

親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) を適用したアオコ毒の分析手法の検討

○園山雅幸 (島根県環境保健公社)

1. はじめに

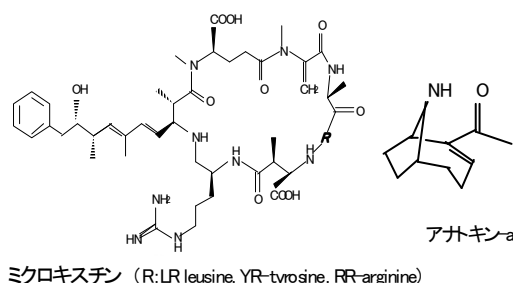
閉鎖系水源で問題となるアオコの発生は、異臭をはじめとした水質の悪化をもたらす。さらにアオコの種類によっては、極めて有害性の高い毒素が産生される。水質基準において、その代表的な毒素であるマイクロキシチン-LR が、要検討項目に設定されている。また、アナトキシチン-a も代表的な毒素の1である。水源においてアオコが発生した際、その存在種ならびに量的な情報を把握することは、原水管理の観点において重要となる。

そこで本検討では、代表的な毒素であるアナトキシチン-a の分析手法の検討、ならびにマイクロキシチン類 (-LR、-YR、-RR) との効率的な同時分析法の構築について検討・検証を行った。

2. 実験

2-1 測定条件

本検討で測定対象とした成分の構造を図1に示す。標準溶液は、市販の標準品または標準溶液をメタノールで溶解・希釈したものを使用した。



マイクロキシチン (R:LR leusine, YR-tyrosine, RR-arginine)

装置	: タンデム四重極型LC/MS/MS
カラム	: HILICカラム(シリカベース) (内径2.1 mm、長さ150 mm、粒径3 μm)
カラムオープン	: 40°C
移動相	: A液 10 mM ぎ酸アンモニウム含有0.1%ぎ酸水溶液 B液 アセトニトリル
グラジエント	: B液 95% (0-0.5 min) -30% (8.0-8.5 min)- 95% (8.51-16.1 min)
注入量	: 4 μl
流量	: 0.4ml/min
イオン化法	: ESI法、ポジティブモード
測定モード	: MRM
モニターイオン (m/z)	: ミクロキシチン-LR 499>135,483 -YR 524>135,508 -RR 520>135,70 アナトキシチン-a 166>149,131

図2. 装置測定条件

測定には、LC/MS/MS 装置を使用した。分離カラムについて、一般的にマイクロキシチン類は、逆相 (ODS) カラムが使用される。一方、アナトキシチン-a は、第二級アミンを含む塩基性化合物であり極性が高い。このため逆相カラムでは、保持が不十分であると考えられる。そこで、本検討では、イオンペア試薬を使用せず、高極性化合物を保持・分離できる親水性相互作用クロマトグラフィー (以下 HILIC) カラムの適用を試みた。測定条件を図2に示す。

2-2 前処理条件

水質試料からの成分の抽出・濃縮法として、固相抽出法の適用を検討した。抽出において

親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) を適用したアオコ毒の分析手法の検討

アナトキシン-a は、塩基性化合物であるため、陽イオン交換機能を持つ固相カラムの適用が有効と考えられる。一方、マイクロキスチン類は疎水性が高い成分であり、一般的にポリマー系の逆相カラムが適用される。以上のことから、陽イオン交換および逆相による保持機能を有する固相を使用することとした。前処理フローを図3に示す。

3. 結果および考察

本法の測定条件で得られたクロマトグラムを図4に示す。アナトキシン-a、マイクロキスチン類ともに、HILIC カラムによる適正な保持・ピーク形状であることが確認できた。前処理にて試料を 25 倍濃縮とした場合、すべての成分で、0.08 μg/l (マイクロキスチン-LR 目標値 0.8 μg/l の 1/10) を定量するのに十分な測定感度が得られた。

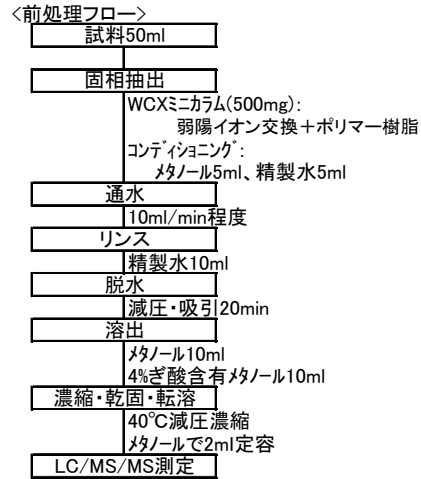


図3. 前処理フロー

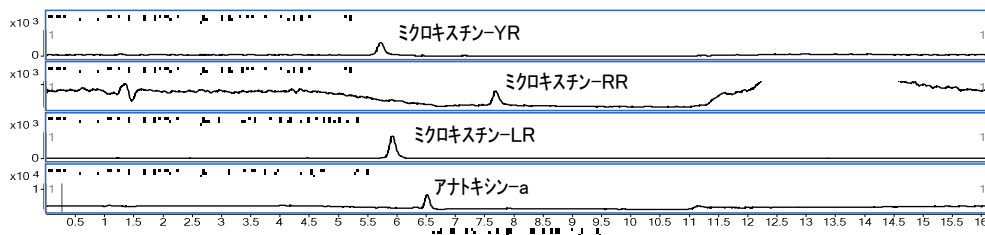


図4. 測定クロマトグラム：標準溶液 2 μg/l (4 μl 注入、試料 0.08 μg/l に相当)

図3に示す前処理フローに従い、模擬原水(ダム水)を使用し、添加回収試験を行った。結果を表1に示す。全成分回収率 80%以上、および変動係数 20%未満であり良好な結果が得られた。ただし、マイクロキスチン類については、アナトキシン-a と比較して低回収傾向であった。

4. まとめ

アオコの毒素であるアナトキシン-a に重点をおき、分析法の構築を検討した。第二級アミンを含むアナトキシン-a に対し、測定に HILIC カラム、前処理にイオン交換および逆相による保持機能を有する固相を使用した。また、マイクロキスチン類との同時測定も試みた。添加回収試験では、アナトキシン-a については、非常に良好な結果であった。一方、マイクロキスチン類については、精度面において検討の余地が残る結果であった。今後、分析法のさらなる最適化を検討していく予定である。

表1. 添加回収試験結果

成分名	添加濃度 1 μg/l (n=4)	
	模擬原水(ダム水)	
	回収率(%)	変動係数(%)
マイクロキスチン-LR	80	9.8
マイクロキスチン-YR	86	9.8
マイクロキスチン-RR	82	4.9
アナトキシン-a	102	5.1