

## G. 研究業績

### 学会発表

1. A rapid and highly specific analysis of labile and genotoxic agaritine in mouse plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry  
Kazunari Kondo, Asako Watanabe, Ikuro Abe, Hideya Tanaka, Hiroshi Akiyama and Tamio Maitani.

*51st International Conference on Analytical Sciences and Spectroscopy in Quebec, Canada (2005, 10)*

2. Determination of Genotoxic Phenylhydrazine Agaritine in Several Mushrooms using Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry

Kazunari Kondo, Asako Watanabe, Yuko Iwanaga, Ikuro Abe, Hideya Tanaka, Megumi Hamano Nagaoka, Hiroshi Akiyama and Tamio Maitani

*2nd International Symposium on Recent Advances in Food Analysis in Prague, Czech Republic (2005, 11)*

3. 血漿および尿中 agaritine の LC/MS/MS 分析

近藤一成, 渡辺麻子, 長岡(浜野)恵, 穂山 浩, 米谷民雄

*日本薬学会第126年会 (仙台) (2006, 3)*

### 論文発表

1. Analysis of agaritine in mushrooms and in agaritine-administered mice using liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Kazunari Kondo, Asako Watanabe, Yuko Iwanaga, Ikuro Abe, Hideya Tanaka, Megumi Hamano Nagaoka, Hiroshi Akiyama and Tamio Maitani

*J. Chromatography B, 834, 55-61 (2006)*

2. Determination of genotoxic phenylhydrazine agaritine in several mushrooms using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry

Kazunari Kondo, Asako Watanabe, Yuko Iwanaga, Ikuro Abe, Hideya Tanaka, Megumi Hamano Nagaoka, Hiroshi Akiyama and Tamio Maitani

*Food Additives and Contaminants accepted*

**51st International Conference on  
Analytical Sciences and Spectroscopy**  
in Quebec, Canada

A rapid and highly specific analysis of labile  
and genotoxic agaritine in mouse plasma  
using liquid chromatography-tandem mass  
spectrometry

Kazunari Kondo<sup>1\*</sup>, Asako Watanabe<sup>1</sup>, Ikuro  
Abe<sup>2</sup>, Hideya Tanaka<sup>2</sup>, Hiroshi Akiyama<sup>1</sup>  
and Tamio Maitani<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>National Institute of Health Sciences,

<sup>2</sup>University of Shizuoka

A rapid and specific method was developed  
using liquid chromatography-tandem mass  
spectrometry (LC/MS/MS) for determination of  
labile and genotoxic agaritine in mouse plasma.  
Agaritine  
[ $\beta$ -N-( $\gamma$ -L(+)-glutamyl)-4-(hydroxymethyl)phenylhy-  
drazine] is one of phenylhydrazine derivatives  
contained in mushroom and is suspected to be  
genotoxic. However, there has been no reliable  
analytical method to evaluate the toxicity and  
disposition of agaritine because of its instability  
and non-specificity for detection. Agaritine is very  
susceptible to oxidation in air and decomposed by  
acids, bases, and even trace metals in water. We  
have developed a simple and highly specific  
method for mushroom hydrazine agaritine (MW  
267.1) in mouse plasma. Agaritine standard was  
synthesized according to the method of Datta S.  
and Hoesch L (*Helvetica Chimica Acta* 70, 1261  
(1987)) and the purity was confirmed (>95%). We  
assigned the structure of synthetic agaritine by  
high resolution (HR)-fast atom bombardment

(FAB) and 2-dimensional nuclear  
magnetic-resonance (NMR) analyses.

After agaritine or agaritine-containing  
mushroom was orally administered to mice, blood  
was collected every 20 min, and plasma was  
prepared and then deproteinized with acetonitrile  
followed by methanol. The resulting plasma  
samples were dissolved in mobile phase (0.01%  
acetic acid:methanol=99:1) without further SPE  
cleanup. Two fragments (266/248 and 266/122) in  
negative mode were monitored simultaneously.  
For determination, multiple-reaction-monitoring  
(MRM) was performed with the characteristic  
fragmentation ion  $m/z$  266  $\rightarrow$  248 for agaritine.  
The recovery of agaritine from mouse plasma was  
approximately 73 $\pm$ 4.4 % (n = 11). This is the first  
report for the specific determination of unstable  
agaritine in mouse plasma. We have also showed  
that agaritine level in mouse blood reached  
maximum 20 minutes after agaritine  
administration to mice. After that, agaritine  
gradually decreased until 100 min, then  
desappeared from blood.

Without specific determination method, no  
evidence for agaritine metabolites has been  
investigated to date. To obtain the structural  
information for agaritine metabolites in  
agaritine-administered mice, LC/MS(/MS) system  
coupled to photo diode array detector (DAD) was  
used. By comparison of the result from  
agaritine-administered mice with that from  
water-administered mice (control), one unknown  
metabolite of agaritine were found and the  
structural analyses are in progress.

## Supplement 2

### Determination of Genotoxic Phenylhydrazine Agaritine in Several Mushrooms using Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry

Kazunari Kondo<sup>a\*</sup>, Asako Watanabe<sup>a</sup>, Yuko Iwanaga<sup>a</sup>, Ikuro Abe<sup>b</sup>, Hideya Tanaka<sup>b</sup>, Megumi Hamano Nagaoka<sup>a</sup>, Hiroshi Akiyama<sup>a</sup> and Tamio Maitani<sup>a</sup>

