ノート

[Jpn. J. Toxicol. Environ. Health]
[衛 生 化 学]
43 (3) 190—196 (1997)

—Notes—

環境水中のミクロシスチンのディスク型固相による抽出

土屋悦輝,* 渡辺真利代
東京都立衛生研究所

Disk Type Solid-Phase Extraction of Microcystin in Environmental Water

Yoshiteru TSUCHIYA* and Mariyo WATANABE

Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 3-24-1, Hyakunincho,
Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan

(Received January 16, 1997)

The cyanobacteria *Microcystis* which produces microcystin, as a hepatic toxin, has been found in the eutrophic water area including the source of water supply. The contamination of drinking water with these algae could be presumed. Therefore, the determination of microcystin in water by HPLC using a disk type solid phase extraction was studied. Microcystins-RR, -YR and -LR in the water were treated with Empore disks C-18 and SDB-XD (styrene divinyl benzene polymer).

As a result, the SDB-XD disk using 10% H₂O - methanol as an eluent showed good recovery and reproducibility. This method can rapidly treat a water sample about ten times faster than the cartridge type solid phase extraction method. To clean the extract from the water sample, a method with a Sep-Pak silica cartridge which connects two pieces was tried using 0.2% TFA·10% H₂O-methanol as an eluent and this method also showed good recovery. The recovery of microcystin from spiked water was 102.3% for -RR, 103.2% for -YR and 91.2% for -LR.

In the analysis of water samples collected from the water area yielding “water bloom”, microcystin -RR 0—0.05 µg/l, -YR 0—0.02 µg/l and -LR 0—0.05 µg/l were detected in the water and in the samples collected from the algae cell, microcystin-RR 0.15—3.67 µg/l, -YR 0—1.21 µg/l and -LR 0.07—2.03 µg/l were detected. The release rate of microcystin from the algae to water was about 1%.

Key words — microcystin; *Microcystis aeruginosa*; toxin; water-bloom; solid phase extraction; styrene divinyl benzene polymer (SDB)

緒 言

近年、富栄養化した湖沼、河川、貯水池などの水域環境で藻類の異常発生が見られ、水道水源池での発生は、浄水場において処理障害、水道水への異臭味を呈することなど社会的にも影響を与えている。藻類の富栄養化した水域での異常発生は“水の華”と称され、さらに主に藍藻類の発生したものはアオコと呼ばれている。このアオコの発生は世界各地で深刻な環境問題となっている。特にアオコの発生している水域で牛、馬などの家畜が飲用し、死亡する

例がオーストラリアを初めアメリカ、カナダ、イギリスなどのヨーロッパ、南アフリカ、南米などで発生している。この被害の原因は藍藻類が産生する毒性物質でミクロシスチンと称されるもので強い肝臓毒性を示すことが知られている。この物質を作る藍藻として *Microcystis* の他に *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nostoc* などがある。我が国においてもアオコの発生は霞ヶ浦、諏訪湖、津久井湖、相模湖、琵琶湖など水道水源池を含む湖沼、河川、貯水池などでみられ、発生した藍藻類の藻体から毒素であるミクロシスチン-RR, -YR, -LR などが検出されている。こ

これらの物質は藻体に内蔵されているが、毒素が水域に溶出することが考えられ、水道水源に発生した所では水道水に混入する恐れがあり、水中のミクロシスチンの挙動を知ることが重要と考え、測定方法の検討を行った。測定方法としては、TLC,¹⁾ UV 検出器^{2,3)} 及び化学発光検出器⁴⁾ を用いた HPLC、大気イオン化法の ESI (electrospray interfaces) を用いた LC-MS,^{5,6)} ELISA⁷⁾ (enzyme-linked immunosorbent assay) 法、プロテインホスファターゼ阻害試験⁸⁾ などが報告されている。測定にあたっては、水中に存在するミクロシスチンが微量であることから、前処理として抽出濃縮操作が必要となる。この抽出には主に固相カートリッジによる固相抽出法が用いられており、ODS シリカゲルカートリッジ、⁹⁻¹³⁾ ポリアクリレート固相カートリッジ⁵⁾ を用いた濃縮法が報告されている。しかし、この抽出法では試料の流量が 4-10 ml/min であり、処理に長時間を要することや、藍藻を含む浮遊物質が多い試料ではカラムが閉塞し、処理が不可能になることがある。そこで著者らは、試料の前処理としてディスク型固相を用いることにより迅速に抽出し、汎用されている HPLC によって分析する方法を、また、浮遊物質を含む試料についても直接抽出する方法を検討した。藍藻が産生するミクロシスチンは現在 50 種以上が確認されているが、対象とした物質は、我が国の水域で見いだされるアオコで検出される物質が主にミクロシスチン-RR、-YR、-LR であることからこれら 3 物質とした。また、この方法を応用し、環境水中の藻体及び水中のミクロシスチンの測定を行った。

