

200734039A

厚生労働科学研究研究費補助金
食品の安心・安全確保推進研究事業

貝毒を含む食品の安全性確保に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書
主任研究者 安元 健

平成20(2008)年 3月

目 次

I. 総括研究報告		
貝毒の安全性確保に関する研究	-----	1
安元 健		
II. 分担研究報告		
1. 麻痺性貝毒の定量分析に関する基礎的研究		
大島 泰克	-----	13
2. 有機溶媒可溶性貝毒標準品の調製に関する研究		
関口 礼司	-----	19
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	26

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
総括・分担研究報告書

貝毒の安全性確保に関する研究

主任研究者 安元 健 財団法人 日本食品分析センター 学術顧問

研究要旨

二枚貝に蓄積する毒の中で有機溶媒に可溶性脂溶性成分（脂溶性毒）について、LC-MSによる定量法の確立を目指して、標準毒の調製とLC-MS条件の検討を行った。標準毒は2種類に大別された。第一のタイプは、外部標準として使用する標準毒である。比較的少量で数年の需要に応えられるので、国内・国外で出現する脂溶性毒をほぼ網羅する14成分を調製した：OA, DTX1, pal-OA, pal-DTX1, PTX1, PTX2, PTX6, YTX, 45-OHYTX, BTXB3, BTXB4, AZA1, AZA2, AZA3。第2のタイプの標準毒は、添加・回収試験や、外部評価機関に提供する添加試料の作製に必要な毒で、外部標準毒より多量を必要とする。海外に出現する毒は、抽出原料の入手が困難なので、国内に出現する毒に限定して調製した。近年は脂溶性貝毒の原料に適した二枚貝試料が得られないので、毒含量の低い低品質試料を用い、抽出・精製法に改良を加えて毒を得た。DTX3やpal-OAは、半合成的に作成することができた。また、新たにhomoYTXの標準毒を作成した。品質評価や定量に有用な¹H-NMRの検討を行った。

LC-MSによる一斉分析の条件は既に定めてある。従来は、貝が毒化する春～夏の試料を用いて条件の検討を行った。しかし、輸出が行われる冬季には貝の脂質含量が高まり、マトリックスによる妨害が大きいことも予想されたので、本年度はその検討を行った。その結果、規制値の十分の一に相当する低い含量では、ホタテガイでは回収率が140%に達する成分もあったが、外部標準毒を使用によって実用的な定量が可能な結果が得られた。

麻痺性貝毒については、Dual column-Gradient elutionによる一斉分析法について改良を加え、陽イオン交換カラム10種について検討した結果、InertsilAX (4.4x33 mm)がC1/2成分の保持に最適の資材であることを発見した。また、溶離液の変化に伴って生ずるベースラインの乱れが毒の定量性に影響を与える点について、移動相に関わる全ての要素を検討した結果、イオンペア試薬に含まれる不純物であることを発見し、問題を解決した。また、バリデーション試験に必要な標準毒混合液および主要二枚貝6種(ホタテガイ、マガキ、アサリ、アカガイ、ウバガイ、ムラサキイガイ)からなる分析試料を調製した。

分担研究者 大島 泰克
東北大学大学院 生命科学研究所
教授

関口 礼司
(財)日本食品分析センター お客様相談室
副部長

A. 研究目的

EU の専門家会議は、ジノフィシストキシン類の許容値の引き下げや、ペクテノトキシン (PTX) やイエツトキシン (YTX) についての最新のリスク評価に基づく規制の設定を勧告している。現行のマウス試験法の感度と特異性では、これらの勧告に対応できない。

一方、LC-MS 法は精度と感度に優れているものの、入手可能な標準毒の種類が少ないために測定可能な成分が限定されている。また、現行の麻痺性貝毒分析法も問題が多い。

本研究の主任研究者は、平成 18 年度にわが国で出現する主要毒を含め 14 成分を作成し、新たに LC-MS による主要有機溶媒可溶毒群の一斉分析法を開発した。

本研究の第一の目的は、申請者らがこれまでに培った技術と能力を生かし、標準毒の作製と分析法の国際的な検証試験を行うことにより、国内外の貝毒対策に貢献することにある。

