

¹⁵N標識内標準物質を用いたLC/MSによる印旛沼におけるミクロシスチンの分析

千葉県環境研究センター ○清水 明 横山 智子 本田 恵理 藤村 葉子
国立環境研究所 佐野 友春

Determination of Microcystins in Lake Inba-numa by Liquid-Chromatography Mass Spectrometry(LC/MS)
using per-¹⁵N-labeled Microcystins, by Akira SHIMIZU, Satoko YOKOYAMA, Eri HONDA, Yoko FUJIMURA (Chiba Pref.
Env. Res. Center) and Tomoharu SANO (National Institute for Env. Studies)

1 はじめに

湖沼の富栄養化によりアオコが発生し水質の低下が問題となる。アオコを形成する藍藻類の一部はミクロシスチン(MCs)などの有害物質を生産することが知られているが、地球温暖化等の影響によるアオコ発生頻度の増加や発生期間の長期化により、これらの有害物質が環境へ及ぼす影響が大きくなることが懸念される。上水試験法にも分析方法が示されているなど MCs にはいくつかの分析方法があるが、その中の LC/MS による分析法において、これまでは一定の精度を得るために有効な内部標準物質がなかった。今回、国立環境研究所Ⅱ型共同研究において¹⁵N標識MCsを内標準物質として用いた高精度な分析法¹⁾によるモニタリング手法について検討し、千葉県の重要な水域である印旛沼の調査を行ったので報告する。

2 方法

2・1 分析法

〔標準物質及び内部標準物質〕Ⅱ型共同研究で配布された、定量対象とする6種類の同族体MCsと定性対象とする5種類の同族体MCsの標準物質及び定量対象MCsに対応する¹⁵N標識内標準物質を使用した。分析対象としたMCsを表1に示した。

〔LC/MS条件〕LC条件は、約21分で分析対象のMCsが溶出するステップグラジエントとした。また、MSのパラメーター(キャピラリー電圧、コーン電圧等)の最適化を行い、ESI positiveでイオン化してSRMモードで測定した。分析対象としたMCsはイオン化により1価と2価のイオンが生成するが、定量対象のMCsは検出強度が高かった2価イオンをプレカーサーイオンとして測定を行った。MCsのモノアイソトピック質量、測定時に設定したモニター

表1 ミクロシスチン同族体
(モノアイソトピック質量, モニターイオン)

MC-	Monoisotopic mass	Monitor Ion
RR	1037.56	519.8 > 135.1
YR	1044.52	523.3 > 135.1
LR	994.54	498.3 > 135.1
WR	1067.54	534.8 > 135.1
FR	1028.53	515.3 > 135.1
7dmLR	980.53	491.3 > 135.1
7(3)dmRR	1023.55	512.8 > 135.1
LA	909.48	910.5 > 135.1
LY	1001.51	1002.6 > 135.1
LW	1024.52	1025.6 > 135.1
LF	985.51	986.6 > 135.1

定量対象 MCs

イオンを表1に示した。

〔試験液の調製〕水試料の超音波抽出の工程で、アオコを形成する藍藻類細胞からのMCsの抽出効率を良くするために、採取した試料は一度凍結した。再溶解した水試料を分取し超音波抽出・遠心分離した後、その上清について固相抽出操作を行い、溶出液を試験液とした。

2・2 印旛沼調査

2013年9月に20地点、2014年9月に8地点で縦断調査を行い、表層水を採取した。また、印旛沼の環境基準点の1地点で毎月採水している試料についても分析を行った(2013年5月~11月, 2014年7月~10月)。

採取試料はMCsの他、クロロフィルaについても分析を行い、同族体の濃度組成比や、クロロフィルa濃度との相関を求めた。印旛沼の調査地点を図1に示した。

3 結果と考察

3・1 分析法の精度管理

〔検量線〕MCs濃度2.5~500 ng/mLの検量線を作成した。MCs標準物質は高濃度ほど検出値が高くなる傾向があったため絶対検量線は2次関数で近似する必要があったが、相応して増減する内部標準物質の検出値で補正することにより、定量対象のMCsの検量線は、いずれも良好な直線性を示した。