<sup>a</sup> National Institute of Health Sciences, Division of Foods

<sup>b</sup> University of Shizuoka, School of Pharmaceutical Sciences

A new method with sensitivity and specificity method for detecting and quantifying genotoxic hydrazines, agaritine and 4-(hydroxymethyl)phenylhydrazine (HMPH), has been developed using liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry (MS). Synthetic agaritine and HMPH were structurally assigned by <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C- and two-dimensional nuclear magnetic-resonance (NMR) analysis (HMBC and HMQC), high-resolution fast-atom-bombardment (FAB) MS and time of flight (TOF) MS. The polar molecule agaritine was separated on an ODS column using 0.01% AcOH-MeOH (99:1) as an eluent with a simple solid-phase-extraction cleanup. There were no interference peaks for any of the mushrooms. Recoveries of agaritine from spiked mushroom samples were 60.3–114 % with one exception. The intra-day precision values were 5.5 and 4.2%, and the inter-day precision values were acceptable (15.0 and

23.0 %) as agaritine is unstable. The limit of quantification was 0.01 µg/g. Even a trace amount of agaritine in mushrooms can be determined using this method. We also directly analyzed HMPH, an active free hydrazine form of genotoxic agaritine, even though it is highly unstable, and obtained direct evidence of its absence from mushrooms. A precursor ion scan confirmed that agaritine derivatives, which could exert a similar toxicity, were absent. The results indicate that this specific and sensitive analytical method for detecting and quantifying agaritine and its derivatives could help to evaluate the risk of mushroom hydrazines to humans.

## Ⅱ. 分担研究報告書

### 3. 担子菌類中の必須・有害金属の分析

分担研究者      米谷 民雄

分担研究報告書

分担研究課題：担子菌類中の必須・有害金属の分析

分担研究者 米谷民雄 国立医薬品食品衛生研究所 食品部長

**研究要旨：**アガリクス健康食品およびアガリクス茸を含めたキノコ類につき、ICP 発光分光法により有害・必須金属濃度を分析した。昨年度、Cd 濃度が高かった製品 B と C については、Cd 濃度のフォローアップを行った。その結果、製品 B では、今年度購入したものは Cd 濃度が 5 mg/kg 以下であった。製品 C では 4～5 月に入手したロットにおいては Cd 濃度が高かったが、平成 18 年には購入できない状態であった。一方、一部のキノコでは Hg 濃度が高いことが知られている。そこで、アガリクス茸についても総 Hg とメチル Hg 濃度を調べたところ低値であった。他の総 Hg 値が高かったキノコでも、メチル Hg 濃度は低かった。アガリクス健康食品中の Cd の存在状態を調べるために、Cd 濃度の高い製品につき、HPLC/ICP-MS 法を用いて状態分析を行ったところ、Cd が高分子化合物に結合している可能性が示唆された。

協力研究者

長岡（浜野）恵 国立医薬品食品衛生研究所  
食品部主任研究官

キノコ類中の有害・必須金属含量の分析を実施した。また、アガリクス中に含まれる金属の存在状態を明らかにするため、HPLC/ICP-MS 法により存在状態を解析した。

**A. 研究目的**

アガリクス茸を含むキノコ類は、有害重金属、特にカドミウムを蓄積しやすいことが、以前から知られている。逆にその性質は、類似の必須金属も吸収しやすいことを示唆している。一方、いわゆる健康食品として販売されているアガリクス製品には、菌糸体を培養した製品も多い。その場合には、有害金属の混入はなくなるが、必須金属も減少している可能性がある。また逆に、特定の重金属を培養液に添加し、金属含量を操作している可能性もある。そこで、アガリクス茸を含むキノコ類の評価項目の1つとして、有害・必須金属について検討することにした。

今年度は、昨年度に引き続き、金属測定用試料分解装置および ICP 発光分析装置を用いて、アガリクス健康食品およびアガリクス茸を含めた

**B. 研究方法**

1) 試料

表 1 に示すアガリクス健康食品およびキノコ類は、都内百貨店やスーパーマーケットで購入し、一部は通信販売にて購入した。製品 B-1 は昨年度測定した検体、製品 B-2 は平成 17 年 4 月、製品 B-3 は平成 18 年に購入した。製品 C-1 は昨年度測定した検体、製品 C-2、C-3 はロットは異なるがともに平成 17 年 4～5 月に購入したものである。なお、平成 18 年には購入不可能であった。

2) 試薬

各金属の標準原液としては、和光純薬工業製原子吸光分析用標準液を使用した。超高純度分析用試薬の硝酸 (68%) と同過酸化水素水 (35%) は、多摩化学工業製の TAPAPURE AA-100 を用いた。

他の試薬は、すべて市販特級品を用いた。水はすべて milliQ synthesis A10 (ミリポア社) で製造した 18 M $\Omega$ cm 以上の超純水を使用した。

### 3) 装置

ICP-AES : ICAP-61 (サーモジャーレルアッシュ製)

マイクロウェーブ試料分解装置 : ETOS TC (マイルストーンゼネラル製)

### 4) マイクロウェーブのプログラム

#### Microwave program 1

(1000 W, 内部温度制御コントロール T1: 40°Cまで昇温, 0-2 min) →(0 W, 2-3 min) →(1000 W, T1: 80°Cまで昇温, 3-23 min) →(0 W, 23-24 min) →(1000 W, T1: 70°Cまで昇温, 24-29 min), →(1000 W, T1: 70°Cで一定 29-59 min), 外部温度制御コントロール T2: 50°C

#### Microwave program 2

(1000 W, T1: 220°Cまで昇温, 0-10 min) →(1000 W, T1: 220°Cで一定, 10-60 min), 外部温度制御コントロール 110°C

### 5) 金属測定用試験溶液の調製

アガリクス健康食品のうち、粒状のものは粉碎した、キノコでは、均質化をはかるため、凍結乾燥後粉末化して分析した。

各試料 1 g を精密に量り、マイクロウェーブ試料分解装置用テフロン容器に注意深く入れ、水 1 ml および超高純度分析用硝酸 7 ml を加えて 1 昼夜放置し、初期の酸分解を徐々に進行させた。その後、まず Microwave program 1 を行い、終了後、容器を本体から外して NO<sub>x</sub> などのガス抜きを行い、室温まで冷やした後、超高純度分析用過酸化水素水 1 ml を加え、Microwave program 2 を行った。試料分解が終了した後、各分解液を水で 50 ml にメスアップし、金属測定用試験溶液とした。

