

高分解能質量分析計を用いた
臭気原因物質の探索

研究代表者	秋葉 道宏
研究分担者	高梨 啓和
研究分担者	下ヶ橋雅樹
研究協力者	小倉 明生
研究協力者	北村 壽朗

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)
分担研究報告書

「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」

研究課題：高分解能質量分析計を用いた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	鹿児島大学学術研究院理工学域工学系 准教授
研究分担者	下ヶ橋雅樹	国立保健医療科学院生活環境研究部 上席主任研究官
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
研究協力者	北村壽朗	神奈川県企業庁水道水質センター 所長

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。このため本年度は、昨年度までの LC/MS による検討に代えて、におい嗅ぎシステムを装備した GC に高分解能質量分析を接続した GC/MS による検討を実施した。生ぐさ臭の原因生物であるウログレナが発生した際に採取した水道原水と、ウログレナの培養液を分析した。両者は、水源が異なる浄水場関連施設から採取した試料だが、共通する臭気成分が3成分発見された。

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、原因物質の構造を推定することとした。合成などにより、推定された構造の物質を入手できれば、原因物質の同定が可能である。

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 LC/MS が適している。このため、LC/MS で被検物質(分析種)を測定するに必要な誘導体化処理方法を一昨年度検討し、これを確立した。さらに、昨年度は、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水道原水を対象に分析

を行った。また、これらとは水源が異なる浄水場関連施設から、生ぐさ臭の原因生物であるウログレナを培養した培養液の提供を受け、同様の分析を行った。その結果、これらのサンプルに共通し、臭気強度およびウログレナ細胞数と相関関係が認められる物質を1物質発見し、その分子式を推定した。

しかし、その相関関係は外れ値 (outlier) の影響を受けており、十分な信頼性を担保できていない。適度な強度の生ぐさ臭が発生した際のサンプルを採取できない限り解決できない問題なので、異なるアプローチが必要と考えた。

そこで本年度は、そのアプローチとして、におい嗅ぎシステムを装備した GC に高分解能質量分析を接続した GC/MS による検討を行った。

B. 研究方法

1. 試料水

京都市上下水道局蹴上浄水場取水池で、2017年12月6日から12月25日までに採水した3検体を水道原水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。また、神奈川県宮ヶ瀬ダム放流水から採取したウログレナを、表1に示すUr-1培地を用いて、表2に示す条件で培養した。培養の結果、ウログレナの細胞数は14,000個/mLとなった。その培養液を培養試料液として用いた。また、ウログレナを植種していない培地をコントロールサンプルとして用いた。

2. 試料水の濃縮

水道原水試料水中に存在する溶存酸素を除去するために、試料水3.7Lに対して1.75M亜硫酸ナトリウム水溶液を1mL添加し、ゆっくりと攪拌した。その後、ウログレナの細胞内に蓄積されている原因物質を細胞外に放出させるために、密閉した容器内で30分間60°Cに加熱した。培養試料液は、約1.75Mになるよう亜硫酸ナトリウムを添加して攪拌した後、密閉した容器内30分間60°Cに加熱した。室温になるまで放冷した後、ポリプロピレン製ハウジングのホウケイ酸ガラス製マイクロファイバーフィルター (Millex-AP50, Merck Millipore, Germany) を用いて加圧ろ過を行った。

表1 Ur-1培地の組成

MgSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	10 mg
KCl	1 mg
NH ₄ NO ₃	5 mg
β-グリセロリン酸ナトリウム·5H ₂ O	4 mg
Fe-EDTA	0.5 mg
ビタミンB ₁	10 μg
ビタミンB ₁₂	0.1 μg
ビオチン	0.1 μg
PIV金属混液	1 mL
精製水	999 mL
pH	7.5

表2 *Uroglena americana* の培養条件

項目	条件
温度 [°C]	15
光強度 [μmol/(m ² s)]	39
明暗条件	12時間明/12時間暗
培養期間	2016/7/1~2016/7/29

ろ過された試料水は、直列に連結された2種類の固相吸着カートリッジ (Sep-Pak PS-2 および AC-2、日本ウォーターズ、東京) にインラインで通水され (20 mL/min)、疎水性相互作用により試料水中の原因物質を吸着した。なお、固相吸着カートリッジは、使用前に、アセトニトリおよび超純水を用いて洗浄・コンディショニングを実施した。原因物質を吸着した後、4 mLのアセトニトリを用いて原因物質を脱離した。脱離は、バックフラッシュで行い、流速を0.5 mL/minとした。脱離の途中で、3 minのsoak timeを設けた。また、コントロールサンプルに加え、純水を用いて一連の操作を実施したブランクサンプルを調製した。水道原水試料水の濃縮倍率は1,333倍、培養液は222倍とした。

