

高分解能質量分析計を用いた  
水道水生ぐさ臭原因物質の探索

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

「水道事業の流域連携の推進に伴う水供給システムにおける  
生物障害対策の強化に関する研究」

研究課題：高分解能質量分析計を用いた水道水生ぐさ臭原因物質の探索

研究代表者	秋葉 道宏	国立保健医療科学院 生活環境研究部 部長
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、高揮発性物質と予想されることから GC-MS による分析が適していると考えられる。一方で、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 LC-MS が適している。このため、高分解能 LC-MS、およびにおい嗅ぎ機能を付与した高分解能 GC-O-MS を併用することで、生ぐさ臭原因物質を探索することを試みた。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、共通する物質が1物質発見された。また、同物質は牛乳様の臭気を有しており、その分子内にはアルコール性ヒドロキシ基、メトキシ基を有するシクロヘキセン環、エノール構造が存在する可能性が示唆された。

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<sup>1)</sup>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)-decatrienal<sup>2)</sup>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いう意見があり、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。

これに対して質量分析は、極微量物質の分析に長けている。とくに、クロマトグラフとのハイブリッドである GC-MS や LC-MS は、分離を伴う分析を実施可能なため、夾雑物の中に含まれる極微量の物質の分析に長けている。一方で、質量分析により物質を同定するためには、標準物質との比較が必須であり、そのためには、どのような化学構造の物質なのかを事前に推定することが必要となる。構造推定には、分析種の分子量情報が保

存されている状態での分析が重要であり、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。しかし、本研究で対象とする水道原水中の生ぐさ臭原因物質は、高揮発性物質であると考えられるため、ESI でイオン化できる可能性が低い。このため、原因物質を含むサンプルを誘導体化し、ESI でイオン化されやすい物性に変換して分析することが有効と考えられる。同時に、高揮発性物質の分析に長けているが高感度分析が可能か否か不明な高分解能 GC-MS を用いた検証や、におい嗅ぎシステムを備えた GC-O を用いた検証が有効と考えられる。

また、日本における水道原水中の生ぐさ臭原因物質については、主な原因生物が黄色鞭毛藻綱 *Uroglena americana* (以下、ウログレナ) とされている<sup>3)</sup>。ウログレナは継代培養が可能のため、その培養液から生ぐさ臭原因物質を探索することが有効と考えられる。

そこで本年度は、ウログレナが発生した際に採取した水道原水および、その水域とは異なる水域から採取したウログレナを継代培養した培養液を対象に、高分解能 LC-MS および高分解能 GC-O-MS を用いて生ぐさ臭原因物質の探索と構造推定を行うことを目的とした。

## 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、2016年4月27日から2018年4月27日までに採水した7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。採取された水道原水試料水の採取日、臭気の種類および強度、ウログレナ中群体数を表1に示す。

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培養した。培養時の培地 (Ur-1 培地) の組成を表2に、培養条件を表3に、それぞれ示す。

### 2. 試料水の前処理および固相抽出による濃縮

試料中の溶存酸素の除去を目的として、採水後の水道原水試料に亜硫酸ナトリウムの粉末を添加し、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、密栓した状態でガロン瓶を加熱した (60°C、30 分間)。加熱が終了した水道原水試料を、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

表1 本研究で使用したサンプルの一覧

採取場所	採取日時	臭気種類	臭気強度	ウログレナ中 群体数
関西地方	2016/4/27	生ぐさ	160	15.6
関西地方	2016/5/16	藻, 生ぐさ	30	0.8
関東地方*	2016/7/29	生ぐさ	データなし	91.7**
関西地方	2017/12/18	生ぐさ	23	10.3
関西地方	2017/12/25	生ぐさ	43	6.4
関東地方*	データなし	生ぐさ	データなし	43**
関西地方	2018/04/13	生ぐさ	40	18.8
関西地方	2018/04/20	生ぐさ	320	30.9
関西地方	2018/04/27	生ぐさ	120	9.8

\*:Ur-1 培地で培養 \*\*:300 細胞 = 1 中群体として換算

表2 Ur-1 培地の組成

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

表3 ウログレナの培養条件

項目	値
温度	15°C
湿度	48%
光子束密度	38 μ mol/m <sup>2</sup> ·s
明暗条件	12 時間暗/12 時間明

(Millex-AP50、Merck Millipore、Germany) により、加圧ろ過した。ウログレナ培養液に対してはこれらの前処理は実施せず、後述する固相抽出による

