液体クロマトグラフ質量分析法を用いた 総ミクロシチンの定量法の開発

高木 博夫¹⁾, 白井 美幸²⁾, 佐野 友春¹⁾, 彼谷 邦光³⁾

¹⁾国立環境研究所 (〒305-8506 茨城県つくば市小野川16-2)

²⁾(株)環境研究センター (〒305-0857 茨城県つくば市羽成3-1)

³⁾東北大学大学院環境科学研究科 (〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉20)

[平成16年4月7日受理]

An Improved Method of the Total Microcystin Determination using Reversed-phase Liquid Chromatography Mass Spectrometry

Hiroo TAKAGI¹⁾, Miyuki SHIRAI²⁾, Tomoharu SANO¹⁾ and Kunimitsu KAYA³⁾

¹⁾National Institute for Environmental Studies
(16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506)

²⁾Environmental Research Center Co., Ltd
(3-1 Hanare, Tsukuba, Ibaraki 305-0857)

³⁾Tohoku University, Graduate School of Environmental Studies
(20 Aramaki-aza-aoba, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8579)

[Received April 7, 2004]

Summary

Microcystins are hepatotoxic cyclic heptapeptides produced by cyanobacteria. The World Health Organization (WHO) guideline has shown that microcystin-LR content in drinking water should be below 1 $\mu\text{g}/\ell$. However, over 70 variants of microcystin including microcystin-LR have been identified in the world, and their toxicities and LD₅₀ are similar to those of microcystin-LR. Therefore, we thought that total microcystin content in drinking water should be determined. Total microcystin can be determined by the MMPB method. However, the method requires some skillful handling procedure.

In this paper, we improved the procedure of the MMPB method, and established a simple determination system for total microcystins. The procedures of the oxidation and the solid-phase extraction in our original MMPB method were improved. By these improvements, the recovery of MMPB was reached to over 70 % and was steady. As the result, 10 pg of MMPB (0.1 μg microcystin/50 mL sample water) can be determined by this improved method.

Key words: microcystin, MMPB, 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid, LC/MS, cyanobacteria

1. はじめに

藍藻類により生産されるマイクロシスチンは、肝臓毒を有することが知られており、WHO では飲料水中のガイドラインとしてマイクロシスチン-LR $1 \mu\text{g}/\ell$ を勧告している¹⁾。欧米などにおいては、マイクロシスチン-LR の量がアオコに含まれるマイクロシスチンの中では最も多いとされており²⁾、マイクロシスチン-LR についての研究データが十分蓄積されていたため、WHO の勧告はマイクロシスチン-LR についてなされた。日本においてはマイクロシスチン-LR が30%程度、マイクロシスチン-RR が50%程度、マイクロシスチン-YR が14%程度を占めているとされている^{3,4)}。一方、マウスの LD_{50} による毒性が、マイクロシスチン-LR を1とするとマイクロシスチン-RR はその1/2程度、マイクロシスチン-YR はマイクロシスチン-LR の7割程度である^{5,6)}ことから、日本においてはマイクロシスチン-LR のみの測定では、アオコ中の毒性の約50%としか評価されていないことになる。一方、マイクロシスチンには、70種以上の同族体が存在することがすでに知られており⁷⁾、それらをすべて分離定量することは困難である。そのため、上水試験方法等には、高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) を用いて LR, RR, YR の3種のマイクロシスチンを測定する手法が示されている⁸⁾。また、高速液体クロマトグラフィー/質量分析装置 (LC/MS) の普及に伴いこれらを用いた分析方法の検討が進み、その有効性が示されているが、一般的な定量分析としては標準物質のあ

るマイクロシスチン-LR, RR, YR 等の分析法の検討にとどまっている^{9,10)}。一方では、総マイクロシスチン量を測定する試みも行われ、L. Spoof ら¹¹⁾は93の環境試料について、HPLC-UV 法と LC/MS 法を用いて10種のマイクロシスチンを測定し、市販の ELISA 法を用いて測定した総マイクロシスチン量の測定結果と比較している。ELISA 法の測定値は HPLC を用いた方法の値の60から70%を示し、マイクロシスチンの種類によって抗体との交差反応性が異なるためと結論付けている。プロテインホスファターゼ 2A (PP2A) 活性阻害を用いて、トータルの毒性をマイクロシスチン-LR 当量 の形で評価する手法も検討されている¹²⁾。PP2A の活性阻害は、マイクロシスチン-LR が最も大きいことから、PP2A により求められた総マイクロシスチン量は HPLC で求めた総量に比べ低めに出ることが明らかにされている。