〔検出下限値・定量下限値の算出〕分析に使用した機器の検出下限値(IDL), 分析方法の検出下限値(MDL),

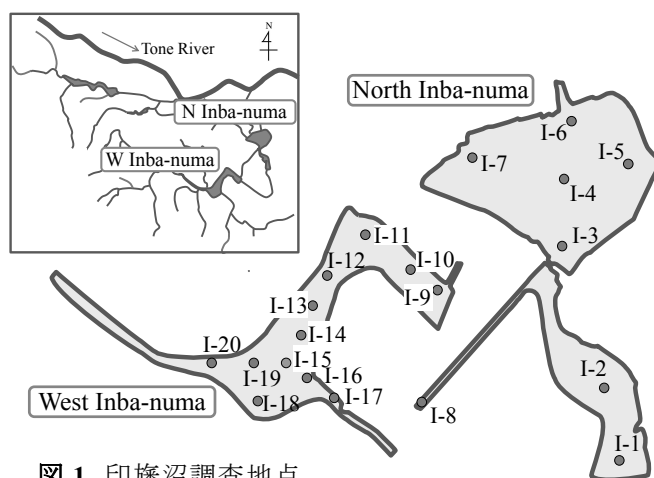


図1 印旛沼調査地点

I-1~I-20: 2013年調査地点
I-2, 4, 6, 8, 11, 15, 17, 20: 2014年調査地点
I-15: 毎月調査地点

定量下限値(MQL)を算出した。
IDLは14 ng/L(MC-RR)~35 ng/L
(MC-WR), MDLは24 ng/L(MC-
RR)~38 ng/L(MC-WR)であり,
MQLは62 ng/L(MC-RR)~97 ng/L
(MC-WR)であった。

〔添加回収試験〕MDL算出時の¹⁵N 内標準物質について、回収率を求めた。MC-WRで回収率が低い試料(52%)があったが、他は70%以上の回収率が得られた。

3・2 印旛沼調査結果

〔縦断調査〕2013年, 2014年に調査したMCs及びクロロフィルa濃度を図2に示した。2013年の調査では北印旛沼の北部(I-5, 6, 7), 西印旛沼と接続する捷水路(I-8), 西印旛沼の南西部(I-16, 18~20)で, MC-RR, LR, 7dmLR 濃度の高い調査地点があった。2014年の調査でも北印旛沼の北部や捷水路で同様の同族体濃度の高い傾向があった。

クロロフィルa濃度は, MCsが低かった2013年の調査地点I-1, I-2を除き, MCs濃度との間に相関が認められた(図3)。

MCsの濃度が高かった北印旛沼地点I-6, 捷水路地点I-8の定量対象同族体の濃度組成比及び定性対象同族体の検出値の組成比を図4に示した。2014年の調査では2013年に組成比の高かったMC-7dmLRの相対的割合は減少し, 未検出であったMC-YR, FRが検出された。また, 定性対象の同族体の組成比も異なっていることから, 2回の調査ではMCsを生産する藍藻類に違いがあることが推測された。

