

第3章 調査研究・報告

第1節 原 著

¹⁵N-標識マイクロシスチンを用いたLC/MS/MSによるマイクロシスチン類の定量

荒堀康史・兎本文昭

Accurate Quantitative Analysis of Microcystins by LC/MS/MS using per-¹⁵N-labeled microcystins

Yasushi ARAHORI and Fumiaki UMOTO

マイクロシスチン類各成分の高精度定量方法として、¹⁵Nで標識したマイクロシスチンをサロゲートとして用い、LC/MS/MSで測定する方法について検討した。本方法ではマイクロシスチン-FR, LR, 7dmLR, RR, WR, YRについて検討したところ、定量下限値は1.5-5.0ng/mLが得られた。また、本方法を用いて実試料の測定を行い、環境省の要調査項目等調査マニュアル記載の、マイクロシスチン類をMMPBに酸化して総量として測定する方法と比較したところ、妥当な結果が得られた。

緒言

飲料水用や灌漑用として用いられているダム湖、ため池等では、富栄養化によりアオコが発生することがある。アオコを形成する生物の中には有毒物質を生産するものがあり、よく知られているものとして、マイクロシスチンを生産するシアノバクテリアがある。マイクロシスチンの毒性は動物には肝臓毒として知られており^{1,2)}、植物に対する成長阻害についても報告がある²⁻⁵⁾。このためマイクロシスチン類については、水道水質基準では要検討項目として、水環境面では要調査項目のリストに入っており、知見の集積が必要な物質の一つとなっているが、全国的に網羅されているとは言いがたい。

マイクロシスチン類の分析方法としては、上水試験方法⁶⁾や衛生試験法⁷⁾ではHPLCによるマイクロシスチン-LR, YR, RRの分析方法が、環境省の要調査項目等調査マニュアルでは、マイクロシスチン類を酸化して2-methyl-3-methoxy-4-phenyl butyric acid (MMPB)としてLC/MSもしくはGC/MSによるマイクロシスチン類総量としての分析方法が記載されている。今回、マイクロシスチン類個別成分の高精度分析手法の確立を目的として、地方環境研究所等と国立環境研究所とのII型共同研究に参加し、この共同研究で用いている、佐野らにより開発された⁸⁾ ¹⁵N標識マイクロシスチンをサロゲートとして用いる方法について検討した。この方法はLC/MS/MS測定で問題となる共存物質によるイオン化阻害やイオン化促進を補正して高精度で定量出来る利点がある。さらに、上水試験方法で規定されている上記3物質に加えてマイクロシスチン-FR, WR,

7dmLRについても検討した。

方法**1. 対象物質**

マイクロシスチン-FR, LR, 7dmLR, RR, WR, YR各成分

表1 HPLCの条件

カラム	Ascentis Express C18	SUPELCO 株式会社製
	100mm×2.1mmID 2.7μm	
移動相A	ギ酸0.1%	ギ酸アンモニウム10mM
移動相B	メタノール	
	0→3分	A:70%, B:30% curve 1
	3.0→15.0分	A:70→20%, B30→80% curve 6
	15.0→20.0分	A:20%, B:80% curve 1
	20.0→20.1分	A:70%, B:30% curve 1
Cycle Time	25分	
流速	0.2mL/分	
カラム温度	40℃	
注入量	10μL	

表2 質量分析計の条件

イオン化モード	ESI Positive
Nebulizer Gas	12
Curtain Gas	10
Collision Gas	12
Ion Spray Voltage	5500V
Temperature	200℃

2. 試薬

マイクロシスチン各成分及び¹⁵N標識マイクロシスチンは独立行政法人国立環境研究所環境計測研究センターより頂いた。メタノール、アセトニトリル及び超純水はLC/MS用、ギ酸及びギ酸アンモニウムはHPLC用、酢酸、炭酸カリウム、亜硫酸ナトリウム、過マンガン酸カリウム、リン酸、過ヨウ素酸カリウムは試薬特級、MMPBナトリウム塩及びMMPB-d3ナトリウム塩は標準品（以上和光純薬工業社製）を用いた。

