

## 精密質量分析と多変量解析による下水試料中の毒性原因物質の探索技術の検討

○澤井淳<sup>1</sup>, 岡村哲郎<sup>1</sup>, 宮本信一<sup>1</sup>, 新福優太<sup>2</sup>, 亀屋隆志<sup>3</sup>, 高梨啓和<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>いであ(株), <sup>2</sup>鹿児島大院・理工, <sup>3</sup>横浜国立大院・環境情報)

### 【はじめに】

環境省は、既存の排水規制を補完する新たな排水管理手法として、排水の生物試験（WET: Whole Effluent Toxicity）の導入を検討している。排水に毒性がみられた場合、原因を探索・同定するために、毒性削減評価（TRE: Toxicity Reduction Identification）<sup>1)</sup>および毒性同定評価（TIE: Toxicity Identification Evaluation）<sup>2)</sup>を実施し毒性を低減させることが求められる。しかし、下水のように多種多様な有機化合物が混在する場合、原因の探索が難しく、米国では下水処理場における毒性削減の成功率が 35%との報告がある<sup>3)</sup>。毒性に寄与している化学物質（群）を同定できれば、効率的に毒性削減できると考えられる。これまでに、下水試料の固相抽出画分に、毒性が既知の化学物質を添加した模擬試料を用いて、精密質量分析および多変量解析により毒性原因物質の探索および同定を試み、負イオンモードで測定できる化学物質について本探索技術の有効性を実証した。

そこで、精密質量分析および多変量解析による毒性原因物質の探索技術が、多様な化学物質に対応できるか検証するため、正イオンモードで測定できる化学物質についても同様に模擬試料を用いて、精密質量分析および多変量解析による毒性原因物質の探索を試みた。

### 【方法】

3 か所の下水処理水を固相抽出（Oasis HLB, 日本 Waters）して、各処理水の 100 倍濃縮メタノール溶液（δ0、ε0、ζ0）を調製した。そこへ、藻類に対する毒性が既知である 5 種類の化学物質（表 1）を添加した試料（δ1、ε1、ζ1）を調製した。推定毒性強度は各物質の 1 倍濃縮液中の添加濃度を藻類毒性値で除して、5 物質分または 3 物質分を足し合わせた値である。6 種類の試料について、LC/MS（LTQ Orbitrap XL, Thermo Scientific, USA）を用いた精密質量分析を実施した。

表 1 化学物質の添加濃度と推定毒性強度

添加した化学物質	各試料への添加濃度/100 (mg/L)						藻類毒性値 EC50または NOEC(mg/L)
	δ0	ε0	ζ0	δ1	ε1	ζ1	
A クラリスロマイシン	0	0	0	0.0032	0.0016	0.0008	0.016 (72h-NOEC)
B シクロホスファミド	0	0	0	0.005	0.01	0.02	100 (72h-NOEC)
C N,N-ジメチルドデシルアミン N-オキシド	0	0	0	0.35	0.175	0.0875	0.081 (72h-EC50)
D ポリオキシエチレン(23)ラウリルエーテル	0	0	0	0.01	0.02	0.005	2 (72h-EC50)
E 4,5-ジクロロ-2-n-オクチル-4-イソチアゾリン-3-オン	0	0	0	0.08	0.04	0.02	0.027 (24h-NOEC)
推定毒性強度 TU (5物質)	1.25	1.25	1.25	7.49	3.75	1.87	-
推定毒性強度 TU (3物質:B, C, D)	1.25	1.25	1.25	4.33	2.17	1.08	-

**Exploring and Identifying of Ecotoxic Substances in Sewage Effluents by an Accurate Mass Analysis Coupled with Multivariable Analyses.** Atsushi SAWAI\*, Tetsuro OKAMURA, Nobukazu MIYAMOTO, Yuta SHINFUKU, Takashi KAMEYA, Hirokazu TAKANASHI

\*Corresponding Address: IDEA Consultants, Inc., 1334-5 Riemon, Yaizu, Shizuoka 421-0212 JAPAN, Tel:+81-54-622-9552, Fax: +81-54-622-9522, E-mail:sw20320@ideacon.co.jp

**【結果と考察】**

6 種類の試料 ( $\delta 0$ ,  $\epsilon 0$ ,  $\zeta 0$ ,  $\delta 1$ ,  $\epsilon 1$ ,  $\zeta 1$ ) の LC/MS による精密質量分析の結果、2,471 個のコンポーネントが検出された。これらから毒性原因物質を多変量解析等により絞り込んだ過程を図 1 に示す。推定毒性強度 (TU: Toxic Unit) と関係があるものを、フィルター設定により 191 個に、付加体イオン・予期できなかった同位体イオン・非意図的に生成したプロダクトイオンを排除して 117 個に、OPLS 回帰分析により 36 個に、相関分析により 15 個に絞り込んだ (図 1)。重回帰分析の結果、添加した 5 物質中 3 物質の濃度が推定毒性強度と同じ比であったため、多重共線性を示し解析不能となったため、2 物質を除外し再解析した。

