

障害生物発生時における分析方法の開発と  
効率的な浄水処理システムの提案

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）  
気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価とその適応性の強化に向けた研究  
分担研究報告書

研究課題：障害生物発生時における分析方法の開発と効率的な浄水処理システムの提案

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 特任研究官
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

水道水の異臭障害の中で 2 番目に発生件数が多い生ぐさ臭の原因物質は、十分に解明されているとは言いがたい。このため浄水場では、機器分析による水質管理は行われておらず、官能試験によって管理されている。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。これまでの研究により、原因物質は、分子式が  $C_{13}H_{20}O_3$ 、3~4 位にヘキシル-2-オンが置換され、5~6 位に  $CH_3O$  が置換された 2-シクロヘキセン-1-オンと推定され、12 種類の構造異性体（48 立体異性体）のいずれかと予測されているが、さらなる構造推定が必要である。そこで本年度は、質量分析、選択的誘導体と量子化学計算を用いて構造推定を進めることとした。検討の結果、1 種類（2 立体異性体）まで候補構造を絞り込むことに成功した。また、試料大容量注入型のガスクロマトグラフ-質量分析計（GC-MS）を用いることにより、水道原水中の原因物質が分析可能なことを示した。

A. 研究目的

水道水の異臭被害の中で 2 番目に被害件数が多い生ぐさ臭<sup>1)</sup>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<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、および生ぐさ臭が複合臭であ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。生ぐさ臭の原因物質（以下、Fishy Smell X, FX）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る、有益である。

以上のように、FX 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）による分子式推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  $\mu\text{g}$ ~数  $\text{mg}$  必要になる。揮発性物質と考えられる FX を、精製した上で数百  $\mu\text{g}$  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ガスクロマトグラフ-質量分析計（GC-MS）や液体クロマトグラフ-質量分析計

（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、どのような構造の物質なのかを事前に推定する必要がある。構造の推定には、分析種の分子量情報を保存した状態で精密質量を測定して分子式を推定することから始める必要がある。分子量情報を保存した状態で測定するためには、エレクトロスプレーイオン化（ESI）法などのソフトイオン化法でイオン化可能な質量分析計が適している。分子量情報を得た後に、電子イオン化（EI）法などのハードイオン化法で FX に過剰なエネルギーを与えてイオン化させ、イオン化とほぼ同時に分解（結合開裂）させて構造情報を取得する必要がある。

昨年度までに FX の分子式を推定し、さらに LC-ESI-MS<sup>n</sup> と GC-EI-MS を用いて構造を部分的に推定した結果、FX の分子式は  $C_{13}H_{20}O_3$  であり、構造中にメトキシ基またはその異性体を 1 個、炭素鎖長 6 のアルキルケトン（ヘキシル-2-オン）を 1 個有するシクロヘキセノン（2-シクロヘキセン-1-オン）と推定された。昨年度末の時点では、メトキシ基またはその異性体 1 個について、官能基の構造および置換位置に見落としがあった。これを見直した結果、FX の推定構造の全体構造は、図 1 に示す 12 種類の構造異性体（48 立体異性体）のいずれかと考えられるが、詳細は不明なままである。

そこで本年度は、12 種類の構造異性体（48 立体異性体）について、選択的誘導体化反応と量子化学計算に基づいた絞り込みを実施した。さらに、構造が確定しない状況でも、広く普及し

ている GC-EI-MS を用いて原因物質を分析するための検討を実施した。

## B. 研究方法

### 1. 選択的誘導体化反応による生ぐさ臭原因物質の構造推定

図 1 に示した 12 種類の構造異性体 (48 立体異性体) のうち、シクロヘキセノンの 5 位および 6 位に置換している官能基の構造を推定する目的で、選択的誘導体化を実施した。2018 年 4 月 13 日に生ぐさ臭が発生した際に採取・濃縮したサンプル 300  $\mu\text{L}$  にモレキュラーシーブ (3A) を添加した後、無水ピリジン 50  $\mu\text{L}$  を混合して室温下で 1 時間放置した。その後、試料に TMS-imidazole (東京化成, >98.0%) 600  $\mu\text{L}$  を添加し、室温下で 1 時間放置した。最後に、孔径 0.22  $\mu\text{m}$  の疎水性 PTFE メンブレンフィルター (島津ジーエルシー, 東京) により濾過し、その濾液を GC-FI-HRMS (7890B-JMS-T200GC AccuTOF GCx-plus, Agilent Technologies, CA, JEOL, 東京) での分析に供した。