このように、マイクロシスチン量を把握する種々の方法が試みられている中、マイクロシスチンを酸化分解することで生成する Adda と呼ばれているマイクロシスチン同族体に共通したユニットである2-メチル-3-メトキシ-4-フェニル酪酸 (MMPB) を定量し (Fig. 1), 最も毒性の強いマイクロシスチン-LR に換算した総マイクロシスチン量として測定する方法が提唱されている¹³⁾。定量方法には、MMPB を誘導体化した後ガスクロマトグラフ質量分析法を用いる方法及び HPLC-UV 検出器を用いて直接測定する方法などが報告されている¹⁴⁾。誘導体化法は、誘導体化の効率の再現性等を考慮しなければならず操作

Fig. 1 Formation of MMPB from microcystin by the oxidation

が煩雑である。また、HPLC-UV 法は、感度が低くバックグラウンドの影響を受けやすいことが指摘されている。

そこで、本研究では LC/MS 法を用いて MMPB の定量を行う方法について検討した。さらに、従来から提案されている酸化分解法および固相抽出方法についても検討を加えた。

2. 実験方法

2. 1 試薬および測定方法

ミクロシスチン-LR 標準試料は、ミクロキステス・ビリデス (NIES 102) より抽出、分離精製⁴⁾し、紫外可視分光光度計 (島津製作所 紫外可視分光光度計 UV-160 波長238nm ϵ 30900) にて濃度を決定したものを使用した。定量用標準物質として2-メチル-3-メトキシ-4-フェニル酪酸 (MMPB) および MMPB-*d*3 (和光純薬 標準品) を用いた。ミクロシスチンの酸化分解には、過マンガン酸カリウム、過よう素酸ナトリウム、リン酸、炭酸カリウム、亜硫酸水素ナトリウム (和光純薬 特級) を、高速液体クロマトグラフ (HPLC) には、メタノール、アセトニトリル (和光純薬 HPLC 用)、酢酸 (和光純薬 特級) を用いた。固相抽出には、メタクリレート系スチレンジビニルベンゼン共重合体カートリッジ (ジーエルサイエンス製 InertSep RP-1, 250mg/6 mL および30mg/1 mL) を用いた。

LC/MS の分析条件を Table 1 に示した。

2. 2 分析法

分析法の概要を Fig. 2 に示す。検討内容の詳細は、次のとおりである。

2. 2. 1 MMPB 分析条件の検討

MMPB ナトリウム塩 1 mg を正確にメスフラスコ 10 mL に採り、50% メタノール水溶液を加えて全量を 10 mL ($100 \mu\text{g/mL}$) とした。これを適宜希釈し所定の濃度とした。

HPLC の最適分析条件を決定するために、移動相の 0.001% 酢酸とアセトニトリルの濃度比を 50/50, 60/40 にしたものおよびアセトニトリル濃度を 20% から 80% まで 6 分間で直線的に変化させたグラジエント法の 3 種で MMPB の分析を行い移動相の最適比率を検討した。

定量下限値を決定するために MMPB の注入量を 160 pg, 80 pg, 40 pg, 20 pg および 10 pg の 5 段階で変化させ、各注入量を 3 回測定し再現性を検討した。

2. 2. 2 ミクロシスチン-LR の酸化分解法の検討

ミクロシスチン-LR 標準試料の 20% メタノール水溶液 100 μL に 0.5 M K_2CO_3 400 μL を加え、これを氷冷し、酸化分解のための試料とした。

2. 2. 3 酸化剤添加量の検討

必要とされる酸化剤の量を検討するために、氷冷した 0.025 M 過マンガン酸カリウム (KMnO_4) および飽和過よう素酸ナトリウム (NaIO_4) の添加量を、それぞれ 500 μL , 50 μL から 2 倍, 3 倍及び 4 倍と増加させ MMPB の収率を検討した。

