

[ノート]

水中ミクロキスチン類の固相抽出-LC/MS 法による 高感度分析法の開発

川元 達彦* 山崎 富夫 矢野 美穂 前田 絵理 三橋 隆夫

Development of a Highly Sensitive Method for Analysis of Microcystins in Water by Solid Phase Extraction and LC/MS Methods

Tatsuhiko KAWAMOTO*, Tomio YAMASAKI, Miho YANO

Eri MAEDA and Takao MITSUHASHI

Life Science Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

We have established a highly sensitive method for analyzing the concentration of Microcystin-RR, Microcystin-YR and Microcystins-LR in water by solid phase extraction and LC/MS methods. In order to evaluate the analytical method, we conducted recovery experiments from distilled water, tap water and river water samples using a PS-2 column. The recovery rate were greater than 80% and the coefficient of variance were under 10%. The determination limits by this method were 0.01 μ g/L for Microcystin-RR, 0.02 μ g/L for Microcystin-YR, 0.01 μ g/L for Microcystin-LR, respectively. Furthermore, we conducted a water-quality test using this method for 30 water samples collected from 15 monitoring points in the Hyogo Prefecture. The results indicated that the concentrations of Microcystin-RR, Microcystin-YR and Microcystins-LR are over a range from N.D. to trace, N.D. to trace, 0.08 to 0.18 μ g/L, respectively.

I はじめに

アオコの原因となっている藍藻類のミクロキスティス属には、肝臓ガンのプロモーターとなる藍藻毒（アオコ毒）ミクロキスチンを産生する種が含まれている。

ミクロキスチンの毒性の強さ（LD₅₀）は、50 μ g/kg（青酸カリの200倍毒性が強い）であり、肝臓ガンの発ガン促進作用があることが報告されている¹⁾。また、1996年、ブラジルでは、透析に用いた水にミクロキスチンが混入し、131名の透析患者のうち100名以上に肝臓障害などの症状が現れ、52名の死亡が報告されている²⁾。

ミクロキスチンは、グルタミン酸、アラニン、Adda（3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-deca-4,6-die noic acid）等、計7個のアミノ酸からなる環状ペプチドであることが知られている。7個のアミノ酸のうち、側鎖の官能基のX、Yの位置に入るアミノ酸の種類（アルギニン等）の違いによってミクロキスチンのタイプは分類されている（Fig.1）。また、このタイプの違いによって毒性が異なることも明らかにされており、非常に強い急性毒性や肝障害、変異原性等の慢性的な毒性についても報告例がある³⁾。現在、日本の水道基準（要検討項目）は、最も毒性の強いミクロキスチン-LRとして、目標値（暫定）0.8 μ g/L以下が設定されており、厳しい基準となっている⁴⁾。

近年、高速液体クロマトグラフ（HPLC）を用いたミクロキスチンの測定法が頻用されるようになったことから、いくつかの水域でミクロキスチンの測定結果が報告

健康科学部

*別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29
兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター
健康科学部 川元 達彦

されている。Kaya らの報告⁵⁾では、霞ヶ浦、津久井湖、諏訪湖で発生したマイクロシスティスの一部から、3~4 種類のマイクロシスチンが検出されており、主にマイクロシスチン-RR, YR および LR であった。

マイクロシスチンの簡易な分析法として、紫外 (UV) 検出器を用いた HPLC による分析が行われてきた⁶⁾。しかし、この方法では様々な不純物が含まれる原水の測定時に、試料濃縮後に目的成分の検出を妨害するピークが出現する場合⁶⁾があり、前処理時にクリーンアップ等の操作が必要である。

本研究では、水中マイクロシスチン類の抽出・精製操作 (前処理) として固相抽出法を採用し、また選択性に優れた高速液体クロマトグラフ - 質量分析計 (LC/MS) を適用した微量分別定量法を開発した。また、兵庫県における水道水の安全確保対策に資するため、本分析法を用いて兵庫県水道水質管理計画⁷⁾に基づいた監視地点の実態調査を行ったので、併せて報告する。

