

第24回 環境化学討論会

24th Symposium on Environmental Chemistry
Program and Abstracts

環境化学の新たな展開

— 環境毒性学の視点を加えて —

要 旨 集

日時: 2015年6月24日(水)~26日(金)

Dates: 24th-26th June 2015

会場: 札幌コンベンションセンター

Venue: Sapporo Convention Center

後援: 北海道大学

Supported by Hokkaido University

協力: SETAC JAPAN

北海道大学大学院獣医学研究科

In cooperation with SETAC JAPAN

Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University

[主催] 一般社団法人日本環境化学会

Organized by Japan Society for Environmental Chemistry



分析対象を限定しない高分解能質量分析による PFOS 生分解生成物の探索

○山本敦史^{1,2}, Vladimir P. Beškoski^{3,4}, 山本勝也⁵, 乾秀之⁴, 川崎英也², 荒川隆一²

(¹大阪市環科研, ²関西大学, ³University of Belgrade, ⁴神戸大学, ⁵兵庫県環境研究セ)

【はじめに】有機フッ素化合物はその化学・物理的安定性や特異な物性から電子材料から医薬品まで暮らしの中で多く用いられている。その中、ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) 等の一部の有機フッ素化合物はその有害性・残留性から規制の対象とされている。これら有機フッ素化合物が使用された後、環境中でどのような運命を辿るのかについて数多くの研究が行われている。光分解や生物分解等が PFOS に限らず分子内のアルキル基にフッ素と水素が混在する化合物や、側鎖にフッ素化アルキル基を持つ高分子等を対象にも試みられ、特に環境中での分解性については議論となっている^{1,2}。この要因として、PFOS を始めとして有機フッ素化合物の分解経路が必ずしも解明されていない上、有機フッ素化合物が非常に多様な化学形態をとっているため取支をとることが困難という点がある。通常、環境分野における化学分析では分析対象を選定し微量分析が行われているが、分析対象の拡大には限界がある。近年、環境分野に限らず、微量分析に用いられるようになっている質量分析計は高感度・高速・高質量分解能が進み、幅広い分野・媒体に対して多くのマススペクトルを取得することが可能となってきた。特に精密質量が測定可能な高分解能質量分析計は低質量のイオンの分子式を決定できることから、生命現象の鍵となるタンパク質・代謝物の同定及び関連の解明に欠かせないものとなっている。また、効率的にデータを解析するために必要となるデータベースや自動化ツールの開発も生命科学での応用を中心に進んでいる。今回、PFOS 等で汚染された土壌から採取した微生物を用い PFOS 等の生分解試験を行うにあたり、分解過程での試料を高分解能質量分析計で測定し、得られたマススペクトルを様々な解析ツールで解析することで代謝物の同定を試みた。

【方法】液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) には Ultimate3000 および Orbitrap Exactive (Thermo Scientific) を用い、負エレクトロスプレーイオン化、測定質量範囲 m/z 100–2000 (1 Hz), m/z 200 における質量分解能 10 万、質量精度 5ppm により測定を行った。UltraMark 1621 及び Sodium Dodecylsulfate, Caffeine, MRFA 混合溶液を用い質量校正を行った。また、フラグメントイオン測定では All Ion Fragmentation モードを用い 25 eV のフラグメンテーション条件により測定を行った。カラムには ODS-100S (東ソー, 150 mm × 2 mm, 5 μ m) を用い、2 mM 炭酸水素アンモニウムを両方に含む水、メタノールの流速 200 μ L/min グラジエント条件を用いた。細菌の優占化に Bushnell Haas 培地を、酵母に麦芽エキス培養液を用いた。Bushnell Haas 培地では、グルコースを 2 g/L で添加したものと *n*-ヘプタンを添加したものをそれぞれ化学合成従属栄養細菌、炭化水素分解細菌の検討のために調製した。各 100 mL の培養液に PFOS 等が 1 μ g/L となるように添加し 28°C, 200 rpm で振とうしながら 4 週間生分解性試験を行った。それぞれに微生物を含まないもの、PFOS 等を含まないものについて対照実験の試料を同様に調製した。7 日ごとに各試料から 5 mL を採取し、遠心し 1% ギ酸 50 μ L を添加した後、固相抽出カートリッジ Presep-PFC II (和光純薬) に通した。溶出は 0.1% アンモニアメタノール 5 mL で行い、1 mL まで窒素気流下で濃縮したものを LC/MS 分析した。また、7 日ごとに pH 変化と生菌数の計測を行った。生菌数は段階希釈した試料を寒天平板に塗抹することで算出した。

Metabolite hunting in biodegradation test of PFOS by untargeted analysis with accurate mass acquisition.

