

厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業)
「大規模災害および気候変動に伴う利水障害に対応した環境調和型
水道システムの構築に関する研究」
分担研究報告書

研究課題：高分解能質量分析計を用いた水道水生ぐさ臭臭気原因物質の探索

| | | |
|-------|------|-------------------------|
| 研究代表者 | 秋葉道宏 | 国立保健医療科学院 統括研究官 |
| 研究分担者 | 高梨啓和 | 鹿児島大学大学院理工学研究科 准教授 |
| 研究分担者 | 岸田直裕 | 国立保健医療科学院生活環境研究部 主任研究官 |
| 研究協力者 | 小倉明生 | 京都市上下水道局水質管理センター 担当課長補佐 |

研究要旨

水道水の異臭味障害の中で2番目の発生頻度となっている生ぐさ臭については、その臭気原因物質が十分に明らかとなっているとは言い難い。このため、浄水現場では、機器分析ではなく官能試験によって水質管理が行われている。そこで本研究では、水道水生ぐさ臭の臭気原因物質を同定することにより、現在の官能試験による水質管理に代えて、機器分析による水質管理に道を開くことを目的とした。

臭気原因物質は、予想される物理化学的性質から GC/MS による分析が適していると考えられるが、未知物質の構造推定には、ソフトなイオン化である electrospray ionization、および、構造推定に有効な linear ion trap を備えた高分解能・高質量精度 LC/MS が適しているため、LC/MS で被検物質を測定できるようにするための誘導体化処理方法を検討し、これを確立した。確立に際し、臭気物質の一般的な構造に鑑み、臭気原因物質を、アミン類、アルコール類、チオール類およびカルボニル化合物と仮定した。確立した方法を用いて、生ぐさ臭の原因生物である黄色鞭毛藻綱 *Uroglena americana* が発生した際に採取した表流水および水道原水の誘導体化処理を行い、高分解能・高質量精度 LC/MS を用いて生ぐさ臭原因物質を探索した。探索の結果、原因物質の候補物質として6個を発見した。

A. 研究目的

水道水の異臭味障害の中で2番目の発生頻度となっている生ぐさ臭¹⁾については、原因物質として 1-heptanal、(2E,4E)-heptadienal、(2E,4Z)-heptadienal、(2E,4Z)-decadienal、(2E,4E,7Z)-decatrienal²⁾が指摘されている。しかし、浄水現場では、これらの物質からは生ぐさ臭とは異なる臭気を感じるとの意見があり、他に原因物質が存在する可能性がある。このように、十分な知見が集積されていないことなどから、生ぐさ臭については、水道法において、物質の濃度ではなく臭気強度で項目化されている。生ぐさ臭の臭気原因物質(以下、原因物質)が明らかになれば、詳細な実態調査、物性値に基づいた効率的な浄水処理技術の開発などに繋がる可能性があり、有益である。

以上のように、原因物質の同定は意義深い、環境中の微量有機物の同定には困難を伴う。未知有機物の同定は、一般的に、フーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR) による官能基推定、核磁気共鳴

装置 (NMR) による構造解析、質量分析 (MS) による分子量測定などにより行われる。しかし、FTIR や NMR での測定を行うためには、夾雑物を除去したサンプルが数百 μg 程度必要になる。揮発性物質と考えられる原因物質を、精製した上で数百 μg 程度得ることは困難と予想される。

そこで本研究では、近年の質量分析の進歩を活用し、高分解能・高質量精度の LC/MS を用いて原因物質の構造を推定することとした。推定された構造の物質を合成できれば、原因物質の同定が可能である。

臭気原因物質は、予想される物理化学的性質から、GC/MS による分析が適していると考えられる。しかし、未知物質の構造推定には分子量関連イオンの検出確率が高いソフトなイオン化である Electrospray Ionization (ESI) を備え、構造推定に有効な linear ion trap を備えた高分解能・高質量精度 LC/MS が適している。このため、LC/MS で被検物質を測定するために必要な誘導体化処理方法を検討

