオン化効率が下がるという報告<sup>9)</sup>があるためである。

#### (1) NOM 濃度

Table 1 にマススペクトルに対する SRFA 濃度の影響をまとめる。平均分子量は SRFA 濃度が 50 - 200 mgC/L の範囲ではほぼ一定であり、濃度の上昇に伴う SRFA の凝集は見られなかった。濃度の上昇によるトータルイオン強度の上昇は 100 mgC/L で頭うちとなり、高濃度の SRFA はそれぞれの成分のイオン化効率を同程度に減少させることが分かった。SRFA 濃度が 20 mgC/L の時は平均分子量はやや低いが、これは S/N 比が低いためノイズの影響を受けたことが考えられた。これらのことから、SRFA 濃度の最適分析条件は 50 - 200 mgC/L と判断した。ただし、高濃度の NOM はイオン源を汚し、分析に悪影響を与える可能性があるため、できるだけ低濃度のほうが望ましいとはいえる。

**Table 3** The effect of pH on mass spectrum

| Buffer composition     | Averaged molecular weight | Total ion intensity |
|------------------------|---------------------------|---------------------|
| Ammonium acetate (6mM) | 603                       | $5.3 \times 10^8$   |
| Acetic acid (6mM)      |                           |                     |
| Ammonium acetate (6mM) | 606                       | $3.7 \times 10^8$   |
| Acetic acid (3mM)      |                           |                     |
| Ammonium acetate (6mM) | 624                       | $5.4 \times 10^8$   |
| Ammonia (3mM)          |                           |                     |
| Ammonium acetate (6mM) | 639                       | $5.5 \times 10^8$   |
| Ammonia (6mM)          |                           |                     |

**Table 4** The effect of the sheath gas pressure on mass spectrum

| Sheath gas pressure (psi) | Averaged molecular weight | Total ion intensity |
|---------------------------|---------------------------|---------------------|
| 40                        | 578                       | $1.1 \times 10^8$   |
| 50                        | 638                       | $5.3 \times 10^8$   |
| 60                        | 631                       | $6.0 \times 10^8$   |
| 70                        | 604                       | $5.5 \times 10^8$   |
| 80                        | 614                       | $3.6 \times 10^8$   |

#### (2) イオン強度

イオン強度は酢酸アンモニウムとアンモニアを等モル溶解させた緩衝液の濃度を変化させ調整した。Table 2 にマススペクトルに対するイオン強度の影響をまとめる。平均分子量およびトータルイオン強度ともに 6 mM の酢酸アンモニウムとアンモニア濃度のとき、最大値をとった。一般に溶液中の塩は溶質のイオン化を助け、ある濃度まではそのイオン化効率を上昇させるが、それ以上は溶液の電気伝導度を上昇させすぎるとイオン化効率を減少させる。本研究の結果はそれと一致した。また、トータルイオン強度が低いと平均分子量が低くなったことから、高分子量域の成分はイオン化しにくい可能性が考えられ、既存の報告と一致した。また、塩が高濃度で存在しても SRFA の凝集 (すなわち平均分子量の上昇) は認められなかった。これらのことから、イオン強度の最適分析条件は 6 mM の酢酸アンモニウムとアンモニア濃度の時とした。

#### (3) pH

pH は酢酸アンモニウム緩衝液の組成を変化させることで調整した。Table 3 にマススペクトルに対する pH の影響をまとめる。平均分子量、トータルイオン強度ともに pH に対する依存性はほとんど見られなかった。すなわち、この pH 範囲では SRFA の低 pH における凝集や高 pH における加水分解は見られなかった。しかし、様々な NOM に質量分析法を適用することを考えると、水環境中の NOM に酸が多いことから、高 pH のほうが溶解性という観点からは有利である。これらのことから pH の最適分析条件は 6 mM の酢酸アンモニウムとアン

**Table 5** The effect of the heated capillary temperature on mass spectrum

| temperature (°C) | Averaged molecular weight | Total ion intensity |
|------------------|---------------------------|---------------------|
| 150              | 981                       | $3.7 \times 10^8$   |
| 160              | 916                       | $3.6 \times 10^8$   |
| 170              | 841                       | $3.7 \times 10^8$   |
| 180              | 769                       | $3.9 \times 10^8$   |
| 190              | 707                       | $5.1 \times 10^8$   |
| 200              | 625                       | $4.2 \times 10^8$   |
| 210              | 566                       | $5.3 \times 10^8$   |