3. 装置

LC/MS/MSはHPLC部がWaters社製Alliance2695、質量分析計がApplied Biosystems社製API-3000を用いた。

4. 測定条件

1) HPLCの条件

表1のとおり

2) 質量分析計の条件

測定モード：MRM

測定イオン：表3に示す

結果

1. 質量分析計の条件

分析対象物質1μg/mLメタノール溶液を用いてインフュージョン法により質量分析計に導入し、測定するプリカーサイオン及びプロダクトイオンのm/z, DP (Declustering Potential), FP (Focusing Potential), CE (Collision Energy), CXP (collision cell exit potential) 各値の最適値を求めた。

各成分のプリカーサイオンは、マイクロシスチン-RRはポジティブモードで二価イオン[M+2H]²⁺が、それ以外のマイクロシスチン類では[M+H]⁺が主として生成した。プロダクトイオンは今回検討した全てのマイクロシスチン類でm/z=135の強度が最も高かった。質量分析計の各設定値については、マイクロシスチン-RRだけが二価イオンを測定しているためか、FPとCEの最適値が他の成分と違う値となったが、他の成分に関しては、最適値はほぼ同じ値となった。¹⁵N標識マイクロシスチンに関しては、ネイティブ体と同じ値を用いることにした。プリカーサイオンについては、当センターと同様にマイクロシスチン-LR, YRについては一価イオンを用いて測定している報告⁹⁾もあるが、二価イオンの方が検出強度が強いとの報告¹⁰⁾もあり、使用する機種による違いと考えている。

続いてフローインジェクションアナリシスでCUR (CurtainGAS), CAD (Collision GAS), IS (Ion Transfer

表3 各物質の測定イオンと質量分析の設定

物質名	測定イオン		DP [V]	FP [V]	CE [V]	CXP [V]
	プリカーサイオン[m/z]	プロダクトイオン[m/z]				
マイクロシスチン-FR	1029.6	135.0	56	240	101	22
マイクロシスチン-LR	995.6	135.0	56	230	87	22
マイクロシスチン-7dmLR	981.7	135.0	61	260	103	22
マイクロシスチン-RR	520.1	135.0	56	180	49	22
マイクロシスチン-WR	1068.7	135.0	56	250	85	22
マイクロシスチン-YR	1045.7	135.0	66	270	81	22
¹⁵ Nマイクロシスチン-FR	1039.4	135.0	56	240	101	22
¹⁵ Nマイクロシスチン-LR	1005.5	135.0	56	230	87	22
¹⁵ Nマイクロシスチン-7dmLR	991.5	135.0	61	260	103	22
¹⁵ Nマイクロシスチン-RR	526.3	135.0	56	180	49	22
¹⁵ Nマイクロシスチン-WR	1079.5	135.0	56	250	85	22
¹⁵ Nマイクロシスチン-YR	1055.5	135.0	66	270	81	22

表4 各物質の測定イオンと質量分析の設定

	IDL [ng/mL]	IQL [ng/mL]
マイクロシスチン-FR	0.90	2.30
マイクロシスチン-LR	1.27	3.27
マイクロシスチン-7dmLR	1.96	5.04
マイクロシスチン-RR	0.59	1.52
マイクロシスチン-WR	1.91	4.91
マイクロシスチン-YR	1.77	4.56