### 6) 金属の状態分析用試料調製

試料 0.5 g に 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 10 ml を加え、20 min 振とう抽出を行い、遠心分離後、

0.45  $\mu$ m のフィルターにてろ過し、上清を得、試料溶液とした。金属の状態分析は、製品 B-1、製品 C-1 およびアガリクス茸 C の 3 検体について行った。

### 7) 金属測定用標準液の調製

金属測定用標準液は、試料中の硝酸濃度と同等になるよう、原子吸光分析用標準液を硝酸溶液で希釈して調製した。ただし、P の標準液は和光純薬工業製光電用を使用し、S の標準液は容量分析用硫酸 (0.05 mol/l、和光純薬工業製) から、C の標準液は尿素 (和光純薬工業製特級) から調製した。

### 8) ICP 測定条件

10 秒間積算の 2 回平均で測定した。ICAP-61 の条件 : power, 1.25 kW; reflected power, <5 W; coolant gas, 20 l/min; sample introduction rate, 1 ml/min. ICP 発光分析装置での分析波長を、表 2 に示す。

### 9) HPLC/HR-ICP-MS 測定条件

HPLC システムは、島津製作所製のオール PEEK 仕様の装置を用いた。高分解能 ICP-MS は、ELEMENT (Finnigan Mat) を用い、分解能  $m/\Delta m = 4000$  にて測定を行った。実験条件の詳細は表 3 にまとめた。

### 10) 総 Hg およびメチル Hg の分析方法

キノコ中の総 Hg の測定は還元気化原子吸光法、メチル水銀は ECD ガスクロマトグラフィー法により行った。

## C. 研究結果

アガリクス健康食品およびキノコ中の金属含量の分析結果を、表 4 および表 5 に示す。

有害金属に関しては、昨年度の分析結果で Cd 濃度が高かった製品 B と製品 C の、それぞれロットが異なるもの、および、それら以外の製品について分析した。昨年度の結果では、製品 B と製品 C の Cd 濃度はそれぞれ 8.7、10.5 mg/kg であった。今年度は、製品 B では Cd 濃度が 4.8、3.2

mg/kg と低くなっていたことから、Cd の値が高値にならないように、原料が吟味されているか、デキストリンなど何らかのものが添加されていることが考えられた。一方、製品 C については、年度当初に購入したものでは昨年度と同様に高値であったが、年度末には購入できなかった。両製品とも Pb については検出されなかった。製品 M、N、O は、製品 B と販売者が同じで、年度はじめに購入したものであるが、Cd の値はそれぞれ 5.1、5.6、6.6 であった。また、製品 P の Cd は N.D. であった。

必須金属では、昨年度の Cu は 4-90 mg/kg、Fe は 15-197 mg/kg と、製品によりさまざまであったが、今年度の結果も Cu は 5-66 mg/kg、Fe は 30.4-102 mg/kg と同様の傾向であった。Cr については、昨年は 9.7 mg/kg や 5.7 mg/kg の製品がみられたが、今年度の限られた製品では、値は N.D. であった。Zn については、昨年は 7-111 mg/kg、今年は 20-116 mg/kg であった。

キノコ類の分析結果（表 5）では、アガリクス茸の Cd は、2.6-7.5 mg/kg（乾燥質量）であり、ポルチーニ茸の Cd は 0.7 と 2 mg/kg（乾燥質量）であった。As（表に示さず）や Pb は特に検出されなかった。ポルチーニ茸中の S は、アガリクス茸の S の約 3 倍であった。

今年度はアガリクス茸も含め、総 Hg およびメチル Hg 濃度も検討した。その結果、ポルチーニ茸 A、B では、総水銀は 3、4 mg/kg（乾燥質量）であった。一方、アガリクス茸の総 Hg はポルチーニ茸に比べ大変低い値であり、0.1、0.5 mg/kg（乾燥質量）であった。なお、いずれのキノコにおいても、メチル Hg はほとんど検出されなかった（表 6）。

金属の有効性や毒性は、その化学形や存在状態に依存するため、Cd の値の高かった製品を用い、各金属の化学形や存在状態の解析を行った。アガリクス茸 C（図 1）では、S は 11.8 min、Fe は 11.1 min にピークがみられた。Cd は 11.1 min

に 1 つの大きなピークとして検出された。Mn については、10.9 min のピークその他、9.4 min にも小さなピークが見られた。Cu は 10.9、12.2、13.1 min に計 3 本のピークがみられ、Zn は 11.0 と 12.0 min にピークが見られた。なお、アガリクス健康食品の製品 B や製品 C についても検討したところ、Cd のピーク強度が小さい以外は、ほぼ同様なクロマトグラムが得られた。

#### D. 考察

昨年度に Cd 濃度が高いアガリクス健康食品がみられたことから、これらの製品および他製品につき、今年度も Cd 濃度のフォローアップを行った。その結果、製品 B については Cd 値が低くなっていることから、何らかの対応がなされていると考えられた。昨年度報告された通り、社内規格を設け、Cd 濃度が高い製品は市場に流通させない方針が遵守されていると考えられた。一方、製品 C では、4-5 月の時点では従来の Cd 濃度のまま市場に流通していた。この製品については、販売を終了すると報告されており、平成 18 年 3 月の時点では、報告通り購入できなかった。このように、両製品については、昨年度の報告書通りの対応がなされていることが示された。

Cd による毒性は、特に長期摂取による腎障害が問題になるとされている。食品由来の Cd の健康影響については、現在、食品安全委員会にリスク評価を依頼しているところであるが、国際的な JECFA による PTWI（暫定耐容週間摂取量）は 7  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$  とされており、2003 年の JECFA でもその値を継続することが確認されている。この値は、体重を 50 kg とし、仮に 1 日あたりに換算すると 50  $\mu\text{g}$  の Cd 一日摂取となる。一方、わが国における汚染物一日摂取量調査によると、日本人の 1 日あたりの Cd 摂取量は平成 13 年度は 29.3、14 年度は 26.2、15 年度は 25.6  $\mu\text{g}$ （ND=0 とした場合の値）であり、PTWI の 50%以上を摂取している。