**Table 6** The effect of the tube lens voltage on mass spectrum

| Voltage (V) | Averaged molecular weight | Total ion intensity |
|-------------|---------------------------|---------------------|
| 60          | 697                       | $2.5 \times 10^8$   |
| 80          | 677                       | $3.7 \times 10^8$   |
| 100         | 627                       | $4.7 \times 10^8$   |
| 120         | 649                       | $4.9 \times 10^8$   |
| 140         | 697                       | $4.4 \times 10^8$   |
| 160         | 745                       | $4.0 \times 10^8$   |

モニア濃度の時とした。

#### (4) シースガス圧

Table 4 にマスペクトルに対するシースガス圧の影響をまとめる。平均分子量およびトータルイオン強度ともに 60 psi のシースガス圧のとき、最大値をとった。シースガスは溶媒の揮発を促進させることでイオン化を助けるものであり、一般に試料の質量分析計への導入速度に対応する最適値が存在する。本研究の結果もそれと一致した。ここでも、高分子領域の成分のイオン化の困難さが考えられる結果が得られた。これらのことからシースガス圧の最適分析条件は 60 psi とした。

#### (5) ヒーティッドキャピラリー温度

Table 5 にマスペクトルに対するヒーティッドキャピラリー温度の影響をまとめる。ヒーティッドキャピラリーの高温もまた溶媒の揮発を助けるものである。ヒーティッドキャピラリーの温度が上昇するにつれ平均分子量は減少し、トータルイオン強度は上昇する傾向がみられた。このことから、高温においてはフラグメントが生じている可能性が考えられた。ただし、低温のとき溶媒（水やアンモニウムなど）の揮発が不十分で、イオン化効率が下がり、同時に NOM に溶媒のアダクトがおきている可能性も考えられた。この結果だけではどちらが原因かは判断できないが、ここではイオン化の効率とアダクトの生成を防止することを優先し、ヒーティッドキャピラリー温度の最適分析条件は 200 °C とした。

#### (6) チューブレンズ電圧

Table 6 にマスペクトルに対するチューブレンズ電圧の影響をまとめる。チューブレンズ電圧が 100 - 120 V の時、トータルイオン強度は最大となり、平均分子量

は最小となった。高すぎるチューブレンズ電圧はフラグメントを生じさせる可能性があるが、その傾向は見られなかった。チューブレンズは、イオンを効率よく質量分析部へ導入するものであることから、その最適分析条件は 100 - 120 V とした。

#### (7) まとめ

SRFA の質量分析条件としては、ヒーティッドキャピラリー温度とチューブレンズ電圧が強くスペクトルに影響を与え、シースガス圧、溶液のイオン強度がそれに続いた。一方、溶液の SRFA 濃度と pH はそれほど影響を与えなかった。最適分析条件は、NOM 濃度：50 - 200 mgC/L、イオン強度および pH：6 mM 酢酸アンモニウムと 6 mM アンモニア、シースガス圧：60 psi、ヒーティッドキャピラリー温度：200 °C およびチューブレンズ電圧：100 - 120V と決定した。ただし、この条件で測定したスペクトルはフラグメントのピークを含む可能性はあり、平均分子量を過小評価している可能性はある。ESI-MS によって、フラグメントが生じるかどうかは議論の分かれている<sup>4)-6)</sup>ところである。本研究から、その報告の違いは、イオン化部の温度などの分析条件の違いによる可能性が示唆された。平均分子量の過小評価とながるもうひとつの因子である、NOM が多価イオンとなる問題に関しては、本研究においてはその有無を判断できなかった。ただし、高分解能の ESI-MS を用いた分析により、NOM 成分は 1 価にイオン化している可能性が高いことが報告<sup>5), 6)</sup>されている。NOM にはイオン化しにくい成分があることが確認され、最適分析条件はそのイオン化率を高めることができた。しかし、各成分が均一にイオン化することは確認できていない。今後は NOM 成分の構造解析の進展に伴い、代表的成分ごとの質量分析によってそれを確認していくことが必要となる。