※IDL…装置検出下限値
IQL…装置定量下限値

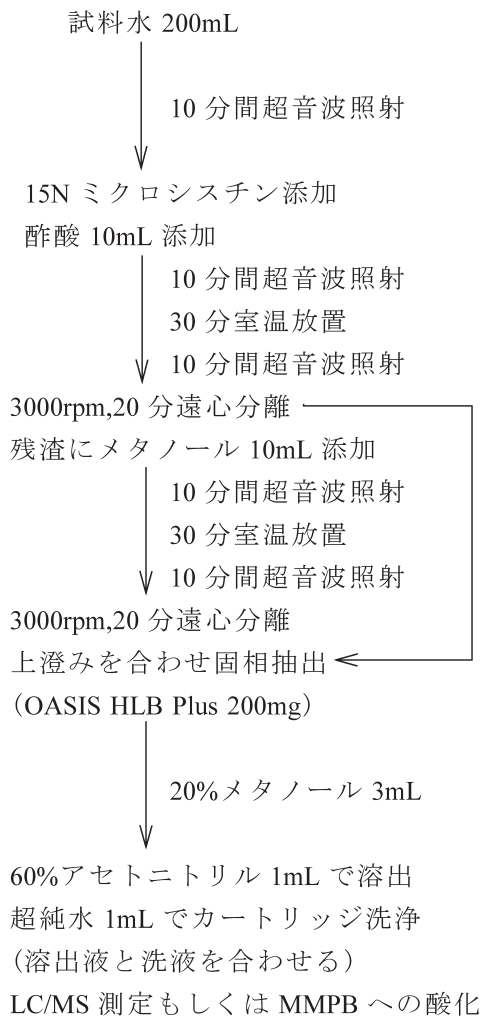


図1 試料水の前処理方法

Voltage), TEM (Temperature), 質量分析計の各条件を変更した結果, 表2に示す条件で感度が最も高かった. Nebulizer Gasに関しては, 8, 10, 12, 14の値で検討したが, 明確な傾向は見られなかった. Curtain Gasに関しては, 8, 10, 12, 14の値で検討した結果, 10の時に感度は最大となったが12以上では低下する傾向が見られた. Collision Gasについては2, 4, 6, 8, 10, 12で検討し

表5 個別定量の和とMMPB法の比較

採取地点	個別定量の和	MMPB 法
A	13.3	12.4
B	6.1	4.8
C	<0.1	<0.1
D	<0.1	<0.1

た結果, 値が大きいほど感度が向上し, 12の時には2の時の2倍以上になった. Ionspray voltageについては, 3000から5500まで500刻みで検討した結果, 電圧を上げるほど向上し5500で3000の時の4倍程度となった.

HPLCのカラムはSUPELCO社製Ascentis Express C18 100mm, 移動相はギ酸0.1%, ギ酸アンモニウム10mMとメタノールを用いた. 表1の条件で行ったところ, 各物質のピークを分離することが出来た.

2. 定量下限値について¹¹⁾

各物質の定量下限値は, 環境省総合政策局環境保健部環境安全課より示された平成20年度環境省化学物質環境実態調査の方法を参考に, S/N比が10前後となる2ng/mLの濃度でn=7の条件で行った. 結果を表4に示す.

3. 実試料の測定

奈良県内にある溜池から試料を採取し, 本方法で測定を行った. 試料の前処理方法については, 環境省要調査項目等調査マニュアルによる方法で行った. 測定方法のフローについて, 図1に示す.

参考として, 同マニュアルに記載の方法であるマイクロシスチン類をMMPBに酸化して, ミクロシスチン類総和を求める方法(以下MMPB法)についても行い, 結果を表5に示した. 個別に定量した各成分の和と, MMPB法で求めたマイクロシスチン類総和との比較は, 妥当な結果が得られた. 個別の成分については, ミクロシスチン類が検出された試料A, Bでは共にマイクロシスチン-LRとRRが検出された. 濃度が高い試料Aからは, ミクロシスチン-7dmLRも検出されたが, 今回測定した試料からはその他のマイクロシスチン類は検出されなかった.

考 察

マイクロシスチン類のLC/MS/MSによる定量に, ¹⁵N標識体を用いることは, 高精度な定量分析に有効な方法であった. プリカーサイオンの選択は, 物質の種類や用いる機器により, 一価のイオンを選択した方が感度が良い場合と, 二価のイオンを選択した方が良い場

合がある。プロダクトイオンについては、物質やプロダクトイオンの価数に関わらず、 $m/z=135$ が高感度であった。個別定量した各物質の和が、MMPB法より大きくなったのは、MMPBへの酸化反応の収率が100%ではないためと考えられる。

謝 辞

本研究で使用した貴重なマイクロシスチン類の標準品及び ^{15}N ラベル化体標準品等、並びに分析に関する技術指導を頂きました国立環境研究所環境計測センターの佐野先生、分析に関する詳細についてご教示いただきました福岡県保健環境研究センターの田中様、飛石様をはじめ、共同研究者の皆様に感謝いたします。