### 2. 量子化学計算による生ぐさ臭原因物質の構造推定

図 1 に示した検討対象の構造のうち、メトキシ基 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ) が 5 位に置換した構造を対象に量子化学計算を実施して、FX の構造を推定した。計算は、計算プログラム GRRM17 用いて非調和下方歪追跡-超球面探索法 (ADDF-SHS) 法<sup>3,4)</sup>を用いて 5,400 時間、すなわち 225 日間実施した。計算レベルは PM6-D3 とした。エネルギー、勾配、二次微分行列は、Gaussian16 を用いて算出した。

### 3. 生ぐさ臭原因物質の分析方法の検討

TON=5 の水道原水に含まれる FX を濃縮倍率 1,000 倍の条件で検出することを目標として、試料大容量注入型 GC-MS を用いて分析するための試料注入条件を検討した。GC-MS は、7890B-JMS-T200GC AccuTOF GCx-plus を用い、イオン源には EI を、分離カラムには DB-5MS (膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ , 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、30  $^{\circ}\text{C}$  (1.5 min)  $\rightarrow$  5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$   $\rightarrow$  200  $^{\circ}\text{C}$  (3 min) とした。キャリアガスにはヘリウムを使用し、流速は 1.0 mL/min (線速度 33.95 mm/sec) とした。注入溶媒はジクロロメタン、注入液量は 50  $\mu\text{L}$  とした。

## C. 結果および D. 考察

### 1. 選択的誘導体化反応による生ぐさ臭原因物質の構造推定

本研究で用いた TMS-imidazole は、様々なシリル化剤と比較してヒドロキシ基との反応性が高く、アミン類とは反応しない<sup>5)</sup>ことが知られる。このため、FX のシクロヘキセノンの 5 位または 6 位に置換している  $\text{CH}_3\text{O}$  がメトキシ基ではなく、ヒドロキシ基と他の官能基の組み合わせなど ( $-\text{OH}$  と  $-\text{CH}_3$  の組み合わせ、または  $-\text{H}$  と  $-\text{CH}_2\text{OH}$  の組み合わせ) であれば、図 2 のように

$m/z$  296.180 の誘導体化物が生成すると考え、水道原水の濃縮試料を TMS-imidazole で誘導体化して GC-FI-HRMS で分析した。分析で用いた FI は、代表的なソフトイオン化法であり誘導体化物の分子イオン ( $m/z$  296.180) を検出可能と考えられる。

実験に先立ち、誘導体化処理を施していない試料を測定したところ、FX の分子イオンである  $m/z$  224.141 のピークが複数観察され、保持係数とマススペクトルから 14.53 min のピークが FX と確認され、試料中に FX が含まれていることが確認された。

次に、誘導体化処理を施した試料を測定した。その結果、図 3 上段に示すトータルイオンクロマトグラムのように、19.03, 22.39, 23.97 min など複数のピークで  $\text{C}_{16}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_5\text{Si}$ ,  $\text{C}_{17}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_3\text{Si}$ ,  $\text{C}_{19}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_4\text{Si}$  のような O-Si を有する TMS 誘導体化物が検出された。これらは誘導体化処理を施していない試料からは検出されなかったことから、試料に含まれるヒドロキシ化合物が TMS 化されて検出されたと考えられる。

