

魚介類中のマイクロシスチン分析

環境衛生課 大窪かおり
食品化学課 松尾彩水

キーワード：マイクロシスチン LC/MS/MS LC/TOF MS

1. はじめに

マイクロシスチン(MC)は多くの同族体を持つ藍藻由来の毒素で、水道水質における要検討項目として目標値 (MC-LR として 0.0008mg/L) が定められている。近年諫早湾干拓調整池でしばしば発生がみられるとの報告¹⁾があり、開門調査が行われることになれば隣接する佐賀県でも有明海産の魚介類への影響が懸念され、魚介中のマイクロシスチンの定量方法を確立することから、LC/MS/MS および LC/TOFMS を用いてマイクロシスチンの分析法を検討した。

2. 方法

試料は有明海産表示のある市販のアサリを 3%食塩水に浸けて泥を吐かせた後、むき身にしてホモジナイザーで均一化したものを用い、図1に示すフローで抽出を行った。²⁾

回収試験は、MC-LR、LC-RR、MC-YR の標準液を用いて 1ng/g または 20ng/g の濃度で試料を調製し、試料と同様に各3検体ずつ前処理を行った。

抽出試料は LC/MS/MS または LC/TOFMS を用いて下記分析条件で測定した。³⁾また、解析は Agilent Mass Hunter (定性・定量) で行った。

【LC】 Agilent1200EL

カラム：ZORBAX Eclipse plusC18 2.1×100mm 3.5μm

移動相：A 0.1%ギ酸+10mM ギ酸アンモニウム

B アセトニトリル

A:B(time)70:30(0分)→50:50(10分)→10:90(15分)

流量：0.2mL/min

注入量：10μL

【MS】 Agilent6460(MS/MS), Agilent6540(TOF MS)

イオン化：AJS-ESI, (Positive)

乾燥ガス：N₂, 350°C, 10L/min、ネブライザー：N₂, 50psig、シースガス：400°C, 11L/min

キャピラリー電圧：4000V、フラグメンター電圧：100V

SCAN 範囲：200~1200(m/Z)、リファレンスマス (LC/TOFMS のみ)：922.0098

コリジョンエネルギー (LC/MS/MS のみ)：MC-RR 30, MC-YR 5, MC-LR 5

プリカーサイオン→プロダクトイオン (LC/MS/MS のみ)：

MC-RR 519→135, 200, MC-YR 523→135, 507, MC-LR 498→135, 482

試料(1g)
↓
抽出 80%MeOH(10mL)
↓ 超音波抽出(30分)
遠心分離
↓ 3,500rpm/min(10分)
洗浄(2回)
↓ n-ヘキサン(4mL)
希釈
↓ ミリQ水(40mL)
固相抽出 (GL-Pak PLS)
↓
洗浄
↓ 水20mL→20%MeOH20mL
溶出
↓ 80%MeOH 3mL
乾固
↓ N₂パージ

3. 結果と考察

① LC/MS/MS による定量

定量はLC/MS/MSで行い、その結果試料中のマイクロシチンはすべて0.2ng/g未満であった。

回収試験結果は表に示すとおりで、低濃度で42~66%、高濃度で68~81%の回収が得られた。低濃度では定量値のばらつきが大きく、高濃度では比較的安定した回収が得られた。