その結果、国産二枚貝の正確な貝毒監視を可能にする。また、二枚貝製品の輸出の際に検査を要求されることの多い、神経性貝毒とアザスピロ酸貝毒測定や、麻痺性貝毒の高精度の検査を可能にする。高精度分析に必要な標準毒の作成は主成分であっても決して容易ではなく、副成分や神経性貝毒、アザスピロ酸貝毒、麻痺性貝毒の一部では更に困難が多く、申請者らを除いては調製に成功していない。

そこで、有機溶媒可溶標準毒は申請者が平成 18 年度に作成した 14 成分を基本とし、国内 20 機関での使用量を勘案すると、各成分を 5 μ g/vial ずつ、合計 200 μ g、すなわち各成分の 1mg を調製すれば 5 年間の需要に応えられる。しかし、標準品の調製に当っては正確な重量測定が求められるので、各成分を 5mg ずつ得ることが目標となる。ただし、AZA 類のように原料入手の困難な成分は 5mg 未満でも止むを得ない。

一方、麻痺性貝毒のポストカラム HPLC 分析については、大島らが開発した分析法の

実用性と精度検証を実施する。

機器分析法では、実施研究機関によって使用機種が異なり、その性能に差異がある。また、測定対象とする貝の種類も多様であるために抽出物中の妨害物質の量と性質に差異がある。国内産の貝の抽出物に標準品を添加した試料と標準品を持参して共同研究機関と現地で実証試験を実施して、改善すべき点があれば協議しながら対策を講じることが効果的である。

このように全ての貝毒の分析精度と実用性向上を図り、消費者の安全を確保する。

B. 研究方法

[標準毒作成 (平成 19~20 年度)]

脂溶性標準毒の作成:

前年度までの研究において、国内で出現する主要な脂溶性毒 10 成分に海外で規制の対象とされている脂溶性の貝毒 4 成分を加えた 14 成分 (図 1) の標準毒を作成し、LC-MS による一斉分析法を設定した。分析法の信頼性を検証するためには、性状の異なる数種の二枚貝試料について更に添加回収試験を行うことと、外部機関に検証を依頼するための標準毒添加試料を必要とする。また、事業終了時には、一定量の標準毒を試験研究機関に提供することを予定している。近年の国内二枚貝の毒化は低く、抽出原料の入手が不可能なことを勘案し、下記の方針で研究を進めた。

1) 下痢性貝毒の主要毒である OA と DTX1 及びそのエステル の作製を最優先する。

2) 低品質原料の処理法を開発して、必要な標準毒を作製する。

3) 前年度までに作製できなかった homoYTX を作製する。

4) 純度及び重量測定に重要な ¹H-NMR スペクトルのデータを整備する。

麻痺性標準毒の作成:

麻痺性貝毒については、分析に必要な C1, C2, GTX1~GTX5, neoSTX 及び dcSTX の主

要麻痺性貝毒 3 群 9 成分からなる標準毒混合液を新たに調製する。また、主要二枚貝数種からなる分析試料を調製し、必要器材とともに参加機関に送付してバリデーション試験を実施する。

[分析条件の検討（平成 19～20 年度）]

LC-MS 法による脂溶性貝毒分析法：

国内で出現する 10 成分と海外で出現する代表的な 4 成分を加えた合計 14 成分について一斉分析法の条件検討を行う。その基本方針は次のように定めた。

- 1) 国内の公定法に従い、中腸腺を抽出の試料とする。
- 2) 迅速性と簡便性を指すので、抽出液の前処理、ヘキサソール分配やカートリッジカラム処理は行わない。
- 3) エステル型下痢性貝毒は、エステル脂肪酸が異なる同属体の混合物であり、分離が困難なので、70%を占める主要成分のパルミチン酸エステルの測定によって判定する。
- 4) LC-MS 測定は選択イオン検出 (SIM) で行い、多重反応イオン検出 (MRM) は行わない。理由は MRM 法が機種と試料マトリックスの影響による変動が大きいこと、エステル体の分離が困難なこと、MS/MS 可能な機種の普及度が十分でないことである。