健康食品では同一製品を長期にわたり摂取することが考えられる。そのため、アガリクス健康食品中の Cd 濃度は、製品に記載された目安量に従って摂取した場合に、各人の日常食からの Cd 摂取とあわせても、PTWI を下回ることが必要と考えられ、そのための方策がとられることが望まれる。

キノコ類では、アガリクス茸の Cd 濃度は、2.6–7.5 mg/kg (乾燥質量) であった。また、ポルチーニ茸では 0.7、2 mg/kg (乾燥質量) であった。ポルチーニ茸 B は露地栽培のキノコであると記載されていたことから、土壤中の Cd を取り込んだものと考えた。なお、一昨年度の文献調査の結果、キノコ中の Cd は 0.4–101 mg/kg (乾燥質量) と報告されており、土壤中の金属を取り込みやすいというキノコの性質を反映したものと考えられる。

昨年度の厚生労働科学特別研究「スギヒラタケ中の有害成分の分析に関する研究」においては、スギヒラタケ中の総 Hg 濃度は 0.073 mg/kg (湿重量) と比較的高かった。キノコでは、ポルチーニ茸で Hg 濃度が高いことが知られている。このことから、今年度はアガリクス茸およびポルチーニ茸の総 Hg およびメチル Hg 濃度を検討した。その結果、ポルチーニ茸 A、B の総水銀は 3、4 mg/kg (乾燥質量) あった。一方、アガリクス茸の総 Hg はポルチーニ茸に比べ低い値であり、0.1、0.5 mg/kg (乾燥質量) であった。なお、いずれのキノコにおいても、メチル Hg はほとんど検出されなかったことから、キノコを介したメチル Hg 摂取は問題とはならないと考えられた。

金属の有効性や毒性は、その化学形や存在状態に依存する。アガリクス茸やアガリクス健康食品の金属について状態分析を行った結果、Cd は 11.1 min にピークトップがみられたものの、8–13 min に広がる大きなピークとして観察された。UV 吸収においてもまた 8–13 min に大きなピークが認められた。この Cd のピーク強度はアガリ

クス茸 C の場合に最も大きく、アガリクス健康食品 B と C では Cd のピーク高はその半分以下であった。Cd はおそらくたんぱく質と結合していると推定された。Cu ではピークが 3 本みられ、このうち 2 本は Zn でみられた 2 本のピークと保持時間が一致した。なお、Cu と Zn のそれぞれのピーク強度と測定同位体の天然存在比を考慮すると、Cu と Zn は 1 つのピークにおいて 1 : 1 の比で存在していることが示された。

## E. 結論

アガリクス健康食品およびアガリクス茸を含むキノコ類につき、ICP 発光分光法により有害・必須金属濃度を分析した。昨年度 Cd の値が高かった 2 製品を含めたアガリクス健康食品について、Cd 濃度のフォローアップを行った結果、2 製品とも販売者において昨年度報告書通りの対応がとられていると考えられた。

アガリクス茸 3 検体中の Cd の値は、3–8 ppm であった。なお、アガリクス茸における総 Hg、メチル Hg 濃度は、ともに低い値であった。

金属の有効性や毒性は、その化学形や存在状態に依存するため、Cd が高値であった検体につき、各金属の状態分析を行ったところ、Cd は高分子化合物に結合していた。

## F. 健康危険情報

昨年度に Cd 濃度が高かった 2 製品については、今年度フォローアップした結果、それぞれ昨年度報告書通りの対応がなされていると考えられた。なお、(独)健康・栄養研究所の HP にある「健康食品」の安全性・有効性情報においては、アガリクスに関する情報として、一部に Cd 含有量の高い製品が見られたが、自主的な基準等を持って対応がはかられていると、参考文献として昨年度の本報告書を引用しながら記載されている。



## G. 研究発表

### 1) 論文発表：

現在執筆中。

### 2) 学会発表：

長岡（浜野）恵、近藤一成、穂山 浩、松田りえ子、米谷民雄: アガリクス健康食品及びキノコ中の有害・必須金属の分析、第 42 回全国衛生化学技術協議会年会（東京）（2005.11 月）（講演要旨集 p 152-153）

M.H. Nagaoka, H. Nagaoka, K. Kondo, H. Akiyama, and T. Maitani: Speciation of cadmium by HPLC/DF-ICP-MS and determination of hydrazines by HPLC with fluorescence derivatization in Agaricus mushroom and its products, Ninth International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Hyphenated Chromatographic Analyzers, (York, UK) (abstract, p131).

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 分析されたアガリクス健康食品

製品名	
製品B-1	顆粒
製品B-2	顆粒
製品B-3	顆粒
製品C-1	粉末
製品C-2	粉末
製品C-3	粉末
製品M	顆粒
製品N	顆粒
製品O	顆粒
製品P	粒

\* 製品名に続く数字が大きくなるほどロットが新しい

表2. ICP-AESでの測定波長

元素	波長 (nm)
Al	308.2
Cd	228.8
Cr	267.7
Cu	324.7
Fe	259.9
Ge	209.4
Mn	257.6
Pb	220.3
S	182.0
Zn	213.8

## DF-ICP-MS:

Instrument	ELEMENT (Finnigan MAT)
RF power	1.29 kW
Carrier gas flow rate	1.03 L/min
Nebulizer	conikal (Glass Expansion)
Spray chamber	double pass, room temp.
Resolution $m/\Delta m$	4000
$m/z$ monitored	S: 33.968 Fe: 53.940 Mn: 54.938 Cu: 62.940 Zn: 63.929 Cd: 110.904

