

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）
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
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
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。昨年度時点では、生ぐさ臭原因物質の候補が1物質発見され、その部分的な構造推定を実施した。一方、生ぐさ臭は同物質以外にも原因物質が存在する混合臭気であることが示唆された。そこで今年度は、同物質のさらなる構造推定、および同物質以外の未特定の原因物質の探索を実施した。その結果、同物質は *2,4-dinitrophenylhydrazine* (DNPH) と反応可能なカルボニル部位を2か所有していることが示唆された。また、パネル一数を加増して水道原水試料のにおい嗅ぎ GC (GC-O) 分析を行い、同物質以外の有臭成分のカラム保持時間を特定した。

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)-decatrienal*²⁾ 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 (以下 LC-HRMS) 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 以下 (GC-HRMS) 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、主な原因生物が黄金色藻綱 *Uroglena americana* (以下、ウログレナ) とされている³⁾。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。

昨年度は、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、LC-HRMS および GC-O-HRMS を用いて、生ぐさ臭原因物質の探索と構造推定を行った。その結果、推定分子式 $C_{13}H_{20}O_3$ の物質が候補物質として抽出された。一方で、GC-O により検証した同物質の臭気は生ぐさ臭とは異なっており、生ぐさ臭は混合臭気であること(候補物質以外にも原因物質が存在すること)が示唆された。

本年度は、昨年度の研究により生ぐさ臭原因物質として抽出された候補物質のより詳細な構造推定を試みた。また、パネラー数を加増して水道原水試料の GC-O 分析を行い、未特定の原因物質の探索を実施した。

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、2018年4月から2019年4月までに採水した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。

得られた検体は、既報⁴⁾に準じて固相抽出による濃縮を行い、その後、以下に示す条件で LC-HRMS による多段階精密質量分析、におい嗅ぎ GC (以下、GC-O) 分析、および GC-HRMS 分析に供した。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の培養液⁴⁾についても、同様の分析を実施した。

2. 試料水の分析

2.1 LC-HRMS による試料水の分析

LC-HRMS 分析に供する検体には、分析種のイオン化効率の向上を目的として、2,4-dinitrophenylhydrazine (以下、DNPH) による誘導体化を施した。

上述のように候補物質の推定分子式は $C_{13}H_{20}O_3$ であったことから、同物質は最大で3つの酸素系官能基を含有しており、それら全てがアルデヒドもしくはケトンであれば、最大で3分子の DNPH と反応すると予想される。ただし、昨年度の検討においては、LC-HRMS 分析における Scan Range の上限が 500 であり、候補物質と1分子の DNPH が反応したイオンを検出するに留まった。そこで、候補物質に対して2分子および3分子の DNPH が付加した物質(以下、2分子付加体および3分子付加体)の検出の可否を確認するために、Scan Range の上限を 800 に改めて、再度分析を実施した。

上述の方法により濃縮・誘導体化した試料を、LC-HRMS (UltiMate 3400SD-LTQ Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて測定した。使用した分離カラムとその温度、使用した移動相とその流速、イオン化の条件などは、既報に準じた⁴⁾。

また、表1に示す条件を用いて多段階精密質量分析を実施した。これにより得られた第一世代プロダクトイオンスペクトルに基づき、候補物質の構造を推定することを試みた。

表 1: 多段階精密質量分析の分析条件

Items	Value/Type/Mode
Activation type	CID
Activation time [msec]	30
Collision gas	N ₂
Normalized collision energy [%]	35
Isolation width [Da]	1.5
Resolution (FWHM at <i>m/z</i> 400)	100,000

3. GC-O および GC-HRMS による試料の分析

3.1 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、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、GC-HRMS 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 μm メンブレンフィルターによりろ過した。

3.2 分析条件

固相抽出により得られた脱離液を、GC-O および GC-HRMS による分析に供した。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 DB-5MS (φ 0.25 mm x 30 m, 膜厚 0.25 μm, Agilent Technologies) を用いた。

分離カラムおよびにおい嗅ぎポートの温度は 30°C (0-1.0 min), 300°C (1.0-14.5 min), 300°C (14.5-19.5 min) とした。キャリアガスにはヘリウムを使用し、流速は 2 mL/min (線速度 67.9 mm/sec) とした。GC-O 分析では splitless injection を用いて、インジェクションボリュームは 2 μL とした。また、GC-HRMS 分析では pulsed splitless injection (Head Pressure: 80 psi) を用いて、インジェクションボリュームは 5 μL とした。

イオン化のモードとして、ポジティブイオンモードを用いた。イオン源における corona current は 1 μA, Cone Gas は 240 L/h, Auxiliary Gas は 200 L/h, Source temp. は 150°C とした。