し、これを確立した。確立に際し、臭気物質の一般的な構造に鑑み³⁾、臭気原因物質を、アミン類、アルコール類、チオール類およびカルボニル化合物と仮定した。確立した方法を用いて、生ぐさ臭の原因生物である黄色鞭毛藻綱 *Uroglena americana* (ウログレナ) が発生した際に採取した表流水および水道原水の誘導体化処理を行い、高分解能・高質量精度 LC/MS を用いて原因物質を探索した。

B. 研究方法

1. 試薬

原因物質のモデル物質として、hexyl alcohol (和光純薬工業、大阪)、1-butanethiol (東京化成工業、東京)、(2E,4E)-heptadienal、4-methyl-2-pentanone (関東化学、東京)、propionic acid (和光純薬工業、大阪) を用いた。

京都市上下水道局蹴上浄水場第 2 取水口で、2015 年 12 月 3 日 11:00 (以下、試料水①) と 12 月 17 日 11:00 (以下、試料水②) に採水した水を試料水として用いた。採水は、ガロン瓶の口いっぱいまで行い、速やかに試験に供した。

2. ダンシルクロリドを用いた誘導体化処理方法の確立

水酸化ナトリウムで pH を 10.5 に調整した炭酸水素ナトリウム水溶液にサンプルとダンシルクロリド (以下、DNS-Cl) のアセトン溶液を加え、60°C の恒温振盪器を用いて遮光下で振盪した。その後、トルエンを加えて 10 分間振盪、10 分間放置し、分相させた。分相したトルエン相を別容器に移し、純水を加えて 10 分間振盪、10 分間放置し、再度分相させた。この操作を 2 回繰り返した。トルエン相を採取し、ロータリーエバポレーターを用いて 100°C でトルエンを留去し、乾固物をアセトニトリルで溶解した。その後、アセトニトリル耐性を有する 0.22 μm メンブレンフィルターでろ過した。

3. 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンをを用いた誘導体化処理方法の確立

3.1 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンのジクロロメタン溶液の調製

ジクロロメタンに 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (以下、DNPH) および濃硫酸を混合し、90 分間反応させた。分相した硫酸相を除去し、純水を加えて 10 分間振盪、10 分間放置し、分相させた。

この操作を 2 回繰り返した。その後、ジクロロメタン相を別容器に移した。

3.2 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン誘導体化方法

3.1 で調製した DNPH ジクロロメタン溶液に無水硫酸ナトリウム、サンプルを加え、5 分間振盪した。その後、混合溶液をナス型フラスコに一定量移し、ロータリーエバポレーターを用いて 30°C でジクロロメタンを留去した。乾固物をアセトニトリルで溶解し、アセトニトリル耐性を有する 0.22 μm メンブレンフィルターでろ過した。

4. 試料水中の生ぐさ臭気原因物質の回収

採取した水道原水にウログレナが浮遊していたため、スポイトを用いてウログレナを採取し、共栓付き容器に移した。この容器を 60°C の湯浴に入れて 1 時間静置した後、容器内のウログレナ含有水を自然ろ過した。また、ウログレナを採取した残りの水道原水も同様に自然ろ過した。これら 2 つのサンプルを、タンデム接続した 2 種類の固相抽出カラム (日本 Waters 製 Sep-Pak Plus PS-2 および Sep-Pak Plus AC-2) に上向流、流量 20 mL/min で通水して原因物質を吸着した。試料水の通水後にカラム内を純水で洗浄し、アセトニトリルとジクロロメタンでカラム吸着物を脱離した。このとき、上向流、流速 0.5 mL/min、バックフラッシュ法で脱離を行い、3 分間の soak time を設けた。