## HPLC system for speciation of Cd

HPLC pump	LC-10Ai(PEEK)(Shimadzu)
Column	Asahipak GS-520 HQ (7.5 mm i.d. x 300 mm)
Injection volume	0.1 mL
Flow rate	0.8 mL/min
Column temp.	20°C
UV detector	SPD-10AVi (Shimadzu, 280 nm)
Mobile phase	50 mM Tris-HCl (pH 7.4)

表 3. HPLC/DF-ICP-MS の測定条件

表4. 健康食品中の金属濃度 (mg/kg)

	製品B-1	製品B-2	製品B-3
Al	76.0 ± 1.5	N.D.	22.2 ± 1.8
Cd	8.8 ± 0.2	4.8 ± 0.1	3.2 ± 0.1
Cr	N.D.	N.D.	N.D.
Cu	55.9 ± 0.9	48.4 ± 2.1	36.7 ± 0.1
Fe	77.5 ± 1.8	47.1 ± 2.0	54.0 ± 0.2
Ge	N.D.	N.D.	N.D.
Mn	7.2 ± 0.1	6.8 ± 0.3	6.8 ± 0.0 <sub>4</sub>
Pb	N.D.	N.D.	N.D.
S	3202 ± 42	3321 ± 234	3453 ± 20
Zn	85.5 ± 1.1	93.6 ± 5.9	89.1 ± 0.5

	製品C-1	製品C-2	製品C-3
Al	97.7 ± 1.3	103.1 ± 1.9	101.2 ± 3.4
Cd	10.4 ± 0.1	9.8 ± 0.1	9.4 ± 0.1
Cr	N.D.	N.D.	N.D.
Cu	65.8 ± 0.5	64.8 ± 0.9	60.5 ± 0.7
Fe	102 ± 2.4	103 ± 1.1	98.4 ± 1.5
Ge	N.D.	N.D.	N.D.
Mn	9.7 ± 0.1	10.2 ± 0.1	9.6 ± 0.1
Pb	N.D.	N.D.	N.D.
S	4435 ± 45	4508 ± 64	4180 ± 43
Zn	113 ± 1.3	116 ± 1.7	107 ± 1.3

	製品M	製品N	製品O
Al	17.9 ± 1.7	N.D.	N.D.
Cd	5.1 ± 0.1	5.6 ± 0.0	6.6 ± 0.5
Cr	N.D.	N.D.	N.D.
Cu	48.6 ± 0.3	46.7 ± 0.3	46.8 ± 1.7
Fe	49.7 ± 0.2	50.3 ± 0.7	57.0 ± 2.0
Ge	N.D.	N.D.	N.D.
Mn	7.1 ± 0.0 <sub>4</sub>	7.4 ± 0.1	7.7 ± 0.3
Pb	N.D.	N.D.	N.D.
S	3553 ± 25	3766 ± 15	3959 ± 77
Zn	94.1 ± 0.7	105 ± 0.7	111 ± 1.8

	製品P
Al	4.8 ± 0.4
Cd	N.D.
Cr	N.D.
Cu	5.4 ± 0.1
Fe	30.4 ± 0.3
Ge	N.D.
Mn	1.3 ± 0.0 <sub>2</sub>
Pb	N.D.
S	2713 ± 37
Zn	19.6 ± 0.2

定量限界: 0.5 mg/kg

Data are expressed as the mean ± S.D.(n=3).

表5. キノコ中の金属濃度 (mg/kg)

	ホルチーニ茸A	ホルチーニ茸B
Al	90.5 ± 2.7	282.3 ± 4.7
Cd	0.7 ± 0.0 <sub>4</sub>	2.0 ± 0.2
Cr	0.8 ± 0.1	4.2 ± 0.3
Cu	20.4 ± 0.3	41.7 ± 0.3
Fe	88.0 ± 1.5	235.5 ± 2.6
Ge	N.D.	N.D.
Mn	14.6 ± 0.3	29.7 ± 0.2
Pb	N.D.	N.D.
S	11255 ± 328	14788 ± 27
Zn	82.0 ± 2.3	129.1 ± 0.2

	アガリクス茸A	アガリクス茸B	アガリクス茸C
Al	54.0 ± 1.0	179.3 ± 4.5	85.5 ± 6.8
Cd	2.6 ± 0.1	2.7 ± 0.1	7.5 ± 0.6
Cr	1.2 ± 0.1	N.D.	N.D.
Cu	32.2 ± 0.8	32.9 ± 0.3	46.0 ± 1.7
Fe	85.1 ± 1.0	100.6 ± 1.3	83.4 ± 4.4
Ge	N.D.	N.D.	N.D.
Mn	13.7 ± 0.3	9.2 ± 0.1	10.2 ± 0.8
Pb	N.D.	N.D.	N.D.
S	4367 ± 115	4111 ± 23	4162 ± 159
Zn	216.9 ± 5.1	163.4 ± 0.9	90.8 ± 2.0

定量限界: 0.5 mg/kg

Data are expressed as the mean ± S.D. (n=3).

表6. キノコ中の総水銀およびメチル水銀濃度 (mg/kg)

		総水銀	メチル水銀
ポルチーニ茸	A	3.01	0.0
ポルチーニ茸	B	3.93	0.0
アガリクス茸	A	0.09	N.D.
アガリクス茸	C	0.48	0.01

