

報 文

超高分解能 FT-ICRMS を用いた バイカル湖水中未同定溶存有機物の解明

杉山 裕子*・Patrick G. Hatcher**・三田村 緒佐武***
片野 俊也****・熊谷 哲*・中野 伸一*****
Valentin V. Drucker*****・Vladimir A. Fialkov*****・杉山 雅人*****

(2008年3月28日受付, 2008年9月10日受理)

Molecular-level characterization of dissolved organic matter in Lake Baikal using high-resolution fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry

Yuko SUGIYAMA*, Patrick G. HATCHER**, Osamu MITAMURA***,
Toshiya KATANO****, Tetsu KUMAGAI*,
Shin-ichi NAKANO*****, Valentin V. DRUCKER*****,
Vladimir A. FIALKOV***** and Masahito SUGIYAMA*****

- * School of Human Sciences and Environment, University of Hyogo,
1-1-12 Shinzaike-honcho, Himeji, Hyogo 670-0092, Japan
- ** Department of Chemistry and Biochemistry,
Old Dominion University
4541 Hampton Boulevard, Norfolk, Virginia 23529-0126, USA
- *** School of Environmental Science, The University of Shiga Prefecture,
2500 Hassaka, Hikone, Shiga 522-8533, Japan
- **** Department of Life Science, Hanyang University,
Seoul 133-791, Korea
- ***** Faculty of Agriculture, Ehime University,
3-5-7 Tarumi, Matsuyama, Ehime 790-8566, Japan
- ***** Limnological Institute, Siberian Branch of the Academy of Sciences,
Ulan-Botorskaya, Irkutsk, Russia
- ***** Baikol Museum, Siberian Branch of the Academy of Sciences,
Ulan-Botorskaya, Listvyanka, Russia
- ***** Graduate School of Global Environmental Studies, Kyoto University,
Yoshida-Honmachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

Lake Baikal, located on the north-eastern borders of Central Asia, is the deepest (maximum depth 1,700 m) and one of the largest lakes in the world. To elucidate the chemical composition of dissolved organic matter (DOM) in the Lake Baikal, we applied high resolution fourier trans-

* 兵庫県立大学環境人間学部
〒670-0092 兵庫県姫路市新在家本町1-1-12
** オールドドミニオン大学
*** 滋賀県立大学環境科学部
〒522-8533 滋賀県彦根市八坂町2500
**** 漢陽大学

***** 愛媛大学農学部
〒790-8566 愛媛県松山市樽見3丁目5-7
***** ロシア科学アカデミー・陸水学研究所
***** ロシア科学アカデミー・バイカル博物館
***** 京都大学大学院地球環境学堂
〒606-8501 京都市左京区吉田本町

form ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR-MS) to the lake water samples.

Water samples were taken at the deepest point of Lake Baikal and its inflowing Barguzin River mouth on August 2005. The sample water was filtrated on board and DOM was extracted using C 18 solid-phase extraction disks (Kim *et al.*, 2003³). The extracted samples on the disks were analyzed by a 9.4-T FT-ICR mass spectrometer at the National High Magnetic Field Laboratory (Tallahassee, FL, USA) in negative ionization mode with a needle voltage of -2.0 kV.

From the FT-ICR mass analysis, 3511, 2862 and 2191 peaks were detected ($S/N > 3$) in river and 5 m- and 945 m- depth lake water samples, and more than 80% of the peaks were assigned within ± 1.0 ppm error. Using van Krevelen Diagrams (van Krevelen, 1950), we found that the main component of L. Baikal DOM was allochthonous lignin-like organic molecule, and that autochthonous lipid- and protein-like molecules were also found in surface water.

Key words: dissolved organic matter, mass spectrometry, characterization, Lake Baikal

1. はじめに

天然水中に溶存している有機物 (Dissolved Organic Matter, DOM) は一般に、孔径0.1~1.0 μm のフィルターを通過する有機物と定義されている。地球上では現存量700 GtCを有し、たとえば海洋では有機炭素の90%以上を占める、水圏における炭素の大きなリザーバーである。この現存量は大気中のCO₂量 (750 GtC) に匹敵する (IPCC, 1996) ため、地球規模の炭素循環を明らかにするためには見逃せない成分である。DOMは主に生物体を起源とし、生物体の分解生成物・分解中間物質などと、それらがさらに環境中で物理・化学・生物反応を受けてきた物質群からなると考えられている。DOMは海水・陸水など水圏に数百 ppb から数十 ppm の濃度でどこにでも存在する物質群であり、バクテリアの主要なエネルギー源となり (Tranvik, 1992)、水中への太陽光の入射を調節することにより水中での一次生産速度に影響を及ぼしたり、有害な紫外線の入射を防ぐ (Arts *et al.*, 2000) など、生態系を支配する重要な因子である。しかしながら DOM を構成する有機物には、当初植物体を構成していた炭水化物・たんぱく質・脂質などのように比較的容易に同定・定量できるような有機物もはやほとんど含まれていない。しかも、DOM を構成している有機物の濃度はきわめて低いことから分析が困難である。そのため、DOM を構成する有機物のほとんどが未同定有機炭素 (Molecularly Uncharacterized Carbon, MUC) であり、1990年代まで分子レベルでの研究は滞ってきた (Hedges *et al.*, 2000)。また、DOM の起源は、海洋では主に自生性 (現場生物起源) の物質、陸水では主に外来性 (集水

域の陸上生物) 起源の物質であると考えられている。しかし、上述のとおり、分子レベルでの有機物組成の解析ができないために、定量的な解釈はなお困難である。

近年の質量分析器の急速な進歩は、この状況を大きく変えつつある (Mopper *et al.*, 2007; Sleighter & Hatcher, 2007)。イオンサイクロトロン共鳴型質量分析器 (FT-ICRMS) の開発により、極めて分解能の高い質量分析が可能になったことから、この方法とエレクトロスプレーイオン化方式を組み合わせ、河川水溶存腐植物質 (Fievre *et al.*, 1997; Kujawinski *et al.*, 2002a; Stenson *et al.*, 2003)、河川水 DOM (Kujawinski *et al.*, 2002b) などの天然有機物同定の試みがされるようになってきた。FT-ICRMS は、磁場中で起こる荷電粒子の回転運動 (サイクロトロン運動) の角速度が、回転している粒子の質量/電荷比の関数であることを利用した分析装置である (齋藤, 2008)。FT-ICRMS の分解能は、たとえば m の質量/電荷比を有するピークについては、 m を、そのピーク高さ (h) の半分 ($1/2 h$) におけるピーク幅 ($\delta m_{50\%}$) で除した値で表す ($m/\delta m_{50\%}$)。一般的には、分解能 $m/\delta m_{50\%} = 10000$ 以上で高分解能質量分析と言われるのであるが、FT-ICRMS において分解能は磁場強度に比例し、たとえば9.4 T の超伝導磁石を用いた装置では数10万~100万を超える分解能を得ることができる。このため、この方法は超高分解能質量分析と呼ばれることもある。たとえば $m/z = 300$ における分解能30万の条件で質量/電荷比300の物質を測定したとすると、 $\delta m_{50\%} = 0.001$ となり、 $m/z = 300.000$ のピークと $m/z = 300.001$ のピークが完全に分離できるという計算になる。この超高分解能の性能を生か