5. 高分解能・高質量精度 LC/MS を用いた生ぐさ臭気原因物質の測定

回収された原因物質および誘導体化された原因物質は、L-column 2 ODS (2.1 x 75 mm、2 μm、化学物質評価研究機構、東京) を備えた高分解能・高質量精度 LC/MS (UltiMate 3400SD-LTQ Orbitrap XL、Thermo Fisher Scientific、MA、USA) を用いて測定された。分離カラムの温度は 40°C、インジェクションボリュームは 1 μL とした。イオン源として ESI を用いて、ポジティブイオンモードとネガティブイオンモードの両モードで測定した。ポジティブイオンモードの測定における移動相 A は 0.05 v/v% のギ酸を含む水、移動相 B は 0.05 v/v% のギ酸を含むアセトニトリルとした。Binary program は、B%=10 (0-0.5 min)、100 (13-17 min) とした。流速は、両モードにおいて 0.5 mL/min とした。ネガティブイオンモードの測定における移動相 A は 1 mM 酢酸と 1 mM 酢酸アンモニウムを含む水、移動相 B は 1 mM 酢酸、1 mM 酢酸アンモ

ニウムおよび水を5 v/v%含むアセトニトリルとした。Binary programは、B%=30 (0-0.5 min)、100 (13-17 min)とした。イオン源における spray voltageは2.5 kV、vaporizer tempは400°C、capillary tempは380°C、sheath gas flow rateは60 arb.、auxiliary gas flow rateは20 arb.、sweep gas flow rateは0 arb.とした。質量分解能を最低の7,500 FWHMに設定して、クロマトグラムピークのデータポイント数が多く得られるようにした。

得られたデータの解析は、LC/MS データ統合解析ソフト (Progenesis QI、Nonlinear Dynamics、Newcastle upon Tyne、UK) を用いて、サンプルの測定に先だって測定されたブランクサンプルの測定結果との差異解析によって行われた。

C. 結果及び考察

1. 誘導体化処理方法の確立

本研究で仮定した原因物質であるアミン類、アルコール類、チオール類およびカルボニル化合物の多くは、ESI でイオン化可能な物質が多いと予想される。しかし、アルコール類、チオール類およびカルボニル化合物については、分子量が小さい場合などにはイオン化効率が低下すると予想される。そこで、モデル化合物として hexyl alcohol、1-butanethiol、(2E,4E)-heptadienal、4-methyl-2-pentanone および propionic acid に着目し、DNS-Cl または DNPH を用いて誘導体化した。誘導体化物が得られたか否かの確認は、MS を用いて行った。

また、誘導体化の際に用いた酸、不揮発性の塩、誘導体化試薬がサンプル中に残存していると、LC/MS で測定した際に LC/MS の腐食や検出器の過剰なエッチングが起こる。このため、固相抽出脱離、液液抽出、結晶化によりこれらの不要成分を除去する方法を検討した。その結果、ESI キャピラリーチューブやイオントランスファーチューブ付近における不揮発性物質と思われる物質の堆積、金属の腐食は認められなかった。また、誘導体化試薬やその加水分解物のピークが認められたが、検出器の過度なエッチングが起きる信号強度ではなかった。これらのことから、不要成分の除去に成功したと判断した。

次に、モデル物質誘導体化物の精密質量を測定した結果、いずれのモデル物質についても、図1および2に示すように、想定される誘導体化物の分子式の精密質量および天然同位体パターンの

