

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と簡易分析手法の提案

研究代表者	秋葉	道宏
研究分担者	高梨	啓和
研究協力者	藤原	俊一郎
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と簡易分析手法の提案

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	藤原 俊一郎	京都市上下水道局 水質管理センター 担当係長
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

水道水の生ぐさ臭は、被害件数が2番目に多い異臭味障害であるが、その原因物質は十分に明らかにされているとは言い難い。このため、機器分析による水質管理は行われておらず、官能試験による水質管理が行われている。そこで本研究では、機器分析による水質管理を可能とするために、原因物質の構造や分析条件を明らかにすることを目的とした。

以前の研究により、原因物質の分子式は $C_{13}H_{20}O_3$ であること、構造内に2個のカルボニル基、シクロヘキセン環を含むことが示唆されている。本研究により、2個のカルボニル基の一方は末端ケトンであること、もう一方はシクロヘキセン環に酸素原子が直接付加したシクロヘキセノンであることが示唆された。さらに、メトキシ基を有すること、プロピル基またはブチル基を有することが示唆された。これらの情報に基づき、原因物質の構造を4つの異性体まで絞り込むことに成功した。また、GC-MSを用いて分析する際の条件を検討し、無極性カラムに対する原因物質の保持指標と電子イオン化法を用いた際のマススペクトルを得て、汎用的・標準的な分析条件を確立した。

A. 研究目的

水道水の異臭味被害の中で2番目に被害件数が多い生ぐさ臭¹⁾は、原因物質として1-ヘプタナール、(2E,4E)-ヘプタジエナール、(2E,4Z)-ヘプタジエナール、(2E,4Z)-デカジエナール、(2E,4E,7Z)-ジエナール²⁾が指摘されている。しかし、浄水場では、これらの物質から生ぐさ臭を感知することができないという意見があり、原因物質が他に存在することが示唆されている。このように、生ぐさ臭については十分な知見が集積されておらず、現在、日本の水道法において、物質の濃度ではなく臭気強度 (TON) を基にした官能試験による管理に留まっている。生ぐさ臭の臭気原因物質が明らかになれば、発生機構の詳細検討や発生予測、物性に基づいた除去技術の開発、水質検査の簡易化・高精度化・迅速化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質の同定には困難を伴う。未知物質の同定には、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 (NMR) 装置による構造解析、質量分析計 (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 ～数 mg 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 程度得ることは相当な労力が必要で困難と予想されるため、検討の初期段階からこれらの手法を用いることは得策ではない。

これに対して MS 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ので、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。このため、検討の初期段階から用いることができる。一方、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イオン源を備えた質量分析計が適している。分子量情報を得た後に、ハードなイオン化法などを用いて、分析種 (原因物質) の開裂反応を観察して構造情報を取得する必要がある。

そこで本研究では、昨年度までの LC-MS を用いたソフトなイオン化で得た分子量情報、および開裂反応を観察して得た構造情報に基づき、ハードなイオン化法を用いた構造推定結果の検証、および詳細な構造推定をおこなうことを目的とした。さらに、構造が確定しない状況でも、広く普及している GC-MS を用いて原因物質を分析する

ための条件を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 試料水

黄色鞭毛藻のウログレナ (*Uroglena americana*) による生ぐさ臭の被害が発生している際に採取された水道原水を、既報³⁾に準じて固相抽出により濃縮・精製し、高分解能 GC-MS を用いて分析した。

2. 分析

濃縮・精製した試料を、高分解能 GC-MS (JMS-T200GC AccuTOF GCx-Plus, JEOL) を用いて分析した。イオン源には電子イオン化 (EI) および電界イオン化法 (FI) を、分離カラムには DB-5MS (膜厚 0.25 μm , 内径 0.25 mm, 長さ 60 m, Agilent Technologies) を用いた。分離カラムの昇温プログラムは、50 $^{\circ}\text{C}$ (0-1.5 min), 200 $^{\circ}\text{C}$ (1.5-31.5 min), 200 $^{\circ}\text{C}$ (31.5-41.5 min) とした。キャリアガスにはヘリウムを使用し、流速は 1 mL/min (線速度 33.95 mm/sec) とした。

3. 標準的な分析条件の検討

イオン化法は、普及が進んでおり、条件が標準化されている EI を採用した。保持指標を求めるときに用いる分離カラムは、保持指標のデータベースで収録例が多い無極性カラムである DB-5MS を採用することにした。保持指標の算出に必要な n -アルカン⁴⁾は、ジーエルサイエン社の炭化水素混合試料ヘキサソル溶液を用いた。

