

学位論文

高分解能質量分析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と構造推定

**Exploration and Structural Elucidation of the Causative Substance
of Fishy Smell in Raw Water for Taps Using the Combination of High
Resolution Mass Spectrometry and Multivariate Analysis**

2022年 3月

鹿児島大学大学院理工学研究科

新福 優太

博士学位論文「高分解能質量分析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と構造推定」

目次

第 1 章 緒論

1. 日本の上水道にて発生しうる生物障害
 - 1-1. 生物障害の定義
 - 1-2. 生物障害の種類
 - 1-3. 異臭味障害の種類と原因生物
 2. 上水道の水質基準に係る日本の法規制
 - 2-1. 水道法第 4 条
 - 2-2. 水質基準項目と基準値
 - 2-3. 水質管理目標設定項目と目標値
 3. 水道水生ぐさ臭異臭味障害に関する既往研究
 - 3-1. 生ぐさ臭発生の歴史
 - 3-2. 生ぐさ臭との関連が指摘されている生物種
 - 3-3. 生ぐさ臭との関連が指摘されている化学種
 4. 質量分析による環境試料の高感度分析の有用性および多変量解析の必要性
 - 4-1. 質量分析による環境分析の有用性
 - 4-2. 質量分析と多変量解析の組み合わせ
 5. 高分解能質量分析を用いる分子式推定
 - 5-1. 分子式推定
 - 5-2. ジェネラルフラグメンテーションルール
 6. 本研究の目的と構成
- 本章の引用文献

第 2 章 固相抽出による 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (2,4-Dinitrophenylhydrazine: DNPH) 誘導体化試料の選択的精製

1. はじめに
2. 実験方法
 - 2-1. 使用した試薬および器具
 - 2-2. DNPH による試料の誘導体化
 - 2-3. 固相抽出による DNPH 誘導体化試料の精製
 - 2-3-1. 水系試料を対象とした固相抽出による精製
 - 2-3-2. 非水系試料を対象とした固相抽出による精製
 - 2-4. 液体クロマトグラフィー分析による DNPH 除去率および誘導体回収率の算出
 - 2-5. 量子化学計算による分析種間の相互作用の検討

- 2-5-1. 1 電子系における Schrödinger 方程式
- 2-5-2. 多電子系における Schrödinger 方程式の近似的解法としての密度汎関数理論
- 2-5-3. 密度汎関数理論計算における汎関数と基底関数
- 2-5-4. 分析種の構造最適化および振動モードの解析
- 3. 結果および考察
 - 3-1. 水系試料中における DNPH 誘導体の加水分解速度
 - 3-2. 非水系試料を対象とした固相抽出における精製効率
 - 3-2-1. 未反応 DNPH の除去率
 - 3-2-2. DNPH 誘導体の回収率
 - 3-3. 選択的精製機構
 - 3-3-1. 分析種の構造最適化
 - 3-3-2. 分析種の振動モード解析
 - 3-3-3. 固相-未反応 DNPH 間の相互作用エネルギー
 - 3-3-4. 固相- DNPH 誘導体間の相互作用エネルギー
- 4. 本章のまとめ
- 本章の引用文献

第 3 章 液体クロマトグラフィー質量分析および多変量解析による生ぐさ臭原因物質の探索

- 1. はじめに
- 2. 実験方法
 - 2-1. 水道原水試料の採水および前処理
 - 2-2. *Uroglena americana* 培養液試料の調製
 - 2-3. 水道原水試料および *Uroglena americana* 培養液試料の 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (2,4-Dinitrophenylhydrazine: DNPH) による誘導体化
 - 2-4. 液体クロマトグラフィー質量分析による水道原水試料および *Uroglena americana* 培養液試料の分析
 - 2-4-1. 逆相クロマトグラフィーの概要
 - 2-4-2. エレクトロスプレーイオン化法の概要
 - 2-4-3. 大気圧化学イオン化法の概要
 - 2-4-4. 液体クロマトグラフィー質量分析の実験条件
 - 2-5. 多変量解析による生ぐさ臭原因候補物質の絞りこみ
 - 2-5-1. 主成分分析
 - 2-5-2. 重回帰分析
 - 2-5-3. 部分最小二乗重回帰分析
 - 2-5-4. ピーク検出および差異解析

2-5-5. インターバル直交部分最小二乗回帰分析による原因物質の抽出

3. 結果および考察

3-1. 検出されたピークの総数および差異解析による生ぐさ臭と無関係なピークの除外

3-2. インターバル直交部分最小二乗回帰分析モデルの構築

3-2-1. 構築した回帰分析モデルの線形性

3-2-2. 回帰分析モデル構築における各解析対象イオンの寄与

3-3. 原因候補物質の分子式推定

3-3-1. 精密質量分析による原因候補物質の分子式推定

3-3-2. 天然同位体パターン解析による原因候補物質の組成推定

3-3-3. 大気圧化学イオン化法を用いた液体クロマトグラフィー質量分析による原因候補物質の分子量関連イオンの検出

4. 本章のまとめ

本章の引用文献

第 4 章 ガスクロマトグラフィー質量分析およびにおい嗅ぎガスクロマトグラフィーによる生ぐさ臭原因候補物質の臭気確認

1. はじめに

2. 実験方法

2-1. 水道原水試料および *Uroglena americana* 培養液試料の前処理

2-2. ガスクロマトグラフィー質量分析およびにおい嗅ぎガスクロマトグラフィーによる原因候補物質の臭気の検討

2-2-1. ガスクロマトグラフィーの概要

2-2-2. におい嗅ぎガスクロマトグラフィーの概要

2-2-3. ガスクロマトグラフィー質量分析およびにおい嗅ぎガスクロマトグラフィー分析の実験条件

3. 結果および考察

3-1. ガスクロマトグラフィー質量分析による生ぐさ臭原因候補物質の分子量関連イオンの検出確認

3-2. におい嗅ぎガスクロマトグラフィーによる水道原水試料の臭気確認

3-2-1. フェーズドシリカキャピラリーを用いる水道原水試料の複合臭気の確認

3-2-2. 低極性カラムを用いる水道原水試料中の臭気成分の分離および確認

3-2-3. 生ぐさ臭原因候補物質の保持時間における臭気確認

4. 本章のまとめ

本章の引用文献

第 5 章 液体クロマトグラフィー質量分析およびガスクロマトグラフィー質量分析による生ぐさ臭原因候補物質の構造推定

1. はじめに

2. 実験方法

2-1. 液体クロマトグラフィー質量分析を用いた多段階精密質量分析による原因候補物質の構造推定

2-1-1. 衝突誘起解離による分析種のフラグメンテーション

2-1-2. 閉殻フラグメンテーションルール

2-1-3. 多段階精密質量分析の実験条件

2-2. ガスクロマトグラフィー質量分析を用いた多段階精密質量分析による原因候補物質の構造推定

2-2-1. 電子イオン化法の概要

2-2-2. 電界イオン化法の概要

2-2-3. 保持指標の概要

2-2-4. 電界イオン化法を用いたガスクロマトグラフィー質量分析による原因候補物質の保持指標値の特定

2-2-5. 開殻フラグメンテーションルール

2-2-6. 電子イオン化法を用いたガスクロマトグラフィー質量分析による原因候補物質のマスペクトルの取得

3. 結果および考察

3-1. 液体クロマトグラフィー質量分析を用いた多段階精密質量分析による原因候補物質の構造推定

3-1-1. プロダクトイオンおよびニュートラルロス

3-1-2. 閉殻フラグメンテーション経路および原因候補物質の部分構造

3-2. ガスクロマトグラフィー質量分析による原因候補物質の構造推定

3-2-1. 原因候補物質の保持指標値

3-2-2. プロダクトイオンおよびニュートラルロス

3-2-3. 開殻フラグメンテーション経路および原因候補物質の部分構造

3-3. 閉殻フラグメンテーションルールおよび開殻フラグメンテーションルールに基づく構造推定結果の比較

4. 本章のまとめ

本章の引用文献

第 6 章 本研究の今後の展望

1. 密度汎関数理論を用いた量子化学計算による構造推定

2. 分取高速液体クロマトグラフィーおよび核磁気共鳴分光法による構造推定

3. 原因物質自動検出システムの構築および全国各地の水道事業体における原因候補物質の存在実態調査

4. 本章のまとめ

第7章 総括

謝辞

図表のタイトルの一覧

第 1 章 緒論

図 1-1 生物障害のイメージ図

図 1-2 発生した生物障害の種類と内訳

図 1-3 異臭味障害の種類と割合（事例数ベース）

図 1-4 水質基準項目、水質管理目標設定項目、要検討項目の位置付け

表 1-1 水質基準項目とその基準値

表 1-2 水質管理目標設定項目とその目標値

図 1-5 年代別の生ぐさ臭発生事例の報告論文数および発生国

表 1-3 生ぐさ臭との関連が指摘されている生物

表 1-4 生ぐさ臭との関連が指摘される化学種

表 1-5 天然同位体元素の精密質量と存在比

第 2 章 固相抽出による 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (2,4-Dinitrophenylhydrazine: DNPH) 誘導体化試料の選択的精製

図 2-1 DNPH 誘導体化の反応機構

図 2-2 スペクトルの周波数依存性および Raylei-Jeans の式

図 2-3 無限に深い井戸の中の電子

図 2-4 分子軌道法と DFT の比較

図 2-5 代表的な汎関数の一覧 (x: 交換汎関数、c: 相関汎関数、xc: 交換相関汎関数)

表 2-1 使用した構造最適化の収束条件

図 2-6 分析種の初期構造 a) DNPH、b) C7DNPH、c) WCX、d) WCX -DNPH 複合体、e) WCX C7DNPH 複合体

図 2-7 C1DNPH のピークエリアの経時変化(エラーバー:±SD)

図 2-8 各種固相の精製効率 (エラーバー:±CV)

図 2-9 使用した固相の樹脂構造一覧

表 2-2 各分析種の最適化構造のエネルギー

表 2-3 各分析種の最適化構造の収束状況

第 3 章 液体クロマトグラフィー質量分析および多変量解析による生ぐさ臭原因物質の探索

表 3-1 本研究で使用したサンプルの一覧と各種物性値

図 3-1 水道原水のろ過

- 表 3-2 Ur-1 培地の組成
- 表 3-3 *Uroglena americana* の培養条件
- 表 3-4 PS-2 の物性 (細孔容積孔径 20 nm 以下の値)
- 図 3-2 ESI におけるイオン化の概略
- 表 3-5 LC-HRMS 測定条件 (使用機器:Ultimate HPG-3400SD-LTQ Orbitrap XL)
- 図 3-3 PCA のイメージ図: どちらが八面体らしく見えるか
- 図 3-4 2次元データの投影方法の一例
- 図 3-5 新しい変数の導入によるデータ縮
- 表 3-6 ピーク検出時に使用したアダクトの一覧
- 表 3-7 サンプルユニークなイオンの探索
- 表 3-8 iOPLS の解析条件
- 表 3-9 OPLS 回帰分析 解析条件
- 図 3-6 OPLS 回帰モデルの概要 a: 実測 *U.americana* 中群数(横軸)と予測 *U.americana* 中群数(縦軸) b: LV 数と RMSECV の関係 c: 各物質の VIP Score
- 表 3-10 分子式推定時の構成元素の種類
- 表 3-11 候補物質の分子式推定結果
- 図 3-7 ESI(-)-HRMS スペクトル(RT 15.72 min) a) 実測マススペクトル、b) シミュレーションマススペクトル
- 図 3-8 水道原水サンプルおよび *U.americana* 培養液試料における EIC (m/z 403.163 \pm 1 ppm) a) *U.americana* 培養液試料、b) 水道原水試料
- 図 3-9 m/z 583.1906 の EIC (mass tolerance = 1.5 ppm) a) *U.americana* 培養液試料、b) 水道原水試料
- 図 3-10 FX の EIC(イオン化法:APCI、 m/z 403.1622、 mass tolerance = 3 ppm)

第4章 ガスクロマトグラフィー質量分析およびにおい嗅ぎガスクロマトグラフィーによる生ぐさ臭原因候補物質の臭気確認

- 図 4-1 GC カラム(キャピラリカラム)の構造
- 図 4-2 GC-O の概略図
- 表 4-1 GC-HRMS 分析条件
- 表 4-2 検討した FX の分子量関連イオンの一覧
- 図 4-3 FX の脱水プロトン付加体の EIC (a: *U. americana* 培養液試料、b: 水道原水試料)
- 図 4-4 FX の脱水プロトン付加体のマススペクトル (保持時間 10.4 分)
- 表 4-3 水道原水試料 (2018 年 4 月 20 日採水) の臭気成分分析の結果
- 表 4-4 再現性良く検知された臭気

第5章 液体クロマトグラフィー質量分析およびガスクロマトグラフィー質量分析による生 ぐさ臭原因候補物質の構造推定

図 5-1 閉殻フラグメンテーションルール

表 5-1 高分解能 LC/MS/MS を用いた多段階質量分析の分析条件

表 5-2 GC-EI/FI-MS 分析の分析条件

図 5-2 開殻フラグメンテーションルール

表 5-3 多段階精密質量分析により検出されたプロダクトイオンおよびニュートラルロスの
分子式

図 5-3 ニュートラルロス 3 種に対する閉殻 GFR による構造推定

図 5-4 直鎖アルカンのピーク（上段）および FX の EIC（下段）

図 5-5 アルデヒドおよびケトンの α 開裂

図 5-6 FX の分子イオン、 m/z 29、 m/z 43 の検出状況

図 5-7 m/z 85 のプロダクトイオンの生成機構例

表 5-4 開殻 GFR および閉殻 GFR による構造推定結果の比較検討

図 5-8 推定される FX の全体構造 14 種（*印は不斉炭素を表す）

図 5-9 除外した全体構造の例 a) C_2H_2O が生成不可能な例、b) C_3H_6O が生成不可能な例

図 5-10 アルキルケトンの分枝の検討 a) m/z 85 を生成しないため不適、b) c) m/z 57 を生成し
ないため不適

図 5-11 リモネンの光学異性体 a) D-リモネン（オレンジ/レモン臭）、b) L-リモネン（ペパ
ーミント/テルペン油臭）

第1章 緒論

1 日本の上水道にて発生しうる生物障害

1-1 生物障害の定義

世界的な産業の発達および人口増加に伴い、安全な飲用水を確保することの重要性は、日増しに高まっている。我々が暮らす地球は水の惑星と呼ばれることからわかるように、豊富な水資源を有している。ところがその大部分は飲用に適さない海水であり、淡水の占める割合は2.5%程度に過ぎない¹⁾。加えて、河川水や湖沼水などの比較的利用しやすい形態で存在している水は、わずか0.01%程度に留まる¹⁾。この限られた水資源を有効活用し、人類社会を持続可能なものとするための技術を開発することは、まさに喫緊の課題である。そのような世界情勢の中において、日本は「水道先進国」の立ち位置にある。給水栓から供給される水道水を飲用できるというのは世界的に見ても珍しく、我々は日々、その高度な浄水技術の恩恵を享受している。近代的水道システムの始まりは、横浜での外国人居留地における給水が始まりとされているが、以来、浄水技術は様々な革新・改良を取り入れつつ成長し、現在に至っている。

しかしながら、近代的水道システムの確立によって日本の水道の衛生状況が大きく改善された一方で、水道を取り巻く諸問題が全て解決されたわけではない。現代においても、不慮の人為的事故や水道水源における微生物の異常増殖等が原因となって、水道水質が損なわれた事例は散見される。人為的な水道水汚染として代表的なものは、2012年の利根川水系におけるホルムアルデヒドの検出が挙げられる²⁾。ホルムアルデヒドは発がん性を有しており、国際がん研究機関（International Agency for Research on Cancer, IARC）による発がん性分類ではグループ1に属している³⁾。グループ1はIARCによる分類の中で最上位に位置し、ヒトへの発がん性について十分な科学的根拠がある物質・要因から構成されている。すなわち、水道水中におけるホルムアルデヒドの存在の有無は公衆衛生上重大な意味を有しており、後述するように水道法第四条の定める水道水質基準による厳格な管理がなされている。水道水中のホルムアルデヒドの基準値は0.08 mg/Lとされているが、先に挙げた利根川水系における事例では、行田浄水場において最高0.168 mg/Lのホルムアルデヒドが検出された²⁾。これを受け、同浄水場では取水・送水が停止されたほか、国土交通省により利根川水系上流ダムで緊急放流が開始されるなど、対応に迫られた。

上記の事例は化学的な水道水汚染と言えるが、病原微生物やウイルスによる生物学的な汚染のリスクも存在する。厚生労働省の報告によると、平成15年から令和2年にかけて、病原微生物およびウイルスによる水道水汚染の事例が合計で23件報告されている⁴⁾。最近の事例では、2019年9月に長野県の宿泊施設において、飲料水中から *Campylobacter jejuni*（以下 *C. jejuni*）が検出されている。*C. jejuni* は1982年に食中毒起因菌として指定され、サルモネラ、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌に次ぐ発生頻度を示している⁵⁾。*C. jejuni* が主たる原因菌となるカンピロバクター感染症を発症した場合、下痢、腹痛、発熱などの症状が現れ、免疫不全などを患っていない場合には予後良好であることが多い一方で、稀に感

染後 1~3 週間を経てギラン・バレー症候群を発症する事例が知られつつある。この場合、手足の麻痺、顔面神経麻痺、呼吸困難などの症状が現れることがあるため、ホルムアルデヒドと同様、*C. jejuni* も公衆衛生上の懸念材料となっている。

水道水源における微生物の増殖は、ヒト健康上の問題を生起させるのみではなく、その他にもさまざまな点で水道システムに危害を及ぼしうる。生物は、陸上、小規模な水たまり、水田・湖沼等の滞留水、水の動きを伴う水路や河川、さらには太陽光のほとんど当たらない地下水に至るまで多種多様な環境に生息している。それら生物は、それぞれが特有の性質（病原性がある、浮遊性がある、運動性がある、臭気物質を産生する等）を有しており、単純な懸濁粒子とは挙動が異なる。このため、水道水の病原性や異臭味を惹起したり、ろ過池を目詰まりさせたりすることで、水道システムに危害を及ぼす。

このように生物が原因となって水道システムに障害が生じる現象を「生物障害」と呼び、また障害を引き起こす生物を「障害生物」と呼ぶ。生物障害は、より厳密には、「生物が水道システムに及ぼす危害のうち、非病原生物によって、水質基準不適となる、水道水の品質が低下する、または水道システムの運転管理上の問題が引き起こされること等により、何らかの対策が必要になること」と日本水道協会の上水試験方法（2011 年版）により定義されている⁶⁾。生物障害が発生すると、水道事業体は障害を解決するための対応を迫られる。結果として、薬品使用量が増加するなどして、事業体にとって大きな経済的損失を招く恐れがある。また、浄水薬品の製造や輸送にかかるエネルギー消費量が増加する。しかしながら、生物障害によるエネルギー消費量の変化に着目した検討例は見当たらない。

1-2 生物障害の種類

先にも述べた通り、生物障害には様々な種類が存在し、かつ、水道システムの様々な箇所が発生しうる。急速ろ過方式を例として、図 1-1 に生物障害の種類、障害の発生する主な場所、障害の内容等のイメージを示す。また、平成 22 年 10 月から 24 年 9 月までの期間で岸田らが実施したアンケート調査⁷⁾によって報告された、発生した生物障害の種類と内訳を図 1-2 に示す。この結果から、異臭味障害が主要な生物障害だと示唆される。

1-3 異臭味障害の種類と原因生物

生物に由来する異臭味障害には様々な種類があり、カビ臭（土臭）、生ぐさ臭（魚臭）、藻臭（青草臭）、芳香臭、腐敗臭などがある。異臭味の原因としては、生物が産生した臭気物質によるものと、生物の死がいの分解作用により発生するものがある。岸田らが行った調査⁷⁾では、異臭味障害は調査期間（平成 22 年 10 月から平成 24 年 9 月）中に 243 事例報告された。その種類の割合は、図 1-3 に示すように、異臭味障害事例数をベースとすると、カビ臭（geosmin、図 4 a）が 37%と最も多く、次いでカビ臭（2-MIB、図 4 b）30%、生ぐさ臭 22%、海藻臭 4%、藻臭 3%の順であった。すなわち、カビ臭と生ぐさ臭が異臭味障害事例のほぼ全てを占めており、これらの異臭味に対する適切な浄水

処理を講じることが求められる。

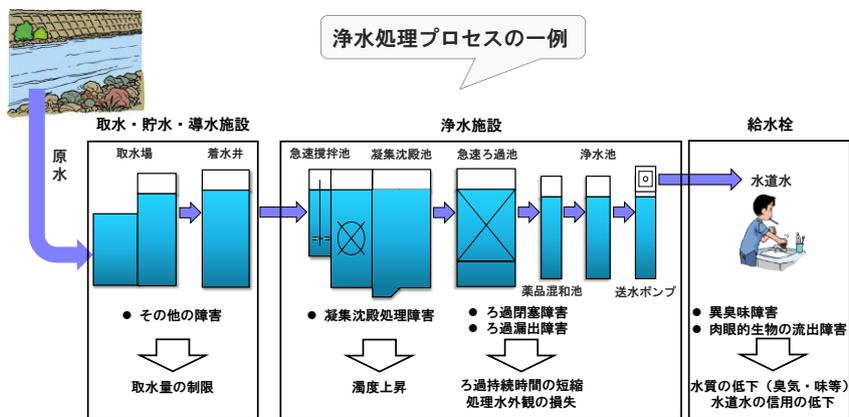


図 1-1 生物障害のイメージ図⁸⁾

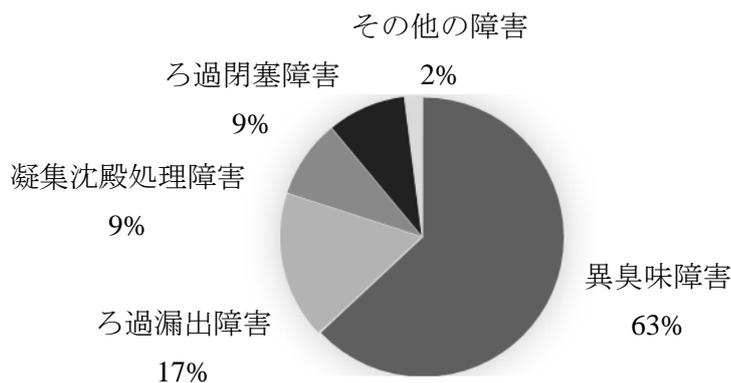


図 1-2 発生した生物障害の種類と内訳⁷⁾

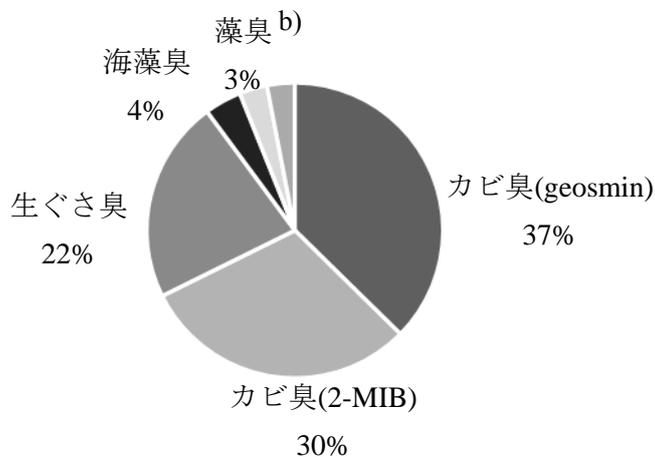


図 1-3 異臭味障害の種類と割合（事例数ベース）⁷⁾

最も発生頻度の高いカビ臭については、比較的多くの知見が集積されている。カビ臭の原因物質は *geosmin* および 2-methylisoborneol(以下、2-MIB)とされており、これら 2 物質に対しては、後述する水質基準項目にその基準値 (10 ng/L) が定められている。この基準値は、水質基準項目に記載されている他の項目の基準値と比して低めに設定されているが、これは 2 物質の嗅覚閾値が極めて低いことに由来し、*geosmin* では 6.5 ppb、2-MIB では 5 ng/L である^{9,10)}。両物質を生産する主たる生物はシアノバクテリア (藍藻類) であり、*Anabaena* 属、*Phormidium* 属の関与がこれまでに指摘されている^{11,12)}一方で、実際にはこれら以外にも多くの微生物種がこれら両物質を産生すると考えられ、原因生物の完全な特定は困難である。

一方で、生ぐさ臭については、カビ臭の様に原因物質が特定されるに至っていない。水道原水中の生ぐさ臭の臭気強度が高まった際、浄水場では活性炭を添加するなどの処置を行うが、臭気強度が高すぎる場合には、既存の浄水方法のみでは完全に生ぐさ臭を除去できないことがある。結果として給配水中に生ぐさ臭が残存し、生ぐさ臭異臭味被害となって顕出する。

2 上水道の水質基準に係る日本の法規制

2-1 水道法第 4 条

日本においては、水道基盤を強化することによって公衆衛生の向上と生活環境を改善することを目的として、昭和 32 年に水道法が公布された。同法の第 4 条では水質基準についての規定がなされており、水道により供給される水は、次の各号に掲げる要件を備えるものでなければならない¹³⁾。

1. 病原生物に汚染され、又は病原生物に汚染されたことを疑わせるような生物若しくは物質を含むものでないこと。
2. シアン、水銀その他の有毒物質を含まないこと。
3. 銅、鉄、フッ素、フェノールその他の物質をその許容量をこえて含まないこと。
4. 異常な酸性又はアルカリ性を呈しないこと。
5. 異常な臭味がないこと。ただし、消毒による臭味を除く。
6. 外観は、ほとんど無色透明であること。

さらに、上記 6 項目を達成するために必要な事項が厚生労働省令によって定められており、水質基準に関する省令 (平成 15 年 5 月 30 日厚生労働省令第 101 号) がそれに該当する。また、図 1-4 に示すように、水質基準項目以外にも、水質管理上留意すべき項目として水質管理設定項目、毒性評価が定まらない物質や水道水中での検出実態が明らかでない項目として要検討項目がある。水道事業者は、水質基準項目等の検査について、水質検査計画を策定し、需要者に情報提供しなければならない¹⁴⁾。

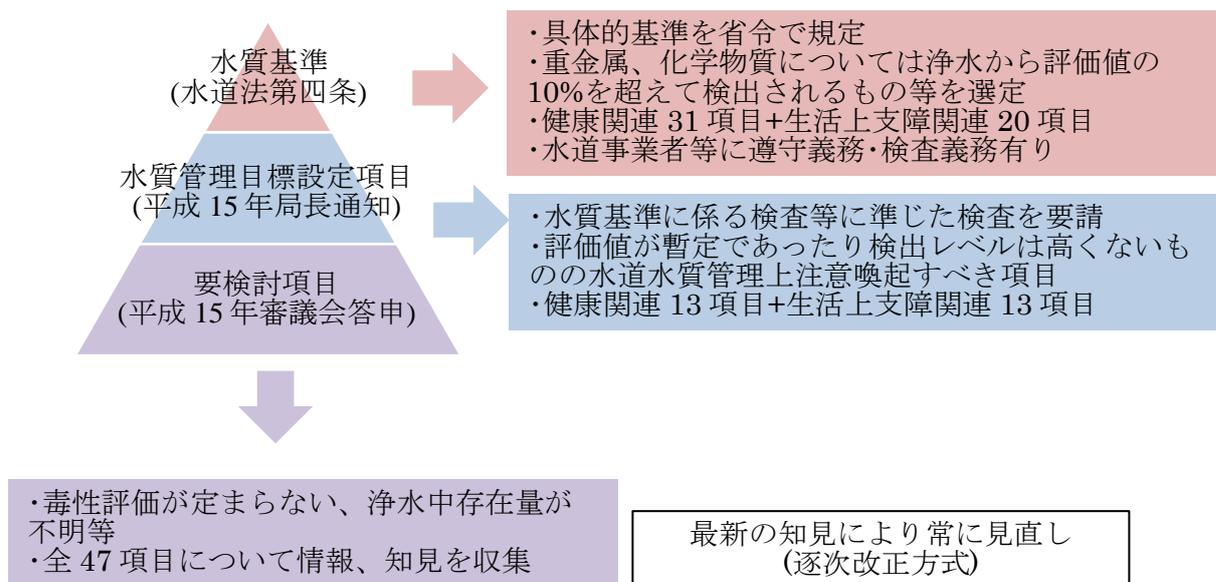


図 1-4 水質基準項目、水質管理目標設定項目、要検討項目の位置付け¹⁴⁾

2-2 水質基準項目と基準値

表 1-1 に水質基準項目とその基準値を示す¹⁵⁾。カビ臭の原因物質である geosmin と 2-MIB は、水質基準項目にその基準値が定められている。ただし本表に記載されている基準値は、令和 4 年 3 月現在の値であることに留意されたい。水質基準および水質管理目標設定項目は、最新の科学的知見に照らして積極的に改正がなされており、例としては令和 2 年 4 月に、六価クロム化合物の基準値が従来の 0.05 mg/L から 0.02mg/L に強化された¹⁶⁾。

表 1-1 水質基準項目とその基準値¹⁵⁾

項目	基準	項目	基準
一般細菌	1 mL の検水で形成される集落数が 100 以下	総トリハロメタン	0.1 mg/L 以下
大腸菌	検出されないこと	トリクロロ酢酸	0.03 mg/L 以下
カドミウム及びその化合物	カドミウムの量に関して、0.003 mg/L 以下	ブロモジクロロメタン	0.03 mg/L 以下
水銀及びその化合物	水銀の量に関して、0.0005 mg/L 以下	ブロモホルム	0.09 mg/L 以下
セレン及びその化合物	セレンの量に関して、	ホルムアルデヒド	0.08 mg/L 以下

	0.01 mg/L 以下		
鉛及びその化合物	鉛の量に関して、 0.01 mg/L 以下	亜鉛及びその化合物	亜鉛の量に関して、 1.0 mg/L 以下
ヒ素及びその化合物	ヒ素の量に関して、 0.01mg/L 以下	アルミニウム及びその化合物	アルミニウムの量に関して、 0.2 mg/L 以下
六価クロム化合物	六価クロムの量に関して、 0.02 mg/L 以下	鉄及びその化合物	鉄の量に関して、 0.3 mg/L 以下
亜硝酸態窒素	0.04 mg/L 以下	銅及びその化合物	銅の量に関して、 1.0 mg/L 以下
シアン化物イオン及び塩化シアン	シアンの量に関して、 0.01 mg/L 以下	ナトリウム及びその化合物	ナトリウムの量に関して、 200 mg/L 以下
硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素	10 mg/L 以下	マンガン及びその化合物	マンガンの量に関して、 0.05 mg/L 以下
フッ素及びその化合物	フッ素の量に関して、 0.8 mg/L 以下	塩化物イオン	200 mg/L 以下
ホウ素及びその化合物	ホウ素の量に関して、 1.0 mg/L 以下	カルシウム、マグネシウム等（硬度）	300 mg/L 以下
四塩化炭素	0.002 mg/L 以下	蒸発残留物	500 mg/L 以下
1,4-ジオキサン	0.05 mg/L 以下	陰イオン界面活性剤	0.2 mg/L 以下
シス-1,2-ジクロロエチレン及び トランス-1,2-ジクロロエチレン	0.04 mg/L 以下	ジェオスミン	0.00001 mg/L 以下
ジクロロメタン	0.02 mg/L 以下	2-MIB	0.00001 mg/L 以下
テトラクロロエチレン	0.01 mg/L 以下	非イオン界面活性剤	0.02 mg/L 以下
トリクロロエチレン	0.01 mg/L 以下	フェノール類	フェノールの量に換算して、 0.005 mg/L 以下
ベンゼン	0.01 mg/L 以下	有機物(全有機炭素 (TOC) の量)	3 mg/L 以下
塩素酸	0.6 mg/L 以下	pH 値	5.8 以上 8.6 以下
クロロ酢酸	0.02 mg/L 以下	味	異常でないこと
クロロホルム	0.06 mg/L 以下	臭気	異常でないこと
ジクロロ酢酸	0.03 mg/L 以下	色度	5 度以下
ジブromokロロメタン	0.1 mg/L 以下	濁度	2 度以下
臭素酸	0.01 mg/L 以下		

2-3 水質管理目標設定項目と目標値

水道水の飲用の可否は、水質基準の適否によって判定されるが、水質基準を補完するこ

とを目的として水質管理目標設定項目が設定されている。水質管理目標設定項目とその目標値を表 1-2 に示す¹⁵⁾。水質管理目標設定項目を満たさない場合、その水は直ちに飲用不適となるわけではないが、より高品質な飲用水を供給するための項目として重要な位置を占めている。水質管理目標設定項目は、水質基準以上に積極的な改正がなされており、近年では令和 2 年 4 月にペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) 及びペルフルオロオクタン酸 (PFOA) の項目が新たに追加された。

表 1-2 水質管理目標設定項目とその目標値¹⁵⁾

項目	目標値	項目	目標値
アンチモン及びその化合物	アンチモンの量に関して、0.02 mg/L 以下	マンガン及びその化合物	マンガンの量に関して、0.01 mg/L 以下
ウラン及びその化合物	ウランの量に関して、0.002 mg/L 以下(暫定)	遊離炭酸	20 mg/L 以下
ニッケル及びその化合物	ニッケルの量に関して、0.02 mg/L 以下	1,1,1-トリクロロエタン	0.3 mg/L 以下
1,2-ジクロロエタン	0.004 mg/L 以下	メチル- <i>t</i> -ブチルエーテル	0.02 mg/L 以下
トルエン	0.4 mg/L 以下	有機物等 (過マンガン酸カリウム消費量)	3 mg/L 以下
フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)	0.08 mg/L 以下	臭気強度 (TON)	3 以下
亜塩素酸	0.6 mg/L 以下	蒸発残留物	30 mg/L 以上 200 mg/L 以下
二酸化塩素	0.6 mg/L 以下	濁度	1 度以下
ジクロロアセトニトリル	0.01 mg/L 以下(暫定)	pH 値	7.5 程度
抱水クロラール	0.02 mg/L 以下(暫定)	腐食性 (ランゲリア指数)	-1 程度以上とし、極力 0 に近づける
農薬類 (注)	検出値と目標値の比の和として、1 以下	従属栄養細菌	1 ml の検水で形成される集落数が 2,000 以下(暫定)
残留塩素	1 mg/L 以下	1,1-ジクロロエチレン	0.1mg/L 以下
カルシウム、マグネシウム等 (硬度)	10 mg/L 以上 100 mg/L 以下	アルミニウム及びその化合物	アルミニウムの量に関して、0.1mg/L 以下

(空白)	(空白)	ペルフルオロオクタ ンスルホン酸 (PFOS) 及びペル フルオロオクタン酸 (PFOA)	ペルフルオロオクタン スルホン酸 (PFOS) 及びペルフルオロオク タン酸 (PFOA) の量 の和として 0.00005mg/L 以下 (暫 定)
------	------	---	---

3 水道水生ぐさ臭異臭味被害に関する既往研究

3-1 生ぐさ臭発生の歴史

水道水源における生ぐさ臭の発生は、遅くとも 19 世紀末の時点では既に問題となっていた。Whipple による論文は、水道水生ぐさ臭に関する研究の中でも最古であり、1899 年に米国ブルックリンの貯水池が生ぐさ臭を呈していたとの記述がある¹⁶⁾。すなわち生ぐさ臭は 120 年以上に渡って問題となっている。米国では、その後も散発的に生ぐさ臭の発生事例が報告されている。Whipple による論文のほか、1919 年から 2015 年に至るまで、8 報の論文が生ぐさ臭について記述している¹⁷⁻²⁴⁾。

米国の他には、エジプト・カイロのナイル川においても、生ぐさ臭の発生が報告されている²⁵⁾。その広大な長さと同流域面積を考慮すると、ナイル川における異臭味の発生は、当時沿岸に居住していた人々に少なからず影響したことが推察される。

上述のナイル川のような例はありながらも、19 世紀末から 1900 年代前半まで、米国はほぼ唯一の生ぐさ臭被害国であった。ところが 1970 年代に入ると、生ぐさ臭の被害はより広範に拡大していくこととなる。米国、エジプトに次ぐ第三の被害国は日本であり、1977 年の琵琶湖において藻類の増殖が見られ、次いで生ぐさ臭が確認された²⁶⁾。ナイル川の事例と同様、琵琶湖も日本最大の湖沼であることから、琵琶湖の水質低下は周辺住民に大きな影響を及ぼしうる。ほどなくして神戸の布引貯水池においても同様の問題が発生し、1980, 1981, 1984, 1986, 1987 年に生ぐさ臭が発生したことが報告されている²⁷⁾。水道原水における生ぐさ臭の発生は必ずしも生ぐさ臭被害の発生を意味せず、浄水処理で対応可能な場合も少なくないが、小山らは中禅寺湖において生ぐさ臭が発生した際には処理後の水道水中に生ぐさ臭が認められたことを報告している²⁸⁾。

これらの報告はいずれも 20 世紀後半のものであるが、現在においても問題が完全に解決されたとは言い難い。京都市上下水道局が生ぐさ臭対策として添加した粉末活性炭の最大濃度は 20 ppm であり、またカビ臭と合わせた粉末活性炭注入日数が 151 日間であった²⁹⁾。日本は 40 年以上に渡って生ぐさ臭の問題に悩まされており、米国ほどではないものの、問題が長期にわたって未解決のままとなっている。

生ぐさ臭発生の歴史を考察する上で、中国における発生事例は重要な材料となる。現在までに 8 報の論文が中国における生ぐさ臭を報告しており³⁰⁻³⁷⁾、これは米国の 9 報に次いで多い。ところが両国は生ぐさ臭の歴史と言う点において大きく異なっており、米国は 19 世紀末から現在に至るまで散発的に生ぐさ臭の発生が報告されているのに対して、中国に

おける最初の生ぐさ臭発生は 1992 年であり、100 年近く差が開いていることがわかる。すなわち、近年の中国においては生ぐさ臭発生件数が顕著に増加しており、世界全体で見た時の生ぐさ臭発生件数を大きく引き上げる一因になっている。約 30 年の期間中に中国での発生件数が急増した理由は明らかではないものの、同国における急速な経済発展が関与している可能性がある。図 1-5 は各年代における生ぐさ臭発生を報告した論文の数および被害国を示しているが、図中に示した国はいずれも北半球に位置しており、かつ経済規模が比較的大きいことが見て取れる。北半球と南半球の国々における経済格差は「南北問題」と称され、先進資本国が北半球に集中しているのに対して発展途上国は南半球に集中しているのはよく知られているが、経済活動の発展が生ぐさ臭発生に負の影響を与えていることが予想される。また、中国での急速な件数増加に鑑みると、現在は生ぐさ臭問題が表面化していない発展途上国においても、経済的に発展するにつれて生ぐさ臭問題が深刻化していくことが懸念される。すなわち生ぐさ臭の発生件数および被害国は今後も増加を続けと見込まれ、原因物質の速やかな同定が必要であることの証左となりうる。