濃縮のみを行った。

ウログレナ培養液、およびろ過後の水道原水試料水を、固相抽出 (SPE) により濃縮した。直列に連結した 2 種類の固相 (Sep-Pak PS-2 および AC-2、日本ウォーターズ、東京) をアセトニトリル、ジクロロメタン、および超純水によりコンディショニングした後、検水を通液した。全量の検水を通液後、アセトニトリルおよびジクロロメタンを通液し、固相表面に吸着した物質の脱離を

施した。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、1 分間の soak time を設けた。

水道原水試料、培養液と共に、超純水に対しても同様の SPE 処理を行った。これ以降の実験においては、超純水を SPE 処理することで得られた脱離液を、本研究でのブランクサンプルとして取り扱った。

### 3. 高分解能 LC-MS による試料の分析

#### 3.1 試料の誘導体化

生ぐさ臭が 1 週間程度の短期間のうちに消失してしまうという事実と、生ぐさ臭の臭気の種類に鑑みて、生ぐさ臭原因物質をアルデヒド類と仮定した。しかし、一般にアルデヒド類は ESI におけるイオン化効率が低く、分析感度の不足が懸念される。そこで本研究では、試料を 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) により誘導体化し、誘導体化後の試料を高分解能 LC-MS により分析した。DNPH はアルデヒドおよびケトンと容易に反応し、得られる誘導体 (2,4-dinitrophenylhydrazone) は、LC-MS により高感度で検出することが可能である。本研究で実施した DNPH 誘導体化の操作手順を、図 1 に示す。

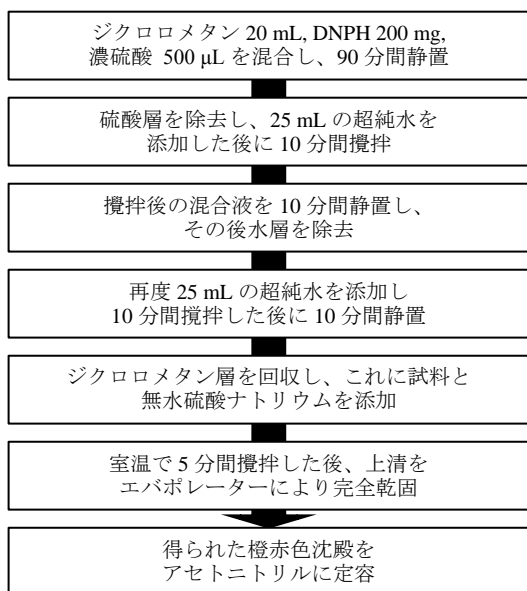


図 1 DNPH による試料の誘導体化

#### 3.2 分析条件

上述の方法により濃縮・誘導体化した試料を、

XBridge BEH Phenyl (2.1 x 100 mm, 2.5 µm, Waters, MA, USA) を備えた高分解能 LC-MS (UltiMate 3400SD-LTQ Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて測定した。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 10 µL とした。イオン源として ESI を用いて、ネガティブイオンモードにより測定した。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%=5 (0-3 min)、100 (3-25 min)、100 (25-30 min)、5 (30-30.5 min)、5 (30.5-35 min) とした。イオン源における source voltage は 2.50 kV、APCI 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。

#### 3.3 多変量解析

##### 3.3.1 差異解析およびフィルタリング

上記の分析条件で取得した高分解能 LC-MS データに対して、表 4 に示した条件で、統合解析ソフト Progenesis QI (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) による差異解析およびフィルタリングを実施した。これらの条件をすべて満たすイオンを多変量解析の解析対象とし、後述の interval-Orthogonal Projections to Latent Structures 回帰分析 (iOPLS) に供した。なお、表 4 中の“Max Fold Change”は、あるイオンの実試料におけるピークボリュームと、ブランクにおけるピークボリュームの比を意味する。また、“Highest (Lowest) Mean”は、表 1 に示した全サンプルのうち、あるイオンのピークボリュームはどのサンプルにおいて最大 (最小) であったかということを示す。