C. 結果および D. 考察

1. 水道水生ぐさ臭原因物質の EI マススペクトルの取得

昨年度までの LC-MS とは異なり、本研究では GC-MS を用いるため、原因物質のカラム保持時間が不明である。そこで、FI 法を用いたイオン化を行い、原因物質の分子イオン (m/z 224) を得てカラム保持時間を求めた。

イオン化法を FI 法から EI 法に変えて、同一のガスクロマトグラフを用いて分離条件を変えずに再度分析を行った。FI 法で求めたカラム保持時間における EI マススペクトルを取得したところ、図 1 に示す原因物質のマススペクトルが再現性よく得られた。

2. 水道水生ぐさ臭原因物質のカルボニル基の構造推定

得られたマススペクトルを解析して原因物質のカルボニル基の構造を推定した。推定は、カルボニル化合物の典型的なフラグメンテーション機構である α 開裂に着目して行った。 α 開裂は、図 2 に示すカルボニル基の α 位の結合が開裂する

反応である。 α 開裂に伴い観察されるプロダクトイオンは、カルボニル化合物がアルデヒドである場合は m/z 29 のホルミルカチオンが観察され、ケトンであれば炭素鎖長に応じた m/z のプロダクトイオンが観察される。原因物質の分子イオンとホルミルカチオンについてそれぞれ抽出イオンクロマトグラムを描写したところ、図 3 に示すようにホルミルカチオンのピークは観察されなかった。このため、原因物質のカルボニル基は 2 個ともアルデヒドではなくケトンと予想された。

そこで、ケトン由来のプロダクトイオンが検出されるか確認したところ、FI 法で検出した原因物質の分子イオン (m/z 224) と同一のカラム保持時間に、 m/z 43 のイオン (アセチルカチオン) が原因物質の分子イオンと同様のピーク形状で検出された。このため、原因物質はアルキル鎖の末端にケトンを有する (末端ケトン構造を有する) ことが示唆された。一方、アセチルカチオン以外の炭素鎖長の異なるケトン由来のプロダクトイオンは発見されなかった。

したがって、生ぐさ臭原因物質はアルデヒド基を有しておらず、2 個のカルボニル基はいずれもケトンであること、そのうち 1 個は末端ケトン構造であることが示唆された。

3. 水道水生ぐさ臭原因物質の構造推定結果の検証と全体構造の推定

原因物質のマススペクトルを解析して、原因物質の全体構造を推定した。解析に際し、3 種のプロダクトイオン (m/z 57.0362, 85.0685, 193.1281) に着目した。図 4 に示すように、プロダクトイオン m/z 57.0362 および m/z 85.0685 は、シクロヘキセン環の π 電子に生じたラジカルカチオンによるアルキルケトン部位の脱離生じて m/z 85.0685 が生成し、次いでこのイオンが単純誘起開裂を起こして m/z 57.0362 が生成したと推定した。すなわち、これらのイオンの検出により C5 (ペンタノン) 以上のアルキルケトンの存在が示唆された。

また、プロダクトイオン m/z 193.1281 の生成を説明可能なフラグメンテーション反応として、単純誘起開裂に伴うメトキシ基の脱離が推定された。

原因物質の分子式が $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3$ であること、および昨年度に示唆されたシクロヘキセンを鑑みて、含まれている酸素系官能基は C5 (ペンタノン) 以上のアルキルケトンが 1 個、メトキシ基が 1 個、シクロヘキセン環に直接酸素原子が結合してシクロヘキセノン環であることが示唆された。これらは、これまでの構造推定結果と矛盾しない。

得られた部分構造を組み合わせると、図 5 に示す 4 個の異性体に限定することができた。

4. 生ぐさ臭原因物質の簡便な化学分析方法の提

案

簡便な化学分析方法として、装置コストが安価、かつ操作が容易であり広く普及している GC/MS を用いた分析法に着目した。イオン化法および質量分離部も、同様に装置コストが安価、かつ操作が容易な EI 法、四重極型質量分離部に着目した。さらに、分離カラムも、安価で広く普及している無極性カラムを用いた方法を検討した。

