

# 水道水源における消毒副生成物前駆物質の特定と 生成特性の把握

京都大学大学院工学研究科 小坂浩司、京都大学工学部 多田悠人

## 1. はじめに

浄水処理過程において、病原微生物の人体への感染を防ぐために消毒が行われている。消毒のおかげで、私たちは安心して水道水を飲むことができる。消毒がもたらす恩恵は非常に大きい。一方で、消毒に伴い消毒副生成物(Disinfection byproducts; DBPs)が生成されることも知られており、トリハロメタンやハロ酢酸(Haloacetic acid; HAAs)に代表されるような一部のDBPsは、人体に有害な影響を与えることが分かっている。水道原水中のDBP前駆物質の除去や浄水処理過程でのDBPsの発生抑制を研究することが大切であることは言うまでもない。

近年、水道水源中にラフィド藻類の発生が確認されており、その際に原水中のトリクロロ酢酸(Trichloroacetic acid; TCAA)生成能が上昇したことが報告されている<sup>1, 2)</sup>。また、市販のラフィド藻類を培養した溶液について、ラフィド藻類数と塩素処理後のTCAA濃度に相関があったことも報告されている<sup>2)</sup>。しかし、ラフィド藻類に由来するTCAA前駆物質は明らかにされておらず、浄水場では塩素注入量の低減や、前塩素処理を止めるなどといった対応が施されているに過ぎず、十分な管理体制が構築できているとは言い難い。ラフィド藻類に由来する前駆物質の特定が行われれば、前駆物質が生成しにくい条件の把握、前駆物質の処理方法の開発等により水道水中のTCAAの低減につながると考えられる。

以上より、本研究ではラフィド藻類に由来するTCAA前駆物質の探索を行った。解析手法として特性の異なる2種類のカラムを用いた高速液体クロマトグラフ(High performance liquid chromatography; HPLC)による分画と各画分へのTCAA生成能試験を組み合わせ、前駆物質の分離・生成を行った。また、液体クロマトグラフ-四重極飛行時間型質量分析計(Liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry; LC-QTOF/MS)による精密質量分析から、TCAA前駆物質の分子量および分子式の推定を行った。

## 2. 方法

### 2.1 試薬と溶液

本研究では、超純水製造システム(Milli-Q Academic; Millipore)により製造した精製水(以降、MQWと記載)を溶液の調製等に用いた。HAA<sub>9</sub>(100 mg/L)の標準液は、関東化学から購入した。次亜塩素酸ナトリウム(試薬特級)、塩化アンモニウム(試薬特級)、酢酸(試薬特級)、リン酸(試薬特級)、メタノール(LC/MS用)、アセトニトリル(LC/MS用)、ギ酸(LC/MS用)、リン酸一水素ナトリウム、リン酸二水素カリウム、EDTA、DPD硫酸塩、EDTA二ナトリウムは富士フイルム和光純薬から購入した。これらを用いて3 g/L次亜塩素酸溶液、15 g/L塩化アンモニウム、500 mMリン酸緩衝液、1.5 mMリン酸水溶液、3%ギ酸水溶液、リン酸緩衝液(DPD用)、DPD溶液を作成した。

## 2.2 対象資料

2017 年 10 月のラフィド藻類発生時に採取したダム湖水を用いた。このダム湖水は A 水道事業体の水道水源として利用されている。ガラス繊維ろ紙 GA-55(孔径 0.6  $\mu\text{m}$ ; アドバンテック)によりろ過した後に実験に用いた。全有機炭素(Total organic carbon; TOC)量および TCAA 生成能(-formation potential; -FP)は、それぞれ 2.6 mgC/L、560  $\mu\text{g/L}$  であった(試験方法は後述する 2.7 を参照)。

## 2.3 HPLC 分画による TCAA 前駆物質の分離

前処理として、ろ過したダム湖水 2 L を 40  $^{\circ}\text{C}$  に保った状態でロータリーエバポレーター(REN-1 Series; IWAKI)と窒素吹き付け機(Dry Thermo Bath MG-2000; EYELA)を用いて、25 倍濃縮した。濃縮液について HPLC 分画を行った。

まず、逆相カラム(ZORBAX SB-Aq、4.6 $\times$ 150 mm; Agilent Technologies)を用いて HPLC 分画を行い、0.33~1 分および 1~40 分までの 1 分ごとの画分(合計 40 画分)を作成した。表 1 に、逆相カラムを用いて HPLC 分画を行った際の条件を示す。移動相は MQW とメタノールであり、流量 1.0 mL/分に対し 100  $\mu\text{L}$  を注入量に設定した。各画分について TCAAFP 試験を行った(後述する 2.7 参照)。