表 4 差異解析によるフィルタリング

条件 1	Max Fold Change $\geq 10$
条件 2	Highest mean = 2018 年 4 月 20 日採水試料 またはウログレナ培養液
条件 3	Lowest mean = ブランクサンプル
条件 4	中群体数 $\geq 9.8$ の サンプルにおいて、変動係数 ( $n$ ) $\leq 20\%$
条件 5	水道原水サンプルのみに着目した時に、 2018 年 4 月 20 日採水試料において abundance が最大

##### 3.3.2 interval-OPLS 回帰分析

表 4 に示したすべての条件を満たしたイオンの

ピークボリュームを独立変数、各サンプルの中群体数換算数を従属変数として iOPLS を実施することで、得られた回帰モデルに対して有意な寄与を示すイオンのみを抽出することを試みた。ただし、ウログレナ培養液については中群体数の実測データが存在しないため、解析対象から除外した。iOPLS 用のソフトウェアとして、PLS Toolbox ver 8.1 (Eigenvector Research Incorporated, WA, USA) を使用し、iOPLS における解析条件は以下の表 5

表 5 iOPLS の解析条件

Item	Setting
Preprocessing (X)	Mean Center
Preprocessing (Y)	Mean Center
Cross validation Mode	Contiguous Blocks (7 splits) Reverse
# of intervals	Auto
Interval Size	1
Step Size	auto
Max. # of LVs	3

のように設定した。

#### 4. 高分解能 GC-O-MS による試料の分析

##### 4.1 試料の前処理

一般に GC-MS や GC-O は試料中の高揮発性成分の分析を目的として用いられるが、3.1 節にて述べた DNPH 誘導体化は、アルデヒド類の揮発性を低下させると予想される。このため、高分解能 GC-MS や GC-O における分析対象サンプルに対しては、DNPH による誘導体化を行わなかった。また、サンプルの脱水を目的として、固体の無水硫酸ナトリウムを添加し、その後上清を 0.22  $\mu\text{m}$  メンブレンフィルターによりろ過した。

##### 4.2 生ぐさ臭原因物質の回収確認

SPE により生ぐさ臭原因物質を回収可能なことの確認を目的として、GC-O 分析を実施した。検討には、におい嗅ぎポート (OP275 Pro、ジーエルサイエンス、東京、日本) を備えた GC (7890B、Agilent Technologies、CA、USA) に、フューズドシリカキャピラリーチューブ ( $\phi$  0.25 mm、1 m) を接続した状態で、GC-O 分析を実施した。この時の Head Pressure は 100 psi、オープン温度は 25°C、インジェクションボリュームは 5  $\mu\text{L}$  とした。検討には、本研究で用いたサンプルのうち最も臭気強度が高かったサンプル (2018 年 4 月 20 日採水の水道原水) を使用した。

#### 4.3 高分解能 GC-O-MS 分析条件

表 1 に示したサンプルを濃縮して得られた脱離液を、高分解能 GC-O-MS による分析に供した。使用したにおい嗅ぎポートおよび GC は 4.2 節と同様であり、MS には Synapt G2-Si HDMS (Waters) を、イオン源には APCI (APGC, Waters) を、分離カラムには Inertcap 5 ( $\phi$  0.53 mm x 15 m、膜厚 5  $\mu\text{m}$ 、ジーエルサイエンス) を用いた。

分離カラムおよびにおい嗅ぎポートの温度は 25°C (0-1.0 min)、260°C (1.0-24.5 min)、260°C (24.5-35.0min) とした。キャリアガスにはヘリウムを使用し、流速は 4.2 mL/min (32 cm/sec) とした。また、Head Pressure を 100 psi に設定し、インジェクションボリュームは 5  $\mu\text{L}$  とした。

イオン化モードは、ポジティブイオンモードとした。イオン源における corona current は 1  $\mu\text{A}$ 、Cone Gas は 0 L/h、Auxiliary Gas は 100 L/h、Source temp. は 150°C とした。また、適当量のメタノールを入れた 1.5 mL バイアル瓶をイオン化室内部に設置することで、分析種のプロトン付加体イオン  $[\text{M}+\text{H}]^+$  の検出感度向上を試みた。