C. 研究結果および D. 考察

1. LC-HRMS による試料水の分析

候補物質の推定分子式 (C₁₃H₂₀O₃), DNPH の分子式 (C₆H₆N₄O₄), DNPH 誘導体化は脱水を伴って進行する反応であることに鑑みて、2 分子付加体の分子式を C₂₅H₂₈N₈O₉ (*m/z* 583.1906), 3 分子付加体の分子式を C₃₁H₃₂N₁₂O₁₂ (*m/z* 763.2190) であると、それぞれ予想した。

予想した *m/z* 値に対して、0.0009 Da の mass tolerance を用いて抽出イオンクロマトグラムを描画したところ、2 分子付加体については図 1 に示すようなピークが、保持時間 20.6 分において観察された。このピークは、ウログレナ培養液および水道原水試料の双方で共通して検出された。一方、3 分子付加体については、ピークを観察することはできなかった。この結果より、候補物質は、DNPH と反応可能なアルデヒド部位またはケトン部位が 2 か所存在することが示唆された。

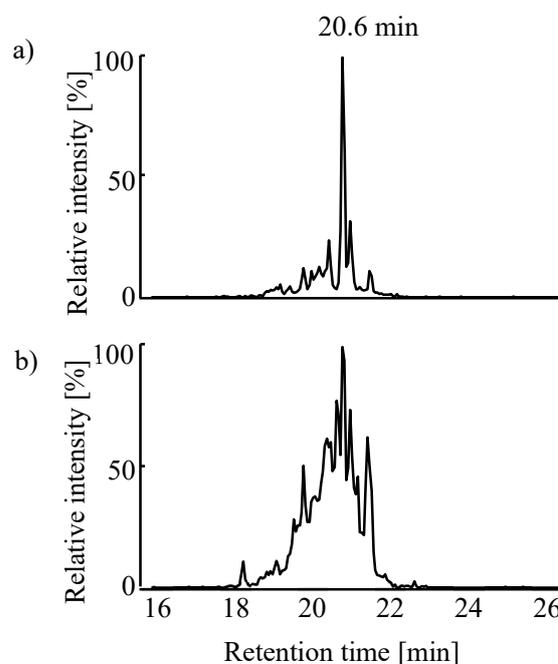


図 1: 2 分子付加体の抽出イオンクロマトグラム (*m/z* 583.1906±0.0009)
a) ウログレナ培養液 b) 水道原水試料

また、候補物質の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 NO, HNO₂, H₂O, C₂H₂O, C₂H₄O, C₃H₆O, H₃NO₃, [CH₃NO₂] が観察された。これらのうち、NO ロスはニトロ基含有化合物において頻繁に観察されるロスであり⁵⁾、同物質が DNPH 誘導体であることを示している。

また、 HNO_2 ロスも DNPH 誘導体の特徴的なロスとして報告されている⁶⁾。その生成機構は、図 2 a) のようなジニトロベンゼン部分の遠隔水素転位反応 (rHa) によって説明可能である。

H_2O , $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$, $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ のロスについては、図 2 b)-e) に示した反応機構により、その生成を説明可能である。特に H_2O ロスについては、アルコール性ヒドロキシ基を有する化合物において特徴的に検出されるロスである⁷⁾ ことから、先に述べた結果と併せて考慮すると、候補物質は酸素系官能基を3つ有しており、うち2つは DNPH と反応可能なアルデヒド/ケトン部位, 残り1つはアルコール性ヒドロキシ基と予想される。また、 H_2O ロスの生成は、アルコール性ヒドロキシ基における遠隔水素転位反応 (rHa) によって説明可能である。

$\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$, $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$, および $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ の生成機構については、ケトン部位とシクロヘキセン環の存在を仮定し、この部位において逆エン反応 (RE), 逆 Diels-Alder 反応 (RDA), Charge Remote Fragmentation (CR) が生じたものと予想した⁷⁾。

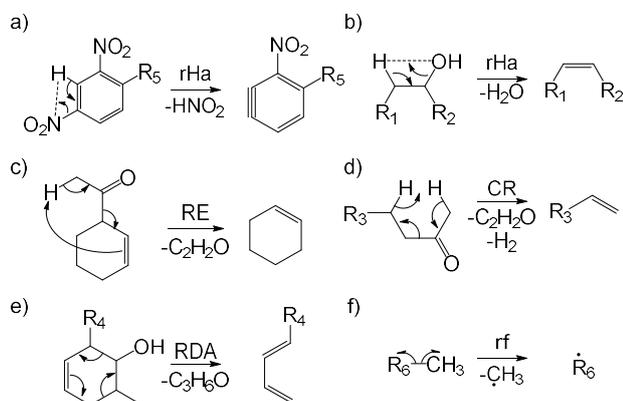
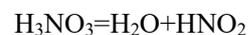