次に、TCAAFP が高かった画分を収集し、窒素吹き付け機により 40 倍濃縮した。この濃縮液について、親水性相互作用クロマトグラフィー(Hydrophilic interaction chromatography; HILIC)カラム(HILIC-OH5、4.6 $\times$ 150 mm; Agilent Technologies)を用いて HPLC 分画を行い、1~41 分までの 1 分ごとの画分(合計 40 画分)に分けた。表 1 に、HILIC カラムを用いて HPLC 分画を行った際の条件を示す。移動相は 1.5 mM リン酸水溶液とアセトニトリルであった。各画分にはアセトニトリルが含まれているため、その割合を下げるために、窒素吹き付け機で約 10 倍濃縮した後に、2.7 で後述する TCAA 分析方法において、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計(Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LC-MS/MS)で測定できる TCAA 濃度範囲に合わせるために、元の分画試料に対して 1.6 倍希釈になるように MQW でメスアップした。その後、各画分について TCAAFP を測定した。

表 1 HPLC 分画の測定条件

|                             | 逆相カラムによるHPLC分画                                             | HILICカラムによるHPLC分画                                       |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| LC                          | Prominence 20A (Shimadzu)                                  | Prominence 20A (Shimadzu)                               |
| フラクションコレクター                 | FRC-10A (Shimadzu)                                         | FRC-10A (Shimadzu)                                      |
| カラム                         | ZORBAX SB-Aq、4.6 $\times$ 150 mm<br>(Agilent Technologies) | HILIC-OH5、4.6 $\times$ 150 mm<br>(Agilent Technologies) |
| 移動相                         | A液: MQW<br>B液: メタノール                                       | A液: 1.5 mMリン酸水溶液<br>B液: アセトニトリル                         |
| グラディエント条件(%)                | B液: 0(0~10分)→ 30(15分)<br>→ 80(18~30分)→ 80(35~45分)          | B液: 95(0~15 分)<br>→ 5(25~42分)→ 95(45~60分)               |
| カラム温度( $^{\circ}\text{C}$ ) | 25                                                         | 25                                                      |
| 注入量( $\mu\text{L}$ )        | 100                                                        | 50                                                      |
| 流量(mL/分)                    | 1.0                                                        | 0.5                                                     |

## 2.4 UV 吸光度による特性解析

HILIC カラムを用いた HPLC 分画と同じ条件、試料を用いて、試料中に芳香環を持つ物質が存在することを確認するために波長 254 nm における紫外部(Ultraviolet; UV)吸光度の測定を行った。

また、HILIC カラムを用いた HPLC 分画において最も TCAAFP が高かった画分を用いて、TCAAFP 試験前後における、UV 吸光度の変化も観察した。この時、ブランクとして MQW にリン酸緩衝液(最終濃度 5 mM)と塩化アンモニウム (最終濃度 50 mg/L)を加えた試料についても測定を行った。この実験における移動相は A 液に 5 mM 酢酸水溶液を用いた。

なお、UV 測定器は SPD - M20A (Shimadzu)を利用した。

## 2.5 固相抽出カラムによる分離

TCAA 前駆物質がどのような官能基を有するのかを検討するために、HPLC 画分を行っていない試料を用いて固相抽出を行った。固相には Oasis MCX カートリッジ(Waters) (以降、MCX と記載)と Oasis MAX カートリッジ(Waters) (以降、MAX と記載)を用いた。固相抽出カートリッジを通過した試料と通過前の試料の TCAAFP 試験を行った。MAX は逆相-強陰イオン交換ポリマーで、酸性化合物に対する選択性がある<sup>3)</sup>。一方で、MCX は、逆相-強陽イオン交換ポリマーで、塩基性化合物に対する選択性がある<sup>3)</sup>。図 1 に固相抽出の手順を示す。

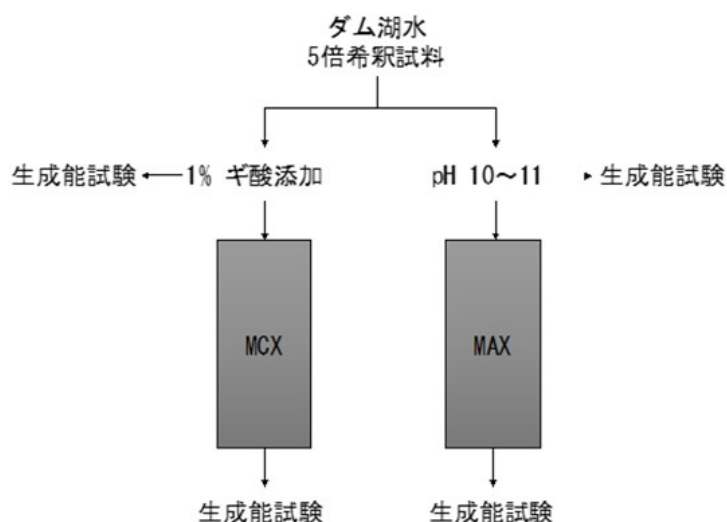


図 1 固相抽出の手順

前処理として、試料 20 mL を 100 mL メスシリンダーで 5 倍希釈した。これを 2 本用意し、一方は、ギ酸を体積比で 1% になるように加えた。他方は pH が 10~11 になるように 1 M の水酸化ナトリウム水溶液を 0.05 mL 加えた。MCX のコンディショニングは、100% メタノール 20 mL と 1% ギ酸水溶液 20 mL を 5 mL/分の流量で流すことで行った。MAX では、100% メタノールを 20 mL、1% アンモニア水溶液を 20 mL、MQW を 20 mL の順で、いずれも 5 mL/分の流量で流すことでコンディショニングを行った。1% ギ酸を加えた試料は、MCX に通水させ、通水液を回収した。同様に水酸化ナトリウム水溶液を加え塩基性にした試料は MAX に通水させ、通水液を回収した。その後、カートリッジに通す前の試料も含めて、TCAAFP 試験を行った。