麻痺性貝毒分析における HPLC 法：

これまでの研究で開発した麻痺性貝毒ポストカラム蛍光化 HPLC 分析法の妥当性確認 (メソッドバリデーション) を実施する。最終的には AOAC International による認定を目指す。本研究ではその下準備として国内数機関による試験を試行する。

倫理面への配慮

本研究は臨床研究や疫学研究等には該当

しないため、倫理面の問題はないと判断した。また、マウス法の代替法を検討することから、実験動物に対する動物愛護を配慮した研究内容と考えられる。下痢性貝毒ではマウス試験は行わない。

ただし、本研究に使用するマウスの数は、最小量に止めることとする。なお、貝毒含有試料の採取場所等が特定される場合は風評被害による影響を受けないよう、都道府県名のみ記すこととする。

C. 研究結果

[標準毒作成]

脂溶性標準毒：

国内及び海外で出現する主要下痢性貝毒及び脂溶性貝毒を図 1 に示した。

わが国の代表的下痢性貝毒成分である DTX1, DTX3, 及び 45-OHYTX は、毒化試料の入手が不可能なので、低純度試料の処理技術とエステル合成技術の検討を実施した。まず、低純度のヘキサソール画分をアルミナカラムで処理して効果的 DTX3 を分離し、加水分解によって DTX1 を精製する技術を開発した (図 2)。DTX1 から DTX3 を合成する方法はすでに検討済みである。この結果、国内で脂溶性区に出現する DTX1, DTX3, OA, OA-エステル, PTX1, PTX2, PTX3, PTX6, YTX, 45-OHYTX の 10 成分をほぼ確保した。平成 19 年度は homoYTX の標準品を新たに調整した。国外で出現する BTXB2, AZA-1, AZA-2, AZA-3 は抽出原料となる毒化二枚貝が入手できなかった。ただし、分析標準品としての最小必要量はすでに保持している。DTX1 に見られるスペクトルの異常は、金属塩の形成によることを解明し、解決した。精製した各標準毒の純度判定は、多波長検出器を用いる HPLC, LC-MS, ¹H-NMR によって行った。一例として、DTX1 の NMR スペクトル、MS スペクトル及び HPLC のクロマトグラムを図 3～5 に示す。

一方、麻痺性貝毒については、C1, C2, GTX1～GTX5, neoSTX 及び dcSTX の主要麻痺

性貝毒 3 群 9 成分からなる標準毒混合液を新たに調製した。また、規制値の 2 倍程度の毒力を有するホタテガイ、マガキ、アカガイ、ムラサキイガイの試験液を天然毒化試料から 30 セット調製した。

[分析条件の検討]

LC-MS 法による脂溶性貝毒分析法：

脂質含量が高く、多量の妨害物質が予想される冬季の中腸腺についても、既報の条件で分析に支障がないことを確認した（図 6，7）。

すなわち、添加回収試験に使用する二枚貝（ホタテガイとムラサキイガイ）は、従来は毒化期の初夏に採取していた。今回は、海外への輸出が行われる冬季の試料について試験を行った。その結果、規制値の十分の一に相当する濃度での回収率は、ホタテガイでは良好であった（70～140%）がムラサキイガイの試料では、OA と DTX1 の回収率が 150% を超えることがあり、今後の検討が必要と判断された（表 1）。

麻痺性貝毒分析における HPLC 法：

ポストカラム蛍光化 HPLC に改良を加え、Dual column-Gradient elution による主要 10 成分の一斉分析に最適の資材を見出した。また、溶離液の変化に伴って生ずるベースラインの乱れが毒の定量性に影響を与える点について、移動相に関わる全ての要素を検討した結果、イオンペア試薬に含まれる不純物であることを発見し、問題を解決した。

D. 考察

脂溶性毒について

海外における LC-MS による脂溶性毒の分析は、ニュージーランドのコースロン研究所が最も熱心に取り組み、In-House Validation のデータも報告している。我々の方法との違いは、①MS/MS を行って検出（MRM）していること、②オカダ酸エステル