文 献

- 1) 渡辺真利代, 原田健一, 藤木博太他: アオコーその出現と毒素一, 80 (1994), (財)東京大学出版会
- 2) 彼谷邦光: 飲料水に忍び寄る有毒シアノバクテリア

- 3) Jacqui McElhiney, Linda A. Lawton, Carlo Leifert: *Toxicon*, **39**, 1411-1420 (2001)
- 4) Anja Peuthert, Stephan Pflugmacher: *Toxicon*, **56**, 411-417 (2010)
- 5) 上水試験方法2001年版, 501-505 (2001), (社)日本水道協会
- 6) 衛生試験法・注解2000, 785 (2000), 日本薬学会編
- 7) 環境省環境管理局水環境部企画課: 要調査項目等調査マニュアル (H15.3), 164-172 (2003)
- 8) Tomoharu Sano, Hiroo Takagi, et al: *Anal Bioanal Chem*, **399**, 2511-2516 (2011)
- 9) 中村忠貴, 津田泰三, 一瀬諭他: 琵琶湖環境科学研究センター研究報告書 (H16), 107-113 (2005)
- 10) 飛石和大, 田中義人, 熊谷博史他: 第20回環境科学討論会講演要旨集, 783-784 (2011)
- 11) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課: 化学物質環境実態調査の手引き (平成20年度版), 76-80 (2009)

奈良県内河川水及び地下水の有機フッ素化合物濃度実態調査

荒堀康史・兎本文昭

A Survey of Perfluorinated Organic Compounds in the Rivers and Ground Water of Nara Prefecture

Yasushi ARAHORI and Fumiaki UMOTO

奈良県内の河川水及び地下水の有機フッ素化合物（PFCs）濃度の実態調査を行った。河川水については、宇陀川流域の一部地点で、他ではあまり見られないPFUdAを検出した地点があった。地下水については、各成分の割合で見るとPFOAの比率が高く、PFHxAやPFNAを検出した地点もあった。PFOAとPFHxAについては、一部の地点で100ng/Lを超える濃度で検出した。河川水と近接する地点の地下水の各成分の比率は、PFOS類はPFOSが主成分であったがPFOA類では地点により成分の相違が見られた。

緒言

有機フッ素化合物の一種であるPFOA及びPFOSについては、世界各地の環境中から検出され、国際的には残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約の新規対象物質に追加されている。日本でもPFOAが化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律の第二種監視化学物質に、PFOSが同法第一種特定化学物質に指定されている。環境調査については、地方公共団体環境研究機関等と国立環境研究所との共同研究（Ⅱ型）で「有機フッ素化合物の環境実態調査と排出源の把握について」という課題で多くの機関が参加する等、水環境に関しては河川の汚染状況の調査が進んでいる。奈良県でもⅡ型共同研究に参加して環境実態調査に取り組んでおり、河川水及び地下水の調査を行った^{1, 2)}。地下水については、河川水と比べると報告は少ないが、奈良県では奈良盆地内の河川は大和川しか無いため、昔から溜池や井戸が重用されてきた歴史的経緯がある。そのため今も生活用水としての井戸もあり、深さも数メートル程度のものが多い。このような井戸は地表面からの影響を受けやすく、汚染されている可能性がある。そのため本調査では地下水も対象とした。

方法

1. 対象物質

既報¹⁾と同様、カルボン酸類についてはC₆-C₁₄及びC₁₆のもの、スルホン酸類についてはC₄, C₆, C₇, C₈, C₁₀及びPerfluoro-7-methyloctanesulfonate (i-PFNS) の17物質を対象とした。

2. 試薬

ペルフルオロオクタン酸及びその同族体、ペルフルオロオクタンスルホン酸及びその同族体はCUS-PFC-MXA及びCUS-LPFOSを、それぞれの物質の¹³Cラベル化体はCUS-M8PFOS及びCUS-MPFC-MXA混合標準品（以上WELLINGTON LABORATORIES社製）、メタノールはLC/MS用、アンモニア水は試薬特級、酢酸アンモニウムはHPLC用、アセトニトリルはLC/MS用、超純水はLC/MS用、固相抽出カートリッジはPFC-Ⅱ（以上和光純薬工業株式会社製）を用いた。