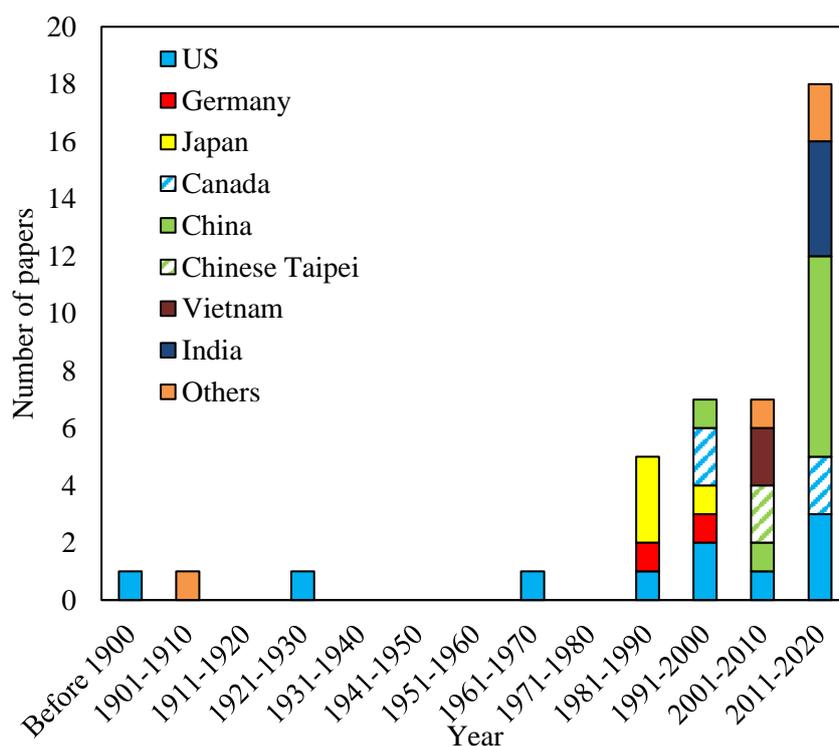


図 1-5 年代別の生ぐさ臭発生事例の報告論文数および発生国

3-2 生ぐさ臭との関連が指摘されている生物種

水道水異臭味被害の主たる原因として水道水源における藻類の増殖が挙げられるのは先に述べたとおりであり、原因生物についての知見を深めることは生ぐさ臭問題の解決を図る上で有益である。

表 1-3 は、これまでに生ぐさ臭が発生した水道水源において存在が確認された藻類の一

覧を示す。簡単のため、表中では種小名は割愛し、属名のみを記す。

表からわかるように、生ぐさ臭との関連が疑われる生物種は多岐にわたるが、ここでは特に *Dinobryon* (ヒダサヤツナギ)、*Synura* (モトヨセヒゲムシ)、*Uroglena* (クスダマヒゲムシ) の 3 つの属に着目する。これら 3 属は、他の属と比較した際に、生ぐさ臭との関連が特に強く疑われるためである。Rashash らは *Dinobryon cylindricum* および *Synura petersenii* を培養し、その培養液が生ぐさ臭を呈していることを確認しており⁴⁴⁾、表 1-3 からわかるようにこれら 2 属が関与した生ぐさ臭の事例は多く報告されている。また、発生事例の件数が最大であるのは *Uroglena* 属である。京都市上下水道局は、*Uroglena* および *Dinobryon* を生ぐさ臭の指標生物として採用しており、水質管理の一環として毎日原水試験でこれらの細胞数を分析している。

表 1-3 生ぐさ臭との関連が指摘されている生物

Genus	References
<i>Asterionella</i>	[38]
<i>Biecheleria</i>	[39]
<i>Chlamydomonas</i>	[16]
<i>Cryptomonas</i>	[35]
<i>Cyclotella</i>	[32, 33, 35]
<i>Dinobryon</i>	[32, 35, 38, 40]
<i>Melosira</i>	[32, 35]
<i>Oscillatoria</i>	[41]
<i>Stephanodiscus</i>	[40]
<i>Symbiodinium</i>	[39]
<i>Synedra</i>	[17, 35]
<i>Synura</i>	[17, 18, 20, 38, 42]
<i>Tabellaria</i>	[17]
<i>Uroglena</i>	[20, 24, 26-28, 43]

Dinobryon は通常、群体を形成して存在しており、枝分かれした樹木に類似した外観を有している。*Dinobryon* の生息域は広範囲に及び、カナダ^{38, 40)}、中国^{32, 35)}、ドイツ⁴⁵⁾、アメリカ⁴⁶⁾、および日本⁴⁷⁾において存在が確認されている。本属は少なくとも 37 の異なる種から構成されており、中でも *Dinobryon cylindricum* および *Dinobryon divergens* の報告例は多い。上述のように *Dinobryon cylindricum* の培養液は生ぐさ臭を発することが知られており⁴⁴⁾、また Watson らは冬季のグレンモア貯水池（カナダ）における生ぐさ臭発生の際、*Dinobryon divergens* の細胞数が顕著に増加したことを報告している³⁸⁾。

Synura も *Dinobryon* と同様に群体を形成するが、こちらは球状に丸まった状態で浮遊する。*Synura* 属によって引き起こされたと考えられる生ぐさ臭被害はアメリカ¹⁷⁾、カナダ³⁸⁾、ドイツ⁴²⁾において報告されている。また、生ぐさ臭発生の有無は不明であるものの、オー

ストラリアにおいても生息が確認されている⁴⁶⁾。本属は約46の種および亜種から構成されており、中でも *Synura petersenii* と *Synura uvella* は生ぐさ臭との関連が疑われる。*Synura petersenii* の培養液は生ぐさ臭を発することは複数の論文で報告されている^{44, 49, 50)}ほか、*Synura uvella* によって生ぐさ臭が惹起された事例も存在する⁴²⁾。

他の生物と比較した時に、*Synura* が引き起こしうる経済的な悪影響は極めて大きいことが懸念される。Palmer らの研究によると、シンシナティの水道水源で生ぐさ臭が発生した時、そのTONは500を超えていた¹⁸⁾。第3章にて後述するが、本研究で複数年にわたって採取した水道原水試料の中で最も高いTONが320であったことを考慮すると、TON500という値が極めて突出した臭気強度であることが推察される。このような臭気強度を有する水道原水の浄水処理には大量の活性炭投入が必要とされ、浄水コストの爆発的な増加につながりうる。ここ10年ほどは*Synura*による生ぐさ臭被害は確認されていないが、先に挙げた理由から、依然として注視すべき生物と言える。

Uroglena も *Dinobryon* や *Synura* と同様に群体を形成するが、*Uroglena* は他の2属と比較した際に、群体を構成する細胞の数が多いという特徴がある。*Uroglena* は60から800程度の細胞から成る群体を形成し、その細胞数によって小群体、中群体、大群体と大まかに分類される。*Uroglena* が原因となって生ぐさ臭が発生したと考えられる例は7件存在し、ドイツで1件⁴³⁾、アメリカで2件^{21, 24)}、日本で3件²⁶⁻²⁸⁾の内訳になっている。このことから *Uroglena* の生息域もまた、広範に及ぶことが予想される。

Uroglena による生ぐさ臭被害は、日本において最も深刻である。先述の1977年の琵琶湖における生ぐさ臭発生例では、副次的に赤潮も発生した。これは日本で発生した淡水赤潮として最も規模が多きものの一つであり、以降同様の赤潮発生を防止することを目的として、リンを含む合成洗剤を禁止する「琵琶湖富栄養化防止条例」が可決されるなど、大きな影響を及ぼした⁵¹⁾。

詳細な発生予測等は依然として困難であるか、年間を通じての大まかな *Uroglena* の増減パターンは明示的であり、毎年春季および冬季に増加する傾向にある。京都市の琵琶湖疏水においては、例年4月上旬から5月下旬にかけて発生し、その期間中は概してTONの値が上がる傾向にある²⁹⁾。ただし増加の程度や生ぐさ臭の強度に与える影響については変動が大きく、2018年4月の様に320という大きな値を示すこともあれば、100未満に留まることもある。また、春季ほどの大きな増加ではないものの、11月-12月にかけて小規模な増加を示す場合もある。*Uroglena* の細胞は外力の作用に対して極めて敏感であり、浄水処理の過程で細胞が破碎し、細胞内の臭気物質が処理水中に混入する恐れがある。このため、*Uroglena* の増加が認められた水道原水を処理する際には、前塩素を停止して中間塩素を使用し、細胞体ごと沈殿させるという処理がなされる。

Uroglena は26の種から構成されているが、Green らによる *Uroglena volvox* が生ぐさ臭を惹起した事例の報告²⁴⁾を除けば、全ての事例について *Uroglena americana* が関与している。すなわち *Uroglena americana* は生ぐさ臭に強く関係しており、かつ日本における生ぐさ臭

の実情をよく反映している生物であることから、本論文においても *Uroglena americana* を生ぐさ臭の原因生物であると想定して実験を行った。

これら 3 属の他にも、生ぐさ臭との関連が疑われる生物は存在する。例として *Ochromonas* などはその代表であり、生ぐさ臭を呈する環境水試料中からの検出例はないものの、Guo らの研究によると、本属の培養液は生ぐさ臭を発する⁵²⁾。対照的に、環境水中から検出された生物としては *Cryptomonas* などが挙げられ、におい嗅ぎガスクロマトグラフィーと質量分析の組み合わせによって *Cryptomonas* 培養液中の有臭成分を探索した研究例が報告されている³⁵⁾。

Cyclotella, *Synedra* などの珪藻類についても比較的検出頻度が高く、これら珪藻類の培養液の化学分析が問題解決に有効であると予想されるが、一方でこれら 2 属はどちらも 300 以上の種から構成される大きな属であり、全ての種について逐一検討を重ねることは困難である。菊池らの研究では、*Synedra rumpens* の培養液は生ぐさ臭を発したとされている⁵³⁾ が、上述の通り、発生頻度等に鑑みて *Dinobryon*, *Synura*, *Uroglena* を優先的に監視することが水質管理上有益と予想される。

3-3 生ぐさ臭との関連が指摘されている化学種

生ぐさ臭原因物質の同定には至っていない一方で、原因物質を報告した研究例は多く存在する。表 1-4 は、既往研究によって生ぐさ臭との関連が指摘された化学種、およびそれらを産生する可能性のある生物を示している。これだけ十分な知見が蓄積されていながら、本表に掲載した物質は、いずれも生ぐさ臭原因物質として基準項目化はされていない。本節では、この研究上のギャップが生じている原因を考察する。

表 1-4 に示されているように、既往研究において生ぐさ臭原因物質とされている物質は、そのほとんど (15/19) がアルデヒド類である。アルデヒド 15 種中、7 種は 2 箇所以上の不飽和結合を有する多価不飽和アルデヒド (polyunsaturated aldehydes, PUA) である。前節において、*Uroglena* の細胞が破碎されると細胞中の臭気物質が溶出しうること述べたが、この臭気物質は多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFA) を前駆物質として細胞内で合成されることがわかっている。*Dinobryon*, *Synura*, *Uroglena* はいずれも黄金色藻に分類されるが、これらの生物種の大きな特徴の一つとして、細胞内の脂質濃度および PUFA 濃度がそれぞれ >60%、30-40% と比較的高いことが挙げられる。特に PUFA は黄金色藻の細胞膜を構成しており、細胞に超音波、加熱などの処理が加えられると、PUFA を出発物質とするカスケード反応に関する酵素が活性化され、最終的に臭気を有する PUA が生成する⁵⁴⁾。

また、生ぐさ臭に対応する英語表現は“fishy smell”すなわち魚臭であり、魚類独特の臭気の原因物質はトリエチルアミンなどに代表されるアミン類であることが広く知られているが、表 1-4 中にはアミン類が含まれていないことは注目に値する。これは“生ぐさ臭/魚臭”および“fishy smell”という表現の意味する範囲が広範に及び、感知した臭気の実

験者に依存することが原因と考えられる。PUA は鯖などの油脂分を多く含む魚類を加熱した際に感じる臭気に近い一方で、アミン類はニシンや魚市場のような臭気であるとする例もある⁵⁵⁾。アミン類の生ぐさ臭への関与は直ちに否定されるべきではないが、黄金色藻内に PUFA が豊富に存在する事実に鑑みると、PUA を原因物質として想定することが妥当と予想される。実際、水道原水中の生ぐさ臭は 1-2 週間程度の短期間のうちに消滅してしまうが、これはアルデヒド類が水中の溶存酸素による酸化を受けて無臭化するものと予想される。

表 1-4 に示されている 19 物質中 15 物質がアルデヒドである一方、Guo らが同定した生ぐさ臭成分 (1-octen-3-ol, 1-octen-3-one, fluorene, 2-tetradecanone) の中にはアルデヒドは含まれていない⁵²⁾。Guo らによる研究は、実際に生ぐさ臭が発生した水道原水試料を調査した事例ではないものの、上記 4 物質のうち 1-octen-3-ol および 1-octen-3-one は PUA と同様に PUFA から合成されることが明らかとなっており、同研究の妥当性を支持している。また 1-octen-3-ol はキノコ類の香気成分としても知られており、(R)-(-)-1-octen-3-ol はキノコ用の臭気を有するのに対し、(S)-1-octen-3-ol はカビ様の臭気を有している⁵⁶⁾。こうした事例を踏まえると、PUA のみならずアルコール類およびケトン類についても注視していくことが、生ぐさ臭問題を解決する上で重要であると推察される。

しかしながら、表 1-4 に示した物質を個別に検討した時、生ぐさ臭惹起への寄与の度合いは大きく異なると予想される。すなわち、geosmin や 2-MIB のように嗅覚閾値 (Odor Threshold Concentration, OTC) が低い物質は、ごく少量存在するだけでも水道水全体の臭気に大きく影響するが、OTC が大きい物質による影響は軽微にとどまる。このように、OTC の値に応じてモニタリングすべき物質の優先順位付けをすることは、原因物質を考察する上で重要と言える。OTC は比較的類似性が高い化合物間であっても大きく値がことなる場合がある。例として、2,6-nonadienal と 2,4-heptadienal を比較すると、前者の OTC が 0.08 µg/L であるのに対して、後者は 3-5 µg/L である⁵⁷⁾。すなわち、2,6-nonadienal は 2,4-heptadienal よりも臭気の有無に与える影響が 37.5-62.5 倍高いことになる。OTC が低い物質を優先的に分析することで、水道水質管理の上で効率的と言える。

しかしながら本節の冒頭にて述べた様に、生ぐさ臭の原因物質についての統一的な理解が得られておらず、完全な同定には至っていないという点には注意が必要である。すなわち、表 1-4 に示した物質のうちいくつかは、物質同定の根拠が不十分であったために、生ぐさ臭問題の一部分のみを垣間見る結果となったことが考えられる。例として、中原らの研究によって (2E,4Z)-heptadienal および (2E,4E)-heptadienal が生臭臭原因物質として同定された²⁷⁾。しかしながら、本研究における同定の過程には、再考の余地が残されている。中原らは生ぐさ臭が発生した際の原水試料を GC/MS により分析し、クロマトグラム上で特に大きな強度を示した 2 物質に着目し、これらを (2E,4Z)-heptadienal および (2E,4E)-heptadienal であると同定した。すなわち、本研究においてこれら 2 物質以外の成分は考慮されておらず、他の有臭物質が生ぐさ臭に寄与していた可能性が見落とされている。実際、中原らは

論文中において、これら 2 物質以外が生ぐさ臭惹起に関与した可能性を示唆している。

また、表 1-4 に示した物質のうち 1 物質のみが生ぐさ臭原因物質として作用するのではなく、実際には表中に示されていない未知物質も含めた複雑な相互作用によって生ぐさ臭が発生することも予想される。複数物質の相互作用によって混合臭気が形成する例は広く知られており、恐らくはこの点が、生ぐさ臭の問題をより一層解決困難にしている。

4 質量分析による環境試料の高感度分析の有用性および多変量解析の必要性

4-1 質量分析による環境分析の有用性

前節において生ぐさ臭問題の複雑性を議論したが、これを解明するための手法としてその有効性が期待されるのが質量分析 (Mass Spectrometry, MS) である。

表 1-4 生ぐさ臭との関連が指摘される化学種

Substances	Raw water	Culture media
Hexanal	X	X
Heptanal	X	X
(2E, 4E)-Heptadienal	X	X
(2E, 4Z, 7Z)-Decatrienal	X	X
(2E, 6Z)-Nonadienal	X	X
4E-Heptenal ^b	X	-
(2E, 4Z)-Heptadienal	X	-
Benzaldehyde	X	-
Nonanal	X	-
Decanal	X	-
(2E, 4E)-Decadienal	X	-
(2E, 4Z)-Decadienal	X	-
(2E, 4E, 7Z)-Decatrienal	X	-
β-Cyclocitral	X	-
Pentanal	-	X
(2Z, 4E)-Heptadienal	-	X
1-Octen-3-ol	-	X
1-Octene-3-one	-	X
Fluorene	-	X
2-Tetradecanone	-	X

*: 表中の“X”は、その物質が水道原水中または藻類の培養液から検出されたことを示す

有機物質の構造解析法としては核磁気共鳴分光法 (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, NMR) や赤外分光法 (InfraRed spectroscopy, IR) が第一の選択肢となる。これらの分析手法はいずれも検出感度が低く、最低でも 1 mg 程度の試料が必要となる。加えて、

NMR や IR は目的物質と夾雑物を分離する機能を持たず、試料流の全成分に由来する信号が一度にスペクトル上に記録される。これに対して水道原水試料のような環境試料中には、ごく低濃度の物質が多数含まれており、その組成は複雑である。例として、ある成分が環境試料中に 10 ng/L の濃度で含まれるとき、1 mg の試料を調整するためには 10^5 L もの水道原水を濃縮せねばならず、実質的に達成不可能である。仮に濃縮を完了できても、十分な精製が伴わない場合には NMR や IR のスペクトルは極めて複雑化するため、解析が困難になる。

MS は、NMR や IR が抱えるこうした問題を克服可能である。MS の分析感度は、機器内部の構造や分析対象の物理化学的性質に依存するが、例としてメパニピリム（殺菌剤）を LC/MS で分析する際、1.0 $\mu\text{g/L}$ 程度の低濃度試料を 5 μL だけ注入する場合であっても、十分に定量可能である⁵⁸⁾。すなわち MS 内部に注入されたメパニピリムの量はわずか 5 pg なので、mg オーダーの試料量が要求される NMR や IR と比較した時、MS は極めて高い感度を有していることがわかる。この高い検出感度を活かして、MS は環境分析分野に限らず食品、医薬、材料化学等の幅広い分野で用いられている。

MS が有するもう一つの大きな利点として、高い選択性を有することが挙げられる。MS はガスクロマトグラフィー (Gas Chromatography, GC) や液体クロマトグラフィー (Liquid Chromatography, LC) と連結可能であり、これにより試料中の複数の成分を分離しながら逐次的に各成分を分析できる。分離のモードは多岐にわたるが、主に GC の場合は成分間の沸点の差、LC の場合は疎水性や沸点の差を利用しての分離が一般的である。また、近年では従来型の質量分析よりも高い分解能を有する高分解能質量分析 (High Resolution Mass Spectrometry, HRMS) の利用が拡大しつつある。また、質量分解能が向上することによって、MS の選択性はさらに引き上げられる。例として、窒素分子 (N_2) およびエチレン分子 (C_2H_4) の質量を考える。H=1, C=12, N=14 としてこれら 2 物質の分子量を整数値で概算すると、どちらも 28 となる。四重極型の質量分析計のような低分解能の装置を用いる場合、マススペクトル上に記録されるイオンの m/z 値は整数値であるため、両者を区別することは原理的に不可能である。しかし実際には、H=1.0078, C=12, N=14.0031...のように、各原子について精密質量が定められている。これを用いて分子量を再度計算すると $\text{N}_2=28.0062$, $\text{C}_2\text{H}_4=28.0312$ となり、小数点第 2 位以下を正確に分析すれば両者を識別可能であることがわかる。現在は質量分解能 10,000~数百万程度の質量分析計も利用可能であり、こうした精密質量の差を議論できるため、複雑な多成分系の分析が可能となるとともに、物質の誤同定のリスクを低減できる。

4-2 質量分析と多変量解析の組み合わせ

MS の高い分析感度と選択性は環境分析の大きな強みであると同時に、別の問題を引き起こす。高い分析感度および選択性ゆえに単一試料から多数の成分が一度に検出されるため、本研究のように未知物質の探索に MS を用いる場合には、何かしらの方法を用いて「どの

イオンが目的の成分由来のイオンであるか」の判定が必要となる。すなわち、生ぐさ臭原因物質の探索を可能な限り高効率なものとして、探索時間を削減するための技術が要求される。

対象とする試料の組成や用いる機器の分析感度に依存するものの、単一試料の MS 分析では数千～数万の物質が検出されうる。原理的には各物質について抽出イオンクロマトグラム (Extracted Ion Chromatograms, EIC) を描き、それぞれのピーク面積値と目的変量 (本研究においては水道原水試料の TON など) との相関を確認することで目的物質の候補を絞り込むことができるが、手作業でこれを達成することは莫大な労力を要するため実質的に不可能といえる。プログラミング等の技術を用いてピーク検出および面積値の算出を自動化することも可能だが、実際には成分の検出強度が低くピーク形状がはっきりしない場合などもあるため、自動化により得られた結果の精度が低下するばかりでなく、ピークピッキングのアルゴリズムから検討する必要が生じる。

本研究ではこれを達成するために、多変量解析 (Multivariate Analysis, MVA) に着目した。MVA という呼称は、複数のパラメータを用いる統計解析手法全般に対する総称であるため、それ自身が具体的な解析手段を意味するわけではない。本研究では数ある MVA の手法のうち、部分最小二乗回帰分析 (Partial Least Square regression analysis, PLS) に着目した。*Uroglena americana* を生ぐさ臭原因生物として想定し、その中群数と検出された各イオンのピークボリューム値を用いて PLS 回帰分析を行うことで、回帰モデル構築への寄与が大きいイオンを生ぐさ臭原因物質の候補として採用する、という戦略を試みた。PLS のアルゴリズムは本質的に主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) と重回帰分析 (Multiple Linear Regression analysis, MLR) のハイブリッドであるので、PCA, MLR, および PLS のアルゴリズムの概略を第 3 章にて述べる。

5 高分解能質量分析を用いる分子式推定

5-1 分子式推定

未知物質およびプロダクトイオンの分子式推定は、各元素の精密質量および天然同位体パターンを分析することにより実施した。天然同位体パターン分析とは、4-1 節にて述べた精密質量の考え方に加えて、天然同位体イオンの強度と同位体の存在比から分子式を推定する方法を指す。代表的な元素の精密質量と同位体の天然存在比を表 1-5 に示す。

表 1-5 天然同位体元素の精密質量と存在比

	元素	質量	存在比[%]	Δm
M	^{12}C	12.0000	100.0	-
	^{14}N	14.0031	100.0	-
	^{32}S	31.9721	100.0	-
	^{35}Cl	34.9689	100.0	-
M+1	^{13}C	13.0034	1.1	1.0034
	^{15}N	15.0001	0.4	0.9970
M+2	^{34}S	33.9679	4.5	1.9958
	^{37}Cl	36.9659	32.0	1.9970

精密質量分析と天然同位体パターン分析を組み合わせることにより、未知物質の推定分子式を絞り込める場合がある。例えば ESI の正イオン化モードで検出された m/z 114.0105 (これを monoisotopic ion とする) のイオンに対し、元素種 C, H, N, O, S, P, Cl を想定し、5 ppm の質量誤差を許容して分子式を推定すると、5 種の候補分子式が得られる ($\text{C}_5\text{H}_5\text{NCl}$, $\text{H}_8\text{ON}_2\text{P}_2$, $\text{C}_4\text{H}_5\text{ONP}$, $\text{CH}_8\text{N}_2\text{ClP}$, $\text{C}_8\text{H}_2\text{O}$)。換言すると、精密質量分析のみで分子式を絞り込むには限界がある。しかし、 m/z 114.0105 よりも 1.9970 だけ大きな m/z 116.0075 も同時に検出されていたとすれば、これは表 1-5 から ^{37}Cl の同位体ピークであることがわかるので、上述の 5 種の分子式のうち Cl を含まないものは分子式の候補から除外される。すると $\text{C}_5\text{H}_5\text{NCl}$ または $\text{CH}_8\text{N}_2\text{ClP}$ のどちらかが推定分子式となるが、両者は含有する炭素の個数が異なることに着目すると、前者では ^{13}C の同位体ピークが monoisotopic ion の 5 パーセント程度の相対強度で検出されるのに対して、後者では 1% 程度の相対強度で検出されるので、この差異を利用すれば推定分子式をどちらか 1 つに決定できる。このように、同位体ピークの精密質量および monoisotopic ion に対しての相対強度を解析することで、未知物質の分子式推定が可能となる。

5-2 ジェネラルフラグメンテーションルール

本研究では、フラグメンテーション反応を解析する際に、ジェネラルフラグメンテーションルール (General Fragmentation Rules, GFR) を用いた。主に GC/MS で用いられる電子イオン化法は、化学結合を容易に解離させうるほどの内部エネルギーを分析種に与えるので、分析種の構造に応じて特徴的な結合開裂 (フラグメンテーション) が発生する。対照的に、主に LC/MS で用いられるエレクトロスプレーイオン化法は電子イオン化法よりもソフトであり、分子式の保存に優れているものの、それでも中性ガスとの意図的または非意図的なフラグメンテーションが発生する。GFR はこうしたフラグメンテーションのパターンを分析種の構造別に分類したものであり、GFR を用いると MS で検出されたイオンの構

造推定が可能となる。本研究では、対象とするプリカーサーイオンの電子状況に応じて、開殻 GFR と閉殻 GFR を使い分けて反応解析を実施したが、これについては第 5 章にて後述する。

6 本研究の目的と構成

本論文は、水道水生ぐさ臭の原因物質が十分に解明されていない実態に鑑み、これを探索し、かつその構造の推定を試みたものである。本論文の概略を、図 1-6 に示す。

第 1 章では、日本の上水道における生物障害、特に異臭味被害の状況と、水道法などの水質管理体系を整理した。その結果、異臭味被害は閉鎖性水域における藻類の増殖が主原因となって引き起こされること、中でも生ぐさ臭は被害件数が多いにもかかわらず十分にその実態が解明されていないこと、それゆえに基準項目化されるにいたっていないことなどを述べた。本研究においては生ぐさ臭原因物質を解明するために、1) 水道原水試料および *Uroglena americana* 培養液試料の前処理方法の検討、2) 高分解能 LC/MS を用いた原因物質の探索、3) におい嗅ぎ GC による候補物質の臭気確認、4) LC-MS/MS (閉殻 GFR) および GC/MS (開殻 GFR) による構造推定、の 4 項目を検討することとした。

第 2 章では、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) により誘導体化した試料を想定した選択的な精製方法の開発を行った。DNPH はアルデヒドおよびケトン誘導体化し、LC/MS での検出感度を高める目的で頻りに利用されるが、一方で試料中に残存する未反応 DNPH を分析機器内部に導入することは、LC カラムの目詰まりや MS のイオン源の汚染などを初めとする様々な悪影響の原因となりうる。このため、未反応 DNPH のみを除去しつつ DNPH 誘導体を回収する選択的精製方法を開発することを目的として、本検討では固相抽出による精製を試みた。はじめに、水系試料を対象とした固相抽出による精製を検討したが、DNPH 誘導体は加水分解することが知られているため、DNPH 誘導体の加水分解速度を検討した。次に、非水系の試料を対象とした精製を試みた。非水系試料における選択的精製方法の開発に成功したため、さらに密度汎関数理論を用いる量子化学計算によって、精製のメカニズムを検討した。

第 3 章では、高分解能 LC/MS および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を実施した。既往研究から、生ぐさ臭原因物質はアルデヒド類またはケトン類であることが予想されたため、はじめに、DNPH により誘導体化した臭気強度の異なる複数の水道原水試料、および *Uroglena americana* 培養液試料を高分解能 LC/MS を用いて分析し、得られたデータに対して差異解析および PLS 回帰分析を適用して、原因物質候補を抽出した。PLS 回帰分析においては、回帰モデルの精度向上を目的として、モデル構築に使用する変数の取捨選択 (インターバル OPLS 回帰分析) を実施した。次に、抽出された物質を対象に、精密質量解析および天然同位体パターン解析によって分子式を推定した。

第 4 章では、第 3 章で抽出された生ぐさ臭原因候補物質 (以降、FX と称する) について、におい嗅ぎ GC を用いてその臭気の有無を確認した。初めに、高分解能 GC-APCI-

TOFMS を用いて水道原水試料および *Uroglena americana* 培養液試料を分析し、FX の分子量関連イオンの検出および保持時間の特定を試みた。次に、特定した保持時間の周辺で溶出する成分の臭気を確認するため、3 名の異なるパネラーによるにおい嗅ぎ GC 分析を実施した。

第 5 章では、高分解能 LC-MS/MS および高分解能 GC-EI/FI-TOFMS を用いる FX の部分的な構造推定を実施した。高分解能 LC-MS/MS 分析については、第 3 章での検討により FX の保持時間および精密質量は既に判明していたため、これらの情報を用いて衝突誘起解離による FX のフラグメンテーションを意図的に引き起こし、得られた第 1 次プロダクトイオンを解析することで、生成したプロダクトイオンおよびニュートラルロスについて検討した。この時、ESI はソフトイオン化であり主に閉殻イオンを生成させることに鑑みて、閉殻 GFR によりフラグメンテーション経路を考察した。

一方、高分解能 GC-EI/FI-TOFMS 分析における FX の保持時間は未知であったため、まずはこれを特定するために、ソフトイオン化法である FI 法を用いて FX の分子量イオンの検出を試みた。これにより、FX の保持時間および保持指標が判明したため、次に EI 法を用いて同じ保持指標における EI マススペクトルを解析することで、イオン化の際に生成したプロダクトイオンおよびニュートラルロスについて検討した。この際、EI は主に開殻イオンを生成させることに鑑みて、閉殻フラグメンテーションルールによりフラグメンテーション経路を考察した。

第 6 章では、水道水生ぐさ臭問題の解決に向けた本研究の今後の展望を示した。

第 7 章では、本研究で得られた成果を総括した。

本章の引用文献

- 1) 水資源: 世界の水資源-国土交通省
(http://www.mlit.go.jp/mizukokudo/mizsei/mizukokudo_mizsei_tk2_000020.html) (2021年10月時点)
- 2) 利根川水系におけるホルムアルデヒドによる水道への影響について(経緯) -厚生労働省
(<https://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000002gthr-att/2r9852000002gtmb.pdf>) (2021年10月時点)
- 3) List of Classifications – International Agency for Research on Cancer
(<https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications>) (2021年10月時点)
- 4) 水質汚染事故等の発生状況-厚生労働省(<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/topics/bukyoku/kenkou/suido/kikikanri/03.html>) (2021年10月時点)
- 5) カンピロバクター感染症とは-国立感染症研究所
(<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/385-campylobacter-intro.html>) (2021年10月時点)
- 6) 日本水道協会(2010), 浄水試験方法 2011年版VI.生物編. 日本水道協会, 東京.
- 7) 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
- 8) 京都市上下水道局水質管理センター, 平成26年度水質試験年報水道事業編, 第67集
- 9) 水質の指標シリーズ6) -株式会社同仁グローバル(<https://www.dojin-glocal.com/geosmin>) (2021年10月時点)
- 10) カビ臭の原因物質-日本食品分析センター
(https://www.jfri.or.jp/storage/file/news_vol4_no5.PDF) (2021年10月時点)
- 11) Gerber, NN: GEOSMIN, from microorganisms, IS TRANS-1, 10-DIMETHYL-TRANS-9-DECALOL. *Tetrahedron Lett.*, **25**, 2971-2974, 1969. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)89625-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)89625-2)
- 12) Ho L, Sawade E, Newcombe G: Gerber, NN: Biological treatment options for cyanobacteria metabolite removal—A review. *Water Res.*, **46**(5), 1536-1548, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.018>
- 13) e-gov 法令検索 (<https://elaws.e-gov.go.jp/document?lawid=332AC0000000177>) (2021年10月時点)
- 14) 水道水質基準について-厚生労働省
(<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/index.html>) (2021年10月時点)

- 15) 水質基準項目と基準値 (51 項目) -厚生労働省水道水質基準について-厚生労働省
(<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/kijunchi.html>
#02) (2021 年 10 月時点)
- 16) Whipple GC: Chlamydomonas and Its Effect on Water Supplies. *T. Am. Microsc. Soc.*, **21**, 97-102, 1900. <https://doi.org/10.2307/3221031>
- 17) Hale FE: Taste and Odor in the New York City's Supplies. *J. Am. Water Works Ass.*, **10**(5), 829-837, 1923.
- 18) Palmer CM: Algae in water supplies of Ohio. *Ohio J Sci.*, **62**(5), 225-244, 1962.
- 19) Munce LD: Ozonation pilot treatment of a surface water supply for odor control, Fairmont, Minnesota (Master's thesis, South Dakota State University, South Dakota, the U.S.), 1987, <https://openprairie.sdstate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=5495&context=etd>
- 20) Burlingame GA, Muldowney JJ, Maddrey RE: Cucumber flavor in Philadelphia's drinking water. *J. Am. Water Works Ass.*, **84**(8), 92-97, 1992. <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1992.tb07416.x>
- 21) Khiari D, Suffet IH, Barret SE: The determination of compounds causing fishy/swampy odors in drinking water supplies. *Water Sci. Technol.*, **31**(11), 105-112, 1995. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(95\)00463-W](https://doi.org/10.1016/0273-1223(95)00463-W)
- 22) Burlingame GA, Waer MA: Committee report: options for a taste and odor standard. *J. Am. Water Works Ass.*, **94**(6), 80-87, 2002.
- 23) Ginou C: Water Quality Sampling and Analysis for the St. Marys River Area of Concern (Beneficial Use Impairment Assessment) (<http://bpac.algomau.ca/wp-content/uploads/2015/09/Water-Quality-Study-Year-1-Technical-Report-March-2014.pdf>) (2021 年 10 月現在)
- 24) Green WR, Hufhines B: A rare Uroglena bloom in Beaver Lake, Arkansas, spring 2015. *Lake Reserv. Manag.*, **33**(1), 8-13, 2017. <https://doi.org/10.1080/10402381.2016.1238427>
- 25) CAIRO WATER SUPPLY: *Bri. Med. J.*, 217-220, 1908.
<https://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC2435830&blobtype=pdf>
- 26) Negoro T, Nishikawa M, Okayama J, Ando M: Behavior of off-flavour Compounds in the Raw Water of Lake Biwa and Its Treatment. *Jpn. J. Water Treat. Biol.*, **27**(1), 7-11, 1991. <https://doi.org/10.2521/jswtb.27.7>
- 27) Nakahara M, Takano R, Ito H, Yano H, Hirase S, Harimaya K: Volatile constituents of Uroglena americana (Chrysophyceae). *J. Agr. Chem. Soc. Jpn.*, **62**(2), 157-159, 1988. <https://doi.org/10.1271/nogeikagaku1924.62.157>
- 28) Koyama J, Fukuda K, Kobayashi N: Seasonal Changes of Uroglena americana in Lakes Chuzenjiko and Yuno-ko. *Jpn. J. Limnol. (Rikusuigaku Zasshi)*, **48**(2), 85-90, 1987. <https://doi.org/10.3739/rikusui.48.85>

- 29) 令和元年度水道水質試験年報-京都市上下水道局水質管理センター(<https://www.city.kyoto.lg.jp/suido/cmsfiles/contents/0000225/225355/reiwa2suisitsukikennenpou.pdf>) (2021年10月現在)
- 30) Miao M, Fu R, Yang D, Zheng L: Vicia root micronucleus assay on the clastogenicity of water samples from the Xiaoqing River in Shandong Province of the People's Republic of China. *Mutat. Res-Fund. Mol. M.*, **426**(2), 143-145, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00057-3](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00057-3)
- 31) Liu W, Qiu R: Water eutrophication in China and the combating strategies. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **82**(9), 781-786, 2007. <https://doi.org/10.1002/jctb.1755>
- 32) Zhao Y, Yu J, Su M, An W, Yang M: A fishy odor episode in a north China reservoir: occurrence, origin, and possible odor causing compounds. *J. Environ. Sci.*, **25**(12), 2361-2366, 2013. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(12\)60317-9](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60317-9)
- 33) Li X, Wang J, Liu Y, Shi J, Zhang X, Chen C: Odorant screening and possible origin analysis of odor episodes in one reservoir in northern China. *J. Water Supply Res. T.*, **64**(7), 847-856, 2015. <https://doi.org/10.2166/aqua.2014.069>
- 34) Wang R, Li D, Jin CX, Yang BW: Seasonal occurrence and species specificity of fishy and musty odor in Huajiang Reservoir in winter, China. *Water Resour. Ind.*, **11**, 13-26, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.wri.2015.04.002>
- 35) Li X, Yu J, Guo Q, Su M, Liu T, Yang M, Zhao Y: Source-water odor during winter in the Yellow River area of China: occurrence and diagnosis. *Environ. Pollut.*, **218**, 252-258, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.06.069>
- 36) Guo Q, Yu J, Li X, Chen T, Wang C, Li Z, Ma W, Ding C, Yang M: A systematic study on the odorants characterization and evaluation in a plain reservoir with wetlands ecosystem. *J. Hazard. Mater.*, **393**, 122404, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122404>
- 37) Guo Q, Zhang X, Li X, Chen T, Yang B, Ding C, Wang C, Pan M, Ma W, Yu J: Variation and mitigation of musty, septic, chemical, grassy, fishy odors and corresponding odorants in a full-scale drinking water treatment plant with advanced treatments. *Chemosphere*, **269**, 128691, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128691>
- 38) Watson SB, Satchwill T, Dixon E, McCauley E: Under-ice blooms and source-water odour in a nutrient-poor reservoir: biological, ecological and applied perspectives. *Freshw.*, **46**(11), 1553-1567, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2001.00769.x>
- 39) Gora SL, Soucie TA, McCormick NE, Ontiveros CC, L'Hérault V, Gavin M, Trueman BF, Campbell J, Stoddart AK, Gagnon GA: Microbiological water quality in a decentralized Arctic drinking water system. *Environ. Sci. Water Res. Technol.*, **6**(7), 1855-1868, 2020. [10.1039/d0ew00019a](https://doi.org/10.1039/d0ew00019a)
- 40) Hargesheimer EE, Watson SB: Drinking water treatment options for taste and odor control. *Water Res.*, **30**(6), 1423-1430, 1996. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(96\)00027-9](https://doi.org/10.1016/0043-1354(96)00027-9)

- 41) Thammasane S, Kaosol T: Single and combined chemical coagulants for *Oscillatoria* sp. removal in raw water for water treatment plant. *Eng. Appl. Sci. Res.*, **43**, 247-249, 2016.
- 42) Jüttner F: Detection of lipid degradation products in the water of a reservoir during a bloom of *Synura uvella*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**(1), 100-106, 1981. <http://doi.org/10.1128/aem.41.1.100-106.1981>
- 43) Chorus I, Klein G, Fastner J, Rotard W: Off-Flavors in Surface Waters-How Efficient is Bank Filtration for their Abatement in Drinking Water?. *Water Sci. Technol.*, **25**(2), 251-258, 1992. <https://doi.org/10.2166/wst.1992.0059>
- 44) Rashash DMC, Dietrich AM, Hoehn RC, Parker BC: The influence of growth conditions on odor-compound production by two chrysophytes and two cyanobacteria. *Water Sci. Technol.*, **31**(11), 165-172, 1995. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(95\)00472-Y](https://doi.org/10.1016/0273-1223(95)00472-Y)
- 45) Jüttner F, Höflacher B, Wurster K: SEASONAL ANALYSIS OF VOLATILE ORGANIC BIOGENIC SUBSTANCES (VOBS) IN FRESHWATER PHYTOPLANKTON POPULATION, **22**(2), 169-175, 1986. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1986.tb04160.x>
- 46) Whipple GC: The observation of odor as an essential part of water analysis. *Public Health Pap. Rep.*, **25**, 587-593, 1899.
- 47) Matsueda H, Uchida T: Environment and Resources of Lake Toya and Usu Volcano area. <http://hdl.handle.net/2115/59817>
- 48) Hayes KP, Burch MD: Odorous compounds associated with algal blooms in South Australian waters. *Water Res.*, **23**(1), 115-121, 1989. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(89\)90069-9](https://doi.org/10.1016/0043-1354(89)90069-9)
- 49) Buffin LW: Treatment of algae-induced tastes and odors by chlorine, chlorine dioxide and permanganate. master thesis, Faculty of the Virginia Polytechnic and state University, the U.S., 1992.
- 50) Rashash DMC, Dietrich AM, Hoehn RC: FPA of selected odorous compounds. *J. Am. Water Works Ass.*, **89**(4), 131-141, 1997. <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1997.tb08213.x>
- 51) 「びわ湖の日」について-滋賀県(<https://www.pref.shiga.lg.jp/biwakatsu/quiz/index.html>) (2021年10月現在)
- 52) Guo Q, Yu J, Zhao Y, Liu T, Su M, Jia Z, Zhao Y, Mu Z, Yang M: Identification of fishy odor causing compounds produced by *Ochromonas* sp. and *Cryptomonas ovate* with gas chromatography-olfactometry and comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Sci. Total Environ.*, **671**, 149-156, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.370>
- 53) Kikuchi T, Mimura T, Moriwaki Y, Ando M, Negoro K: Metabolites of a Diatom, *Synedra rumpens* KUTZ. isolated from Water in Lake Biwa. Identification of Odorous Compounds, n-Hexanal and n-Heptanal, and Analysis of Fatty Acids. *Chem. Pharm. Bull.*, **22**(4), 945-949, 1974. <https://doi.org/10.1248/cpb.22.945>