し、有機地球化学の分野では FT-ICRMS を用いて主に未知物質の分子式を予想し、さらに分子内不飽和結合の数などから物質を分子レベルで特徴付ける試みがされている。Hugey *et al.* (2001) は FT-ICRMS 分析で得られる多数のピークを類似した分子ごとに区別する方法として、石炭化学分野で用いられてきた Kendrick Mass Defect (KMD) 分析 (Kendrick, 1963) を原油試料に適用し、KMD 分析が質量イオンピークの分子式予測に有効であることを示した。また、Kim *et al.* (2003b) は膨大な分子式データを分子種のグループごとに視覚的に示すことのできる方法として、石炭化学分野で用いられてきた van Krevelen diagram (van Krevelen, 1950) を河川水 DOM 試料に適用し、この方法が分子種や分子の反応 (変質) 過程を明らかにするのに有効であることを示した。その後、Suwannee 川の水に含まれるフルボ酸とその光分解試料 (Kujawinski *et al.*, 2004)、 C_{18} 固相抽出ディスクに捕集された河川水 DOM (Kim *et al.*, 2003b)、液化石炭試料 (Wu *et al.*, 2005)、河川水 DOM とその生分解生成物 (Kim *et al.*, 2006)、海水中高分子量 DOM (Hertkorn *et al.*, 2006)、ブラックカーボンやチャコールカーボンと呼ばれる縮合型炭化水素を骨格に有する有機物質群 (Kramer *et al.*, 2004; Trompowsky *et al.*, 2005; Hockaday *et al.*, 2006; 2007) など数多くの報告がされてきている。

バイカル湖は世界最大の貯水量 (23000 km^3)、および水深 (1643 m) を誇り、世界最大の淡水の貯蔵庫である (森野・宮崎, 1994)。約3000万年前にできたとされるこの湖は、今でも清澄な湖水を保っており富栄養化を免れている。また、その巨大な容積ゆえに、水の平均滞留時間は330年と長い。このことから、この湖の有機物循環には、湖沼特有の流入・流出に支配されている過程に加え、海洋に類似した生成・除去・変質などの生物過程が働いている可能性もあり、大変興味深い研究対象である。また、気候の温暖化に代表されるような大きな環境変動により、集水域の植生や河川流量の変化が引き起こされ、結果としてバイカル湖の水質が将来大きな影響を受けることも予想される。バイカル湖 DOM を構成する陸起源有機物や湖内自生有機物の分子レベルでのキャラクター化が必要である。

我々はバイカル湖最深部における DOM の表層水と深層水における分子組成の違いや、湖水 DOM の起源を探ることを目的として、フロリダ州立大学に設置さ

れている National High Field Magnetic Laboratory において、9.4テスラの超伝導マグネットを備えた FT-ICRMS を用いて、バイカル湖水中の溶存有機物の分子レベルキャラクター化を試みた。

2. 方法

2.1 試料の採取と処理

試料の採取地点を Fig. 1 に示す。試料採取は2005年8月4日にロシア連邦のシベリア南東部 (N: 51~56°, E: 104~110°) に位置するバイカル湖最深部 (Deep: 水深1640 m) において行った。溶存有機炭素 (DOC) 濃度測定のため、水深0, 5, 10, 15, 25, 50, 100, 250, 350, 945 m の鉛直試料を採取した。また、流入河川のひとつであるバルグジン川の下流 (Barguzin, 水深3 m) において、表層水を採取した。船上で電気伝導度・水温・クロロフィル a 蛍光値・濁度・pH・透明度の測定を行った。前4項目の測定には CTD (Seabird Electronics 社, SBE 19) を用いた。pH は比色法、透明度は透明度板を用いて測定した。採取した試料は、低密度ポリエチレン製採水瓶に保存し、船上で速やかに濾過を行った。濾過には予め1 M HCl-1 M HNO_3 混酸で洗浄した孔径 $0.2 \mu\text{m}$ のヌクレポアフィルター (Whatman, UK) を使用した。濾過した湖水 (濾過試料) はポリカーボネート製保存瓶に冷凍保存した。質量分析には、Deep 地点水深5 m および945 m, Barguzin 0 m で採取した試料を



Fig. 1 Sampling Sites at L. Baikal and Barguzin River.

用いた。質量分析用試料は、各3リットル採取し、濾過後濃塩酸を添加して pH 2程度に調整し、溶存有機物を C₁₈固相抽出ディスク (Empore, 3 M, USA) に担持した。担持された溶存有機物を80%メタノール/水溶液10 mlにより溶離し、日本に持ち帰ったあと、窒素吹き付けにより溶媒を蒸発させて National High Magnetic Field Laboratory (フロリダ, USA) に設置された FT-ICR 質量分析器により測定した。測定の際には試料を再び80%メタノール/水溶液に溶解した。C₁₈固相抽出法は、極性の低い有機物を分離・濃縮する方法として広く使われている方法であるが、特に脱塩が必要不可欠な質量分析の前処理法としてよく用いられている。天然水中の有機物に関しては、リグニン (Louchouart *et al.*, 2000), 河川水 DOM (Kim *et al.*, 2003a; 2006), 海洋 DOM (Simjouw *et al.*, 2005) などに適用されており, Simjouw *et al.* (2005) は, Chesapeake Bay 沿岸の表層水 DOM は限外ろ過により高分子量 DOM (>1 k Da) として 49~53%が回収されるのに対し, C₁₈固相抽出により分離された DOM (C₁₈DOM) は DOC として 38~39%と低い回収率ではあったが, 限外ろ過では脱塩濃縮できない低分子量 DOM の 31~38%を回収できると報告した。また彼らは, C₁₈DOM は高分子量 DOM より水酸基が少なく, アミドや不飽和炭化水素・アルカン・アルケン・芳香環が多いことなどを FTIR の結果から述べている。さらに, 海水, 河川水ともに C₁₈固相抽出法の有機炭素回収率 ([抽出試料中の DOC + ディスク通過試料の DOC] × 100 / バルク試料の DOC) はおよそ 100%を示し, ディスク上に溶離されずに残るものは炭素量にするとわずかであると結論付けている。著者らも C₁₈固相抽出法が蛍光を有する有機物に高い回収率を示すこと (杉山ら, 2005), 琵琶湖 DOM の C₁₈固相抽出ディスクへの吸着率は DOC として 35~50%であることなどを確認している (杉山ら, 2007)。

2.2 実験

濾過試料の DOC 濃度は, 日本に持ち帰った後 SHIMADZU TOC-5000 を用いて測定した。測定は, あらかじめマッフル炉により 450°C で 2 時間の加熱処理をした専用のガラス製バイアル瓶に入れて 1 本当たり 3 回行い, その平均値を取った。変動係数が 2% に収まらない場合には, 前の 3 回の測定に加えて 2 回測定を行い, 変動係数が最小になる 3 回の測定の平均値を用いた。装置のブランク値は, 装置に内蔵してあるブラン