3. 前処理方法

試料水100-1000mLに内部標準物質を添加した後、予めコンディショニングした固相カートリッジに毎分10mLの速度で通水した。固相カートリッジを窒素ガス吹きつけにより乾燥後、0.1%アンモニア含有メタノール5mLで溶出した。この溶液を窒素ガス吹きつけにより1mLに濃縮して試験溶液とした。

4. 装置

LC/MS/MSはHPLC部がWaters社製Alliance2695、質量分析計がApplied Biosystems社製API-3000を用いた。

5. 測定条件

1) HPLCの条件

既報¹⁾と同じく、カラムはGL Science社製Inertsil ODS-4を用い、移動層は10mM酢酸アンモニウム及びアセトニトリルを用いた。

2) MSの条件

既報¹⁾と同じく、イオン化はESI Negativeモードで、

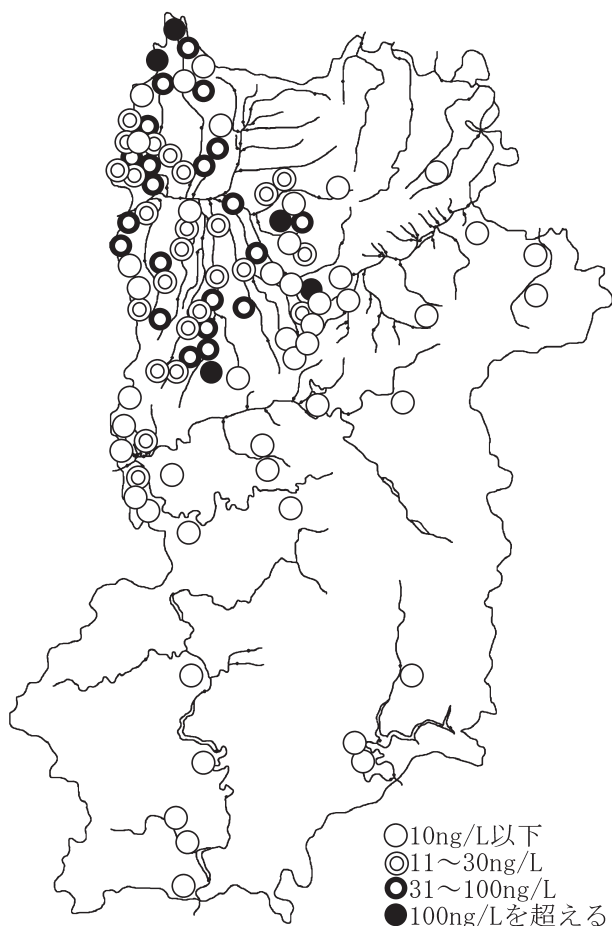


図1 地下水のPFOA濃度

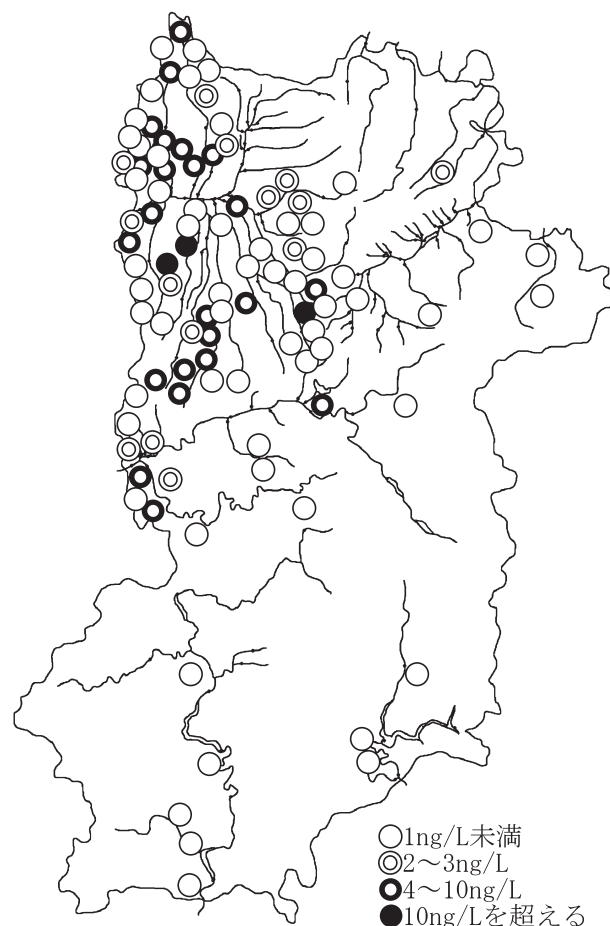


図2 地下水のPFOS濃度

データ採取はMRMモードで行った。

結果

地下水の調査結果について、PFOA濃度を図1に、PFOS濃度を図2に示す。有機フッ素化合物による汚染箇所は、県北西部を流域とする大和川流域及び県中部を東から西へ流れる紀の川流域の下流付近で多く存在した。各成分の割合については、PFOAが主であることが多いが、地点によってはPFOAとPFNA、PFOAとPFHxAあるいはPFHxAからPFNAの複数の成分が近い濃度で検出されることがあり、成分の割合は一律では無い。100ng/L以上の高濃度で検出したのはPFOAとPFHxAであった。