実験方法

1. 試薬 ミクロシスチン標準品：ミクロシスチン-RR、ミクロシスチン-YR、ミクロシスチン-LR (関東化学製) の各 10 mg/l (20%メタノール-水) 溶液を用いた。標準液はミクロシスチンの各標準 1 ml をメスフラスコ 10 ml にとり、メタノールを加え 10 ml とし、1 mg/l 標準混合液として使用した。

トリフルオロ酢酸 (特級関東化学製)

固相ディスク：固相に C 18 及びスチレンジビニルベンゼンポリマー (SDB) を含有する直径 47 mm のもの (エムポアディスク、住友スリーエム社) を用いた。使用前にメタノール 10 ml 及び水 10 ml で洗浄し、用いた。

ガラスビーズ：直径 40 μ m のもの (住友スリーエム社)。

シリカゲルカラム：Sep-Pak シリカカートリッ

ジ (690 mg, Waters 社製) を用いた。

2. 器具及び装置 吸引マニホールド (住友スリーエム社)

高速液体クロマトグラフ：日本分光社製のもの、デガッサー (800-50 型)、送液ポンプ (880-PU 型)、カラムオープン (865-CO 型)、検出器 (870-UV 型) を用い、記録計は C-R6A クロマトパック (島津製作所製) を用いた。HPLC の測定条件は、カラム Mightysil RP-18 (関東化学製)、4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm、粒径 5 μ m を用い、移動相は、0.05 mol/l リン酸緩衝液及びメタノールの 44:56 混合液を pH 3.0 にリン酸で調整した。カラムオープン 40°C、移動相流量 1.0 ml/min、検出器 UV 238 nm、試料注入量 20 μ l で行った。

3. 分析方法 アオコを含む試料はあらかじめグラスフィルター (1 μ m) を用い、ろ過処理を行う。アオコを捕捉したフィルターは一昼夜冷凍保存する。ろ液をあらかじめ洗浄活性化したディスクに流速 150-250 ml/min で通し、ミクロシスチンを吸着させる。水 10 ml 及び 80%水-メタノール 10 ml で洗浄後、これに 10%水-メタノール溶液 2 ml を流し、受器にとる。さらに 2 ml で 2 回流し、これを合わせる。流出液は 40°C に加温しながら、窒素ガスを吹き付け乾固する。これにメタノール 1 ml を加え、再溶解する。

冷凍保存したフィルターは、共栓フラスコに入れ、5%酢酸溶液 100 ml を加えたのち、超音波で 15 分間処理を行う。酢酸溶液をとり、さらに 5%酢酸溶液 100 ml を加え、同様に操作する。得られた酢酸溶液に水 100 ml を加え、これを固相ディスクでろ液と同様に操作し、試験溶液とする。

次に得られた試験溶液についてシリカゲルクロマトグラフィーによるクリーンアップを行う。Sep-Pak シリカゲルカートリッジ 2 本を連結し、10 ml のメタノールで洗浄したものに、メタノールに溶解した試験溶液を通し、これにメタノール 10 ml を緩やかに通し、流出液は捨てる。0.2%TFA-10%水-メタノール 6 ml を緩やかに通し、ミクロシスチンを溶出し、これに窒素ガスを吹き付け 1.0 ml とする。これを HPLC 分析に供する。

結果及び考察

ディスク型固相による抽出条件、クリーンアップ、全操作による回収率、実試料への応用などについて検討を行った。

1. 固相ディスクによるミクロシスチンの抽出

マイクロシスチンの水中からの濃縮及び抽出は ODS シリカゲルカートリッジが用いられているが、処理の迅速性からディスク型固相による濃縮、抽出の適用性について検討した。マイクロシスチン標準各 1 μg を 1 l の水に添加したものをスチレンジビニルベンゼンポリマー (SDB) 及び ODS シリカゲルのディスク型固相に約 160 ml/min の速度で通した。これをメタノールまたは 10% 水含有メタノールでマイクロシスチンを溶出し、各化合物の回収率を求めた。