クチェック機能により計測した。装置のブランクから, DOC の検出限界 (S/N > 3) は, 0.16 mgC/dm³ と計算された。検量線には, フタル酸水素カリウム (0, 2, 4 mgC/dm³) 標準溶液を用いた。2 mgC/dm³ の標準溶液の測定により計算された測定精度は, ± 0.03 mgC/dm³ (N = 3) であった。また, クロロフィル a (Chl. a) は Holm-Hansen *et al.* (1965) にしたがって, Whatman GF/F フィルタに捕集後 90% アセトンで抽出し, Turner 10-AU にて測定した。

C₁₈固相抽出ディスク上に濃縮された試料は, National High Magnetic Field Laboratory において, 9.4 テスラの超伝導マグネットを備えた手製の FT-ICR 質量分析器により測定した。また, 超純水 (MilliQ-TOC) 1 L を試料と同様の操作により C₁₈固相抽出を行い, 溶離したブランク試料も測定した。測定は, ネガティブイオンモードで行い, イオン化はエレクトロスプレーイオン化法を選択し, インフュージョン分析を行った。注入量は 0.4 μl/min, ニードル電圧は -2.0 kV に設定し, 測定時間は 30 秒とし, 125 回測定したスペクトルを積算した。ブランク試料に検出された質量イオンピークは, 試料処理の段階で混入してきたものである可能性が高いため, 湖水試料解析の際には質量イオンリストから除いた。質量イオンピークの分子式は, Molecular Formula Calculator v 1.1 (@NHMFL) を用いて予測した。分子式予測のための条件は, C: 1 以上, H: 1 以上, N: 0~5, O: 0 以上, P: 0~6, S: 0~2 とした。元素数に上限をもうけたのは, 存在する可能性の低い分子式を候補からはずすことにより, 分子式選択を容易にするためである。Iijima *et al.* (2008) によると, Dictionary of Natural Products (Chapman & Hall/CRC Press) に掲載されている天然有機化合物の 95.65% が, C: 1~95; H: 1~182; N: 0~10; O: 1~45; P: 0~6; S: 0~5 の範囲の元素比を有するとされている。

3. 結果と考察

3.1 Deep における DOC 濃度の鉛直分布

Table 1 に Deep において観測された電気伝導度 (EC) と水温, pH, Chl. a および DOC の値を示した。透明度は 5.0 m であった。Deep において DOC は 1.2~1.4 mgC/dm³ の範囲で分布し, 鉛直方向に大きな変化は見られなかった。Barguzin の表層水においては EC, DOC ともに湖水に比べて高値を示した。この濃度範囲は Yoshioka *et al.* (2002a) の観測結

Table 1 Physico - chemical data for the deepest point at L. Baikal and Barguzin River mouth (August, 2005)

Sample	Location		Secchi depth (m)	Water depth (m)	Water Temp. (°C)	EC ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	pH	Chl.a ($\mu\text{g chl.a}/\text{dm}^3$)	DOC ($\text{mg C}/\text{dm}^3$)
	Latitude	Longitude							
Barguzin	53° 25'N	108° 58' 60"E	1.0	0	23.7	159.8	7.6	4.0	4.22
Deep-1	53° 17'N	108° 17' 20"E	5.0	0	16.2	76.0	8.3	2.1	1.32
Deep-2				5	16.1	96.7	8.3	5.4	1.33
Deep-3				10	11.0	83.2	8.2	3.9	1.42
Deep-4				15	7.9	76.7	7.6	4.2	1.43
Deep-5				25	5.4	72.0	7.3	1.0	1.35
Deep-6				50	4.0	69.0	7.3	0.2	1.41
Deep-7				100	3.8	69.1	7.3	0.1	1.40
Deep-8				250	3.6	69.3	7.3		1.37
Deep-9				350	3.5	69.3	7.2		1.42
Deep-10				945	3.3	69.3	7.2		1.24

果とほぼ同じであった。また、Chl. a 濃度は水深5 m で最高値5.4 $\mu\text{g chl. a}/\text{dm}^3$ を示した。

3.2 バイカル湖水中DOMの質量スペクトルの特徴

Barguzin 0 m, および Deep 5 m, 945 m から採取された水試料から C_{18} 固相抽出ディスクに濃縮された DOM (C_{18}DOM) の FT-ICR 質量スペクトルを Fig. 2に示す。エレクトロスプレーイオン化法は、最もソフトなイオン化法として知られており、フラグメントイオンがほとんど生じないため、得られたピークはほとんどが分子イオンピークであると考えられる (Stenson *et al.*, 2002)。各スペクトルには、 $m/z = 240 \sim 280$ の範囲に明瞭なピークが見られない領域があるが、この範囲のシグナル強度を平均した値をノイズ値とし、 $\text{S/N} > 3$ の強度を有するピークを抽出した結果、バイカル湖水およびバルグジン河川水において、 $m/z = 300 \sim 600$ の範囲を中心に、Barguzin では 3511, Deep 水深5 m の試料では 2862, 945 m の試料では 2191の質量イオンピークが検出された。質量分析により検出されたピークの分子量範囲は1000 Da 以下と、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) などにより測定された天然有機物の分子量 (Perminova *et al.*, 2003) よりも明らかに小さい。Sugiyama *et al.* (2006) は腐植物質試料を SEC-HPLC により3つのサイズフラクションに分離し、それぞれのフラクションを TOF-ESI 質量分析と ESI-FTICR 質量分析器で分析し、分子量分布や分子種の比較を行っており、SEC-HPLC により分離された各フラクションの平均分子量 (Mn) は、質量分析により計算された値と比較して3~62倍大きいこと、全く同じ m/z 値を有する分子が全てのフラクションに存在していることを報告した。Sugiyama らは、SEC 分析による分子量が大

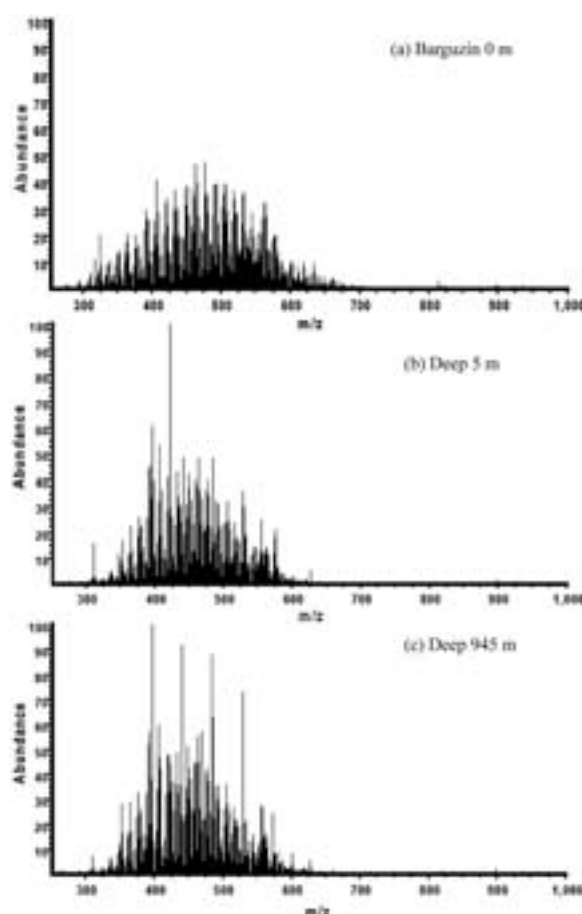


Fig. 2 Broadband negative-ion electrospray ionization FT-ICR mass spectra of the C_{18} extracted L. Baikal and Barguzin River C_{18} extracted DOM.

