

LC/MS を用いた琵琶湖溶存有機物中の紫外線吸収物質のキャラクタリゼーション

*和田千弦¹、早川和秀²、鈴木智代¹、杉山裕子¹、熊谷哲¹

1)兵庫県立大学環境人間学部

2)滋賀県琵琶湖・環境科学研究センター

1. はじめに

湖水溶存有機物中には、腐植物質に代表されるような紫外線を吸収する紫外線吸収物質が含まれている。紫外線吸収物質は、自身が紫外線により分解される一方、紫外線入射量を調整し、水中生物の適切な生活環境を保つ役割を果たしている。近年、成層圏オゾン層破壊が進んでおり、地上に降り注ぐ紫外線量が増加している。紫外線入射量の増加により、紫外線吸収作用をもつ有機物の光化学反応による分解が促進され、結果として濃度の減少が引き起こされるかもしれない。紫外線吸収物質が減少すれば、湖内への紫外線入射量が増加し、水中生物の生息環境の悪影響が懸念される。そこで、本研究は、湖水中の紫外線吸収物質の分布と動態を把握することを目的として、琵琶湖溶存有機物に含まれる紫外線吸収物質のキャラクタリゼーションを試みた。

2. 試料と方法

試料の採取は、琵琶湖において 2006 年 10 月 12 日に、北湖NA地点、流入河川である野洲川河口(yasu)地点、南湖中央(SB)地点で行った。すべての湖水は、ニスキン採水器を用いて採取した。採取した試料は、ポリカーボネート製採水瓶に保存し、氷冷下で研究室に持ち帰った。持ち帰った試料は、予め 1M HCl・1M HNO₃ 混酸で洗浄した孔径 0.2 μ m のヌクレポアフィルターでろ過した。ろ過試料は、次の測定まで 4 $^{\circ}$ C 以下の冷暗所で保存した。

ろ過試料の溶存有機炭素 (DOC) 濃度を、SHIMADZU TOC-5000 を用いて測定した。また、ろ過試料の三次元励起蛍光測定には、HITACHI F-4500 を用い、励起波長 220~450nm、蛍光波長 220~500nm で蛍光強度を測定した。サンプルの蛍光強度は、10 μ g l⁻¹ 硫酸キニーネ (Ex/Em 345/450nm、0.1M 硫酸溶液) を 10QSU として規格化した。

ろ過試料の濃縮には、限外ろ過と C18 固相抽出法を用いた。限外ろ過には、タンジェンシャルフロー型の限外ろ過装置(Millipore-Pelicon-2 miniCassette)を用いた。ろ過試料をろ過膜に通し、高分子量(>5 kDa)、低分子量(<5 kDa)にそれぞれ分画した。ろ過試料 10 l を高分子量分画 200 ml になるまで濃縮を行った。そして、さらに脱塩のため超純水 1 l を加え、高分子量分画が再び 200 ml になるまで濃縮を行った。

C18 固相抽出法では、ろ過試料 10 l に濃塩酸を添加して pH2.2 に調整し、C18 固相抽出カートリッジ(3M Empore)に担持させ、その後 80%無蛍光メタノール 20 ml で溶離し、窒素吹きつけにより 2 ml まで濃縮した。

そして、これらの濃縮試料の LC/MS 測定を行った。LC/MS には逆相カラムを用い、測定は以下の条件で行った(Table 1)。

3. 結果と考察

LC/MS 測定結果

- 限外ろ過試料

限外ろ過により濃縮した試料を LC/MS を用い測定した結果、疎水性分画の(保持時間の大きい)ピークは、表層で低い紫外吸収を示した。このピークを構成する有機物が表層水中で強い紫外線により分解されている可能性が示唆された。また、最もクロロフィル a 濃度の高かった水深 15 m

の試料で高い紫外吸収を示したことから、生物活動に伴って湖水に供給されている可能性があると考えられた。そして、底層で最高値を示した保持時間 14.2 分のピークは、底層付近で生産されている腐植性の有機物であると考えられた(Fig. 1)。