ただし、1% ギ酸を加えた試料は、TCAAFP 試験において、リン酸緩衝液で pH 7.0 にならなかったために、1 M の水酸化ナトリウム水溶液で pH 7.0 になるように調製を行った後に、TCAAFP 試験を行った。

## 2.6 精密質量分析

HILIC カラムによる HPLC 分画によって精製した高濃度で TCAA 前駆物質が含まれる画分を LC-QTOF/MS で分析した。測定条件を表 2 に示す。後述する固相抽出と紫外吸光度測定の結果を基に測定条件を決定した。TCAAFP 試験を行った試料と TCAAFP 試験において次亜塩素酸溶液のみを加えなかった試料を用意し測定を行った。得られた 2 つのマススペクトルから塩素処理後に減少したピークを探索した。そのピークから、分子量と分子式の推定を試みた。

表 2 LC-QTOF/MS による分析条件

|          |                     |                                                         |
|----------|---------------------|---------------------------------------------------------|
| LC       | 機種                  | 1260 Infinity (Agilent Technologies)                    |
|          | カラム                 | HILIC-OH5、150×4.6 mm<br>(Agilent Technologies)          |
|          | カラム温度 (°C)          | 30                                                      |
|          | 注入量 (μL)            | 10                                                      |
|          | 移動相                 | A 液 : 5 mM 酢酸水溶液<br>B 液 : アセトニトリル                       |
|          | グラディエント条件 (%)       | B液: 95 (0~15分) → 5 (25~42分)<br>→ 95 (45~60分)            |
|          | 流量 (mL/分)           | 0.5                                                     |
| Q-TOF/MS | 機種                  | 6560 Ion Mobility Q-TOF<br>LC/MS (Agilent Technologies) |
|          | イオン化法               | ESI-                                                    |
|          | スキャン範囲 (m/z)        | 20~1100                                                 |
|          | 乾燥ガス (N2) 温度 (°C)   | 250                                                     |
|          | 乾燥ガス (N2) 流量 (L/分)  | 13                                                      |
|          | ネブライザーガス (N2) (psi) | 40                                                      |
|          | シースガス温度 (°C)        | 350                                                     |
|          | シースガス流量 (L/分)       | 12                                                      |
|          | キャピラリー電圧 (V)        | -3000                                                   |
|          | ノズル電圧 (V)           | 500                                                     |
|          | フラグメンター電圧 (V)       | 360                                                     |

## 2.7 分析方法

### 2.7.1 TCAAFP

10 mL 褐色のガラス容器に試料 4 mL と攪拌子を入れ、リン酸緩衝液を加え pH 7.0 (最終濃度 5 mM) とした。これに塩素濃度が 30 mg/L となるように少量の次亜塩素酸溶液を加え、20 秒間攪拌し、20°C の実験室内の暗所 24 時間反応させた。その後、塩化アンモニウム溶液を 50 mg/L になるように少量加え、遊離塩素を除去した。この試料をバイアル瓶に移し、分析に供した。HILIC カラムを用いた HPLC 分画では、試料を 2 mL にして分析を行った。培養液では、次亜塩素酸溶液を塩素濃度が 30 mg/L となるように加え、塩化アンモニウム溶液を 100 mg/L になるように少量加え遊離塩素を除去した。

TCAA の測定は、液体クロマトグラフータンデム質量分析計 (Liquid chromatography-

tandem mass spectrometry; LC-MS/MS) (4000 QTRAP; AB Sciex) を用いて行った(表 3)。TCAA の検量線範囲は、3、10、30、100、300  $\mu\text{g/L}$  の 6 段階とした。定量下限値は 3 $\mu\text{g/L}$  であった。

表 3 LC-MS/MS による TCAA 分析条件

|       |                                    |                                                                    |
|-------|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| LC    | 機種                                 | Prominence 20A(Shimadzu)                                           |
|       | カラム                                | VP-ODS 150 $\times$ 4.6 mm(Shimadzu)                               |
|       | カラム温度( $^{\circ}\text{C}$ )        | 50                                                                 |
|       | 注入量( $\mu\text{L}$ )               | 10                                                                 |
|       | 移動相                                | A 液 : 0.3% ギ酸、B 液 : メタノール                                          |
|       | グラディエント条件(%)                       | B液: 1(0 $\sim$ 0.5分) $\rightarrow$ 50(5分)<br>$\rightarrow$ 99(25分) |
|       | 流量( $\text{mL/分}$ )                | 0.3                                                                |
| 質量分析部 | 機種                                 | 4000 QTRAP(AB sciex)                                               |
|       | イオン化法                              | ESI-                                                               |
|       | イオンスプレー電圧(V)                       | -5500                                                              |
|       | ターボイオンスプレー温度( $^{\circ}\text{C}$ ) | 300                                                                |
|       | カーテンガス(psi)                        | 50                                                                 |
|       | ネブライザーガス(psi)                      | 80                                                                 |
|       | ヒーターガス圧(psi)                       | 50                                                                 |
|       | コリジョンガス(psi)                       | 6                                                                  |
|       | 多重反応モニタリング(MRM) (m/z)              | 160.8 $\rightarrow$ 116 (-35、-4、-16、-3) <sup>1</sup>               |