得られたマススペクトルを解析する手段として、米国 National Institute of Standards and Technology (NIST) が開発して無償公開している GC-EI-MS 用の自動同定ソフトである AMDIS を用いることを検討した。AMDIS を用いて原因物質の検出の有無を自動的に判定するのに必要な情報は、原因物質のマススペクトルと分離カラムへの保持指標である。マススペクトルは、図 1 に示したものを登録できるようにした。保持指標を求めるために *n*-アルカン混合標準液を原因物質と同条件で測定した結果から、原因物質のカラム保持時間を保持係数に換算した結果、原因物質の保持係数 (RI) は 1,694 であった。

E. 結論

令和元年度に推定された水道水生ぐさ臭原因物質の構造について、電子イオン化で得られたフラグメントイオンを解析して検証した。検証の結果、4 個の異性体に限定することができた。また、浄水場への導入が進んでいる汎用型 GC-MS を用いて、簡便な分析方法を提案した。本提案に基づいて分析すれば、推定された物質の相対的な濃度を実測可能である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shinfuku Y, Takanashi H, 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*, 257, 127174, 2020.

Shinfuku Y, Nakamura T, Takanashi H, Nakajima, Ueda T, Akiba M. A Method to Purify a DNPH-derivatized Sample Using Solid Phase Extraction. *Environmental Science*, 33(5), 70-78, 2020.

2. 学会発表

新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏, LC-HRMS, GC-O, GC-HRMS, 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 68 回質量分析総合討論会, 2020.5, オンライン.

山下優輝, 新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏, ガスクロマトグラフ-高分解能質量分析計を用いた水道水中の生ぐさ臭原因物質の構造推定, 環境科学会 2020 年会, 2020.9, , オンライン.

山下優輝, 新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏, 生ぐさ臭を呈する水道原水から発見されたカルボニル化合物の構造推定, 第 55 回日本水環境学会年会, 2021.3, , オンライン.

新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏, ガスクロマトグラフ高分解能質量分析計による水道水生ぐさ臭原因物質の構造推定, 第 55 回日本水環境学会年会, 2021.3, オンライン.

Yuta Shinfuku, Hirokazu Takanashi, Tsunenori Nakajima, Michihiro Akiba, An Exploration of the Causative Substance of Fishy Smell in Raw Water for Taps by Combining High Resolution Mass Spectrometry and Multivariate Analysis, The 23rd Symposium of Japan Society on Water Environment Online, 2020.9, online.

Yuta Shinfuku, Hirokazu Takanashi, Tsunenori Nakajima, Michihiro Akiba, An Exploration of the Causative Substance of Fishy Smell in Raw Water for Taps by Combining High Resolution Mass Spectrometry with Multivariate Analysis, Water and Environment Technology Conference 2020 Online, 2020.11, online.

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. 実用新登録

該当なし

3. その他

該当なし

I. その他 (受賞等)

新福優太, 公益社団法人日本水環境学会博士研究奨励賞 (オルガノ賞), An Exploration of the Causative Substance of Fishy Smell in Raw Water for Taps by Combining High Resolution Mass Spectrometry and Multivariate Analysis, 2020.9, 公益社団法人日本水環境学会.

山下優輝, 2020 年会優秀発表賞 (富士電機賞), ガスクロマトグラフ-高分解能質量分析計を用いた水道水中の生ぐさ臭原因物質の構造推定, 2020.9, 公益社団法人環境科学会.

山下優輝, 第 55 回日本水環境学会年会学生ポスター発表特別賞 (ライオン特別賞), 生ぐさ臭を呈する水道原水から発見されたカルボニル化合物の構造推定, 2021.3, 公益社団法人日本水環境学会.

