



水環境の分析手法／解析技術の最前線

精密質量分析による 下水中のPRTR物質の把握

LC-QToF-MSを用いたターゲットスクリーニング

(国研)土木研究所 高沢 麻里・鈴木 裕識・山下 洋正

はじめに

近年、市場に流通している化学物質の増加が著しく⁽¹⁾、それらの使用・排出に伴う環境中存在実態の把握や排出量低減を目的とした処理技術等の評価のためには、分析手法の整備が重要である。使用される化学物質の数は、今後も増加し続けることが見込まれることから、より網羅的かつ効率的な分析技術が求められる。

近年、網羅分析技術の一つとして精密質量分析技術を用いたスクリーニング分析が注目されている。本研究チームでは、スクリーニング技術の一つであるターゲットスクリーニングに着目し、PRTR制度の対象である第一種指定化學物質462種（PRTR物質）について、夾雜物を多く含む下水中における存在実態の把握を目的として分析手法の検討を進めてきた。本稿では、液体クロマトグラフ-エレクトロスプレーアイオン化-四重極飛行時間型質量分析計（LC-ESI-QToF-MS）を用いたターゲットスクリーニング手法について、特にそのデータベース（DB）の構築手法開発の取り組みを紹介する。

1 精密質量分析によるスクリーニング技術

スクリーニング分析は、従来の個別分析技術とは異なり、事前に対象とする物質を設定することなく、試料に含まれる化学物質に係るデータ

を網羅的に取得する。このデータには、およそ数百～数万の質量スペクトルが含まれておる⁽²⁾、データ取得後に、各々の目的（ターゲットまたはノンターゲット）に沿って解析方法を選択できることから、元データの汎用性が高い。ターゲットスクリーニング法は、まず目的対象とする物質群をDB化する必要がある。このDBには、モノアイソトピック精密質量、保持時間（RT）、プロダクトイオンスペクトル等が含まれており⁽³⁾、これらの複数の指標を用いて、DBへ登録されている物質に対する存在有無を把握する。また、DBに目的物質を随時追加することで、捕捉範囲の拡大ができ、年月が経過したのちに問題提起された物質に対する、「振り返り解析」も可能である⁽⁴⁾。ターゲットスクリーニングにおける先行研究では、DBとの突合の際にRT、プロダクトイオン、付加イオン、同位体比など複数の指標を用いて照合しているが、これらの指標の中には、機種・分析条件・試料依存性があるものが含まれ、実質機能しない場合がある⁽⁵⁾⁽⁶⁾。これらのうちRTとプロダクトイオンについては、分析条件から予測可能なツールも開発されているが⁽⁵⁾、そのメカニズムのほとんどが *in silico* であり、実測値との整合性の判断は難しい。また、網羅的に測定データを取得するゆえに得られるデータは膨大で、特に試料に含有される夾雜物の影響を受けた測定データは複雑であるため⁽⁵⁾⁽⁶⁾、DBと突合後にアウトプットされる結果に対する正誤判定の難易度は高い。ノ

ンターゲットスクリーニング法は、未知物質の探索が目的であり、取得した測定データのうち目を引く m/z が解析対象となる。例えば、試料を複数日採取し、全日程において検出された m/z や、特定の試料のみに特異的に検出された m/z などが目的 m/z となる。抽出された目的 m/z に対し、第1図に示した4段階のプロセスを経ることで物質候補を絞り込み、未知物質を同定する。一方で、それぞれのプロセスで行う絞込操作には、高度な知識、経験、時間が必要となり、最終的に複数の候補が残ってしまい、明確な答え（固有物質名）にたどり着かない場合も少なくない。

近年の精密質量分析における化合物探索では、得られたデータに対し第1図に示す「同定レベル」を設けることが世界的に推奨されはじめている⁽⁵⁾。上述の通り、ノンターゲットスクリーニングは、物質の同定に高度な知識が必要で、解析の限界点が同定レベル3や4に留まり、物質を同定できない可能性もある。一方、どちらの解析方法でも共通している同定レベル1（標準品を用いた照合）は、同定レベルとしてはトップクラスではあるが、従来の個別分析とほぼ同等の操作手順が必要となることから、網羅的にデータを取得するスクリーニング技術の利点を最大限に發揮しているとは言い難い。このように、どちらの解析方法であっても利点と