その結果、Table 1 に示すように SDB ディスクを用いたものは、メタノールによる溶出で 65—77% 程度の回収率を示したが、10% 水—メタノールではマイクロシスチン -RR で 94.3%、マイクロシスチン -YR で 95.4%、マイクロシスチン -LR で 97.2% と良好な回収率を示した。ODS ディスクでは、溶出にメタノールを用いた場合、マイクロシスチン -RR は全く回収できず、-YR、-LR で 20% 台の回収率であり、10% 水—メタノールでの溶出でも 29—70% の回収率で良好な結果が得られなかった。ODS ディスクの下に SDB ディスクを重ね処理したところ、SDB ディスクからマイクロシスチン -RR を約 7%、-YR で 4%、-LR で 15% を検出し、ODS ディスクで一部捕捉されずに流出することが明らかになった。また、溶離液によって 10% 水—メタノールにより溶出度が増すことから吸着したマイクロシスチンが用いた溶離液では脱着されないものと考えられる。これは、ODS シリカゲルは全多孔性シリカゲルにオクタデシル ($\text{C}_{18}\text{H}_{37}$) 基を化学結合したものであり、SDB はポリスチレン骨格にジビニルベンゼンで架橋したものを基材としたもので、ODS と比較してシラノール (= SiOH) 基を持たないことから吸着性が少なく、塩基性物質や親水性の物質の保持力が強いことから回収率が良いものと考えられる。カートリッジ型の固相では吸着剤が 1 g 以下ではメタノールで溶出ができるが、2 g ではメタノールでの溶出でマイクロシスチン -RR で回収が不良であり、10% 水含有させたメタノールを用いている。⁹⁾ SDB ディスクでは、溶出

溶媒としてメタノールに 10% 水を含むものが適用できた。以上の結果から固相ディスクとして SDB ディスクを使用した。

2. マイクロシスチンの SDB ディスクからの溶出

ディスクに吸着したマイクロシスチンの溶出について検討した。マイクロシスチン各 1 μg を 1 l の水に添加し、SDB に通し、吸着させたものについて溶離液メタノール及び 10% 水—メタノール 1 ml を 1 フラクションとして溶出方法を求めた。その結果、Table 2 に示したように溶離液にメタノールを用いた場合は、3 フラクションのメタノール 3 ml 以後は溶出せず、48.5—70.8% と低い回収率を示した。一方、10% 水—メタノールでは、マイクロシスチン -RR は 5 フラクションの 5 ml の溶離液で、-YR、-LR は 3 ml で回収でき、その回収率は 94.3—97.2% と良好な結果を示した。次に表面積の広いディスクからマイクロシスチンを溶出させることから、溶離液による添加量の影響を検討した。10% 水—メタノール 1 ml で 6 回添加し、溶出したもの (Table 2) の他、3 ml で 2 回溶出したもの、6 ml を添加し溶出したものの回収率を求めたところ、3 ml で 2 回溶出したものは -RR で 92.6%、-YR で 99.8%、-LR で 94.4% を示し、6 ml で 1 回溶出では、-RR で 95.1%、-YR で 98.4%、-LR で 96.9% を示し、多少のバラツキが見られたが、溶離液の添加方法による各マイクロシスチンの回収率の

Table 2. Desorption Recovery of Microcystin from DSB Using Solvents (%)

Fraction	Methanol			10% H ₂ O-methanol		
	RR	YR	LR	RR	YR	LR
1 1 ml	27.3	36.8	42.8	13.0	31.1	22.3
2 1 ml	21.2	22.3	28.0	52.3	55.4	63.6
3 1 ml	0	8.9	0	21.5	8.9	11.3
4 1 ml	0	0	0	6.5	0	0
5 1 ml	0	0	0	1.0	0	0
6 1 ml	0	0	0	0	0	0
Total	48.5	68.0	70.8	94.3	95.4	97.2

Table 1. Recovery of Microcystin Treated with Solid Phase Extraction

Disk	Eluent	Microcystin RR (%)	Microcystin YR (%)	Microcystin LR (%)
SDB	Methanol	64.9	76.8	70.9
	10% H ₂ O-methanol	94.3	95.4	97.2
ODS	Methanol	—	26.8	27.8
	10% H ₂ O-methanol	29.2	58.7	69.6