II 材料と方法

1. 試薬および試料等

1) ミクロシスチン類：分析対象としたマイクロシスチン類は 3 物質で構造式を Fig. 1 に示す。標準原液として、各標準品の粉末 10.0mg (和光純薬社製, ミクロシスチン-RR, YR, LR の純度は、それぞれ 95.0%以上, 90.0%以上, 90.0%以上) をそれぞれ秤量し、メタノールで全量を 100mL とし、100mg/L 溶液を調製した後に、さらにメタノールで希釈して 10.0mg/L を調製した。この標準原液を精製水で希釈し、各実験に必要な標準溶液を調製した。

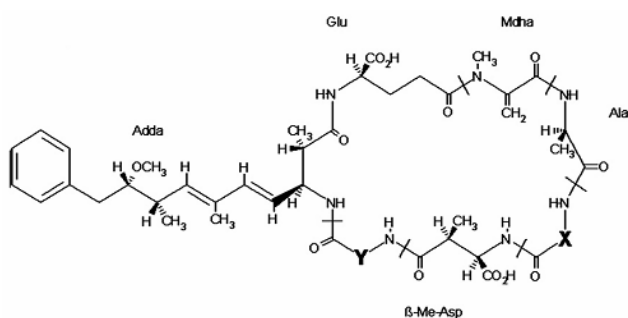


Fig.1 Chemical structure of Microcystins

Microcystin-RR (X:Arg, Y: Arg), MW=1038

Microcystin-YR (X:Tyr, Y: Arg), MW=1045

Microcystin-LR (X:Leu, Y: Arg), MW= 995

2) アスコルビン酸ナトリウム (和光純薬社製, 特級).

3) 酢酸 (和光純薬社製, LC/MS 分析用).

4) 0.05%トリフルオロ酢酸：トリフルオロ酢酸 (TFA)

(和光純薬社製, HPLC 分析用) は精製水で希釈して、0.05%TFA 水溶液を調製した。

5) 有機溶媒：メタノール (和光純薬社製) は LC/MS 分析用を用いた。その他の試薬は、すべて市販の特級品 (関東化学社製) を用いた。

6) 精製水：水道水を Auto Still (Yamato WG220) で加熱蒸留した後、Milli-Q SP TOC (Millipore 社製) で精製したものをを用いた。

7) 水道水は県立健康生活科学研究所 3 階の給水栓水より採取し、アスコルビン酸ナトリウム (水道水 1 L に 10mg 添加) で脱塩素したものを実験に供した。また、水道原水は兵庫県北部の一級河川より採取したものを実験に供した。

8) pH, 浮遊物質 (SS) および残留塩素：精製水, 水道水および水道原水 (河川水) について、上水試験方法⁸⁾に準拠して分析した。

2. 装置

マイクロシスチン類の抽出は、Vac Elut SPS 24 (Varian 社製) の抽出装置を用いた。HPLC はアジレント社製 Agilent1100 を、MS は ThermoFisher Scientific 社製の AQA を用いた。

3. 水中マイクロシスチン類の固相抽出-LC/MS 分析

水中マイクロシスチン類の固相抽出法の概略を Fig. 2 に示し、その詳細な手順を以下に示した。

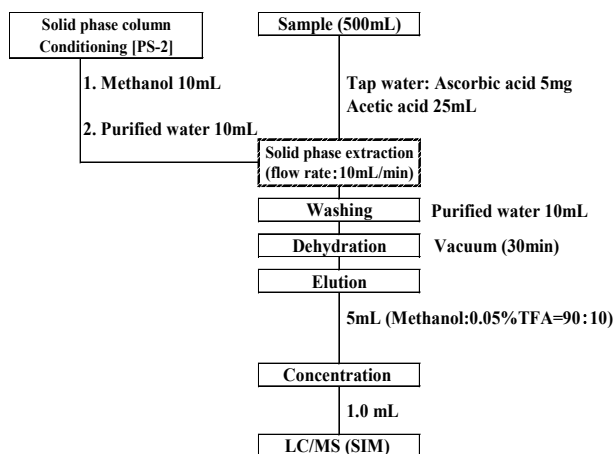


Fig. 2 Analytical procedures for Microcystins

固相抽出カラムの PS-2 (265mg, Waters 社製) は使用前に、メタノール 10mL, 精製水 10mL によりコンディショニングを実施した。そして、水試料 500mL (各マイクロシスチンとして 0.5μg/L を含むように精製水, 脱塩素した水道水, 水道水および河川水を調製) を固相抽出