### 3.2 天然有機物質の質量分析

前節で求めた最適分析条件を用い（ただし NOM 濃度は 100 mgC/L、チューブレンズ電圧は 100 V とした。）、各種 NOM の質量分析を行った結果を Fig.1 - Fig.4 に示す。スペクトル中の  $m/z = 149$  および 413 のピークはブランクでも卓越していたため試料あるいは質量分析計からの不純物のピークと考えられる。

いずれの NOM に対するマスペクトル上にも、ほぼすべての  $m/z$  にピークが分布しており、NOM の多分散な性質が確認できる。SRFA、SRNOM および NFA については、成分の分布形としては  $m/z$  が 200 - 600 にかけてシャープな山をひとつ持っているが、NHA につ

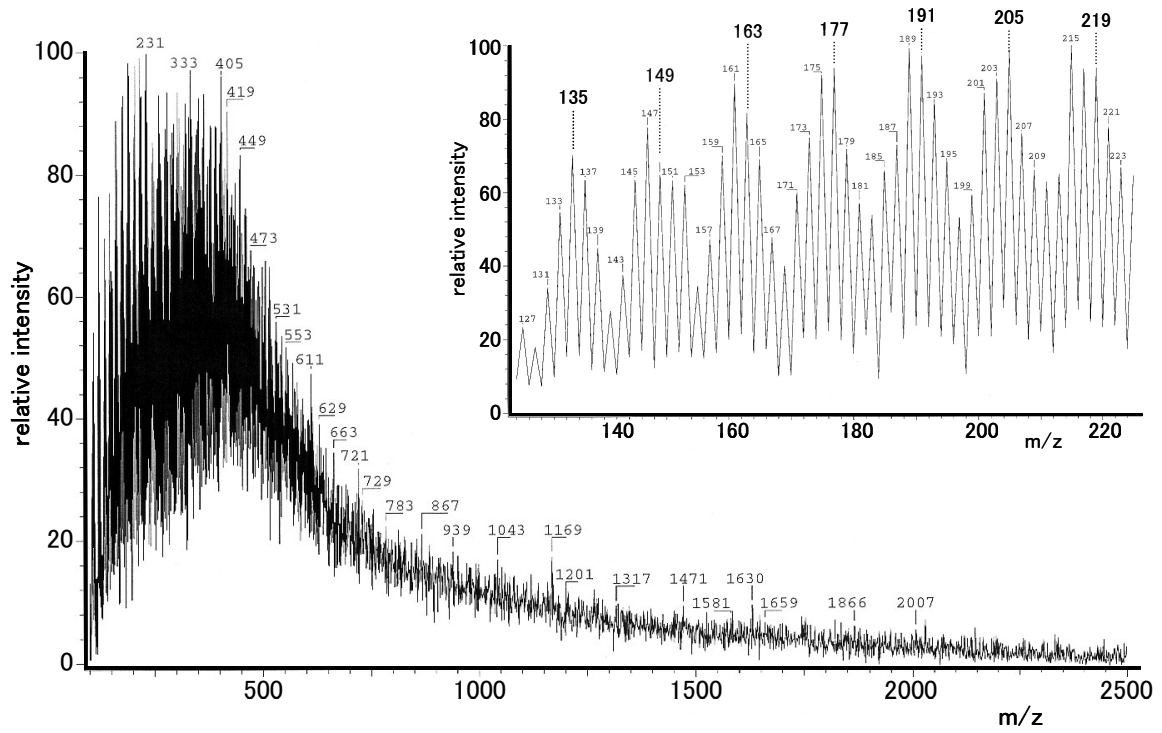


Fig. 1 Mass spectrum of SRFA

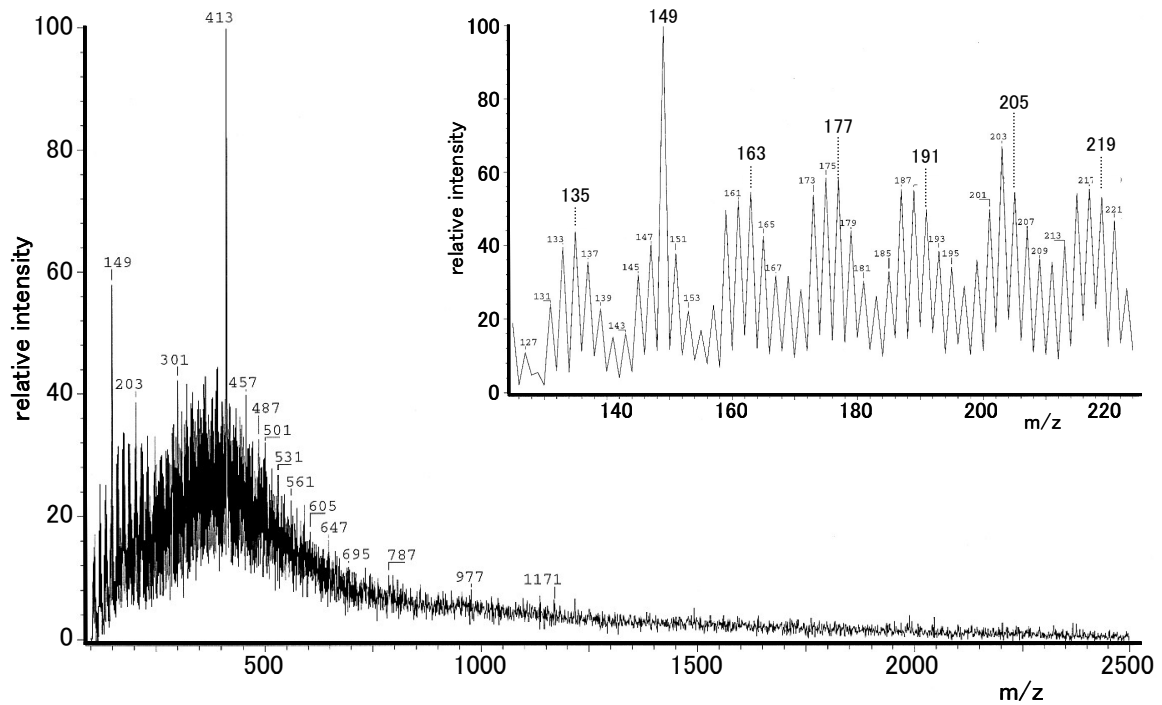


Fig. 2 Mass spectrum of SRNOM

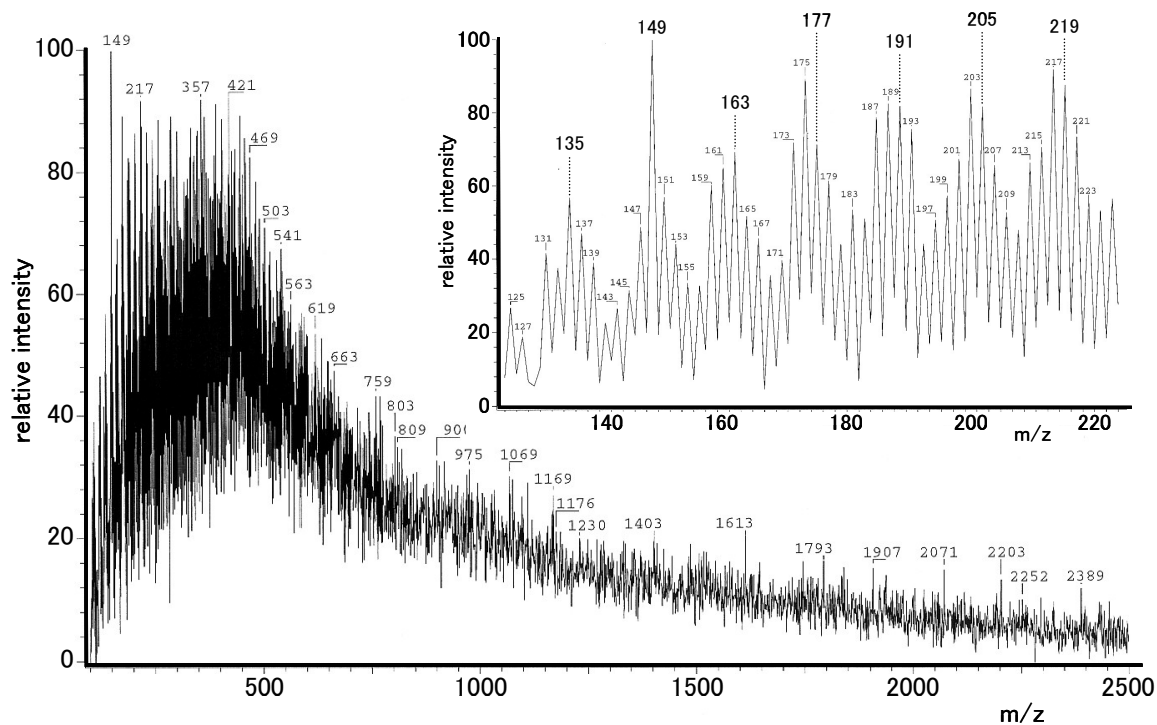


Fig. 3 Mass spectrum of NFA

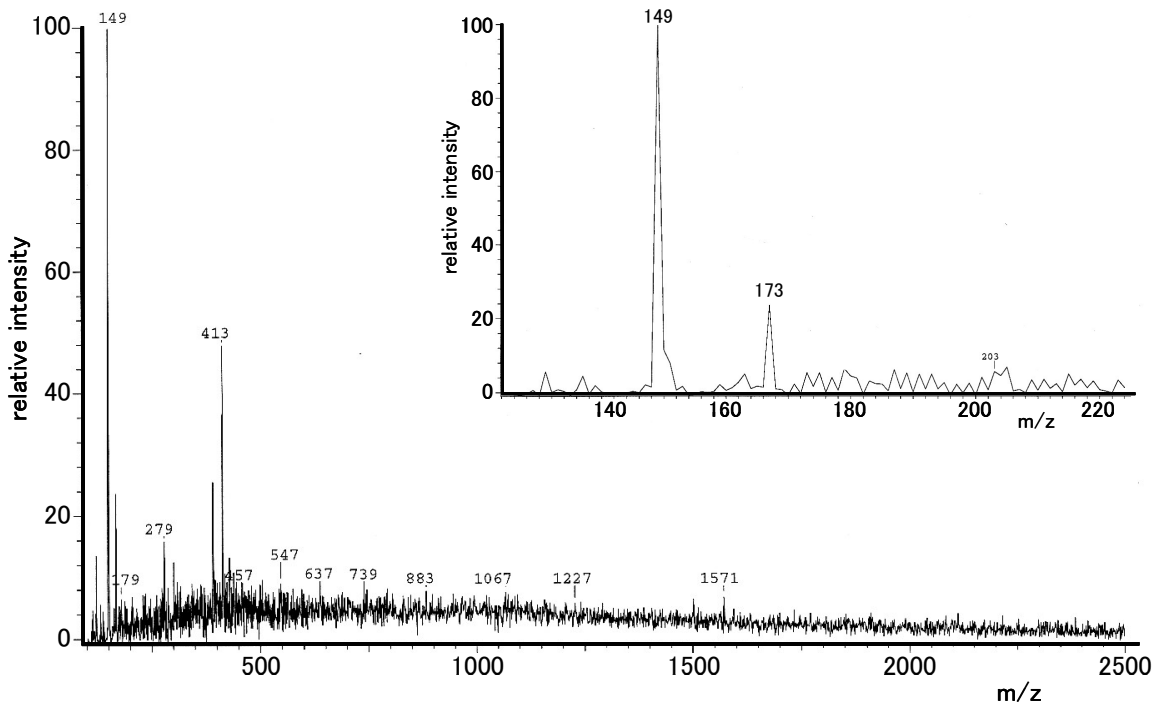


Fig. 4 Mass spectrum of NHA

いては明確な山は存在しない。それぞれのマスペクトルから求めた平均分子量は、SRFA が 664 Da、SRNOM が 720 Da、NFA が 852 Da および NHA が 1092 Da となった。これに対し、サイズ排除クロマトグラフィーで求めた平均分子量は、SRFA が 1360 Da<sup>9)</sup>、SRNOM が 1330 Da<sup>9)</sup>、NFA が 3870 Da<sup>10)</sup> および NHA が 5060 Da<sup>10)</sup> と報告されている。両者は絶対値は大きく異なるものの、SRFA = SRNOM < NFA < NHA という順番はほぼ一致している。一般には、サイズ排除クロマトグラフィーで求めた平均分子量は過大評価される傾向にあるが、質量分析法で求めた平均分子量は前述のように過小評価される可能性があり、真値に関してはここでは判断することはできない。