差は見られなかった。抽出頻度と簡易性を考慮し、溶出溶媒として10%水-メタノール2 mlを3回用いて溶出した。

3. 試料のSDBディスク通過速度及び試料量による吸着の影響

ディスク型固相は0.5 mmの厚さにスチレンジビニルベンゼンポリマーの吸着剤を固定しており、カートリッジとは異なりカラム層高がないことから試料の通過速度によりミクロシスチンの吸着が十分でないことが、また試料量により吸着破過が起こる可能性があり検討した。

ミクロシスチン各1 μg を添加した試料1 lをディスクに3分40秒—7分10秒(270 ml—140 ml/min)までの5段階の速度で通し、各物質の回収率を求めた。その結果、ミクロシスチン-RRの回収率は90.3—110.2%を示し、吸着速度が6, 7分で回収率が高い傾向が見られた。ミクロシスチン-YRでは93.1—102.1%の回収率を示し、吸着速度が最速の3分40秒で93.1%と回収率がやや低い結果であったが、その他は96%以上の良好な回収を示した。ミクロシスチン-LRについても最速で処理した試料で90.6%と低い回収率を示したがその他は良好な結果を得た。

試料量の影響について水5 lにミクロシスチン各1 μg を添加し、SDBに約35分間(147 ml/min)で通したものの回収率は、-RRで97.7%, -YRで91.6%, -LRで95.2%と良好な回収を示し試料として5 lの大容量でも吸着が可能であった。ディスク型固相はカートリッジ型固相と比較して固相の厚さ

が1/20であるが、面積が約20倍あり固相の単位面積当たり流入する試料量も1/20となることから同様な吸着能を有し、さらにディスク充填剤粒子は5—20 μm でカートリッジ型固相の1/5以下と小さいため、粒子の表面積は大となり試料通水速度が早くとも吸着が可能であると考えられる。なお、ディスク型固相は水を一度通し、脱水した状態で再び水を処理すると極端に通過速度が低下することから、最初のメタノール洗浄後、水洗浄を行う以降から常に水を少量残す必要がある。

4. 試料のpHの変動によるディスク吸着への影響

アオコの発生する富栄養化した水域の水試料はpHが9以上のアルカリ性を示すことが多いことからSDBディスクへの吸着性について、3種のミクロシスチン1 μg を1 lの水に添加し、pHを3.1, 4.1, 5.1, 6.2, 7.1, 8.1, 9.0, 10.0の8段階に調整したものについて常法により処理し、検討した。

その結果、Fig. 1に示すようにミクロシスチン-RRは、92.8—101.4%, -YRは91.5—102.1%, -LRは91.4—103.7%の回収率を示し、pHによる抽出の影響は見られなかった。ODSシリカゲルのカートリッジを使用した場合はpH 4以下及びpH 9以上で影響し、抽出効率が低下することが報告⁹⁾されている。ポリマーゲルの固相では試料水のpHによる影響は見られず、環境水にそのまま適用が可能である。

5. クリーンアップ

固相ディスクで吸着した試料は極性のある溶媒で

Fig. 1. Influence of the Sample pH for Adsorption of Microcystin to Disk Solid Phase

溶出することから水中の有機物質も同時に抽出される。多量の試料を抽出し、マイクロシスチンが低濃度の場合は HPLC による測定では妨害があり、測定が困難となることからクリーンアップが必要となる。Tsuji ら¹⁰⁾は Sep-Pak Vac シリカゲルカートリッジを用い、溶出溶媒 10%水-0.1%TFA-メタノール 20 ml で溶出し良好な結果を得ている。ここではシリカゲル 1 g による処理ではマイクロシスチンが一部吸着せずに流出する現象が見られることから 2 g を用いクリーンアップを行っている。著者らもシリカゲル、フロリジルのカートリッジによる方法を試みた。マイクロシスチン各 1 μ g を含むメタノール溶液 1 ml を Sep-Pak フロリジル及び Sep-Pak シリカゲルカートリッジに通したのち、メタノールで溶出し 2 ml を 1 フラクションとして 8 フラクションを採取した。次に 0.2%TFA-10%水含有メタノールで溶出 2 ml を 1 フラクションとし、5 フラクションを採取し、各フラクションを HPLC に供し、各マイクロシスチンを測定した。この結果、フロリジルカートリッジ (900 mg 含有) による操作では、メタノール溶出ではマイクロシスチンは流出せずに固相カート