の測定は加水分解後のオカダ酸の測定を行っていること、③可食部全体を抽出に使用することである。①MRM 測定を採用しているのは標準品が利用困難なためと推測される。MRM 測定は使用機種や試料二枚貝の種類の差によるマトリックスの影響が大きい。各研究機関が保有する機種や測定対象二枚貝ごとに回収率を検討することが必要になるが、その検討に使用する標準毒が揃わないことが普及の難点とされている。それに対して、我々は必要な標準毒の調製・供給を行って選択イオン測定を行うので、使用機種や使用二枚貝試料の差異による影響は小さい。②我々がエステル型標準毒を使用する利点も大きい。加水分解を行うと PTX 類は破壊され、他の成分も減少するので、一つの試料について加水分解物前後において 2 回の測定が必要となる。我々の方法ではエステル型標準品を使用するので加水分解の必要はなく、エステル体が顕著に検出される試料を精密に測定する場合だけ加水分解を行えばよい。測定の作業・時間が短縮される。③EU では可食部全体の抽出を定めている。しかし、下痢性貝毒が中腸腺に局在することは、国内の二枚貝および EU のイガイでも確認されている。中腸腺の毒濃度が高いので、測定誤差を小さくできることで有利である。

脂質含量が高く、マトリックスによる干渉が最も大きい冬季の試料でも、標準毒を使用すれば下痢性貝毒の検出・定量は可能であった。ただし、精度は低下した。

LC-MS 法による貝毒定量に対する海外での評価は、マウスを使用せず、迅速かつ精度が高い方法として位置付けられている。しかし、標準品の供給がないと機種やマトリックスの違いによる誤差の修正が不可能もしくは困難なために直ちに公定法に採用されるには至っていない。我々は、ほぼ全ての標準毒を自作していることに優位性がある。

麻痺性貝毒について

これまでの研究で開発した麻痺性貝毒ポストカラム蛍光化 HPLC 分析法の妥当

性確認（メソッド バリデーション）を実施する。最終的には AOAC International による認定を目指す。本研究ではその下準備として国内数機関による試験を試行する。

本研究の計画では、一次水産物である貝類を測定対象としているが、最近の話題・問題点としては、貝類を使用した加工食品の安全性についても消費者の関心が強いことから、今後の課題として本研究の成果を加工食品に適用することも考える必要がある。

E. 結論

- 1) 毒の抽出・精製法に改良を加え、低品質原料から標準毒を確保する道を開いた。
- 2) わが国の下痢性貝毒監視に最も重要な DTX1, DTX3 確保への展望を得た。
- 3) ¹H-NMR に於ける異常スペクトルの問題を解決した。
- 4) 新たに homoYTX の標品を調製した。
- 5) マトリックス妨害の大きくなる冬季二枚貝の抽出液でも C-MS 適用の見通しを得た。
- 6) 麻痺性貝毒の一斉分析法について改良を加え、最適の資材を見出した。また、ベースラインの乱れの原因を追究し、イオンペア試薬に含まれる不純物であることを発見し、問題を解決した。
- 7) バリデーション試験に必要な麻痺性貝毒の標準毒および二枚貝抽出液からなる分析試料を調製した。

F. 健康危険情報

健康危険情報について、該当事項はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takeshi Yasumoto: Algal Toxins - An Overview: Methods for Detection and Quantification of Marine Toxins,

Proceedings of the International Symposium on Algal Toxins, Trieste 25-27 May 2007. (in press)

- 2) Megumi Suzuki, Reiji Sekiguchi, Masatoshi Watai, Takeshi Yasumoto: Preparation and simultaneous LC-MS analysis of fourteen shellfish toxins, Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae 2006, Copenhagen, Denmark (in press).

- 3) C. Alfonso, A. Alfonso, M. J. Pazos, M. R. Vieytes, T. Yasumoto, A. Milandri, R. Poletti, L. M. Botoana: Extraction and cleaning methods to detect yessotoxins in contaminated mussels, Analytical Biochemistry, 363, 228-238, 2007.