2. 2. 4 酸化反応条件の検討

酸化反応条件の MMPB 収率に対する影響を検討するために、反応温度、攪拌条件等を以下の 5 種の条件で行った。

1. 氷水中に 1 時間保持した。その後、氷水から出し、室温に 3 時間保持した (30 分に 1 回程度の頻度

Table1 LC/MS Conditions for MMPB determination

MS Condition

Instrument	: LCMS-2010A (Shimadzu Corp.)
Ionization mode	: ESI negative
SIM (m/z)	: MMPB- <i>d</i> 0 207, MMPB- <i>d</i> 3 210
Nebulizer gas	: N_2 1.3 L/min,
Detector gain voltage	: 1.8 Kv
Probe voltage	: 5 Kv
CDL voltage	: -10v

HPLC Condition

Instrument	: LC10AD (Shimadzu Corp.)
Column	: Mightysil RP-18 (i.d. 2.0 x 100 mm) (Kanto Chemicals) : Zorbax XDB-C18 (i.d. 2.1 x 150 mm 5 μm) (Agilent Technologies)
Mobile Phase	: 0.001% Acetic acid: Acetonitrile = 60:40 (V/V)
Flow rate	: 0.2 mL/min
Column Temp.	: 40°C
Injection Volume	: 5~50 μL

で良く攪拌した)。

2. 氷冷時に超音波を5分間かけ、その後は1と同じ
3. 氷水から出し室温に戻した直後に超音波を5分間かけ、その後は1と同じ
4. 氷水から出し室温に戻した後、室温に3時間保持、その間30分ごとに超音波5分処理
5. 氷水から出し室温に戻した後、40℃水浴中で3時間保持

2. 2. 5 酸化分解生成物 (MMPB) の固相回収

反応時間が経過した後、反応溶液に精製水 4 ml および 20% 亜硫酸水素ナトリウム (NaHSO_3) を過マンガン酸カリウムの色が消えるまで加え反応を停止した。

反応を停止した溶液に 2M H_3PO_4 約 1 ml を均一に攪拌しながら添加し、反応液の pH を 3 に調整した後、さらに内部標準物質としてサロゲート物質である MMPB- d_3 0.05 μg を水溶液として添加した。この溶液を固相カートリッジ (ジールサイエンス製 InertSep RP-1, 30mg/1 ml, メタノール 1 ml, 精製水 1 ml で洗浄しておく) に穏やかに通液し、酸化分解生成物 (MMPB) を吸着させた。カートリッジを 1 ml の精製水で洗った後、0.2 ml の 90% メタノール水溶液で MMPB

を溶出した (溶出液をスピッツ管に受ける)。さらに 0.2 ml の 90% メタノール水溶液、0.6 ml の精製水をカートリッジに通し、メタノールの残留液を押し出した。溶出液と洗浄液をあわせ全量を 1 ml とし、LC/MS 用試料とした (Fig. 2)。

2. 2. 6 環境試料からの回収実験

アオコの塊を含む湖沼表層水を均一に攪拌した試料 50 ml をスクリーキャップ付遠沈管に取り、酢酸 2.5 ml 加え、密栓して超音波発生器 (シャープ製 U-205S 200w) で 3 分間処理した。処理後、20 分間 2500rpm で遠心分離し、上澄み液を採取した。残った残渣にメタノール 10 ml を加えて、同様の操作を行い、上澄み液を先のものと合わせた。

この溶液を固相カートリッジ (ジールサイエンス製 InertSep RP-1, 250mg/6 ml, メタノール 10 ml, 精製水 20 ml で洗浄しておく) に通し、ミクロシスチンを吸着させた。その後、固相カートリッジを精製水 20 ml, 20% メタノール水溶液 20 ml で洗浄し、80% (v/v) メタノール水溶液 4 ml で溶出した。この溶出液をロータリーエバポレーターで 200 μl 程度まで濃縮し、MMPB 生成分解操作用試料液の検液とした (Fig. 2)。