このように、誘導体化反応が起きていることを確認できたので、FX の誘導体化物の分子イオン ( $m/z$  296.180) を探索したところ、図 3 下段に示す抽出イオンクロマトグラムのように検出されなかった。このため、FX の  $\text{CH}_3\text{O}$  はヒドロキシ基を含まず、メトキシ基と考えられる。メトキシ基を仮定すると、FX の候補構造は図 4 に示す 4 種類の構造異性体 (12 立体異性体) となる。

### 2. 量子化学計算による生ぐさ臭原因物質の構造推定

図 4 に示した構造のうち、メトキシ基が 5 位に置換した 6 種類の立体異性体を対象に量子化学計算を実施した。6 種類のうち、1 種類については計算することができなかった。残りの 5 種類を対象に計算した結果、21,348 個の安定構造 (EQ), 38,031 個の遷移状態構造 (TS), 2,094 個の TS を経ない開裂構造 (UpDC), 6,521 個の TS を経る開裂構造 (DownDC), 合計 67,994 個の構造が発見された。これらの構造のうち、UpDC と DownDC に着目して開裂反応の種類を検討した結果、同一  $m/z$  のプロダクトイオンを生成する反応が数多く発見され、異なるプロダクトイオンを生成する反応は 31 種類であった。

発見された開裂反応のうち、FX のシクロヘキセノンに置換しているヘキシル-2-オンの置換位置の判別に有効な開環反応を検討したところ、ヘキシル-2-オン 3 位置換体と 4 位置換体の両方から図 5 に例を示すような 27 種類の開環反応が発見された。シクロヘキセノン環の開環位置を検討したところ、シクロヘキセン環のすべての環結合での開環反応が進行していた。そこで、ヘキシル-2-オン 3 位置換体と 4 位置換体の両方で、シクロヘキセン環の 3 位の炭素原子と 4 位の炭素原子の間の結合が開裂した開環構造に着目した。着目した開環構造から逐次的に進行する開裂反応を予測した結果、図 6 に例を示す開環反応が予想された。予測された開環反応で生成するプロダクトイオンの抽出イオンクロマト

グラム (EIC) を、生ぐさ臭を呈したサンプルの測定結果に対して描いた。その結果、図 7 に例を示すように、FX の基準ピークである 33.47 分にピークが観察されたのは、ヘキシル-2-オン 3 位置換体から生成すると予想された  $m/z$  124.0883 であり、ヘキシル-2-オン 4 位置換体から生成すると予想された  $m/z$  111.0441 は観察されなかった。今後、量子化学計算を進めて、ヘキシル-2-オン 3 位置換体から  $m/z$  124.0883 となる開裂反応が発見されることを確認する必要があるが、ヘキシル-2-オン 4 位置換体から  $m/z$  124.0883 の生成は考えにくいので、ヘキシル-2-オン 3 位置換体が推定される。

同様の検討をメトキシ基の置換位置についても実施したところ、メトキシ基はシクロヘキセン環の 6 位に置換していると予想された。以上を総合すると、図 8 に示す 1 種類 (2 立体異性体) まで候補構造を絞り込むことに成功した。

### 3. 生ぐさ臭原因物質の分析方法の検討

本年度は、検討に適した臭気強度の水道原水を入手できなかった。このため、2017~2022 年に採水した水道原水を Sep-Pak PS2 (日本ウォーターズ) を用いて 3,000~6,500 倍に濃縮し、溶媒で希釈して模擬サンプルを得て試料注入条件を検討した。試料注入条件として、注入口温度の検討、試料注入速度、ベントガス流量および時間、溶媒待ち時間を検討した。その結果、図 9 に示すように、検討に用いた 3 検体すべてで、高感度化の目標である破線より低濃縮倍率での FX 検出を確認することに成功し、高感度化を達成した。今後、検討に適した臭気強度の水道原水を入手して確認する必要がある。