#### C. 結果及び考察

##### 1. LC-HRMS による試料の分析

###### 1.1 差異解析

LC-HRMS 分析により検出される同位体イオンおよび付加体イオンをモノアイソトピックイオンの特定の付加体に取りまとめた結果、6,810 コンポーネントであった。その 6,810 コンポーネントに対して差異解析およびフィルタリングを実施したところ、表 4 に示した条件をすべて満たしたイオンは 117 種であった。これらの 117 物質を用いて iOPLS 回帰モデルを構築することで、候補数を更に絞り込むことを試みた。

###### 1.2 iOPLS

差異解析により選択された 117 物質を用いて iOPLS を実施したところ、117 物質中 18 物質が選択された。これら 18 物質を用いて、iOPLS 回帰モデルを構築した。得られた回帰モデルの概要を図 2a-c に示す。図 2a に示したように、回帰モデ

ルの当てはまり誤差 (Root Mean Square Error of Cross Validation; RMSECV) は潜在変数 (Latent Variable; LV) の数が 3 の時に最低値を示したが、本研究においては、回帰モデルの過学習を最小限にとどめることを目的として、LV の数を 2 に設定した。

得られた回帰モデルにより算出した予測中群体数、および実測中群体数を用いて決定係数  $R^2$  を求めたところ、図 2b に示したように、その値は 1 に近く、回帰モデルの直線性が高いことが確認された ( $R^2$  CV = 0.996、 $R^2$  Cal = 1.00、RMSECV = 0.724)。

次に、この回帰モデルの構築における各物質の寄与の大きさを確認することを目的として、各物質の Variable Importance in Projection Score (VIP Score) を確認した。その結果、図 2c のように 1 物質の VIP Score が他の物質の VIP score と比較して大きかった。VIP Score が大きい物質は回帰モデル構築にも大きく寄与していると考えられるため、この 1 物質が生ぐさ臭原因物質の主要な候補であると仮定した。

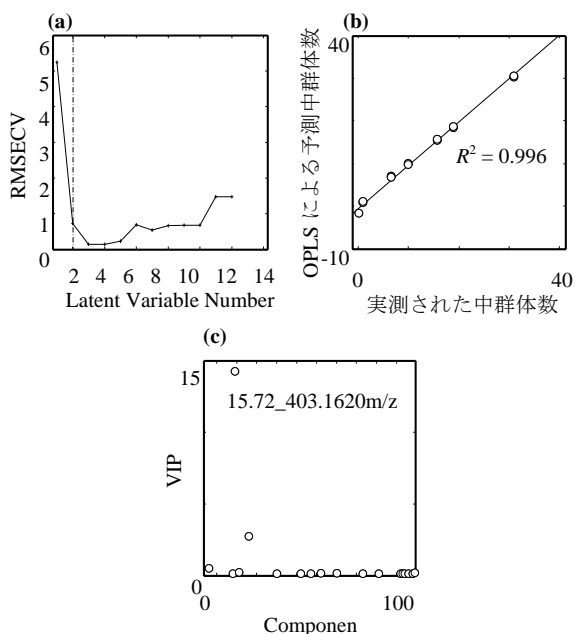


図 2 得られた回帰モデルの概要  
((a) 適切な LV 数の検討、(b) 構築された回帰

モデル、(c) 回帰モデル構築に対する寄与率が大きい物質の検討)

### 1.3 生ぐさ臭候補物質の分子式推定

多変量解析により抽出された 1 物質の詳細を確認したところ、同物質はカラム保持時間 15.7 min において検出されており、その実測  $m/z$  は 403.1620 であった。カラム保持時間 15.7 分におけるマススペクトルを図 3 に示す。

図中①のイオンは *monoisotopic ion* であり、その  $m/z$  値は 403.1620 である。また図中の②、③はそれぞれ  $^{13}\text{C}$  の同位体イオン、 $^{15}\text{N}$  の同位体イオ