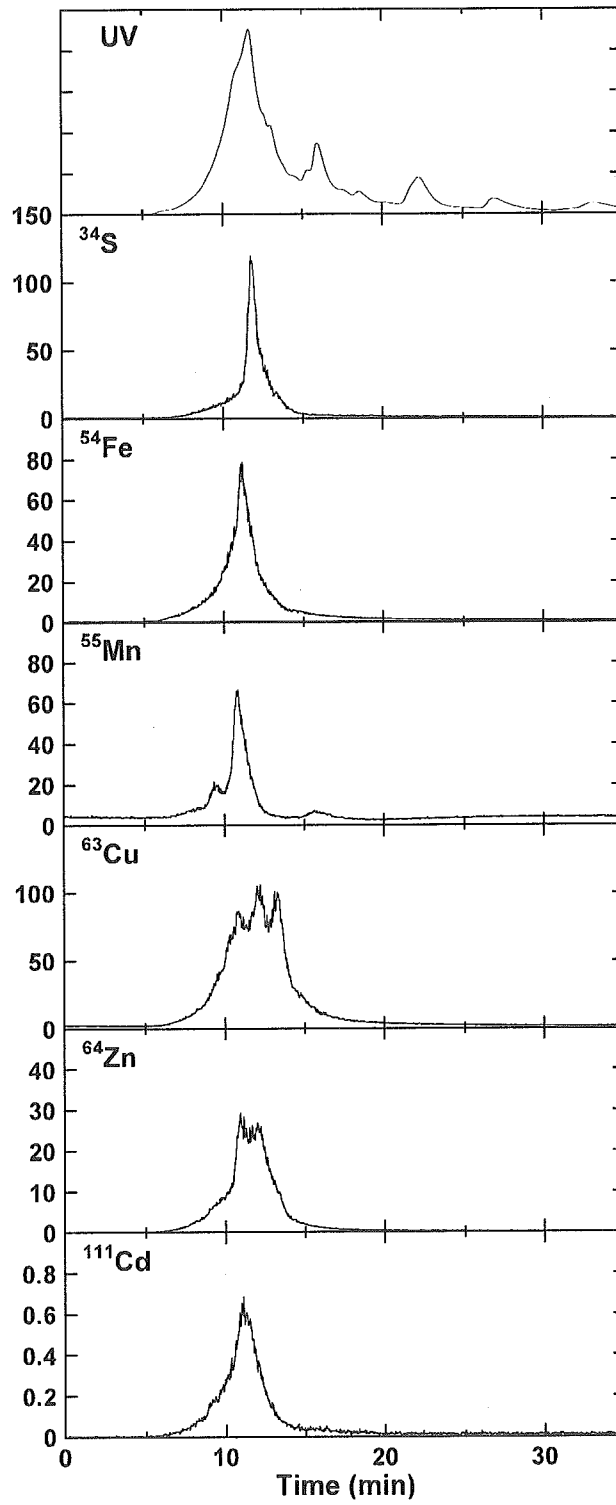


図1. アガリクス茸C中の金属の存在状態別分析

## II. 分担研究報告書

### 4. 担子菌類中のヒドラジン類の蛍光誘導体化による

網羅的解析

分担研究者      長岡 恵



分担研究報告書

分担研究課題：担子菌類中のヒドラジン類の蛍光誘導体化による網羅的解析

分担研究者 長岡 恵 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨：アガリクス健康食品中の有害成分とされるアガリチン (agaritine, AGT) と関連化合物について、特別な試料前処理を必要としない、代謝産物をも含めたヒドラジン類の、DMEQ-COCl (3,4-dihydro-6,7 dimethoxy-4-methyl-3-oxoquinoxaline-2-carbonyl chloride) を用いた簡便・選択的・高感度一斉分析法を確立した。4-hydrazinylbenzoic acid (CPH), AGT, phenylhydrazine (PH), 4-methylphenylhydrazine (MPH)の検出下限はそれぞれ 422, 45.3, 16.5, 138 fmol (20  $\mu$ L 注入時)であった。アガリクスを含むキノコ中およびアガリクス健康食品中の AGT 量は 8.3–1836  $\mu$ g/g dry weight であり、CPH, PH, MPH は検出されなかった。

協力研究者

米谷民雄 国立医薬品食品衛生研究所・食品部・部長

長岡寛明 長崎国際大学・健康管理学部・教授

xaline-2-carbonyl chloride (DMEQ-COCl)を用いた蛍光ラベル化法による一斉分析法の確立を行った。ついで、このような特別な試料前処理を必要としない代謝産物をも含めた AGT 類の一斉分析法を用い、アガリクス製品の他、*Agaricus* 属を含むキノコ中の AGT 量を明らかにした。

A. 研究目的

アガリクス茸中の毒性物質として確認されているフェニルヒドラジン類について、蛍光ラベル化法による高感度かつ選択的な一斉分析法の確立を目的とした。

これまで他の分担研究者により、アガリクス中の有害成分であるアガリチン ( $\beta$ -N-( $\gamma$ -L(+)-glutamyl)-4-(hydroxymethyl) phenylhydrazine, agaritine, AGT) と 4-hydrazinylbenzylalcohol (HMPH)につき、LC-MS による分析が行われてきた。本年度は、4-hydrazinylbenzoic acid (CPH)、4-methylphenylhydrazine (MPH)、phenylhydrazine (PH) を対象に加え、3,4-dihydro-6,7dimethoxy-4-methyl-3-oxoquino

B. 研究方法

1) 試料

ヒドラジン類のアガリチン ( $\beta$ -N-( $\gamma$ -L(+)-glutamyl)-4-(hydroxymethyl) phenylhydrazine, agaritine, AGT) および 4-hydrazinylbenzylalcohol (HMPH)は、合成したものを他の分担研究者から入手した。3,4-dihydro-6,7 dimethoxy-4-methyl-3-oxoquinoxaline-2-carbonyl chloride (DMEQ-COCl)は同仁化学研究所のものを使用した。4-hydrazinylbenzoic acid (CPH)、phenylhydrazine (PH)、4-methylphenylhydrazine (MPH)、および他の試薬は、すべて市販特級品を用いた。ヒドラジン類、

蛍光ラベル化剤および蛍光ラベル化体の構造を Fig. 1 に示した。

アガリクス健康食品 (product A、B、C)、およびキノコ類 (*Agaricus blazei* Murrill 3 検体、*Agaricus bisporus* 1 検体、シイタケ 1 検体) は、都内百貨店やスーパーマーケットで購入し、一部は通信販売にて購入した。アガリクス健康食品のうち、粒状のものは粉碎したのち分析した。生キノコについては、均質化をはかるため、凍結乾燥後粉末化したものについて分析した。

## 2) 装置

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)装置: ポンプ: L-7100, 日立製作所(株)製、蛍光検出器: RF-10AXL, 島津製作所(株)製

質量分析装置(MS): API-3000 MS system (Applied Biosystems 社); ion source, electro spray ionization (ESI), PhotoSpray™; positive mode.