また、炭素鎖の長さで見ると、ペルフルオロカルボン酸類ではよく検出するのはC=9であるPFNA迄で、それ以上炭素鎖が長くなると検出頻度・濃度共に少なくなり、C=13であるPFTrDAとそれ以上炭素鎖の長さが長い物質は検出しなかった。ペルフルオロスルホン酸類は検出しない地点が多く、検出した場合はPFOSのことが多かった。PFBSやPFHxSも検出したが、PFHpSは1地点のみでiPFNSとPFDSは調査したすべての地点で検出なかった。多くの地点ではPFOA濃度が高い地点では

PFOS濃度も高いことが多く、PFOS/PFOAの割合は1/3-1/20程度の地点が多い。しかし、一部の地点では特定の成分が高い濃度で検出された地点もあり、このような場合にはこの比率から大きく外れる場合もあった。また、特定の地点ではPFOAよりPFHxAの濃度が高い地点を13箇所発見した。これらの地点を図3に示す。図よりこれらの地点は大和川流域では特定の支川流域に集中している。PFHxAの濃度は1地点で100ng/Lを超えたが、その他12地点の平均30ng/LでPFOAの汚染より濃度は低いものの、代替物質による汚染も進行していた。

河川水については、前年度調査を行っていない宇陀川（淀川水系）について調査を行った。調査地点を図4に示す。⑭及び⑮の地点ではほとんど検出しなかった。この付近にはし尿処理場や宅地等があるが、この間で濃度が上昇していないことから、大きい排出源ではないことが確認された。一方、⑯の芳野川合流手前（宇陀川）及び⑰の芳野川流末地点では、他では見られないPFUdAがそれぞれ110ng/L及び77ng/L検出された。同時にPFNAも10ng/L及び11ng/Lと他の地点より高濃度で検出した。一方PFOA及びPFHxAは⑯の地点でそれぞれ6ng/Lと1ng/L、⑰の地点でそれ