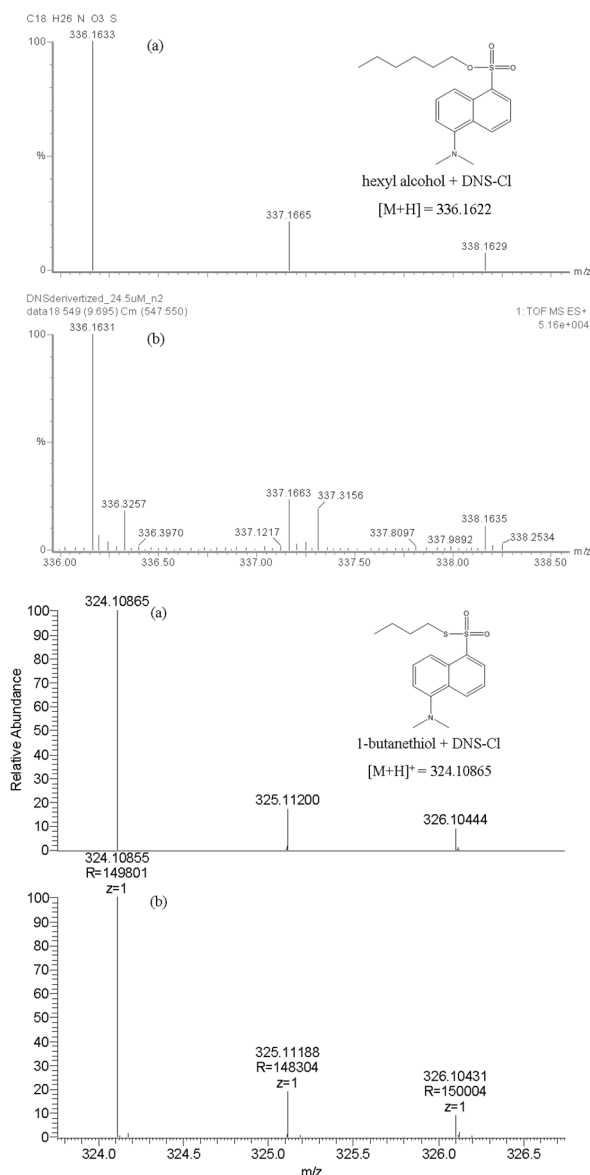


図1 ダンシルクロリドによるモデル物質の誘導体化(a: シミュレーション結果、b: 実測結果)

シミュレーション結果と実測結果が一致した。

以上より、検討したすべてのモデル物質の誘導体化および LC/MS を用いた検出に成功した。

2. 高分解能・高質量精度 LC/MS を用いた生ぐさ臭臭気原因物質の測定

モデル物質の誘導体化、LC/MS による検出に成功したため、実サンプルの誘導体化処理を実施し、得られた誘導体化サンプルを LC/MS で分析した。希釈した実サンプルを用いた予備測定において、界面活性剤と考えられる高強度ピークが観察されたため、一部のカラム保持時間の測定において移動相の MS への供給を停止した。また、誘導体化処理を施さないサンプルについても同様に測定した。さらに、純水を用いて一連の濃縮・誘導体化処理を実施したサンプル (ブランクサンプル)