1) 括弧内の数値は DP (V)、EP (V)、CE (V)、CXP (V) の組み合わせ

## 2.7.2 TOC

TOC は TOC<sub>CSN</sub>(Shimadzu)を用いて測定した。測定方法は、試料からあらかじめ IC(無機炭素)を除去し、その後の TC(全炭素)を測定することで TOC 測定を行う NPOC 法(不揮発性有機体炭素法)を用いた。

## 3. 結果および考察

### 3.1 HPLC 分画による各画分の TCAA 生成能と TCAA 前駆物質の化学特性

濃縮液について、逆相カラムによる HPLC 分画の各画分の TCAAFP を、図 2 に示す。40 画分を収集したが、10 分までの 10 画分の TCAAFP の合計と分画前の 25 倍濃縮試料の TCAAFP(570  $\mu\text{g/L}$ )が一致したため、10 分までを対象とした。ブランクとして、TCAAFP 試験において次亜塩素酸溶液を加えなかった試料も用意し TCAA を測定したが検出されなかった。

1 $\sim$ 2 分の画分の TCAAFP は高い結果となった(440  $\mu\text{g/L}$ )。逆相カラムでは疎水性物質が保持され、親水性物質が溶出しやすい。また 10 分までの移動相の条件は、MQW が 100%であったことから、TCAA 前駆物質は非常に親水性が高いと推察された。1 $\sim$ 2 分の画分から LC-QTOF/MS を用いて TCAA 前駆物質に由来するマススペクトルの特定を試みたが、非常に多くのマススペクトルが確認され、対象とするピークを見つけることは非常に困難であった。そこで、1 $\sim$ 2 分の画分から TCAA 前駆物質の分離を目的として、HILIC カラムによる HPLC 分画を行った。

HILIC カラムを用いた HPLC 分画の各画分の TCAAFP を図 3 に示す。24 $\sim$ 26 分の連続した画分の TCAAFP が高いことがわかった。HILIC カラムでは、逆相カラムと違い、親水性物質が保持される。初めの 15 分間の移動相の条件はアセトニトリルの割合が 95%であるので、親水性

物質が固相に捕捉され、その後アセトニトリルの割合が低くなるにつれ、親水性物質が徐々に析出するものと考えられる。図3に示すように、24～26分の連続した2画分から前駆物質は溶出したがこれらの結果から、TCAA前駆物質は1つの物質ないしは、複数の物質であったとしても類似の物理化学的性質を持つ物質であると推察された。

