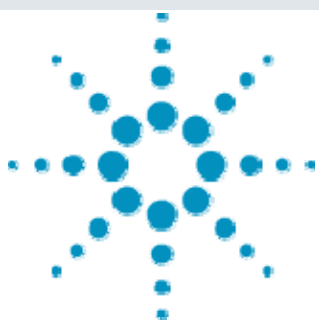




Agilent 6410 によるミクロシスチン類の高感度一斉分析



＜要旨＞ 河川水中ミクロシスチン RR, LR 及び YR の LC-MS/MS による高感度一斉分析法を検討しました。その結果、イオン源に ESI を用いることで、これらミクロシスチン類の高感度分析が可能でした。標準溶液による検出限界は 0.017、0.009 及び 0.08ng/mL でした。また、河川 500 倍濃縮液中においても濃縮液中濃度で 1ng/mL 相当で全てのミクロシスチンの検出が可能で、顕著なイオン化阻害も認められませんでした。

Key Words: ミクロシスチン、LC-MS/MS、MRM、河川水

1. はじめに

湖沼等の富栄養化の進行により発生する「水の華」と呼ばれるアオコは *Microcystis* 属等の淡水産のラン藻類であり、ミクロシスチン類と呼ばれる一連の毒性物質を産生します。これらミクロシスチン類は、強力な肝毒性と発がん性作用を併せ持つ化合物であり、本化合物が原因で馬や牛などの家畜が死亡する事件は世界各地で発生しています。更にブラジルでは、人工透析の際にミクロシスチンで汚染された水を使用したことが原因で、1996 年 2 月に 50 人が死亡する事件も発生しています。日本国内においても諏訪湖、霞ヶ浦、津久井湖などの湖沼で有害アオコが発生し、人への健康影響が危惧されています。WHO は平成 10 年 3 月、飲料水中のミクロシスチンの暫定ガイドライン値をミクロシスチン-LR として 0.001 mg/L に設定しました。我が国では全国湖沼の調査の結果、暫定ガイドライン値を超えるミクロシスチンは検出されなかったことから基準値は設定されていません。しかし、現在でもミクロシスチン類の環境中でのモニタリングは継続されています。そこで本研究においてミクロシスチン類の LC-MS/MS 法を用いた一斉分析法の検討を行いました。

2. 装置及び測定条件

分析条件は表.1 に示した通りです。カラムには逆相系 C18 を使用し、移動相には、アセトニトリル及び 0.1% ige 酸+10mM ige 酸アンモニウムによるグラジエント条件で測定しました。MS 条件はイオン源に ESI 法を使用した MRM 法で測定しました。

3. 結果及び考察

各ミクロシスチンの質量スペクトルは図.1 に示しましたが、MS1 によるフルスキャンで観察されたベースピークは全て 2 個イオン ($M+2H$)²⁺ でした。従って、これら

イオンをプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行いました。結果は全て共通イオン ($m/z=135$) が最も強度の強いプロダクトイオンでした。以上の結果 MRM 条件は表.1 の通りとしました。

表.1 ミクロシスチン類の LC-MS/MS 条件

LC	: 1200LC
Column	: ZORBAX Extend C18 (100mm, 2.1mm, 1.8um)
Mobile phase	: A: 0.1% HCOOH+10mM HCOONH ₄ , B: ACN 25%B--(10min)--35%B
Column temp	: 40°C
Sample volume	: 20uL
Flow rate	: 0.2mL/min
MS	: Agilent 6410 LC-MS
Ionization	: ESI
Drying gas	: 10L/min at 350°C
Nebulizer gas	: 345kPa
Fragmentor	: 100V

No	Name	Precursor	Target	Qualifier	CE1	CE2	R.time	TS
1	Microcystin-RR	520.0	135	200	30	35	5.45	1
2	Microcystin-YR	523.5	135	507	10	5	8.73	2
3	Microcystin-LR	498.5	135	482	15	10	9.36	2

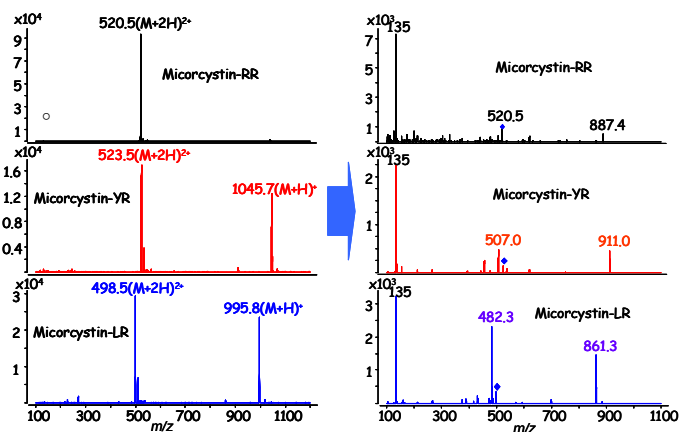


図.1 各ミクロシスチンの質量スペクトル (左:MS1 フルスキャンスペクトル、右:MS2 プロダクトイオンスキャンスペクトル)