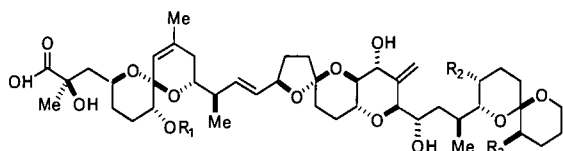
- 4) Yasukatsu Oshima: Characteristics of PSP-toxin profiles in bivalves from Japanese coastal waters, Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae 2006, Copenhagen, Denmark (in press).

2. 学会発表

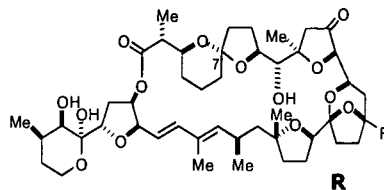
- 1) Takeshi Yasumoto: Marine Toxin Detection at the Chemistry/Biology Interface, (Plenary lecture), 121st AOAC Annual Meeting & Exposition, Anaheim, California, USA, September 16-20, 2007

- 2) Takeshi Yasumoto: Algal Toxins - An Overview, (Plenary lecture), International Symposium on Algal Toxins, Trieste, May 27-29, 2007.

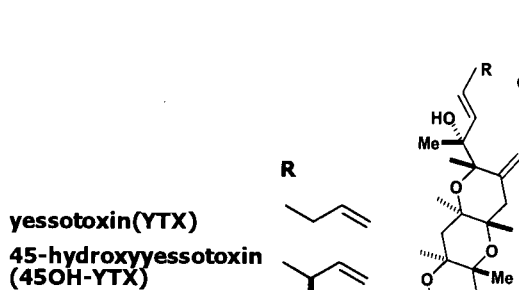
- 3) M. Suzuki, R. Sekiguchi, M. Watai, T. Yasumoto: Preparation of fourteen shellfish toxins and their simultaneous analysis by LC-MS (poster), 121st AOAC Annual Meeting & Exposition, Anaheim, California USA, September 16-20, 2007.



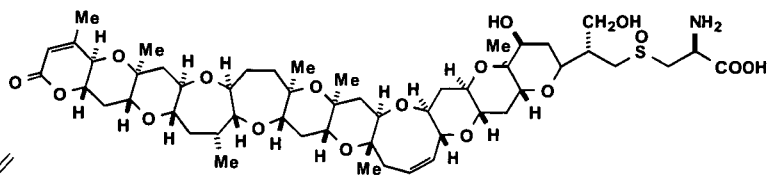
okadaic acid (OA)	R1	R2	R3
dinophysistoxin 1(DTX1)	H	Me	H
pal-OA	H	Me	Me
pal-DTX1	palmitoyl	Me	H
	palmitoyl	Me	Me



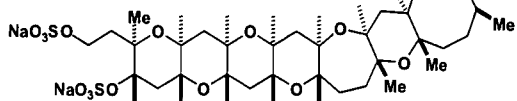
pectenotoxin1 (PTX1)	R
pectenotoxin2 (PTX2)	CH ₂ OH
pectenotoxin3 (PTX3)	CH ₃
pectenotoxin6 (PTX6)	COOH



yessotoxin(YTX)
45-hydroxyyessotoxin (45OH-YTX)