きくなる理由として、低分子量有機物の水中における凝集の可能性を述べている。Reemtsma *et al.* (2007) もまた Sugiyama *et al.* (2006) と同じ検討

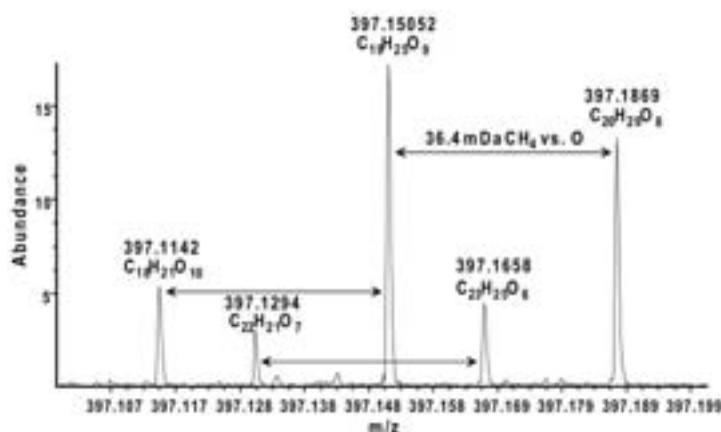


Fig. 3 Scale-expanded negative-ion ESI FT-ICR mass spectra of the C₁₈ extracted L. Baikal surface water DOM.

をSuwannee川の河川水に溶存するフルボ酸について行い、SECによりサイズ分離された3つのフラクションに全く同じ分子式で記述される分子が多数見られることを報告した。またHatcherら(2004)はSuwannee川中の溶存フルボ酸に対してDOSY NMRとESI質量分析を適用して分子量分布を調べ、両者の結果が一致することを確かめている。これらの報告において、SECにおいて検出されている高分子量の分子は、主に小さな分子が静電的相互作用や疎水性相互作用などの弱い力により凝集したもので、質量分析のイオン化の際には乖離して検出されるという仮説が提案されている。

Fig. 3は、Deep表層水試料(5 m)における質量スペクトルの $m/z=397.100\sim 397.200$ を拡大し、ピークの同定結果を合わせて示したものである。Fig. 3より、この質量分析器が非常に高い分解能でピークを検出していることが分かる。図に示した矢印は36.4 mDaの m/z 差を示しており、分子内におけるCH₄とOの違いに相当する。このように、FT-ICRMSを用いると、複雑な質量イオンピークは高い分解能で相互分離され、同定が可能になる。本装置のピーク分解能は、例えば $m/z=400$ 付近において、約500000 ($m/\delta m_{50\%}$)と計算された。

Table 2には、 $m/z=397.0\sim 398.0$ の範囲で検出されたDeep水深5 mの試料の質量イオンピークの同定結果を示す。この範囲で検出された14ピークのうち、+0.0~+0.5 ppm以内の精度で13ピークの分子式を予想することができた。このようにして ± 1.0 ppmの範囲で分子式を予想することができたピーク数は、Barguzinでは3280 (¹³C同位体ピーク849を含む)、

Table 2 Elemental composition assignments for the C₁₈ extracted L. Baikal surface water DOM.

Observed m/z	Expected Formula	Theoretical m/z	Error (ppm)
397.0567	C ₂₀ H ₁₃ O ₉	397.05651	0.5
397.07773	C ₁₇ H ₁₇ O ₁₁	397.07764	0.2
397.09303	C ₂₁ H ₁₇ O ₈	397.09289	0.3
397.11415	C ₁₈ H ₂₁ O ₁₀	397.11402	0.3
397.12942	C ₂₂ H ₂₁ O ₇	397.12928	0.4
397.14247	n/a	n/a	n/a
397.15052	C ₁₉ H ₂₅ O ₉	397.15041	0.3
397.1658	C ₂₃ H ₂₅ O ₆	397.16566	0.3
397.1869	C ₂₀ H ₂₉ O ₈	397.18679	0.3
397.20219	C ₂₄ H ₂₉ O ₅	397.20205	0.4
397.22331	C ₂₁ H ₃₃ O ₇	397.22318	0.3
397.22656	C ₁₈ H ₃₇ O ₇ S ₁	397.22655	0.0
397.23858	C ₂₅ H ₃₃ O ₄	397.23843	0.4
397.25966	C ₂₂ H ₃₇ O ₆	397.25956	0.2

Deep水深5 mで2408(同742)、同地点水深945 mで2011(同646)であった。また同定された(分子式を予想することができた)ピークの全質量イオンピーク数に対する割合は、Barguzinでは93%、Deep地点では5 mで84%、945 mで92%となった。未同定有機物の中には、多価イオンを生じている物質や金属と結合している物質など2.2項に記述した元素数の条件に当てはまらないものが含まれる。

3.3 Kendrick Mass Defect 分析によるDOMのキャラクタリゼーション

インフュージョン分析により得られる質量スペクト

ルには、通常数千のピークが検出される。この膨大なデータを処理する方法として、Kendrick Mass 分析がある。Kendrick Mass 分析は、最初に石炭化学分野で提案され (Kendrick, 1963)、使われてきた方法であり、同じ基本構造を持つが、 $-\text{CH}_2$ の数だけが異なるような一連の化合物群を取り出すことができる。

Kendrick mass 分析では、まず、次式により測定された質量を“Kendrick Mass”に変換する。

$$\text{Kendrick mass (KM)} = \text{exact } m/z \text{ value of peak} \\ \times \frac{\text{no. min. al. mass of } [\text{CH}_2, \text{COO}, \text{H}_2, \dots]}{\text{exact mass of } [\text{CH}_2, \text{COO}, \text{H}_2, \dots]}$$

たとえば、 $(\text{CH}_2)_n$ によって表すことができる有機物質群の Kendrick mass $[\text{CH}_2]$ は、

$$\text{Kendrick mass } [\text{CH}_2] = \text{exact } m/z \text{ value of peak} \\ \times \frac{14.000 \text{ Da}}{14.01565 \text{ Da}}$$

の計算を行うことにより、整数値となる。

得られた Kendrick mass と、Kendrick nominal mass の差が Kendrick mass defect (KMD) である。

$$\text{Kendrick mass defect (KMD)} = (\text{nominal} \\ \text{Kendrick mass} - \text{Kendrick mass}) \times 1000$$