出カラム (PS-2) に流速 10mL/min 以下で通水した。PS-2 カラムは窒素パージにて 30 分間乾燥させた後、メタノールと 0.05%TFA 水溶液との混合液 (それぞれ 90:10 の割合) で順方向からマイクロキシチン類を溶出させた。抽出液を窒素ガス気流下にて室温で濃縮し、正確に 1.0mL に調製したものを分析用検液とした。

LC/MS 測定条件については Table 1 に示した。

マイクロキシチン分析のための検量線作成 (濃度範囲: 0~1,000 μ g/L) 及び定量にあたっては、各マイクロキシチンに特徴的なイオン (Table 2) を選択 (Selected Ion Monitoring: SIM 法) して測定を行った。

なお、本法におけるマイクロキシチン類の添加回収実験の平均回収率と変動係数は、3 回の繰り返し実験により求めた。

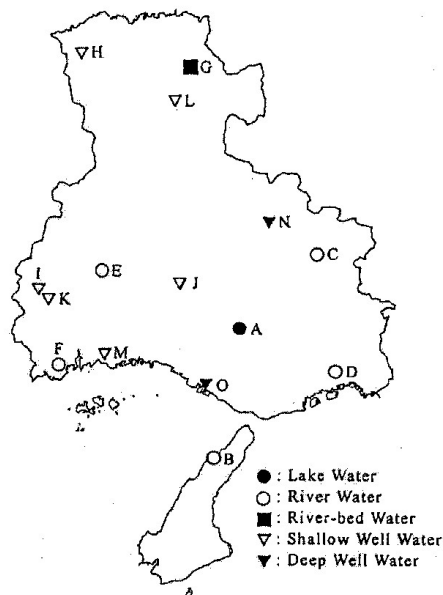


Table 1 LC/MS operation conditions

【LC】	
Instrument: Agilent 1100	
Column: Symmetry RP-18 (Waters, 2.1 x 150mm, 5.0 μ m)	
Mobile Phase: A: 0.05% TFA B: CH ₃ CN	
Isocratic: Time	A% B%
20.0	75 25
Flow rate: 0.15mL/min	
Oven temp.: 40°C	
Injection volume: 20 μ L	
Injection speed: 20 μ L/sec	
【MS】	
Instrument: Finnigan AQA	
Mass range: m/z100-1100	
Ionization ESI(+)	
Fragmentor: 120V, Nebulizer: N ₂ (50psi), Drying gas: N ₂ (10L/min, 200°C)	

Fig. 3 Location of sampling points

ンゼン-N-ビニルピロリドン重合体の HLB カラム (225mg, Waters 社製) の 2 タイプを連結し、各固相抽出カラムにおける抽出効率に関する検討を行った。精製水に各マイクロキシチン 1.0 μ g/L を添加して回収率を検討した結果、PS-2 カラムの平均回収率 (n=3) として、マイクロキシチン-RR は 96.9%, マイクロキシチン-YR は 95.8%, マイクロキシチン-LR は 95.3% であり、HLB カラムの平均回収率 (n=3) は、すべて 5.0%未滿の回収率であった。逆に、HLB カラムが上端の場合での平均回収率 (n=3) は 95.0%を下回ったことから、PS-2 カラムが適当と判断した。

4. 水道原水中のマイクロキシチン類含有量調査

兵庫県水道水質管理計画⁷⁾に基づいた水質監視地点のうち、監視 14 地点および関連 1 地点の計 15 地点 (水源種別: 湖沼水 1 地点, 河川水 5 地点, 伏流水 1 地点, 浅井戸 6 地点, 深井戸 2 地点) (Fig. 3) について、2011 年 6 月 21 日及び 10 月 18 日に採水した試料を用いた。各地点の原水 500mL を試料として、3. の方法に従ってマイクロキシチン類を固相抽出 (溶出) し、濃縮を行い、正確に 1.0mL としたものを分析用検液とした。

III 結果および考察

1. 固相抽出-LC/MS 法によるマイクロキシチン類の分析条件の検討

1) 各固相抽出カラムによる回収率の検討

今回、水中マイクロキシチン類の抽出・精製を目的とした固相カラムとして、医薬品と農薬等の抽出・精製に頻用^{9)~11)}されているスチレンジビニルベンゼン共重合体の PS-2 カラム (265mg, Waters 社製) とジビニルベ