Agilent Technologies

図.2 には標準溶液による各ミクロシスチンの MRM クロマトグラムを示しました。0.1ng/mL の各ミクロシスチンの S/N 比(Peak to Peak)は 17.4, 31.2 及び 35.3 でした。従って S/N=3 で定義した検出限界は 0.017, 0.009 及び 0.008ppb でした。直線性は各ミクロシスチンの検量線を図.3 に示しましたが 20-0.1ng/mL 範囲での決定係数は 0.9998, 0.9998 及び 0.9997 と非常に良好でした。

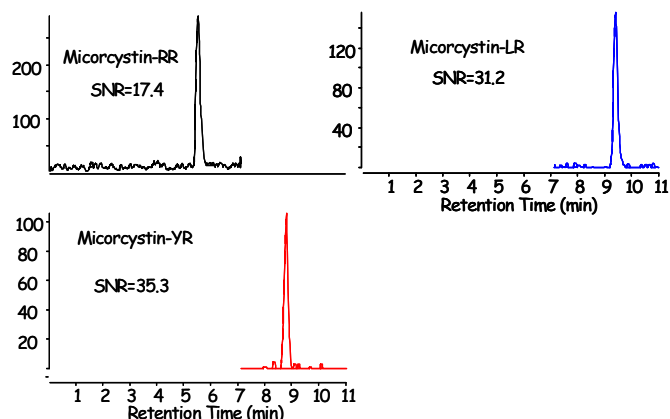


図.2 各ミクロシスチンの MRM クロマトグラム (0.1ng/mL)

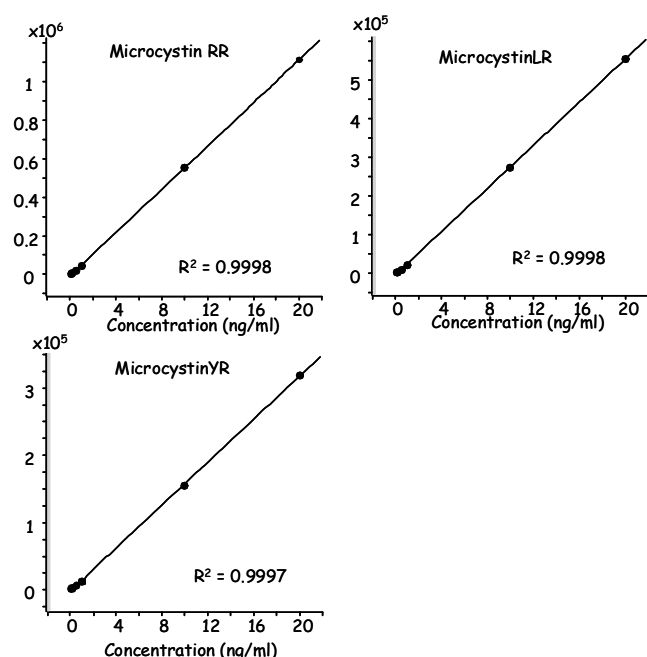


図.3 各ミクロシスチンの検量線

実試料には河川水を用いましたが、河川水は固相抽出法にて 500 倍濃縮しました。この河川濃縮液に 1ng/mL 相当の 3 種ミクロシスチンを添加した試料の MRM クロマトグラムを図.4 に示します。結果、河川濃縮液においても各ミクロシスチンは妨害ピークの影響もなく検出が可能でした。また同一濃度の標準溶液と比較した各ミクロシスチンの相対強度は 82, 91 及び 84%であり、河川 500 倍濃縮液においてもマトリックスによる顕著なイオン化阻害は認められませんでした。

従って、外部標準検量線を用いた絶対検量線法による定量が可能と考えられます。

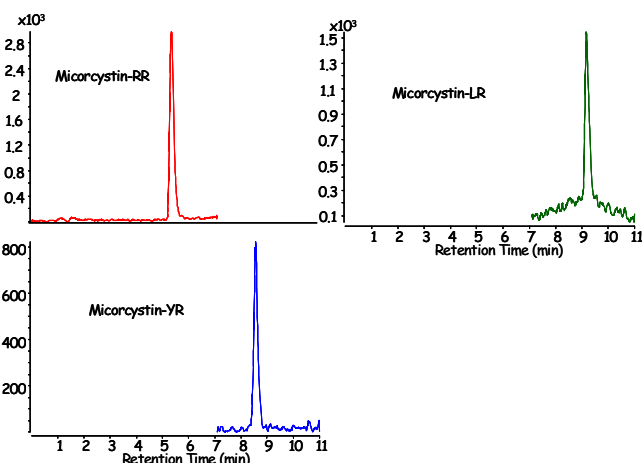


図.4 河川濃縮液中各ミクロシスチンの MRM クロマトグラム (濃縮液中添加濃度:1ng/mL)

4. まとめ

今回、LC-MS/MS を用いた河川水中のミクロシスチン-RR、ミクロシスチン-YR 及びミクロシスチン-LR の一斉分析法を紹介しましたが、ESI 及び MRM 法を使用することで 0.1ng/mL 以下の高感度分析が可能でした。また、河川 500 倍濃縮液中においても 1ng/mL での検出が可能であり、顕著なイオン化阻害がなく絶対検量線法による定量が可能でした。

【LCMS-200901TK-002】

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1
www.agilent.com/chem/jp