○Atsushi YAMAMOTO^{1,2}, Vladimir P. BEŠKOSKI^{3,4}, Katsuya YAMAMOTO⁵, Hideyuki INUI⁴, Hideya KAWASAKI², Ryuichi ARAKAWA² (¹Osaka City Inst Pub Health Environ Sci, ²Kansai Univ, ³Univ Belgrade, ⁴Kobe Univ, ⁵Hyogo Pref) 8-34 Tojocho, Tennoji-ku, Osaka City, Japan 5430026, Tel 06-6771-3246

【結果と考察】LC/MS による分析例を図 1 に示した。脱フッ素や酸化した分子に相当する明確なピークは見られなかった一方で、PFOS 等と微生物を含む試料からのみ検出されたイオンが数多く検出された 図 1(b)。感度の違いはあるものの微生物の種類によらず同質量を持つ共通のイオンが検出された。図 1(c) に示すように水素原子二個分ないし酸素原子一個分の質量差を示す一連のイオンが PFOS 等の保持時間の近辺に出現しており、比較的疎水性の高い代謝物が生成していると考えられた。図 1(c) に取り出したイオンの同位体パターンを見るとモノアイソトピックイオン X に対して X+1, X+2 であるイオンの比率がそれぞれ 19–22%, 1.6–1.9% であった。仮にこれが一般的な有機化合物であるとすると、これらのイオンには炭素原子が 20 個前後含まれており、塩素や硫黄といった安定同位体比に特徴のある元素が含まれていないと考えられた。抽出イオンクロマトグラム上には複数のピークが見られたものも多く、いくつかの異性体が存在することを示唆していた。最も感度の強かった m/z 343.189 であるイオンについて、そのフラグメントイオンを解釈していくと、水分子で脱離したと考えられる m/z 325.179, 307.168 の他、 CH_2O や CH_4O_3 等で脱離したイオンが考えられた。マススペクトルデータベースである MassBank を用いて、これらのニュートラルロスが現れるマススペクトルを検索すると水酸基を多数持つフラボノイド、脂肪酸、また糖構造を持つ物質がヒットした。この精密質量を炭素原子が 20 前後、酸素原子が 3 つ以上、構成元素が C, H, N, O, P, F からなるとすると候補は $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{O}_4$ と $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_5\text{F}$ の 2 つとなった。これらの Ring and double bond equivalent は 8.5 と 4.5 であり、それぞれステロイド様、不飽和脂肪酸様の構造を考えるとありえない分子式とは考えられなかった。

天然物の中でフッ素を含む物質は塩素や臭素を含む物質に比較して非常に限られた数しか知られていない³。モノフルオロ酢酸等を生成する植物や *Streptomyces Cattleya*⁴ といった微生物は報告例があるものの今回の検討に用いた微生物との関連については明確にできなかった。¹⁹F-NMR により有機フッ素化合物の形態が変化していることの確認することも検討しているがそれぞれの代謝物は異性体など種類も多く、絶対量として限られているという問題もある。質量分析計の感度は他の技術に対する大きなメリットである。生命科学の分野で活発に取り組まれている機械学習等を用いた質量分析データ解析手法の導入や環境データの蓄積により PFOS 等の分解生成物の同定を行うことで環境中の汚染物質の挙動の解明にも繋げられるようになることが期待される。

【謝辞】

本研究はJSPS科研費 26241026 (精密質量データ解析法の開発と環境化学物質モニタリングへの応用)の助成を受けたものです。

【参考文献】

- (1) Z.Wang *et al.*, *Chemosphere*, **122**, 301–303 (2015). doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.03.066
- (2) S.M.Avenidaño *et al.*, *Chemosphere*, in press (2015). doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.03.022
- (3) G.W. Gribble, (2002) In: A.H.Neilson (Ed) *Organofluorines*, Hdbk. Environ. Chem., Springer, Berlin.
- (4) M.Sanada *et al.*, *J. Antibiotics*, **39**, 259–265 (1986). doi: 10.7164/antibiotics.39.259

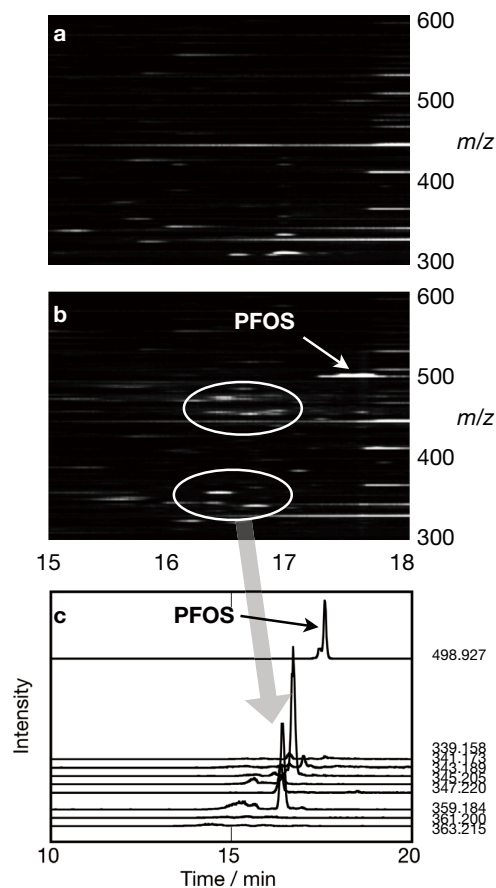


Figure 1. LC/MS data of analyses of biodegradation test samples by yeast and molds a) without PFOS, b) and c) with PFOS. c) Extracted ion chromatograms of PFOS and metabolites. The intensity of the metabolites was magnified by 100. Extracted m/z values are shown in the margin.