- 54) Pohnert G: Wound-activated chemical defense in unicellular planktonic algae. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **39**(23), 4352-4354, 2000. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20001201\)39:23<4352::AID-A NIE4352>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20001201)39:23<4352::AID-A NIE4352>3.0.CO;2-U)
- 55) Lin TF, Watson SB, Dietrich AM, Suffet IH: Taste and Odour in Source and Drinking Water: Causes, Controls, and Consequences. IWA Publishing, London, UK, 2019.
- 56) Mosandl A, Heusinger G, Gessner M: Analytical and sensory differentiation of 1-octen-3-ol enantiomers. *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 119-122, 1986.
- 57) Siver AP, Wee JL: Nova Hedwigia Chrysophytes and related organisms: topics and issues. Gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung, Germany, 2001.
- 58) 高分解能 LC-MS システム Q Exactive Focus による、ごまサンプル中の農薬スクリーニングと定量分析-サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社 (<https://www.thermofisher.com/content/dam/tfs/Country%20Specific%20Assets/ja-ja/CMD/LCMS/Application-Notes/LCMS089-JA.pdf>) (2021 年 10 月時点)

第 2 章 固相抽出による 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (2,4-Dinitrophenylhydrazine: DNPH) 誘導体化試料の選択的精製

1 はじめに

2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (2,4-dinitrophenylhydrazine, DNPH) はアルデヒドおよびケトン进行分析の際の誘導体化試薬として最も汎用的である。同物質の有する末端アミンが、アルデヒドまたはケトンのカルボニル基に対して求核的に攻撃し、脱水を伴いながらヒドラゾン誘導体 (シッフ塩基) を生成する。DNPH は LC または LC/MS による分析のための誘導体化試薬として優れており、 $\lambda=360$ nm 付近の近紫外線をよく吸収する¹⁾ので、UV-Vis での分析に適している。また、同物質は負イオン化モードによる LC-ESI-MS での分析にも適している²⁾。このような背景から、DNPH は大気中または水中のアルデヒド/ケトン類进行分析の際に頻繁に用いられており、このことは多くの既報で散見される³⁻⁵⁾。特にホルムアルデヒドについては、発がん性を有するために公衆衛生上の関心が高いが、その低い分子量ゆえに極めて揮発性が高く、そのままの状態では正確な定量は困難である。このため、DNPH によりホルムアルデヒドを誘導体化し、得られた誘導体を分析する手法が用いられる。

しかしながら、DNPH による環境試料の誘導体化は別の問題を引き起こしうる。誘導体化反応の定量性を担保するために、通常は環境試料中のアルデヒド/ケトン類の推定濃度に対して過剰量の DNPH が用いられるが、これは同時に、誘導体化後の試料中に大量の未反応 DNPH が残存することを意味する。そのような試料を分析機器内部に導入すると、LC カラムの目詰まり、MS のイオン源の汚染、および二次電子増倍管のエッジング等の様々な悪影響を引き起こし、長期的には回復不能なダメージを分析機器に与えうる。ダイバートバルブ等を用いることによりイオン源への導入は回避できるものの、その場合でもあっても LC システム内に未反応 DNPH を導入することとなるため、誘導体化後の試料を精製した後に分析することが望ましい。この精製においては、未反応 DNPH を除去しつつも、分析対象である DNPH 誘導体を回収可能な選択的精製が要求される。

そこで本研究では、選択的精製を達成するための手法として固相抽出 (Solid Phase Extracction, SPE) に着目した。一般に SPE による精製は水系試料を対象として、分析種間の疎水性の差やイオン化の難易の差を利用するものであるため、本研究においても同様に水系試料を対象とした精製方法の開発を試みた。ただし DNPH 誘導体は加水分解を受けやすいことが知られている⁶⁾ため、精製方法の開発に先立ち、DNPH 誘導体の加水分解速度を検討した。この時、DNPH 誘導体のモデル物質として formaldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazone (ホルムアルデヒドの DNPH 誘導体、以下 C1DNPH) を用いて、これをアセトニトリル (ACN) に溶解させたものを水で 5 倍に希釈し、得られた検液を LC-PDA を用いて繰り返し分析して C1DNPH のピーク面積値の経時変化を観察した。その結果、C1DNPH は溶液調製から 60 分程度が経過すると約 1 割が加水分解することが判明した。

固相抽出による精製はこれと同等程度の時間を要するため、水系試料を対象とした精製方法の開発を断念した。

次いで、非水系の誘導体化試料を対象とした精製方法の開発に着手した。DNPH は ACN に可溶であり、誘導体化の際の反応溶媒としても ACN が用いられることが多いため、ACN 中の未反応 DNPH および DNPH 誘導体の精製方法を検討した。検討には、オクタデシルシリル (Octa Decyl Silyl, ODS) を有する逆相系の固相や、陽イオン/陰イオン交換カラム等を含む合計 7 種の固相を用いて、個別に DNPH 除去率および誘導体回収率を算出した。検討には、heptanal の DNPH 誘導体 (以下 C7DNPH) を用いた。その結果、弱陽イオン交換カラムが最も優れた精製効率を示し、DNPH 除去率および誘導体回収率ともに 90% を上回った。しかしながら選択的精製を可能とする精製機構が不明であったため、密度汎関数理論 (Density Functional Theory, DFT) を用いた量子化学計算によって、精製実験の結果を支持することを試みた。

弱陽イオン交換カラムが有するフェニル基に対して、DNPH および C7DNPH が有するフェニル基が重なるような錯体を想定し、それぞれについて構造最適化および振動モード解析を実施した。得られた最適構造の有する振動モードはいずれも実振動であったことから、適切に構造最適化できたと判断した。その上でそれぞれのエネルギーを比較したところ、固相-DNPH 錯体に対して固相-C7DNPH 錯体の方が約 11 kJ/mol だけエネルギー的に安定であり、精製実験の結果を支持する計算結果が得られた。最適化後の構造に鑑みて、フェニル基同士の π - π スタッキングが安定化をもたらしていることが示唆された。

2 実験方法

2-1 使用した試薬および器具

DNPH (wetted with ca 50% water)、Formaldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazone、およびヘプタナールは東京化成工業 (東京) から購入した。LC/MS グレードの超純水とアセトニトリル、試薬特級のアセトニトリル、およびリン酸 (85% 水溶液) は富士フィルム和光純薬より購入した。水酸化アンモニウム水溶液はシグマアルドリッジジャパン (東京) より購入した。本研究で使用した固相である Sep-Pak C18 Plus、Sep-Pak PS-2 Plus、Oasis HLB Plus、Oasis MCX Plus、Oasis WCX Plus、Oasis MAX Plus、Oasis WAX Plus は、いずれも日本ウォーターズ (東京) より購入した。

2-2 DNPH による試料の誘導体化

2-3-3 節にて heptanal を DNPH による誘導体化し、誘導体化後の検液を固相に通すことで精製効率を検討したが、その際の誘導体化の手順を以下に示す。

DNPH 誘導体化は図 2-1 のような反応機構で進行するため、酸触媒が必要であることがわかる。本研究においては、リン酸を酸触媒として使用した。333 μ M の heptanal ACN 溶液 50 mL に 20 v/v% のリン酸水溶液を 100 μ L 添加し、さらにこの混合液に 3 mM の DNPH ACN

溶液を添加した。添加後の検液を軽く攪拌した後に、室温で 20 分間静置させ、その後後述する SPE 処理を施した。

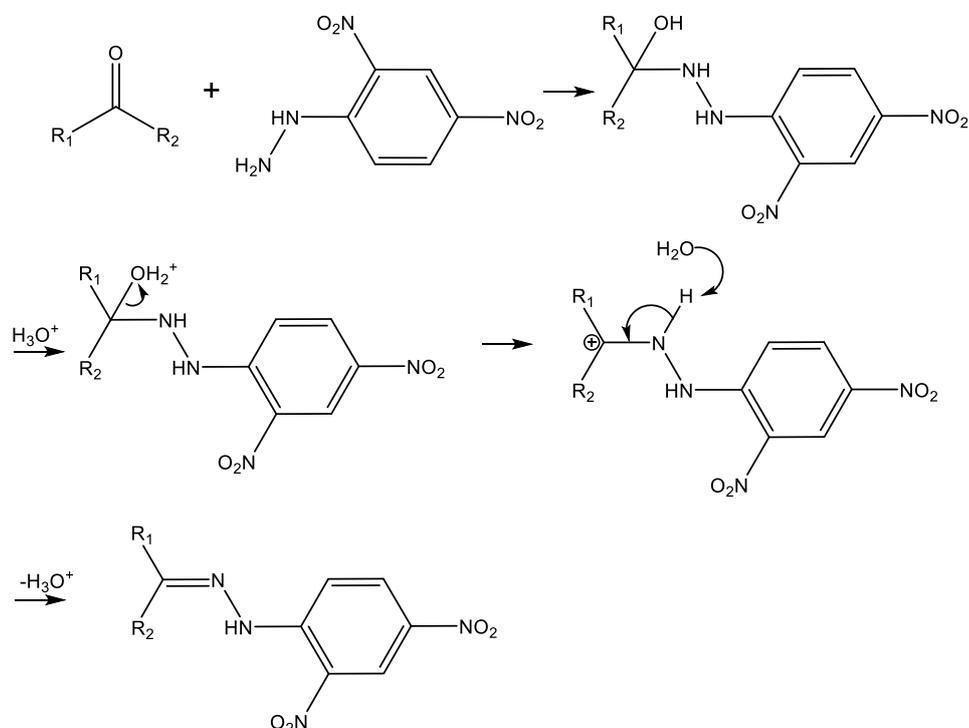


図 2-1 DNPH 誘導体化の反応機構

2-3 固相抽出による DNPH 誘導体化試料の精製

2-3-1 水系試料を対象とした固相抽出による精製

一般に SPE によって試料を精製する際、精製対象の試料は水溶液である。SPE では分析種の疎水性の差や、陽イオン/陰イオン化のされやすさの差に基づいての成分分離が一般的であるが、水以外の有機溶媒に溶解した試料を通液すると、分析種の溶媒に対する溶解度が、分析種と固相間の疎水性相互作用の強さを上回ってしまうため、固相樹脂表面への吸着が起こらない。また、有機溶媒中では水のイオン積が成立せず、試料の pH 測定が困難となるほか、酸解離定数 pKa に基づくイオン化率の計算が不可能となるため、イオン交換による精製を企図することも難しい。本研究においては、未反応 DNPH と DNPH 誘導体とでは疎水性に大きな差があると予想し、誘導体化後の試料を水で希釈した後に疎水性相互作用によって精製を達成することを試みた。しかしながら、DNPH 誘導体化反応は可逆的であり、酸性条件下では DNPH 誘導体が再び DNPH に分解されることがわかっている⁶⁾。そこで、水で希釈したことによる DNPH 誘導体の回収率低下を防ぐために、まずは DNPH 誘導体の加水分解速度の検討を実施した。

検討のモデル物質として、ホルムアルデヒドの DNP 誘導体である formaldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazone (以下 C1DNPH) を用いた。1 mM の C1DNPH ACN 溶液を調製し、これを 2 つのアリコートに分割した後に、一方のみを水により 5 倍希釈した。先に示した DNP 誘導体化手順を考慮し、両方のアリコートに 20 v/v% のリン酸水溶液を添加した。2 種類のアリコートをそれぞれ 0.22 μm の疎水性 PTFE メンブレンフィルタ (島津ジーエルシー、東京) によりろ過した後に、ACQUITY HClass-PDA (Waters, MA, USA) を用いて 30 分おきに分析した。分析の詳細な条件は、2-4 説にて後述する。

2-3-2 非水系試料を対象とした固相抽出による精製

上述の固相を、0.02 v/v% のリン酸を含有する ACN 20 mL でコンディショニングし、2-2 節に示した手順で調製した誘導体化後の検液 2 mL を各固相に通液した。固相を通過した検液をガラス試験管内に採取し、さらに固相樹脂の間隙に残存する検液を回収するために、各固相を 3 mL の ACN で洗浄する工程を三回繰り返した。このときの洗液もガラス試験管内に採取し、合計 11 mL (2+3 \times 3=11) の検液を得た。その後、全ての検液が等しく 13 mL となるように ACN を用いてメスアップした。すなわち固相通液の前後で比較して、検液は 6.5 倍 (13/2) に希釈された。

これと併行して、SPE による精製を施さない誘導体化検液も同時に準備し、精製した試料と同様に ACN を用いて 6.5 倍希釈した後に 0.22 μm の疎水性 PTFE メンブレンフィルタを用いてろ過した。この試料を LC-PDA で分析して得られた DNP および heptanal の DNP 誘導体 (以下 C7DNPH) のピーク面積値を基準として、各固相の SPE 精製後の DNP 除去率および C7DNPH 回収率を算出した。

2-4 液体クロマトグラフィー分析による DNP 除去率および誘導体回収率の算出

UPLC の分析カラムとして、ODS カラム (BEH C18, 1.7 μm , 2.1 \times 50 mm, Waters) を用いた。移動相には 0.003 v/v% NH_4OH を含有する超純水 (pH=10.2、移動相 A) および ACN (移動相 B) を使用した。グラジエント分析に用いたバイナリプログラムは B 10% (0-1 min)、90% (1-7 min)、90% (7-9 min)、10% (9-9.5 min)、10% (9.5-10 min) とした。移動相の体積総流量は 0.5 mL/min (線速度=2.4 mm/sec) とし、210-400 nm の波長範囲をスキャンした。データ解析には MassLynx v4.1 software (Waters) を使用した。

各固相の DNP の除去率は、 $100 - (A_p/A_n) \times 100$ (A_p は精製試料の DNP ピーク面積値、 A_n は未精製試料の DNP ピーク面積値) として算出した。同様に、C7DNPH の回収率は、 $(A_p'/A_n') \times 100$ (A_p' は精製試料の C7-DNP ピーク面積値、 A_n' は未精製試料の C7-DNP ピーク面積値) として算出した。

2-5 量子化学計算による分析種間の相互作用の検討

SPE における精製機構を検討することを目的として、密度汎関数理論 (DFT) を用いる量子

化学計算を実施した。原子・分子のような微視的なスケールにおける物理現象を記述するには **Schrödinger** 方程式が用いられる。これは理論的には正しい方程式であるものの、現実的な多原子分子に対してこれを適用して厳密解を得ることは不可能であり、水素分子ですら厳密解を得られない（水素原子に対しては厳密解を求めることが可能である）。また、分子を構成する原子数に対して計算量が指数関数的に増加するため、計算機技術が発達した現代においても、**Schrödinger** 方程式をそのまま解くということを行われない。

そのような状況を踏まえ、**Schrödinger** 方程式の近似解を短時間のうちに計算可能な手法が積極的に考案されてきた。DFT はそのうちの一つであり、化学分野においては最も頻繁に用いられる計算理論の一つとなっている。そこでまずは **Schrödinger** 方程式の概要を紹介した後に、DFT が確立されるに至った経緯、および実践的な計算方法等について整理する。

2-5-1 1 電子系における **Schrödinger** 方程式

先に述べた様に、原子や分子といったマイクロなスケールでの物理現象を考察するための方程式が **Schrödinger** 方程式である。ドイツの Erwin **Schrödinger** によって 1920 年代に考案されたこの方程式を皮切りに、量子力学の理論は大きな発展を遂げた。量子力学の誕生からはまだ 100 年程度しか経過しておらず、Newton らによって確立された古典力学と比較すると、学問としての歴史は浅い。

Schrödinger 方程式が誕生した背景には、当時の古典力学では説明不可能な様々な物理現象の存在があった。量子力学が台頭する直前、19 世紀のドイツは著しい近代化の最中にあり、製鉄業が重要な国策の一つだった⁸⁾。数千度にも達する高温で熱された鉄は橙赤色の光を発するが、炉内の色を頼りに職人たちが鉄の純度を見極めていた。しかし、これはまさしく職人技であったために、より客観的な、炉内の色を分析して鉄の純度を向上させる技術の開発が求められていた。後に炉内から発せられる光を分光し、スペクトルに基づいて鉄の純度を把握することが可能となったが、当時の物理学者は「スペクトルの波形を理論的に記述する式はないか?」という疑問を抱くことになる。

この疑問に対し、Rayleigh と Jeans は Rayleigh-Jeans の式を提唱した (図 2-2 の赤線)。しかしながら彼らの方程式には大きな問題があった。すなわち下図のように、高周波数側では彼らの式は実測値と全く一致しなかった。この現象は紫外破綻と呼ばれる。

Rayleigh-Jeans の式は、暗黙の裡に古典力学的な仮定を導入していた。すなわち、光のエネルギーは連続的であり、どのような値でも取り得ると考えられていた。これは当時の物理学界ではほとんど常識のように扱われていたが、その常識に異議を唱え、紫外破綻の問題を見事に解決して見せたのが Planck である。彼は、光のエネルギー E は振動数 ν の整数倍に比例しなければならず、その比例定数 h を Planck 定数であるとして、 $E=n h \nu$ ($n=1, 2, 3, \dots$) という式を提唱した。すなわち、光がとり得るエネルギーは連続的ではなく離散的であることが判明した。「量子」という語には「それ以上分割不可能な物質構成の最小単位」という意味が含まれており、すなわち全ての物質は整数倍の (離散的な数の) 量子から構

成されている。量子的であることと離散的であることには密接な関係があり、ここから量子力学が大きく発展していくことになる。

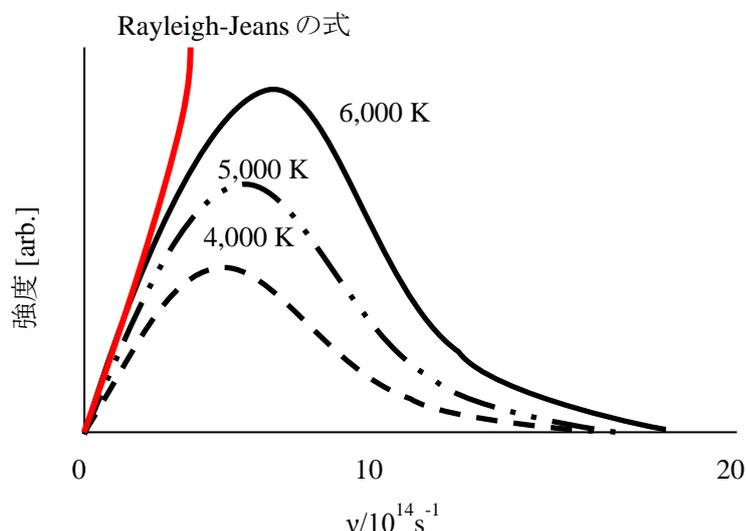


図 2-2 スペクトルの周波数依存性および Rayleigh-Jeans の式⁹⁾

また現代では、原子は原子核と電子から構成されており、陽子と中性子から成る原子核の周囲を電子が運動しているというのはもはや周知の事実として扱われているが、当時はこのことも明らかになっておらず、原子はどのように構成されているのかというのも当時の物理学者にとっての難問であった¹⁰⁾。この問題に取り組んだ第一人者が **Rutherford** であり、彼は放射線の一種である α 線、 β 線を発見するなどの多大な功績から「原子物理学の父」と称されている。当時の原子モデルとして有力だったのは **J. J. Thomson** によるブドウパンモデルであり、薄く広がる正電荷の中を電子が自由に運動しているというものであった¹¹⁾。仮にブドウパンモデルが正しければ、原子の中に入射された α 粒子はほとんど偏向しない（向きを変えない）で直進すると予想された¹²⁾。ところが実際には、8000 個に 1 個ほどの割合で大きく偏向する α 粒子が存在し、中には跳ね返されるような挙動を示すものもあった。この実験事実から **Rutherford** は、正電荷はブドウパンモデルのように薄く広がって分布するのではなく、原子の中心部の小さな領域に集中しており、 α 粒子がこの小さな領域に接近した時にのみ大きな斥力を受けて偏向する、そして電子は小さな流域の周辺を惑星の様に周回運動しているものと考えた。

しかしながら **Rutherford** の考えもまた、旧来の物理学との矛盾に苦しんだ。電子のような荷電粒子が移動すると、そこからは電磁波が放射されて電子はエネルギーを失い、やがて原子核からの引力を受けて「墜落」することが予想された。すなわち、従来の考え方は原子核の周囲を定常的に周回運動する電子と言うのは実現不可能だった。この問題に対しても、紫外破綻の時と同様に、量子化による解決が試みられ、これを実践したのが **Bohr**

である。Planck が光のエネルギーの量子化を提案したのに対して、Bohr は電子の軌道の量子化を提案した。すなわち電子はある空間内を自由に運動するのではなく、ある特定のエネルギー準位を有する軌道上のみを運動し、その際にはエネルギーを放射しないと仮定した。そして電子が異なるエネルギー準位の軌道間を移動するとき、エネルギー準位の差に相当する光子を放出する、と考えた。これにより、水素原子の発する線スペクトルの波長を理論的に説明可能となった¹⁰⁾。

ここまでの議論においては、電子は微小な粒子であることを前提としていたが、実際にはこの考えも正しくないことが判明した。より正確には、電子は粒子としても波としても振る舞えることが証明された。この考え方は、「波動方程式」とも呼ばれる Schrödinger 方程式の基礎となる。

波が示す特徴的な現象の一つとして、回折があげられる。これは媒質中を伝わる波の進行方向に対して障害物（スリット等）がある時、一見すると障害物に阻まれて波が伝わらないように思われるものの、実際にはスリットの背後などに回り込んで波が伝わっていく現象である。これを利用した技術の一つが X 線による結晶構造解析であり、結晶構造を有する物質に対して X 線を照射すると、被照射物質の原子間隔に依存する回折パターンを示すので、これを解析することで結晶構造を推定できる。そして電子も X 線と類似した回折図形を示す。この事実は、電子が波として振舞うことの証左の一つである⁹⁾。

一方で、電子は運動量を持つ粒子としても振舞い、このことを示す現象の一つが光電効果である。周波数を表す単位であるヘルツの由来となっているドイツの物理学者 Hertz は、金属表面に紫外線を照射すると電子が放出されることに気づいた。ところが、この時放出される電子の運動エネルギーは紫外線の強度（振幅）とは全く無関係であり、また紫外線の振動数がある一定の値を下回ると、どんなに強度の高い紫外線を照射しても電子は全く放出されなかった。当時の古典力学では、電子の運動エネルギーは紫外線の強度に依存し、また十分な強度を有する紫外線であれば振動数に関係なく電子が放出されると考えられていたため、光電効果は当初 2 つの大きな矛盾を抱えていたことになる。

Planck は光のエネルギーは量子化されていると唱えた一方、放出されたエネルギーは古典的な波動として振舞うと考えていた。これに異を唱えたのが Einstein であり、彼の「光量子仮説」は、光は $E=h\nu=hc/\lambda$ (c は光速、 λ は波長) のエネルギーを持つ粒子であると考えたことで光電効果を説明可能であると見出した¹³⁾。この業績により Einstein は後年、ノーベル物理学賞を受賞した。

回折や光電効果の実験から、徐々に「光は波としても粒子としてもふるまう」という考え方が浸透しはじめた。これはもはや古典力学の範疇を超えてしまっていたため、光や電子の振る舞いを矛盾なく説明するためには、新しい理論が必要となった。Heisenberg は行列力学を用いてこの問題の解決を試みたが、彼が提唱した式の物理的意味は判然としなかった。そこで登場したのが Schrödinger 方程式であり、行列力学と違って比較的シンプルな微分方程式であるにもかかわらず、Heisenberg の提唱した行列力学と数学的に等価である

ことが後に証明された。

Schrödinger 方程式は以下のように表される。Newton の法則 $F=ma$ が古典力学における公理とみなされ、その導出は不可能であることと同じように、この方程式も量子力学における基本的な公理とみなされていて、導出は不可能である。

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{d^2}{dx^2} + V(x) \right] \psi(x) = E\psi(x)$$

ここで $\hbar = h/2\pi$ であり、表記の簡便性のために頻りに用いられる表現である。 m は粒子の質量、 x は位置座標（上式は簡単のために1次元空間を想定している）、 $V(x)$ はポテンシャルエネルギー、 $\psi(x)$ は波動関数、 $E(x)$ は全エネルギーである。波動関数 $\psi(x)$ が、ポテンシャル $V(x)$ の中で運動する質量 m の運動を記述する。

簡単かつ具体的な例として、いわゆる「井戸型ポテンシャル」における1電子の Schrödinger 方程式を考える。図 2-3 のような無限に深い井戸の中で運動する電子の全エネルギーは、どのように表せるだろうか。まず、この井戸の中での電子は自由粒子、すなわちポテンシャルエネルギーを感じていない ($V(x)=0$) と仮定する。すると先ほどの Schrödinger 方程式はもっと単純化できて、移項した上で係数を整理すると以下が得られる。

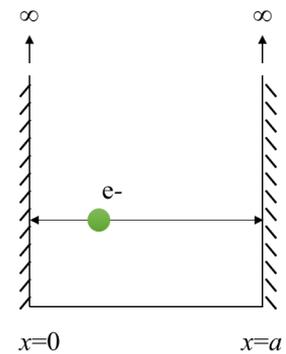


図 2-3 無限に深い井戸の中の電子

$$\frac{d^2}{dx^2} \psi(x) + \frac{2mE}{\hbar^2} \psi(x) = 0$$

ここで、これを解くために、次のような微分方程式を考える。

$$\frac{d^2 f(x)}{dx^2} + k^2 f(x) = 0$$

右辺が 0 の定数係数線形微分方程式の解は $f(x)=e^{ax}$ なので¹⁴⁾、これを上式に代入すると、

$$\begin{aligned} a^2 e^{ax} + k^2 e^{ax} &= 0 \\ \therefore e^{ax} (a^2 + k^2) &= 0 \\ a = \pm ik, f(x) = e^{ax} &= e^{\pm ikx} \end{aligned}$$

ところで、線形微分方程式ではある解の定数倍も解となり、解の和もまた解となる。よ

って、より一般的な形として解を表すには、以下のように変換した方が適切と言える。 C_3 , C_4 は定数係数であり、変形の途中で Euler の公式を用いた。

$$\begin{aligned} f(x) &= C_1 e^{ikx} + C_2 e^{-ikx} \\ &= C_1 (\cos kx + i \sin kx) + C_2 (\cos(-kx) + i \sin(-kx)) \\ &= (C_1 + C_2) \cos kx + (C_1 - C_2) i \sin kx \\ &= C_3 \cos kx + C_4 \sin kx \end{aligned}$$

$k^2=2mE/\hbar^2$ とすれば井戸型ポテンシャルの Schrödinger 方程式と全く同じ形になるので、

$$\psi(x) = C_3 \cos \sqrt{\frac{2mE}{\hbar^2}} x + C_4 \sin \sqrt{\frac{2mE}{\hbar^2}} x$$

井戸は無限に深いから、井戸の外側における電子の存在確率はゼロである。ここで、Born による波動関数の確率解釈を考える。彼は、波動関数について、ある微小空間 $d\tau$ 中に粒子を見出す確率は $|\psi|^2 d\tau$ に比例すると考えた。これは現在でも一般的に受け入れられている波動関数の解釈法であり、現在は1次元の場合を考えているので、 $0 \leq x \leq a$ の領域外では $|\psi(x)|^2=0$ 、すなわち $\psi(x)=0$ である。また、波動関数は連続¹⁵⁾だから、井戸の両端でも $\psi(0)=\psi(a)=0$ を満たす必要がある。 $\cos(0)=1, \sin(0)=0$ なので、 $\psi(0)=\psi(a)=0$ であることを考慮すると、ただちに $C_3=0$ が導かれる。また、数学的には $C_3=C_4=0$ の場合も解となり得るが、この場合 $\psi(x)=0$ となって物理的には全く意味のない結果となってしまうので、 $C_4=0$ の選択肢はここでは除外する。これを踏まえると、電子の全エネルギー E が次のように算出される。

$$\begin{aligned} \psi(a) &= C_4 \sin \left(a \sqrt{\frac{2mE}{\hbar^2}} \right) = 0 \\ \therefore a \sqrt{\frac{2mE}{\hbar^2}} &= n\pi, \quad a^2 \frac{2mE}{\hbar^2} = n^2 \pi^2 \quad (n = 1, 2, \dots) \\ E &= \frac{n^2 \pi^2 \hbar^2}{2ma^2} = \frac{n^2 \pi^2 \left(\frac{\hbar}{2\pi}\right)^2}{2ma^2} = \frac{n^2 \hbar^2}{8ma^2} \quad (n = 1, 2, \dots) \end{aligned}$$

ここで着目すべきは、自然数 n が解に含まれており、その他の項は全て定数であるという点である。 n は離散的な値しか取れないため、 E もおのずと離散的な値となる。すなわち、電子のエネルギーが量子化されていることの表れである。

最も単純な例としてポテンシャルの存在しない1次元空間での Schrödinger 方程式を考えただが、2次元や3次元の場合であっても基本的には同じ考え方でエネルギーを導ける（ただ

し位置座標ごとに変数分離するなどの手法は別途必要になる)。しかしこの節では無視していたポテンシャルエネルギーを考慮すると、Schrödinger 方程式は極めて複雑となり、多原子分子についての厳密解を得ることはできなくなる。

2-5-2 多電子系における Schrödinger 方程式の近似的解法としての密度汎関数理論

多電子系の最も単純な例として He 原子の Schrödinger 方程式を考えると、これは以下のように表される。

$$\left(-\frac{\hbar^2}{2M}\nabla^2 - \frac{\hbar^2}{2m_e}\nabla_1^2 - \frac{\hbar^2}{2m_e}\nabla_2^2\right)\psi(\mathbf{R}, \mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) + \left(-\frac{2e^2}{4\pi\epsilon_0|\mathbf{R} - \mathbf{r}_1|} - \frac{2e^2}{4\pi\epsilon_0|\mathbf{R} - \mathbf{r}_2|} - \frac{2e^2}{4\pi\epsilon_0|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2|}\right)\psi(\mathbf{R}, \mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) = E\psi(\mathbf{R}, \mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2)$$

ここで $\nabla, \nabla_1, \nabla_2$ はそれぞれ原子核、電子 1、電子 2 のラプラシアン、 $\mathbf{R}, \mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2$ はそれぞれ原子核、電子 1、電子 2 の位置、 m_e は電子の質量である。Born-Oppenheimer 近似を用いて原子核の運動エネルギーや核-電子間引力を無視し、かつ \mathbf{R} を定数（かつ原点）とみなせば、

$$\left(-\frac{\hbar^2}{2m_e}\nabla_1^2 - \frac{\hbar^2}{2m_e}\nabla_2^2\right)\psi(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) - \frac{2e^2}{4\pi\epsilon_0}\left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2}\right)\psi(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) + \frac{2e^2}{4\pi\epsilon_0|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2|}\psi(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) = E\psi(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2)$$

ただし Born-Oppenheimer 近似を用いても、左辺第 3 項の電子反発項のために左辺を変数分離することができないので、厳密解を得ることはできない。多原子分子はこれよりも電子間反発を考える 2 電子の組み合わせが圧倒的に多いので、もはや Schrödinger 方程式を解くことは不可能である。

このため、厳密解を得ることは不可能であるにしても、より現実的な範囲で近似解を得るための手法が求められるようになった。密度汎関数理論 (Density Functional Theory, DFT) も、そのような流れの中で生まれた手法の一つであり、現在は化学分野で最も頻繁に用いられる計算手法の一つとなっている。

ここで、旧来の分子軌道法と DFT の考え方の違いを考察する¹⁶⁾。分子軌道法では、電子数 N や外場 $v(\mathbf{r})$ をインプット情報として使い、ここから定義されるハミルトニアン $H(\mathbf{r})$ の固有値問題を解くことでさまざまな物理量を導出している。最終的に導出可能な物理量の中に、電子密度 $\rho(\mathbf{r})$ も含まれている。ところが DFT は、分子軌道法の流れを逆行するように、電子密度 $\rho(\mathbf{r})$ をインプットとして与えることで諸物理量が計算される。この考え方を可能としているのが“Hohenberg-Kohn の定理”である (図 2-4)。

Hohenberg-Kohn の定理は第一定理と第二定理から成り、特に第一定理が計算を行う上で大きな意味を持つ。第一定理の主張は「基底状態が縮退していないとき、外場 $v(\mathbf{r})$ と基底状態の波動関数 Ψ は、電子密度 $\rho(\mathbf{r})$ を与えると一意的に決まる」というものである。下式の関係を用いることで、電子密度 $\rho(\mathbf{r})$ から直ちに電子数 N も直ちに計算可能である。

$$\rho(\mathbf{r}) = N \int \Psi^* \Psi d\mathbf{r}_2 \dots d\mathbf{r}_N$$

すなわち、図 2-4 左側に示した一連の計算過程は、 $\rho(\mathbf{r})$ が既知であればすべて計算可能である。換言すると、基底状態の全エネルギーを初めとする諸物理量は、電子密度 $\rho(\mathbf{r})$ だけで決まる汎関数である¹⁷⁾。

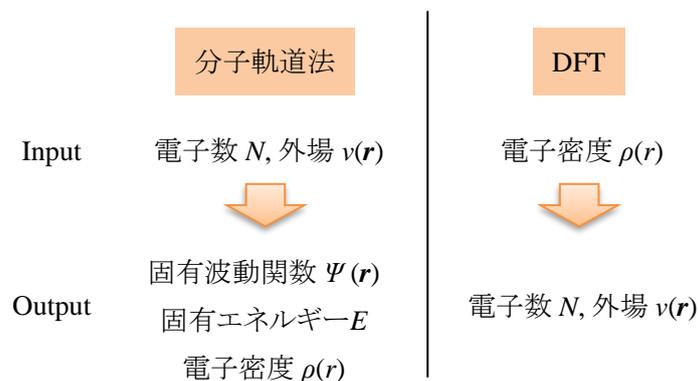


図 2-4 分子軌道法と DFT の比較¹⁶⁾

また第二定理の主張は、基底状態の全エネルギーは、電子密度の汎関数 $E[\rho(\mathbf{r})]$ を最小化することによって得られるというものである (B が A の汎関数であることは、 $B[A]$ のように表される)。ところが、汎関数 $E[\rho(\mathbf{r})]$ が実際にどのような形をしているかは全くの未知である。よって、Hohenberg-Kohn の定理は電子密度をインプットとして用いる計算が原理的に可能であることを示しているものの、具体的にどう計算すればよいのかは示していない。特に電子間の相互作用については難解であり、古典的なクーロン反発の他にも、古典力学では説明不可能な交換相互作用などを記述する必要がある。電子の運動エネルギーについても、電子密度の汎関数として表現する方法は見つかっていない。これは電子間の相互作用があるために、単純に $K=mv^2/2$ としても正確な運動エネルギーは表現できないためである。こうした物理現象をどのように記述するかによって DFT の計算結果は異なってくる¹⁸⁾。最も頻繁に用いられるのは Kohn-Sham 型の汎関数である。

Kohn-Sham 方程式は、大筋としては Schrödinger 方程式と同じ形をしている。また先に述

べたように、電子の運動エネルギーと交換相互作用などの量子力学的効果をどう考えるかが問題となるが、Kohn-Sham 方程式においては、電子の運動エネルギーについては電子間相互作用を考慮しない。よって問題となるのは、交換相互作用などの量子力学的効果を如何に表現するかであるが、Kohn-Sham 方程式は次のように表される（簡単のために原子単位系による表記を用いた）。

$$\left(-\frac{1}{2}\nabla^2 - \sum_A \frac{Z_A}{r_A} + V^{\text{eff}}\right)\phi_k = \epsilon_k \phi_k$$

$$V^{\text{eff}} = V^{\text{Coulomb}} + V^{\text{XC}}$$

ここで第一項は電子の運動エネルギー、第二項は電子-核間ポテンシャル、 ϕ_k は k 番目の分子軌道、 ϵ_k は ϕ のエネルギーである。また、 V^{eff} 項が電子間の相互作用から生じるポテンシャルエネルギーであり、交換相関汎関数ともいう。その名の通り交換汎関数と相関汎関数から成る。量子力学的な効果の一つとして交換相互作用があるが、これは電子のスピンに由来し、以下のように一重項状態（スピンの反平行）と三重項状態（スピンの平行）のエネルギー差をもたらす（ J はクーロン積分、 K は交換積分と呼ばれる）。

$$E_{\text{singlet}} \text{ (スピンの反平行)} = J+K$$

$$E_{\text{triplet}} \text{ (スピンの平行)} = J-K$$

交換相互作用に由来するポテンシャルを交換ポテンシャルといい、これを記述する汎関数が交換汎関数である。Kohn-Sham 方程式では、交換汎関数を記述するのに局所密度近似（Local Density Approximation, LDA）の考え方を用いる。これは、ある一電子に注目し、残りは電子密度平均として考えることで、多体問題を一体問題に帰結させる方法である。経験的に現実を反映する一方で、注目する電子自身との相互作用も取り入れてしまうため、電子間相互作用が大きい系には不向きである。Kohn-Sham 方程式で用いられる交換汎関数は、Fock によって提案された以下の LDA 交換汎関数である。

$$E_x^{\text{LDA}} = -\frac{3}{4} \left(\frac{3}{\pi}\right)^{\frac{1}{3}} \int \rho^{\frac{4}{3}}(\mathbf{r}) d\mathbf{r}$$

一方で、運動エネルギー、クーロン相互作用、交換相互作用以外の相互作用を総称して相関相互作用と呼び、それに由来するポテンシャルを相関ポテンシャルといい、これを記述するのが相関汎関数である。ただし相関汎関数にはさまざまなバリエーションが存在し、計算対象の系に応じて適切な相関汎関数を選択することが求められるが、ここでは、図 2-5 に代表的な汎関数を紹介するにとどめる。なお GGA は、LDA を電子密度の勾配を用いて補正したもの（Generalized Gradient Approximation, GGA）であり、運動エネルギー密度 τ で

更に GGA を補正したものがメタ GGA である。そのほか、長距離補正項を含むような特殊な汎関数も存在する。

LDA	GGA	メタGGA	長距離補正など
VWN-LDA _C	B88 _X	Lap 1 _C	CAM-B3LYP _{XC}
PW-LDA _C	PW91 _X	Lap 3 _C	MCY _{XC}
PBE _C	PBE _X	VS98 _{XC}	LC- ω PBE _{XC}
revPBE _C	revBPE _X	PKZB _{XC}	ω B97X _{XC}
	PW91 _C	TPSS _{XC}	erfgau _{XC}
	PBE _C	FT98 _C	LCgau-BOP _{XC}
	LYP _C	KCIS _C	BNL _{XC}
			B97-D _{XC}
			DFT-D _{XC}
			M06-2X _{XC}

図 2-5 代表的な汎関数の一覧 (x: 交換汎関数、c: 相関汎関数、xc: 交換相関汎関数)