2) 分析条件等の検討

マイクロキシチン類の高感度分析の装置として、LC/MS 法を採用した。イオン化法は ESI 法、ポジティブモードとした。マイクロキシチン-RR は定量イオンとして m/z520 を、マイクロキシチン-YR は定量イオン m/z1046 を、マイクロキシチン-LR は定量イオンを m/z996 とし、いずれも特徴的なイオンであった (Fig.4-1, Fig.4-2, Fig.4-3)。

Fig. 5 に、河川水中マイクロキシチン類の SIM クロマトグラムを例として示したが、各ピークの形状や分離は極めて良好であった。これらの 3 種類のマイクロキシチン類のクロマトグラムの結果から、これらの定量イオンはマトリックスが多い試料の場合でも、これらのイオンが定量イオンとして特に有効であることを確認できた。

また、マイクロキシチン-RR, マイクロキシチン-YR, マイクロキシチン-LR のモニターイオン, 保持時間, 検量線の直線回帰式および相関係数の分析パラメーターを Table 2 にまとめて示した。各農薬濃度とピーク面積と

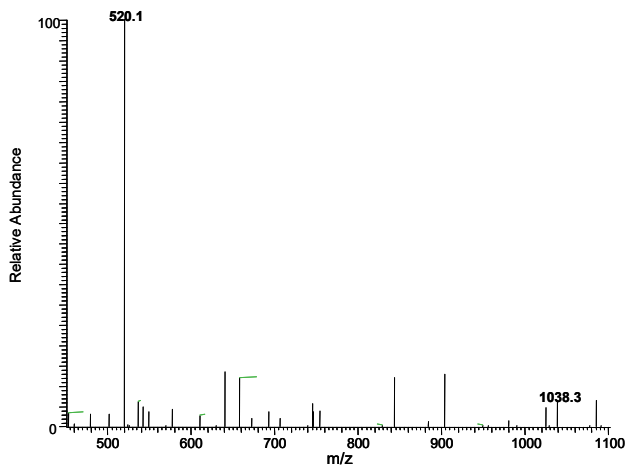


Fig.4-1 Mass spectrum of Microcystin-RR
Microcystin-RR: 1 mg/L

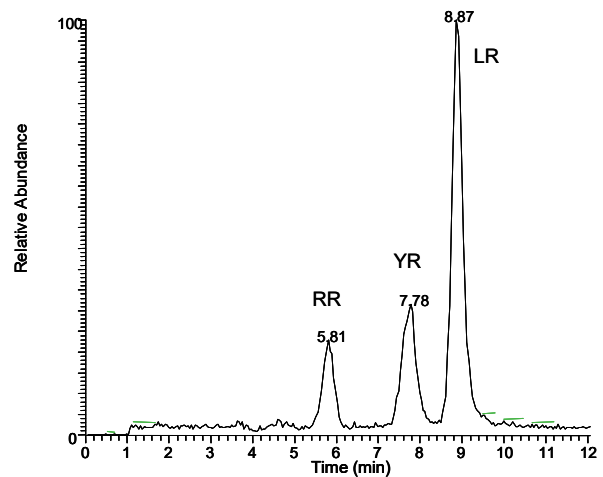


Fig. 5 LC/MS SIM chromatogram of Microcystins in river water
Spiked microcystins concentration: 0.1 mg/L