〔毎月調査〕2013年は5月から9月まで, 2014年は10月までMCsが検出されたが, 縦断調査時のような

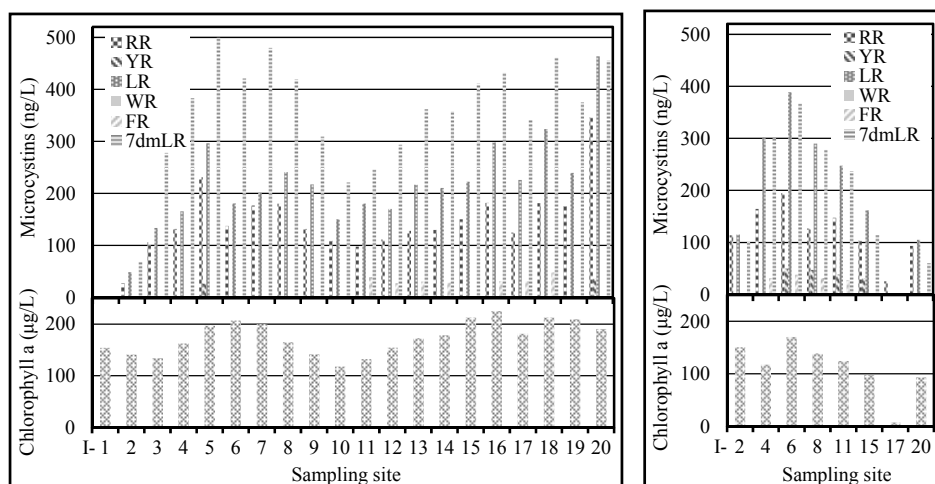


図2 印旛沼縦断調査 MCs, クロロフィルa濃度
(左:2013年9月 右:2014年9月)

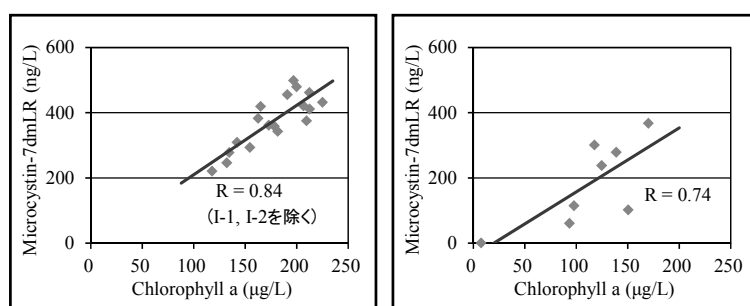


図3 印旛沼縦断調査 MC-7dmLRとクロロフィルa濃度の相関
(左:2013年9月 右:2014年9月)

MCsとクロロフィル濃度との相関は認められなかった。

毎月の調査を通して2014年8月に地点I-15で最も高い680 ng/LのMC-LRが検出されたが, このときの定量対象同族体の濃度組成比は2014年の縦断調査地点I-6, I-8と類似していた。また, 定性対象同族体もMC-LWの組成比が高い傾向であるが, 同じ同族体が検出され類似性が認められた(図4 *15)。

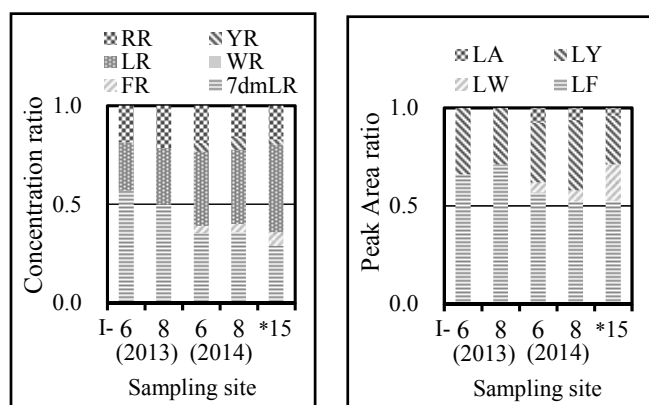


図4 MCsの濃度(検出値)組成比
〔左:定量対象MCs 右:定性対象MCs〕
*15;毎月調査2014年8月 I-15

4 まとめ

¹⁵N 標識内標準物質を用いたLC/MSによるMCsの分析を行った。定量下限値はWHOが勧告したMC-LRの暫定的な基準値(1 µg/L)²⁾の1/10以下であり, 回収率も概ね良好であった。

印旛沼調査では, 本分析法により藍藻類の最盛期ではない季節に低濃度でもMCsが検出され, 同族体の濃度組成比の差異や変化が明らかになった。

印旛沼縦断調査でMCsとクロロフィルa濃度との間に一定程度の相関が見られたが, 今後はプランクトン数や優占種等を含め考察していく必要があると考えられた。

- 〔参考文献〕1) Sano, T., Takagi, H., Nagano, K., Nishikawa, M., Kaya, K., Anal. Bioanal. Chem., 399,2511-2516(2011)
2) “Toxic Cyanobacteria in Water, A Guide to Their Public health Consequences, Monitoring and Management”, ed. by Chorus, I. and Bartram, J., WHO(1999)