3. GC-O-APCI-TOFMS

におい嗅ぎシステムを装備した GC に高分解能質量分析を接続した GC/MS は、GC 部に 7890B (Agilent Technology, CA, USA)、におい嗅ぎ部にスニッフィングポート OP275L (ジーエルサイエンス、東京)、APCI-TOFMS に Synapt G2 Si HDMS (Waters, MA, USA) をそれぞれ用いた。システムの模式図を図1に、APCIのイオン化反応を図2に示す。図1に示したように、GCカラムで分離された臭気物質がにおい嗅ぎポートに到達するのに必要な時間と MS に到達するのに必要な時間が

異なるため、予め標準物質を用いて補正した。図2に示したように、水分子を介さないイオン化と介したイオン化を行えるので、両方のイオン化を試みた。

GCカラムには、Inertcap 5 (ジーエルサイエンス、15 m×0.53 mm)、キャリアガスにはHeを用いた。昇温プログラムは、40 °C (0-1 min), 10 °C/min to 260°C (1-23 min), 260 °C (23-30 min)とした。その他の測定条件を表3に示す。

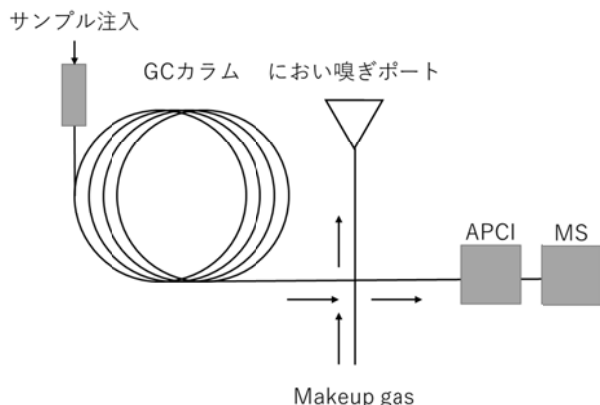
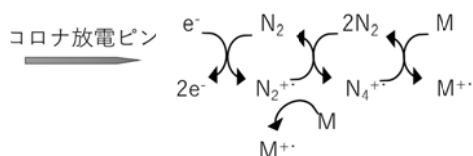


図1 GC-0-APCI-TOFMS のシステム模式図

Dry条件(イオン化室に水分子がない条件)



Wet条件(イオン化室に水分子がある条件)

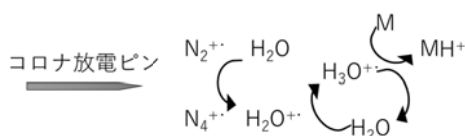


図2 APCI のイオン化機構

表3 GC/MS の測定条件

Carrier Gas flow	8.0 mL/min, (60.6 cm/sec)
Front Inlet Temp.	230□
Aux. Temp.	270□
Injection Volume	2 μL
MS Mode	Resolution Mode
Polarity	Positive Ion Mode
Corona	1.0 μA
Sampling Cone	40
Source Offset	80
Source Temp.	150□
Cone Gas Flow	230 L/h
Aux. Gas Flow	200 L/h

C. 結果及び考察

1. GC-0 を用いた臭気物質の分離

水道原水濃縮サンプル (3 サンプル)、およびウログレナ培養液濃縮サンプル (1 サンプル) を分析した結果、表4に示す結果が得られた。

表4 におい嗅ぎシステム付き GC での分析結果

RT (min)	ウログレナ 培養液	水道原水1 (TON 43)	水道原水2 (TON 23)	水道原水3 (TON 18)
	臭気種類			
7.2	米	米	米	米
8.7	昆布だし			
10.4		アンモニア	アンモニア	
11.2		カレールー	カレールー	
12.1	ベニヤ板		ベニヤ板	ベニヤ板
13.7	植物葉	植物葉		
14.3		牛革	牛革	
15.3		果物		果物
17.2	牛乳	牛乳	牛乳	

RT: カラム保持時間

水道原水は、臭気強度が強くなるほど測定者が感じ取った臭気物質の数が多くなった。このため、臭気強度が最も強かった水道原水1の測定結果に着目した。水道原水1の測定結果とウログレナ培養液の測定結果を比較し、両者で共通する臭気種類を抽出すると、測定者が「米」、「植物葉」および「牛乳」と表現する臭気物質が共通していることが分かる。これらの表現は生ぐさ臭と異なる表現であるが、臭気成分は濃度によって感じ方が異なることがあるため、これらの臭気物質に着目してさらに検討することとした。さらに、生ぐさ臭がする水道原水は、条件によっては昆布だしに似たにおいがするとの意見があるため、水道原水からは検出されなかったがウログレナ培養液から