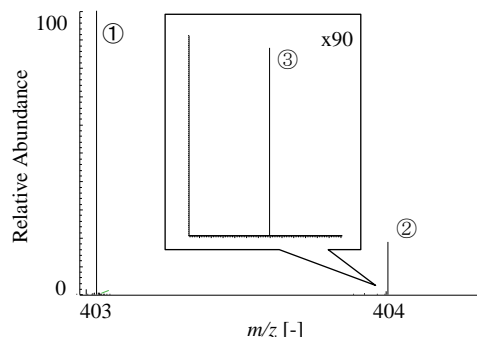


図 3 マススペクトル (保持時間 15.7 min)

ンであり、①の強度を 100%としたときの相対強度は、それぞれ 18.5%、1.04%であった。これらの事実を鑑みて、同物質のイオン式推定を試みた。イオン式を推定する際の元素種として C、H、N、O を仮定し、質量誤差が 1 ppm 以下となるようなイオン式を推定した結果、同物質のイオン式は  $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_6^-$  であると推定された。 $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_6^-$  の環と二重結合等価数 (Ring and Double Bond Equivalent, RDBE) を算出したところ 10.5 となり、小数第一位が 0.5 となったことからこのイオンは閉殻イオンであることが確認された。また、窒素ルールから本イオンに含まれている窒素数は偶数個であり、推定されたイオン式と矛盾しなかった。

この物質の推定イオン式に窒素原子が 4 つ含ま

れていることから、同物質は DNP 誘導体として検出されたと予想される。したがって、DNP 誘導体化反応の反応機構に基づき、同物質が誘導体化を受ける前に有していた分子式を、 $C_{13}H_{20}O_3$  であると推定した。

#### 1.4 異なる水系から検出されていることの確認

3.3.2 節にて述べたように、ウログレナ培養液は iOPLS の解析対象から除外した。したがって、iOPLS により選択された  $m/z$  403.1620 の物質が、ウログレナ培養液においても検出されているかどうかを確認した。質量誤差 1 ppm の範囲で抽出イオンクロマトグラムを描いたところ、図 4 のようなピークが観察された。図 4 上部のクロマトグラム (破線) はウログレナ培養液の分析結果、下部 (実線) は水道原水試料の分析結果を示しており、ウログレナ培養液においても、保持時間の再現性良く同物質が検出されていることを確認した。

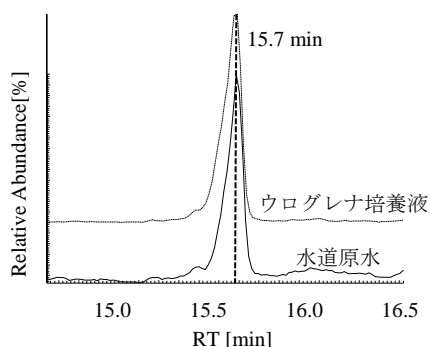


図 4 抽出イオンクロマトグラム  
( $m/z$ 403.162 $\pm$ 1 ppm)

### 2. 高分解能 GC-O-MS による試料の分析

#### 2.1 生ぐさ臭原因物質の回収確認

フューズドシリカキャピラリーチューブを接続した状態で GC-O 分析を実施した結果、試料のインジェクションから 30 秒ほどが経過した時点において、生ぐさ臭を検知することができた。そのため、本研究で実施した前処理および固相抽出

の方法を用いることにより、生ぐさ臭原因物質を回収可能であることが確認された。

#### 2.2 GC-O-HRMS 分析

高分解能 LC-MS および多変量解析により、生ぐさ臭原因物質の主要な候補として 1 物質が抽出されたため、この物質が高分解能 GC-O-MS においても検出可能であるかどうかを検討した。

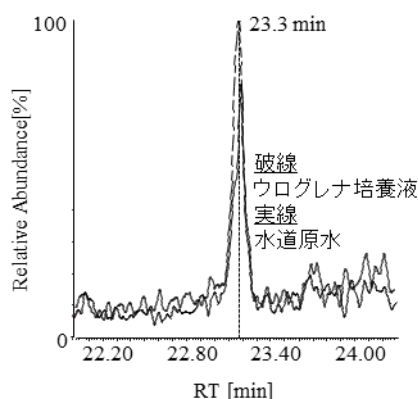
一般に GC-MS のイオン化法として用いられる EI と比較すると、本研究で用いたイオン化法である APCI によって分析種に印加されるエネルギーは小さく、分析種の fragmentation が起こりにくいという利点がある。これを考慮して、上述の  $C_{13}H_{20}O_3$  が APCI のポジティブイオン化モードによってイオン化された場合、そのイオン式は  $C_{13}H_{21}O_3^+$  であり、 $m/z$  値は 225.15 であると予想した。