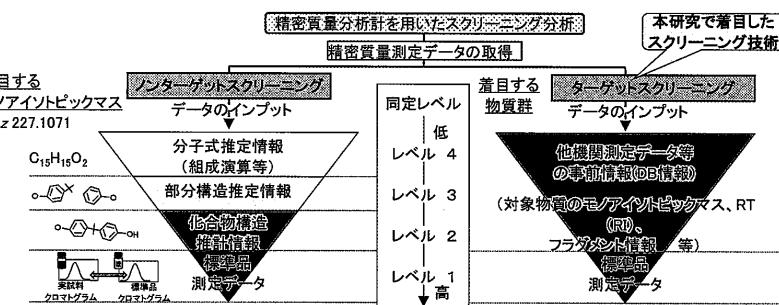
欠点があることから、各々の目的や求めたい結果の同定レベルに合わせて解析手法を選択する必要がある。

本研究チームでは、環境挙動の把握が求められる物質群の一つとしてPRTR物質に着目した。このように、物質群が定まっている場合は、ターゲットスクリーニングが有効である。PRTR制度の中で、公共用水域への排出量において寄与が大きい業種に下水道があり⁽⁷⁾⁽⁸⁾、下水に含有される物質の存在把握は水質保全の観点においても重要であると言える。下水試料のような夾雜物を多く含む試料の測定データは、夾雜物の影響を大きく受ける可能性があり、本来検出されるべき物質が見落とされることが少なくない。従って、本研究チームでは、機種・分析条件・試料の依存性が低く、かつ、検出の見落としをできるだけ低減させたDB構築を試みた。

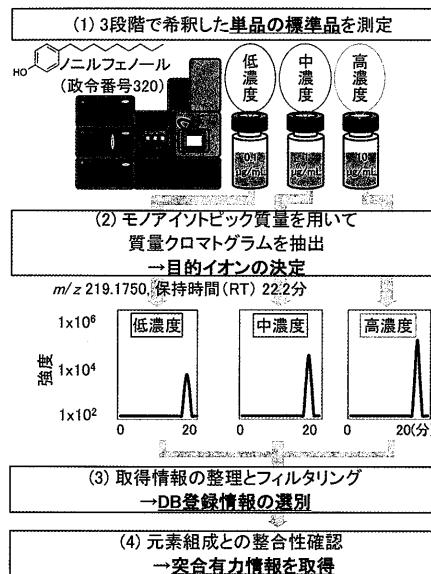
2 ターゲットスクリーニングデータベース構築手法の開発

スクリーニング用DBの構築のための標準品解析手順を検討した。その概要を第2図に示す。ここでは、一例としてPRTR物質のノンルフェノール（NP）の例を示す。本手法の特徴は、

- ① 3段階で希釈した単品の標準溶液の測定



第1図 精密質量分析技術における化学物質の探索プロセスおよびその同定レベル



第2図 スクリーニングデータベース構築のための標準品解析手順の概要（解析例：ノニルフェノール）

データを基に、DB登録情報を収集した点。
 ② 分析環境および条件の影響を受けにくく、LC-ESI-QToF-MS 内の真空環境下で発生するプロダクトイオンに着目し、これらの情報を網羅的に取得した点。
 ③ 取得した全スペクトルデータから、突合に有力となる情報を段階的に精査し、複数個DBへ登録した点。

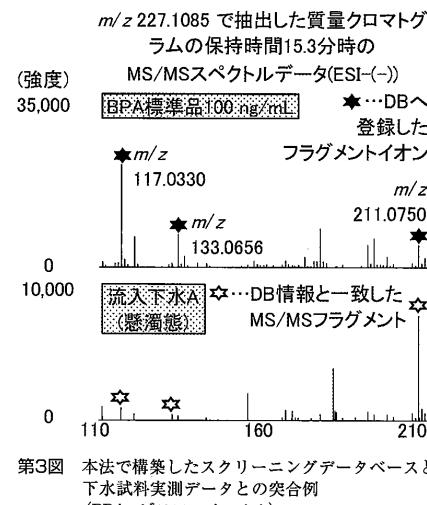
である。

以上の特徴を持つ本DB情報は、他機関における他機種で取得したデータにおいても、有効な照合指標となることが期待できる。また、夾雑物が多く含まれることが想定される下水試料中では、取得データの複雑さから、本来検出されるべき対象物質が検出となる場合があるが¹⁰、本DB情報では、突合に有力なプロダクトイオンを複数個登録することにより、突合妨害のリスクを低減し、見落としを最小限に抑えることが期待できる。本研究では、入手可能であった