MC-RRに比べてMC-YRおよびMC-LRは感度が低いため、特に低濃度回収試験ではバックグラウンドノイズの影響を大きく受けやすかったと思われる。

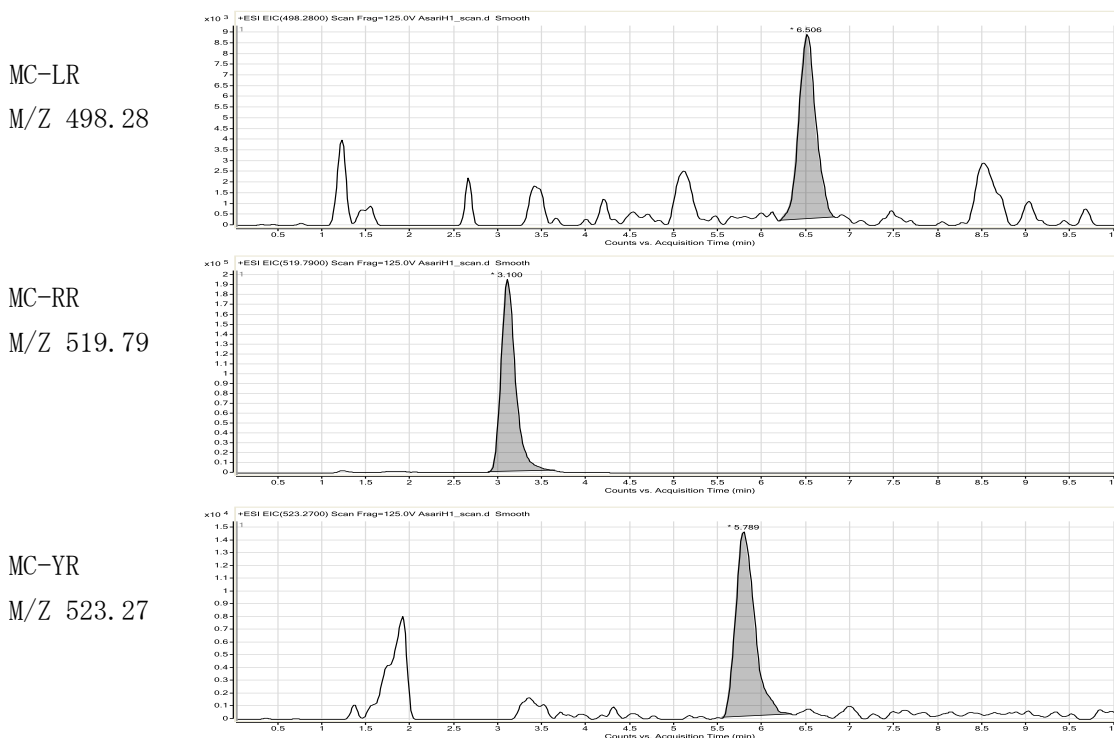
② LC/TOF MS による定性

四重極型質量分析計のMS/MSでは、プロダクトイオンスキャンを行うには感度が十分でなく、定量は全てMRMモードで測定した。MRMモードは選択性が高いがターゲット化合物以外の測定はできないことから、他のMC同族体も含めた同定の可能性も考慮して精密質量の測定が可能なTOF MSを用いて測定を行った。回収試料中の各MCのマスクロマトグラムの一例を示す。(図2)

表1 回収試験結果

1ng/g	平均回収率	CV
RR	66%	11%
YR	63%	8.3%
LR	42%	18%
20ng/g	平均回収率	CV
RR	81%	4.6%
YR	71%	2.1%
LR	68%	2.5%

図2 LC/TOF MSによるアサリ抽出液のマスクロマトグラム



TOF MSのスキャンモードでの測定時もMS/MS測定時同様、MC-RRの感度が最も高く、MC-YRおよびMC-LRは低濃度回収試験試料では検出が困難であった。

MCの測定においては2価イオン[M+H]²⁺が多く検出され、MS/MS測定時のプロダクトイオンではAdda残基由来のm/z135がいずれの同族体においても検出されるという共通点があることから、アオコ抽出試料に対して更に精密質量から表2に示すデータベースを用いて他の同族体⁴⁾の検索を試みた。