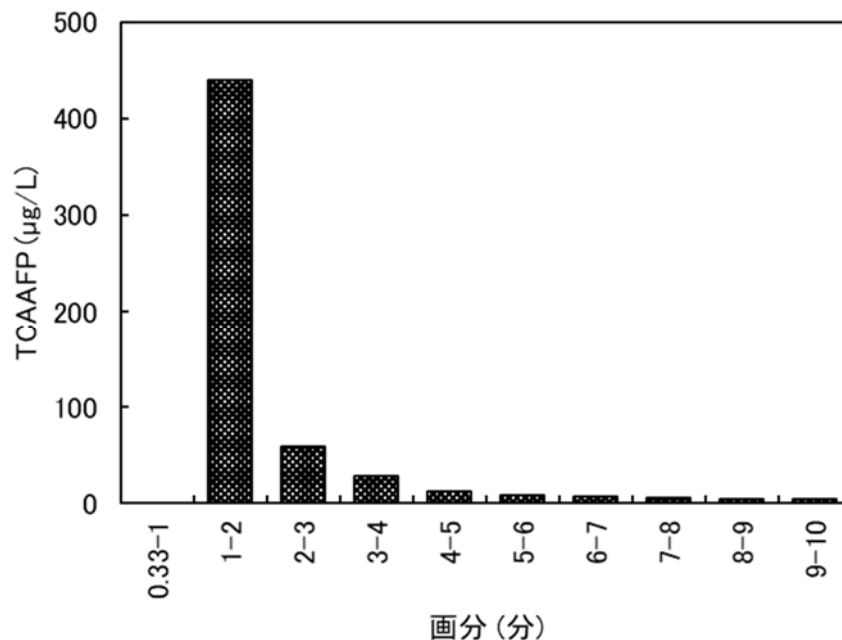


図2 逆相カラムによる HPLC 分画の各画分の TCAA-FP

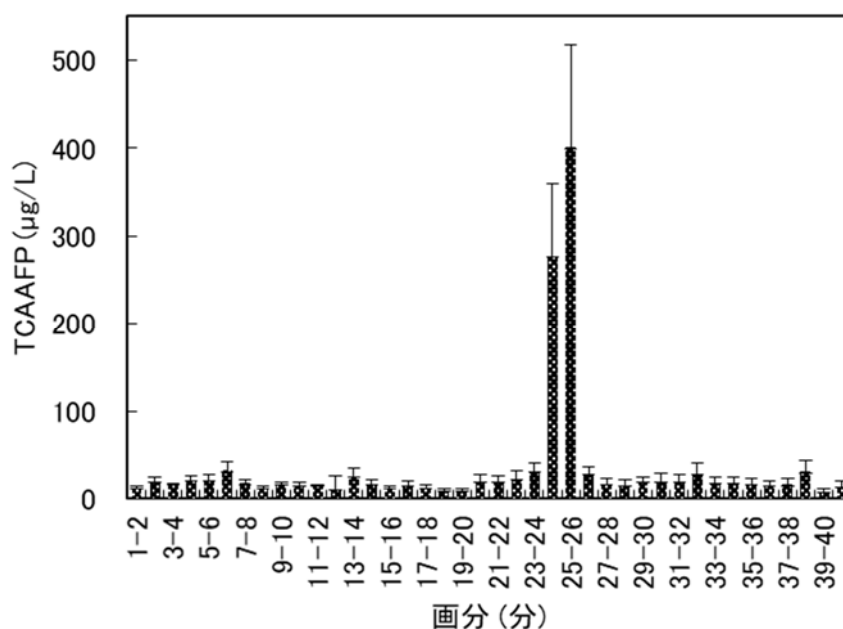


図3 HILIC カラムによる 1～2 分の画分(図2)の HPLC 分画の各画分の TCAA-FP

### 3.2 UV 吸光度

図3と同一の分析条件における、波長 254 nm における UV のクロマトグラムを図4に示す。

図3の結果と同様に、UVのクロマトグラムでも24～26分において高い値を示した。この結果から、TCAAFPが高い画分中には芳香環を持つ物質が含まれると考えられた。

また、図5に25～26分画分の塩素処理前後の波長254 nmにおけるUV測定結果を示す。塩素処理後に、25～26分における波長254 nmに対する吸光度が減少したことが確認できた。塩素処理前試料の25～26分における画分を再度収集し、TCAAFPを測定したところ生成能は十分に確認された(196 µg/L)。従って、波長254 nmの吸光度の減少は、TCAA前駆物質に起因すると考えられた。