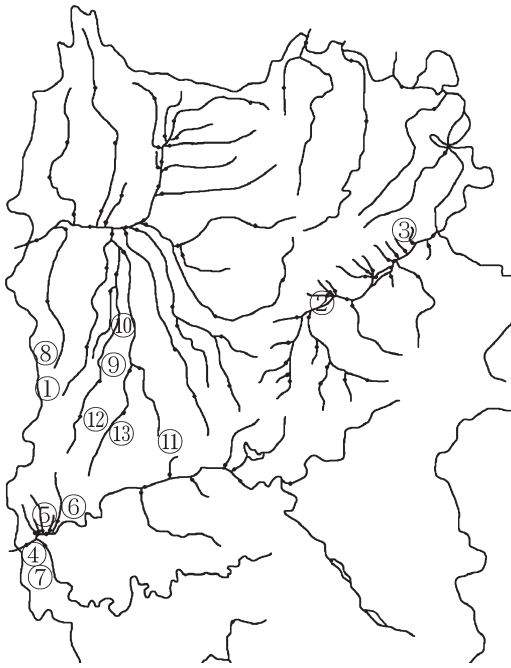


図3 地下水からPFHxAが高濃度で検出された地点

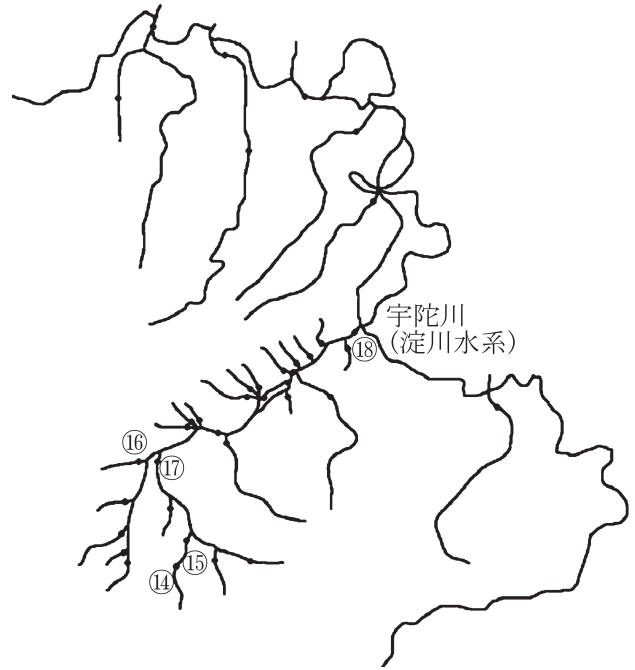


図4 宇陀川（淀川水系）の調査地点

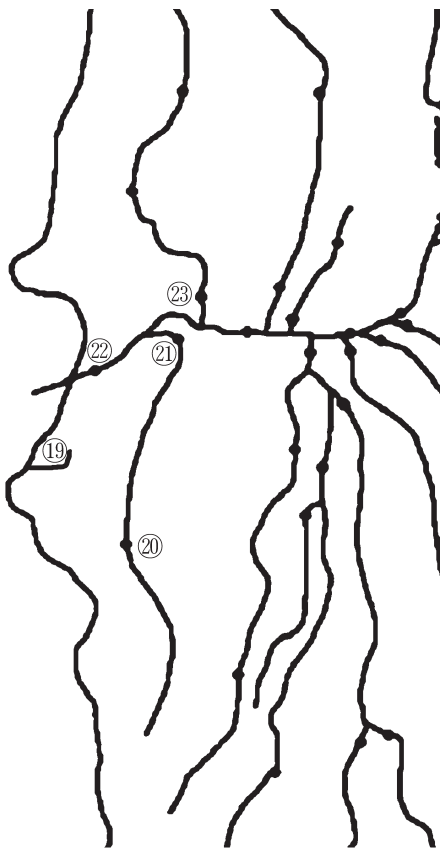


図5 竜田川・葛下川流域の採水地点

ぞれ5ng/Lと2ng/Lのように低濃度であり、他の地点とは違う由来によると考えられた。宇陀川の奈良県側最下流地点である⑱の辻堂橋では、PFHxAが1ng/L、PFOA及びPFNAがそれぞれ2ng/Lと3ng/Lで、濃度が大きく低下している。

地下水調査を行っている中で、濃度が高い地域が

いくつか見つかった。その中から今回、竜田川・葛下川流域について詳細調査を行った。調査地点を図5に示す。河川水採水地点の⑲の原川と⑳の新橋は別の河川であるが、付近は共に住宅及び学校の中を流れていた。これらの地点での濃度はPFOAが23ng/Lと20ng/L前後、PFNAが11ng/Lと13ng/Lと近い値で、PFOSは5ng/Lと4ng/Lであり、その他の成分も近い値であった。㉑のだるま橋では多くの成分は㉒とほぼ同じ濃度であったが、PFHxAの濃度が9ng/Lから29ng/Lに上昇しており、この間に何らかのPFHxA排出源があると思われる。㉓の竜田大橋については、PFHxA-PFUdA及びPFBS-PFOSと炭素鎖の長さが様々な物質を検出した。これらの地点の地下水については、⑲⑳付近の地下水はPFOAがカルボン酸類のうち60%以上を占めているが、河川水⑲のPFOAの割合は43%、同⑳のPFOAの割合は41%であった。一方スルホン酸類は両地点及びその付近の地下水ともにPFOSの割合が75%以上で変化は無かった。河川水㉓の地点での検出状況は、カルボン酸類はPFHxA14ng/L、PFHpA10ng/L、PFOA51ng/L、PFNA26ng/Lが主であり、PFDAやPFUdAも検出した。スルホン酸類もPFBSからPFOSまで1-7ng/L検出した。一方その付近で採取した地下水では、PFOAが主成分でスルホン酸類は検出しなかった。この上流付近で採取した地下水からは、PFOA以外にPFHxAやPFHpAも検出し、スルホン酸類も検出した。しかし、PFUdAは検出しなかった。