したがって、 $(\text{CH}_2)_n$ によって表すことができる有機物質群の Kendrick mass defect は、すべて0となる。

このように、KMD は、同じ基本構造を持つが、 $-\text{CH}_2$ や $-\text{COO}$ の数だけが異なるような一連の化合物群について同値となる。

Fig. 4には Deep 5 m の試料について $-\text{CH}_2$ および $-\text{COO}$ に関して Kendrick Mass 分析を行った結果を示した。水平方向に一列に並んでいるデータ群がそれぞれ同じ KMD を有するグループであり、分子内の CH_2 あるいは CO_2 の数だけが異なっている分子である。KMD $[\text{CH}_2]$ の結果を用いて、分子式の推定を同じ KMD を有するグループごとに行うことで、分子式の候補が数多く存在する高分子化合物についても、適当な分子式を予想することが容易になる。また、水平方向に並んだ一連の有機物質群の存在は、環境水中での生物・化学反応による重合や分解、脱炭酸などの変質過程を示しているとも考えることもできる。

KMD $[\text{CH}_2]$ の結果、水平方向に $m/z = 14$ の間隔をあけて並んだ化合物のグループが多数見つかった (Fig. 4(a))。水平方向に並んだグループは、分子の

基本構造が同じで分子内の CH_2 の数だけ異なる化合物群であると考えてよいので、たとえば同じ KMD を有するグループの低分子量の化合物の分子式が予測できれば、高分子量の化合物の分子式も予測できることになる (Hughey *et al.*, 2001)。

KMD $[\text{COO}]$ の結果からも、水平方向に $m/z = 44$ の間隔をあけて並んだ化合物のグループが多数見つかった (Fig. 4(b))。このことは、水中で脱炭酸反応による一連の分子の変質が起こっていることを示唆している。このように、KMD プロットからは、有機分子を特定の官能基の違いによるグループに分けることができ、有機物の分子式や構造推定に役立てることができる。

3.4 不飽和度 (Double Bond Equivalent, DBE)

解析による DOM のキャラクタリゼーション
各質量ピークの分子式を予想することができると、それぞれの分子の有する二重結合あるいは環の数 (Double Bond Equivalent, DBE) を求めることができる。DBE は分子を構成する各元素比から計算され、次の式に従って求められる。

$$\text{DBE} = \frac{1}{2} \times (2 \times \text{C} + \text{N} + \text{P} - \text{H} + 2)$$

(C, N, P, H は分子が有するそれぞれの元素の数を示す)

求められた DBE を炭素数に対してプロットしたものを Fig. 5 に示す。Fig. 5 より、バイカル最深部の DOM は表層水で DBE = 0~35、炭素数 11~60 の分子、深層水で DBE = 0~33、炭素数 10~48 の分子から主に構成されることがわかった。Fig. 5(a) には、表層で見られたが深層で検出できなくなったピークの領域に楕円の印をつけた。大きく2種類の領域が深層で見られなくなったが、ひとつは DBE が 17 以上、炭素数 25 以上の不飽和結合を多く有し、比較的大きな分子のグループ (B) である。もうひとつは DBE が 5 以下で炭素数 28 以下の比較的小さな分子のグループ (A) であった。

3.5 Van Krevelen Diagram による DOM の分子構成の特徴と DOM の起源に関する考察

同定された有機物質群を視覚的に比較できる方法として、van Krevelen Diagram (van Krevelen, 1950) がある。このグラフは、縦軸に H/C 元素比、横軸に O/C 元素比をプロットしたものであり、1 点が 1 質量イオンピークに相当する。Fig. 6 は Barguzin 0 m, Deep 5 m および 945 m における C_{18} DOM のピーク同

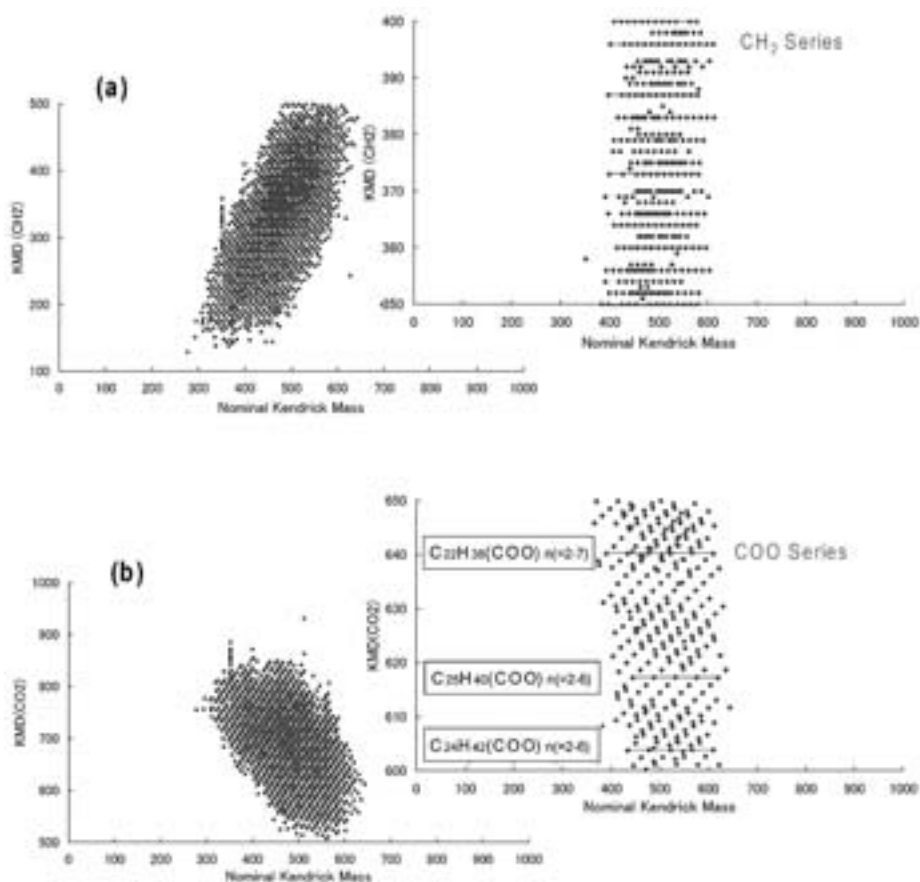


Fig. 4 Kendrick mass defect plots of peaks of the C_{18} extracted L. Baikal surface water DOM: (a) points analyzed by CH_2 KMD analysis; (b) points analyzed by CO_2 KMD analysis.