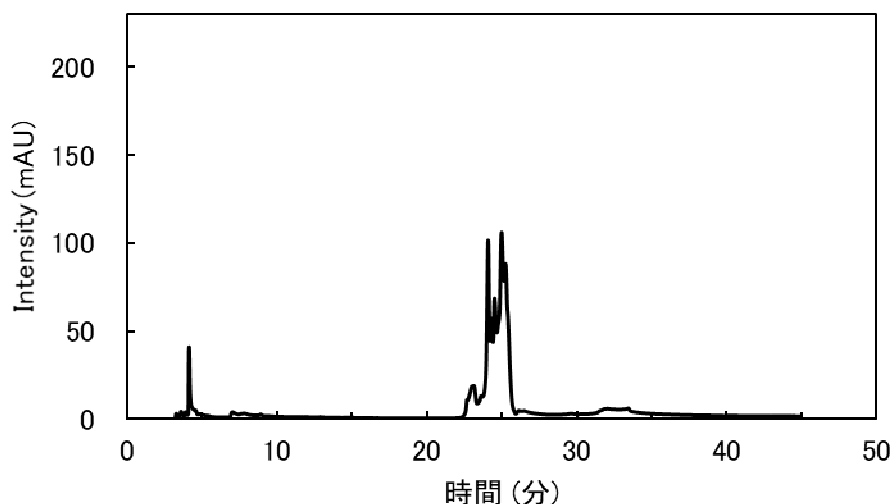


図4 逆相カラムによるHPLC分画の1～2分の画分(図2)の波長254 nmにおけるUVクロマトグラム

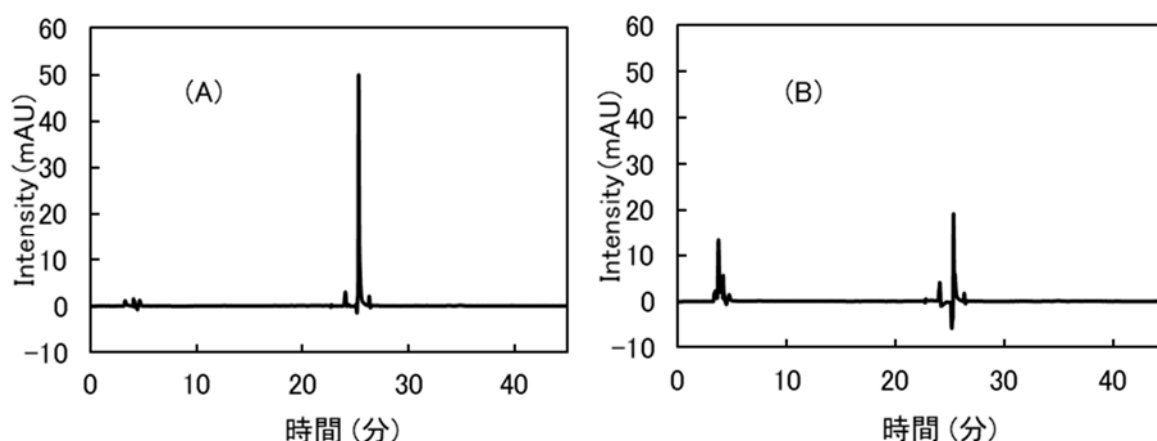


図5 25～26分画分の塩素処理(A)前(B)後の波長254 nmにおけるUV吸光度測定結果

### 3.3 固相通水前後のTCAA生成能

図6に固相通水前後の試料のTCAAFPを示す。カートリッジ通水前の試料のTCAAFPについて、MCXの方がMAXの場合に比べて低い、これは水酸化ナトリウム水溶液の添加によって試料が希釈されたことによる。

MAXの場合、通水前のTCAAFPは127 µg/L、通水後は5.7 µg/Lであり、固相への通水によってTCAAFPが大きく減少した。MAXは逆相強陰イオン交換ポリマーで、酸性化合物(–COOH等)

に対する選択性がある<sup>3)</sup>。従って、TCAA 前駆物質はカルボキシル基などの官能基を持つことが推察された。一方、MCX の場合、固相への通水前後ではあまり変化がなかった。MCX は逆相強陽イオン交換ポリマーで、塩基性化合物 ( $-\text{NH}_2$  等) に対する選択性がある<sup>3)</sup> ので、TCAA 前駆物質はアミノ基などの官能基を持つ塩基性物質でないと推定された。

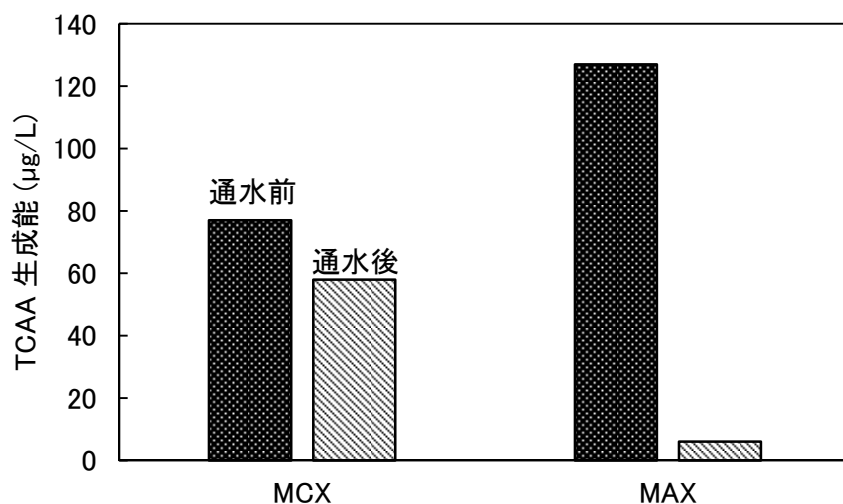


図 6 固相通水前後の TCAAFP

### 3.4 LC-QTOF/MS による解析

図 5 および図 6 の結果より、TCAA 前駆物質は芳香族化合物であり、カルボキシル基を持つことが推定された。先行研究より、TCAAFP が高い物質はフェノール類もしくは芳香族アミン類であることが報告されている<sup>4,5)</sup>。MCX への通水前後で TCAAFP が変わらなかったことから、ラフィド藻類に由来する TCAA 前駆物質は芳香族アミン類ではなく、フェノール類かつカルボキシル基を有している物質であると考察された。フェノール類の測定は Negative モードで測定できるため<sup>6)</sup>、LC-Q-TOF/MS による測定は Negative モードで行うことに決定した。

図 7 および図 8 に、HILIC カラムを用いた HPLC 分画において、TCAAFP が高かった 25～26 分画分の塩素処理前後の試料を LC-Q-TOF/MS で測定した結果を示す。塩素処理前後のクロマトグラムを比べると、塩素処理後に 23 分あたりのピークの減少が確認された。このとき、波長 254 nm における紫外吸光度測定の結果 (図 5) と比べると、ピークの減少が観察された時間が早かった。LC-Q-TOF/MS による測定では、注入量は 10 μL であり UV 吸光度測定時の注入量 50 μL よりも少なかったため、保持時間が早くなったと考えられた。