Fig. 2 Extraction of microcystins from environmental samples and MMPB formation procedure from microcystin

3. 結果と考察

3. 1 MMPB 分析条件

マスペクトルには、MMPB の親ピークと一致した $m/z = 207$ のフラグメントピークが見られた。分析条件によっては、MMPB に水の付加した分子量 $m/z = 225$ のフラグメントが見られることもあったが、最終的な LC/MS の分析条件では検出されなかった。

移動相の0.001%酢酸/アセトニトリル濃度比を変化させた場合のクロマトグラムを Fig. 3 に示す。MMPB の分離およびピーク形状は、アセトニトリル濃度を20%から80%まで6分間で変化させた結果がもっとも良かった。しかし、分析時間等を考慮した結果、0.001%酢酸/アセトニトリル比を60:40の濃度比とした移動相条件で測定することとした。固相からの回収率およびMSの感度補正を行うためにサロゲート化合物を添加した。サロゲート化合物にはMMPB-*d*3 ($m/z = 210$) を用いた。MMPB-*d*3 とMMPBの混合物のマスペクトル、SIMクロマトグラムを Fig. 4 に示す。

3. 2 MMPB の定量下限値

MMPB の注入量を160pg から10pg まで変化させた結果、20pg までは変動係数 (CV %) は5 %以下で非常に安定していた (Fig. 5)。定量下限値を求めるためにMMPB 注入量と CV % の関係について回帰式を求めた。

回帰式より計算された CV10% における MMPB の値は11.83pg, 20%では6.79pgであった。最小注入量である10pg において CV % が14.5%であり、ピーク面積が約30000と感度が十分であった。このことから定量下限値を10pg とした (Fig. 6)。MMPB 注入量10pg から160pg の間で、検量線は良い直線性を示した (Fig. 7)。

3. 3 ミクロシスチン-LR の酸化分解

3. 3. 1 酸化剤添加量の検討

従来は、固相カートリッジよりミクロシスチンを溶出する際に入る溶出溶媒のメタノールの影響を避けるために抽出した試料を一度乾固させていたが、再溶解時に完全に溶解できずに収率のばらつきの原因となると推定された。そこで試料を乾固することなくメタノールが一定量含有した状態の検液のままで酸化分解を行った。

ミクロシスチン標準物質の酸化分解もメタノール20%水溶液のままで行ったが、メタノールにより酸化剤が消費されるため酸化剤の量を増やす必要が認められた。酸化剤の添加量を0.025M 過マンガン酸カリウム (KMnO_4)、飽和過イodateナトリウム (NaIO_4) それぞれの初期添加量500 μl , 50 μl から2倍、3倍及び4倍と増加させた結果、酸化試薬の量が2倍になるとMMPBの収率がそれまでの46%から65%に大きく増加した (Fig. 8)。その後の増加が比較的小さかったことから、酸化剤の必要量をそれぞれ 0.025M 過マンガン酸カ

Fig. 3 Changes in MMPB mass chromatograms by various conditions of mobile phase for HPLC

リウム (KMnO₄) 1 ml, 飽和過よう素酸ナトリウム (NaIO₄) 100 μ l とした。

従来, 過よう素酸ナトリウムは固体で加え反応溶液中で溶解させていた¹³⁾が, 速やかに溶解させることが困難

なために収率に影響を与える可能性が示唆されたため飽和溶液として添加することとした。また, 過よう素酸ナトリウムは加水分解してアルカリ性を示し, その状態で強い酸化力を示すため, 反応溶液を炭酸カリウムでアル

Fig. 4 Mass spectra and mass chromatograms of MMPB and MMPB-d₃

Fig. 5 Correlation diagram between MMPB concentration and the coefficient of variation

カリ性にし、酸化力の安定性を高めた。

3. 3. 2 酸化反応条件の検討

酸化反応の攪拌条件および反応温度条件を変えて収率への影響を検討したが、試料を乾固しない酸化反応条件

では、攪拌条件の違いによる収率に大きな差は見られなかった。反応温度による影響は、氷冷後の温度を40℃で3時間保持した条件では、室温で保持した場合に比べ収率に減少が見られた。