核磁気共鳴スペクトル(NMR)装置: JEOL alpha-500 (日本電子(株)製)。homonuclear shift correlation spectroscopy (COSY)、heteronuclear multiple-quantum coherence (HMQC) 及び heteronuclear multiple bonds correlation (HMBC)、nuclear overhauser effect (NOE)には磁場勾配システムを用いた。NMR のケミカルシフト値は、TMS (tetramethylsilane) を基準とした。

## 3) HPLC 条件

Analytical conditions: column, XBridge™ shield RP18 column (4.6 mm i.d. x 150 mm, particle size 3.5 μm, Waters, MA, U.S.A.); column temp., at room temp.; solvent A, 0.2 M Tris-HCl (pH 8.0)/MeOH = 70/30, solvent B, MeOH/水=90/10; Gradient condition, solvent B 0–14 min, 0%; 14–15 min, from 0% to 40%; 15–24 min, from 40% to 80 %; 24–34 min, 80 %; injection volume, 20 μL; flow rate, 0.7 mL/min; detect, Ex: 392 nm, Em: 462 nm.

## 4) 蛍光ラベル化反応

ヒドラジノ基に着目し、DMEQ-COClにより、ヒドラジン類を蛍光ラベル化した。すなわち試料溶液(100 μL)に 5 mM DMEQ-COCl のジメチルホルムアミド溶液(100 μL)を加え、この混液を一般には 37°Cで 60 min 反応させた。反応終了後、MeOH/水=30/70 (800 μL)を加えた後、カラムに負荷した。

## 5) phenylhydrazine 蛍光ラベル化体の構造確認

PH の蛍光ラベル化体を大量に分取するため、OASIS HLB を用い、粗精製を行った。すなわち、まず 5 mM DMEQ-COCl の DMF 溶液 7 ml と 10 mM PH 水溶液 7 ml を混合し、密閉、暗所にて 37°C、60 min 加温した。これに、5% MeOH 56 ml を加えた後、OASIS HLB (1 g/20 ml)に負荷し、50% MeOH で洗浄後、100% MeOH で PH の蛍光ラベル化体を溶出し、溶出画分を濃縮後、分取用カラム(Inertsil ODS-3 (10 i.d. x 250 mm)に負荷し、MeOH/水(65/35)を溶離液とし、流速 3 ml/min にて、PH 蛍光ラベル化体のピークを分取し、濃縮した。これをまず <sup>1</sup>H-NMR および <sup>13</sup>C-NMR (DMSO) で構造決定および精製度を確認した後、MS の分析を行った。

## 7) 反応時における WSC とピリジンの存在による影響

ピリジン共存下での蛍光ラベル化反応の実験は、ピリジンの最終濃度 1.5% で実施した。WSC (water soluble carbodiimide, 別名 EDC; 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) は最終濃度 50, 100 mM になるように添加した。

## 8) 食品からの AGT を含むヒドラジン類の抽出方法

粉末試料 0.5g に MeOH 30 ml 加え、3 時間振とう抽出した。遠心分離後、0.45 μm のフィルターにてろ過し、上清を得た。抽出液は milli Q で 10 倍以上希釈し、試料溶液を得、蛍光ラベル化反応を行った。

## C. 研究結果

1) CPH, AGT, PH, MPH-DMEQ-CO 体を負荷した際の典型的なクロマトグラム

CPH, AGT, PH, MPH-DMEQ-CO 体を HPLC に負荷したときの典型的なクロマトグラムを Fig.2 に示した。CPH, AGT, PH, MPH の蛍光ラベル化体は、それぞれ、18.0、23.2、26.2、28.4 min の保持時間で検出された。なお、結果は示していないが、HMPH-DMEQ-CO は AGT-DMEQ-CO と同じ保持時間に検出された。

2) 蛍光ラベル化体の Ex と Em

CPH, AGT, PH, MPH の蛍光ラベル化体の蛍光スペクトルは、すべて Ex: 390-394 nm, Em: 461-464 nm 付近に極大波長が観察されたことから、測定波長として、Ex: 392 nm, Em: 462 nm を採用した。

3) 蛍光ラベル化反応における加熱温度および反応時間の検討

Fig.3 に示したとおり、CPH においては、37°C よりも 100°C での加温の方が、蛍光ラベル化反応が促進された。いずれの温度においても 60 min の加温により、ほぼ 100% 反応が進行することがわかった。AGT, PH, MPH においては、100°C に比し 37°C の方が、蛍光ラベル化反応が促進された。その場合、40 min の反応時間で反応が終了することがわかった。

4) 蛍光ラベル化反応における WSC およびピリジンの影響

DMEQ-COCl を用いる場合、緩和な条件で反応性を上げるために、WSC (water soluble carbodiimide, 別名 EDC; 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)carbodiimide) やピリジンの共存下で蛍光ラベル化反応を行うことが多い。そこで、ヒドラジン類の蛍光ラベル化反応におけるこれらの影響を調べたところ、4つのヒドラジン類のいずれにおいても、WSC およびピリジンを加えない方が、反応が進行した (Fig.4)。

5) PH の蛍光ラベル化体の構造確認

蛍光ラベル化体の構造を確認するため、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR および MS (API-3000, positive, ESI および PhotoSpray) の測定を行った。

5-1) ESI 法による結果:

PH の蛍光ラベル化体 (PH-DMEQ) (MW:354.36) では、positive モードで PH (MW:108.14) の [M+H]<sup>+</sup> に相当する  $m/z$  109 のイオンが検出された。親イオンの [M+H]<sup>+</sup> に相当する  $m/z$  355 のイオンは、電圧などを変更しても、強度はあまり変わらなかった。