定結果から作成された van Krevelen Diagram である。

van Krevelen Diagram は、様々な情報を視覚化している。例えば、ある直線に沿って点が並んでいる場合、直線に沿って並んだ有機分子群は、同種の分子構造（アルキル鎖など）をもつ有機物群が、特定の元素比の官能基を得る、あるいは失っていく変化を示している。直線を $H/C = -a(O/C) + b$ としたときに、水素化/脱水素化は鉛直方向の直線、脱水は $a = -2$ 、酸化/還元は水平方向の直線で、それぞれ示される (Sleighter & Hatcher, 2007)。

また、同種の有機分子は、それぞれある一定範囲の H/C および O/C 比を有することから、同定された有機物がどのような種類のものであるのか、大まかにグループ化することが可能である。Fig. 6(a)には大まかな有機化合物の取り得る範囲をグループごとに楕円で示した。Fig. 6より、バルグジン河川水、バイカル

湖水ともに C_{18} DOM は、リグニン様物質が中心的な構成成分であって、表層5 m ではそれに脂質やタンパク様物質が加わっているということが示唆された。一方、縮合型炭化水素のグループのピークは河川水のみを検出され、湖水試料では全く検出されなかった。

バイカル湖水中リグニン様物質の範囲にプロットされた有機分子が外来性のものであるか自生性のものであるかを確かめるために、Barguzin 0 m で検出されたピーク同定結果と湖水ピーク同定結果を比較した。予想分子式が一致したピークを Fig. 6(b), (c)に●で、河川水中では検出されず湖水のみで見られたピークを○で示した。バイカル湖表層水 (5 m) C_{18} DOM では総同定ピークのうち79.6%が、深層水 (945 m) では89.6%が、河川水 C_{18} DOM と同一の分子式で示される分子で構成されていることが分かった。また、Fig. 6(b)には湖水中でのみ検出されたピーク領域 A, B を示している。この領域に含まれるピークを示した

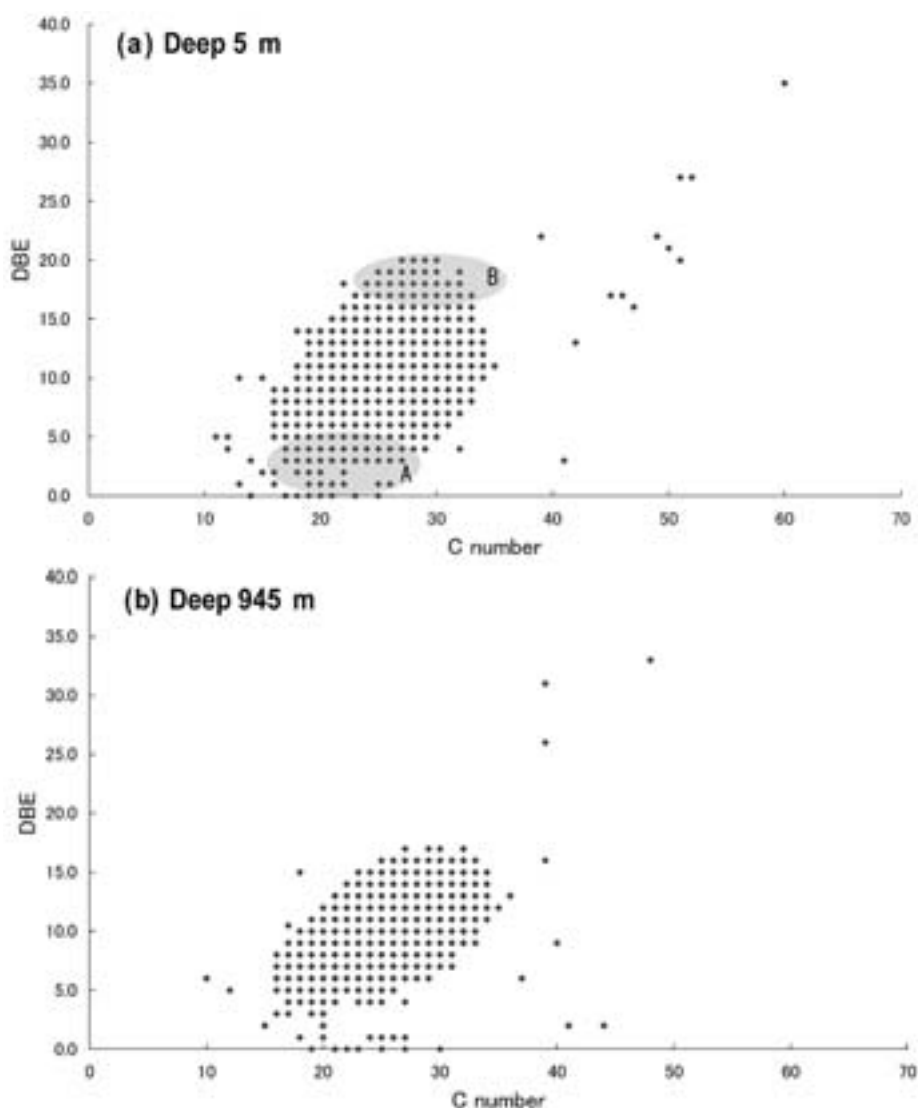


Fig. 5 Double-bond equivalents vs. carbon number for the C_{18} extracted L. Baikal DOM.

有機分子は、主に湖内で生成された自生性 DOM であると考えられる。A で示された部分は脂質・タンパク様物質などの領域であり、Kujawinski *et al.* (2004) は、バクテリア培養試料において A 領域に多くのピークが現れることを示している。この領域に含まれるピークは、先に DBE 解析の項で述べた Fig. 5(a) の A の領域のピーク群に相当する。一方 B で示された部分はリグニンやフミン物質などが示す領域である。バイカル湖深層水の有機物の多くは河川起源のリグニン様物質などにより構成されていると考えられるが、自生性有機物起源の水生フミン物質も生成し、B の領域に現れている可能性もある。この領域に含まれるピークは、Fig. 5(a) の B の領域のピーク群に相

当している。

Fig. 6には、炭水化物や加水分解タンニンなどの領域にプロットされる質量イオンピークはほとんどみられなかった。タンニンのように極性が高い物質は、他のグループに比較して C_{18} 固相抽出における回収率が低いことが予想される。また、炭水化物はエレクトロスプレーイオン化法のイオン化効率が非常に低いことが分かっている (Lee *et al.*, 未公表データ)。このため、これらの物質の存在の有無を確認するためには、 C_{18} 固相抽出以外の脱塩濃縮法や大気圧光イオン化法 (APPI)、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI) など他のイオン化法を併用した分析を行うことなどが必要である。