Fig. 6 SIM chromatograms of MMPB at the concentrations of 10 pg and 160 pg

Fig. 7 A calibration curve of MMPB

3. 3. 3 酸化分解方法の検討結果

マイクロシスチンの酸化分解で生成した MMPB は固相抽出により回収されるが、固相を通す溶液に 2.0M H_3PO_4 を加えて pH3 以下 (約 1 ml) に調整した。その結果、回収率は 60% 台から 70% 台まで改善された。MMPB-*d*3 の回収率が 80% 台であることから、分解効率を含んだマイクロシスチンからの MMPB の回収率としては十分なものと考えられた。

マイクロシスチン-LR 標準物質の分解試験を 1. 乾固によりメタノールを除去した後に酸化分解する方法 (方法 1), 2. メタノールに溶解した状態で酸化分解する方法 (方法 2) の 2 通りの方法について 3 濃度 (0.25, 0.5, 1 $\mu\text{g}/\ell$) で行ったところ、いずれの濃度においても方法 2 が収率は最も高く、方法 1 よりも収率が高く、平均収率は 55% から 71% に改善された (Fig. 9)。

サロゲート物質である MMPB-*d*3 の希釈溶液は時間とともに濃度が減少していくことが明らかとなった。そのため高濃度溶液で保存し、使用の都度希釈調製した結果、収率および回収率の再現性がさらに改善された。

ここで設定された分析条件で WHO のガイドライン値 1 $\mu\text{g}/\ell$ を測定するために必要な試料の量を見積もると、定量下限値 10pg, LC/MS 注入量を 10 $\mu\ell$, 全体の回収率を 70% としたときに約 10ml の試料があればよいことが明らかとなった。

3. 4 環境試料からの回収実験

アオコの塊が含まれている湖水 50ml からマイクロシスチン抽出操作で調製された MMPB 測定用検液を直接 LC/MS で測定した。TIC クロマトグラムを Fig.10-1 に示す。抽出されたマイクロシスチン類の内マイクロシスチン-RR ($m/z = 520$) のピークは検出できたが、マイクロシスチン-LR ($m/z = 995$) はわずかししか検出できなかった。

この溶液を検液として MMPB を測定した結果を Fig.10-2 に示す。この測定では、高濃度の MMPB が含まれていると考えられたため、内部標準物質の量を増やし希釈した状態で測定を行った。この試料の MMPB 濃度は、14 $\mu\text{g}/\ell$ と求められた。

4. まとめ

1. LC/MS を用いた総マイクロシスチン量としての 2-メチル-3-メトキシ-4-フェニル酪酸 (MMPB) の定量分析は、MS をネガティブ ESI 測定質量 $m/z = 207$, 移動相を 0.001% 酢酸 / アセトニトリル 比 60:40 とすることで良い分離測定が行えた。
2. 試料を乾固せずメタノールが一定量含有した状態で酸化剤の量を 0.025M 過マンガン酸カリウム (KMnO_4) 1ml, 飽和過ヨウ素酸ナトリウム (NaIO_4) 100 $\mu\ell$ にて酸化し、pH 3 の溶液で固相抽出を行うことで収率は 71% になった。
3. これらの改良およびサロゲート化合物に MMPB-*d*3

Fig. 8 Changes in yields and recoveries of MMPB by various amounts of the oxidizing reagents

Original volumes of the oxidizing reagents;
0.025M Potassium permanganate (KMnO_4), 500 $\mu\ell$;
Saturated sodium periodate (NaIO_4), 50 $\mu\ell$.

▨ Recovery of MMPB-*d*3

▤ *Yield of MMPB

Fig. 9 Relationship between MMPB yields in the original and the improved methods
Microcystin-LR was used for the experiment of MMPB yields.
 ▨ original method
 ▤ improved method

Fig. 10 Mass chromatograms of MMPB and microcystins from a environmental sample
 10-1 Mass chromatogram of Microcystins from a environmental sample
 10-2 Mass chromatogram of MMPB formed from the sample