表2 ミクロシスチン同族体⁴⁾の精密質量

MC 同族体名	化学式	monoisotopic mass	[M+H] ⁺	[M+2H] ²⁺
MC-LA	C46H67N7O12	909.484773	910.492598	455.7502115
MC-Laba	C47H69N7O12	923.500423	924.508248	462.7580365
MC-AR	C46H68N10O12	952.50182	953.509645	477.258735
MC-YA	C49H65N7O13	959.464038	960.471863	480.739844
[D-Asp3, Dha7]-MC-LR	C47H70N10O12	966.51747	967.525295	484.26656
[D-Asp3, Dha7]-MC-EE (OMe)	C46H63N7O16	969.433133	970.440958	485.7243915
[D-Asp3]-MC-LR	C48H72N10O12	980.53312	981.540945	491.274385
[Dha7]-MC-LR	C48H72N10O12	980.53312	981.540945	491.274385
[DMAAdda5]-MC-LR	C48H72N10O12	980.53312	981.540945	491.274385
[D-Asp3, (E)-Dhb7]-MC-LR	C48H72N10O12	980.53312	981.540945	491.274385
[D-Asp3, Dha7]-MC-E (OMe)E (OMe)	C47H65N7O16	983.448783	984.456608	492.7322165
[Dha7]-MC-EE (OMe)	C47H65N7O16	983.448783	984.456608	492.7322165
MC-LF	C52H71N7O12	985.516073	986.523898	493.7658615
MC-LR	C49H74N10O12	994.54877	995.556595	498.28221
[D-Asp3, D-E (OMe)6]-MC-LR	C49H74N10O12	994.54877	995.556595	498.28221
[(6Z)-Adda5]-MC-LR	C49H74N10O12	994.54877	995.556595	498.28221
[Dha7]-MC-E (OMe)E (OMe)	C48H67N7O16	997.464433	998.472258	499.7400415
[L-Ser7]-MC-LR	C48H74N10O13	998.543685	999.55151	500.2796675
MC-LY	C52H71N7O13	1001.510988	1002.518813	501.763319
[D-Asp3, L-Ser7]-MC-E (OMe)E (OMe)	C47H67N7O17	1001.459348	1002.467173	501.737499
[L-Ser7]-MC-EE (OMe)	C47H67N7O17	1001.459348	1002.467173	501.737499
MC-Hi1R	C50H76N10O12	1008.56442	1009.572245	505.290035
[D-Asp3, ADMAAdda5]-MC-LR	C49H72N10O13	1008.528035	1009.53586	505.2718425
[D-E (OMe)6]-MC-LR	C50H76N10O12	1008.56442	1009.572245	505.290035
[D-Asp3, ADMAAdda5, Dhb7]-MC-LR	C49H72N10O13	1008.528035	1009.53586	505.2718425
MC-LHArg	C50H76N10O12	1008.56442	1009.572245	505.290035
[D-Asp3, Dha7]-MC-RR	C47H71N13O12	1009.534517	1010.542342	505.7750835
[L-MeSer7]-MC-LR	C49H76N10O13	1012.559335	1013.56716	507.2874925
[Dha7]-MC-FR	C51H70N10O12	1014.51747	1015.525295	508.26656
[L-Ser7]-MC-E (OMe)E (OMe)	C48H69N7O17	1015.474998	1016.482823	508.745324
[ADMAAdda5]-MC-LR	C50H74N10O13	1022.543685	1023.55151	512.2796675
[D-Asp3, ADMAAdda5]-MC-LHar	C50H74N10O13	1022.543685	1023.55151	512.2796675
[D-Asp3]-MC-RR	C48H73N13O12	1023.550167	1024.557992	512.7829085
[Dha7]-MC-RR	C48H73N13O12	1023.550167	1024.557992	512.7829085
[D-Asp3, Dhb7]-MC-RR	C48H73N13O12	1023.550167	1024.557992	512.7829085
MC-FR	C52H72N10O12	1028.53312	1029.540945	515.274385