2-5-3 密度汎関数理論計算における汎関数と基底関数

また、汎関数と同様に DFT 計算において重要となるのが基底関数の指定である。前節にて示した Kohn-Sham 方程式に再度着目すると、汎関数の定義が重要であると同時に、分子軌道 ϕ_k を何らかの形で定義しない限り、これを解くことはできない。DFT では分子軌道を表現する方法として、基底関数の線形結合が用いられ、基底関数としてはガウス型オービタル(Gaussian Type Orbital, GTO)が最もよく用いられる。すなわち、分子軌道は次のように表される。

$$\phi_i(\mathbf{r}) = \sum_{\mu=1}^N C_{\mu i} \chi_{\mu}(\mathbf{r})$$

ここで $C_{\mu i}$ は分子軌道係数(i 番目の分子軌道に対する μ 番目の基底関数の寄与、 $\chi_{\mu}(\mathbf{r})$ は基底関数である。基底関数を用いる最終的な目的は分子軌道を表現することだが、これを達成するために、まずは基底関数の線型結合として各原子の原子軌道を表現する必要がある。一般に GTO は“ k -nlG”または“ k -nlmG”のように表記されるが、この時 k は内殻原子軌道を表現する原始ガウス型原子軌道(Primitive Gaussian Type Orbital, PGTO)の数を、 n, l, m は原子価軌道(最外殻の原子軌道)を表現する PGTO の数をそれぞれ表す。一般に、分子の諸性質に影響を与えるのは内殻軌道よりも原子価軌道であると予想されるが、このように内殻軌道と原子価軌道で PGTO を使い分ける基底関数は split valence 基底と呼ばれる。さらに、原子

価軌道を2つにわけると“*k-nlG*”型の基底関数を **double zeta** 基底、原子価軌道を3つにわけると“*k-nlmG*”型の基底関数を **triple zeta** 基底と呼ぶ。例えばよく使われる基底関数の1つに 6-31G が挙げられるが、これは内殻軌道を6つの PGTO で表現し、さらに原子価軌道を2つにわけ、一方を3つの PGTO、他方を1つの PGTO で表現する **double zeta** 型の **split valence** 基底であることがわかる。

しかし、単に PGTO のみの組み合わせとして基底関数（ひいては分子軌道）を記述することには限界があり、特に興味対象の分子がイオンである場合には注意を要する。実際の分子内には原子核や電子など、電場を生み出すものが多数存在するので、分子内での分極を考慮する必要があるが、PGTO のみでこれを達成することは難しい。そこで、PGTO を補正するために用いられるのが分極関数と **diffuse** 関数である。

分極関数は、より高次の原子軌道を考慮することで分極の効果を取り入れようとするものである。例えば **triple zeta** 基底の一種として 6-311G があるが、これに分極関数を追加した 6-311G(d, p) という基底関数も存在する。これは、Li 以降の原子に6つの **d** 軌道を追加し、H 原子に3つの **p** 軌道を追加する、というものである^{19, 20)}。このように、分極関数は元となる基底関数の末尾に括弧書きで原子軌道を記載することで表現される。特にカチオンの場合は分極の効果は顕著に現れるので、分極関数を取り入れるのが望ましい。一方で、アニオンの場合は中性分子よりも電子分布が広がるため、これを考慮するために **diffuse** 関数を取り入れる。先ほどの 6-311G(d, p) にさらに **diffuse** 関数を取り入れる時、“**G**”の直前にプラス記号を挿入して、6-311+G(d, p) のように表現する。これは、6-311G(d, p) を基準として、さらに Li 以降の原子の原子価軌道に 1s 軌道1つと 2p 軌道3つを追加するという意味である^{19, 20)}。さらに H 原子にも 1s 軌道を追加する場合には、6-311++G(d, p) のように表現される。

2-5-4 分析種の構造最適化および振動モードの解析

本研究においては汎関数として ω B97XD、基底関数として 6-31G+(d, p) を使用した。計算には Gaussian 09²¹⁾ を用いた。 ω B97XD は長距離相互作用の補正項を含む汎関数であり、本研究の様に2分子間の相互作用を検討するための汎関数として適切と予想された²²⁾。また、一般的なガウス型基底関数 6-31G に対して **diffuse** 関数および分極関数を適用することで、分子内の電子状態をより正確に表現することを試みた。これらの汎関数および基底関数を使用して、Berny アルゴリズムによる構造最適化を行った。構造最適化を実施する前の各分析種の初期構造を図 2-6 に示す。また、構造最適化計算の際の収束条件は、表 2-1 に示すものを用いた。さらに、収束条件を満たした安定構造のエネルギーが極大値ではなく極小値であることを確認するために、振動モード解析を併せて実施した。

表 2-1 使用した構造最適化の収束条件

Item	Value
Maximum Force	0.000002
RMS Force	0.000001
Maximum Displacement	0.000006
RMS Displacement	0.000004

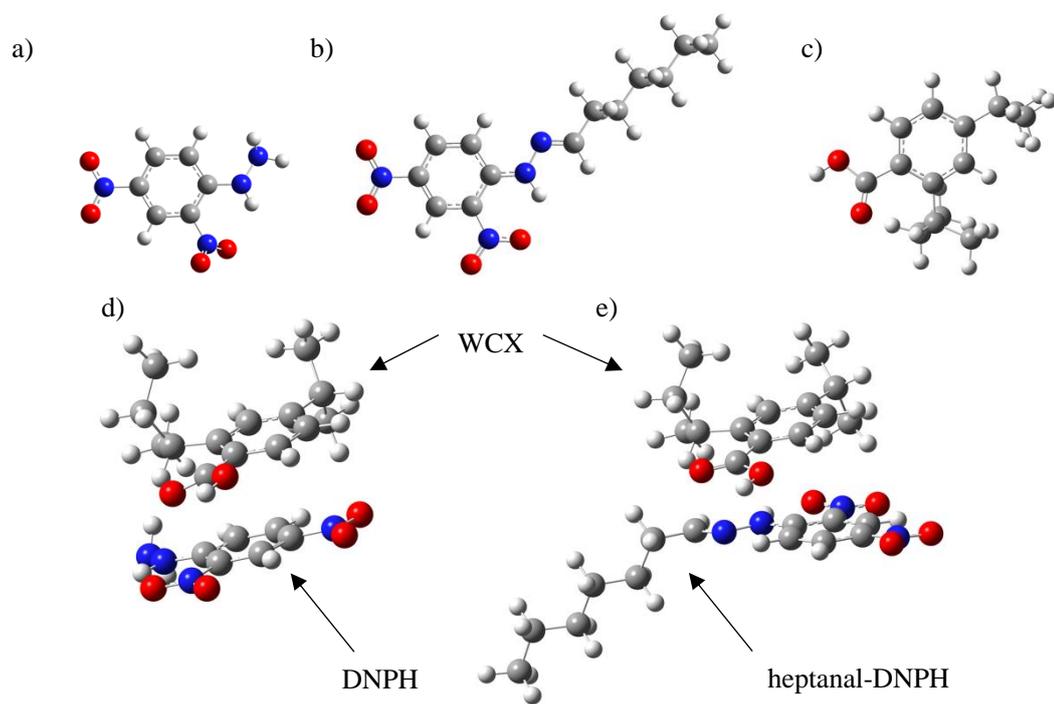


図 2-6 分析種の初期構造

a) DNPH、b) C7DNPH、c) WCX、
 d) WCX -DNPH 複合体、e) WCX C7DNPH 複合体

3.結果および考察

3-1 水系試料中における DNPH 誘導体の加水分解速度

図 2-7 に未希釈溶液および 5 倍希釈溶液の、時間経過に伴う C1DNPH のピーク面積値の変化を示す。

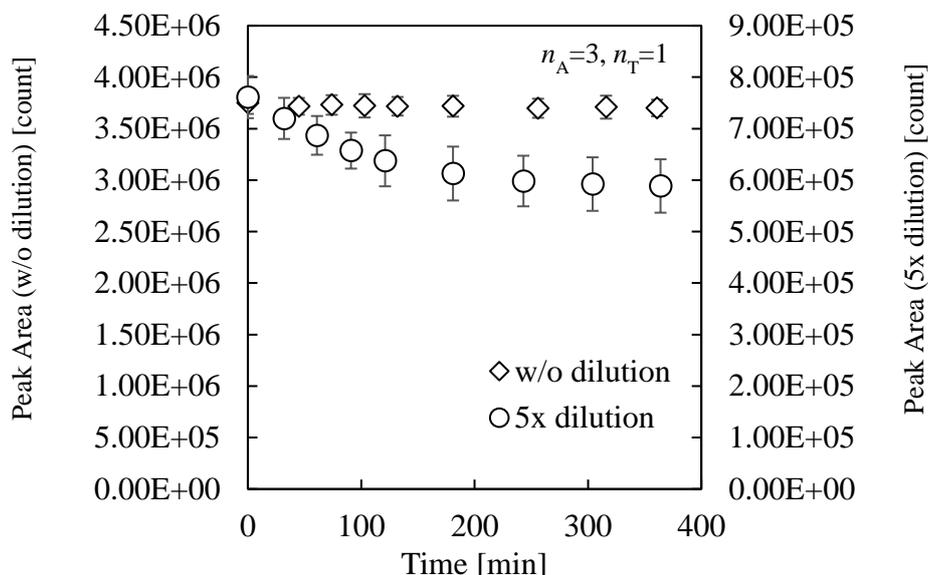


図 2-7 C1DNPH のピークエリアの経時変化 (エラーバー:±SD)

未希釈溶液では 6 時間以上が経過しても有意な減少が認められなかったのに対して、5 倍希釈溶液では顕著な減少が観察された。最初の 60 分で約 10% が分解し、最終的には 200 分ほどが経過した時点で 20% 程度の減少が見られ、それ以上の加水分解は起こらなかった。以上の結果より、DNPH 誘導体化した試料を水で希釈すると、加水分解による DNPH 誘導体回収率の低下、およびそれに付随する再現性の悪化が懸念されることが示された。したがってこの問題を解決するために、非水化した SPE による選択的精製を試みた。

3-2 非水系試料を対象とした固相抽出における精製効率

3-2-1 未反応 DNPH の除去率

図 2-8 に、各固相の DNPH 除去率および C7DNPH の回収率を示す。

DNPH 除去率は固相間での差が大きく、MCX、WCX、MAX では高い除去率が見られた。ただしこれら 3 種の固相は MCX および WCX が陽イオン交換カラムであるのに対して、MAX は陰イオン交換カラムであることから、DNPH の除去はイオン交換作用によるものではないことが示唆された。

一方で、HLB、WAX、C18、PS-2 の除去率は芳しくなかった。HLB、MCX、WCX、MAX、WAX は導入されている一部のイオン交換系官能基の除き、構造の大部分が共通している (図 2-

9)。よって MCX と WCX と MAX、および HLB と WAX の構造の差異に着目することが精製機構を考察する上で有効とし、HLB および WAX が共に有している構造（イオン交換系官能基を有さないフェニル基から γ -ラクタムまでの部分構造）は精製に関与しないものと考えた。よって、イオン交換系の官能基を有するフェニル基に着目し、後述する DFT 計算の際にはこの周辺の部分構造のみを用いて DNPH と固相、および C7DNPH と固相の相互作用エネルギーを評価した。

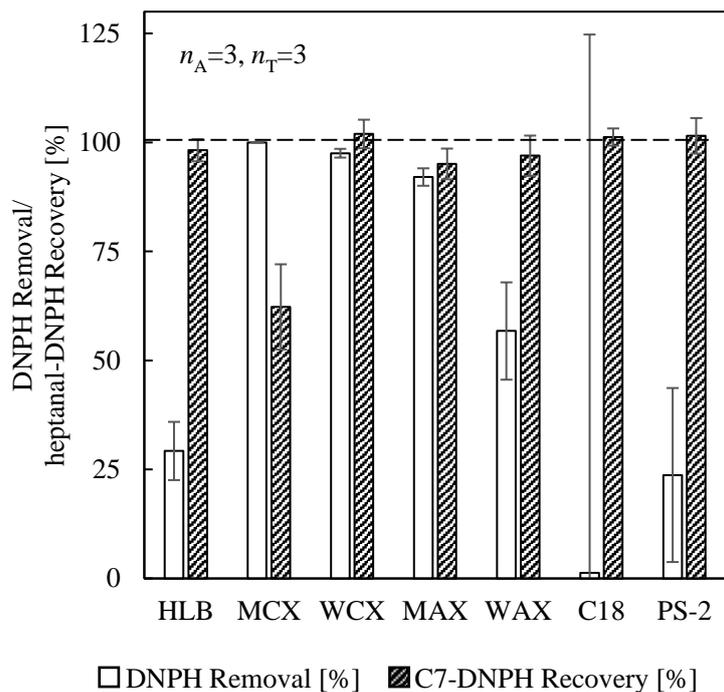


図 2-8 各種固相の精製効率 (エラーバー:±CV)

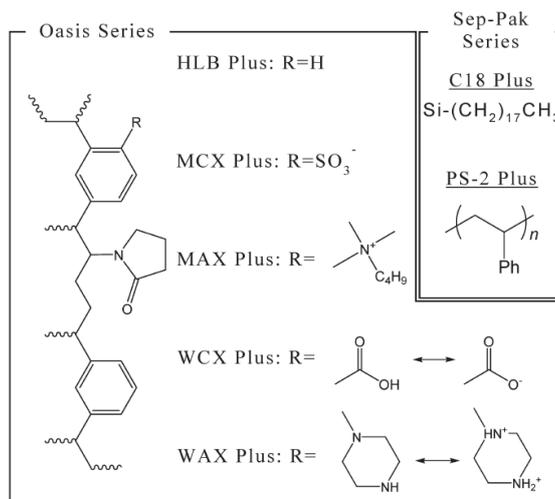


図 2-9 使用した固相の樹脂構造一覧²³⁾

3-2-2 DNPH 誘導体の回収率

C7DNPH 回収率については、MCX を除くすべての固相でほぼ全量を回収できた。MCX はスルホニル基を有しており、その pK_a の値が低い (1 未満) ので、MCX が有する全てのスルホニル基はすべてイオン化していると考えられる²³⁾。よって、一部のプロトン化した C7DNPH が MCX と静電相互作用によって樹脂表面に吸着したために、回収率の低下を招いたと予想される。

MCX 以外の全ての固相で C7DNPH 回収率はほぼ 100%であったため、回収率という観点から各固相の精製効率を順位付けすることは不可能であり、DNPH 除去率の観点から各固相の精製効率を評価した。除去率が低かったことに鑑みて HLB、WAX、C18、PS-2 を除去し、WCX および MAX が選択精製に適した固相であることが示された。両者の差はわずかであったものの、WCX の DNPH 除去率および C7DNPH 回収率は MAX よりも優れていたため、WCX が精製に最適な固相であると結論した。

しかしながら、WCX が弱陽イオン交換カラムであるのに対し MAX は強陰イオン交換カラムであり、異なるモードを有するにもかかわらず共通して高い DNPH 除去率が得られたことから、精製機構はイオン交換作用によるものではないと予想された。更に詳細な精製機構の検討を行うため、DFT による量子化学計算を実施した。

3-3 選択的精製機構

3-3-1 分析種の構造最適化

表 2-2 に、各分析種の構造最適化の結果算出された SCF エネルギーを示す。また、表 2-3 に、各分析種の構造最適化の際の収束状況を示す。

表 2-2 各分析種の最適化構造のエネルギー

Analytes/ BSSE	Energy [hartree*]
DNPH	-751.7444202
C7DNPH	-1025.669006
WCX	-695.8746155
WCX-DNPH 複合体	-1447.637739
WCX-C7DNPH 複合体	-1721.563023
BSSE ₁ (WCX-DNPH 複合体)	0.002929481
BSSE ₂ (WCX-C7DNPH 複合体)	0.007855672

*1 hartree = 2625.500 kJ/mol

表 2-3 各分析種の最適化構造の収束状況

analyte	Max. Force	RMS Force	Max. Displcement	RMS Displacement
DNPH	0.000000	0.000000	0.000004	0.000001
C7DNPH	0.000000	0.000000	0.000003	0.000001
WCX	0.000000	0.000000	0.000006*	0.000002
WCX-DNPH 複合体	0.000000	0.000000	0.000005	0.000001
WCX-C7DNPH 複合体	0.000000	0.000000	0.000006	0.000001

*: above the threshold for structural optimization

SCF エネルギーの算出の際には、表 2-2 に示したように BSSE による補正を行った。これは、計算対象分子の構成原子数が増えるほど基底関数の数も増大し、これによって 2 分子間の相互作用エネルギーを過剰に安定化してしまうことを補正するために実施した²⁴⁾。BSSE 計算の際には、例えば WCX-DNPH 複合体を計算する際には WCX の全元素のゴースト軌道を設定した状態、および DNPH の全元素にゴースト軌道を設定した状態での計算を併せて実施した（具体的な相互作用エネルギーの算出方法については後述）。

WCX-DNPH 複合体の Max. Displacement については構造最適化の収束条件を満たさなかったが、これは Gaussian のプログラム上の仕様であり、Max. Force および RMS Force の値が収束閾値の 1/100 以下になったときに、Max. Displacement および RMS Displacement の値に関係なく構造最適化を終了したものと考えられる。

3-3-2 分析種の振動モード解析

前節で述べたように Max. Displacement の値が収束しないものがあったため、これを含めた分析対象（全 5 種）の構造が安定構造であることを確認するために、振動モード解析によって虚振動が得られるかどうかを確認した。その結果、計算対象の分子が有する振動はいずれも実振動（nimag=0）であり、最適化後の構造が安定構造であることを支持する結果となった。

3-3-3 固相-未反応 DNPH 間の相互作用エネルギー

表 2-2 の結果に基づき、WCX-DNPH の相互エネルギー ΔE_1 を、次のように算出した。

$$\begin{aligned}\Delta E_1 &= E_{\text{complex}} - (E_{\text{DNPH}} + E_{\text{WCX}}) + \text{BSSE}_1 \\ &= -1447.63773852 - (-751.744420157 - 695.874615478) + 0.002929481 \\ &= -0.01577340 \text{ hartree} \\ &= -41.41307 \text{ kJ/mol}\end{aligned}$$

すなわち WCX は DNPH と相互作用することにより、互いに独立して存在するよりも約 41

kJ/mol 安定化することが示唆された。

3-3-4 固相-DNPH 誘導体間の相互作用エネルギー

同じく表 2-2 に示した結果に基づき、WCX-C7DNPH の相互作用エネルギー ΔE_2 を、次のように算出した。

$$\begin{aligned}\Delta E_2 &= E_{\text{complex}} - (E_{\text{heptanal-DNPH}} + E_{\text{WCX}}) + \text{BSSE}_2 \\ &= -1721.56302259 - (-1025.66900620 - 695.874615478) + 0.007855672 \\ &= -0.01154524 \text{ hartree} \\ &= -30.31203 \text{ kJ/mol}\end{aligned}$$

すなわち WCX は C7DNPH と相互作用することにより、互いに独立して存在するよりも約 30 kJ/mol 安定化することが示唆された。 $\Delta E_1 - \Delta E_2 = -11.10105$ kJ/mol であり、WCX-C7DNPH 複合体は WCX-DNPH も約 11 kJ/mol 安定であり、DNPH は C7DNPH よりも優先的に WCX と相互作用することが示唆された。この計算結果は、SPE による精製実験の結果を支持するものであった。

WCX による精製機構の証明にはより詳細な検討が必要であるものの、固相、DNPH、および C7DNPH の位置関係に鑑みて、互いのフェニル基どうしの π - π スタッキングによって安定化がもたらされたと推察される。

4. 本章のまとめ

本章では、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) により誘導体化した試料を想定した選択的な精製方法の開発を行った。その結果、弱陽イオン交換カラムを用いる固相抽出法によって、未反応 DNPH のみを除去しつつ DNPH 誘導体を回収可能な選択的精製方法を見出した。また、弱陽イオン交換カラムが選択的精製をもたらす機構を考察するために、密度汎関数理論を用いる量子化学計算によって、精製のメカニズムを検討した。これにより、固相と DNPH 誘導体の複合体は、固相と未反応 DNPH の複合体と比較した際に約 11 kJ/mol エネルギー的に安定であること、および精製には互いのフェニル基の π - π スタッキングが寄与している可能性が示唆された。

本章の引用文献

- 1) Frey J, Schneider F, Schink B, Huhn T: Synthesis of short-chain hydroxyaldehydes and their 2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives, and separation of their isomers by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1531**, 143-150, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.11.046>
- 2) Santa T: Derivatization reagents in liquid chromatography mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.*, **25**(1-2), 1-10, 2011. <https://doi.org/10.1002/bmc.1548>
- 3) Kalabokas P, Carlier P, Fresnet P, Mouvier G, Toupance G: Field studies of aldehyde chemistry in the Paris area. *Atmos. Environ.*, **22**(1), 147-155, 1988. [https://doi.org/10.1016/0004-6981\(88\)90307-1](https://doi.org/10.1016/0004-6981(88)90307-1)
- 4) Marchand C, Bulliot B, Calve SL, Mirabel Ph: Aldehyde measurements in indoor environments in Strasbourg (France). *Atmos. Environ.*, **40**(7), 1336-1345, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2005.10.027>
- 5) Dąbrowska A, Nawrocki J: Aldehyde concentrations in wet deposition and river waters. *The Science of the Total Environment*, **452-453**, 1-9, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.037>
- 6) Meijboom PW, Stroink JBA: 2-trans,4-cis,7-cis-decatrienal, the shy off-avor occurring in strongly autoxidized oils containing linolenic acid or ω 3,6,9, etc., fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **49**(10), 555-558, 1972. <https://doi.org/10.1007/BF02609225>
- 7) Hill D, Binions R: Breath Analysis for Medical Diagnosis,
https://www.researchgate.net/publication/267976507_Breath_Analysis_for_Medical_Diagnosis
(2021年10月現在)
- 8) 早稲田ウィークリー 「禁断の扉」を開けた量子力学
<https://www.waseda.jp/inst/weekly/academics/2016/04/15/2718/> (2021年10月現在)
- 9) McQuarrie DA, Simon JD 著. 千原秀昭、江口太郎、齋藤一弥訳. マッカーリサイモン物理化学 分子論的アプローチ 上巻
- 10) 歴史で学ぶ量子力学 【1】 (<https://nazology.net/archives/44557/3>) (2021年10月現在)
- 11) 2-4: トムソンの原子模型 (https://ne.phys.kyushu-u.ac.jp/seminar/MicroWorld/Part2/P24/Thomson_model.htm) (2021年10月現在)
- 12) 2-4-A: トムソンの原子模型による粒子の散乱 (https://ne.phys.kyushu-u.ac.jp/seminar/MicroWorld/Part2/P24/Thomson_scattering.htm) (2021年10月現在)
- 13) マルチメディアでみる原子・分子の世界 3.6 アインシュタインの光量子説(https://rika-net.com/contents/cp0030/part2/chap03/page3_6.html) (2021年10月現在)
- 14) 線形微分方程式で解を $e^x(\exp)$ と仮定するのはなぜか? (<https://uxhpu.net/physics/math3/>) (2021年10月現在)

- 15) 波動関数とその微分が連続であることの理由
(<https://feynmandiagram.hatenablog.com/entry/2019/02/16/183944>) (2021年10月現在)
- 16) 【量子化学】密度汎関数理論の基礎：ホーエンベルク・コーンの定理
(https://www.youtube.com/watch?v=t0SSW7q2nPg&t=326s&ab_channel=%E5%B1%B1%E4%B8%8B%E9%9B%84%E5%8F%B2%E3%81%AEYouTube%E7%A0%94%E7%A9%B6%E5%AE%A4)
- 17) Hohenberg-Kohn の定理 (<http://www.ecs.shimane-u.ac.jp/~kageshima/saito/first-principles6.html>) (2021年10月現在)
- 18) Kohn-Sham 方程式の導出 (https://whyitso.net/physics/solid_state_physics/KohnSham.html)
(2021年10月現在)
- 19) Gaussian 利用の手引き (<https://helpdesk.t3.gsic.titech.ac.jp/manuals/gaussian/pdf/gaussian.pdf>)
(2021年10月現在)
- 20) 分子軌道法計算プログラム Gaussian 03—その3—(https://www2.itc.nagoya-u.ac.jp/pub/pdf/pdf/vol05_04/335_349kouza01.pdf) (2021年10月現在)
- 21) Gaussian 09, Revision D.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
- 22) Close CE. Approach to Characterising the Adsorption of Hydrophilic Pollutants onto Oasis HLB. Doctoral Dissertation, School of Science, College of Science, Engineering and Health, RMIT University, Melbourne, Australia. 2018. <https://core.ac.uk/download/pdf/185278026.pdf> (2021年10月現在)
- 23) Oasis Sample Extraction Products – Waters (https://www.waters.com/waters/en_US/Oasis-Sample-Extraction-Products/nav.htm?cid=513209&locale=uk) (2021年10月現在)
- 24) Counterpoise 補償法による BSSE の見積 (<https://pc-chem.info/applications/233>) (2021年10月現在)

第3章 液体クロマトグラフィー質量分析および多変量解析による生ぐさ臭原因物質の探索

1. はじめに

緒論で述べたように、水道水生ぐさ臭原因物質は解明が十分に進んでおらず、問題解決のためには、網羅的な探索によって既報にない新規物質を探索することが必要と予想される。よって本研究では、高い質量分解能と検出感度を有する MS に着目した。

探索にあたっては、まず未知物質の分子式を推定する必要があるため、ソフトイオン化である ESI を利用可能な LC/MS による探索が適している。一方で生ぐさ臭は高揮発性物質であると予想されるほか、アルデヒド/ケトン類は一般に ESI でのイオン化効率が低いため、そのままの状態では LC/MS を用いて分析することは困難である。

そこで本研究では、生ぐさ臭原因物質を不揮発化して分析に適した状態にすること、およびイオン化効率を向上させることを目的として、水道原水試料および *Uroglena americana* 培養液試料を DNPH により誘導体化した後に、高分解能 LC/MS による探索を実施した。得られた分析データに対し MVA (差異解析およびインターバル OPLS 回帰分析) を適用し、*U. americana* 中群体数を従属変数とする線形回帰モデルを構築した結果、1 物質のみが突出した VIP Score (Variable Importance in Projection Score) を示したため、本物質を生ぐさ臭原因物質の候補であると推定した (以下、同物質を FX と称する)。

FX は保持時間 15.7 分、 m/z 403.1622 のイオンであった。精密質量解析および天然同位体パターン解析によって FX の分子式を推定した結果、推定分子式は $C_{19}H_{24}N_4O_6$ であった。DNPH の分子式 ($C_6H_6N_4O_4$)、および DNPH 誘導体化が脱水を伴って進行する反応であることに鑑みると、FX の誘導体化前の分子式は $C_{13}H_{20}O_3$ と推定された。イオン化法を変更して LC-APCI-MS で分析を行った場合でも、同じく保持時間 15.7 分、 m/z 403.1622 のイオンが検出されたため、このイオンは非意図的に生じたプロダクトイオンではなく、分子式を保存したプリカーサーイオンであると推定された。

2. 実験方法

2-1 水道原水試料の採水および前処理

水道原水試料は、関西地方のものを採取し、ガロン瓶の口いっぱいまで採水したものを速やかに実験に供した。表 3-1 に、使用したサンプルの一覧を示す。

表 3-1 本研究で使用したサンプルの一覧と各種物性値

水源	採取日	臭気種類	TON (臭気強度)	<i>U.americana</i> 中群体数	サンプル種類
関西地方	2016/4/27	生ぐさ	160	15.6	水道原水
〃	2016/5/16	藻、生ぐさ	30	0.8	〃
〃	2016/6/6	藻、青草	15	0	〃
関東地方	2016/7/29	-	-	91.7**	<i>U.americana</i> 培養液*
関西地方	2017/12/6	生ぐさ	18	5.2	水道原水
〃	2017/12/18	〃	23	10.3	〃
〃	2017/12/25	〃	43	6.4	〃
関東地方	-	-	-	43**	<i>U.americana</i> 培養液
関西地方	2018/04/13	生ぐさ	40	18.8	水道原水
〃	2018/04/20	〃	320	30.9	〃
〃	2018/04/27	〃	120	9.8	〃
〃	2019/04/22	〃	70	3.2	〃
〃	2019/04/26	〃	130	47	〃

*:cultured with Ur-1 medium **:300 cells = 1 colony

水道原水中の生ぐさ臭は、1-2 週間程度の短期間で消滅するという特徴のほか、生ぐさ臭に関する既報を考慮すると、生ぐさ臭原因物質は水中溶存酸素 (DO) による酸化を受けやすいアルデヒド類であると予想される。アルデヒド類は一般に安定性が低い (反応性が高い) 化学種であり、酸化を受けるとカルボン酸へと変換される。

したがって、アルデヒド類の DO による酸化を防止するため、水道原水サンプルに亜硫酸ナトリウム粉末を添加した。亜硫酸ナトリウムと酸素との反応は $2\text{Na}_2\text{SO}_3 + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{Na}_2\text{SO}_4$ のように表され、添加した亜硫酸ナトリウムが硫酸ナトリウムへと変換することで DO が除去される。

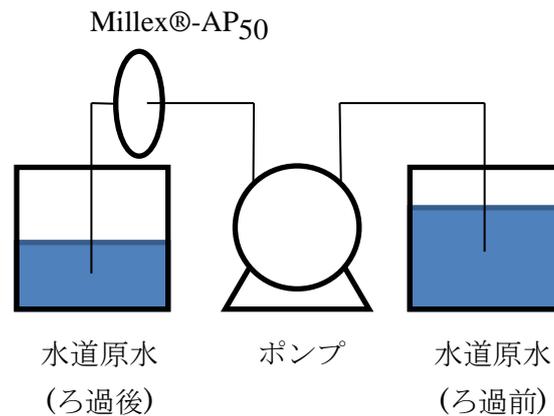


図 3-1 水道原水のろ過

生ぐさ臭原因生物の 1 種と考えられる *Uroglena americana* は、加熱・冷蔵・超音波処理といった刺激を加えられることにより、細胞内に存在する臭気原因物質を放出することが知られている¹⁾。そのため亜硫酸ナトリウム添加による DO 除去の後、サンプルの入ったガロン瓶を湯浴（60℃、30 分間）により加熱した。

30 分間の加熱の後、水道原水サンプルのろ過を行った。Cole-Parmer 社製 MasterFlex ポンプと、Merck 社製 Millex-AP₅₀ フィルターを使用し、図 3-1 のようにろ過を行った。ポンプを介して図の右側から左側へとサンプルが流れていくようになっており、加圧側にフィルターを接続することで加圧ろ過を行った。

2-2 *Uroglena americana* 培養液試料の調製

本研究では、上述の水道原水と共に、*U.americana* の培養液も研究対象とした。これは関東地方のダム放流水中から採取された *U.americana* を Ur-1 培地上で培養したものである。培地の組成および培養条件を、それぞれ以下の表 3-1、表 3-2 に示す。本研究で使用した全てのサンプルの種類、および各種物性値を表 3-3 に示す。

ろ過後の水道原水を、SPE により濃縮した。固相として、Sep-Pak PS-2 Plus および Sep-Pak AC-2 Plus (日本ウォーターズ、東京) を用いた。PS-2 はスチレンとジビニルベンゼンの共重合体からなる疎水性の固相であり、水中農薬の抽出などに使用される³⁾。PS-2 の化学構造と物性を、表 3-4 に示す。また、固相に低極性溶媒を流すことにより、固相表面に吸着した物質を脱離・回収できる。AC-2 は、吸着/脱離効率の高い低灰分活性炭をパッキングした固相であり、水中および食品中の高極性農薬などの抽出に用いられる³⁾。

表 3-2 Ur-1 培地の組成²⁾

物質名	添加量
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 値	7.5

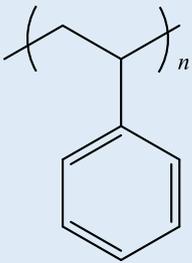
表 3-3 *Uroglena americana* の培養条件

項目	値
温度	15°C
湿度	48%
光強度	3000 ルクス
明暗条件	12 時間暗/12 時間明

市販の固相には、製造原料や反応中間体などの不純物が含まれており、それら不純物が分析結果に重大な影響を与えることがあるので、試料濃縮の直前に固相のコンディショニングを行った。また、コンディショニングを含む全ての固相抽出操作には、全自動固相抽出装置 AquaTrace ASPE899（ジーエルサイエンス、東京）を使用した。PS-2 と AC-2 をタンデム接続し、これらにアセトニトリル 20 mL、ジクロロメタン 20 mL、アセトニトリル 20 mL、精製水 40 mL を逐次的に通液することで、固相のコンディショニングを行った。コンディショニングを行った固相には、その後速やかに水道原水サンプルを通水し、濃縮を行った。

亜硫酸ナトリウムの添加、加熱、および加圧ろ過を施した水道原水サンプルを、下降流にて PS-2、AC-2 に通水した。サンプル通水の後、PS-2、AC-2 それぞれの固相にアセトニトリルを通液し、固相通過後のアセトニトリルを回収した。その後、ジクロロメタンを用いて同様の操作を行った。このとき下降流、バックフラッシュ法で脱離を行い、1 分間の soak time を設けた。得られた脱離液は褐色バイアル瓶に移し、-20°C で冷凍保存した。

表 3-4 PS-2 の物性 (細孔容積孔径 20 mm 以下の値)

型	多孔質無極性樹脂
構造	
内部表面積 [m ² /dry-g]	660
平均粒径 [μm]	50

2-3 水道原水試料および *Uroglena americana* 培養液試料の 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (2,4-Dinitrophenylhydrazine: DNPH) による誘導体化

クロマトグラフィー、マススペクトロメトリーにおける分析対象物質の検出感度向上を目的として、誘導体化が頻繁に用いられる。例えば、Gas Chromatography (GC) においては、高温の注入口に試料を注入し、溶媒ごと分析種を揮発させるため、高揮発性成分については特段の前処理の必要なく分析可能である。一方、難揮発性化合物や、高温による熱分解を受けるような物質をGCで分析する際には、予め揮発性や熱安定性を向上させる操作を施すことが必要になる。これを可能とするのが誘導体化であり、例えば揮発性を高めたりテーリングを抑制したりすることを目的として、アルコール類をトリメチルシリル化する操作は頻繁に行われる⁴⁾。

一方、液体クロマトグラフィー (LC) においては、試料は液体か、あるいは固体でも適当な溶媒に可溶であることが求められる。LCの誘導体化の目的はGCの場合とは異なり、検出方法に依存した誘導体化が主となる。本研究の様にMSを検出器として用いる場合、すなわちLC/MSにおける誘導体化法のメリットとしては、以下の二点が挙げられる。

- ・分析種のイオン化効率を高め、高感度分析を可能とする。
- ・特徴的なフラグメンテーションパターンを誘起するような部分構造を導入し、構造推定を行う。

本研究では、前者のイオン化効率を高めること、および不揮発化させることによって試料を取り扱いやすくすることを目的として、以下に示す DNPH による誘導体化を実施した。

i) DNPH のジクロロメタン溶液の調製

ジクロロメタン 20 mL に DNPH 200 mg および濃硫酸 500 μL を混合し、90 分間反応させ

た。分相した硫酸相を除去し、純水を加えて10分間振盪、10分間放置し、分相させた。この操作を2回繰り返した。その後、ジクロロメタン相を別容器に回収した。ただしジクロロメタンの20℃における水溶解度は2 g/100 mLであり、わずかながら水に可溶である⁵⁾。そのため、本操作において最終的に調製したDNPHジクロロメタン溶液の最終濃度は不明瞭である。

ii) DNPH誘導体化方法

i)で調製したDNPHジクロロメタン溶液4 mLに無水硫酸ナトリウム、サンプルを加え、5分間振盪した。その後、混合溶液をナス型フラスコに一定量移し、ロータリーエバポレーターを用いてジクロロメタンを留去した。乾固物をアセトニトリルで溶解し、アセトニトリル耐性を有する0.22 μmメンブレンフィルタでろ過し、LC/MSで測定した。

2-4 液体クロマトグラフィー質量分析による水道原水試料および *Uroglena americana* 培養液試料の分析

2-4-1 逆相クロマトグラフィーの概要

クロマトグラフィーには多くの種類があるが、それらに共通していることは、「固定相」と「移動相」と呼ばれる2相間で分配係数が異なる試料成分が、異なる速度で移動し、その結果として相互に分離される⁶⁾。

高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) は、速度、カラム効率、分離能においてGCに匹敵することもあり、本質的にGCより有用である。HPLCは揮発性で熱的に安定な試料に限定されず、固定相の種類は固相吸着剤、化学修飾吸着剤、イオン交換体およびサイズ排除という4つの吸着機構を利用することができる。また、GCよりも移動相の選択幅が広いいため分離の選択性を大きく変えることができる。定組成溶離法 (isocratic elution) では移動相として1種の溶媒を使用し、クロマトグラフィーの操作中に移動相の組成を変える勾配溶離法 (gradient elution) では2種類以上の溶媒をコンピュータ制御のもとに混合して使用する。

(1) 固定相 (カラム充填剤)

現在、最も広く利用されている充填剤は、未修飾または化学修飾した微粒子シリカである。吸着に基づく分離には、シラノール (Si-OH) 基が存在する極性表面を持つ未修飾のシリカが用いられる。クロロシランまたはアルコキシシランで処理して表面を修飾すると、シロキサン (Si-O-Si-C) 結合の生成により結合相 (bonded-phase) 充填剤が得られる。現在、最も広く利用されているのは、シリカをオクタデシル (C₁₈)、オクチル (C₈) あるいはアシル基で修飾したもので、非極性炭化水素類似の表面を持っている。固定相が非極性であり、移動相が親水性溶媒であるような組み合わせで実施されるクロマトグラフィーは、逆相クロマトグラフィーと呼ばれる。

(2) 移動相

HPLC では移動相組成の選択が、クロマトグラフィー性能を大きく支配する。移動相の溶解力は、移動相全体としての極性、固定相の極性、試料成分の特性によって決まる。順相分離（normal phase separation, 極性固定相/非極性固定相）の場合、溶媒の極性の増加とともに非極性の物質から溶出される。逆相分離（reversed phase separation, 非極性固定相/極性移動相）の場合、溶媒の溶出力の増加とともに高極性の物質から溶出する。

(3) 検出器

HPLC 用の汎用検出器は、溶質による紫外光または可視光の吸収を測定するもの、および溶質を含む移動相と純粋な移動相の屈折率の差を測定するものである。

(i) 紫外/可視光度計および分光光度計

これらの検出器は 190~700 nm の光を吸収する溶質に応答し、その応答は Lambert-Beer の法則 ($A=εcl$) に従う。光度計は、ある固定した波長においてのみ使用でき、分光光度計は、ダブルルーム光学系とマイクロプロセッサによる制御が採用されていることが多い。なお、この種の検出器は、石英製の小体積のセルを用いる。

(ii) フォトダイオードアレイ検出器 (PDA)

フォトダイオードアレイ検出器 (Photo diode array detector) は、光度計や通常の分光光度計よりも多くのスペクトル情報を与える。例えば、カラムから溶出する成分の紫外領域または紫外および可視領域の完全なスペクトルを記録し、そのスペクトル情報をマイクロコンピュータにより様々に処理して精巧なカラーグラフィックとして表示することができる。表示されるクロマトグラムは、時間/吸光度/波長の三次元クロマトグラムが典型的なものである。

(iii) 蛍光検出器

この種の検出器は選択制が高く、高感度検出器に属する。フィルター蛍光計と分光蛍光計とがあり、蛍光を発しない分析成分は、クロマトグラフィーに供する前や、分離カラムと検出器との間で蛍光試薬を用いて蛍光性に変換する（誘導体化）。

(iv) 屈折率検出器

屈折率 (reflectance index, RI) 検出器は、移動相のみ（対照流）の屈折率とカラム流出液（試料流）の屈折率の差を測定する。したがって、移動相に用いる溶媒の屈折率を変化させる溶質は何でも検出できるが、いずれの型の RI 検出器も温度の影響を受けやすく、勾配溶離法には利用できない。