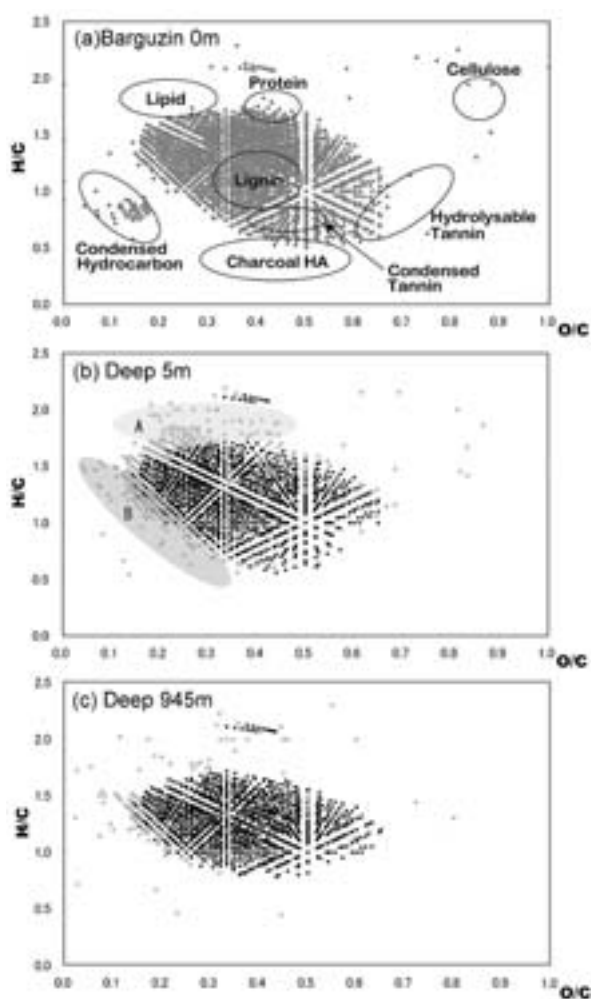


Fig. 6 The van Krevelen diagrams for the C_{18} extracted (a) Barguzin River and (b) (c) L. Baikal DOM, from the molecular formulas calculated from negative-ion ESI FT-ICR mass spectra. In Fig. 6 (a), regions corresponding to general compound classes are also shown. In Figs (b) (c), peaks found both in lake and river water C_{18} DOM (●); and found only inlake water C_{18} DOM (○).

4. ま と め

バイカル湖に溶存する未同定有機物を解明する目的で、エレクトロスプレーイオン化法に超高分解能フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型質量分析を組み合わせて、 C_{18} 固相抽出により分離されたDOMの分析を試みた。Barguzin 地点表層水、および Deep 地点5 m と945 m の試料を分析した結果、質量イオンピークは $m/z = 300 \sim 600$ の範囲を中心に分布し、Barguzin では3511, Deep 地点水深5 m では2862, 945

m では2191の質量イオンピークが検出された ($S/N > 3$)。このうちで ± 1.0 ppm の範囲で分子式を予想することができたピーク数は、Barguzin では3280 (^{13}C 同位体ピーク849を含む)、水深5 m で2408 (同742)、水深945 m で2011 (同646) であり、全質量イオンピークのうち80%以上の分子式を予想することができた。得られた分子式から、その元素比を用いて van Krevelen Diagram を作成し、バイカル湖表層水と深層水に溶存する有機物の組成の違いを比較したところ、バイカル湖最深部の C_{18} DOM は表層から深層までリグニン様物質が中心的な構成成分であった。表層5 m ではそれに脂質・タンパク様物質が加わっていた。河川水データと湖水データの比較から、バイカル湖表層水 C_{18} DOM では総同定ピークのうち79.6%が、深層水では89.6%が、河川水 C_{18} DOM と同一の分子式で示される分子で構成されていた。今回は C_{18} 固相抽出法とエレクトロスプレーイオン化法を用いたため、検出される有機分子には分離濃縮とイオン化の過程で化学的選択が働いており、全ての有機分子がこれで明らかになったわけではない。しかし、 C_{18} 固相抽出法に代わる脱塩濃縮法や他のイオン化法を試みることにより、今回は検出できなかった有機分子の解明もさらに進めることが可能になると考えられる。

謝 辞

今回の観測を行うにあたり、バイカル博物館 R/V Treskov の船長・乗員の皆様には多くの援助をいただいた。関係者の皆様に感謝する。

本調査は、日本学術振興会科学研究費補助金 (No.14255015, 18255001) による補助を受けて行った。また、FT-ICRMS 分析を行うにあたり、米国 National Science Foundation (CHE-0089147) からの補助を受けた。

参 考 文 献

- Arts M. T., Robarts R. D., Kasai F., Waiser M. J., Tumber V. P., Plante A. J., Rai H. and de Lange H. J. (2000) The attenuation of ultraviolet radiation in high dissolved organic carbon waters of wetlands and lakes on the northern Great Plains. *Limnology and Oceanography* **45**, 292–299.
- Fievre A., Solouki T. and Marshall A. G. (1997) High-resolution fourier transform ion cyclotron reso-

- nance Mass Spectrometry of humic and fulvic acids by laser desorption/ionization and Electrospray ionization. *Energy & Fuels* **11**, 554–560.
- Hatcher, P. G., Kim, S. and Sugiyama, Y. (2004) Intercomparisons of some new approaches for investigating the molecular weight distribution of dissolved organic matter. In: *Humic Substances and Soil and Water Environment*, Martin-Neto, L., Milori, D. M. B. P., and ds Silva, W. T. L. (eds.), Embrapa, Brazil, p. 241–243.
- Hedges J. I., Eglinton G., Hatcher P. G., Kirchman D. L., Armosti C., Derenne S., Evershed R. P., Kogel-Knabner I., de Leeuw J. W., Littke R., Michaelis W. and Rullkotter J. (2000) The molecularly-uncharacterized component of non-living organic matter in natural environments. *Organic Geochemistry* **31**, 945–958.
- Hertkorn N., Benner R., Frommberger M., Schmitt-Kopplin P., Witt M., Kaiser K., Kettrup A. and Hedges J. I. (2006) Characterization of a major refractory component of marine dissolved organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **70**, 2990–3010.
- Hockaday W. C., Grannas A. M., Kim S. and Hatcher P. G. (2006) Direct molecular evidence for the degradation and mobility of black carbon in soils from ultrahigh-resolution mass spectral analysis of dissolved organic matter from a fire-impacted forest soil. *Organic Geochemistry* **37**, 501–510.
- Hockaday W. C., Grannas A. M., Kim S. and Hatcher P. G. (2007) The transformation and mobility of charcoal in a fire-impacted watershed. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **71**, 3432–3445.
- Holm-Hansen O., Lorenzen C. J., Holmes R. W. and Strickland D. H. (1965) Fluorometric determination of chlorophyll. *Journal of Marine Science* **30**, 3–15.
- Hughey C. A., Hendrickson C. L., Rodgers R. P. and Marshall A. G. (2001) Kendrick Mass Defect Spectrum: A compact visual analysis for ultrahigh-resolution broadband mass spectra. *Analytical Chemistry* **73**, 4676–4681.
- Iijima Y., Nakamura Y., Ogata Y., Tanaka K., Sakurai N., Suda K., Suzuki T., Suzuki H., Okazaki K., Kitayama M., Kanaya S., Aoki K. and Shibata D. (2008) Metabolite annotations based on the integration of mass spectral information. *The Plant Journal* **54**, 949–962.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) (1996) Radiative Forcing of Climate Change. In: *Climate Change 1995*, Cambridge University Press, 65–132.
- Kendrick E. (1963) A mass scale based on $\text{CH}_2 = 14.0000$ for high resolution mass spectrometry of organic compounds. *Analytical Chemistry* **35**, 2146–2154.
- Kim S., Simpson A. J., Kujawinski E. B., Freitas M. A. and Hatcher P. G. (2003a) High-resolution electrospray ionization mass spectrometry and 2 D solution NMR for the analysis of DOM extracted by C_{18} solid phase disk. *Organic Geochemistry* **34**, 1325–1335.
- Kim S., Kramer R. W. and Hatcher P. G. (2003b) Graphical Method for Analysis of Ultrahigh-Resolution Broadband Mass Spectra of Natural Organic Matter, the Van Krevelen Diagram. *Analytical Chemistry* **75**, 5336–5344.
- Kim S., Kaplan L. A. and Hatcher P. G. (2006) Biodegradable dissolved organic matter in a temperate and a tropical stream determined from ultra-high resolution mass spectrometry. *Limnology and Oceanography* **51**, 1054–1063.
- Kramer R. W., Kujawinski E. B. and Hatcher P. G. (2004) Identification of black carbon derived structures in a volcanic ash soil humic acid by fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Environmental Science and Technology* **38**, 3387–3395.
- Kujawinski E. B., Hatcher P. G., Freitas M. A. and Zang X. (2002a) High-resolution fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry of humic and fulvic acids: improvements and comparisons. *Analytical Chemistry* **74**, 413–419.
- Kujawinski E. B., Freitas M. A., Zang X., Hatcher P.