BTXB2



	R1	R2	R3	R4
Azaspiracid	H	H	H	Me
Azaspiracid -2	H	Me	Me	H
Azaspiracid -3	H	H	H	H

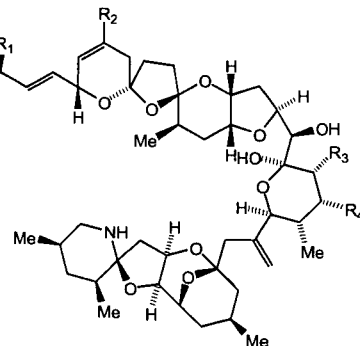


図1 国内及び海外で出現する主要下痢性貝毒及び脂溶性貝毒

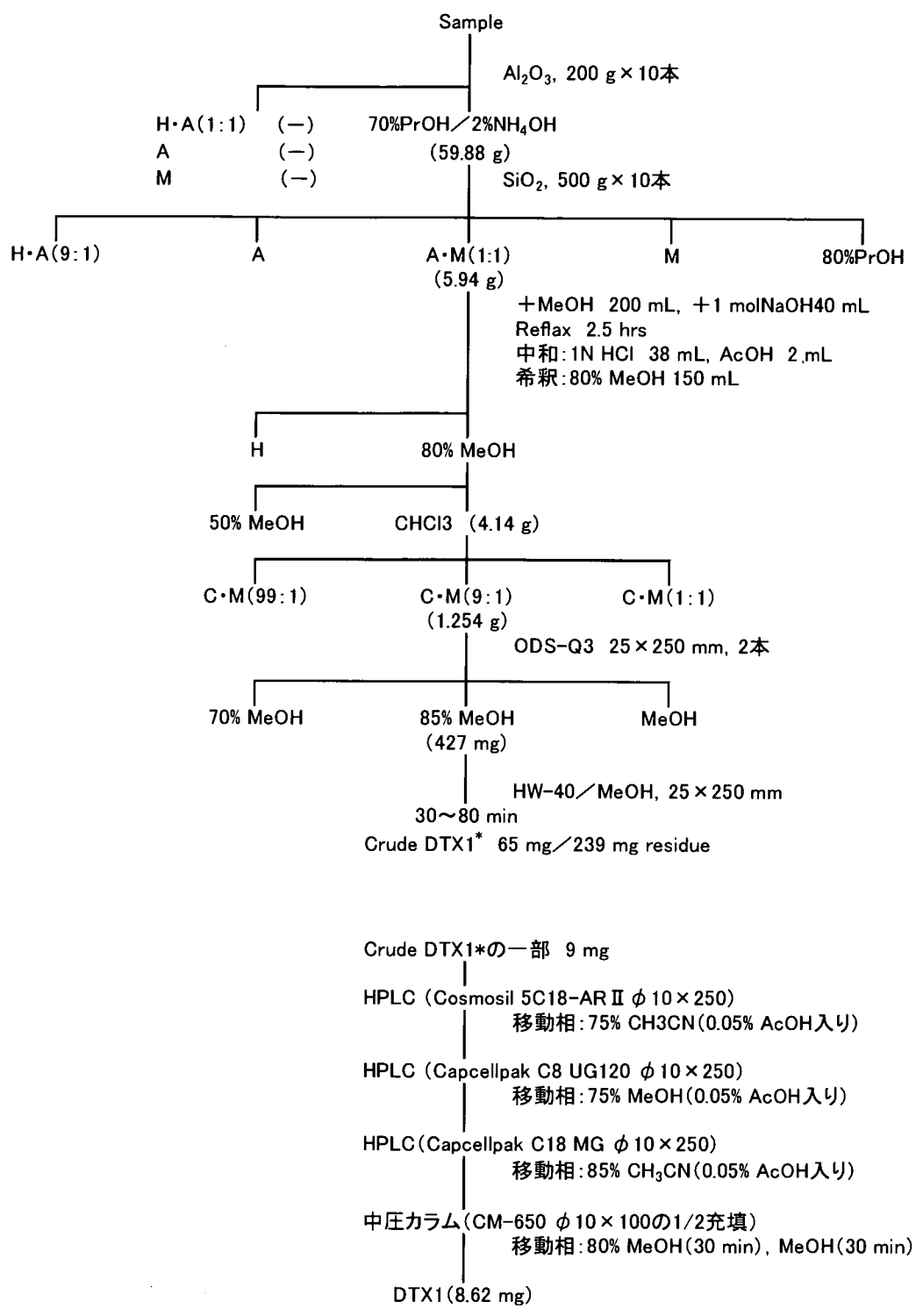


図2 DTX1調製の1例

試料: 1995年陸奥湾産ホタテガイ中腸腺ヘキサン区 2.24 kg DTX1換算88 mg含有
略号: H: Hexane, A: Acetone, C: Chloroform, M: Methanol, SiO₂: シリカゲル60, Al₂O₃