### E. 結論

選択的誘導体化反応と量子化学計算を用いて生ぐさ臭原因物質の構造を検討した結果、候補構造を 1 種類 (2 立体異性体) まで絞り込むことに成功した。立体配置が異なると臭気の有無が異なる可能性があるため、本来は立体異性体を区別する必要がある。しかし、日常業務において立体異性体を区別して分析するのは困難と考えられ、両者の総濃度として管理する可能性を検討する必要がある。

また、本研究で推定した物質は、多変量解析で TON および原因生物濃度と相関する物質を抽出した結果、得られた物質である。その物質の構造も、質量分析、選択的誘導体化反応と量子化学計算を用いて推定した構造である。今後は、推定された物質を入手し、生ぐさ臭と関係するか否か、管理指標として適切か否かを検証する必要がある。

### F. 健康危険情報

該当なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Yuta Shinfuku, Hirokazu Takanashi, Tsunenori Nakajima, Ikuro Kasuga,

Michihiro Akiba (2022) The Status Quo of Causal Substance Exploration for Fishy Odor in Raw Water for Taps. *J. Water and Environment Technology*, 20(2), 29-44.

#### 2. 学会発表

高岩 凜太郎, 山下 優輝, 新福 優太, 中島 常憲, 高梨 啓和, 秋葉 道宏, 試料大容量注入型 GC/MS による水道水生ぐさ臭の未知原因物質の相対定量法の開発, 第 57 回日本水環境学会年会, 2023 年 3 月 15 日-17 日, 松山.

山下優輝, 新福優太, 山田奈瑠実, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏, フラグメンテーション反応の全経路探索による水道水生ぐさ臭原因物質の構造推定, 第 57 回日本水環境学会年会, 2023 年 3 月 15 日-17 日, 松山.

山下優輝, 新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 超球面探索/非調和下方歪追跡法による水道水生ぐさ臭原因物質の構造推定, 第 70 回質量分析総合討論会, 2022 年 6 月 22 日-24 日, 福岡.

### 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。さらに、計算の一部は、東北大学のサイバーサイエンスセンターの計算機を用いて行われた。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) Ohno, K. and Maeda, S. (2004) A Scaled Hypersphere Search Method for the Topography of Reaction Pathways on the Potential Energy Surface. *Chem. Phys. Lett.*, 384, 277-282.

4) Maeda, S. and Ohno, K. (2003) A New Method for

Constructing Multidimensional Potential Energy Surfaces by a Polar Coordinate Interpolation Technique. *Chem. Phys. Lett.*, **381**(1-2), 177-186.  
 5) Horning, M. G., Moss, A. M., Horning, E. C. (1967) A new method for the separation of the catecholamines by gas-liquid chromatography. *Biochem. Biophys. Acta*, **148**, 597.