PRTR物質29種についてDB化を行った。今後さらに標準品を入手し、DBへ追加することも可能であり、また、本手法はPRTR物質以外の化学物質にも応用可能である。

3 実試料への適用例

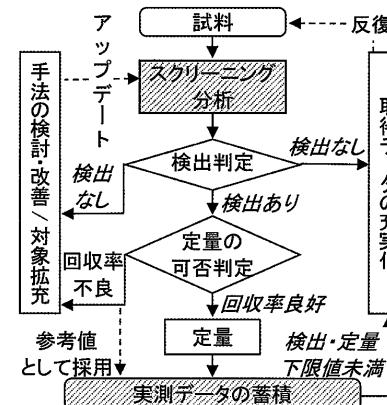
前章の手法を用いて構築したDBを、実試料に適用した。試料は10ヶ所の下水処理施設を対象とし、それぞれの処理施設の流入水および処理水を採水し、LC-ESI-QToF-MSで測定した。測定データと構築したDBを突合した結果、いずれかの試料で検出「有」と判定された物質は、29物質中15物質であった。実試料から検出された物質の一つであるビスフェノールAの検出例を第3図に示す。DBに登録された三つのプロダクトイオン情報が突合指標となり、実試料中で検出有と判定されたことが分かる。このように、夾雑物を含む試料であっても、多くの照合情報が登録されているDBであれば、複数の指標をヒントとして用いることができ、同定操作が容易となる上、物質同定の確度の向上が期待できる。



第3図 本法で構築したスクリーニングデータベースと下水試料実測データとの突合例（BPA：ビスフェノールA）

4 実測データ蓄積のためのプロセス

環境試料のデータ蓄積のための簡易ターゲットスクリーニング手順を第4図に示す。試料に含有される物質の予見が容易でない場合、事前スクリーニングを導入することで、効率的に化学物質における定量値の取得が見込める。調査数（試料数）増加によりそのプロセスを繰り返し、取得データを充実することができれば、環境試料から検出される物質の傾向把握につながることが期待される。



第4図 実測データ蓄積のためのプロセス

おわりに

本稿では、近年のスクリーニング技術を紹介し、利点と限界点をまとめた。それを受け、より汎用性の高いDBの必要性から、DBの新規構築手法を検討した。また、その手法を用いて構築したDBを下水試料へ適用し、その有効性が確認された。本研究で構築したDBおよびDB構築手法は、他機関との共有が既存のDBと比較しより容易であることが期待される。今後、本研究グループだけではなく、複数の機関で第4図のようなプロセスを反復して実施し、手法の改善・提案やDBの更新・共有が促進されるこ

とで、事前に目的物質を設定する従来型の定量分析手法では捕捉しきれない広範な有機物質に対する実測データの蓄積がより迅速かつ簡単にになることが期待される。

謝辞

本研究の一部は（独）環境再生保全機構の環境研究総合推進費（JPMEERF19S20402）により実施された。

＜参考文献＞

- (1) (一社)化学情報協会ウェブサイトCAS登録番号 (CAS RN®) とは
<https://www.jaici.or.jp/welcome/faq.html>
(アクセス日2020年8月1日)
- (2) R.Loops et al., *Environ. Pollut.*, 157, 561-568 (2009)
- (3) 滝畠昌彦: 分析化学, 63(6), 497-513 (2014)
- (4) H.A.Assress et al., *Environ. Pollut.*, 253, 655-666 (2019)
- (5) E.L.Schymanski et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, 407(21), 6237-6255 (2015)
- (6) 川瀬敬三・他: 分析化学, 64(1), 43-50 (2015)
- (7) 環境省ウェブサイト: PRTRインフォメーション広場集計結果の概要
<https://www.env.go.jp/chemi/prtr/result/gaiyo.html>
(アクセス日2020年8月1日)
- (8) 環境省ウェブサイト: PRTRインフォメーション広場届出外推計資料、21.下水処理施設に係る排出量
<https://www.env.go.jp/chemi/prtr/result/todokedegaiH29/syosai/21.pdf>
(アクセス日2020年8月1日)
- (9) E.Rogatcky et al., *J. Am. Soc. Mass Spec.*, 16, 1757-1759 (2005)

筆者紹介

高沢 麻里

（国研）土木研究所 水環境研究グループ
水質チーム 専門研究員

鈴木 裕識

（国研）土木研究所 水環境研究グループ
水質チーム 研究員

山下 洋正

（国研）土木研究所 水環境研究グループ
水質チーム 上席研究員