図 2: 予想されるフラグメンテーション経路

a) ジニトロベンゼン部位における遠隔水素転位反応, b) アルコール性ヒドロキシ基における遠隔水素転位反応, c) シクロヘキセンおよびケトン部位における逆エン反応, d) ケトン部位における Charge Remote Fragmentation, e) ヒドロキシシクロヘキセン部位における逆 Diels-Alder 反応, f) メチルラジカル脱離

H_3NO_3 , $[\text{CH}_5\text{NO}_2]\cdot$ は単分子のロスではなく、複数のロスの和であると予想した。すなわち、これらの生成を説明する素反応のひとつとして、図 2 f) のようなメチルラジカル脱離を想定し、以下に示すように予想した。



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 3 g), h) のようなものを予想した。g) は候補物質が DNPH による誘導体化を受けた状態の構造に相当し、誘導体化を受けていない状態での構造を表しているのが h) である。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。

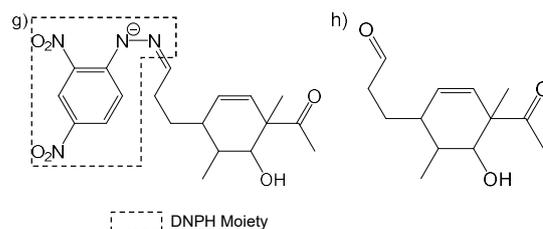


図 3: 推定した全体構造の例

g) DNPH 誘導体としての推定構造

h) DNPH 誘導体化を受ける前の推定構造

2. GC-HRMS および GC-O による試料の分析

2.1 GC-HRMS 分析

水道原水試料およびウログレナ培養液を分析し、候補物質の GC-HRMS における検出の可否を検討した。候補物質の推定分子式が $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3$ であることと、大気圧化学イオン化 (正イオン化モード) で分析を行ったことに鑑みて、GC-HRMS 分析における同物質のイオン式を $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{O}_3^+$, m/z 値を 225.15 であると予想した。分析の結果, m/z 225 のイオンが検出されたが、このイオンの天然同位体パターンから算出した炭素原子の数は 9 ± 1 個であり、推定分子式 $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3$ とは一致しなかった。

次に、大気圧化学イオン化において頻繁に見られるフラグメンテーション反応のひとつである分析種の脱水⁸⁻⁹⁾に着目し、候補物質のイオン式を $C_{13}H_{18}O_2^+$ 、 m/z 値を 207.14 であると予想した。得られた GC-MS データ上で、 m/z 207.14 に対し 0.05 Da の mass tolerance を用いて EIC を描画したところ、保持時間 10.5 分においてピークが観察された。このイオンは、水道原水試料およびウログレナ培養液の双方で共通して検出された。また、天然同位体パターンから推定した含有炭素原子数は 12 ± 1 であり、推定分子式とよく一致していることが確認された。

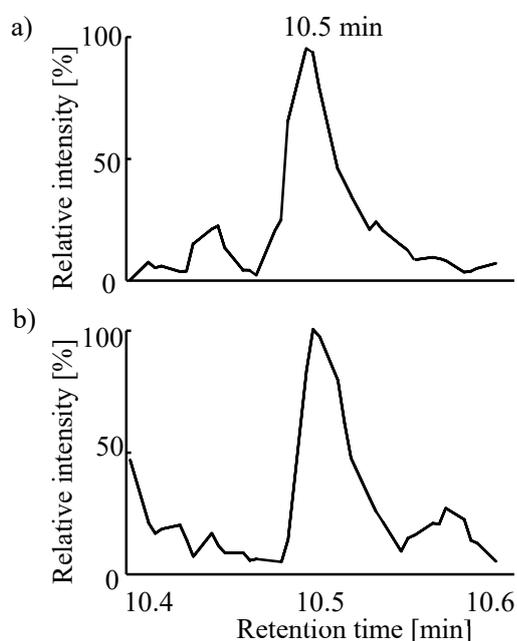


図 4: 候補物質の EIC

(GC-HRMS 分析, m/z 207.14 \pm 0.05)

a) ウログレナ培養液, b) 水道原水試料

2.2 GC-O 分析

3 名のパネラーにより、水道原水 3 検体について、GC-O 分析を実施した。全 9 回の分析において、臭気が検出された保持時間を集計したところ、その総数は 129 であった。しかしこれらの臭気の中には、1 名のパネラーのみが検知したもののように、再現性を確認できない臭気が多数含まれて