5-2) PhotoSpray 法による結果:

蛍光ラベル化体 (MW:354.36) では positive モードで、 $m/z$  108 の M<sup>+</sup> イオンが検出されたが、 $m/z$  109 の [M+H]<sup>+</sup> に相当するイオンは検出されなかった。親イオンの [M+H]<sup>+</sup> イオンの  $m/z$  355 や M<sup>+</sup> イオンの  $m/z$  354 の強度は小さく、電圧などを変更しても、あまり強度は変わらなかった。一方、PH では、positive モードで  $m/z$  108 の M<sup>+</sup> イオンと  $m/z$  109 の [M+H]<sup>+</sup> イオンの両方が検出された。

6) 検量線および検出下限

CPH, AGT, PH, MPH の検量線および検出下限を Fig.5 に示した。CPH, AGT, PH, MPH において、それぞれ良好な直線性が得られた。検出下限は、CPH, AGT, PH, MPH でそれぞれ 422, 45.3, 16.5, 138 fmol であった。

7) アガリクスを含むキノコおよびアガリクス健康食品中のヒドラジン化合物量の分析

5種類のキノコおよび3種類のアガリクス健康食品中の CPH, AGT, PH, MPH 量を調べた結果を Table 1 に示した。*Agaricus bisporus* すなわち西洋マッシュルーム中の AGT は 1,836  $\mu\text{g/g dry}$  であった。*Agaricus blazei* Murrill 中の AGT は 111.9—731.3  $\mu\text{g/g dry}$  であった。シイタケ中の AGT は 8.3  $\mu\text{g/g dry}$  であった。一方、アガリクス健康食品3製品中の AGT 量は、product A で 1,791  $\mu\text{g/g dry}$ 、product B で 124.3  $\mu\text{g/g dry}$ 、

product C で N.D.であった。なお、調べた検体において、CPH、PH、MPH は検出されなかった。

#### 8) AGT の回収率

Table 2 に AGT を *Agaricus* 茸 B および *Agaricus* 健康食品 A と C に添加した際の回収率をまとめた。回収率は 93.6–102% と良好であり、試料溶液中のマトリックスによる蛍光ラベル化反応への影響はほとんど見られなかった。

#### D. 考察

AGT を含むヒドラジン誘導体類は塩基性化合物であるため、今回塩基性化合物の分離に適するとされる XBridge™ shield RP18 column を採用した。また、HPLC の溶離液の pH をアルカリ側にするることによって、ヒドラジン化合物の分別定量が可能となった。

DMEQ-COCl は水が存在すると分解されやすいため、試料を添加しない場合においても、クロマトグラム上に多数のピークが見られた (Fig.2)。しかし、これらのピークは対象とするヒドラジン誘導体の蛍光ラベル化体のピークとは分離された。この試薬の分解によるピークと CPH-DMEQ の保持時間が近かったため、これらを分離するために、HPLC 移動相の pH およびイオン強度を検討した。その結果、0.2 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) と MeOH によるグラジエント溶出が分離に最適であり、分析時間 30 min での分析条件が確立された。

HMPH-DMEQ-CO は AGT-DMEQ-CO と同じ保持時間に検出され、さらに 1-acetyl-2-phenylhydrazine の蛍光ラベル化体は、PH-DMEQ-CO と同じ保持時間に検出されたことから、蛍光ラベル化反応は、まずアミド結合が切断され、次に、ヒドラジノ基と DMEQ-COCl とが反応し、蛍光ラベル化体を生成するという順で起こることが示唆された。

DMEQ-COCl は、アミノ基との反応性が、他のラベル化剤の FITC 試薬や NBC 試薬よりも非

常に強いことが知られている。そこで今回、DMEQ-COCl を蛍光ラベル化剤として用い、ヒドラジン誘導体中のヒドラジノ基とアミド結合を形成させて蛍光ラベル化を行った。なお、ヒドラジノ基だけではなく、食品中に含まれるアミノ基を有する化合物を蛍光ラベル化することが考えられた。このため、pyridoxamine, allantoin, guanine, aniline, arginine, histidine, glutamic acid, poly arginine につき、蛍光ラベル化反応を行い、HPLC に負荷したところ、クロマトグラム上にこれらの蛍光ラベル化体は検出されなかった。食品中でアミノ基を有しかつ高濃度で存在するアミノ酸は、そのカルボキシル基の存在のため、保持時間はヒドラジン誘導体とは大きく異なることが予想され、このためヒドラジン誘導体の分析には影響を与えないと考えられた。さらに、ヒドラジノ基と DMEQ-COCl の反応の場合、通常使用される WSC やピリジンを必要としなかった。以上のことから、本研究で確立した分析法は、ヒドラジノ基を有する化合物を特異的に検出できる方法であると考えられた。

食品から AGT を抽出する際に MeOH を使用することから、蛍光ラベル化反応を行う際の MeOH 濃度の影響についても検討した。その結果、MeOH 濃度が反応溶液の 20% 以下では蛍光ラベル化反応の収率はほとんど違いは見られないが、20% 以上になると、蛍光ラベル化反応の収率は、MeOH 濃度の上昇とともに減少することがわかった。したがって、蛍光ラベル化反応の際には、MeOH 濃度を 10% 以下に行うこととした。

蛍光ラベル化体の構造は、NMR と MS により確認された。PhotoSpray 法では、H との親和性が低いサンプルでは M<sup>+</sup>イオン、H との親和性が高いサンプルでは [M+H]<sup>+</sup>イオンが主に観測される。PH では M<sup>+</sup>と [M+H]<sup>+</sup>の両方が検出されたことから、H との親和性は高くないと考えられた。したがって PH よりも構造的に大きい蛍光ラベル化体は、さらに PhotoSpray 法ではイオン化され