2-4-2 エレクトロスプレーイオン化法の概要

エレクトロスプレーイオン化 (Electrospray Ionization, ESI) は、大気圧イオン化法 (API, Atmospheric pressure ionization) の一種であり、イオン性・高極性化合物に有効なイオン化法である。先端に高電圧を印加したキャピラリ中に注入された試料は、印可した電圧と同符号の細かな帯電液滴となる。帯電液滴は、質量分析計方向への移動の過程で溶媒の蒸発・表面電場の増加が進み、電荷同士の反発力が液体の表面張力をこえると分裂する (クーロン爆発)。蒸発と分裂を繰り返すことにより、微細な液滴になり、最終的には試料イオンが気相中に放出されると考えられる (イオン蒸発)。ESIは最もソフトなイオン化法で、フラグメントイオンを生成しにくい。また、高極性、難揮発性、熱不安定な化合物に適用が可能である^{6,7)}。また、図 3-2 に ESI におけるイオン化の概略を示す。

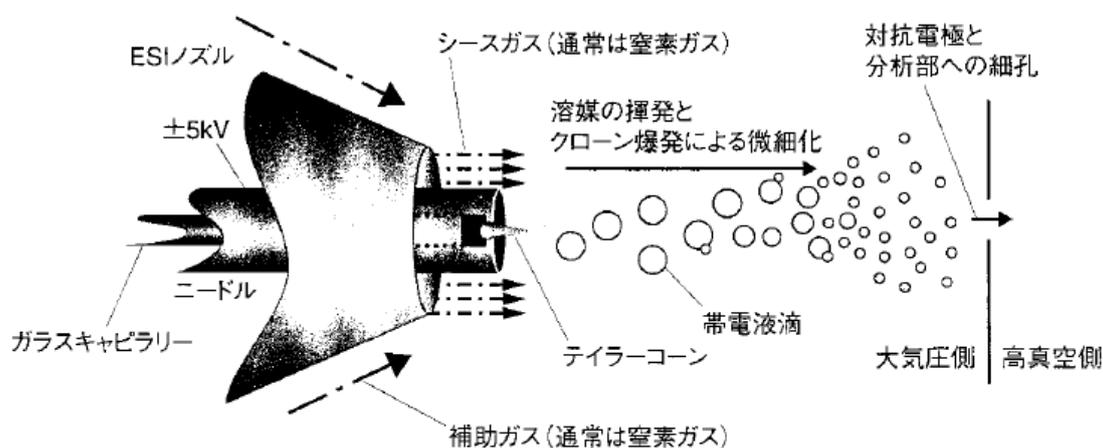


図 3-2 ESI におけるイオン化の概略⁶⁾

2-4-3 大気圧化学イオン化法の概要

大気圧化学イオン化法 (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) は、化学イオン化法 (Chemical Ionization, CI) の大気圧バージョンと言えるため、CI についても併せて概略を述べる。

CI では、気相分子とイオンの相互作用によってイオン化が起こる。すなわち、化学イオン化は二分子過程で起こるとするのが特徴的である。代表的な反応様式としては、以下の 4 種類が挙げられる⁸⁾。

1. プロトン移動 $M + [BH]^+ \rightarrow [M+H]^+ + B$
2. 求電子付加 $M + X^+ \rightarrow [M+X]^+$
3. アニオン引き抜き: $M + X^+ \rightarrow [M-A]^+ + AX$
4. 電荷交換: $M + X^+ \rightarrow M^{++} + X$

これらの反応様式からわかるように、CI は比較的分子量関連イオンを発生させやすいイオン化法であり、EI等と比較するとソフトなイオン化法である。APCIでは、針電極と対抗電極の間でコロナ放電を発生させ、CI プラズマを維持させる。生成したイオンは ESI と同様に、真空インターフェースを用いて質量分析部へと輸送される。このため、ESI と APCI は比較的容易に換装可能である。また、ESI は高極性成分のイオン化に適した方法であるのに対して、APCI では中性分子量分子を直接イオン化できる。このため、ESI が苦手とする低極性あるいは中極性の分子であっても、APCIによりイオン化可能な場合がある。

2-4-4 液体クロマトグラフィー質量分析の実験条件

本研究では、UltiMate HPG-3400SD-LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を LC/MS 測定に用いた。LC カラムは X Bridge BEH Phenyl (2.5 μ m, 2.1*100 mm, Waters) を用い、移動相にはアセトニトリルと水 (ともに富士フィルム和光純薬 (株) 製、LC/MS 用グレード) を用いた。詳細な分析条件を表 3-5 に示す。

表 3-5 LC-HRMS 測定条件 (使用機器:Ultimate HPG-3400SD-LTQ Orbitrap XL)

LC 条件	分離カラムの温度	40°C
	Injection Volume	10 μ L
	移動相	A=超純水+ 1 mM 酢酸+ 1 mM 酢酸アンモニウム B=アセトニトリル+ 1 mM 酢酸+ 1 mM 酢酸アンモニウム+ 5 v/v% 水
	Binary Program	B%=5(0-3.0 min, 30.5-35.0 min), 100(3.0-25.0 min, 25.0-30.0 min)
	流速	0.6 mL/min
MS 条件	イオン源	ESI
	イオン化モード	negative
	spray voltage	2.50 kV
	vaporizer temp.	400°C
	capillary temp.	380°C
	sheath gas flow rate	60.00 arb.
	auxiliary gas flow rate	20.00 arb.
	sweep gas flow rate	0.00 arb.
	質量分解能	60000
	Acquisition mode	Centroid

2-5 多変量解析による生ぐさ臭原因候補物質の絞りこみ

2-5-1 主成分分析

主成分分析 (PCA) は MVA の手法の中でも最も頻繁に用いられるものの一つであり、そ

の利用法は多岐にわたるものの、端的には「多変量からなるデータを少数の変量のみを用いて表現し、データの取り扱いおよび解釈を容易にするための分析手法」といえる。

PCA の概念を理解するための例えとしてよく用いられるのは「3次元の物体をどの角度からながめるか」というものである。例えば、八面体を一枚の写真に収める時、どの角度から撮影すれば最も八面体らしく映るだろうか。この問題について定量的な解を得ることは困難だが、定性的な議論は容易である。すなわち、図 3-3a のような角度が好ましい。対象的に、八面体を真上から観察する図 3-3b のような角度から撮影すると、平面的なひし形と区別できなくなってしまう。

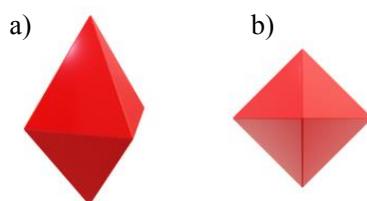


図 3-3 PCA のイメージ図: どちらが八面体らしく見えるか?

先に挙げた八面体の例では、本来的に 3 次元空間上にしか存在しない (3 つの位置変数を用いないと記述できない) 物体を、写真に収めることで 2 次元平面上に表現する (2 つの位置変数のみを用いて記述する) ことになるので、3 変量のデータを 2 変量のデータに縮約していると言い換えることができる。すなわち、本節の冒頭で述べたように、多変量からなるデータを少数の変量のみを用いて表現したことになる。ただし、本来的に 3 変量からなるデータを 2 変量に縮約してしまっているため、写真のみの情報を用いて元々の被写体である八面体を復元することは不可能である。すなわち、情報の損失が生じる。図 3-3b に八面体を真上から観察する場合、八面体の高さは全く分からなくなってしまう。このことからわかるように、主成分分析を行う上で重要となるのは、使用する変数の数を減らしつつもオリジナルの情報量を可能な限り保存することといえる。

情報量の保存を、より定量的に議論することを考える。図 3-4 に示すような 2 変量からなるデータを 1 変量へと縮約する際に、情報量を最大限保存するための最適な方法を検討する。最も簡単な方法は、 x 軸または y 軸上に各点を投影し、その値を採用する方法である。すなわち、2 変量のうちの 1 つを完全に無視する方法である。しかしこれでは、投映することによって区別が難しくなる点が存在する。すなわち情報を大きく損失してしまっているため、より効率的な縮約が望ましい。

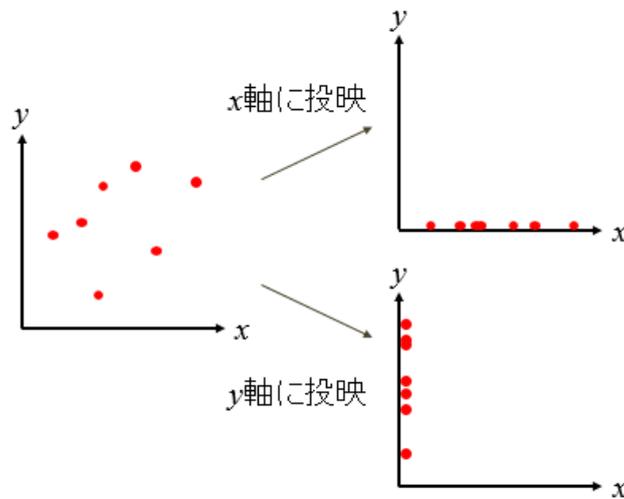


図 3-4 2 次元データの投影方法の一例

そこで、 x でも y でもない新たな変数を導入する。すなわち、下図のように新たな軸を用意し、この軸上に各点を投影すれば、損失を最小化しつつも情報を縮約可能となる。このような考えのもと、新たに導入された変数を主成分（Principal Component, PC）と称する。



図 3-5 新しい変数の導入によるデータ縮約

より厳密には、PCAにおいてはデータの分散 σ^2 に着目し、これを情報量の指標として用いる。例として、生徒 50 人からなるクラスの各生徒の身長を h_1, h_2, \dots, h_{50} とした時、このクラスの身長の分散は下式で求められる。

$$\sigma^2 = \frac{1}{50} \sum_{i=1}^{50} (h_i - \mu)^2$$

ただしここで μ はこのクラスの身長の平均、すなわち、

$$\mu = \frac{1}{50} \sum_{i=1}^{50} h_i$$

上式では母分散を求めたが、本論文での以降の記述においては特に断りのない場合、「分散」は不偏分散を表すものとする。PCA のアルゴリズムの根幹には「元のデータにはない新たな変数（新たな軸）を合成し、その軸に各プロットを投影した際の分散 σ^2 を最大化する」という考えがある⁹⁾。このとき、新たな軸上に各点を投影して得られた値をスコアと呼び、一般に \mathbf{t} と表す。すなわち、PCA はスコアの分散の最大化が大きな目標である。元のデータのサンプル数が m のとき、PC 上に投影した点の個数もまた m 個であるから、 \mathbf{t} は m 次元ベクトルになる。

$$\mathbf{t} = [t_1, t_2, \dots, t_m]^T$$

また、PC は元のデータを構成する各変量の一次結合で表される。すなわち、元のデータを構成する各変量が x_1, x_2, \dots, x_n であるとき、

$$PC = p_1 x_1 + p_2 x_2 + \dots + p_n x_n$$

ここで p_1, p_2, \dots, p_n は実数係数である。換言すると、PCA のアルゴリズムの土台となるのは、スコアの分散を最大化するための実数係数の組 p_1, p_2, \dots, p_n を算出することである。さらに、この実数係数の組をローディングと呼び、一般に \mathbf{p} と表す。元のデータが n 個の変数からなる時、同じ数だけ係数が必要であるから、 \mathbf{p} は n 次元ベクトルになる。

$$\mathbf{p} = [p_1 \ p_2 \ \dots \ p_n]^T$$

ただし、実数係数に一切の規則を設けないままスコア分散を最大化することは不可能である。これらの係数の値を大きくすればするほどスコア分散も大きくなってしまうためである。そこで以下のように、係数の二乗和が 1 となるように規格化する。すなわち、この制限の範囲内で、 σ^2 を最大化することを考える。

$$\sum_{i=1}^n p_i^2 = 1$$

また、合成する PC の数は 1 つとは限らず、必要に応じて複数の PC (PC1, PC2, PC3, ...) を合成できる。ただしその際には、各 PC がいずれも直交するように定めなければならない。これはすなわち PC 間の共線性が無いということであり、これは後述する PLS 回帰を行う際に大きな意味を持つ。例として 2 つの PC を用いる場合、PC1 に対するスコアとローディング、PC2 に対するスコアとローディングがそれぞれ必要となるため、これら 2 種類のパラメータはベクトルではなく行列を用いて記述する。その際には、大文字の \mathbf{T} および \mathbf{P} を用いてそれぞれ以下のようにスコア行列、ローディング行列を表現する。ただし c は使用する PC の数、 m はサンプル数、 n は変数の数である。

$$\mathbf{T} = \begin{bmatrix} t_{11} & t_{12} & \cdots & t_{1c} \\ t_{21} & t_{22} & \cdots & t_{2c} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ t_{m1} & t_{m2} & \cdots & t_{mc} \end{bmatrix}$$

$$\mathbf{P} = \begin{bmatrix} p_{11} & p_{12} & \cdots & p_{1c} \\ p_{21} & p_{22} & \cdots & p_{2c} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ p_{n1} & p_{n2} & \cdots & p_{nc} \end{bmatrix}$$

ところで、ローディングの二乗和が 1 となるような制約を設けた上でスコア分散を最大化するという作業は、典型的な拘束条件付きの極値問題であり、Lagrange の未定乗数法を用いることで解が得られる。Lagrange の未定乗数法とは、 n 変数関数 f に対して k 個の条件 $g_i(x_1, x_2, \dots, x_n) = 0$ ($i = 1, 2, \dots, k$) が与えられている時に、以下のような関数

$$\tilde{f} = f - \lambda_1 g_1 - \lambda_2 g_2 - \cdots - \lambda_k g_k$$

を考えて、

$$\frac{\partial \tilde{f}}{\partial x_j} = 0 \quad (j = 1, 2, \dots, n)$$

$$\frac{\partial \tilde{f}}{\partial \lambda_i} = -g_i = 0 \quad (i = 1, 2, \dots, k)$$

として定式化される。ここで $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_k$ を Lagrange の未定乗数と呼ぶ¹⁰⁾。この方法を用いて、2 変数 x_1, x_2 からなるデータを 1 変数に縮約する際の、PC1 の算出方法を考える。今求めたいのは、PC1 = $p_1 x_1 + p_2 x_2$ に対するスコア分散を最大化するような p_1 および p_2 を算出することである。ここでの拘束条件は

$$p_1^2 + p_2^2 - 1 = 0$$

ここで σ^2 は、一般に以下のように表せることが、簡単な計算によって証明できる。

$$\sigma^2 = \sigma_1^2 p_1^2 + \sigma_2^2 p_2^2 - 2\text{Cov}(x_1, x_2) p_1 p_2$$

σ_1^2, σ_2^2 はそれぞれ x_1, x_2 の分散であり、 $\text{Cov}(x_1, x_2)$ は x_1 と x_2 の共分散である。すなわち、先に定式化した Lagrange の未定乗数法に当てはめた時、

$$\tilde{f} = \sigma_1^2 p_1^2 + \sigma_2^2 p_2^2 - 2\text{Cov}(x_1, x_2) p_1 p_2 - \lambda(p_1^2 + p_2^2 - 1)$$

なる新しい関数を考えて、これを p_1, p_2, λ についてそれぞれ偏微分して得られる式が全て 0 となるようにすればよい。したがって、

$$\sigma_1^2 p_1 - \text{Cov}(x_1, x_2) p_2 - \lambda p_1 = 0$$

$$\sigma_2^2 p_2 - \text{Cov}(x_1, x_2) p_1 - \lambda p_2 = 0$$

$$-(p_1^2 + p_2^2 - 1) = 0$$

三段目の式が成立することは自明であるため、上二段の式のみに着目すると、これらは行列を用いて以下のように一つの式にまとめられる。

$$\begin{bmatrix} \sigma_1^2 & -\text{Cov}(x_1, x_2) \\ -\text{Cov}(x_1, x_2) & \sigma_2^2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} p_1 \\ p_2 \end{bmatrix} - \lambda \begin{bmatrix} p_1 \\ p_2 \end{bmatrix} = 0$$

対角成分が各変数の分散となるように、先ほどの二段目の式の第 1 項と第 2 項を入れ替えた上での変形となっている。この式は、線型代数学における固有値問題そのものである。すなわち、任意の正方行列 \mathbf{A} について、以下の関係を満たす列ベクトル \mathbf{x} および λ を見いだすことが固有値問題を解く目的である。

$$\mathbf{A}\mathbf{x} = \lambda\mathbf{x}$$

この時の \mathbf{x} を固有ベクトル、 λ を固有値とそれぞれ呼ぶ。ここで単位行列を \mathbf{E} としたとき、

$\mathbf{x}=\mathbf{E}\mathbf{x}$ が成り立つ (\mathbf{x} が n 次数ベクトルなら、 \mathbf{E} は n 次単位行列) から、この式は次のように変形できる。

$$\begin{aligned}\mathbf{A}\mathbf{x} &= \lambda\mathbf{E}\mathbf{x} \\ \therefore (\mathbf{A} - \lambda\mathbf{E})\mathbf{x} &= \mathbf{O}\end{aligned}$$

二段目の式を解くには、下式を満たす λ を求めれば良い¹¹⁾。

$$\det(\mathbf{A} - \lambda\mathbf{E}) = 0$$

ここで \det は行列式を表す。 $\mathbf{A}-\lambda\mathbf{E}\neq\mathbf{0}$ 、すなわち $\mathbf{A}-\lambda\mathbf{E}$ が逆行列を有すると仮定すると、先ほどの固有値問題からただちに $\mathbf{x}=\mathbf{O}$ が導かれるが、これは自明な解と呼ばれ、実用上の意味をほとんど有さないので、固有ベクトルとしてはみなさない。そして固有値 λ がわかれば、固有ベクトル \mathbf{x} も求まる。現在は 2 変量のデータを考えており、すなわち固有値問題を解くことは λ についての二次方程式を解くことであるから、2 つの固有値 λ_1, λ_2 が得られ、それぞれに対応する固有ベクトル $\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2$ が求まる。ここまでの一連の計算により、スコアの分散を最大化するためのローディングが得られたこととなる。

ローディングが得られたので、元のデータに対してローディングを作用させてスコアを計算する。すなわち $\mathbf{T}=\mathbf{X}\mathbf{P}$ である。ここで \mathbf{X} は元のデータであり、その変数の数とローディングベクトルの数が等しいとき、分散捕捉率は 100% となる。しかしこれはもとの変数と同じ数だけ別の変数を用意することと同義であり、データの縮約という目的にはかなっていない。そこで実際には、いかに高い分散捕捉率を維持しながら主成分の数を抑えるか (ローディングベクトルの数を抑えるか) ということが解析上の問題となる。

2-5-2 重回帰分析

PCA に引き続き、PLS 回帰を考える上でもう一つの重要な概念である重回帰分析 (Multiple Linear Regression analysis, MLR) の概略を述べる。最も単純な回帰分析は、単一の独立変数 x に対して単一の従属変数 y を用いる単回帰分析であり、最小二乗法を適用することで達成されるが、MLR では複数の独立変数を用いて単一の従属変数 y を予測するための回帰式を得ることが目的となる。すなわち、 n 変量からなるデータ \mathbf{y} に対して、

$$\mathbf{y} = \sum_{i=1}^n a_i \mathbf{x}_i + b$$

を考え、予測誤差が最小となる回帰係数の組 a_1, a_2, \dots, a_n を求めることが MLR の主目的となる。なお b は定数項であり、 \mathbf{y}, \mathbf{x} はいずれも n 次数ベクトルである。また、 a_i は \mathbf{y} の \mathbf{x}_i に

対する偏回帰係数という¹²⁾。

この式より、予測誤差 \mathbf{e} の任意の成分 e_i は、以下のように表される。 \mathbf{e} もまた、 n 次元ベクトルである。

$$e_i = y_i - \left(\sum_{j=1}^k a_j x_{ij} + b \right)$$

ここで k は変数の数を表す。MLR においても基本的な考え方は単回帰分析と同様であり、以下に示す残差の二乗和 Q を最小化するような実数係数の組 \mathbf{a} を最小二乗法により求めることが目的となる。

$$Q = \sum_{i=1}^n e_i^2 = \sum_{i=1}^n \left\{ y_i - \left(\sum_{j=1}^k a_j x_{ij} + b \right) \right\}^2$$

簡単のため、2 変量のデータを用いて MLR を行う場合における偏回帰係数の算出を考える。上式において変数の数に対応する変数は j であるから、2 変量の場合この式は、よりシンプルに

$$Q = \sum_{i=1}^n e_i^2 = \sum_{i=1}^n \{ y_i - (a_1 x_{i1} + a_2 x_{i2} + b) \}^2$$

と書ける。ここで、この Q を a_1, a_2, b についてそれぞれ偏微分し、得られた値が 0 となるようにする。

$$\begin{aligned} \frac{\partial Q}{\partial a_1} &= -2 \sum_{i=1}^n x_{i1} \{ y_i - (a_1 x_{i1} + a_2 x_{i2} + b) \} = 0 \\ \frac{\partial Q}{\partial a_2} &= -2 \sum_{i=1}^n x_{i2} \{ y_i - (a_1 x_{i1} + a_2 x_{i2} + b) \} = 0 \\ \frac{\partial Q}{\partial b} &= -2 \sum_{i=1}^n \{ y_i - (a_1 x_{i1} + a_2 x_{i2} + b) \} = 0 \end{aligned}$$

この 3 つの式は、それぞれ順番に以下の様書き直せる。

$$\begin{aligned}
b \sum_{i=1}^n x_{i1} + a_1 \sum_{i=1}^n (x_{i1})^2 + a_2 \sum_{i=1}^n x_{i1}x_{i2} &= \sum_{i=1}^n x_{i1}y_i \\
b \sum_{i=1}^n x_{i2} + a_1 \sum_{i=1}^n x_{i1}x_{i2} + a_2 \sum_{i=1}^n (x_{i2})^2 &= \sum_{i=1}^n x_{i2}y_i \\
bn + a_1 \sum_{i=1}^n x_{i1} + b_2 \sum_{i=1}^n x_{i2} &= \sum_{i=1}^n y_i
\end{aligned}$$

この3つの式を正規方程式と呼び、これを解くことで偏回帰係数を求めるが、そのためにはまず最下段の式を n で除する。和の記号 Σ を有する項を n で割ると、これは平均値となる。

$$b = \bar{y} - a_1\bar{x}_1 - a_2\bar{x}_2$$

各変数上部の横線は、平均値を意味する。これを残り2式に代入して変形すると、以下が得られる。

$$\begin{aligned}
a_1 \left(\sum_{i=1}^n (x_{i1})^2 - n(\bar{x}_1)^2 \right) + a_2 \left(\sum_{i=1}^n x_{i1}x_{i2} - n\bar{x}_1\bar{x}_2 \right) &= \sum_{i=1}^n x_{i1}y_i - n\bar{x}_1\bar{y} \\
a_2 \left(\sum_{i=1}^n x_{i1}x_{i2} - n\bar{x}_1\bar{x}_2 \right) + a_2 \left(\sum_{i=1}^n (x_{i2})^2 - n(\bar{x}_2)^2 \right) &= \sum_{i=1}^n x_{i2}y_i - n\bar{x}_2\bar{y}
\end{aligned}$$

これは a_1, a_2 の二元連立一次方程式と言える。ここで $S_{11}, S_{22}, S_{12}, S_{yy}, S_{1y}, S_{2y}$ をそれぞれ \mathbf{x}_1 の偏差平方和、 \mathbf{x}_2 の偏差平方和、 \mathbf{x}_1 と \mathbf{x}_2 の偏差積和、 \mathbf{y} の偏差平方和、 \mathbf{x}_1 と \mathbf{y} の偏差積和、 \mathbf{x}_2 と \mathbf{y} の偏差積和であるとする¹³⁾。すなわち、

$$\begin{aligned}
S_{11} &= \sum_{i=1}^n (x_{i1})^2 - n\bar{x}_1^2 \\
S_{22} &= \sum_{i=1}^n (x_{i2})^2 - n\bar{x}_2^2 \\
S_{12} &= \sum_{i=1}^n x_{i1}x_{i2} - n\bar{x}_1\bar{x}_2 \\
S_{yy} &= \sum_{i=1}^n y_i^2 - n\bar{y}^2 \\
S_{1y} &= \sum_{i=1}^n x_{i1}y_i - n\bar{x}_1\bar{y} \\
S_{2y} &= \sum_{i=1}^n x_{i2}y_i - n\bar{x}_2\bar{y}
\end{aligned}$$

これを用いて先ほどの二元一次連立方程式を変形すると、

$$\begin{aligned}
a_1 S_{11} + a_2 S_{12} &= S_{1y} \\
a_2 S_{12} + a_2 S_{22} &= S_{2y}
\end{aligned}$$

したがって、単純な二元一次連立方程式を解く際と同様に、 a_1 、 a_2 を含む項を消去することで、偏回帰係数 a_1, a_2 が得られる。

$$\begin{aligned}
a_1 &= \frac{S_{1y}S_{22} - S_{2y}S_{12}}{S_{11}S_{22} - (S_{12})^2} \\
a_2 &= \frac{S_{2y}S_{11} - S_{1y}S_{12}}{S_{11}S_{22} - (S_{12})^2}
\end{aligned}$$

原理的には以上のような手順を経て偏回帰係数が求まるが、MLR においては独立変数の間の多重共線性 (Multicollinearity) の有無が大きな問題となる。独立変数間に高い共線性がある場合、すなわち独立変数の中に相関を示すものが含まれる場合、MLR による偏回帰係数の推定は不安定となるため注意が必要である。

2 変数間の相関の大きさは、一般に Pearson の積率相関係数 r (単に相関係数ともいう) を用いて評価される。相関係数は、2 変数の共分散を各変数の標準偏差の積で除したものと定義されるので、 \mathbf{x}_1 と \mathbf{x}_2 の相関係数 r は、

$$r = \frac{S_{12}}{\sqrt{S_{11}}\sqrt{S_{22}}}$$

と表される。これは規格化された値であるため $-1 \leq r \leq 1$ の範囲内の値のみを取り、1に近いほど強い正の相関、-1に近いほど強い負の相関が認められるものと判断する。独立変数間の r が1または-1に近いとき、 $S_{12}^2 \doteq S_{11}S_{22}$ 、すなわち $S_{12}^2 - S_{11}S_{22} \doteq 0$ が成立する。これにより先ほど示した偏回帰係数 a_1, a_2 の分母もまた0に近づく。そして分子には x_1 と y 、 x_2 と y の偏差積和が含まれており、観測値は観測の度にばらつくが、分母が0に近いとばらつきの影響を大きく受けて、わずかな観測値の差が偏回帰係数の値を変動させやすくなる¹⁴⁾。使用する独立変数の数が増えると、相関が高い変数の組み合わせが生じる確率も増大するため、MLRでは使用可能な独立変数の数が限られてしまうという欠点がある。

2-5-3 部分最小二乗回帰分析

前節で言及したようにMLRの問題点は、独立変数間の中に強い相関があるときに、わずかな観測値の差で推定回帰係数が大きく変動してしまう点であった。一方、PCAにおいて新たに合成されるPCは互いに直交するため、これらは互いに完全に独立した関係にある。そこで、まずPCAの考え方を応用して互いに独立な新しい変数の組を用意し、次いでMLRの考え方で回帰分析を行えば、MLRの持つ問題が解消されて高精度な回帰分析を行えると予想される。このような考え方で考案されたのが部分最小二乗回帰分析(Partial Least Square regression analysis, PLS)である。

PLSとPCAのアルゴリズムでは異なる点も多く、混同しないよう注意が必要である。PCAにおいては、スコア分散を最大化するPCを探索するが、PLSにおいては \mathbf{X} と \mathbf{Y} それぞれのスコア \mathbf{T}, \mathbf{U} の**共分散**を最大化する新しい軸を探索することが目的である。PCAのスコアとPLSのスコア \mathbf{T}, \mathbf{U} は算出方法が異なることに注意する必要がある。PCAではスコア計算に \mathbf{X} の共分散行列($\mathbf{X}^T\mathbf{X}$)が用いられるのに対して、PLSでは \mathbf{X} と \mathbf{Y} の共分散行列($\mathbf{X}^T\mathbf{Y}$)を用いることで、 \mathbf{X} と \mathbf{Y} の相関を加味したスコアとなる¹⁵⁾。

すなわち、初めに独立変数 \mathbf{X} に対してPCAと類似の手法(おおむねPCAと同じだが、上述のように用いる行列が共分散行列である点が異なる)を適用し、スコア共分散が最大となる軸を得た後に、さらにスコアと \mathbf{Y} の共分散が最大となる軸を探索するので、PCAと違って二段構えで新しい軸を探索することになる。

ただしこれは \mathbf{Y} が2つ以上の変量を有する場合の理論であり、 \mathbf{Y} が単変量である場合にはまたアルゴリズムが異なる。これについては、NIPALSのアルゴリズムとして後述する。 \mathbf{Y} が単一の変量からなる場合のPLSをPLS1、 \mathbf{Y} が2つ以上の変量を有する場合のPLSをPLS2と呼んで区別する。

また、新しく引かれる軸は、主成分(PC)ではなく潜在変数(Latent Variable, LV)と称する。PCAの場合は、PCの数が増えるほど分散捕捉率が向上するが、PLSの場合、やみくもにLVを増やしても回帰精度が改善されるとは限らない。それどころか、教師データ中の無意味なノイズも考慮した過学習(Overfitting)の状態に陥り、テストデータに対する予測精度が低下することもあり得るため、注意を要する。

本研究では *Uroglena americana* の中群体数のみを目的変数として PLS を行ったため、まず PLS1 のアルゴリズムを考察し、次いで PLS2 のアルゴリズムを考察する。また、数ある PLS1 のアルゴリズムの中で最もシンプルな NIPALS (Non-Iterative Partial Least Squares) を取り扱う。以降は従属変数が単変量であることを強調するために \mathbf{y} の表記を用いる。

以下、NIPALS のアルゴリズムを示す¹⁶⁾。これは数ある PLS のアルゴリズムの中で最初に提案されたものである。

1. \mathbf{X} と \mathbf{y} の共分散ベクトルを \mathbf{w}_1 とする。なお、以下の過程では \mathbf{X} および \mathbf{y} ともに平均中心化された状況を想定しているため、 \mathbf{w}_1 は共分散ベクトルとなる。平均中心化がなされていない場合、 \mathbf{w}_1 は単に \mathbf{X} の各変数と \mathbf{y} の内積からなるベクトルである。

$$\mathbf{w}_1 = \mathbf{X}^T \mathbf{y}$$

2. 共分散ベクトル \mathbf{w}_1 を \mathbf{X} に対する重みとして用いて、スコア \mathbf{t}_1 を得る。

$$\mathbf{t}_1 = \mathbf{X} \mathbf{w}_1 = \mathbf{X} (\mathbf{X}^T \mathbf{y})$$

3. 回帰係数 \mathbf{p}_1 を求める。これは独立変数 \mathbf{t}_1 の従属変数 \mathbf{X} に対する回帰分析における回帰係数の推定である。

$$\mathbf{p}_1 = \frac{\mathbf{X} \mathbf{t}_1^T}{\mathbf{t}_1^T \mathbf{t}_1}$$

4. 回帰係数 \mathbf{q}_1 を求める。これは独立変数 \mathbf{t}_1 の従属変数 \mathbf{y} に対する回帰分析における回帰係数の推定である。

$$\mathbf{q}_1 = \frac{\mathbf{y} \mathbf{t}_1^T}{\mathbf{t}_1^T \mathbf{t}_1}$$

5. PLS 回帰式 (下式 1 段目) を求めるとともに、 \mathbf{X} と \mathbf{y} を \mathbf{t}_1 上に回帰させたときの残渣 (下式 2 段目および 3 段目) を求める。

$$\begin{aligned} \hat{\mathbf{y}}_1 &= \mathbf{t}_1 \mathbf{q}_1 \\ \mathbf{X}_1 &= \mathbf{X} - \mathbf{t}_1 \mathbf{p}_1^t \\ \mathbf{y}_1 &= \mathbf{y} - \mathbf{t}_1 \mathbf{q}_1 \end{aligned}$$

6. $\mathbf{X}_1, \mathbf{y}_1$ を用いて再度 1. からやり直す。PCA と同様に、最小の LV で高精度な回帰モデルを

得ることが望ましい。

PLS2 のアルゴリズムを考察するにあたっては行列の対角化および特異値分解の知識が必要となるので、まずこれら 2 つの概略を述べる。

ある正方行列 \mathbf{A} に対して適当な正則行列 \mathbf{P} を考えると、 $\mathbf{P}^{-1}\mathbf{A}\mathbf{P}$ が対角行列になることがある。このような操作によって対角行列を得ることを対角化という¹⁷⁾。行列を対角化することによって、煩雑な行列の n 乗計算が簡単になるなどの利点が生まれる。ここで対角行列 $\mathbf{P}^{-1}\mathbf{A}\mathbf{P}$ を、以下の様に表す。

$$\mathbf{P}^{-1}\mathbf{A}\mathbf{P} = \begin{bmatrix} a_1 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & a_2 & \dots & 0 \\ 0 & 0 & \ddots & 0 \\ 0 & 0 & \dots & a_n \end{bmatrix}$$

ここで、任意の対角成分 a_i はこの行列の固有値であり、これに対応する固有ベクトルが \mathbf{p}_i となっている。これは、以下のような変形により確認できる（簡単のために \mathbf{A} は 2 次正方行列とする）。

$$\begin{aligned} \mathbf{P}^{-1}\mathbf{A}\mathbf{P} &= \begin{bmatrix} a_1 & 0 \\ 0 & a_2 \end{bmatrix} \\ \mathbf{A}\mathbf{P} &= \mathbf{P} \begin{bmatrix} a_1 & 0 \\ 0 & a_2 \end{bmatrix} \\ \mathbf{A} [\mathbf{p}_1 \quad \mathbf{p}_2] &= \mathbf{P} \begin{bmatrix} a_1 & 0 \\ 0 & a_2 \end{bmatrix} \\ [\mathbf{A}\mathbf{p}_1 \quad \mathbf{A}\mathbf{p}_2] &= [a_1\mathbf{p}_1 \quad a_2\mathbf{p}_2] \\ \therefore \mathbf{A}\mathbf{p}_1 &= a_1\mathbf{p}_1, \mathbf{A}\mathbf{p}_2 = a_2\mathbf{p}_2 \end{aligned}$$

最下段の式は、固有値問題に他ならない。ただし全ての行列が対角化可能なわけではなく、 n 次の正方行列 (n は 2 以上の任意の自然数) であること、および n 個の 1 次独立な固有ベクトルを持つことが対角化可能であるための条件となる。

ところで、転置してもその形が変わらない、つまり $\mathbf{A}=\mathbf{A}^T$ が成立する正方行列を対称行列と呼び、 $\mathbf{A}\mathbf{A}^T=\mathbf{A}^T\mathbf{A}=\mathbf{E}$ (\mathbf{E} は単位行列) が成立する正方行列を直交行列と呼ぶ。対称行列は、適当な直交行列を用いることで常に対角化可能である¹⁵⁾。対称行列のうち、その成分の全てが実数であるものを特に実対称行列と呼ぶが、まず実対称行列の固有値は全て実数であることを示す。

典型的な固有値問題 $\mathbf{A}\mathbf{x}=\lambda\mathbf{x}$ は、各要素を共役に置き換えても成立する。すなわち、

$$\mathbf{A}\mathbf{x} = \lambda\mathbf{x} \Rightarrow \bar{\mathbf{A}}\bar{\mathbf{x}} = \bar{\lambda}\bar{\mathbf{x}}$$

共役に置換した後に演算して得られる行列は、各成分もまた共役となるので行列の組成は変わるものの、等号関係は依然成立する。次に、置換後の行列について転置を取ると、 \mathbf{A} は実対称行列であって $\mathbf{A}=\mathbf{A}^T$ かつ $\mathbf{A}=\bar{\mathbf{A}}$ だから、

$$\mathbf{x}^T \mathbf{A} = \bar{\lambda} \bar{\mathbf{x}}^T$$

この関係を用いると、下式の最左辺を以下の様に変形できる（最後の変形は定数 λ を先頭に出しただけである）。

$$\bar{\lambda} \bar{\mathbf{x}}^T \mathbf{x} = \bar{\mathbf{x}}^T \mathbf{A} \mathbf{x} = \bar{\mathbf{x}}^T \lambda \mathbf{x} = \lambda \bar{\mathbf{x}}^T \mathbf{x}$$

最左辺および最右辺のベクトルの内積はスカラー量となり、かつ複素共役同士の積であることから、虚数部分がキャンセルされて実部の平方和のみが残る（ $(a+bi)(a-bi)=a^2+b^2 > 0$ ）。よってこの内積で最左辺と最右辺を除すると、

$$\bar{\lambda} = \lambda$$

これはすなわち、固有値 λ は実数しか取りえないということであり、これにより実対称行列の固有値は全て実数であることが示された。

次に、固有値が全て実数である実正方行列は、適当な直交行列を用いて三角化可能であることを示す。行列の三角化の可能性については、三角化定理というものが存在し、「任意の n 次正方行列 \mathbf{A} に対して、 $\mathbf{U}^{-1}\mathbf{A}\mathbf{U}=\mathbf{T}$ なるユニタリ行列 \mathbf{U} および上三角行列 \mathbf{T} が存在する」というものである¹⁸⁾。ユニタリ行列とは、ある行列 \mathbf{A} の随伴行列 \mathbf{A}^\dagger (\mathbf{A} の転置行列 \mathbf{A}^T の各成分を複素共役で置換したもの) に対して $\mathbf{A}\mathbf{A}^\dagger = \mathbf{A}^\dagger\mathbf{A} = \mathbf{E}$ を満たす行列を指す。対角化可能な行列は限られているのに対して、三角化は全ての n 次正方行列に対して適用できる。さらに、 \mathbf{A} が実行列で固有値が全て実数ならば、ユニタリ行列の代わりに直交行列を用いての三角化が可能である。

簡単な例として、実際に3次の正方行列を三角化する。この時、三角化の流れは、

1. 行列の固有値と固有ベクトルを求める
2. ある固有ベクトルに対して1次独立となる任意の列ベクトルを考える（3次行列の場合は2つの列ベクトルを考える）
3. 上記2.で検討した固有ベクトルおよび一次独立な列ベクトルを行方向に並べた正方行列 \mathbf{P} を作る（必要であれば各ベクトルを予め正規化する）
4. 3.で作った正方行列が正則であることを利用して、 $\mathbf{P}^{-1}\mathbf{A}\mathbf{P}$ を求めると、これは上三角化

されている

5. 2 次の小行列に対して 1.以降の手順を再度繰り返す

以上 5 段階から成る。3 次以上の任意の正方行列に対しても、同様の手順を踏むことで対角化可能である¹⁹⁾。

ここで以下のような 3 次行列正方行列 \mathbf{A} を考え、まずはその固有値と固有ベクトルを求めろ。4.2.1 節で記した方法を用いると、固有値 $\lambda_1=1$ に対する固有ベクトル $\mathbf{v}_1=[1\ 0\ -1]^T$ が求まる。導出は割愛するが、 \mathbf{A} は固有値 $\lambda_2=2$ も有しており、この時点で \mathbf{A} の固有値は全て実数であることがわかるため、ユニタリ行列の代わりに直交行列を用いて三角化可能である。

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 0 \\ 2 & 1 & 2 \\ 1 & -1 & 2 \end{bmatrix} \Rightarrow \mathbf{v}_1 = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ -1 \end{bmatrix}$$

ここで $\mathbf{v}_2=[0\ 1\ 0]^T$, $\mathbf{v}_3=[1\ 0\ 1]^T$ を考えると、両者ともに \mathbf{v}_1 に対して一次独立である。これらを正規化した上で列ベクトルとして並べると、次のような直交行列 \mathbf{U} が得られる。 \mathbf{U} は全ての列ベクトルが一次独立、すなわちフルランクであるから、逆行列を有する。また、全ての列ベクトルが一次独立かつ正規化されているから、 $\mathbf{U}\mathbf{U}^T$ ないし $\mathbf{U}^T\mathbf{U}$ を考えると対角成分のみが 1 となって残りは 0 である。よって $\mathbf{U}\mathbf{U}^T=\mathbf{U}^T\mathbf{U}=\mathbf{E}$ 、つまり \mathbf{U} は直交行列である。

$$\mathbf{U} = \begin{bmatrix} \frac{1}{\sqrt{2}} & 0 & \frac{1}{\sqrt{2}} \\ 0 & 1 & 0 \\ -\frac{1}{\sqrt{2}} & 0 & \frac{1}{\sqrt{2}} \end{bmatrix}$$