- C18 固相抽出試料

C18 固相抽出により濃縮した試料を LC/MS を用いて測定を行った結果、疎水性有機物分画において高い紫外吸収を示した。また、疎水性分画である保持時間 14.2 分のピークにおいて、底層付近で高い紫外吸収を示したことから、湖底部で生産された腐植性の有機物の寄与が大きいと考えられた。そして、マススペクトルにより、疎水性有機物の分子イオンピークは、m/z 値が 150~800 の範囲に山形に分布しており、ほとんどのピークが分子量 1000 以下の多数の分子から構成されていることが分かった(Fig. 2)。

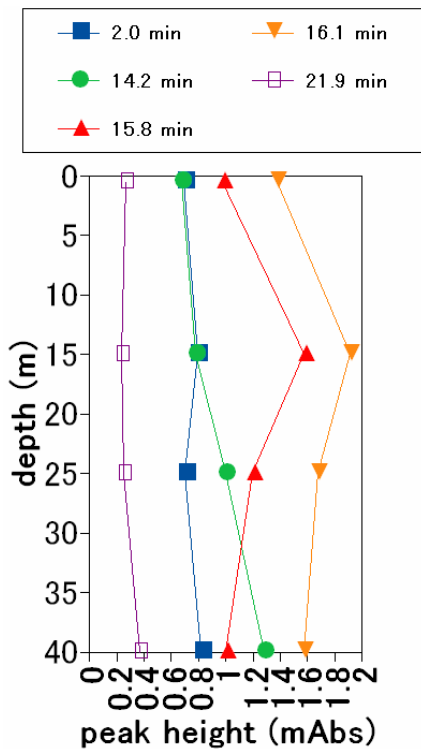


Fig. 1 LCにより分離された琵琶湖北湖NA地点にお

Table.1 LC/MS 測定条件

装置	LCMS-2010	カラム	C18 逆相カラム
移動相 A	1mM 酢酸 アンモニウ ム溶液(pH5)	検出	UV 254nm
移動相 B	アセトニトリル	イオン化法	ESI法
流速	0.2ml/min	ガス流量	4.5l/min
注入量	10 μl	検出器電圧	1.9kV
温度	40°C	イオン化モード	ネガティブ

グラジエント条件 : 0分 (0% B) →10分 (15% B)→13分 (30% B)→15分 (100% B)→30分 (100% B)

る限外ろ過試料の各ピークのピーク高さの鉛直変化

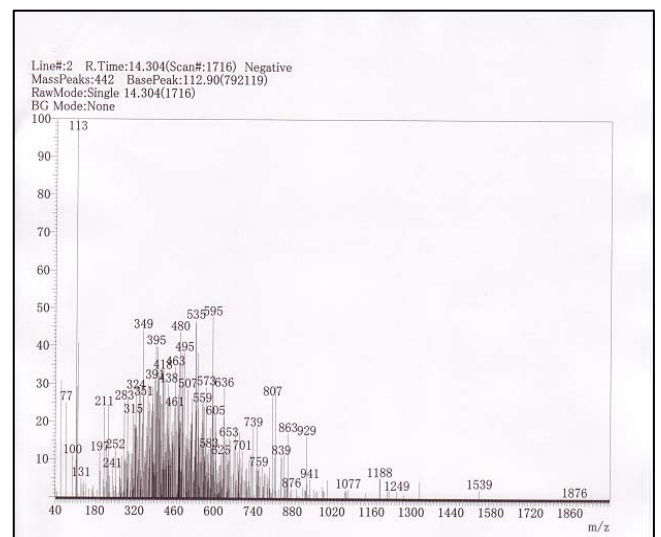


Fig. 2 2006年10月 NA地点水深40mにおけるC18 固相抽出試料のマススペクトル (R.Time 14.2 min)