検出された RT=8.7 min の臭気物質で、「昆布だし」と表現される物質にも着目して検討することにした。

2. GC-O-APCI-TOFMS による臭気成分の検討

このため、APCI のイオン化の条件を再度検討したが、明確なピークの検出には至らなかった。そこで次に、LC/MS データ統合解析ソフト (Progenesis QI v2.2, Nonlinear Dynamics, UK) を活用して、サンプルの測定に先だって測定され

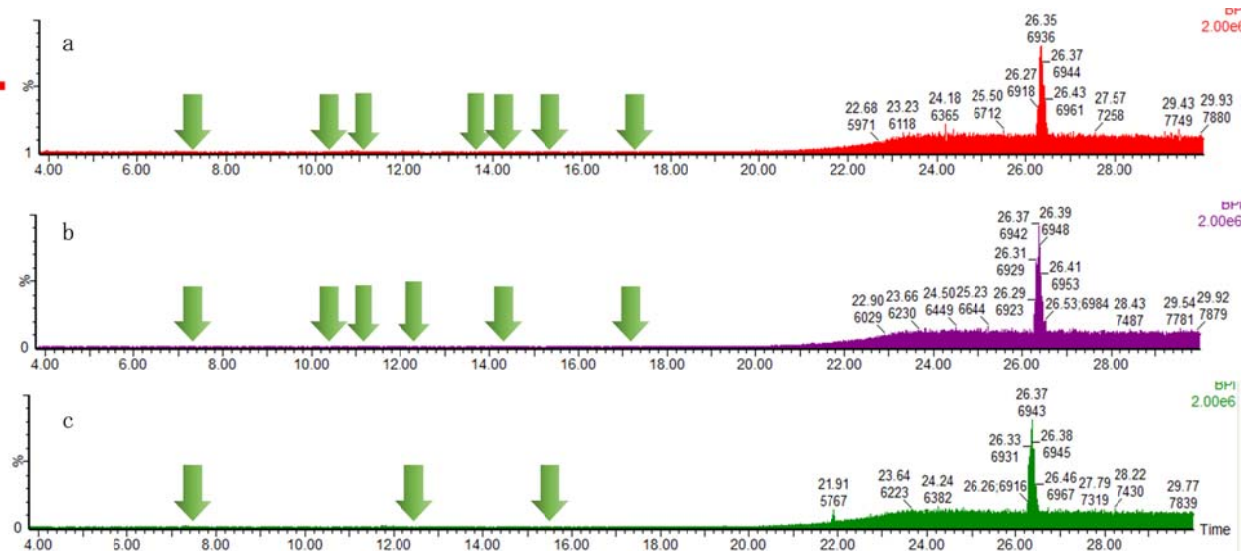


図3 GC-O-APCI-TOFMS で分析した水道原水に含まれる物質の基準ピーククロマトグラム (a : TON=43 のサンプル、b : TON=23 のサンプル、c : TON=18 のサンプル、矢印は、GC-O で臭気成分が検出された RT)

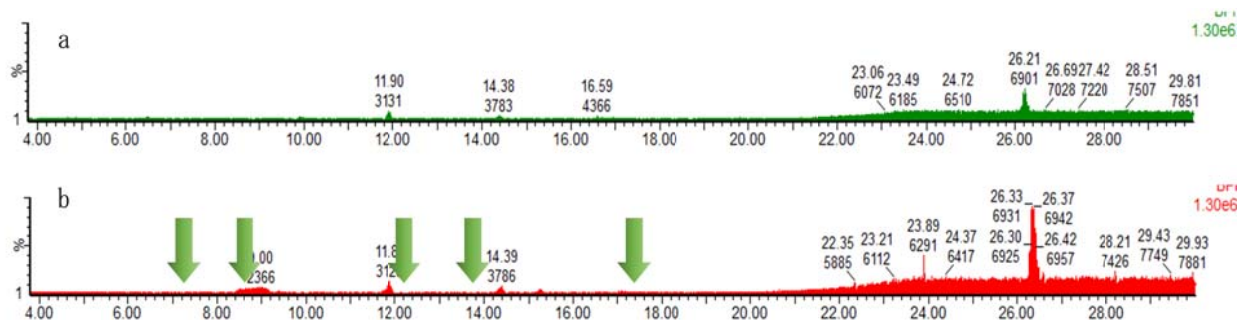


図4 GC-O-APCI-TOFMS で分析したウログレナ培養液に含まれる物質の基準ピーククロマトグラム (a : コントロールサンプル、b : 培養液サンプル、矢印は、GC-O で臭気成分が検出された RT)