SRFA、SRNOM および NFA のマスペクトルの低分子領域には、いずれも、それぞれ 14 Da だけ離れたピーク群が観察された。一方、高分子領域には確認されなかった。この 14 Da は  $-\text{CH}_2-$  に対応すると考えられ、これらの NOM の低分子領域は脂肪鎖構造を基本構造として持つことが推察された。NHA に関してはどの領域にもこのようなピーク群は認められなかった。

#### 4. おわりに

本研究では、NOM の分子量分布の測定法として、質量分析法を導入し、NOM のひとつである SRFA の分析を通し、その最適分析条件を検討・確立した。SRFA の質量分析条件としては溶液のイオン強度、シースガス圧、チューブレンズ電圧、ヒータッドキャピラリー温度が、強く分析結果に影響を与え、一方、溶液の SRFA 濃度と pH はそれほどではないことが分かった。また、質量分析法により求めた SRFA の平均分子量は、SRFA の各成分のイオン化のしやすさ、フラグメントの生じやすさおよび溶媒のアダクトの程度などを反映したものではあるが、それらの影響を最適分析条件により最小化させた。ただし、本研究ではタンパク質などの質量分析に用いられる分析条件の一つを基本条件とし、各分析条件をひと

つずつ変化させ、最適分析条件を検討した。しかし、各分析条件の分析結果への影響が独立でない可能性は否定できない。したがって、よりよい分析条件が存在するかも知れない。また、同じ ESI-MS でも、装置ごとに異なるイオン化部の構造を持つため、本研究で得られた最適分析条件はほかに装置には直接は適用されないかも知れない。しかし、まず優先して検討すべき分析条件は何か、あるいは何に注目すべきかといった手がかりを本研究の成果は与える。

さらに、SRFA、SRNOM、NFA および NHA に質量分析法を適用した結果、それぞれの平均分子量は 664 Da、720 Da、852 Da および 1092 Da と測定され、順番はサイズ排除クロマトグラフィーで求めた文献値とほぼ一致した。各分子量分布の測定法には固有の欠点が存在するため、質量分析法は既存の方法とともに相補的に用いていくべきだと考える。SRFA、SRNOM および NFA の低分子成分には、14 Da ( $-\text{CH}_2-$ に相当) ずつ離れたピーク群が検出され、脂肪鎖構造を基本単位としてもつことが推察される結果を得られた。一方、NHA にはそれは見られなかった。今後は、サイズ排除クロマトグラフィーと ESI-MS<sup>9)</sup> および NMR を組み合わせることで、その確認を行っていきたい。

#### [参考文献]

- 1) J. A. Leenheer, and J. P. Croue, *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 18A-25A (2003).
- 2) A. Fievre, T. Solouki, A. G. Marshall, and W. T. Cooper, *Energy & Fuels*, **11**, 554-560 (1997).
- 3) T. L. Brown, and J. A. Rice, *Anal. Chem.*, **72**, 384-390 (2000).
- 4) J. A. Leenheer, C. E. Rostad, P. M. Gates, E. T. Furlong, and I. Ferrer, *Anal. Chem.*, **73**, 1461-1471 (2001).
- 5) E. B. Kujawinski, P. G. Hatcher, and M. A. Freitas, *Anal. Chem.*, **74**, 413-419 (2002).
- 6) A. C. Stenson, W. M. Landing, A. G. Marshall, and W. T. Cooper, *Anal. Chem.*, **74**, 4397-4409 (2002).
- 7) C. E. Rostad, and J. A. Leenheer, *Anal. Chim. Acta.*, **523**, 269-278 (2004).
- 8) S. D. Richardson, *Anal. Chem.*, **75**, 2831-2857 (2003).
- 9) Y. P. Chin, G. Aiken, and E. O'Loughlin, *Environ. Sci. Technol.*, **28**, 1853-1858 (1994).
- 10) J. Peuravuori, and K. Pihlaya, *Anal. Chim. Acta.*, **337**, 133-149 (1997).

(受付 2005. 4.11)

(受理 2005. 5.26)