いた。そのため、複数のパネラーが共通して検知した再現性の高い臭気のみを絞り込んだ。

絞り込みを行った結果、良好な再現性が確認されたのは保持時間 7.5 分, 9.2-9.5 分, 10.0-10.5 分の 3 つであり、それぞれ黒糖臭, 金属臭, 牛乳臭が検知された。これらのうち、牛乳臭については、前節で確認した候補物質の保持時間とよく一致しており、同物質が有臭成分であることが示唆された。また、黒糖臭および金属臭については、同物質以外の生ぐさ臭原因物質の候補であると考えられる。今後は、電子イオン化および電界イオン化を備えた GC-HRMS 分析を実施することにより、これら 2 成分についてより詳細な検討を実施予定である。

しかし、いずれの保持時間においても、生ぐさ臭は検知されなかった。上述の 3 つの臭気が混合すると生ぐさ臭として感じられるとも予想されるが、今後の検討が必要である。

F.健康危険情報

該当なし

G.研究発表

1) 論文発表

Takanashi H, Shinfyku Y, Nakajima T, Ogura A, Kitamura H, Akiba M. Exploration of an Odorous Aldehydes and Ketones Produced by *Uroglena americana* Using High Resolution Mass Spectrometry, GC-Olfactometry, and Multivariate Analysis. *Chemosphere*. (*in press*)

Shinfyku Y, Nakamura T, Takanashi H, Nakajima, Ueda T, Akiba M. A Method to Purify a DNPH-derivatized Sample Using Solid Phase Extraction. *Environmental Science*. (*in press*)

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-HRMS と多変量解析の組み合わせによる水道水生ぐさ臭原因物質の探索, 第 67 回質量分析総合討論会, 1P-30
Yuta Shinfuku, Hirokazu Takanashi, Tsunenori Nakajima, Michihiro Akiba,

Exploration of a causative compound of fishy-smell in raw water for taps by combining a LC-HRMS, a GC-O-HRMS, and multivariate analyses, 第 28 回環境化学討論会, 1D-05

Yuta Shinfuku, Hirokazu Takanashi, Tsunenori Nakajima, Michihiro Akiba, Exploration of a Causative Substance of Fishy-Smell in Raw Water for Taps by Combining a LC-HRMS, a GC-O-HRMS, and Multivariate Analyses, Water and Environment Technology Conference 2019, 1C-15

新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏, LC-HRMS と多変量解析の組み合わせによる水道水中の生ぐさ臭原因物質の探索および構造推定, 第 22 回日本水環境学会シンポジウム,

新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏, 多変量解析と LC-HRMS および GC-O-HRMS の組み合わせによる水道水中の生ぐさ臭原因物質の探索, 環境科学会 2019 年会, P-26

Yuta Shinfuku, Hirokazu Takanashi, Tsunenori Nakajima, Michihiro Akiba, Exploration of an odorous metabolite of *uroglena americana* using high resolution mass spectrometry, GC-Olfactometry, and multivariate analyses, Water and Environment Technology Conference 2019, 2-120S

新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏, 多変量解析, LC-HRMS, GC-O および GC-HRMS による水道水生ぐさ臭原因物質の探索, 第 54 回日本水環境学会年会, 3-I-11-4. (学会中止, 誌上発表)

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) Nakahara. M., Takano. R., Ito. H., Yano. H., Hirase. S. and Harimaya. K. (1988) . Volatile Constituents of *Uroglena americana* (Chrysophyceae), *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **62**, 35-37.
- 4) 秋葉道宏, 高梨啓和, 小倉明生, 北村壽朗 (2019) 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 令和元年度分担研究報告書
- 5) Fu, X., Y. Zhang, S. Shi, F. Gao, D. Wen, W. Li, Y. Liao, and H. Liu (2006) Fragmentation study of hexanitrostilbene by ion trap multiple mass spectrometry and analysis by liquid chromatography/mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **20**, 2906-2914.
- 6) Zwiener, C., T. Glauner, and F. Frimmel, 2002. Method optimization for the determination of carbonyl compounds in disinfected water by DNPH derivatization and LC-ESI-MS-MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **372**, 615-621.

- 7) Daniel P. Demarque, Antonio E. M. Crotti, Ricardo Vessecchi, Joao L. C. Lopes and Norberto P. Lopes (2016) Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products, *Natural Product Reports*, **33**, 432-455.
- 8) Perraud, V., Li X., J.N. Smith, Barbara J. Finlayson-Pitts (2019) Novel ionization reagent for the measurement of gas-phase ammonia and amines using a stand-alone atmospheric pressure gas chromatography (APGC) source, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, e8561.
- 9) Durán-Peña, M.J., M. E. Flores-Giubi, J. M. Botubol-Ares, L. M. Harwood, I. G. Collado, A. J. Macías-Sánchez and R. Hernández-Galán (2016) Chemoselective and stereoselective lithium carbenoid mediated cyclopropanation of acyclic allylic alcohol, *Organic and Biomolecular Chemistry*, **14**, 2731-2741.