($m/z = 210$) を用い回収率を補正した結果、ミクロシスチン-LR の酸化解解過程も含めた MMPB の定量下限値は10pg となった。

4. WHO ガイドライン値 $1 \mu\text{g}/\ell$ の10分の1まで測定するには10mℓの試料を濃縮すれば、検出限界を満足できることから、今回検討した分析方法で50mℓの環境試料を用いれば WHO ガイドライン値の定量が十分可能であることが明らかとなった。

要 約

LC/MS を用いた総ミクロシスチン量としての2-メチル-3-メトキシ-4-フェニル酪酸 (MMPB) の定量分析は、MS をネガティブ ESI 測定質量 $m/z = 207$ 、移動相を0.001%酢酸/アセトニトリル比60:40とすることで良い分離測定が行えた。試料を乾固せずメタノールが一定量含有した状態で酸化剤の量を0.025M 過マンガン酸カリウム (KMnO_4) 1mℓ、飽和過よう素酸ナトリウム (NaIO_4) 100μℓにて酸化し、pH 3 の溶液で固相抽出を行うことで収率は71%になった。WHO ガイドライン値 $1 \mu\text{g}/\ell$ の10分の1まで測定するには50mℓの環境試料を用いれば定量が十分可能であることが明らかとなった。

文 献

- 1) World Health Organization: Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR. pp83-127, Guidelines for Drinking-Water Quality-Second Edition-Volume 2—Health Criteria and Other Supporting Information — Addendum, World Health Organization, Geneva (1998)
- 2) 彼谷邦光: 3・6 ミクロシスチンはどのような割合で含まれているのか, pp43-44, 「環境のなかの毒」, 裳華房, 東京 (1995)
- 3) Park, HD., Watanabe, MF., Harada, KI., Suzuki, M., Hayashi, H. and Okino, T.: Seasonal-Variations of Microcystis Species and Toxic Heptapeptide Microcystins in Lake Suwa. *Environmental Toxicology and Water Quality*, **8**, 425-435 (1993)
- 4) Kaya, K. and Watanabe, M.M.: Microcystin of an axenic clonal strain of *Microcystis viridis* and *Microcystis viridis*-containing waterblooms in Japanese freshwater. *J. Appl. Phycol.*, **2**, 173-178 (1990)
- 5) 彼谷邦光: 3・5 ミクロシスチンはどんな構造か。またどのような性質か, pp37-43, 「環境のなかの毒」, 裳華房, 東京 (1995)
- 6) Rinehart, KL. Namikoshi, M., Choi, BW: Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *J. Appl. Phycology* **6**, 159-176, 1994
- 7) 彼谷邦光: 4 シアノトキシン, pp33-49, 「飲料水にしのびよる有毒シアノバクテリア」, 裳華房, 東京 (2001)
- 8) 日本水道協会: 15ミクロキスチン, pp501-505, 「上水試験方法 2001版」, 日本水道協会, 東京 (2001)
- 9) 滝埜昌彦, 代島茂樹, 中原武利: 液体クロマトグラフィー/質量分析法による河川水中のミクロシスチン類の分析法の検討, 環境化学, **11**, 211-219, (2001)
- 10) Maizels, M. and Budde, W.L.: A LC/MS Method for the Determination of Cyanobacteria Toxins in Water. *Anal. Chem.* **76**, 1342-1351 (2003)
- 11) Spoof, L., Vesterkvist, P., Lindholm, T. and Meriluoto, J.: Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatography A*, **1020**, 105-119 (2003)
- 12) Robillot, C., Vinh, J., Puiseux-dao, S. and Hennion, M.: Hepatotoxin Production Kinetics of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, as Determination by HPLC-Mass Spectrometry and Protein Phosphatase Bioassay. *Environ. Sci. Technol.*, **34**, 3372-3378 (2000)
- 13) Sano, T., Nohara, K., Shiraishi, F. and Kaya, K.: A Method for Micro-Determination of Total Microcystin Content in Waterblooms of Cyanobacteria (Blue-Green Algae). *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **49**, 163-170 (1992)
- 14) Kaya, K. and Sano, T.: Total microcystin determination using erythro-2-methyl-3-(methoxy-d3)-4-phenylbutyric acid (MMPB-d3) as the internal standard. *Analytica Chimica Acta* **386**, 107-112 (1999)