MC-M(O)R	C48H72N10013S	1028.500107	1029.507932	515.2578785
[Dha7]-MC-HphR	C52H72N10012	1028.53312	1029.540945	515.274385
[D-Asp3, Dhb7]-MC-HtyR	C51H70N10013	1030.512385	1031.52021	516.2640175
[Dha7]-MC-YR	C51H70N10013	1030.512385	1031.52021	516.2640175
[D-Asp3]-MC-YR	C51H70N10013	1030.512385	1031.52021	516.2640175
MC-YM(O)	C51H69N7014S	1035.462325	1036.47015	518.7389875
[ADMAdda5]-MC-LHar	C51H76N10013	1036.559335	1037.56716	519.2874925
[D-Leu1]MC-LR	C52H80N10012	1036.59572	1037.603545	519.305685
MC-RR	C49H75N13012	1037.565817	1038.573642	519.7907335
[(6Z)-Adda5]-MC-RR	C49H75N13012	1037.565817	1038.573642	519.7907335
[D-Ser1, ADMAdda5]-MC-LR	C50H74N10014	1038.5386	1039.546425	520.277125
[ADMAdda5, MeSer7]-MC-LR	C50H76N10014	1038.5386	1039.546425	520.277125
[L-Ser7]-MC-RR	C48H75N13013	1041.560732	1042.568557	521.788191
[D-Asp3, MeSer7]-MC-RR	C48H75N13013	1041.560732	1042.568557	521.788191
MC-YR	C52H72N10013	1044.528035	1045.53586	523.2718425
[D-Aap3]-MC-HtyR	C52H72N10013	1044.528035	1045.53586	523.2718425
[Dha7]-MC-HtyR	C52H72N10013	1044.528035	1045.53586	523.2718425
[D-Aap3, (E)-Dhb7]-MC-HtyR	C52H72N10013	1044.528035	1045.53586	523.2718425
MC-(H4)YR	C52H76N10013	1048.559335	1049.56716	525.2874925
[D-Asp3, ADMAdda5, Dhb7]-MC-RR	C49H73N13013	1051.545082	1052.552907	526.780366
[D-E-OC2H3(CH3)OH2]-MC-LR	C52H80N10013	1052.590635	1053.59846	527.3031425
MC-HtyR	C53H74N10013	1058.543685	1059.55151	530.2796675
[L-Ser7]-MC-HtyR	C53H74N10014	1062.5386	1063.546425	532.277125
MC-WR	C54H73N11012	1067.544019	1068.551844	534.7798345
[D-Asp3, ADMAdda5, Dhb7]-MC-HtyR	C53H74N10013	1072.52295	1073.530775	537.2693
[L-MeLan7]MC-LR	C52H81N11014S	1115.568521	1116.576346	558.7920855

その結果、MC-WR と MC-FR (もしくは[Dha7]-MC-HphR) がヒットした。MC-WR としてヒットした TIC およびスペクトルを示す(図3)。このように標準品がない場合でも、LC/TOF MS と精密質量データベースを利用することにより同族体の存在を推定することが可能となる。

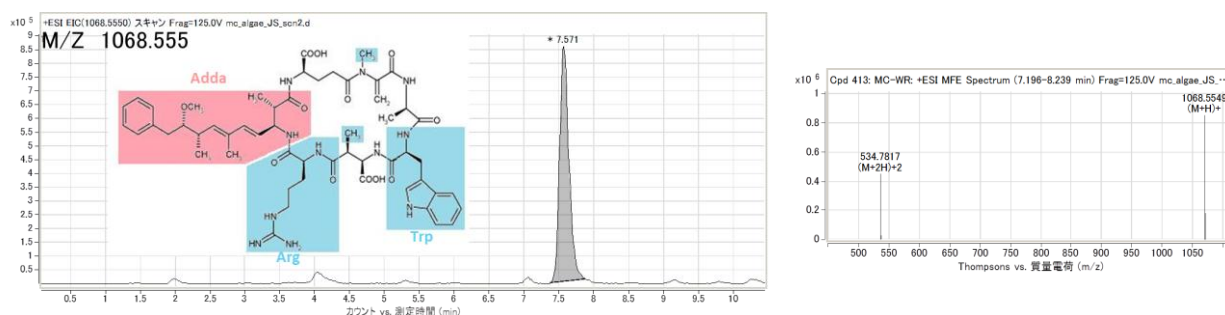


図3 LC/TOF MSによるMC-WRの検索例

4. まとめ

3種のマイクロシスチンのLC/MS/MSによる定量分析を行い、アサリへの添加回収試験の結果、1ng/g添加で43～66%、20ng/g添加で68～81%の回収率を得た。この分析法は貝類中のマイクロシスチンの分析法として有用であると考えられる。LC/TOFMSによる分析でも、3種のマイクロシスチンを検出できた。また、未知試料について、得られた精密質量からその他のマイクロシスチン同族体の検索も可能であり、標準品のない同族体についても検出が可能であることが示唆された。

5. 文献

- 1) 高橋徹ら, 諫早湾調整池の真実, かもがわ出版, 2010
- 2) Zhang et.al., Evaluation of organ distribution of microcystins in the freshwater phytoplanktivorous fish *Hypophthalmichthys molitrix*, J.Zhejiang Univ. Sci.B, 2007;8(2)116-120
- 3) Agilent 6410によるマイクロシスチン類の高感度一斉分析
- 4) 朴虎東ら諏訪湖におけるアオコ毒素 **microcystin** の動態, 山地水環境教育研究センター研究報告:79-97(2003)

(本研究成果は第47回全国衛生化学技術協議会で発表したものである)