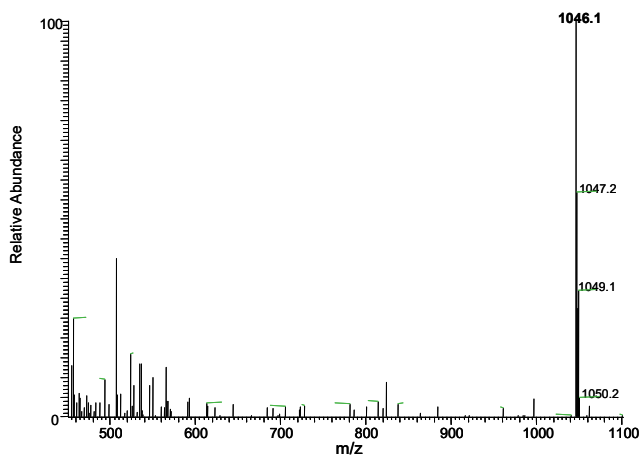


Fig.4-2 Mass spectrum of Microcystin-YR
Microcystin-YR: 1 mg/L

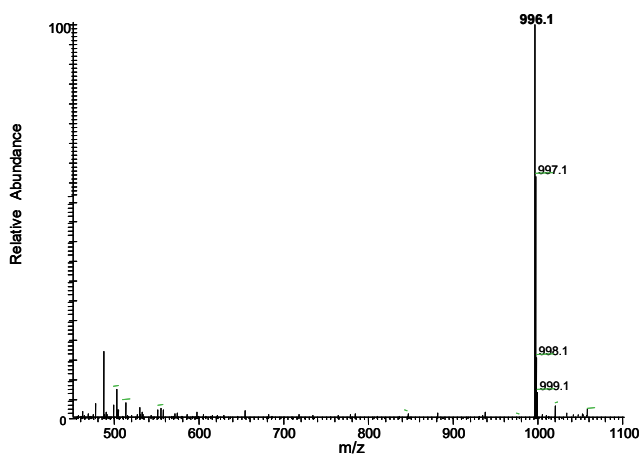


Fig.4-3 Mass spectrum of Microcystin-LR
Microcystin-LR: 1 mg/L

Table 2 Various parameters of Microcystins measurement

Chemicals	MS(m/z)	Retention time(min)	Regression curve*	Correlation coeff.
Microcystin-RR	520	5.81	Y=191.60X	0.9988
Microcystin-YR	1046	7.78	Y=152.50X	0.9989
Microcystin-LR	996	8.87	Y=370.38X	0.9994

*: Conc. 0-1000 μ g/L (6 points: 0, 5, 10, 50, 100, 1000 μ g/L)

の相関係数は 0.9988 以上と高い値を示し、濃度応答性の直線性が極めて良好であることを認めた。

以上の結果から、固相抽出-LC/MS 法がマイクロキスチン類の分析に対して有効な分析方法であることが示された。

3) 添加回収実験

固相抽出-LC/MS の一斉分析による水中マイクロキスチン類の定量性および再現性を把握するため、試料水（精製水、脱塩素した水道水、水道水および河川水）を使った場合の回収率とその変動係数を求めた。

精製水、脱塩素した水道水、水道水および河川水 500mL にマイクロキスチン標準溶液を添加した試料水（マイクロキスチン類として各 0.25 μ g を含む）を用いて、添加回収実験を行った。それらの回収率と変動係数の結果を Table 3 に示す。

精製水、脱塩素した水道水、水道水および河川水にマイクロキスチン-RR を 0.5 μ g/L 添加した時の回収率の範囲は、90.3~91.5%であり、変動係数の範囲は 2.4~3.0%であった。また、マイクロキスチン-YR を 0.5 μ g/L 添加した時の回収率の範囲は、88.6~91.2%であり、変動係数の範囲は 2.1~2.4%であった。さらに、マイクロキスチン

Table 3 Recoveries of Microcystins added to water samples

Chemicals		Distilled water	Tap water (+VC)	Tap water	Raw water
Microcystin-RR	R, %	90.3	91.5	30.1	90.5
	CV, %	2.5	2.4	4.3	3.0
Microcystin-YR	R, %	88.6	90.3	33.2	91.2
	CV, %	2.3	2.1	3.3	2.4
Microcystin-LR	R, %	88.3	89.4	32.5	89.5
	CV, %	4.3	3.5	3.9	3.9

Spiked conc.: 0.5µg/L, R: recovery, CV: coefficient of variation (n=3), VC: ascorbic acid
 Distilled water: pH: 6.8, SS<0.1mg/L, Tap water(+VC): pH: 6.8, SS<0.1mg/L
 Tap water: pH: 6.9, SS<0.1mg/L, Raw water: pH: 7.0, SS=2.5mg/L