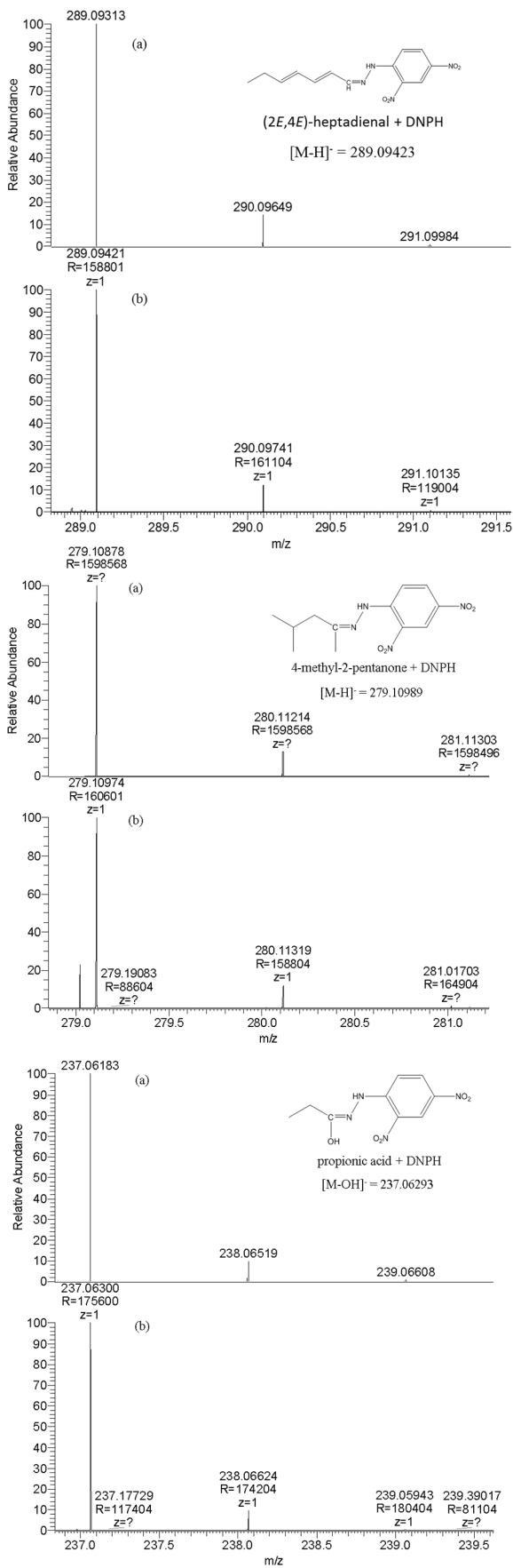


図2 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンによるモデル物質の誘導体化(a: シミュレーション結果、b:実測結果)

を調製し、LC/MS を用いて同様に測定した。測定結果の例として、DNS-Cl で誘導体化したブランクサンプルと、水道原水を DNS-Cl で誘導体化したサンプルの測定結果を図3に示す。図3に例を示したように、サンプル固有なピークを目視で探索することは困難であったが、サンプルのピークボリュームがブランクサンプルのピークボリュームの2倍以上であったピークをサンプル固有のピークとして差異解析を実施したところ、positive ion mode における測定で 210 個、negative ion mode における測定で 298 個のサンプル固有なピークを発見した。さらに、ピークボリュームの比が 10 倍以上となるピークを探索したところ、図4に示すように、両イオン化モードでそれぞれ 3 個（合計 6 個）のサンプル固有なピークを発見した。

E. 結論

水道水生ぐさ臭臭気原因物質の探索を実施した。臭気物質の一般的な構造に鑑み、生ぐさ臭臭気原因物質をアミン類、アルコール類、チオール類およびカルボニル化合物と仮定し、LC/MS で検出するための誘導体化処理方法を確立した。確立した方法を用いて、黄色鞭毛藻綱 *Uroglena americana* が発生した際に採取した湖沼水および水道原水から回収された物質の誘導体化処理を実施し、LC/MS で生ぐさ臭臭気原因物質を探索した結果、検出されたピークボリュームが大きい物質として 6 物質を発見した。

今後は、多変量解析を用いて、サンプルの TON と各物質のピークボリュームとの相関関係を検討し、水道水生ぐさ臭原因物質のピークを精査し、精査されたピークの構造推定を実施する予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1) 論文発表