試料によっては、クロマトグラム上で同じm/zであ

るが、リテンションタイムが標準品の少し前にも物質が検出されることがあった。

考 察

地下水からも多くの地点から有機フッ素化合物が検出され、地下水も汚染が進行していることが明らかとなった。

既報^{1,2)}にある河川水調査の報告で、各規制に対応するため炭素鎖の短い化合物に移行する動きが、河川水の調査より見られることを報告した。他府県市からも同様にPFOA→PFHxA^{3,4)}、PFOS→PFHxS⁵⁾、PFOS→PFBS⁶⁾等の報告があり、奈良県だけではなく、日本各地で類似の現象が報告されている。また、一部の河川から他ではあまり見られないPFUdAのように炭素鎖の長い化合物は、検出する頻度は少ないものの、特定の場所で検出することが報告されており⁷⁻⁹⁾、特異な発生源があると思われる。

地下水と近隣の河川水の各成分比率は、相違が見られた。調査井戸の水面は地表から数m程度の井戸が多く、不圧地下水の可能性が高いが、日本の地下水とりわけ不圧地下水は流速が速いため¹⁰⁾、数年程度のうちに成分比率が変わっていったか、浸透中に成分比率が変化したと考えられる。

一部の試料で本来のピークの前に別のピークが見られる現象については、標準品で用いた直鎖の化合物では無く、Langloisにより同定されている¹¹⁾炭素鎖に枝分かれのある化合物と推定される。異性体についての報告¹²⁾もいくつかあり、異性体の比率の違いは発生源や汚染経過の違いによるものと思われる。

謝 辞

本研究は、平成23、24年度地方公共団体環境研究機関等と国立環境研究所との共同研究「有機フッ素化合物の環境実態調査と排出源の把握について」の一環として実施したものであり、関係者の皆様に感謝致します。

文 献

- 1) 荒堀康史, 浅野勝佳, 兎本文昭: 奈良県保健環境研究センター年報, **46**, 46-50 (2011)
- 2) 荒堀康史, 浅野勝佳, 高木康人他: 第39回環境保全・公害防止研究発表会講演要旨集, 70-71 (2012)
- 3) 上堀美智子, 清水武憲, 大山浩司: 全国環境研会誌, **36**, 44-50 (2011)
- 4) 八木正博, 山路章, 渋谷一郎: 第12回日本水環境学会シンポジウム, 106-107 (2009)
- 5) 宗かよこ, 小原浩史, 平野真悟他: 福岡市保健環境研究所年報, **36**, 41-46 (2011)
- 6) 浦山豊弘, 前田大輔, 吉岡敏行他: 第20回環境化学討論会講演要旨集, P-078 (2011)
- 7) 竹峰秀祐, 吉田光方子, 松村千里他: 兵庫県環境研究センター紀要, **1**, 12-18 (2009)
- 8) 中島純夫, 南部佳弘, 水嶋好清他: 札幌市衛生研究所年報, **37**, 77-89 (2010)
- 9) 田中周平: 平成19年度河川整備基金助成事業成果報告書 (2007)
- 10) 岩田進午, 喜田大三編: 土の環境圏, 341-347 (1997), 株式会社フジ・テクノシステム
- 11) Langlois Ingrid: Mass spectrometric isomer characterization of perfluorinated compounds in technical mixture, water and human blood., PhD Thesis, University of Basel, Faculty of Science (2007)
- 12) 吉澤正, 清水明, 宇野健一: 千葉県環境研究センター年報, **7**, 210-215 (2009)