水道原水濃縮サンプル (3 サンプル)、およびウログレナ培養液濃縮サンプル (1 サンプル) を分析した。得られた結果を図 3、4 に示す。すべての測定結果において、GC-O を用いた検討で臭気物質が検出された RT (補正後の RT) に目視で確認できる明確なピークが認められないことが分か

た。一方、測定者が「昆布だし」、このため、APCI のイオン化の条件を再度検討したが、明確なピークの検出には至らなかった。そこで次に、LC/MS データ統合解析ソフト (Progenesis QI v2.2, Nonlinear Dynamics, UK) を活用して、サンプルの測定に先だって測定され

「米」および「牛乳」と表現する臭気物質が検出された RT (補正後の RT) に一致する物質は検出されなかった。

臭気物質の中でイオン化できなかった可能性が高い物質が多く存在したため、それらの物質がどのような物質なのかを考察した。考察は、同技術を用いてイオン化可能な物質を調べることにより行った。これは、どのような物質がイオン化できないかの情報がほとんど得られないためである。すなわち、イオン化されやすい物質の部分構造を推定することによって、本研究でイオン化できなかった物質がそれらの構造を有していない可能性があることを考察した。

同技術で測定可能とされている 338 物質³⁾について、部分構造を検討した。その際、1 物質について、最大 5 個の部分構造が抽出された。検討の結果、合計 1,033 個の部分構造が抽出された。その 1,033 個の主な部分構造を見ると、クロロベンゼン、有機リン、アミドなどであり、酸素以外のヘテロ元素を含む部分構造が大多数を占めた。ヘテロ元素を含まないか、炭素と水素および酸素から成る部分構造は、シクロセキセン、エステル、エーテル、ケトン、三級アルコールなどであった。昨年度発見した、臭気強度およびウログレナ細胞数と相関関係が認められる物質は、炭素と水素および酸素から成る物質であり、アルデヒド類と推定された。検討されている 338 物質の中のアルデヒド類を探したところ 1 物質発見された。しかし、その物質は、ホルミル基の他に、APCI でイオン化されやすい三級アミン構造を有していた。このため、同物質は三級アミン構造によりイオン化されると考えられる。すなわち、イオン化されやすい他の官能基を有さないアルデヒド類は、本研究で用いた APCI ではイオン化されにくいと考えられる。これらのことから、本研究で検出された臭気物質の中でイオン化できなかった物質は、酸素以外のヘテロ元素を有する可能性や、シクロセキセン、エステル、エーテル、ケトン、三級アルコールなどの構造を有する可能性が低い物質と考

察される。

E. 結論

水道原水とウログレナ培養液に共通する臭気成分を 3 成分発見した。しかし、本研究で用いたイオン化法では、それらのうちの 2 成分をイオン化できなかった。イオン化できた 1 成分の m/z は 146.962 であった。

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

新福優太、高梨啓和、中島常憲、大木 章、下ヶ橋雅樹、秋葉道宏、NPH 誘導体化アルデヒドを LC/MS で測定する際の妨害物質の除去、第 52 回日本水環境学会年会、1-J-11-4.

新福優太、高梨啓和、中島常憲、大木 章、下ヶ橋雅樹、秋葉道宏、DNPH 誘導体化における測定妨害物質の除去を目的とした固相抽出の適用、第 20 回日本水環境学会シンポジウム、p.123.

新福優太、高梨啓和、中島常憲、大木 章、下ヶ橋雅樹、秋葉道宏、高分解能質量分析計と多変量解析による水道水生ぐさ臭原因物質の探索、環境科学会 2017 年会、1C-0930/P-18.

Yuta Shinfuku, Hirokazu TAKANASHI, Tsunenori Nakajima, Akira Ohki, Masaki Sagehashi and Michihiro Akiba, Exploring a Fishy-Smelling Substance in Raw Waters for Water Supply with High Resolution Mass Spectrometry and Multivariate Analysis, the Water and Environment Technology Conference 2017, Hokkaido, Hokkaido University, 3A-17.

Yuta Shinfuku, Hirokazu Takanashi, Tsunenori Nakajima, Akira Ohki, Masaki Sagehashi and Michihiro Akiba, Exploring a fishy-smelling

compound in raw waters with high resolution mass spectrometry and multivariate analysis, 26th Symposium on Environmental Chemistry, Shizuoka, 3E-06.

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。また、神奈川県企業庁水道水質センターの職員より、*Uroglena americana* 培養液の提供およびその前処理への協力を受けた。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) Laura Cherta, Tania Portolés, Joaquim Beltran, Elena Pitarch, Johannes G.J. Mol, Félix Hernández (2013) Application of gas chromatography – (triple quadrupole) mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization for the determination of multiclass pesticides in fruits and vegetables, *Journal of Chromatography A*, **1314**, 224-240.