-LR を 0.5µg/L 添加した時の回収率の範囲は、88.3～89.5%であり、変動係数の範囲は 3.5～4.3%であった。

このように、検討を行ったすべての試料水へ添加したマイクロキスチン類の回収率は 88%以上と良好であった。また、変動係数は 10%未満と良好な再現性を示した。このことから、実サンプルである水道水および河川水に含有する成分による妨害はなく、十分に定量可能であることが明らかとなった。本分析条件によるマイクロキスチン-RR, YR, LR の定量下限は、それぞれ 0.01, 0.02, 0.01µg/L (S/N=10) であった。

なお、マイクロキスチン-LR の定量下限値は目標値 0.8µg/L の 1/80 の濃度に相当し、極めて高感度な測定が可能であった。

一方、水道水中におけるマイクロキスチン類の安定性実験として、残留塩素 0.8mg/L を含有する水道水に各マイクロキスチン 0.15mg/L を添加し、0～3.0 時間の酸化分解反応を追跡調査した結果、いずれのマイクロキスチンも経時的に分解し、マイクロキスチン-RR は 1.0 時間後に 100% 分解し、マイクロキスチン-YR は 2.0 時間後に 100% 分解した。一方、マイクロキスチン-LR は 3.0 時間後に 100% 分解したが、官能基の種類により分解時間に差が認められた。

本研究結果から、マイクロキスチン類は水道水中の塩素で比較的容易に分解することが判明したが、これらマイクロキスチン類の水道水中濃度を測定する際には、脱塩素操作は不可欠であることが分かった。また、水質管理上、塩素処理の重要性も明らかとなった。

2. 水道原水中のマイクロキスチン類の調査

兵庫県下の 15 ヶ所の水道原水について、マイクロキスチン類の含有量調査を行った結果を Table 4 に示す。マイクロキスチン-RR および YR は湖沼水を除き、すべて不検出であったが、湖沼水では極めて微量検出された。一方、マイクロキスチン-LR は湖沼水のみ比較的高い濃度で、高頻度に検出 (2 検体/2 検体, 頻度 100%) され、最高値は 0.18µg/L で、目標値 0.8µg/L の 9/40 の濃度レ

Table 4 Concentration levels of Microcystins in water

Water samples	Sources					
	Microcystins-RR		Microcystins-YR		Microcystins-LR	
	Conc.(µg/L) ¹⁾	Frequency	Conc.(µg/L) ¹⁾	Frequency	Conc.(µg/L) ¹⁾	Frequency
River water	N.D.	0/10	N.D.	0/10	N.D.	0/10
Lake water	N.D., trace	0/2	N.D., trace	0/2	0.08, 0.18	2/2
River bed water	N.D.	0/2	N.D.	0/2	N.D.	0/2
Shallow well	N.D.	0/12	N.D.	0/12	N.D.	0/12
Deep well	N.D.	0/4	N.D.	0/4	N.D.	0/4
Total	N.D.(trace)	0/30	N.D.(trace)	0/30	N.D.~0.18	2/30

Sampling date: June 21, 2011 & October 18, 2011

*: Determination limit: Microcystin-RR: 0.01 µg/L, Microcystin-YR: 0.02 µg/L, Microcystin-LR: 0.01 µg/L

ベルにあった。

以上、兵庫県下の水源別の調査結果から、湖沼水でも毒性の強いマイクロキスチン-LR が比較的高濃度、高頻度に検出され、河川水、浅井戸、伏流水および深井戸では全く検出されない実態が明らかとなった。今後は、特に湖沼水の水質監視を強化する必要性が明確となった。

飲料水の安全性確保のため、今後とも行政、水道事業所、試験研究機関が一体となり、マイクロキスチン類の浄水処理過程における挙動調査など詳細な研究を進めることが必要であると考えられた。

IV 要 旨

藍藻の一種であるマイクロキスティス属は、肝臓毒を有し、非常に強い急性毒性を有するマイクロキスチンを生成することが報告されている。

水中マイクロキスチン類の固相抽出-LC/MS 法による分析条件の検討および実態調査に関する研究を行った結果、以下の知見が得られた。

1. 水中マイクロキスチン類の固相抽出カラムとして、ポリマー系の PS-2 および HLB カラムを直列に接続して検討した結果、PS-2 カラムで良好な抽出が可能であり、HLB カラムからは殆ど回収されないことが分かった。
2. さまざまな試料水 (精製水、脱塩素した水道水、水道水および河川水) を用いて、マイクロキスチン類の添加回収実験を行ったところ、回収率は 80%以上と良好な結果が得られた。また、変動係数も 10%未満と再現性の高い結果であることが認められた。これらのことから、固相抽出-LC/MS 法の有用性が示され、ここに高感度な分析法が確立された。本法によるマイクロキ