残りの 13 個のコンポーネントについても強い多重共線性を示していたことから、分子式を検討した。TU との相関係数が 0.9 以上で  $C_nH_{2n}$  の違いや  $C_nH_{2n+2}$  の違いのイオンが 11 個発見された (図 2)。これは、界面活性剤の特徴であり、混合物と推察されたためピーク面積が最大のものを残し 10 個を除外した。残った 3 個について重回帰分析を実施したが、同様に強い多重共線性を示したため、残りの 2 個も不純物の可能性があると考え、ピーク面積が最大の物質で単回帰分析を行ったところ、 $R^2=0.985$  と強い相関関係が確認された。RT=17.37 min、中性分子のモノアイソトピック質量 229.2411、分子式  $C_{14}H_{31}NO$  の物質であった。データベースマッチングにより *N,N*-ジメチルドデシルアミン *N*-オキシドと推定できた。

**【結論】**

精密質量分析と多変量解析を用いて、下水処理水に、藻類に影響がある濃度で添加した *N,N*-ジメチルドデシルアミン *N*-オキシドを毒性原因物質として探索できた。模擬試料を用いて、精密質量分析と多変量解析を用いた未知の毒性原因物質の探索技術が有効であることが確認できた。今後、有機化合物が毒性原因と推定された実試料を用い、本手法の有効性を検証する。

**【謝辞】** 本研究の一部は、国土交通省下水道技術研究開発 (GAIA プロジェクト) により実施された。

**【参考文献】**

- 1) US EPA, Generalized methodology for conducting industrial toxicity reduction evaluations, 1989.
- 2) US EPA, Toxicity Identification Evaluation Characterization of Chronically Toxic Effluents Phase I, 1992.
- 3) Texas Association of Clean Water Agencies, Report on Freedom of Information Act Request to U.S. Environmental Protection Agency by Texas Coalition of Publicly Owned Treatment Works Regarding Sublethal Toxicity Reduction Evaluations, 2010.

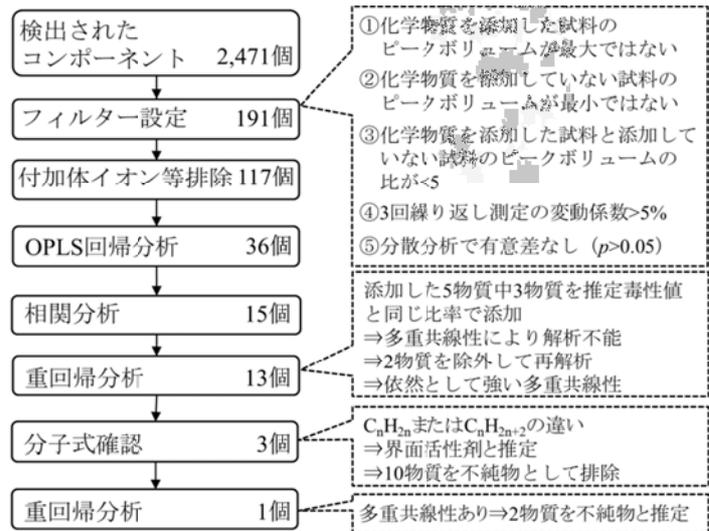


図 1 毒性原因物質絞り込みの流れ

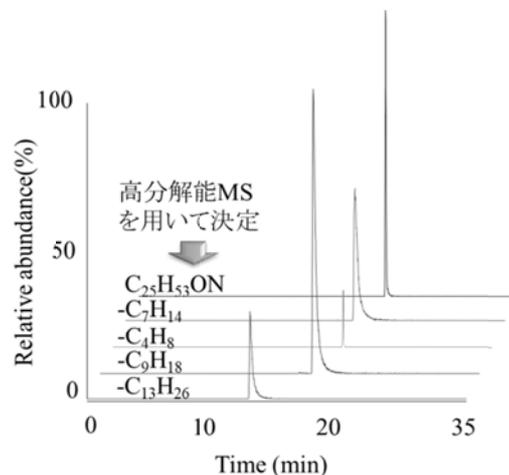


図 2 TU との相関係数が 0.9 以上となったコンポーネントの EIC の例