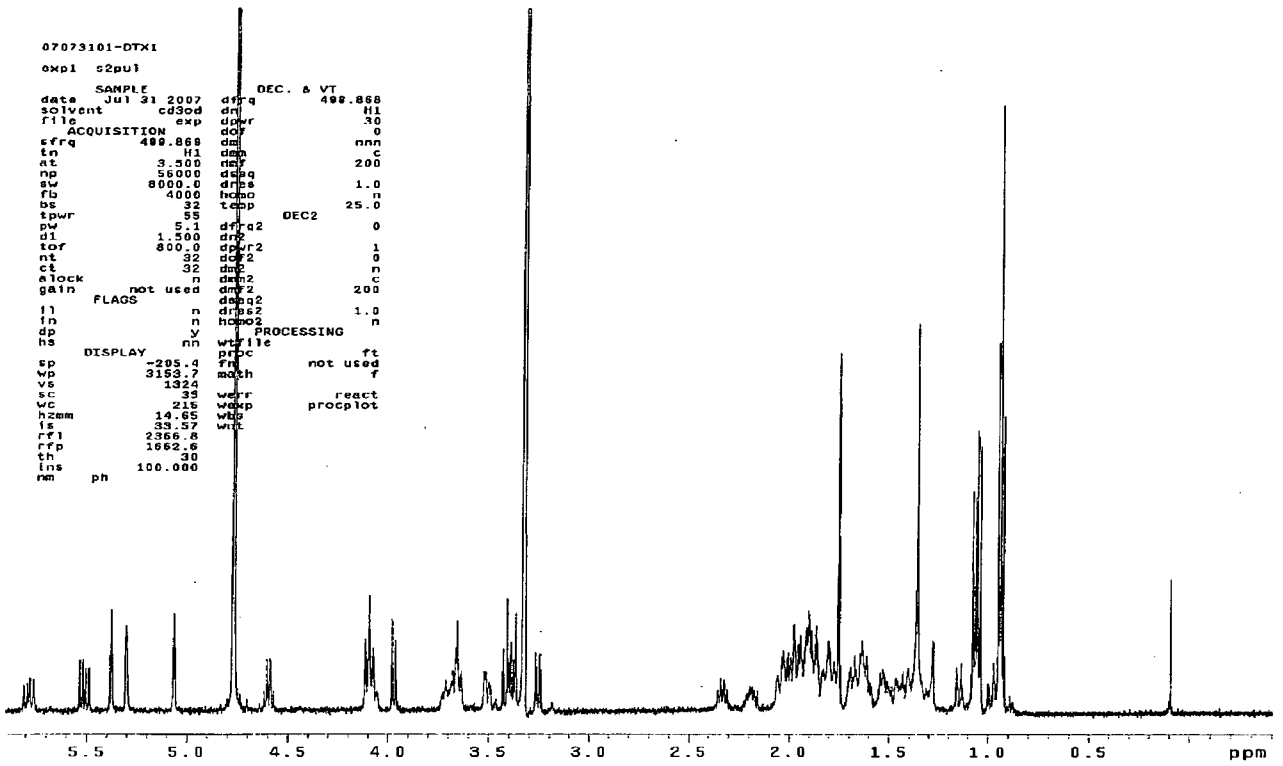


図3 DTX1精製品の水素核一次元核磁気共鳴スペクトル

C:\Xcalibur\data\dsp 2007\071128scan06
nega 700-1000

11/28/2007 2:02:56 PM

07112301 dbx1 nega

071128scan06 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 3.22E4
T: - c Q1MS [700.00-1000.00]