行列 $\mathbf{T}=\mathbf{U}^T\mathbf{A}\mathbf{U}$ を考えると、 \mathbf{T} の 1 列目は (1,1) 成分を除き 0 になっている (上三角化とは結局、第 j 列の (j, j) 成分より下の成分が 0 であるような行列を得ることである)。これを確認するために、 $\mathbf{U}^T\mathbf{A}\mathbf{U}$ に右から単位ベクトル $\mathbf{e}_1=[1\ 0\ 0]^T$ を乗じる。この操作は、 $\mathbf{U}^T\mathbf{A}\mathbf{U}$ の 1 列目のみを取り出す操作に相当する。

$$\begin{aligned} \mathbf{U}^T\mathbf{A}\mathbf{U}\mathbf{e}_1 &= \mathbf{U}^T\mathbf{A}[\mathbf{v}_1\ \mathbf{v}_2\ \mathbf{v}_3]\mathbf{e}_1 \\ &= \mathbf{U}^T\mathbf{A}\mathbf{v}_1 \\ &= \lambda_1\mathbf{U}^T\mathbf{v}_1 \\ &= \lambda_1\mathbf{U}^T[\mathbf{v}_1\ \mathbf{v}_2\ \mathbf{v}_3]\mathbf{e}_1 \\ &= \lambda_1\mathbf{U}^T\mathbf{U}\mathbf{e}_1 \\ &= \lambda_1\mathbf{e}_1 \\ &= \begin{bmatrix} \lambda_1 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} \end{aligned}$$

計算過程は省略するが、実際に $\mathbf{U}^T \mathbf{A} \mathbf{U}$ を計算すると、確かに上三角行列になっている。

$$\mathbf{U}^T \mathbf{A} \mathbf{U} = \begin{bmatrix} 1 & \sqrt{2} & -1 \\ 0 & 1 & 2\sqrt{2} \\ 0 & 0 & 2 \end{bmatrix}$$

この例においては 1 回の操作で上三角化を達成できたが、1 回のみで上三角化を達成できない場合であっても、 $\mathbf{U}^T \mathbf{A} \mathbf{U}$ から 1 行目および 1 列目を除外した小行列 \mathbf{U}_2 を新たに考えて、同じように固有値および固有ベクトルを求める段階から繰り返せばよい。3 次以上の正方行列であっても、数学的帰納法によって上三角化可能であることを証明できる。なお、今回の例においては、 \mathbf{U}_2 は以下のような 2 次正方行列である。

$$\mathbf{U}_2 = \begin{bmatrix} 1 & 2\sqrt{2} \\ 0 & 2 \end{bmatrix}$$

以上の議論より、適当な直交行列 \mathbf{P} を用いて任意の実対称行列 \mathbf{A} を三角化すると、

$$\mathbf{P}^{-1} \mathbf{A} \mathbf{P} = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & \cdots & a_{1n} \\ 0 & a_{22} & \cdots & a_{2n} \\ 0 & 0 & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \cdots & a_{nn} \end{bmatrix}$$

ここで左辺の転置を取ると、

$$(\mathbf{P}^{-1} \mathbf{A} \mathbf{P})^T = \mathbf{P}^T \mathbf{A}^T \mathbf{P} = \mathbf{P}^{-1} \mathbf{A} \mathbf{P} \quad (\because \mathbf{A}^T = \mathbf{A}, \mathbf{P}^{-1} = \mathbf{P}^T)$$

つまり $\mathbf{P}^{-1} \mathbf{A} \mathbf{P}$ は上三角行列であり、かつ転置をとっても形が変化しない対称行列である。この 2 条件は、対角成分以外の成分が全て 0 である場合にのみ成立し、すなわち $\mathbf{P}^{-1} \mathbf{A} \mathbf{P}$ が対角行列であることを示している。これによって、実対称行列 \mathbf{A} は任意の直交行列 \mathbf{P} を用いて対角化可能であることが証明された²⁰⁾。

この事実を用いて、任意の $n \times m$ 行列の \mathbf{A} ($n \leq m$) を直交行列 \mathbf{Q} によって対角化することを考える²¹⁾。ただし対角化可能な行列は正方行列に限られるので、 \mathbf{A} をそのまま対角化するのではなく、転置行列との積 $\mathbf{A} \mathbf{A}^T$ を対角化する。 \mathbf{A} が実行列である場合、 $\mathbf{A} \mathbf{A}^T$ は実対称行列となるので、その固有値は全て実数となり、適当な直交行列によって対角化可能であることが、今までの議論からわかる。これを達成する直交行列を \mathbf{Q} とすると、

$$\mathbf{Q}^T \mathbf{A} \mathbf{A}^T \mathbf{Q} = \text{diag}[\lambda_1, \dots, \lambda_n] \quad (\because \mathbf{Q}^T = \mathbf{Q}^{-1})$$

$\mathbf{Q}^T \mathbf{A}$ の任意の行ベクトルを $\mathbf{p}_i^T \in R^m (i=1, \dots, n)$ として左辺を変形すると、

$$\begin{aligned} \mathbf{Q}^T \mathbf{A} \mathbf{A}^T \mathbf{Q} &= \mathbf{Q}^T \mathbf{A} (\mathbf{Q}^T \mathbf{A})^T \\ &= \begin{bmatrix} \mathbf{p}_1^T \\ \mathbf{p}_2^T \\ \vdots \\ \mathbf{p}_n^T \end{bmatrix} [\mathbf{p}_1 \ \mathbf{p}_2 \ \dots \ \mathbf{p}_n] = \text{diag}[\lambda_1, \dots, \lambda_n] \quad (\text{ただし } \lambda_i = \sqrt{\sigma_i}) \end{aligned}$$

すなわち λ_i は \mathbf{p}_i 自身の内積であり、 λ_i の平方根を取ったものが \mathbf{p}_i のノルムとなる（半正定値行列の固有値は全て非負となることが知られているので、ノルム計算に支障はない）。続いて、ある行列の特異値分解を考える。任意の行列 $n \times m$ 行列 \mathbf{A} ($n \leq m$) は、適当な $n \times n$ 直交行列 \mathbf{Q}_1 および $m \times m$ 直交行列 \mathbf{Q}_2 を用いて、以下の様に分解できる。

$$\mathbf{A} = \mathbf{Q}_1 [\text{diag}(\sigma_1, \dots, \sigma_n) | 0_{n \times (m-n)}] \mathbf{Q}_2^T$$

この式中の非負実数値 σ_i を行列 \mathbf{A} の特異値と言う。また \mathbf{Q}_1 と \mathbf{Q}_2 をそれぞれ左特異行列、右特異行列と呼ぶ。また、 \mathbf{Q}_1 と \mathbf{Q}_2 に挟まれている中央の $n \times m$ 行列を特異値行列と呼び、 Σ で表すこととする。

ところで、先ほど $\mathbf{Q}^T \mathbf{A} (\mathbf{Q}^T \mathbf{A})^T$ が対角行列となることを示したが、 $\mathbf{Q}^T \mathbf{A}$ について以下が成り立つ。

$$\begin{aligned} \mathbf{Q}^T \mathbf{A} &= \Sigma \mathbf{S} \\ &= [\text{diag}(\sigma_1, \dots, \sigma_n) | 0_{n \times (m-n)}] \begin{bmatrix} \mathbf{s}_1^T \\ \mathbf{s}_2^T \\ \vdots \\ \mathbf{s}_m^T \end{bmatrix} \end{aligned}$$

ここで \mathbf{S} は、 $\mathbf{Q}^T \mathbf{A}$ に適当な $m-n$ 個のベクトルを加えて得られる行列であり、その行ベクトルを $\mathbf{s}_i^T \in R^m (i=1, \dots, m)$ とする。すなわち \mathbf{S} は m 次正方行列である。ただし、 \mathbf{S} の行ベクトルは正規直交系となるよう、 $\mathbf{Q}^T \mathbf{A}$ に新たにベクトルを加えるものとする。

$\mathbf{Q}^T \mathbf{A}$ の行ベクトルは、直交してはいるものの正規直交系ではない（先の式から分かるように $\mathbf{p}_i^T \mathbf{p}_i = \lambda_i$ である）ことに注意を要する。 \mathbf{S} は $\mathbf{Q}^T \mathbf{A}$ にベクトルを加えて得られるものではあるが、単に加えるだけではなく正規化しなければならないので、 \mathbf{S} の i 行目と $\mathbf{Q}^T \mathbf{A}$ の i 行目

($i=1, \dots, n$)は必ずしも一致しない。

先ほどの関係が成り立つことを確認するために、実際に $\Sigma \mathbf{S}$ ($\mathbf{Q}^T \mathbf{A}$) を求めると、次のような結果が得られる。

$$\mathbf{Q}^T \mathbf{A} = \Sigma \mathbf{S} = [\text{diag}(\sigma_1, \dots, \sigma_n) | 0_{n \times (m-n)}] \begin{bmatrix} \mathbf{s}_1^T \\ \mathbf{s}_2^T \\ \vdots \\ \mathbf{s}_m^T \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \sigma_1 \mathbf{s}_1^T \\ \sigma_2 \mathbf{s}_2^T \\ \vdots \\ \sigma_n \mathbf{s}_n^T \end{bmatrix}$$

Σ は対角行列と零行列に分割できるが、対角行列の対角成分以外は全て 0 なので、結果として得られる行列は \mathbf{p}_i^T を σ_i 倍する形になる。さらに、

$$\begin{aligned} \mathbf{Q}^T \mathbf{A} (\mathbf{Q}^T \mathbf{A})^T &= \Sigma \mathbf{S} (\Sigma \mathbf{S})^T = \begin{bmatrix} \sigma_1 \mathbf{s}_1^T \\ \sigma_2 \mathbf{s}_2^T \\ \vdots \\ \sigma_n \mathbf{s}_n^T \end{bmatrix} [\sigma_1 \mathbf{s}_1 \quad \sigma_2 \mathbf{s}_2 \quad \cdots \quad \sigma_n \mathbf{s}_n] \\ &= \text{diag}(\sigma_1^2, \dots, \sigma_n^2) \\ &= \text{diag}(\lambda_1, \dots, \lambda_n) \quad (\because \mathbf{s}_i^T \mathbf{s}_j = \delta_{ij}) \end{aligned}$$

ただし δ_{ij} はクロネッカーのデルタである。これは、 $\mathbf{Q}^T \mathbf{A}$ と $\mathbf{Q}^T \mathbf{A}$ の転置の積を対角化した際に得られた結果と同じであり、確かに $\mathbf{Q}^T \mathbf{A} = \Sigma \mathbf{S}$ であるとわかる。また、 \mathbf{Q} は直交行列 ($\mathbf{Q}\mathbf{Q}^T = \mathbf{Q}^T \mathbf{Q} = \mathbf{E}$) であることを利用すると、

$$\begin{aligned} \mathbf{A} &= \mathbf{Q} (\mathbf{Q}^T \mathbf{A}) \\ &= \mathbf{Q} \Sigma \mathbf{S} \\ &= \mathbf{Q} [\text{diag}(\sigma_1, \dots, \sigma_n) | 0_{n \times (m-n)}] \mathbf{S} \end{aligned}$$

$\mathbf{Q} = \mathbf{Q}_1$, $\mathbf{S} = \mathbf{Q}_2^T$ として改めて書き直せば、当初の特異値分解の式に帰着する。

$$\mathbf{A} = \mathbf{Q}_1 [\text{diag}(\sigma_1, \dots, \sigma_n) | 0_{n \times (m-n)}] \mathbf{Q}_2^T$$

よって、任意の行列 $n \times m$ 行列 \mathbf{A} ($n \leq m$) は、適当な $n \times n$ 直交行列 \mathbf{Q}_1 、特異値行列 Σ 、 $m \times m$ 直交行列 \mathbf{Q}_2 の積として分解できることが示された。

PLS2 のアルゴリズムは、ここまでで議論した特異値分解と密接に関連しており、以下の流れで進行する^{15, 22)}。

1. 行列 $\mathbf{X}^T\mathbf{Y}$ を特異値分解し、第一左特異ベクトル \mathbf{w}_1 (左特異行列の第一列ベクトル) および第一右特異ベクトル \mathbf{c}_1 (右特異行列の第一列ベクトル) を求める。特異値分解の性質より、これは $\mathbf{X}\mathbf{w}_1$ と $\mathbf{Y}\mathbf{c}_1$ の共分散を最大化することが分かっている²³⁾。
2. $\|\mathbf{w}_1\|=\|\mathbf{c}_1\|=1$ となるよう正規化する。
3. $\mathbf{t}_1=\mathbf{X}\mathbf{w}_1$, $\mathbf{u}_1=\mathbf{Y}\mathbf{c}_1$ よりスコア $\mathbf{t}_1, \mathbf{u}_1$ を求める。
4. $\|\mathbf{t}_1\|=\|\mathbf{u}_1\|=1$ となるよう正規化する。
5. 回帰係数 $\mathbf{b}_1=\mathbf{u}_1^T\mathbf{t}_1$ を求める。
6. $\mathbf{p}_1=\mathbf{X}^T\mathbf{t}_1$, $\mathbf{q}_1=\mathbf{Y}^T\mathbf{u}_1$ より $\mathbf{p}_1, \mathbf{q}_1$ を求める。
7. \mathbf{X} の残渣行列 \mathbf{E}_1 , \mathbf{Y} の残渣行列 \mathbf{F}_1 を求める。

$$\mathbf{E}_1 = \mathbf{X} - \mathbf{t}_1\mathbf{p}_1^T$$

$$\mathbf{F}_1 = \mathbf{Y} - \mathbf{u}_1\mathbf{q}_1^T$$

8. 残渣行列を用いて再度 1.から繰り返す。繰り返しの回数が LV の数となる。
PCA と同様に LV どうしは直交するため、PLS は MLR のような多重共線性の問題を回避できる。ただしサンプル数に対して変数の数が過剰である場合には回帰精度が低下するため、後述する差異解析等を用いて、あらかじめ従属変数と無相関な変数を取り除いておくことが望ましい。

2-5-4 ピーク検出および差異解析

LC/MS 分析により取得したデータを用いて、ピーク検出、保持時間補正、および差異解析を実施した。これらの解析には、LC/MS データ統合解析ソフトである Progenesis QI (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) を用いた。

ピーク検出の際に仮定したアダクトの一覧を表 3-6 に示す。ピーク検出の閾値は“Automatic”に設定し、Chromatographic Peak Width についての制限は設けなかった。また、LC で使用した移動相由来の汚染物質や、システムノイズを除去するために、表 3-7 に示した一連の条件を全て満たしたピークのみを、後述するインターバル OPLS 回帰分析 (iOPLS 回帰分析) に供した。

2-5-5 インターバル直交部分最小二乗回帰分析による原因物質の抽出

差異解析により抽出されたイオンの peak volume と、*U.americana* 中群体数との間で回帰分析を行うことで、得られた回帰モデルに対して大きく寄与している物質のみを抽出することを目的として、直交部分最小二乗回帰分析 (Orthogonal Projection to Latent Structure, OPLS) を実施した (OPLS は、PLS 回帰分析と Orthogonal Signal Correction を組み合わせた回帰分析法である²⁵⁾)。OPLS 回帰分析を行うソフトウェアとして、PLS_Toolbox (Eigenvector Incorporated, USA)を使用した。

表 3-6 ピーク検出時に使用したアダクトの一覧

Adduct	Charge
M+H ₂ O-H	1
M-2H+K	1
M-H	1
M+Hac-H	1
2M+Hac-H	1
M-H ₂ O-H	1
M+ACN+Cl.	1
M+Hac.+Cl.	1
M+Cl ⁻ .	1
M+Br	1
M+H ₂ O+Cl.	1
2M-H	1
M+ACN-H	1
3M-H	1
M-2H	2
M-3H	3

表 3-7 サンプルユニークなイオンの探索

条件 1	Max fold change ≥ 10
条件 2	Highest mean = 20180420 採水サンプル または <i>U.americana</i> 培養液
条件 3	Lowest mean = SPE blank
条件 4	ANOVA p-value ≤ 0.05

OPLS によって構築された線形回帰モデルを評価する際の重要な概念として、cross validation および RMSECV(Root Mean Square Error of Cross Validation)が挙げられる。Cross validation とは、**X** と **Y** を教師データとテストデータに分割し、教師データのみから構築されたモデルを用いてテストデータの予測を行い、その精度を評価する手法である。その際、テストデータの予測値と実測値の間には予測誤差が存在するため、この誤差を RMSECV と定義する。すなわち、RMSECV は cross validation における根平均二乗誤差である。PLS により得られた回帰直線の決定係数 R^2 が小さい場合は、予測誤差が大きい、すなわち RMSECV が大きいモデルと言える。上述したように、PLS は、独立変数が多数存在する場合においても適用可能な解析法である。しかし、実験によって得られる独立変数の中には、従属変数とは無関係なものや、ノイズも含まれている可能性があり、そのような場合には回帰の精度悪化、すなわち RMSECV の増大につながる危険性がある。これを防ぐため、variable selection 機能を用いることにより、モデル精度の改善を試みた。これは、RMSECV を悪化させる独立変数を解析から除外し、一部の独立変数のみを用いることで当てはまりの良いモデルを構築するための手法である。このように、元データの一部の変数のみを

用いて OPLS 回帰モデルを構築する手法は iOPLS 回帰分析と呼ばれる。本研究における iOPLS の解析条件を、以下の表 3-8 に示す。

表 3-8 iOPLS の解析条件

Item	Value
Mode	reverse
# of intervals	auto
Interval Size	1
Step Size	auto
Max. # of LVs	3

Variable selection によって抽出された一部のイオンを用いて、OPLS 回帰モデルを構築した。その際の解析条件は以下の表 3-9 に示すとおりである。

表 3-9 OPLS 回帰分析 解析条件

Preprocessing (X)	Mean Center
Preprocessing (Y)	Mean Center
Cross validation	Contiguous Blocks (7 splits)

3.結果および考察

3-1 検出されたピークの総数および差異解析による生ぐさ臭と無関係なピークの除外

Progenesis QIによる Peak Picking の結果、検出されたイオンの総数は 6,810 種であった。これらのうちから、表 3-8 の条件を満たすような物質のみを抽出したところ、その総数は 117 であった。すなわち、検出されたイオン全 6,810 種のうち 6,693 種については、生ぐさ臭と無関係なピークであると判断した。

抽出された 117 物質を iOPLS 回帰分析に供することで、候補物質のさらなる絞り込みを試みた。

3-2 インターバル直交部分最小二乗回帰分析モデルの構築

差異解析により候補物質を 117 種抽出したが、これらのうち、OPLS 回帰分析モデルの構築に使用する物質を、variable selection 機能により抽出した。variable selection の結果、117 種中 18 種のイオンが選択されたため、これを回帰分析モデルの構築に供した。

PLS_Toolbox では、二種類のモード (forward mode と backward mode) にて variable selection を実施可能であるが、本研究においては backward mode を採用した。すなわち、回帰分析モデルの構築から除外した際に RMSECV の増大を招くようなイオンを探索・抽出し、その結果として 18 種のイオンが抽出された。

抽出された 18 物質を用いて OPLS 回帰モデルを構築し、LV の数に対するモデルの RMSECV を確認したところ、図 3-6a に示すようなプロットが得られた。LV=2 の点を knee point であると判断し、モデル構築における LV の数は 2 とした。

3-2-1 構築した回帰分析モデルの線形性

LV=2 として得られた回帰モデルの概要を図 3-6b に示す。図中の赤色の直線は実際に得られた回帰直線、緑の直線は $R^2=1$ の理想的な回帰直線を示しており、両者はよく重なっていることから、直線性良好な回帰モデルを構築できたと言える。また、図中の R^2 CV、 R^2 cal も 1 に近い値を示した。

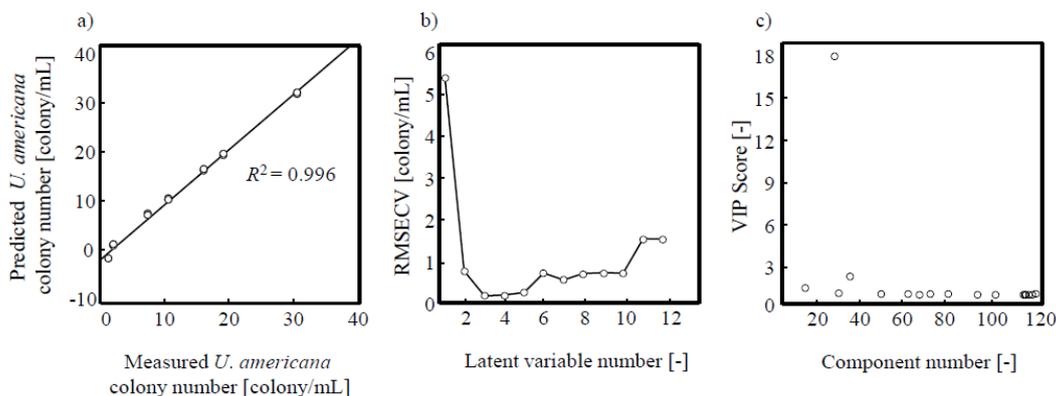


図 3-6 OPLS 回帰モデルの概要

a: 実測 *U. americana* 中群体数(横軸)と予測 *U. americana* 中群体数(縦軸) b: LV 数と RMSECV の関係 c: 各物質の VIP Score

3-2-2 回帰分析モデル構築における各解析対象イオンの寄与

このモデルにおける各物質の Variable Importance in Projection Score (VIP Score)を確認した結果、1物質 (RT 15.72 min、 m/z 403.1622) のみが突出した値を示した(図 3-6c)。以下、この物質を FX と称する。VIP Score は、各物質のモデル構築への寄与の大きさを示す指標であり、その値が大きいほど、モデル構築に大きく寄与していると考えられるため、同物質について詳細な検討を行った。

3-3 原因候補物質の分子式推定

3-3-1 精密質量分析による原因候補物質の分子式推定

分子式推定時の構成元素の種類は表 3-10 のように決定した。推定時の元素の数の制限は、同位体パターン分析に基づいて設定した。なお、分子式を推定する際の許容誤差範囲は、1 ppm 以内に設定した。

表 3-10 分子式推定時の構成元素の種類

元素	精密質量
^{12}C	12.0000
^1H	1.0078
^{14}N	14.0031
^{16}O	15.9949

この値に基づき、FX の精密質量からイオン式を推定した結果、 $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_6^-$ という推定結果が得られた (表 3-11)。この時の質量誤差は -0.05 mmu (-0.00005) であり、高い質量精度

で FX を分析できたことを確認した。また、RDB が 10.5 と非整数値であったことから、FX は閉殻イオンとして検出されたと判断した。FX はイオン化の際に脱プロトンによってイオン化したものと仮定し、中性状態での分子式を $C_{19}H_{24}N_4O_6$ と推定した。

表 3-11 候補物質の分子式推定結果

Accurate mass	Exact mass	error (mmu)	RDB equiv.	formula
403.16226	403.16231	-0.05	10.5	$C_{19}H_{23}N_4O_6$

3-3-2 天然同位体パターン解析による原因候補物質の組成推定

iOPLS 回帰分析により抽出された候補物質の m/z は 403.1622 であったが、これは monoisotopic mass といわれる値であり、各元素の主同位体（天然同位体存在比が最も大きい同位体）のみから構成される分子の精密質量である。一般に、MS で測定される化学種を構成する元素が複数の同位体を持つ場合において、各元素の主同位体のみから構成される分子イオンが検出されると同時に、天然同位体存在比が小さい同位体元素を有するイオンも検出される。分子式の推定には、それらの同位体ピークの情報が重要となる。例えば、炭素と塩素における元素の精密質量と天然存在比は、表 1-5 のように決められており、 ^{12}C と ^{35}Cl を有する分子イオン M が検出された場合、M から +1.0034 離れたところに ^{13}C を有するイオンが、+1.9970 離れたところに ^{37}Cl を有するイオンが、M の同位体イオンとして検出される。したがって同位体イオンを確認することで、どのような元素を有するイオンか推定することができる。さらに、M : M + 1.0034 のイオン強度の比がおよそ 100% : 11% だった場合、M は 10 個前後の C 元素を有することが限定できるため、イオンが有する元素の種類だけでなく元素の数も限定することができる。したがって、分子式の推定は、これらの同位体パターン分析に基づいて実施した。

前節にて推定した FX の分子式が天然同位体パターンを矛盾しないことを確認するために、FX のマススペクトル（図 3-7）を確認したところ、monoisotopic mass より 1.0034 だけ大きな m/z を持つイオンが検出されていた。このピークは ^{13}C に由来する同位体ピークであり、monoisotopic mass に対して約 18.5% のピーク強度を有していた。また、 ^{15}N に由来する同位体ピークである、0.9977 だけ大きい m/z を持つイオンも検出され、monoisotopic mass に対する強度は約 1.04% だったことから、同物質は DNPH 誘導体として検出されていると考えられる。以上の事実に鑑みて、FX の推定分子式 $C_{19}H_{24}N_4O_6$ は天然同位体パターンに合致していると判断した。また、DNPH の分子式および誘導体化の反応機構を考慮して、FX が DNPH による誘導体化を受ける前の分子式を $C_{13}H_{20}O_3$ と推定した。

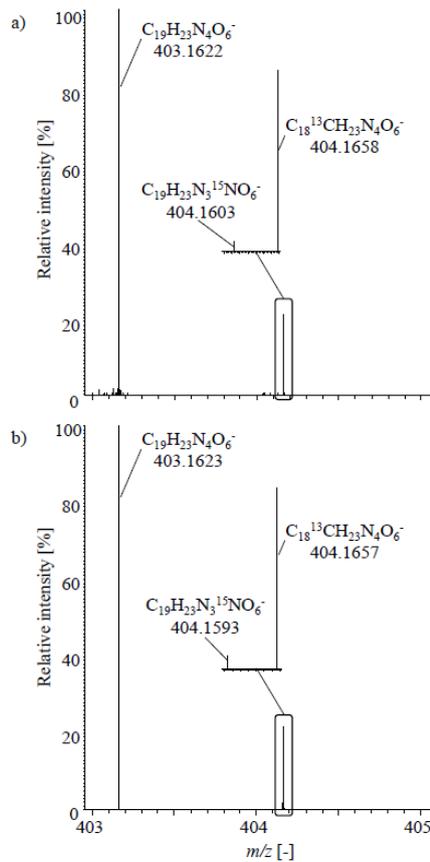


図 3-7 ESI(-)-HRMS スペクトル(RT 15.72 min)

a) 実測マススペクトル、b) シミュレーションマススペクトル

FX は、水道原水サンプルを LC-HRMS により分析した結果に多変量解析を適用したことで抽出された物質であるため、同物質が *U.americana* 培養液においても検出されるかどうかを確認した。図 3-8 は、水道原水サンプル(2018年4月20日採水)、および *U.americana* 培養液の分析結果上で、抽出イオンクロマトグラム(Extracted Ion Chromatogram、EIC)を描いた結果であり、どちらのサンプルにおいても共通して検出されていることが確認された。

FXの推定分子式が $C_{13}H_{20}O_3$ であったことから、FXはカルボニル基を最大で3個有しており、FXと2分子または3分子のDNPHが反応した誘導体も同時に生成している可能性が考えられたため、この点についても併せて検討した。 $C_{13}H_{20}O_3$ が2分子または3分子のDNPHによって誘導体化された場合、それぞれの分子式は $C_{25}H_{28}N_8O_9$ および $C_{31}H_{32}N_{12}O_{12}$ 、 m/z (as $[M-H]^-$) は 583.1906 および 763.2190 と推定されたため、これらの値を用いてEICを描いて検出の可否を確認した。

その結果、水道原水試料および *U.americana* 培養液試料の双方において、 m/z 583.1906 のイオンが検出された(図3-9)。一方で、 m/z 763.2190 のイオンは検出されなかった。このことより、FXはDNPHと反応可能なカルボニル基を最低2箇所有すると判断した。

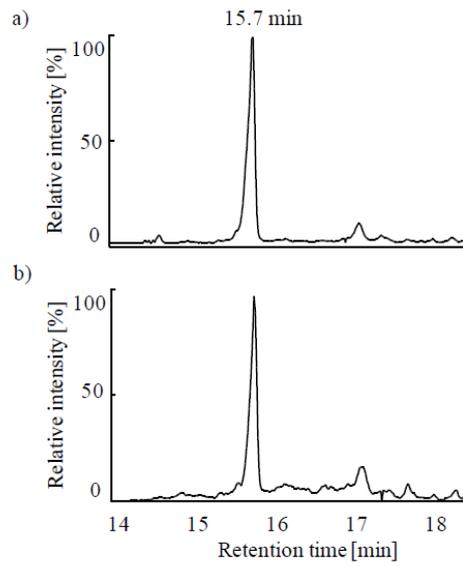


図 3-8 水道原水サンプルおよび *U.americana* 培養液試料における EIC (m/z 403.163 \pm 1 ppm) a) *U.americana* 培養液試料、b) 水道原水試料

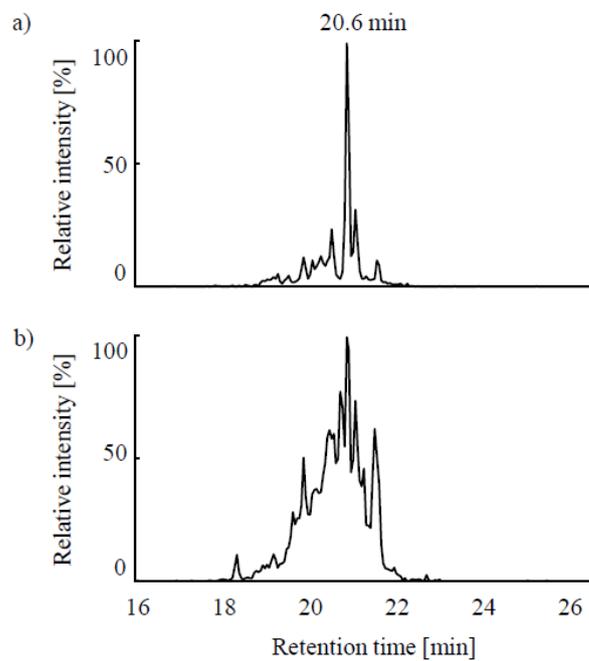


図 3-9 m/z 583.1906 の EIC (mass tolerance = 1.5 ppm) a) *U.americana* 培養液試料、b) 水道原水試料

3-3-3 大気圧化学イオン化法を用いた液体クロマトグラフィー質量分析による原因候補物質の分子量関連イオンの検出

ESI はソフトなイオン化法であるものの分析種のフラグメンテーションが全く起こらないというわけではなく、対象としているイオンが分子量関連イオンかどうかの判断には慎重を要する。最も確実な方法はイオン化法の正負を入れ替え（本研究の場合では負イオン化モードから正イオン化モードへの入れ替えを意味する）、 $[\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_6+\text{H}]^+$ に相当するイオンが検出されるかを確認することである。しかしながら、正イオン化モードで FX の測定は困難だったため、イオン化モードは共通させつつ、イオン化法を ESI から APCI に変更して再度分析を行った。その結果、RT 15.81 min にピークトップを持つ m/z 403.1622 のピークが観測された(図 3-10)。ESI での測定結果では、RT 15.6 min にピークトップが観察されたため、両者のピークトップの RT は比較的近いと言える。

ESI と APCI の 2 つのイオン化法で m/z 403.1622 のイオンが共通して検出されていることは確認できた。よって、FX は分子式を保存しており、分子量関連イオンとして検出されたものと結論した。一方で、APCI での検出感度は ESI の 1/100 程度にとどまった。DNPH およびその誘導体は熱的に不安定なことから、APCI でのイオン化の際に熱分解し、検出感度が低下したと予想される。

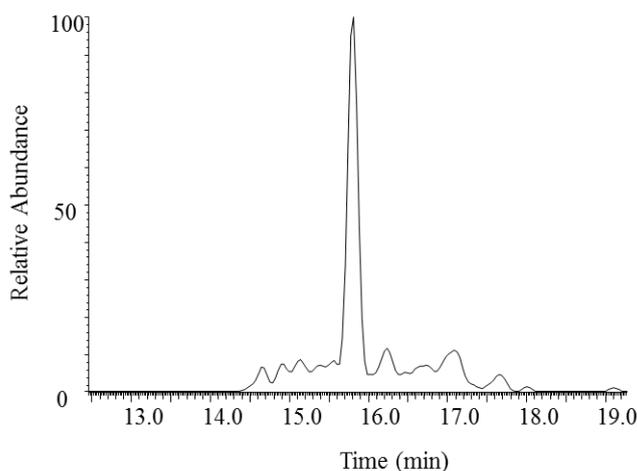


図 3-10 FX の EIC(イオン化法:APCI、 m/z 403.1622、mass tolerance = 3 ppm)

4. 本章のまとめ

本章では、水道原水試料および *U. americana* 培養液試料を DNPH にて誘導体化した後に LC/MS を用いてこれらを分析し、水道水生ぐさ臭原因物質の探索を試みた。その結果、保持時間 15.7 分、 m/z 403.1622 の物質 (FX) が候補物質として抽出されたため、精密量解析および天然同位体パターン解析に基づき、同物質の分子式を $C_{13}H_{20}O_3$ と推定した。FX は ESI のみならず APCI でも検出されたため、 m/z 403.1622 は分子量関連イオンであると判断した。

また、FX は水道原水試料と *U. americana* 培養液試料の双方で共通して検出された。すなわち FX は *U. americana* が産生する代謝物質であると予想され、また日本においては *U. americana* は水道原水中での生ぐさ臭惹起に大きく寄与していると考えられることから、FX が生ぐさ臭原因物質であることを支持する結果となった。

本章の引用文献

- 1) Pohnert G: Wound-activated chemical defense in unicellular planktonic algae. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **39**(23), 4352-4354, 2000. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20001201\)39:23<4352::AID-ANIE4352>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20001201)39:23<4352::AID-ANIE4352>3.0.CO;2-U) (2021年10月現在)
- 2) 石橋良信、一柳淳一、後藤光亀、今野弘 揮発性海藻臭 (E, E) -へプタジエナールの分析方法に関する実験、土木学会東北支部技術研究発表会 (平成4年度)、
<http://library.jsce.or.jp/jsce/open/00322/1993/1993-0314.pdf> (2021年10月現在)
- 3) サンプル前処理 - Waters Corporation
(https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005718ja_02.pdf) (2021年10月現在)
- 4) 小川茂: GC/MS, LC/MS のための誘導体化
(<https://www.jsac.or.jp/bunseki/pdf/bunseki2008/200807nyumon.pdf>) (2021年10月現在)
- 5) Air Quality Guidelines Second Edition - WHO Regional Office for Europe
(https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0013/123061/AQG2ndEd_5_7Dichloromethane.pdf) (2021年10月現在)
- 6) 赤岩秀夫 (2005) 機器分析入門, 裳華房, 134-140
- 7) Lars Konermann, Elias Ahadi, Antony D. Rodriguez, and Siavash Vahidi, (2013), Unravelling the Mechanism of Electrospray Ionization, *Anal. Chem.*, **85**, 2-9.
- 8) Jurgen H Gross 著 日本質量分析学会出版委員会訳 マススペクトロメトリー
- 9) Chapter 13. Maximizing variance with principal component analysis
(<https://livebook.manning.com/book/machine-learning-for-mortals-mere-and-otherwise/chapter-13/>)(2021年10月現在)
- 10) 金本理奈、石原秀至 弱点克服 大学生の物理数学 東京図書
- 11) 【固有値編】固有値と固有ベクトルの求め方を解説(<https://oguemon.com/study/linear-algebra/characteristic-equation/>) (2021年10月時点)
- 12) 重回帰分析による予測モデル(<http://www.ritsumei.ac.jp/se/rv/dse/jukai/MRA.html>) (2021年10月時点)
- 13) 相関係数の計算に必要な計算式 (<http://www.ritsumei.ac.jp/se/rv/dse/soukan-eq.html>) (2021年10月時点)
- 14) 多重共線性によって重回帰分析の推定は不安定になる (のはなぜか?)
(<https://webbeginner.hatenablog.com/entry/2016/05/29/072806>) (2021年10月時点)
- 15) 第1章 システム生物学と多変量解析 (<http://kurodalab.bs.s.u-tokyo.ac.jp/member/Yugi/Textbook/chapter11.pdf>) (2021年10月現在)
- 16) 橋本淳樹, 田中豊: 偏最小2乗回帰のアルゴリズムと性能.
(https://www.jstage.jst.go.jp/article/jscsymo/22/0/22_37/_pdf/-char/ja) (2021年10月現在)
- 17) 【固有値編】行列の対角化と具体的な計算例(<https://oguemon.com/study/linear-algebra/diagonalization/#toc-6>) (2021年10月時点)

- 18) 線形代数Ⅱ 4-11 対角化可能性 (http://www2.las.osakafu-u.ac.jp/~yositomi/YouTube/LA2/Slide/LA2_4_11TriAbility.pdf) (2021年10月時点)
- 19) 線形代数学/行列の三角化
(https://ja.wikibooks.org/wiki/%E7%B7%9A%E5%9E%8B%E4%BB%A3%E6%95%B0%E5%AD%A6/%E8%A1%8C%E5%88%97%E3%81%AE%E4%B8%89%E8%A7%92%E5%8C%96#cite_ref-1) (2021年10月現在)
- 20) 【固有値編】対称行列の対角化の性質と必ず対角化できる理由
(<https://oguemon.com/study/linear-algebra/diagonalization-symmetric-mat/>) (2021年10月時点)
- 21) 第7章 特異値分解とその応用 <http://www.chaos.cs.tsukuba.ac.jp/ila/chapter7.pdf> (2021年10月現在)
- 22) PLS_Toolbox 4.0 Manual
(http://mitr.p.lodz.pl/raman/jsurmacki/pliki/zajecia/LMDiT/cw3/LMDiT_PLS_Manual_4.pdf) (2021年10月現在)
- 23) Höskuldsson A: PLS regression methods. *J. Chemom.*, **2**(3), 211-228, 1988.
<https://doi.org/10.1002/cem.1180020306>
- 24) SSII2014 チュートリアル資料 - 電気電子工学科
(<https://paperzz.com/doc/5380381/ssii2014%E3%83%81%E3%83%A5%E3%83%BC%E3%83%88%E3%83%AA%E3%82%A2%E3%83%AB%E8%B3%87%E6%96%99--%E9%9B%BB%E6%B0%97%E9%9B%BB%E5%AD%90%E5%B7%A5%E5%AD%A6%E7%A7%91>) (2021年10月現在)
- 25) Evaluation of Orthogonal Signal Correction for PLS modeling (OSC-PLS and OPLS)
(<https://www.r-bloggers.com/2013/03/evaluation-of-orthogonal-signal-correction-for-pls-modeling-osc-pls-and-opls/>) (2021年10月現在)

第4章 ガスクロマトグラフィー質量分析およびにおい嗅ぎガスクロマトグラフィーによる生ぐさ臭原因候補物質の臭気確認

1 はじめに

MSをはじめとする機器分析が発達し、微量物質の高感度分析が広く普及したが、時として分析機器と遜色ない検出感度を有するのが人間の嗅覚である。例えばスカトールは糞便臭を有するため嗅ぐと不快感を生じるが、同物質の嗅覚閾値はわずか 5.6 ppt と極めて低い¹⁾。またアミルメルカプタンの嗅覚閾値は 0.78 ppt と、スカトールよりもさらに低い²⁾。これは、東京ドーム（容積約 124 万 m³）中にわずか数 mL のアミルメルカプタンのガスをまいただけでもそのにおいを感知できることを意味する。このように、ヒトは元来優れた嗅覚を有している。