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。ここに記して謝意を表す。

K. 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) 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

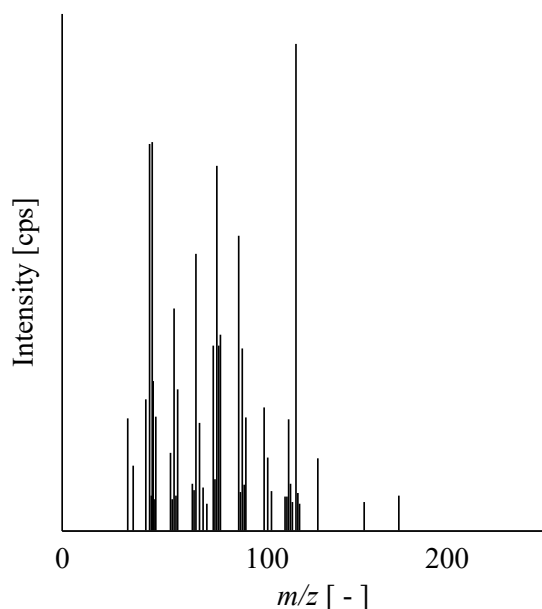


図1 水道水生ぐさ臭原因物質のEI マスペクトル

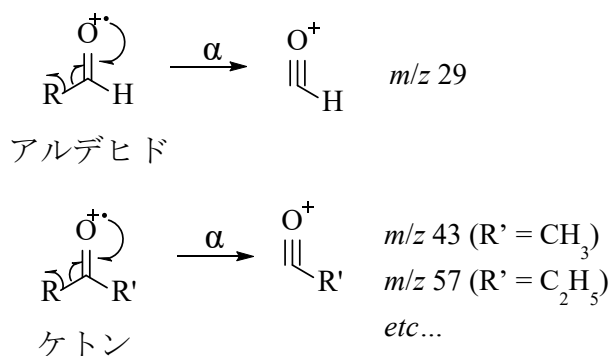


図2 アルデヒドおよびケトンの α 開裂機構

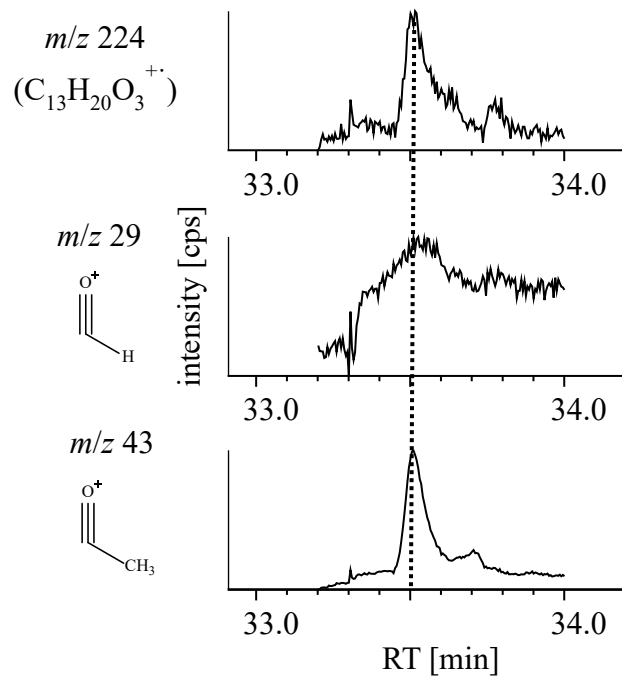


図3 水道水生ぐさ臭原因物質のカルボニル基の構造推定
 (上段：原因物質の分子イオンの抽出イオンクロマトグラム,
 中段：ホルミルカチオンの抽出イオンクロマトグラム,
 下段：アセチルカチオンの抽出イオンクロマトグラム)

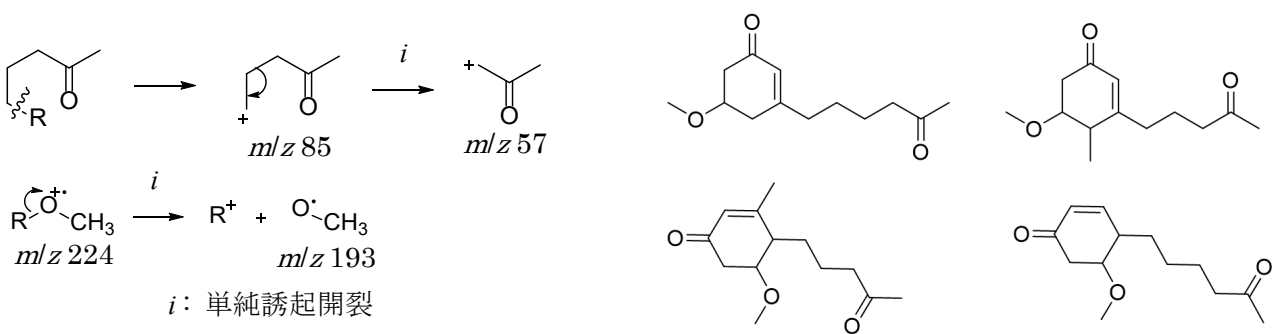


図4 着目したプロダクトイオンの生成機構の推定 図5 水道水生ぐさ臭原因物質の全体構造の推定