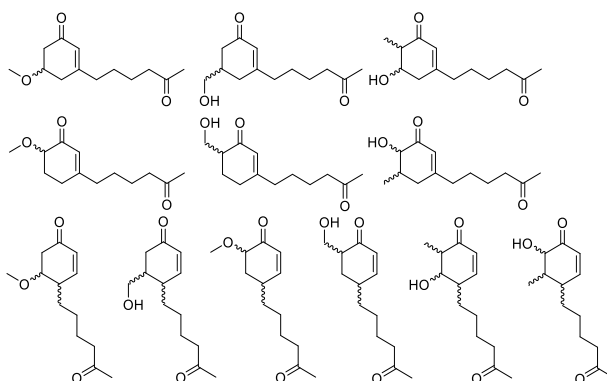


図 1 検討対象の構造

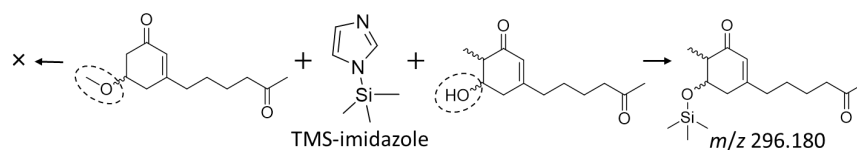


図 2 TMS-imidazole によるヒドロキシ基の選択的誘導体化と想定される誘導体化物の  $m/z$  値

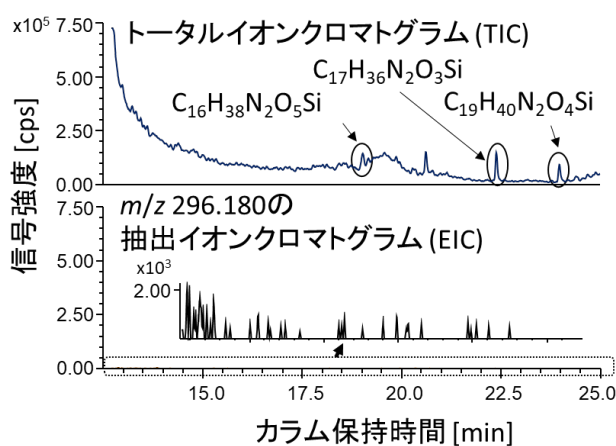


図 3 選択的誘導体化による  $\text{CH}_3\text{O}$  の構造推定

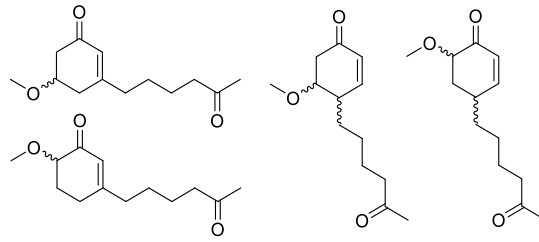


図4 選択的誘導体化で否定されなかった構造

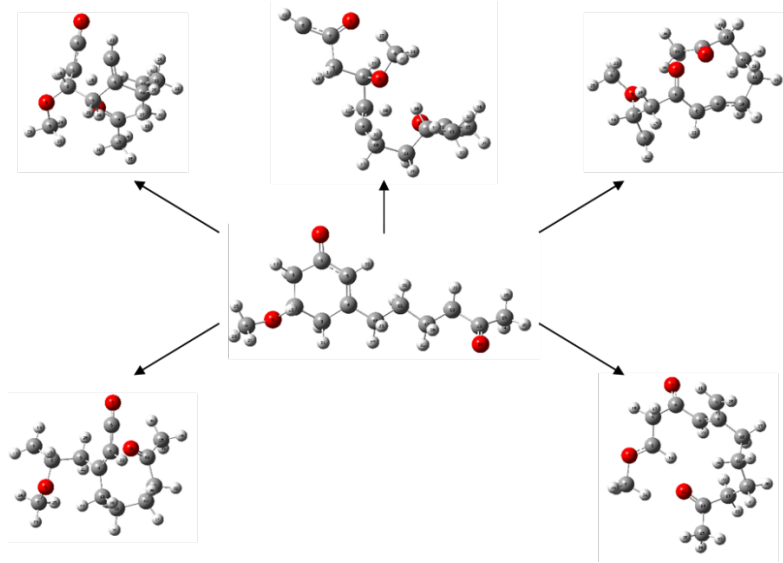