その一方で、我々が日常的に感じるにおいの実態を解明することには困難を伴う。第一に、一般に「におい」はスカトールやアミルメルカプタンのような単一物質としての臭気というよりも、むしろ多成分の混合臭として感じられることが多いため、あるにおいを構成する臭気成分およびそれぞれの濃度の特定が必要になる。第二に、臭気物質同士の相互作用は複雑であり、組み合わせ次第でその混合臭は様々に変化する。例として、3Z-hexenal および(2E, 4E)-heptadienal はどちらも特有の臭気を有しているが、両物質をある特定の濃度比で混合すると、その混合液は無臭となることがわかっている³⁾。加えて、単一物質の限ってもその濃度によってにおいの感じ方は異なる。スカトールと同様に糞便臭を有するインドールは、数%程度の濃度では花のような香りを有するので、香水の成分として使われる⁴⁾。

ヒトの嗅覚はすぐれた検出器であるものの、一方で個人によって嗅覚閾値が異なったり、においの感じ方が異なったりなど、再現性という点においては機器分析に劣る。また、機器分析の様に検出された信号を数値化できないため、主観的な要素を完全に排することは難しい。そこでヒトの優れた嗅覚閾値と、機器分析の高い再現性・客観性を組み合わせた分析法を開発する動きが生まれ、におい嗅ぎ GC (GC-O) 分析が確立された。“O”は Olfactometry の頭文字であり、嗅覚を意味する“olfactory”と計量を意味する接尾辞“-metry”からなる造語である。GC-O では、一般的な GC と同じカラムを使用して混合成分を分離するが、GCカラムの出口を二方向へ分岐するという点が特徴である。分岐させた一報をにおい嗅ぎポートへ、もう一方を MS などの分析機に接続し、におい嗅ぎ実験と機器分析の結果を紐づけることで臭気成分の分析が可能になる。

本研究においても GC-O に着目し、水道原水試料および *U. americana* 培養液試料の臭気成分の分析を試みた。3名のパネラーを用いて3種類の水道原水試料を分析した結果、さまざまな臭気成分が検出されたが、うち一つはFXの保持時間と一致し、また3名のパネラーがいずれも臭気を感じたことから、FXは有臭成分であることが示唆された。

2 実験方法

2-1 水道原水試料および *Uroglena americana* 培養液試料の前処理

対象試料の前処理として、3 節にて LC/MS 分析を実施した際と同様に、亜硫酸ナトリウムの添加による DO 除去、加熱 (60°C/30 分)、加圧ろ過、固相抽出による濃縮を実施した。ただし DNPH による誘導体化は分析種の揮発性を著しく低下させるため、GC での分析には不適切であると判断し、誘導体化は実施しなかった。また、水分が残存している試料を低極性 GC カラムに導入するとカラムの性能劣化を引き起こすため⁵⁾、これを防ぐために硫酸ナトリウムを添加して、得られた上清を 0.22 μm メンブレンフィルタでろ過したものを分析に供した。

2-2 ガスクロマトグラフィー質量分析およびにおい嗅ぎガスクロマトグラフィーによる原因候補物質の臭気の検討

2-2-1 ガスクロマトグラフィーの概要

GC においても、LC と同様に、固定相と移動相の 2 相間で分配係数が異なる試料成分が、異なる速度で移動する。その結果として、検体中に含まれる分析種の分離が達成され、それぞれ異なる保持時間において検出される。

しかし、GC 用のカラムおよび移動相は、LC 用のそれらとは大きく異なる。LC においては、金属円筒内に直径数~数十 μm 程度の粒子を充填したものがカラムとして用いられるが、GC カラムとして主に用いられるのは、内径 0.25~0.53 mm 程度のごく細かいキャピラリーチューブの内壁表面に液相を塗布したものであり、キャピラリーカラムと称される(図 4-1)。この時、液相内に含有される物質の種類を変更することで、様々な分離モードを達成することが可能となる。よく用いられるものとしては 5%フェニル/95%ジメチルポリシロキサンを有する低極性カラムや、ポリエチレングリコールを有する高極性カラムなどが市販されている⁶⁾。

また、LC では水、メタノール、アセトニトリルなどの液体が移動相の役割を渡すのに対して、GC では水素、ヘリウム、窒素などの気体が移動相として用いられる。これら 3 種のガスの van deemter プロット (線速度に対する理論段相当高さ) を比較すると、水素が最も分離に優れていることがわかるが、爆発性を有するガスであるため安全上の懸念がある。ヘリウムは化学的に極めて安定であるため安全性が高く、また比較的分離にも優れていることから、GC 用のキャリアガスとして最も頻繁に用いられる。しかしながら、現在は世界的なヘリウム供給不足に陥っているため、今後の動向が懸念される⁷⁾。

安全性、供給安定性ともに優れているのが窒素であるが、これら 3 種の中では分離が最も悪い。近年のヘリウム不足を受けて、使用するキャリアガスの種類を簡単に切り替え可能な (例: ヘリウム \leftrightarrow 窒素) 分析機器の開発も進んでいる。

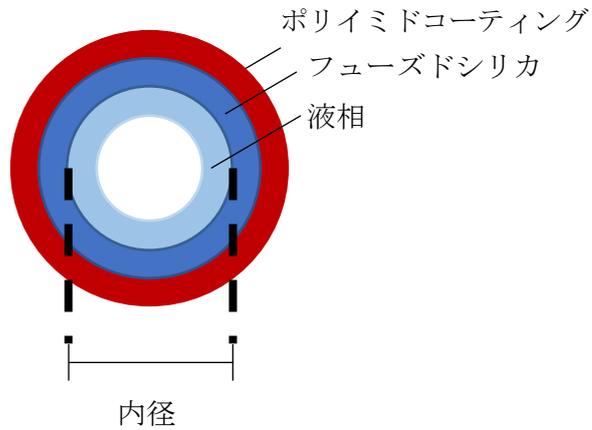


図 4-1 GC カラム(キャピラリカラム)の構造⁸⁾

2-2-2 におい嗅ぎガスクロマトグラフィーの概要

一般に GC は高揮発性物質の分析を目的として用いられ、そのような物質は臭気を有することがある。GC の検出器としては MS、水素炎イオン化検出器 (Flame ionization detector, FID)、熱伝導度型検出器 (Thermal conductivity detector, TCD) などが用いられるが、検体中の香気成分を分析する際には、人間の嗅覚による検出を行う GC-O が用いられることがある。GC-O の概略図を図 4-2 に示す。分析の原理としては GC と同様であるが、GC カラム末端から検出器へとつながるラインを分岐させ、新しく設けたもう一方のライン末端から溶出する気体の臭気を実験者が確認する。イオン化効率が低いなどの理由で検出が困難な物質であっても、その物質が臭気を有しており、ヒトの嗅覚により検知可能な濃度であれば、GC-O により保持時間を特定することができる。

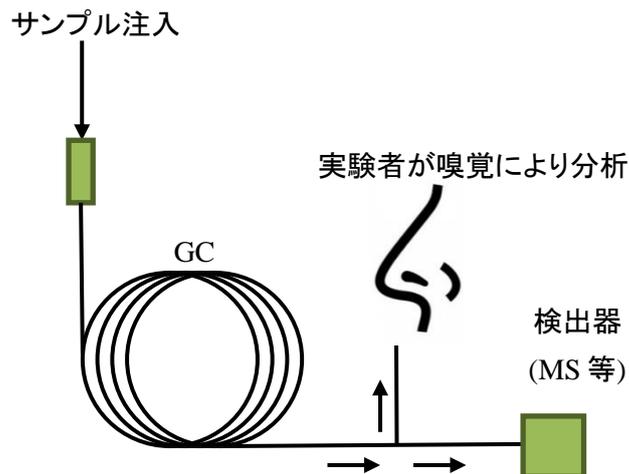


図 4-2 GC-O の概略図

2-2-3 ガスクロマトグラフィー質量分析およびにおい嗅ぎガスクロマトグラフィー分析の実験条件

GC-OによるFXの臭気確認を行うためには、まずFXのGCにおけるカラム保持時間を特定する必要があり、そのためにはGC-MSを用いてFXの分子量関連イオンを検出することが必要となる。表4-1に、GCおよびMSの各分析条件を示す。また、MeOHを入れた1.5 mL褐色バイアル瓶をイオンエンクロージャー内に設置することで、FXの分子量関連イオンの検出感度向上を試みた。イオン化法には、APCIを用いた（第3章2-4-3節参照）。

表 4-1 GC-HRMS 分析条件

測定機器	Agilent 7890B(GC)、 Synapt G2-Si HDMS (MS)	
Column	DB5-MS (30 m, ϕ 0.25 mm, df 0.25 μ m)	
GCの条件	Oven Temp.	30°C (0-1 min)、 300°C (1-14.5 min, 14.5-19.5 min)
	Injection Vol.	2 μ L (GC-O) / 5 μ L (MS)
	Inlet temp.	250°C
	Carrier Gas	Helium
	流速	0.2 mL/min
	MSの条件	イオン源
イオン化モード		positive
Corona Current		1.0 μ A
Source Temp.		150°C
Sampling Cone		40
Source Offset		80
Cone Gas Flow		240 L/h
Aux. Gas Flow		200 L/h
設定質量分解能		20000
Acquisition mode	Centroid	

3.結果および考察

3-1 ガスクロマトグラフィー質量分析による生ぐさ臭原因候補物質の分子量関連イオンの検出確認

前章で推定したFXの分子式 $C_{13}H_{20}O_3$ 、および APCI で生成しうるイオン種 (M^+ , $[M+H]^+$, $[M-H_2O+H]^+$) に鑑み⁹⁻¹¹⁾、FX の分子量関連イオンとして次の3種を想定し、それぞれの検出確認を行った(表4-2)。また、検討に際してはTONが最も高かった水道原水試料(2019年4月20日採水、TON320)を用いた。

表4-2 検討したFXの分子量関連イオンの一覧

イオン種	m/z (理論値)
M^+ ($C_{13}H_{20}O_3^+$)	224.1407
$[M+H]^+$ ($C_{13}H_{21}O_3^+$)	225.1491
$[M-H_2O+H]^+$ ($C_{13}H_{18}O_2^+$)	207.1385

これら3種のイオンのうち、ラジカルカチオンに相当する m/z 224 は検出されなかった。また、プロトン付加体の相当する m/z 225 は検出されたものの、天然同位体パターンを解析した結果、想定される含有炭素数は9となり、FXの分子式を矛盾した。

そのため、脱水プロトン付加対に相当する m/z 209 の検出を確認した結果、図4-3に示すEICが得られた。

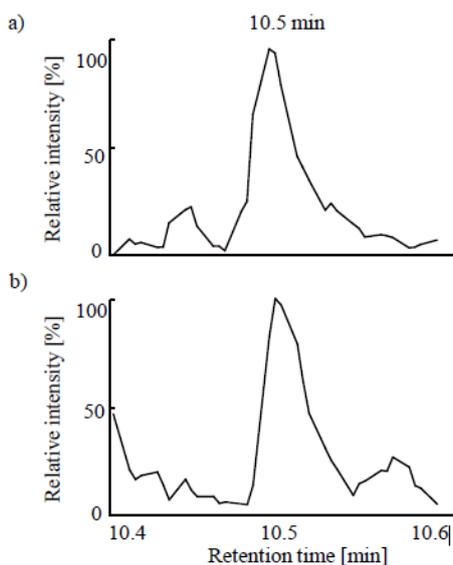


図4-3 FXの脱水プロトン付加体のEIC
(a: *U. americana* 培養液試料、b: 水道原水試料)

比較的明瞭な EIC が得られたため、この保持時間におけるマススペクトル（図 4-4）を確認し、天然同位体パターンを確認した結果、 ^{13}C の同位体ピークの強度から予想される炭素含有数は約 12 個となり、FX の推定分子式に一致することが確認された。

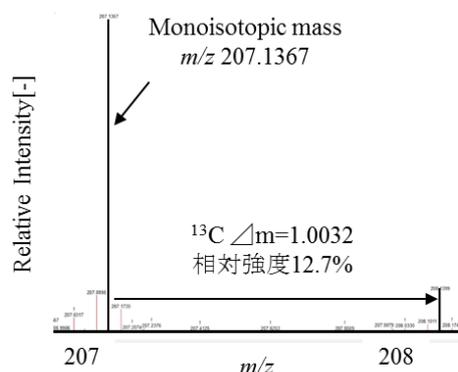


図 4-4 FX の脱水プロトン付加体のマススペクトル（保持時間 10.4 分）

3-2. におい嗅ぎガスクロマトグラフィーによる水道原水試料の臭気確認

3-2-1. フェーズドシリカキャピラリーを用いる水道原水試料の複合臭気の確認

まず、固相抽出等の前処理の過程で生ぐさ臭成分が失われていないことを確認するため、GC カラムの代わりにフェーズドシリカキャピラリーを用いて試料の GC-O 分析を実施した。これは通常の GC カラムと同一の素材から構成されるキャピラリーであるが、管内壁に液相が塗布されていないので、試料中成分は分離されない。

その結果、試料注入から 10 秒程度が経過した時点において、明確に生ぐさ臭を確認することができた。したがって、前処理の過程で生ぐさ臭は失われていないと判断した。

3-2-2 低極性カラムを用いる水道原水試料中の臭気成分の分離および確認

水道原水試料の臭気の確認には 3 つの異なる試料（1. 2018 年 4 月 20 日採水、TON320, 2. 2019 年 4 月 22 日採水、TON70, 2019 年 4 月 26 日採水、TON130）を使用して、3 名のパネルラーにより臭気を評価した。表 4-3 に、TON320 のサンプルを分析して得られた臭気分析の結果を示す。この表からわかるように、検知された臭気の数に極めて多岐に渡った。また、同一の試料を分析した結果であってもパネルラー間のばらつきが大きかった。このため、3 名のパネルラー全員が臭気を検知した時間帯を絞り込み、その時間帯で検知された臭気を確認した結果、表 4-4 に示す 3 つの臭気抽出された。

表 4-3 水道原水試料（2018年4月20日採水）の臭気成分分析の結果

パネラーA		パネラーB		パネラーC	
RT[min]	におい	RT[min]	におい	RT[min]	におい
3.8	酸	4.1	酸	3.8	酸
4.6	草	4.4	不快臭	4.1	ヨーグルト
4.8	のり	4.6	金属	4.5	表現不能
5.0	のり	5.3	タタミ	4.6	金属
6.6	上履き	5.9	タタミ	5.3	豆
7.1	食べ物	6.3	タタミ	5.8	タタミ
7.5	黒糖	7.5	タタミ	6.2	プール
7.9	ベニヤ	8.8	プラスチック	7.6	表現不能
8.1	上履き	9.4	黒糖	9.1	表現不能
9.1	上履き	9.9	茶葉	9.4	カビ
9.4	ミント	10.5	葉っぱ	9.5	PCの部屋
9.6	甘い	11.9	不快臭	9.6	よどんだ川
10.1	金属	12.7	カビ	10.20	のり
10.6	牛乳	13.4	ゴム	10.4	不快臭
10.9	金属			10.9	不快臭
11.2	室内			12.1	表現不能
11.9	カメムシ			12.5	不快臭
12.2	セロリ				

表 4-4 再現性良く検知された臭気

RT [min]	におい
7.5-7.6	黒糖、タタミ
9.1-9.6	上履き、黒糖、カビ等
10.0-10.6	金属、葉っぱ、牛乳

3-2-3. 生ぐさ臭原因候補物質の保持時間における臭気確認

絞り込んだ時間帯における臭気についてもばらつきが大きかったため、臭気種類を評価することは困難であったが、FXの保持時間10.5分において再現性良く臭気が確認されたため、FXが有臭成分であることが示唆された。

4. 本章のまとめ

第3章にて抽出されたFXの臭気の有無を確認するため、水道原水試料および*U. americana*培養液試料をGC-Oにより分析した。あらかじめGC/MSによるFXの保持時間を検討した結果、FXは脱水プロトン付加体として保持時間10.5分において検出された。次に、SPEにより生ぐさ臭が回収できたことを確認するために、フューズドシリカキャピラリを用いるGC-O分析を実施した結果、注入から10秒程度が経過した時点で生ぐさ臭が確認されたため、SPEによる生ぐさ臭の回収に成功したと判断した。

3種の水道原水試料をパネラー3名により分析した結果、多数の臭気成分が検知された。再現性良く臭気が検知された時間帯のみに絞り込んだ結果、3つの時間帯でさまざまな臭気が検知され、そのうち1つ(10.0-10.6分)はFXの保持時間を共通していた。よって、FXが有臭成分であることが示唆された。

本章の引用文献

- 1) 嗅覚のメカニズム-新コスモス電機株式会社(https://www.new-cosmos.co.jp/product/smell/xp3293_mecha.html) (2021年10月現在)
- 2) シリーズ「悪習に関わる苦情への対応」-第1回においの特徴と悪臭公害の現状- (https://www.soumu.go.jp/main_content/000386163.pdf) (2021年10月現在)
- 3) Meijiboom PW: Relationship Between Molecular Structure and Flavor Perceptibility of Aliphatic Aldehydes. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **41**, 326-328, 1964. <https://doi.org/10.1007/BF02667030>
- 4) Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantiaet AS, McNamara JO, Williams SM: Olfactory Perception in Humans, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11032/>
- 5) G-column の使い方/トラブルシューティング-一般財団法人化学物質評価研究機構 (https://www.cerij.or.jp/service/09_chromatography/column_faq_02.html) (2021年10月現在)
- 6) Agilent J&W GC カラムセレクションガイド (https://www.chem-agilent.com/pdf/low_5990-5488JAJ.PDF) (2021年10月現在)
- 7) 分離について (<https://www.tokyo-densan.co.jp/pdf/an/cu.pdf>) (2021年10月現在)
- 8) ガスクロマトグラフィー (GC)の基礎 II章 -1 キャピラリーカラムの概要 https://www.gls.co.jp/technique/technique_data/gc/basics_of_gc/p2_1.html (2021年10月時点)
- 9) APGC イオン化法の高分子構造解析への応用 (https://www.waters.com/waters/ja_JP/APGC-%E3%82%A4%E3%82%AA%E3%83%B3%E5%8C%96%E6%B3%95%E3%81%AE%E9%AB%98%E5%88%86%E5%AD%90%E6%A7%8B%E9%80%A0%E8%A7%A3%E6%9E%90%E3%81%B8%E3%81%AE%E5%BF%9C%E7%94%A8/na.htm?locale=ja_JP&cid=134950160)
- 10) 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*, 2020;e8561, <https://doi.org/10.1002/rcm.8561>
- 11) 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. <https://doi.org/10.1039/C5OB02617B>

第5章 液体クロマトグラフィー質量分析およびガスクロマトグラフィー質量分析による生ぐさ臭原因候補物質の構造推定

1. はじめに

MSは優れた検出感度を有する一方で、MS分析によって得られる情報は基本的に精密質量と、そこから推定される分子式(LC/GCを併用した場合には保持時間)のみであり、未知物質の構造について得られる情報はごく限られている。一方で、冒頭で述べたように、構造確定のためにNMRやIRを用いることも困難であり、環境試料中の未知物質の構造推定は大きな障壁となっている。

しかしながら、MSでの構造推定は完全に不可能というわけではなく、断片的ながらも構造情報を得ることができる。これを可能にするのが分析種の断片化(フラグメンテーション)であり、イオン化の際に非意図的に、または分析種に対して外部からエネルギーを印加することで意図的に発生する。これは分析種が過剰な内部エネルギーを獲得した際に、内部エネルギーが分子内のさまざまな運動(並進、偏角、伸縮等)に分配され、分配されたエネルギーがある特定の化学結合の結合エネルギーを上回ったときに、その部分での結合開裂が起こることで生じるものと考えられている。例としてアミノ基(-NH₂)は正イオン化モードにより容易に水素付加を受けるが、イオン化したアミノ基は単純誘起開裂(Simple Inductive Cleavage)と呼ばれるフラグメンテーション反応によって容易に脱離することが知られている¹⁾。この際、アミノ基は中性のアムモニア(NH₃)として脱離するので、分析種の m/z より17だけ小さいイオンが観察された場合、その分析種はアミノ基を有していると予想される。

ジェネラルフラグメンテーションルール(GFR)は対象とするイオンが閉殻か開殻かで大きく異なる。歴史的にはGC-EI/MS、すなわち開殻イオンのほうが長く分析されてきたため、開殻GFRについては多くの知見が集積されている。ESIのような閉殻イオン化はEIに比べると歴史が浅いものの、閉殻GFRについても徐々に地検が集積されつつある。

本研究では、LC-MS/MS(閉殻GFR)およびGC/MS(開殻GFR)を併用して、観察されたフラグメンテーションパターンに基づくFXの構造推定を試みた。その結果、LC-MS/MS分析では4種のニュートラルロスが観察され、メトキシシクロヘキセノン構造を有すると予想された。またGC/MS分析では3種のニュートラルロスに着目した結果、メトキシ基と末端アルキルケトンを有すると予想された。これらの部分的な構造情報、およびFXの分子式に鑑みて、予想されるFXの全体構造14種が得られた。

2. 実験方法

2-1 液体クロマトグラフィー質量分析を用いた多段階精密質量分析による原因候補物質の構造推定

2-1-1 衝突誘起解離による分析種のフラグメンテーション

通常、質量分析計の内部は高真空に保たれており、イオンと中性ガスの衝突を可能な限り低減する設計となっている。しかしながら、質量分析計の中には意図的にイオンと中性ガスの衝突を引き起こす機能を有するものもあり、これは分析種のフラグメンテーションを引き起こすことで未知物質の構造を解析することを目的としている。

衝突を用いるものとして最も有名な方法は衝突誘起解離 (Collision Induced Dissociation, CID) である。CID を行う際には、装置内部の一部のみをヘリウム、窒素、アルゴンなどの中性ガスで満たし、この中にイオンビームを照射する。中性ガスを満たす部分以外は高真空に保つ必要があるため、近傍に真空ポンプを設置して差動排気された領域を形成する。CIDにより、ESIで生成するような内部エネルギーの低いイオンであっても活性化することが可能となるため、構造解析のための重要な手段となる²⁾。

2-1-2 閉殻フラグメンテーションルール

プリカーサーイオンがヘテロリティック開裂を起こしたとき、電子の分配は不均等になる。すなわち電子を2つ多く持つイオンと、電子を2つ少なく持つイオンに開裂する。この場合は、閉殻フラグメンテーション (GFR) を用いてフラグメンテーション反応解析を行うことができる。閉殻フラグメンテーションルールの一覧を図 5-1 に示す^{3,4)}。本研究で使用したルールの条件を以下に述べる。

(1) Charge retention fragmentations: Remote hydrogen rearrangements

Remote hydrogen rearrangements は、チャージサイトと離れた位置で起こるフラグメンテーション反応であり、四員環遷移状態を経由すると仮定して、2つの共有結合が開裂することにより進行する。開裂パターンは、プロダクトイオンに π 結合が形成されるパターン a と、ニュートラルロスに π 結合が形成されるパターン b の2種類がある。どちらのパターンにおいても、四員環を形成する X は炭素またはヘテロ原子であり、パターン a については、チャージサイト側に結合している原子が A ではなく X でも反応は起こり得る。また、分析種がペプチドの場合は、炭素に結合している水素よりも、窒素に結合している水素の方が選択的に反応すると考えられる。ペプチドのように分子内にアミノ基とカルボニル基がある場合、窒素の孤立電子対がカルボニル炭素を求核攻撃することで環状イオンが生成する可能性もある。さらに系の安定性から、フラグメンテーションを伴わない異性化や、Remote hydrogen rearrangements とは別の転位反応が起こることも考慮しなければならない。

(2) Charge retention fragmentations: Retro-Diels-Alder reactions

Retro-Diels-Alder reactions (RDA) は、有機化学反応のディールズアルダー反応の逆反応に相当し、不飽和環状化合物が開裂するフラグメンテーションである。ディールズアルダー反応はペリ環状反応の一種であり、これが進行するかどうかは Woodward-Hoffman 則にのっとる。ディールズアルダー反応の進行のためのエネルギー供給源としては熱または光が想定されるが、本研究では MS 装置内でのフラグメンテーション反応を考えるため、熱反応のみを検討対象とする。また、厳密には結合性軌道と反結合性軌道の向きまで考慮しなければならないが、想定している RDA に関与する電子総数が $4q+2$ ($q=1$ 以上の整数) であれば反応は起こり得る。しかしながら、Hückel 則を満たすような安定な化合物に関しては、不飽和環状化合物であっても反応は起こらない。

(3) Charge retention fragmentations: Radical fragmentation

Radical fragmentation は、チャージサイトから離れた結合がヘテロリティック開裂する反応である。したがって、イオン、脱離種の双方がラジカルとなる。また、メトキシ基を含む化合物がメチルラジカル脱離を起こして生じたプロダクトイオンが共鳴可能な（複数の極限構造を仮定できる）場合、反応が進行しやすくなる。ラジカルが生成するため、開殻 GFR と混同しがちだが、開殻フラグメンテーションの場合には本ルールを適用できないことに注意が必要である。

(4) Charge migration fragmentations: Simple inductive cleavage

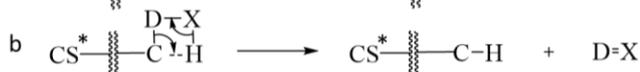
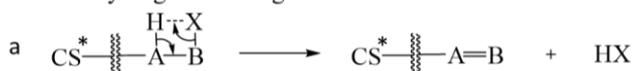
Simple inductive cleavage は、チャージサイトの隣の結合がホモリティック開裂する反応であり、ホモリティック開裂するとともにチャージサイトが移動する。また、アリルアルコール、アリルエーテル、フェノールが対象イオンであるとき、Simple inductive cleavage は起こりやすい。

(5) Charge migration fragmentations: Inductive cleavages assisted by adjacent heteroatoms

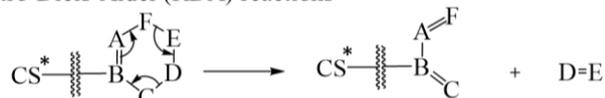
Inductive cleavages assisted by adjacent heteroatoms は、共有電子対を持つ原子の 2 つとなり、チャージサイトがあるときに起こり得る。共有電子対が隣の結合に電子を供与することで反応は始まり、電子供与された結合につながる原子のもう一方の結合が電子不足のチャージサイトに電子を供与する。この反応によりチャージサイトが移動する開裂が起こる。また、プリカーサーイオンに S、N、O の原子が含まれている場合、共有電子対を持っている原子であるため、このフラグメンテーションは起こり得る。

Charge retention fragmentation

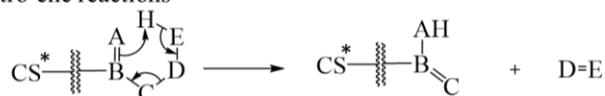
Remote hydrogen rearrangements



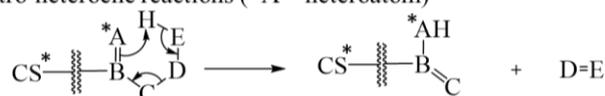
Retro-Diels-Alder (RDA) reactions



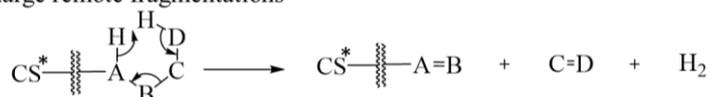
Retro-ene reactions



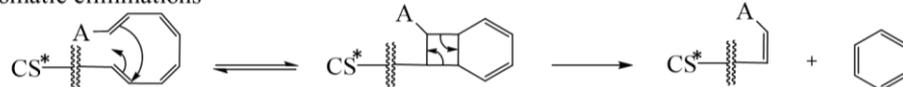
Retro-heteroene reactions (*A = heteroatom)



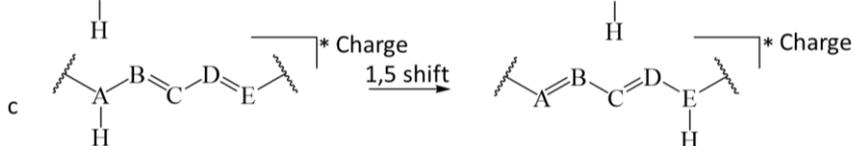
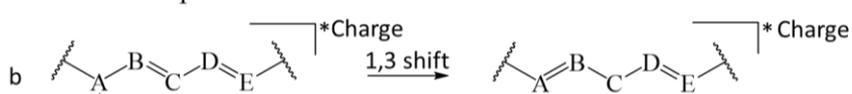
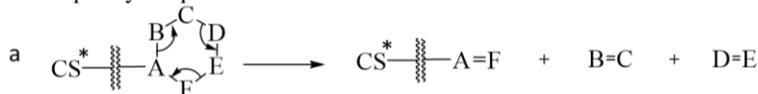
Charge remote fragmentations



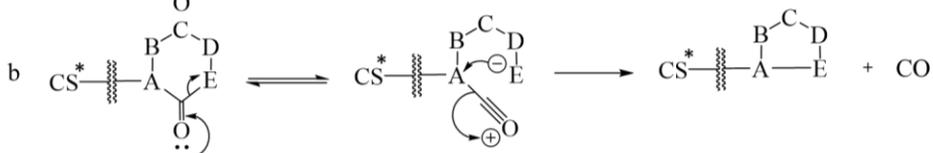
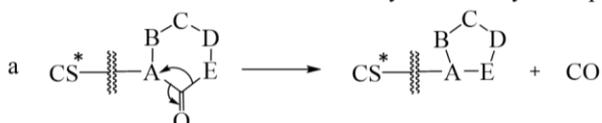
Aromatic eliminations



Other pericyclic processes



Carbon monoxide eliminations from cyclic carbonyl compounds



Radical fragmentation

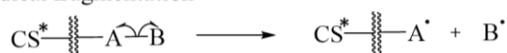
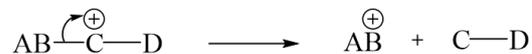


図 5-1 閉殻フラグメンテーションルール^{3,4)}

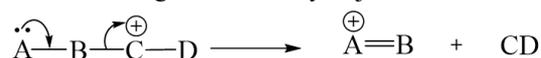
Charge migration fragmentation

Positive mode

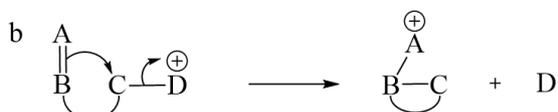
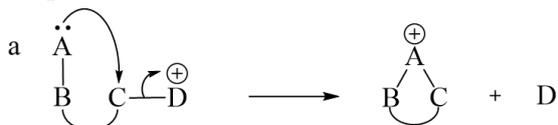
Simple inductive cleavage



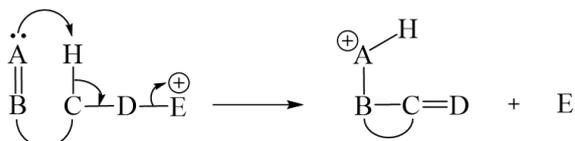
Inductive cleavages assisted by adjacent heteroatoms



Displacement reactions



Inductive cleavages assisted by β -hydrogen removal



Grob-Wharton fragmentation

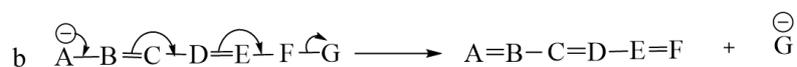


Negative mode

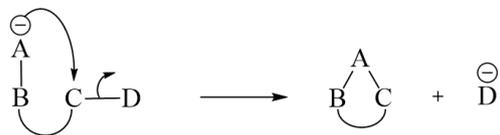
α -Eliminations



γ - and ε -eliminations



Displacement reactions



Eliminations assisted by β -hydrogen removal

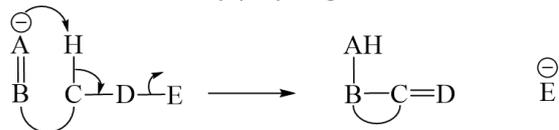


図 5-1 閉殻フラグメンテーションルール^{3,4)} (続き)

2-1-3 多段階精密質量分析の実験条件

FX の多段階精密質量分析には、LC-ESI(-)-MS (HPG-3400SD-LTQ Orbitrap XL) を用いた。その際の分析条件を表 5-1 に示す。分離カラム、移動相、バイナリプログラム等の分析条件については、第 3 章にて記載した条件と同一のものを用いた。

表 5-1 高分解能 LC/MS/MS を用いた多段階質量分析の分析条件

項目 (単位)	値/タイプ/モード
Source voltage (kV)	2.50
Vaporize temp. (°C)	400
Sheath gas flow (arb.)	60.00
Aux. gas flow (arb.)	20.00
Sweep gas flow (arb.)	0.00
Capillary temp. (°C)	380.00
Collision gas	He

2-2 ガスクロマトグラフィー質量分析を用いた多段階精密質量分析による原因候補物質の構造推定

2-2-1 電子イオン化法の概要

電子イオン化法 (Electron Ionization, EI) は質量分析のためのイオン化法として最もよく用いられ、気相中の中性分析種に対して運動エネルギーを有する電子を照射することでイオン化が起こる。この時の電子の運動エネルギーは数十 eV であり、これが分析種のイオン化エネルギーを上回ると以下のようなイオン化が起こる。



大半の分子のイオン化エネルギーは 7 ~ 15 eV の範囲に収まる。より厳密には、EI 法でのイオン化効率は分析種のイオン化断面積に依存することがわかっているが、電子エネルギーに対するイオン化断面積の関係は 70 eV 付近で極大値を示すなだらかな曲線である。このため、電子エネルギーが 70 eV から多少ずれてもイオン化効率はほとんどかわらず、また 70 eV という値は全ての原子や分子をイオン化できるほど強力なエネルギーであるので、EI スペクトルを取得する際の電子エネルギーの設定値はほぼ常にこの値が用いられる²⁾。

2-2-2 電界イオン化法の概要

EI 法は質量分析の黎明期から現代にいたるまで重要な立ち位置を占めるイオン化法であるものの、分析種のフラグメンテーションが頻繁に発生するために、分子イオン M^{+} の保存に適していないという欠点がある。本研究のような未知物質の探索においては、まず未知物質の分子式を推定する必要があるため、分子イオンを保存できないことは大きな問題となる。

そこで EI 法よりもソフトで分子イオンを保存可能、かつ GC/MS でのイオン化として利用可能なものとして、電界イオン化法 (Field Ionization, FI) に着目した。その名の通り電界によりイオン化が起こるが、これには次のような過程が考えられる。

タングステンのような金属表面の近傍に水素原子が位置する場合、金属に正電位を与えて 2 V \AA^{-1} 程度の強電場を発生させると、プロトンと電子間のポテンシャルが大きく歪み、電子がプロトンから離れてイオン化が起こる。



EI 法と異なり FI 法は自動イオン化を応用した方法であり、すなわちエネルギー供給源と分析種の相互作用はイオン化を引き起こすのみである。すなわち M^+ に対して二次的にエネルギーを供給することが無いので、分析種のフラグメンテーションが最小限に抑えられ、このため FI 法は分子イオンの保存に適している²⁾。

2-2-3 保持指標の概要

GC/MS の LC/MS に対する優位性の一つは、分析条件の規格化がなされている点であり、異なる実験室で得られたデータどうしであっても比較しやすいという特徴がある。先に挙げた 70 eV の電子によるイオン化もその一つであるが、中でも保持指標 (Retention Index: RI) は GC/MS 分析の大きな武器である。保持指標は、分析種の GC カラム保持時間を絶対的な値として比較するのではなく、他の標準物質に対する相対的な保持時間として表現することで得られる値である。実際、GC 分析の際にはカラム先端に蓄積した汚染物質を除去するなどの目的でカラムをわずかに切断するという操作が頻繁に行われるので、これを繰り返す度に GC カラム長はどんどんと短くなり、それに付随して保持時間も短くなる。すなわちほとんどの場合において、絶対的な値としての GC カラム保持時間を比較することは意味をなさない。しかしながら保持指標を用いて保持時間を相対化することにより、この問題は解消される。GC カラムは LC カラムと違って種類が限られていることも、保持指標の考え方を実現させた要因の一つになっている。

保持時間を相対化する際の標準物質として用いられるのは直鎖アルカンの混合溶液である。GC の分析法は、時間経過に伴って GC カラムオープンの温度を上昇させる昇温分析と、カラムオープンの温度を一定に保つ恒温分析に大別されるが、それぞれにおいて保持指標は以下のように求められる⁵⁾。

$$\text{昇温分析: RI} = 100 \times \frac{t_r - t_n}{t_{n+1} - t_n} + 100n$$

$$\text{恒温分析: RI} = 100 \times \frac{\log t_r - \log t_n}{\log t_{n+1} - \log t_n} + 100 \times n$$

ここで t_r は保持指標値を算出したい分析種の保持時間、 t_n は t_r 未満の保持時間を有するアルカンの中で炭素数が最大のものの保持時間、 t_{n+1} は t_r より大きい保持時間を有するアルカンの中で炭素数が最小のものの保持時間、 n は保持時間 t_n のアルカンの炭素原子数を示す。アメリカ国立標準技術研究所 (National Institute of Standards and Technology, NIST) のデータベースには多くの物質の EI マススペクトルと共に各種 GC カラムにおける保持指標の値が掲載されており、データベースマッチングの際にはよく参照される値となっている⁶⁾。

2-2-4 電界イオン化法を用いたガスクロマトグラフィー質量分析による原因候補物質の保持指標値の特定

これまでに述べた EI 法および FI 法それぞれの特徴に鑑みると、最終的には FX の EI マススペクトルを取得し、フラグメンテーションパターンを解析して構造を推定することが目的となる。しかしながら EI 法が FX の分子イオンの保存には適さない可能性があり、分子イオンを検出できない場合、GC における FX の保持時間が不明となり、どの EI スペクトルを構造解析の対象とすべきかがわからない。

そこでまず、ソフトイオン化である FI 法を用いて、FX の保持時間および保持指標を特定することを試みた。その際の実験条件を表 5-2 に示す。

表 5-2 GC-EI/FI-MS 分析の分析条件

測定機器	Agilent 7890B (GC), AccuTof Gcx-plus (MS)	
GC の条件	Column	DB5-MS (30 m, ϕ 0.25 mm, df 0.25 μ m)
	Oven Temp.(EI)	50°C (0-1.5 min), 200°C (1.5-41.5 min)
	Oven Temp.(FI)	50°C (0-1.5 min), 300°C (1.5-43.2 min), 300°C (43.2-53.2 min), 350°C (53.2-55.7 min), 350°C (55.7-60.7 min)
	Injection Vol.	1 μ L
	Inlet temp.	250°C
	Carrier Gas	Helium
	流速	1 mL/min
MS の条件	イオン源	EI/FI
	イオン化電流(EI)	300 μ A
	カソード(FI)	-10000 V
	スキャン範囲	25-230(EI), 30-800(FI)
	検出器電圧(EI)	2300 V
	設定質量分解能	10000
Acquisition mode	Centroid	

2-2-5 開殻フラグメンテーションルール^{4,7)}

プリカーサーイオンがホモリティック開裂を起こしたとき、共有結合を形成する電子対が1つずつ、イオンおよび脱離種に分配される。このときラジカルイオンが生成するが、ラジカルイオンのフラグメンテーション反応解析に対しては開殻 GFR を用いる。代表的な開殻 GFR の一覧を図 5-2 に示すとともに、各ルールの概要を以下に述べる。

(1) Radical-site initiation (α 開裂)

Radical-site initiation は α 開裂ともよばれ、本論文においては α 開裂と称する。代表的な開殻 GFR であり、不対電子と α 結合の1つの電子が新たに電子対を形成して結合が生成するため。よって α 結合はヘテロリティック開裂を起こし、中性ラジカル種が脱離する。また、チャージサイトとラジカルが異なる原子上に位置している（このようなイオンをディストニックイオンと称する）状態であっても、 α 開裂は進行する。反応の前後でチャージサイトは変化せず、ラジカルを保有する原子または原子団に依存して反応進行の程度が変化し、 $N > S$ 、アルキル基、 O 、 π 結合 $> Cl, Br > H$ の順で優先的に起こる。

(2) H rearrangement receptor site unsaturated in ring (McLafferty 転位)

H rearrangement receptor site unsaturated in ring は McLafferty 転位ともよばれ、この反応も代表的な GFR である。McLafferty 転位は、ラジカルカチオンを保有する原子を基準として4位または6位に位置する水素を転位させる。このとき、チャージサイトの原子はヘテロ原子でなければならず、また α 解列とは違い、ディストニックイオンでは反応が進行しない。水素が転位する際の間体として4または6員環を仮定するとき、チャージサイトの原子は π 結合を有する必要がある。