リッジに保持されていた。0.2%TFA-10%水含有メタノール溶出ではフラクション 1 から溶出したが 4 フラクション以降溶出せず、その回収率はマイクロシスチン -RR で 10%以下、-YR で 36%、-LR で 36%であり、フロリジルに吸着し、脱離が困難であった。一方、シリカゲルカートリッジ (690 mg 含有) はマイクロシスチン吸着後、メタノール溶出でマイクロシスチン -YR、-LR が一部脱離することが観察された。このことから、カートリッジ 2 本を連結して処理を行ったところ、メタノール 16 ml を通してもマイクロシスチンは溶出されず、カートリッジに保持された。次に 0.2%TFA-10%水-メタノールでクロマトグラフィーを行った結果、最初の画分 1 ml では溶出しなかったが、第 2 画分で 81-86%、第 3 画分で 8-19%溶出し、第 4 画分では 3 物質とも検出されず合計 5 ml でマイクロシスチンは溶出した。この操作で、マイクロシスチン -RR で 101.2%、-YR で 94.9%及び -LR で 95.1%と良好な回収率を示し、Tsuji らの報告したシリカゲルによるクリーンアップが有効であることが確認された。Fig. 2 に実試料 11 にマイクロシスチン各 1 μ g を添加し、ディスクで抽出したもの (Fig. 2A) とこれをシリカゲルクロマトグラフィーを行ったもの (Fig. 2B) を示す。

6. 検量線及び回収率

マイクロシスチンの標準各 0.2, 0.5, 0.7, 1.0 μ g/ml を HPLC により測定し、検量線を作成した。この結果、マイクロシスチン -RR で $y=2146x-26$, $r=0.999$, -YR は $y=2142x-17$, $r=0.998$, -LR は $y=2513x-12$, $r=0.998$ であり、いずれも直線性を示した。

実試料の湖沼水 11 にマイクロシスチン 1 μ g を添加して全操作を行ったものの回収率を求めた。その結果、マイクロシスチン -RR で回収率 102.3%, c.v. % = 3.4, -YR で回収率 103.2%, c.v. % = 4.0, -LR では回収率 91.2%, c.v. % = 5.2 を示し良好な結果を得た。

7. 浮遊物質を含む試料の抽出

マイクロシスチンを測定する対象となる水域は藍藻などプランクトンを含み、懸濁していることが多く、水中のマイクロシスチンを固相カートリッジで抽出する場合は、そのまま試料を処理すると目詰まりを起こすことから、あらかじめ浮遊物質をろ過してから行っている。溶存状態のマイクロシスチンを前処理せずにディスク型固相で抽出することを試みた。

Microcystis aeruginosa を含む環境水を試料として使用し検討を行った。本試料はアオコの発生して

Fig. 2. HPLC Chromatogram Showing (A) Pond Water Spiked with Microcystin RR, YR and LR. (B) Spiked Water after Silica Gel Chromatography

いる水域のもので、濁度約 250°, 浮遊物質として 35 mg/l を含むものである。この試料を用いて SDB ディスクに通したところ、280 ml でろ過不能となり適用できない。次に SDB ディスクの上にガラスフィルター (1 μ m) をのせ、さらにガラスビーズを 1 cm 積層したものに試料を加えて処理した。この結果、試料 500 ml を 15—25 分でろ過することができた。ここで試料 1 l を処理したところ、約 3 時間を要し実質的に 500 ml 程度の処理が可能であった。試料 500 ml にミクロシスチン各 1 μ g を添加したものを本方法によって処理し、回収率を求めたところ、ミクロシスチン -RR で 94.2%, -YR で 97.5%, -LR では 103.1% と良好な回収を示した。さらに、シリカゲルクロマトグラフィーを含む全操作を行ったものの回収率はミクロシスチン -RR で 84.9%, -YR で 84.5%, -LR で 85.7% であり、やや低い回収率を示したが、シリカゲルクロマトグラフィーの影響によると思われる。この結果から固相カートリッジでは処理できない試料を直接ディスク型固相で処理し、水中の溶存ミクロシスチンを測定できた。