スチン-RR, YR, LR の定量下限値は, それぞれ 0.01, 0.02, 0.01 $\mu\text{g/L}$ であり, 極めて低濃度レベルまで定量可能であった. また, ミクロキスチン-LR のみ目標値 0.8 $\mu\text{g/L}$ が設定されているが, 目標値の 1/800 濃度まで高感度測定が可能であった.

3. 本法を兵庫県水道水質管理計画に基づいた監視 15 地点の水道原水中ミクロキスチン類の濃度調査に適用した結果, ミクロキスチン-RR および YR は, 河川水, 浅井戸, 伏流水および深井戸では全く検出されなかったが, 湖沼水のみでミクロキスチン-LR が最高値 0.18 $\mu\text{g/L}$ 検出され, またミクロキスチン-RR および YR は極めて微量検出された. 湖沼水では高温期にアオコの発生が認められることから, 飲料水の安全性確保のため, 継続した監視と塩素管理が重要と考えられた. 今後は, 広範囲な実態調査及び詳細な浄水処理過程における挙動調査を行うことが必要であると考えられた.

謝 辞

本稿を終えるにあたり, 試料水の採取にご協力をいただきました兵庫県健康福祉部生活衛生課, 健康福祉事務所並びに各市町水道事業所の皆様に深謝いたします.

文 献

- 1) Falconer, I.R., Buckley, T. and Runnegar, M. T. C.: Evidence of Liver Damage by Toxin from a Bloom of the Blue-green Alga, *Microcystis Aeruginosa*. *Med. J. Aust.*, **1**, 511-514 (1983)
- 2) Jochimsen, E.M., Carmichael, W.W., An. J. Cardo, D.M., Cooksen, S.T., Holmes, C.E.M., Antunes, M.B., de Melo Fiho, D.A., Lyra, T.M., Barretto, T., Azevedo, S.M.F.O. and Jarvis, W.R.: Liver Failure and Death after Exposure to Microcystines at Hemodialysis Center in Brazil. *N. Eng. J. Med.*, **338**, 873-887 (1996)
- 3) Watanabe, M.F., Oishi, S., Harada, K-I., Matsuura, K., Kawai, H. and Suzuki, M.: Toxins contained in *Microcystis* species of cyanobacteria (Blue-green algae). *Toxicon.*, **26**, 1017-1025 (1996)
- 4) 厚生労働省: 「水質基準の見直し等について(答申)」, 2003年4月28日, 厚生科学審議会
- 5) Kaya, K. and Watanabe, M.: Microcystin Composition of an Axenic Clonal Strain of *Microcystis Viridis* and M. *Viridis*-containing Waterblooms in Japanese Freshwaters. *J. Appl. Phycol.*, **2**, 173-178 (1990)
- 6) 古谷博: 水中の微量ミクロキスチンの固相抽出法による濃縮法の検討. *水道協会雑誌*, **67**(4), 25-29 (1998)
- 7) 兵庫県健康生活部生活衛生課: 「兵庫県水道水質管理計画」, 平成6年3月策定(第1次), 平成17年9月策定(第2次)
- 8) 日本水道協会編: 上水試験方法2001年版, 日本水道協会出版, p.107-114, p.119-120, p.247-257, 東京 (2001)
- 9) 国包章一, 西村哲治: 環境省地球環境保全等試験研究費 「水道水源等における生理活性物質の測定と制御に関する研究」. 平成18年度成果報告集 (2007)
- 10) 久保田領志, 田原麻衣子, 清水久美子, 西村哲治: 高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法による環境水中PPCPsの分析と水環境中の存在実態. *国立衛研報*, **126**, 98-103 (2008)
- 11) 川元達彦, 辻英高, 寺西清: 兵庫県下の水源別からみた水道原水中の農薬の濃度及び検出頻度の経年的変動. *J. Health Sci.*, **45**(6), 401-411 (1999)