(3) H rearrangement saturated receptor site

H rearrangement saturated receptor site は、転位する水素とチャージサイトが飽和結合上に存在しているときに起こりうる反応である。McLafferty 転位と同じく水素転位反応であるが、H rearrangement saturated receptor site の場合は、ディストニックイオンでも反応は起こりうる。また、仮定する環状構造はフラグメンテーション後の系（生成系）がフラグメンテーション前の系（始原系）よりも安定であれば、この反応は進行する。

(4) 2H rearrangement: Displacement (ラジカル置換反応)

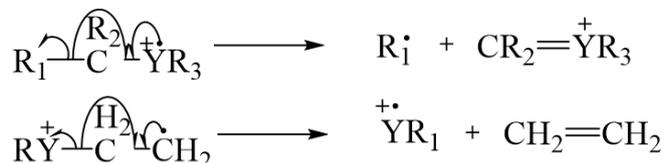
2H rearrangement: Displacement はラジカル置換反応とよばれ、ラジカルとヘテロリティック開裂により生じた不対電子が新たな結合を形成し、中性ラジカル種が脱離する反応である。この反応は、開裂する結合とチャージサイトが飽和構造上に存在していなければならない。開裂位置は系の安定性によって決まる。また、チャージサイトはラジカルカチオンであり、ヘテロ原子上に存在していなければならない。

(5) Charge-site initiation (Inductive cleavage)

Charge-site initiation は、チャージサイトの隣の結合で起きるホモリティック開裂のことである。Charge-site initiation による Inductive cleavage は、ハロゲン元素 >O、S ≫ N、C の順に開裂が起こりやすい。これは電気陰性度の高い順になっており、すなわち誘起効果の起こしやすさが本反応の進行の上で重要となる。また例外として、ニュートラルロスがラジカルであるため、系全体の安定性に着目した際に反応前よりも反応後が安定であれば、チャージサイトの隣ではなく、α 結合がホモリティック開裂する場合がある。α 位で開裂する場合、これはホモリティック開裂であるため、α 開裂とは異なる点に注意しなければならない。

Radical-site initiation (alpha cleavage)

Saturated site



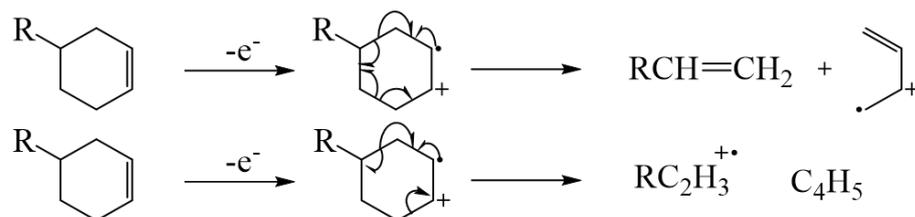
Unsaturated heteroatoms



Alkene (allylic cleavage)



Retro-Diels-Alder (double α-cleavage)



Sigma electron ionization

Alkanes



Low IE elements



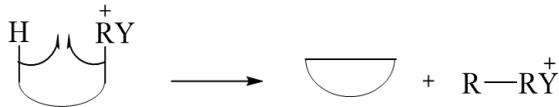
図 5-2 開殻フラグメンテーションルール^{4,7)}

Charge-site initiation (inductive effect)

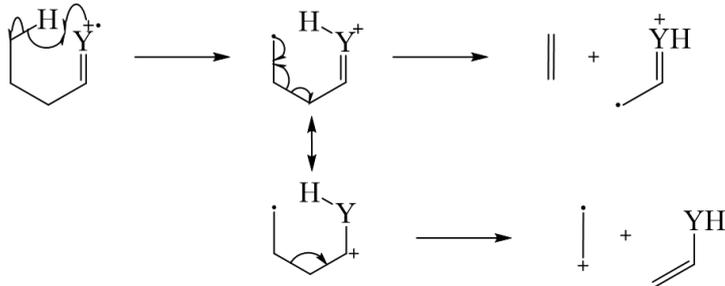


Rearrangements

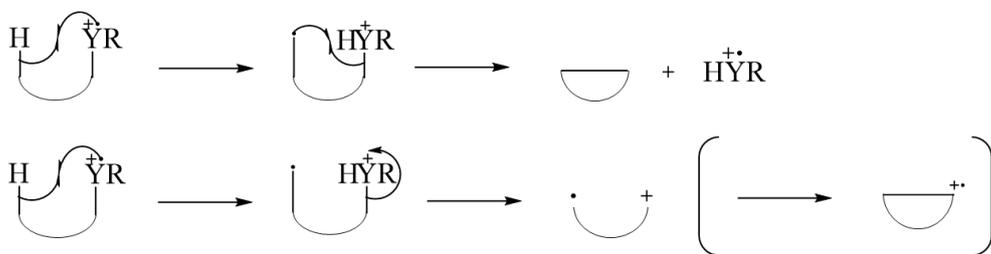
Elimination



H rearrangement, receptor site unsaturated in ring



H rearrangement, receptor site saturated in ring



2H rearrangement



Displacement

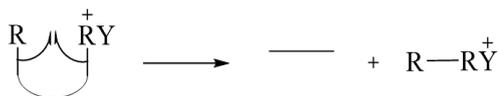


図 5-2 開殻フラグメンテーションルール (続き) 4.7)

2-2-6 電子イオン化法を用いたガスクロマトグラフィー質量分析による原因候補物質のマススペクトルの取得

前節にて特定した保持指標の値を用いて、これに相当する保持時間周辺の EI マススペクトルを取得した。EI マススペクトルには FX に由来するプロダクトイオンの他、試料中の夾雑成分や測定の際のノイズなども含まれるため、あるイオンの実測 m/z 値 $+0.005$ で EIC を描いたときに、得られたピークのピークトップが FX と一致したイオンのみをフラグメンテーションパターン解析に供した。

3.結果および考察

3-1 液体クロマトグラフィー質量分析を用いた多段階精密質量分析による原因候補物質の構造推定

3-1-1 プロダクトイオンおよびニュートラルロス

FX+DNPH の EIC は保持時間 15.7 分にピークトップを示したため、これを含む前後 4 枚のマススペクトル (15.59 分、15.65 分、15.72 分、15.78 分) で検出された全イオンの総数は 380 種であった。このうち、4 枚全てのマススペクトルで再現性良く検出され、かつ EIC のピーク形状が明瞭であったイオンのみを絞り込んだ結果、32 種のイオンが得られた。これらのイオンの精密質量から予測したプロダクトイオンの分子式と RDB 値、および FX と比較した際のニュートラルロスの組成を表 5-3 に示す。

表 5-3 多段階精密質量分析により検出された
プロダクトイオンおよびニュートラルロスの分子式

m/z	分子式 (プロダクトイオン)	RDB (プロダクトイオン)	分子式 (ニュートラルロス)
122.0250	C6 H4 O2 N	5.5	C13 H19 O4 N3
138.0199	C6 H4 O3 N	5.5	C13 H19 O3 N3
151.0278	C7 H5 O3 N	6.0	C12 H18 O3 N3
152.0229	C6 H4 O3 N2	6.0	C13 H19 O3 N2
153.0307	C6 H5 O3 N2	5.5	C13 H18 O3 N2
164.0230	C7 H4 O3 N2	7.0	C12 H19 O3 N2
166.0259	C6 H4 O3 N3	6.5	C13 H19 O3 N
167.0100	C6 H3 O4 N2	6.5	C13 H20 O2 N2
168.0178	C6 H4 O4 N2	6.0	C13 H19 O2 N2
176.0467	C8 H6 O2 N3	7.5	C11 H17 O2 N
177.0307	C8 H5 O3 N2	7.5	C11 H18 O3 N2
179.0100	C7 H3 O4 N2	7.5	C16 H20 O2 N2
179.0212	C6 H3 O3 N4	7.5	C13 H20 O3
181.0131	C6 H3 O4 N3	7.0	C13 H20 O2 N
182.0209	C6 H4 O4 N3	6.5	C13 H19 O2 N
183.0049	C6 H3 O5 N2	6.5	C13 H20 O N2
192.0304	C9 H6 O4 N	7.5	C10 H15 O2 N3
214.0621	C11 H8 O2 N3	9.5	C8 H15 O4 N
218.0572	C10 H8 O3 N3	8.5	C9 H15 O3 N
243.0524	C11 H7 O3 N4	10.5	C8 H16 O3
272.1041	C14 H14 O3 N3	9.5	C5 H9 O3 N
283.0837	C14 H11 O3 N4	11.5	C5 H12 O3
303.1351	C16 H19 O4 N2	8.5	C3 H4 O2 N2
304.1428	C16 H20 O4 N2	8.0	C3 H3 O2 N2
316.1302	C16 H18 O4 N3	9.5	C3 H5 O2 N
325.1193	C18 H17 O4 N2	11.5	C H6 O2 N2 H3 O3 N
338.1510	C19 H20 O3 N3	11.5	(H2O+HNO2)

340.1304	C18 H18 O4 N3	11.5	C H5 O2 N (NO+CH5O)
356.1617	C19 H22 O4 N3	10.5	HNO2
358.1409	C18 H20 O5 N3	10.5	CH3ON
359.1361	C17 H19 O5 N4	10.5	C2 H4 O
385.1519	C19 H21 O5 N4	11.5	H2O

3-1-2 閉殻フラグメンテーション経路および原因候補物質の部分構造

表 5-2 に示したプロダクトイオンまたはニュートラルロスは、分子式が大きいため構造を一意に決定できないものが大半を占めたが、構造推定につながるニュートラルロスとして C_2H_2O 、 C_2H_4O 、 C_3H_6O に着目し、それぞれのフラグメンテーション経路を図 5-3 のように推定した。

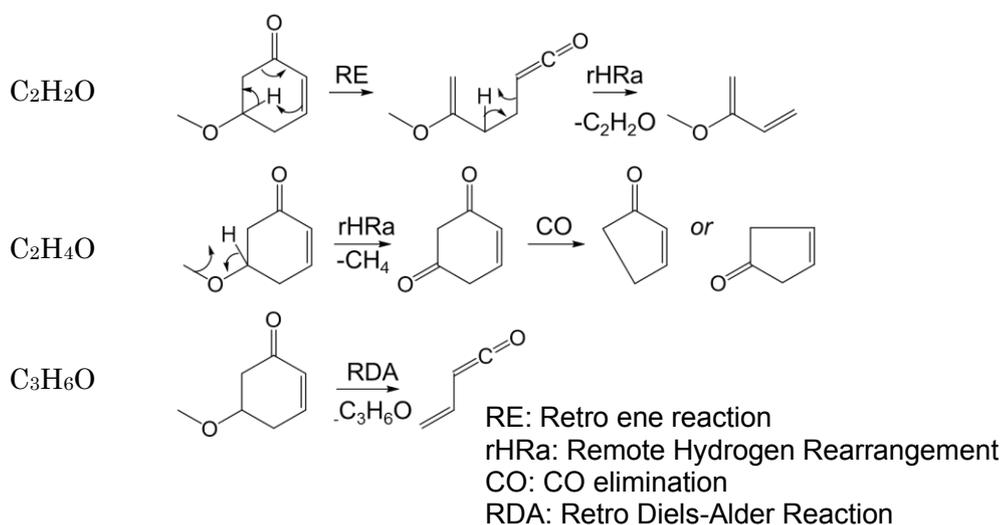


図 5-3 ニュートラルロス 3 種に対する閉殻 GFR による構造推定

C_2H_2O については、不飽和結合を有する六員環ケトンがまず逆エン反応 (RE) によって開環し、次にホルムアルデヒドが脱離したものと予想した³⁾。 C_2H_4O については、同じく不飽和結合を有する六員環ケトンが側鎖としてメトキシ基を有する構造を仮定し、遠隔水素転位反応 (rHRa) によるメタン脱離および環状ケトンからの CO 脱離が連続的に起こった結果として、2 段階の反応で生じたニュートラルロスの合計が C_2H_4O であると予想した³⁾。ただし必ずしも図 5-3 に示した順番ではなく、先に CO 脱離が起こってからメタンが脱離することも想定される。 C_3H_6O については、メトキシ基を有するシクロヘキセンから逆ディールズアルダー反応 (RDA) によってメトキシ基が脱離したものと想定した³⁾。これらの構造推定の結果を総合して、FX はメトキシシクロヘキセノン構造を有することが示唆された。

その他、フラグメンテーション経路が想定可能であったニュートラルロスとして HNO_2

があるが、これは DNPH のニトロ基が遠隔水素転位反応によって亜硝酸として脱離したと予想された³⁾。しかしこれは FX の構造についてなんら情報を与えないため、それ以上の検討は行わなかった。また H₂O ロスはヒドロキシ基を有する化合物において頻繁に観察されるフラグメンテーションパターンであるが、FX の部分構造として 2 か所のカルボニル基およびメトキシ基を既に仮定しているため、FX の分子式 C₁₃H₂₀O₃ に鑑みると、ヒドロキシ基を仮定することは不可能である。これを踏まえ H₂O ロスは FX 分子由来ではなく DNPH 由来であると予想し、LC-MS/MS データの実測データベースを用いて類似のフラグメンテーションパターンを検索した結果、同じく 1-(2,4-dinitrophenyl)-azepane において H₂O ロスが観察されていることが確認された。これは DNPH 誘導体の一種であり、ニトロ基の他には酸素原子を有しないことから、この物質における H₂O ロスは DNPH 部位のニトロ基から生成した可能性が高い⁸⁾。FX の DNPH 誘導体についても同様の反応が起こって H₂O ロスが生成したと考えられるが、具体的なフラグメンテーション反応機構は不明である。

3-2 ガスクロマトグラフィー質量分析による原因候補物質の構造推定

3-2-1 原因候補物質の保持指標値

FX がイオン化によってラジカルカチオン C₁₃H₂₀O₃⁺ となった際の *m/z* を 224.1407 と算定し、0.005 の質量誤差を許容して EIC を描いたところ、図 5-4 のように明瞭なピークが確認された（同一の分析条件における直鎖アルカン類のピークを併記する）。

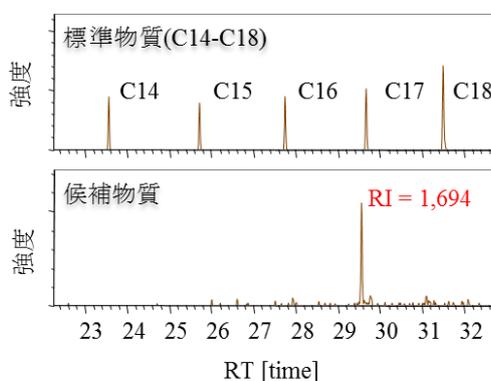


図 5-4 直鎖アルカンのピーク（上段）および FX の EIC（下段）

図 5-4 に示されているように、FX は C17 に近い保持時間で検出された。本実験は昇温分析であるため、2-2-3 節の式に従って RI 値を算出した結果、1,694 となった。

3-2-2 プロダクトイオンおよびニュートラルロス

FI 法により FX の RI を特定できたため、EI でもこの RI に相当する時間帯のマススペクトルを取得した結果、1,000 種以上のイオンが確認された。これらのうち、2-2-5 節に示し

た条件を満たし、さらに構造情報が得られたものは3種であった。

3-2-3 開殻フラグメンテーション経路および原因候補物質の部分構造

第3章でFXはDNPHと反応可能なホルミル基またはケトン基を最低2つ有することが明らかとなったが、この時点ではそのどちらを有するかは不明であった。そこで、官能基種別を判定するために、開殻GFRの一つである α 開裂に着目した。

α 開裂はカルボニル基に特徴的なフラグメンテーション反応であり、アルデヒドおよびケトンの場合には図5-5のような電子移動を経て、カルボニル炭素と α 炭素間の結合が開裂する⁷⁾。

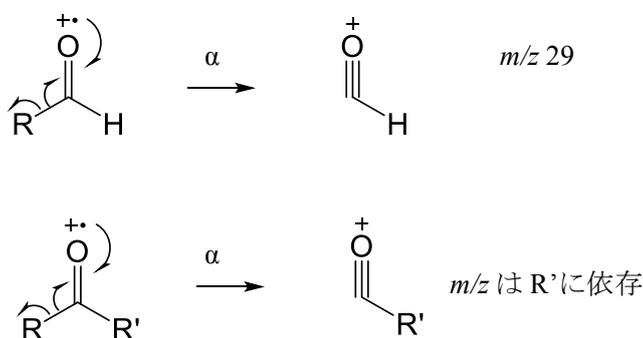


図 5-5 アルデヒドおよびケトンの α 開裂

アルデヒドの α 開裂では m/z 29が生成するのに対し、ケトンの α 開裂で生成するプロダクトイオンは側鎖の組成に依存するが、最も単純なメチル基を仮定した場合でも m/z は43となる。よって、 m/z 29が生成するかどうかで官能基種別を判定可能である。

図5-6にFXの分子イオン(m/z 224)、 m/z 29、および m/z 43のEICを示す。信号強度としては微弱であるものの、検出器電圧を引き上げることで保持時間33.5分にてFXの分子イオンの検出に成功した。また、この保持時間をRIに換算した値は1,692であり、FI法で測定した際のRIとよく一致した。FI法とは異なる分析条件を用いたため、保持時間は異なっているが、RIは一致した。

一方で、 m/z 29のEICは明瞭なピークを示さず、ノイズであると判断した。これにより、FXはホルミル基を有しておらず、2か所のカルボニル基はいずれもケトン基であると予想された。

末端ケトンから生成可能 m/z 43のEICははっきりとしたピークを示し、ピークトップはFXの分子イオンのピークトップと一致した。このことより、 m/z 43はFXから生じたプロダクトイオンであり、FXは分子内に末端ケトンをもっていると示唆された。

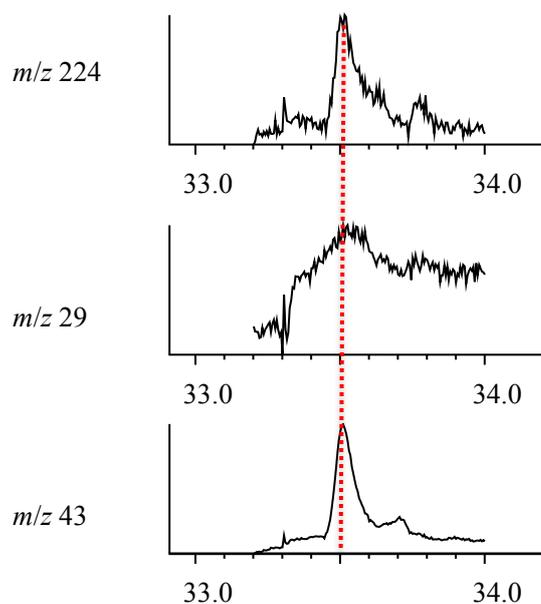


図 5-6 FX の分子イオン、 m/z 29、 m/z 43 の検出状況

次に、より詳細な構造推定を目的として m/z 193, 85, 57 のイオンに着目した。これら 3 種のイオンについても、 m/z 29 や m/z 43 と同様に、EIC を描いて FX のプロダクトイオンである可能性が高いことを確認した。 m/z 193 は、FX の分子イオンからのメトキシ基の脱離によって生成し、これに関与しているのは単純誘起開裂であると仮定した。また、側鎖の炭素数が 3 または 4 のアルキルケトンがフラグメンテーションを起こした場合、まず m/z 85 が生成し、次いで単純誘起開裂によって m/z 57 が生成すると予想した。炭素数が 5 以上の場合については、LC-MS/MS による構造推定で示唆されたメトキシシクロヘキセノンも併せて考慮すると FX の推定分子式と矛盾してしまうため、本研究においては検討から除外した。 m/z 85 を生成するフラグメンテーション経路は仮定する全体構造によって変化するが、一例として図 5-7 のような一連の反応が考えられる。

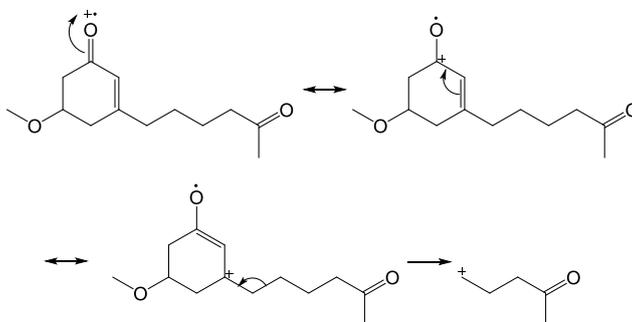


図 5-7 m/z 85 のプロダクトイオンの生成機構例

上記の結果より、開殻 GFR に基づく構造推定の結果、FX はメトキシ基およびプロピル基またはブチル基を側鎖として有する末端ケトンを含むと示唆された。

3-3 閉殻フラグメンテーションルールおよび開殻フラグメンテーションルールに基づく構造推定結果の比較

LC-MS/MS および GC/MS によって得られた構造推定結果を、表 5-4 に総括した。

表 5-4 開殻 GFR および閉殻 GFR による構造推定結果の比較検討

LC-MS/MS		GC-MS	
ニュートラルロス	推定部分構造	プロダクトイオン	推定部分構造
C ₂ H ₂ O	シクロヘキセノン	57	末端ケトン
C ₂ H ₄ O	メトキシ基、環状ケトン	85	末端ケトン
C ₃ H ₆ O	メトキシシクロヘキセン	193	メトキシ基

双方の構造推定では、メトキシ基の存在がともに示唆された。また、LC-MS/MS ではシクロヘキセンの存在が示唆されたが、GC/MS ではこれに相当するプロダクトイオンは確認されなかった。対照的に、GC/MS では末端アルキルケトンの存在が示唆されたが、LC-MS/MS ではこれに相当するニュートラルロスやプロダクトイオンは観察されなかった。また、両者の構造推定結果を比較した際、互いに矛盾しないことがわかる。

以上の結果を踏まえ、FX の全体構造を以下の 14 種のうちいずれかであると推定した。

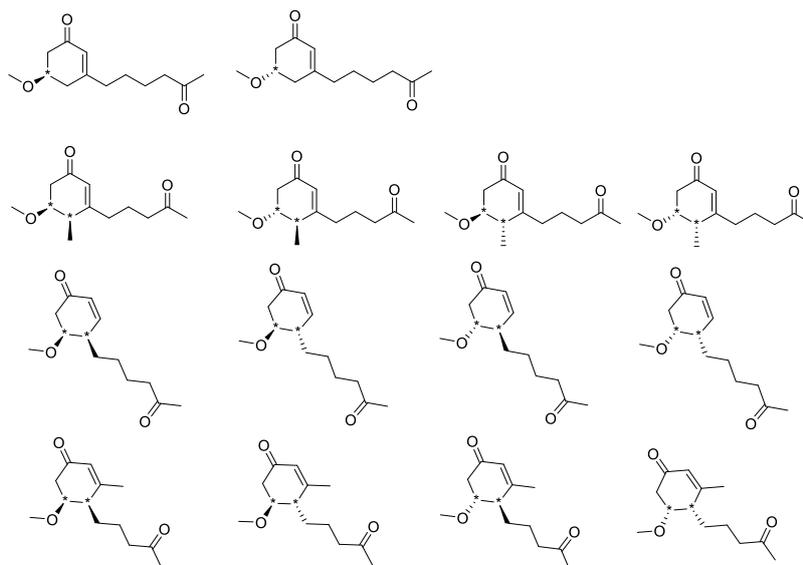


図 5-8 推定される FX の全体構造 14 種 (*印は不斉炭素を表す)

図 5-8 に示した全体構造を得る過程で、官能基どうしの位置関係を考慮した。例として、逆エン反応および遠隔水素転位反応により C_2H_2O を生成するためには、シクロヘキサノンの 2 位の炭素（シクロヘキサノン中の 2 つの sp^2 炭素のうち、カルボニル基に近い炭素）は側鎖を有してはならない。よって、図 5-9a のような構造は矛盾する。同様に、逆ディールズアルダー反応により C_3H_6O を生成するためには、シクロヘキサノンの 6 位の炭素（カルボニル基に隣接する 2 つの炭素のうち、 sp^3 炭素である方）は、側鎖を有してはならない。よって、図 5-9b のような構造は矛盾する。

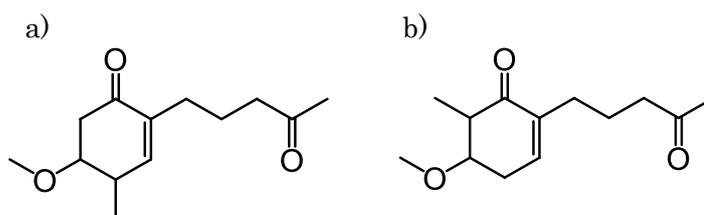


図 5-9 除外した全体構造の例

a) C_2H_2O が生成不可能な例、b) C_3H_6O が生成不可能な例

また m/z 85 および m/z 57 の生成については、図 5-7 に示したようなアルキルケトンの主鎖の炭素数が 6 である構造のほか、5 のものについても、上述の GFR に矛盾せずに全体構造を仮定できる。この際の余剰の炭素（メチル基）は、図 5-8 の 2 段目および 4 段目のように、シクロヘキサノンの側鎖であると仮定できる。

ただし、アルキル鎖内で分枝するものについては除外した。例として図 5-10 a) のような構造から図 5-7 と同様の電子移動が起こると、生成するプロダクトイオンは m/z 71 となり、矛盾する。また図 5-10 b) のような構造の場合、 m/z 85 を生成可能であるものの、正電荷が炭素鎖の端に位置しないので、単純誘起開裂によって生成するプロダクトイオンは m/z 57 ではなく m/z 43 となり矛盾する。図 5-10 c) も同様である。 m/z 85 は炭素数 5 のプロダクトイオンであるため、アルキルケトンの主鎖炭素数が 4 以下のものについては除外した。

さらに、FX が臭気物質であることを考慮すると、分子内の不斉炭素に着目し、光学異性体を区別することが必要と予想される。光学異性の差はにおいの感じ方に大きく関与する場合があり、著名な例としてはリモネンが挙げられる。同物質は柑橘類の皮などに多く含まれ、D 体および L 体が光学異性体として存在する（図 5-11）が、前者がオレンジ臭、レモン臭を呈するのに対して、後者はペパーミント臭、およびテルペン油様の臭気を呈する^{9,10}。このように検討した結果、最終的に得られた候補構造は図 5-8 の 14 種となった。

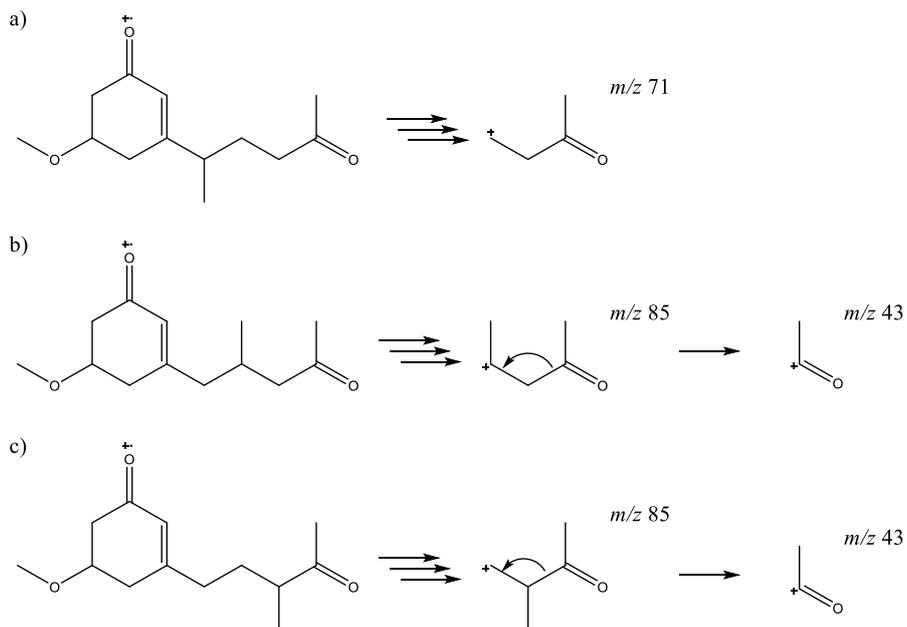


図 5-10 アルキルケトンの分枝の検討

a) m/z 85 を生成しないため不適、b) c) m/z 57 を生成しないため不適

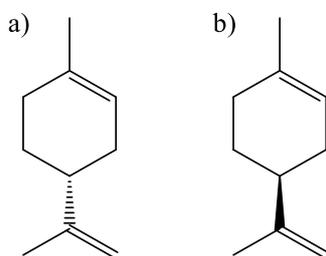


図 5-11 リモネンの光学異性体

a) D-リモネン (オレンジ/レモン臭)、b) L-リモネン (ペパーミント/テルペン油臭)

4. 本章のまとめ

本研究では、LC-MS/MS（閉殻 GFR）および GC/MS（開殻 GFR）を併用して、観察されたフラグメンテーションパターンに基づく FX の構造推定を試みた。その結果、LC-MS/MS 分析では 4 種のニュートラルロスが観察され、メトキシシクロヘキサノン構造を有すると予想された。また GC/MS 分析では 3 種のニュートラルロスに着目した結果、メトキシ基と末端アルキルケトンを有すると予想された。これらの部分的な構造情報、および FX の分子式に鑑みて、予想される FX の全体構造 14 種が得られた。

本章の引用文献

- 1) Ming Qian, Shuo Yang, Hong Wu, Papiya Majumdar, Nathan Leigh, and Rainer Glaser. Ammonia Elimination from Protonated Nucleobases and Related Synthetic Substrates. *J Am Soc Mass Spectrom*, **18**, 2040–2057, 2007, doi:10.1016/j.jasms.2007.08.018
- 2) Jurgen H Gross 著 日本質量分析学会出版委員会訳 マススペクトロメトリー
- 3) Demarque DP, Crotti AEM, Vessecchi R, Lopes JLC, Lopes NP: 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, 2016.
- 4) 大葉佐世子: 殺虫剤環境変化体の活性推定と一斉分析方法の開発. 鹿児島大学大学院理工学研究科博士論文, 2019.
- 5) 有機溶剤 61 成分の分析及び保持指標-カラム間の比較-
(<https://www.gls.co.jp/viewfile/?p=GT076>) (2021 年 10 月現在)
- 6) NIST Chemistry WebBook (<https://webbook.nist.gov/chemistry/>)
- 7) McLafferty FW, Turecek F: Interpretation of Mass Spectra. 4th edition. University Science Books, Sausalito, 1993.
- 8) mzCloud DataViewer
([https://www.mzcloud.org/DataViewer#/Main/reference\\$7129/T11270%23Standard/Recalibrated/2621050](https://www.mzcloud.org/DataViewer#/Main/reference$7129/T11270%23Standard/Recalibrated/2621050))
- 9) 香りについて (<http://web.tuat.ac.jp/~oginolab/japanese/essay/20191103/20191103.html>) (2021 年 12 月現在)
- 10) 食環境におけるキラリティー
(https://www3.chubu.ac.jp/faculty/yamamoto_atsushi/column/chirality/) (2021 年 12 月現在)

第 6 章 本研究の今後の展望

1. 密度汎関数理論を用いた量子化学計算による構造推定

前節にて示した GFR による部分構造の推定は、構造推定の第一段階としては有用であるものの、経験則として確立されてきた側面も大きく、精製するプロダクトイオンやニュートラルロスのエネルギー的な安定性、フラグメンテーション反応の活性化エネルギーなどが考慮されていない場合も多い。そこでフラグメンテーションルールにより理論的な支持を与え、かつ構造推定の精度を向上させるために、DFT によるフラグメンテーション反応の検討を実施中である。

GFR から予想される始原系（結合開裂前の分析種）および生成系（結合が開裂して生成したイオンとニュートラルロスの複合体）から、QST2 計算によって反応の遷移状態（Transition State, TS）に相当する活性錯体を探索し、次に活性錯体に対して固有反応座標（Intrinsic Reaction Coordinate, IRC）計算を実施する。IRC によって得られた始原系、TS、生成系が反応経路上で滑らかにつながることを確認できれば、その反応は理論的に進行可能であることを確認できる。反応経路は、任意の個数の“beads”と呼ばれる単位に分割し、一般には 15 程度の beads が用いられるが、より厳密に反応経路を議論する場合にはより多数の beads を用いることが有効である。

2. 分取高速液体クロマトグラフィーおよび核磁気共鳴分光法による構造推定

GFR による構造推定および DFT による構造推定の併用によって FX の全体構造をさらに絞り込んだ後に、推定した全体構造の妥当性を確認するために、NMR による FX の分析に向けて現在実験を行っている。NMR で分析可能な試料純度および試料量を確保するために、水道原水試料量を大量に採取し、分取 HPLC を用いて精製を行う。この時、FX が揮発性物質であることに鑑みて、DNPH 誘導体化によって不揮発化した後に分取生成を行う。現時点での予備検討の結果、FX の単離精製には成功しているものの、回収量が不十分であり、解析可能な NMR スペクトルを得られていない。今後は引き続き水道原水試料の分取生成を行い、十分量の FX を回収次第、再度 NMR にて分析予定である。

3. 原因物質自動検出システムの構築および全国各地の水道事業体における原因候補物質の存在実態調査

本研究での検討によって FX が生ぐさ臭惹起に寄与している可能性が示唆されたものの、現時点で水道原水試料として用いたのは関西地方の 1 箇所の採水地点から採取した試料のみであり、FX が全国各地の水道水源に存在するか、また FX が生ぐさ臭惹起に有意な寄与を示しているかどうかは、現時点では不明瞭である。

そこで各地の水道事業体の協力を仰ぎ、FX の存在実態を解明することを検討している。これを達成するために、オンライン上で利用可能な化学物質の自動検出システムを構築済みであり、現在試験的に運用している段階にある。本システム上には FX の EI マススペク

トルも収録されている。各地の水道事業者の水質試験結果（GC/MS分析で得られたEIマススペクトル）を、システム上のFXのEIマススペクトルとマッチングすることで、FXの検出を確認できる仕組みとなっている。FXの存在実態が解明されれば、FXおよび生ぐさ臭の発生メカニズムがより詳細に理解されるものと期待される。

第7章 総括

本論文は、水道水生ぐさ臭の原因物質が十分に解明されていない実態に鑑み、これを探索し、かつその構造の部分的な推定を試みたものである。

第1章では、日本の上水道における生物障害、特に異臭味被害の発生状況と、これらを管理するための水道法などの法体系を整理した。その結果、異臭味被害は閉鎖性水域における藻類の増殖が主原因となって引き起こされること、中でも生ぐさ臭は被害件数が多いにもかかわらず十分に実態が解明されていないこと、それゆえに基準項目化されるにいたっていないことなどを述べた。また、本研究で用いた解析手法である多変量解析（主成分分析、重回帰分析、部分最小二乗回帰分析）および GFR に基づく未知物質の構造推定について、その概略を整理した。

第2章では、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン（DNPH）により誘導体化した試料を想定した選択的な精製方法の開発を行った。その結果、弱陽イオン交換カラムを用いる固相抽出法によって、未反応 DNPH のみを除去しつつ DNPH 誘導体を回収可能な選択的精製方法を見出した。また、弱陽イオン交換カラムが選択的精製をもたらす機構を考察するために、DFT を用いる量子化学計算によって、精製のメカニズムを検討した。これにより、固相と DNPH 誘導体の複合体は、固相と未反応 DNPH の複合体と比較した際に約 11 kJ/mol だけエネルギー的に安定であること、および精製には互いのフェニル基の π - π スタッキングが寄与している可能性が示唆された。

第3章では、高分解能 LC/MS および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を実施した。既往研究から生ぐさ臭原因物質はアルデヒド類またはケトン類であることが予想されたため、はじめに DNPH により誘導体化した臭気強度の異なる複数の水道原水試料、および *Uroglena americana* 培養液試料を高分解能 LC/MS により分析し、得られたデータに対して差異解析および PLS 回帰分析を適用して、原因物質候補を抽出した。PLS 回帰分析においては、回帰モデルの精度向上を目的として、モデル構築に使用する変数の取捨選択（iOPLS 回帰分析）を実施した。次に、精密質量解析および天然同位体パターン解析によって、FX の分子式を $C_{13}H_{20}O_3$ と推定した。

第4章では、におい嗅ぎ GC を用いて FX の臭気の有無を確認した。初めに、高分解能 GC-APCI-MS を用いて水道原水試料および *Uroglena americana* 培養液試料を分析し、FX の分子量関連イオンの検出に成功した。次に、特定した保持時間の周辺で溶出する成分の臭気を確認するため、3名の異なるパネラーによるにおい嗅ぎ GC 分析を実施した結果、FX は有臭成分であることが示唆された。

第5章では、高分解能 LC-MS/MS および高分解能 GC-EI/FI-TOFMS を用いる FX の部分的な構造推定を実施した。閉殻 GFR および開殻 GFR によって FX のフラグメンテーションパターンを解析した結果、FX はメトキシクロヘキセノンおよび末端アルキルケトンを含むことが示唆された。この結果に基づき、FX の全体構造として推定されるものを 14 種にまで絞り込んだ。ただし GFR は経験則的な側面も大きいほか、官能基の位置のみが異なる

る位置異性体に対しては、その効果は限定的である。今後は第 6 章で述べた方法を用いて、FX の構造確定に取り組む。

謝辞

本論文の執筆にあたり、多くの方々からのご助言・ご支援を賜りました。この場をお借りして、御礼申し上げます。

鹿児島大学理工学研究科准教授、高梨啓和先生には、本論文の主査をご快諾いただいたほか、研究上のディスカッションにも丁寧に対応してくださいました。私が研究者として未熟であったにも関わらず、在籍期間中に学会発表や論文投稿など様々な経験を積むことができたのは、ひとえに先生の綿密なご指導の賜物です。また、研究面のみならず、修了後のキャリアについてもご高配にあずかりました。私の鹿児島大学での研究生活は、高梨先生のご指導無くしてはあり得なかったものであり、本学位論文を執筆できたことは私にとっても望外の喜びに存じます。

鹿児島大学理工学研究科准教授、中島常憲先生には、本論文の副査をご快諾いただきました。まだ私が修士課程に在籍していた際、とある学会の懇親会の席で、中島先生から博士後期課程への進学を応援するお言葉を頂戴しました。中島先生にとっては何気ない一言だったと存じますが、これは今でもはっきりと私の記憶に残っており、進学を決意する際の後押しとなりました。厚く御礼申し上げます。

鹿児島大学理工学研究科准教授、金子芳郎先生には、本論文の副査をご快諾いただきました。有機-無機ハイブリッド合成という独自性の高い分野をご専門とされている金子先生のご助言は、環境化学とは異なる視点から私の研究に切り込むものであり、本論文の学術性を高める上で大いに役立ちました。

環境化学研究室の大葉佐世子氏、橋本扶美氏、中村友拓氏、桐原晃希氏、山下優輝氏からは、実験遂行の際に多くのご助言・ご協力を賜りました。本研究室での研究活動は決して平坦なものではありませんでしたが、同じ学生という立場で同氏らと交わした忌憚のないやり取りが私にとっての力添えとなり、本論文を完成させるに至りました。

最後に、私の学位取得を陰ながら応援してくれた家族に感謝します。日本においては博士後期課程への進学率は極めて低い水準にある事実を踏まえると、私が進学を選択したことは、家族の目には奇異なものとして映ったかもしれません。あるいは、私の将来について不安を抱かせたかもしれません。しかしながら私の選択を少しも否定することなく、そればかりか現在に至るまで多くの応援のお言葉を頂戴しました。これは私にとって何事にも代えがたい喜びです。

とくに両親には、27年という長い時間、大きな苦勞をかけてしまいました。依然として未熟な一人息子ではありますが、ようやく自立できそうです。二人の愛情に少しでも報いるべく、今後の人生を歩んでまいります。

2022年3月 新福 優太