8. 実試料への適用

ディスク型固相抽出は試料を迅速に吸着処理できる方法として適用できることから、実際の環境試料としてアオコが発生している水域の試料について測定を行った。

藍藻 *Microcystis aeruginosa* による“水の華”が発生している水域について 9, 10, 11 月に採取した。試料 4 l をガラスフィルターでろ過したのち、SDB ディスクに通し常法により処理を行ったところ、90 分程度で試料を通すことができた。純水を通した場合、約 30 分で処理することができるが、実試料では、ろ過後の試料中に 1 μ m 以下の微細な粒子が存在し、これを通すことによってディスクの目詰りが起こり処理に時間を要したと思われる。しかし、カートリッジ型固相では閉塞する場合もあり、大量の試料を抽出するにはディスク型の固相が有効であることが明らかである。

採取した試料の水と藻体中のミクロシスチンの濃度について測定を行った (Table 3)。9 月に採取した試料は、水中のミクロシスチンは -YR が不検出であったが、-RR 0.03 μ g/l, -LR 0.02 μ g/l を検出した。このときの藻体では -YR の 0.25 μ g/l をはじめ、-RR 1.25 μ g/l, -LR 0.62 μ g/l を検出した。ミクロシスチンは主に藻体の細胞に内蔵されているとされているが、ここでは約 1% 前後の溶出が認められた。10 月の試料では水試料で 3 物質を 0.02—0.05

Table 3. Concentration of Microcystin RR, YR and LR in Surface Water

Sample	RR (μ g/l)	YR (μ g/l)	LR (μ g/l)
Sample No. 1 (Sep. 25)			
Water	0.03	0	0.02
Cell	1.25	0.25	0.62
Release rate (%)	0.7	—	1.2
Sample No. 2 (Oct. 24)			
Water	0.05	0.02	0.05
Cell	3.67	1.21	2.03
Release rate (%)	1.3	1.6	2.4
Sample No. 3 (Nov. 21)			
Water	0	0	0
Cell	0.15	—	0.07
Release rate (%)	—	—	—

μ g/l で検出し、藻体からも 1.21—3.67 μ g/l を検出し、前回と同様に -RR が一番高濃度に検出され、次いで -LR, -YR であった。11 月の試料では水からはミクロシスチンは検出されず、藻体からも YR は不検出であり、検出された -RR (0.15 μ g/l), -YR (0.07 μ g/l) も低い値を示した。各試料中の *Microcystis* の細胞数を計測したものを Table 4 に示した。試料から *Microcystis* 約 20000—35000 個を検出したが、9 月、11 月の試料では *M. aeruginosa* が優占種となっており、10 月では *M. viridis* が優占種であった。ミクロシスチン量との比較で、ミクロシスチン濃度に依存して *Microcystis* 量も変動しているが、毒素を産生しない藻体もあり明確な相関は見られなかった。また、藻体を含む浮遊物質量が 9 月で 25.2 mg/l, 10 月で 17 mg/l であったのに対し、11 月では 8.5 mg/l とミクロシスチン濃度の月変動と同様な傾向が見られた。ミクロシスチンが藻体から水中に溶出することにより水道水源に混入する可能性を示したが、著者らの調査では約 1% が水中に溶出する結果を得た。辻ら¹⁴⁾ のアオコ発生湖沼の調査では、主にミク

Table 4. Cell Numbers of *Microcystis* in Surface Water

Algae	Sep. (n)	Oct. (n)	Nov. (n)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	12950	14605	10910
<i>M. viridis</i>	4740	17980	7700
<i>M. wesenbergii</i>	9785	3000	1465
<i>M. novcekii</i>	0	0	400
<i>Microcystis</i> spp.	730	0	310
Total	28205	35585	20785

ロシスチン -RR, -LR を検出しその溶出率は -RR で 0.6—4.5%, -LR で 0.3, 3.0% であった。また、田中ら¹⁵⁾は琵琶湖のアオコ発生地点でのマイクロシスチンの調査で、マイクロシスチン -YR, -LR を検出し、その溶出率が共に 4.8% であるとしている。このことからマイクロシスチンの藻体からの水中への溶出は 5% 以下であると考えられる。