図 5 は  $m/z$  225.141~225.152 の範囲で描いた抽出イオンクロマトグラムをスムージングしたものを表しており、保持時間 23.3 min において、水道原水およびウログレナ培養液で共通するピークが確認された。また、このカラム保持時間に相当する時間に、におい嗅ぎポートにおいて牛乳のような臭気が検知された。検知した臭気は生ぐさ臭とは異なっていた。このことから、生ぐさ臭は複数の原因物質によって惹起される複合臭気であるということが予想される。原水試料およびウログレナ培養液の臭気分析については、今後のより詳細な検討が必要と言える。

図 5 抽出イオンクロマトグラム  
( $m/z$  225.15 $\pm$ 0.05 Da)

### 3. 多段階精密質量分析による構造推定

$m/z$ 403.1620 の候補物質の構造を部分的に推定



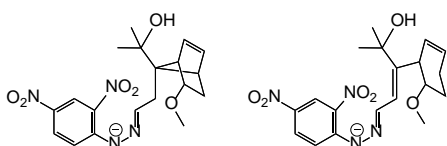


することを目的として同物質の多段階精密質量分析を実施した。第一世代プロダクトイオンスペクトルを取得したところ、特徴的なニュートラルロスとして  $\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{HNO}_2$ 、 $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ 、 $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$  が観察された。これらのニュートラルロスを生成し得るフラグメンテーション経路として、アルコール性ヒドロキシ基の遠隔水素転位反応 (rHa)、DNPH のジニトロベンゼン部分の遠隔水素転位反応 (rHa)、メトキシ基を有するシクロヘキセン環の逆 Diels-Alder 反応 (RDA)、エノール構造の逆エン反応 (RE) を予想した<sup>4)</sup>。予想したフラグメンテーション経路を以下の図 6 に示す。

図 6 予想されるフラグメンテーション経路

また、これらのニュートラルロスを生成し得る全体構造の例として、図 7 のようなものを予想した。しかし、これらの構造は推定例に過ぎず、完全な構造決定については、今後のより詳細な検討が必要と言える。

図 7 推定した全体構造の例



## E. 結論

・高分解能 LC-MS 分析および多変量解析の結果、水道原水とウログレナ培養液に共通する臭気成分を 1 成分発見し、同物質の分子式を  $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3$  と推定した。

・におい嗅ぎ分析の結果、同物質のカラム保持時間の周辺で牛乳様臭気を検知した。

・多段階質量分析の結果、同物質はアルコール性ヒドロキシ基、メトキシ基を有するシクロヘキセン環、エノール構造を有すると推定された。

## F. 健康危険情報

該当なし

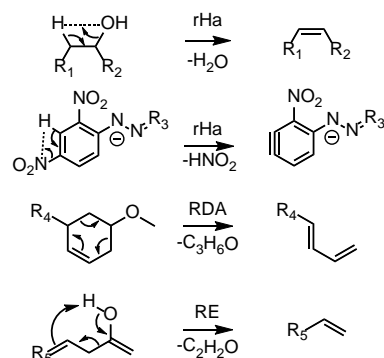
## G. 研究発表

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, 秋葉道宏.



LC-HRMS および GC-O-MS による水道水生ぐさ臭原因物質の探索. 第 53 回日本水環境学会年会講演集, 甲府, 2019.3, 126.

## 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. 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.: Under-ice blooms and source-water odour in a nutrient-poor reservoir: biological, ecological and applied perspectives, *Freshwater Biology*, Vol.46, pp.1553-1567, 2001.
- 3) Nakahara M., Takano R., Ito H., Yano H., Hirase S., Harimaya K.: Volatile Constituents of *Uroglena americana* (Chrysophyceae). *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, Vol.62, No.2, pp.35-37, 1988.

- 4) Daniel P. Demarque, Antonio E. M. Crotti, Ricardo Vessecchi, Joao L. C. L., Norberto P. L.: Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products, *Natural Product Reports*, Vol.33, pp. 432-455, 2016.

#### J.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。