図5 ヘキシル-2-オン 3 位置換体から発見された開裂構造の例

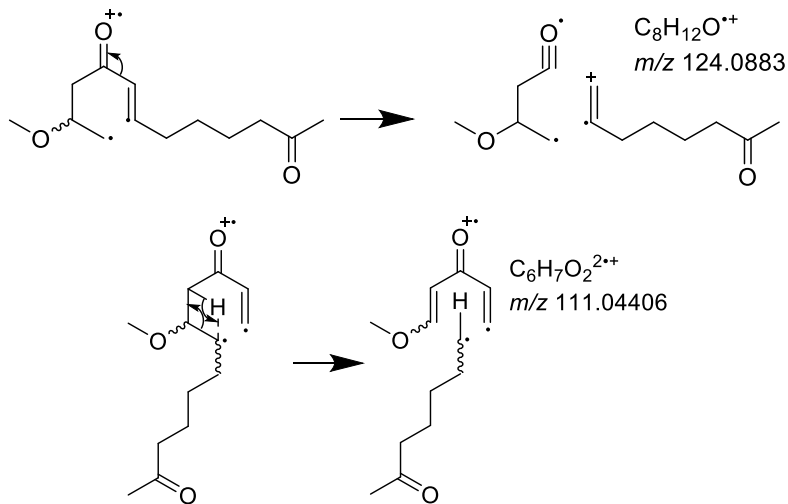


図6 ヘキシル-2-オン 3 位置換体の開環構造からの逐次開裂反応の例

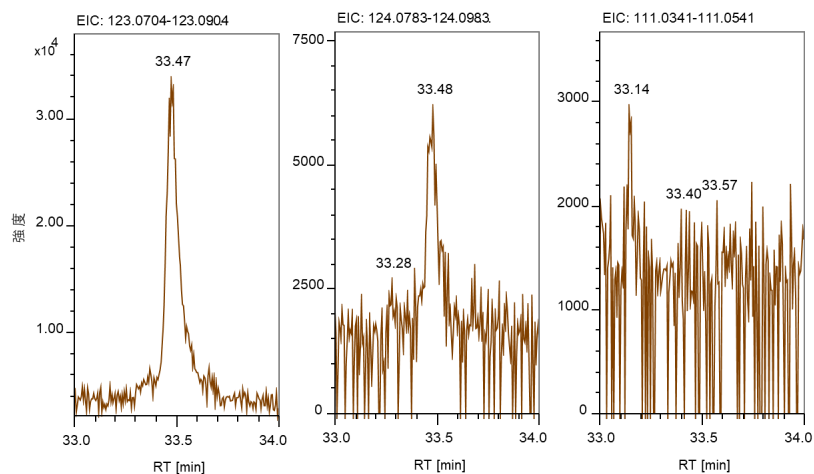


図7 ヘキシル-2-オンのシクロヘキセン環置換位置の検討例

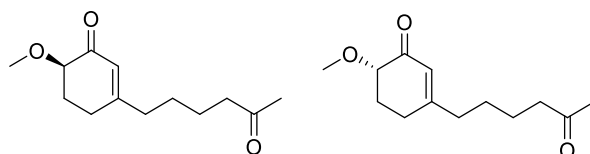


図8 選択的誘導体化反応と量子化学計算による生ぐさ臭原因物質の構造推定結果

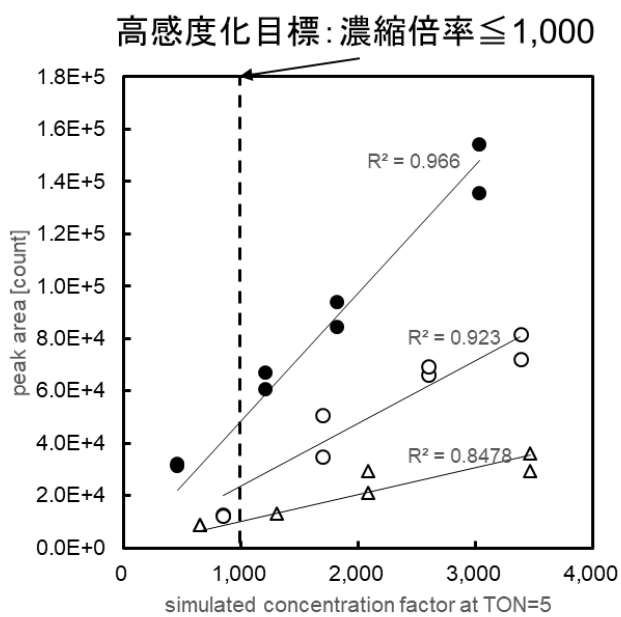


図9 試料大容量注入型 GC/MS による水道水生ぐさ臭の未知原因物質の相対定量