Microcystis が発生している環境水域では藻体が分解することにより、マイクロシスチンの溶出が考えられることから、9 月に採取した試料を 7 日間放置し、挙動を見た。この結果、水中からはマイクロシスチンは全て検出せず、藻体からはマイクロシスチン -RR で $0.32 \mu\text{g/l}$, -YR で $0.05 \mu\text{g/l}$, -LR $0.12 \mu\text{g/l}$ を検出した。藻体中のマイクロシスチン約 80% 前後が分解していたが、水中には検出せず微生物などにより分解したものと考えられる。

ま と め

藍藻 *Microcystis* などが産生する毒性物質マイクロシスチンを水中から抽出する方法の検討及びこれを用いた環境試料の測定を行った結果、次のことが明らかになった。

1) スチレンジビニルベンゼンポリマー (SDB) のディスク型固相で 500—5000 ml のろ過試料水を処理し 10% 水—メタノールで溶離し、迅速に抽出が可能であった。

2) 藍藻などの浮遊物質を含む試料水を前処理することなしに直接ディスク型固相で抽出することができた。

3) *Microcystis* の発生する水域の水試料及び藻体からマイクロシスチン -RR, -YR, -LR をそれぞれ検出し、藍藻からの水域への溶出は約 1% であった。

以上のように、ディスク型固相による水中のマイクロシスチンの測定法を検討したが、Falconer ら¹⁶⁾の動物による毒性実験からのリスク評価によると水中のマイクロシスチンの水質ガイドライン値を $1 \mu\text{g/l}$ としており、試料量 500 ml で定量することができる。本抽出法により藻体の分離した試料、または、前処理なしで実試料を直接迅速に測定が可能である。また、環境水域にはマイクロシスチンを 0— $5 \mu\text{g/l}$ の範囲で検出しているが、塩素処理により分解することが知られており、通常の浄水処理により分解除去できるものと考えられる。

References

- 1) Ojanpera I., Pelander A., Vuori E., Himberg K., Waris M., Niinivaara K., *J. Planar. Chromatogr. Mod. TLC*, **8**, 69 (1995).
- 2) Harada K., Matsuura K., Suzuki M., Oka H., Watanabe M.F., Dahlem A.M., Boasley V.R., Carmichael W.W., *J. Chromatogr.*, **448**, 275 (1988).
- 3) Harada K., Tsuji K., Kondo F., *J. Jap. Soc. Wat. Environ.*, **17**, 545 (1994).
- 4) Murata H., Shoji H., Oshikata M., Harada K., Suzuki H., Kondo F., Goto H., *J. Chromatogr.*, **693**, 263 (1995).
- 5) Umetani T., Morizitsu K., *J. JWWA*, **65**, 26 (1996).
- 6) Poon G.K., Griggs L.J., Edwards C., Beattie K.A., Codd G.A., *J. Chromatogr.*, **628**, 215 (1993).
- 7) Nagata S., Soutome H., Tsutsumi T., Hasegawa A., Sekijima M., Sugamata M., Harada K., Suganuma M., Ueno Y., *Natural Toxin*, **3**, 78 (1995).
- 8) Lambert T.W., Boland M.P., Holmes C.F.B., Hrudey S.E., *Environ. Sci. Technol.*, **28**, 753 (1994).
- 9) Tsuji K., Naito S., Kondo F., Watanabe M.F., Suzuki S., Nakazawa H., Suzuki M., Shimada T., Harada K., *Toxicon*, **32**, 1251 (1994).
- 10) Himberg K., Keijola A.M., Hiisvirta L., Pyysalo H., Sivonen K., *Wat. Res.*, **23**, 979 (1989).
- 11) Lam A.K.Y., Prepas E.E., Spink D., Hrudey S.E., *Wat. Res.*, **29**, 1845 (1995).
- 12) Lawton L.A., Edwards C., Codd G.A., *Analyst*, **119**, 1525 (1994).
- 13) Moollan R.W., Rae B., Verbeek A., *Analyst*, **121**, 233 (1996).
- 14) Tsuji K., unpublished.
- 15) Tanaka Y., Takenaka J., Kitamori S., Proceeding of 30th Conference of Japan Society on Water Environment, p.74 (1996).
- 16) Falconer I.R., Burch M.D., Steffensen D.A., Choice M., Coverdale O.R., *Environ. Toxicol. & Water Quality, Int. J.*, **9**, 131 (1994).