該当なし

2) 学会発表

該当なし

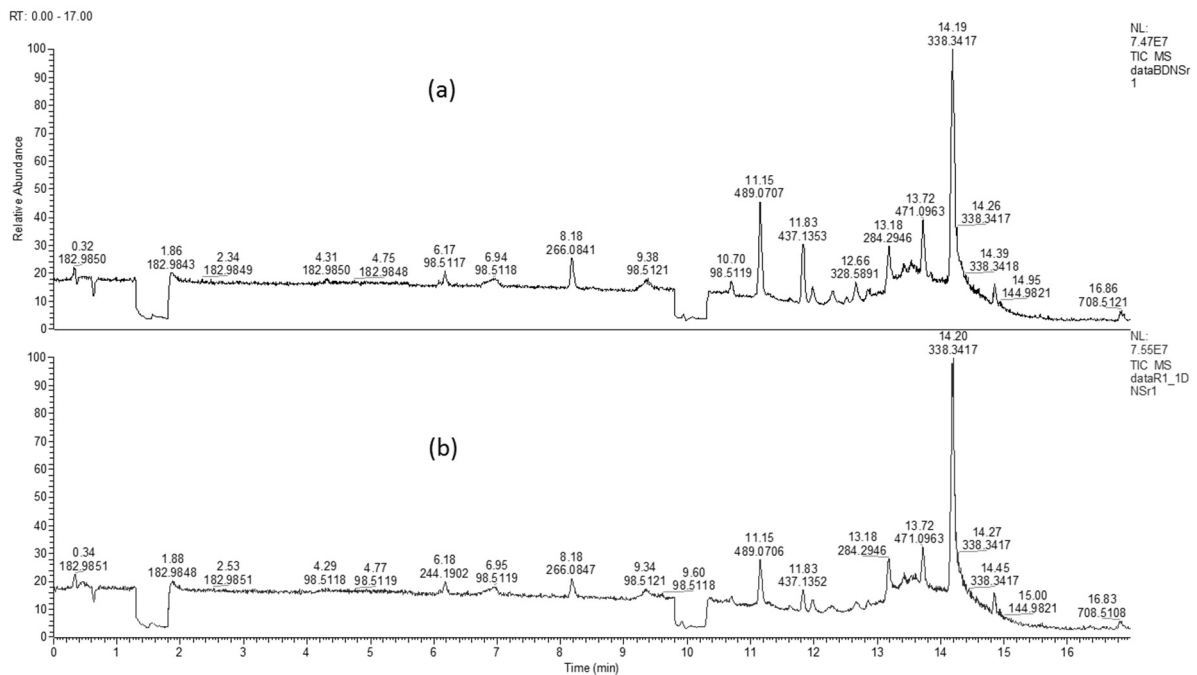


図3 LC/MSによる測定結果の例(a: ブランクサンプルのTIC、b: 水道原水サンプルのTIC)

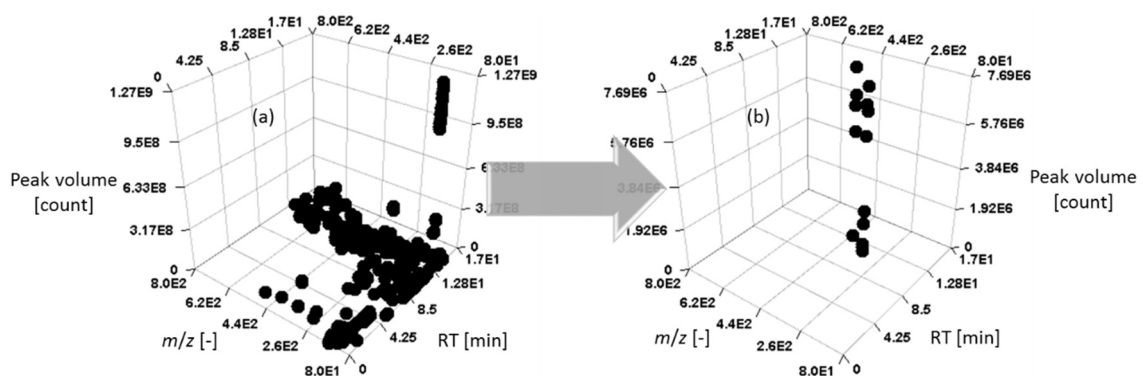


図4 検出された全イオンからサンプル固有イオンの抽出結果(a: 全イオン、b: サンプル固有イオン)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)

1) 特許取得

該当なし

2) 実用新案登録

該当なし

3) その他

該当なし

I. 謝辞

本研究を実施するにあたり、京都市上下水道局水質管理センター水質第1課の職員より、試料水採取などで協力を受けた。ここに記して謝意を表す。

J. 参考文献

- 1) 秋葉道宏、岸田直裕、下ヶ橋雅樹 (2014) 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業)水道システムにおける生物障害の実態把握とその低減対策に関する研究 平成 25 年度総括・分担研究報告書.
- 2) Watson S.B., Satchwill T., Dixon E., McCauley E. (2001) Under-ice blooms and source-water odour in a nutrient-poor reservoir: biological, ecological and applied perspectives, *Freshwater Biology*, **46**, 1553-1567.
- 3) 特許庁 (2007) 標準技術集-香料(https://www.jpo.go.jp/shiryousonota/hyoujun_gijutsu/kouryou/2-3-2.pdf#1) (2016年2月時点) .