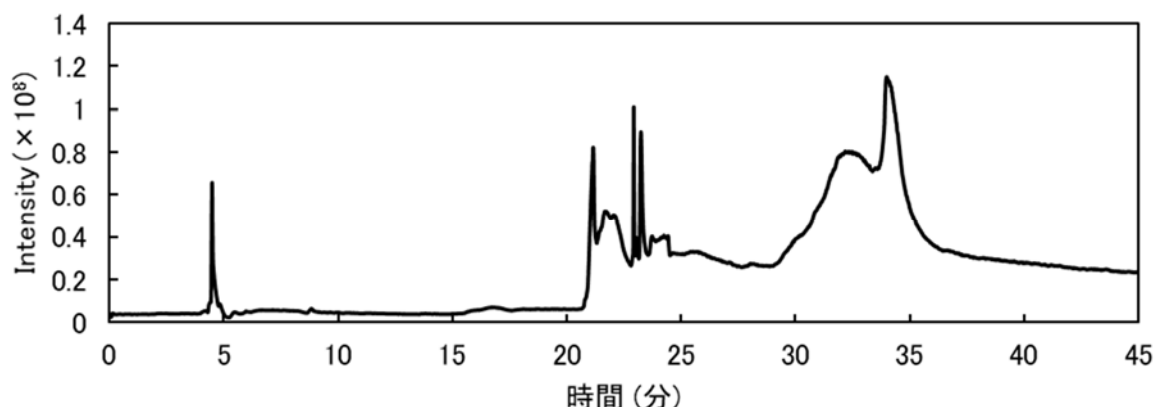


図 7 25～26 分の画分の塩素処理前の LC-QTOF/MS による測定結果

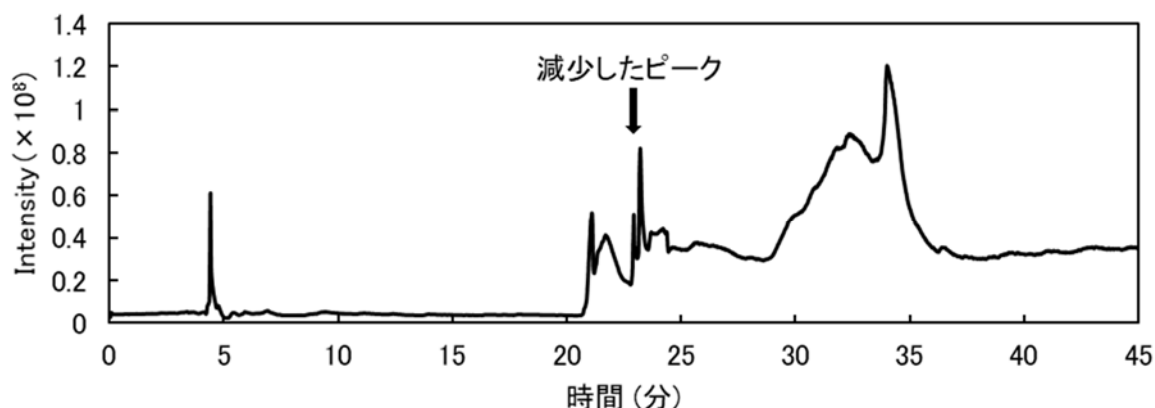


図 8 25～26 分の画分の塩素処理後の LC-QTOF/MS による測定結果

図 9 および図 10 に、それぞれピークの減少が確認された区間(22.8～23.0 分)におけるダム湖水の塩素処理前後のマススペクトルを示す。塩素処理によって、いくつかのピークが減少していることが分かる。小さい方から列挙すると、 $m/z$  196.90、208.94、238.98、244.98、288.98、338.98、438.97、448.96、538.96、588.96、602.64、638.96、674.16、688.96、738.95、778.95、788.94 と多くのピークが該当した。 $m/z$  288.98、338.98、388.97、438.97、448.96 は  $m/z$  49.99 ずつ異なったが、同じピークの形状から同じ構造に由来する化学物質であると推察された。 $m/z$  288.98 のピークについて分子式の推定を行ったところ、その候補として  $C_6H_3F_6N_4O_4P$  が推定された。 $-CF_2-$ の構造を持つ物質のマススペクトルは  $m/z$  49.99 と上述した  $m/z$  49.99 ずつ異なる物質と一致した。このため、この物質はフェノール類ではないと考えられた。すなわち、この分子式を持つ物質は TCAA 前駆物質ではないと推察された。

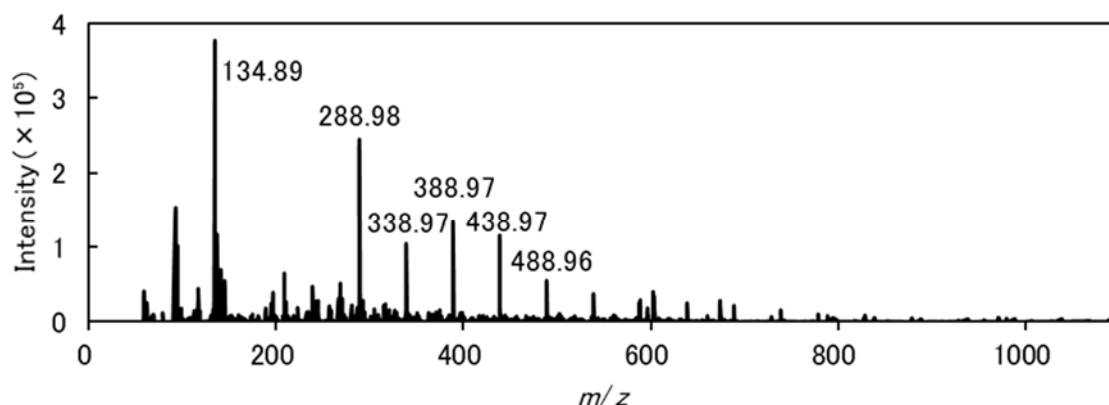


図 9 25～26 分の画分の塩素処理前の LC-QTOF/MS のマススペクトル (22.8～23.0 分)