- G., Green-Church K. B. and Jones B. (2002b) The application of electrospray ionization mass spectrometry (ESI MS) to the structural characterization of natural organic matter. *Organic Geochemistry* **33**, 171–180.
- Kujawinski E. B., Del Vecchio R., Blough N. V., Klein G. C. and Marshall A. G. (2004) Probing molecular-level transformations of dissolved organic matter: insights on photochemical degradation and protozoan modification of DOM from electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Marine Chemistry* **92**, 23–37.
- Louchouart P., Opsahl S. and Benner R. (2000) Isolation and Quantification of Dissolved Lignin from Natural Waters Using Solid-Phase Extraction and GC/MS. *Analytical Chemistry* **72**, 2780–2787.
- Mopper K., Stubbins A., Ritchie J. D., Bialk H. M. and Hatcher P. G. (2007) Advanced instrumental Approaches for characterization of marine dissolved organic matter: extraction techniques, mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemical Reviews* **107**, 419–442.
- 森野浩, 宮崎信之 (1994) バイカル湖 古代湖のフィールドサイエンス, 東京大学出版会.
- Perminova I. V., Frimmel F. H., Kudryavtsev A. V., Kulikova N. A., Abbt-Braun G., Hesse S. and Petrosyan V. S. (2003) Molecular weight characteristics of humic substances from different environments as determined by size exclusion chromatography and their statistical evaluation. *Environmental Science and Technology* **37**, 2477–2485.
- Reemtsma T., These A., Springer A. and Linscheid M. (2007) Differences in the molecular composition of fulvic acid size fractions detected by size-exclusion chromatography-on line Fourier transform ion cyclotron resonance (FTICR-) mass spectrometry. *Water Research* **42**, 63–72.
- 齋藤和徳 (2008) フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型質量分析計の原理と応用. 九州大学中央分析センター. センターニュース, **27**, 1–4.
- Simjouw J-P., Minor E. C. and Mopper K. (2005) Isolation and characterization of estuarine dissolved organic matter: Comparison of ultrafiltration and C₁₈ solid-phase extraction techniques. *Marine Chemistry* **96**, 219–235.
- Sleighter R. L., Hatcher P. G. (2007) The application of electrospray ionization coupled to ultrahigh resolution mass spectrometry for the molecular characterization of natural organic matter. *Journal of Mass Spectrometry* **42**, 559–574.
- Stenson A. C., Landing W. M., Marshall A. G. and Cooper W. T. (2002) Ionization and fragmentation of humic substances in electrospray ionization fourier transform-ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **74**, 4397–4409.
- Stenson A. C., Marshall A. G. and Cooper W. T. (2003) Exact masses and chemical formulas of individual Suwannee River fulvic acids from ultrahigh resolution electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectra. *Analytical Chemistry* **75**, 1275–1284.
- 杉山裕子, 杉浦嘉一, 和田千弦, 熊谷哲 (2005) C₁₈固相抽出と3次元励起蛍光スペクトルを併用した湖沼溶存有機物の簡易モニタリング. 日本腐植物質学会第21回講演会講演要旨集, 54–55.
- 杉山裕子, 和田千弦, 熊谷哲, 鈴木智代, 早川和秀, 児玉宏樹, 米林甲陽, 藤嶽暢英, Patrick Hatcher (2007) C₁₈固相抽出により分離された琵琶湖溶存有機物の特徴—IHSS法により抽出された溶存腐植物質との比較—. 日本腐植物質学会第23回講演会講演要旨集, 18–19.
- Sugiyama Y., Hockaday W. C., Caccamise S. A. L., Ruhl I. D. and Hatcher P. G. (2006) Contrasting molecular sizes of dissolved organic matter in swamp water determined by size exclusion chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Proceedings of the 13th Meeting of the International Humic Substances Society: Humic Substances- Linking Structure to Functions*, Frimmel, F. H. and Abbt-Braun, G. (eds), p. 237–240.
- Tranvik L. J. (1992) Allochthonous dissolved organic matter as an energy source for pelagic bac-

- teria and the concept of the microbial loop. *Hydrobiologia* **229**, 107–114.
- Trompowsky P. M., de Melo Benites V., Madari B. E., Pimenta A. S., Hockaday W. C. and Hatcher P. G. (2005) Characterization of humic like substances obtained by chemical oxidation of eucalyptus charcoal. *Organic Geochemistry* **36**, 1480–1489.
- van Krevelen D. W. (1950) Graphical-statistical method for the study of structure and reaction processes of coal. *Fuel* **29**, 269–284.
- Williams P. M. and Druffel E. R. M. (1987) Radiocarbon in dissolved organic matter in the central North Pacific Ocean. *Nature* **330**, 246–248.
- Witters H. E., Van Puymbroeck S. and Vanderborgh O. L. J. (1990) The effect of humic substances on the toxicity of aluminium to adult rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Biology* **37**, 43–53.
- Wu Z., Rodgers R. P. and Marshall A. G. (2005) ESI FT-ICR mass spectral analysis of coal liquefaction products. *Fuel* **84**, 1790–1797.
- Yoshioka T., Ueda S., Khodzher T., Bashenkhaeva N., Korovyakova I., Sorokovikova L. and Gorbunova L. (2002a) Distribution of dissolved organic carbon in Lake Baikal and its watershed. *Limnology* **3**, 159–168.
- Yoshioka T., Ueda S., Khodzher T., Bashenkhaeva N., Tomberg I., Gorbunova L., Khanaev I. and Zhdanov A. (2002b) Dissolved organic matter in Lake Baikal and its watershed: a possible tool for studying the interaction between terrestrial and freshwater environments. In: *New scope on sustainable watersheds in east Asia, DIWPA series* **3**, 71–80.