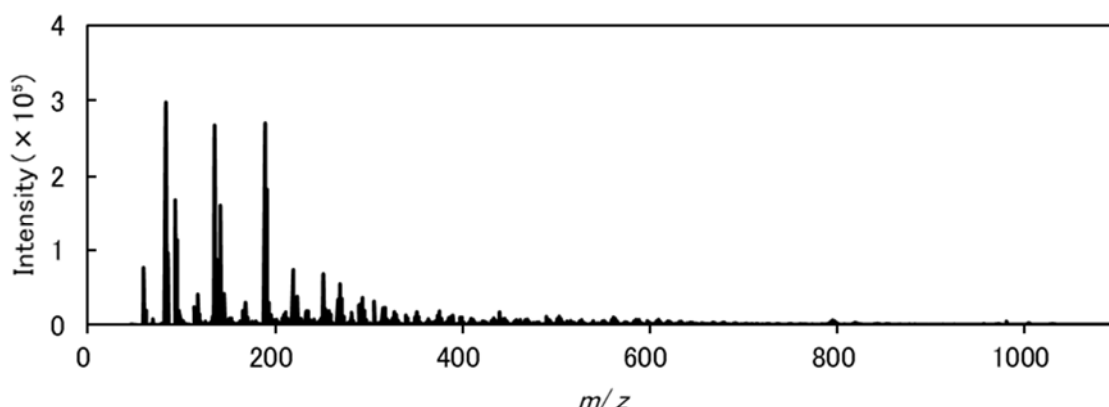


図 10 25～26 分の画分の塩素処理後の LC-QTOF/MS のマススペクトル (22.8～23.0 分)

#### 4. まとめ

ラフィド藻類に由来する TCAA 前駆物質は親水性であり、連続した画分の TCAAFP が高かったことから、前駆物質は一つの物質もしくは類似の物理化学的性質や化学構造を持った物質であると推察された。また、2 種類のカートリッジによる固相抽出と TCAAFP 試験前後の波長 254 nm における UV に吸光度の変化により、TCAA 前駆物質はフェノール類でありカルボキシル基等を持つことを示唆した。この結果をもとに、Negative モードで LC-Q-TOF/MS 測定を行った。いくつかピークが確認されたが、分子式の推定までには至らなかった。

#### 5. 今後の課題

本研究では、ラフィド藻類に由来する TCAA 前駆物質を特定するまでに至らなかった。原因として考えることは、試料の精製が不十分であること、LC-QTOF/MS による分析において測定条件が不適切であったことなどが挙げられる。今後は、これらの改善を行う予定である。

TCAA 前駆物質を特定した後は、特定した前駆物質について、水環境中での存在実態、TCAA の生成特性、処理性などの検討を行う予定である。

#### 6. 参考文献

1) 倉田彰弘、前田年宏、桐山秀樹、沼田孝、松本英俊：奈良県櫻井浄水場における消毒副生成物の水質管理、平成 29 年度全国会議（水道研究発表会）、734-735、2017。

- 2) 横井貴大、萩野賢治、細田耕、船岡英彰、小倉明生：ラフィド藻類がハロ酢酸濃度に与える影響評価、平成30年度全国会議（水道研究発表会）、732-733、2018.
- 3) Waters: Oasis サンプル前処理製品、[https://www.waters.com/waters/ja\\_JP/Waters-Oasis-Sample-Extraction-SPE-Products/nav.htm?locale=ja\\_JP&cid=513209](https://www.waters.com/waters/ja_JP/Waters-Oasis-Sample-Extraction-SPE-Products/nav.htm?locale=ja_JP&cid=513209)(2019年2月閲覧).
- 4) 越後信哉、矢野雄一、徐育子、伊藤禎彦：溶存有機物を構成する化学構造からのハロ酢酸生成特性、環境工学研究論文集、Vol.44, pp.265-273、2007.
- 5) He, K., Okuta, E., Cordero, J. A., Echigo, S., Asada, Y. and Itoh, S.: Formation of chlorinated haloacetic acids by chlorination of low molecular weight compounds listed on pollutant release and transfer registers (PRTRs), Journal of Hazardous Materials, Vol.351, pp.98-107, 2018.
- 6) Seraglio, S. K. T., Valese, A. C., Daguer, H., Bergamo, G., Azevedo, M. S., Gonzaga, L. V., Fett, R. and Costa, A. C. O.: Development and validation of a LC-ESI-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in honeydew honeys with the diluted-and-shoot approach, Food Research International, Vol.87, pp.60-67, 2016.