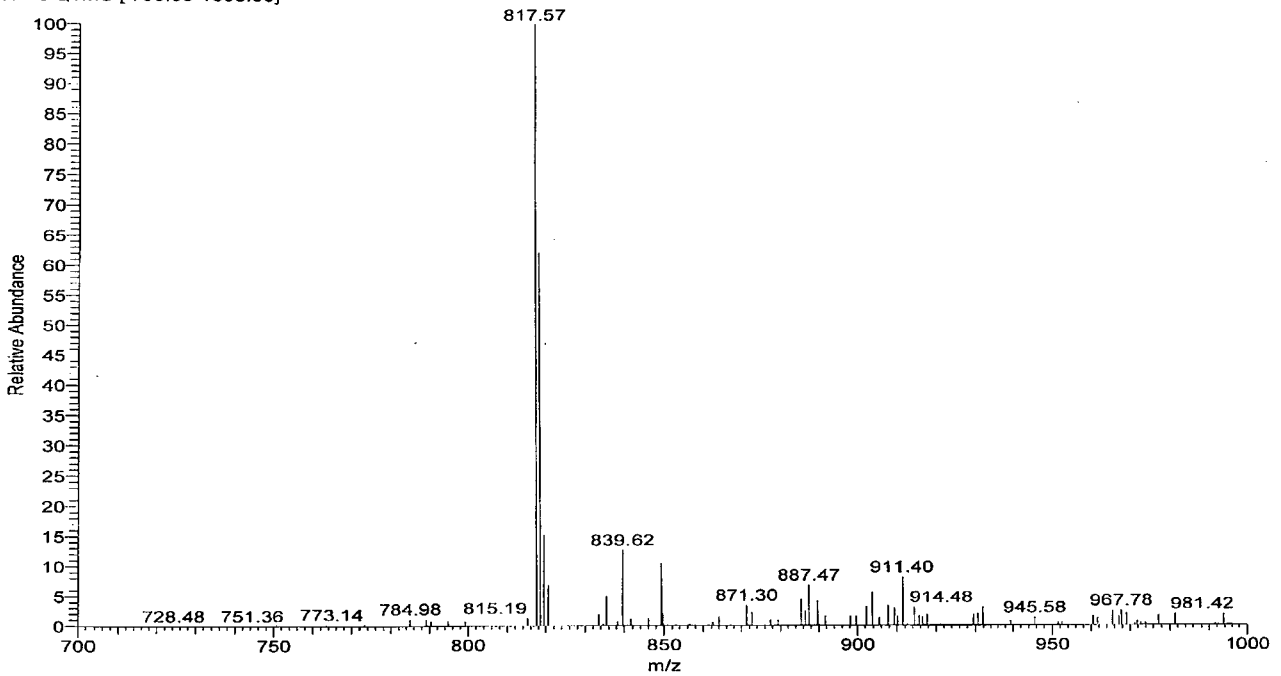


図4 DTX1精製品のLC/MSスペクトル

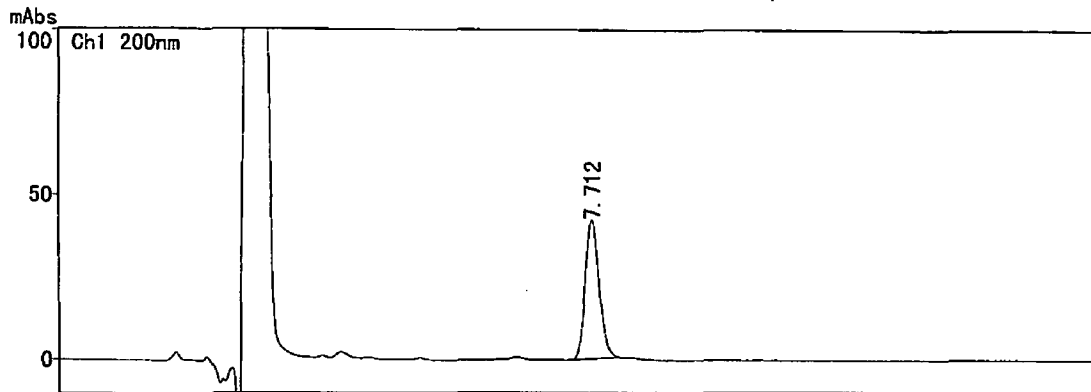


図5 DTX1精製品のHPLCクロマトグラム

DTX1 : 0.84 mg

CapcellpakC18 ϕ 4.6 \times 250, 75%MeCN/0.05%AcOH, 1.0mL/min, 35 $^{\circ}$ C

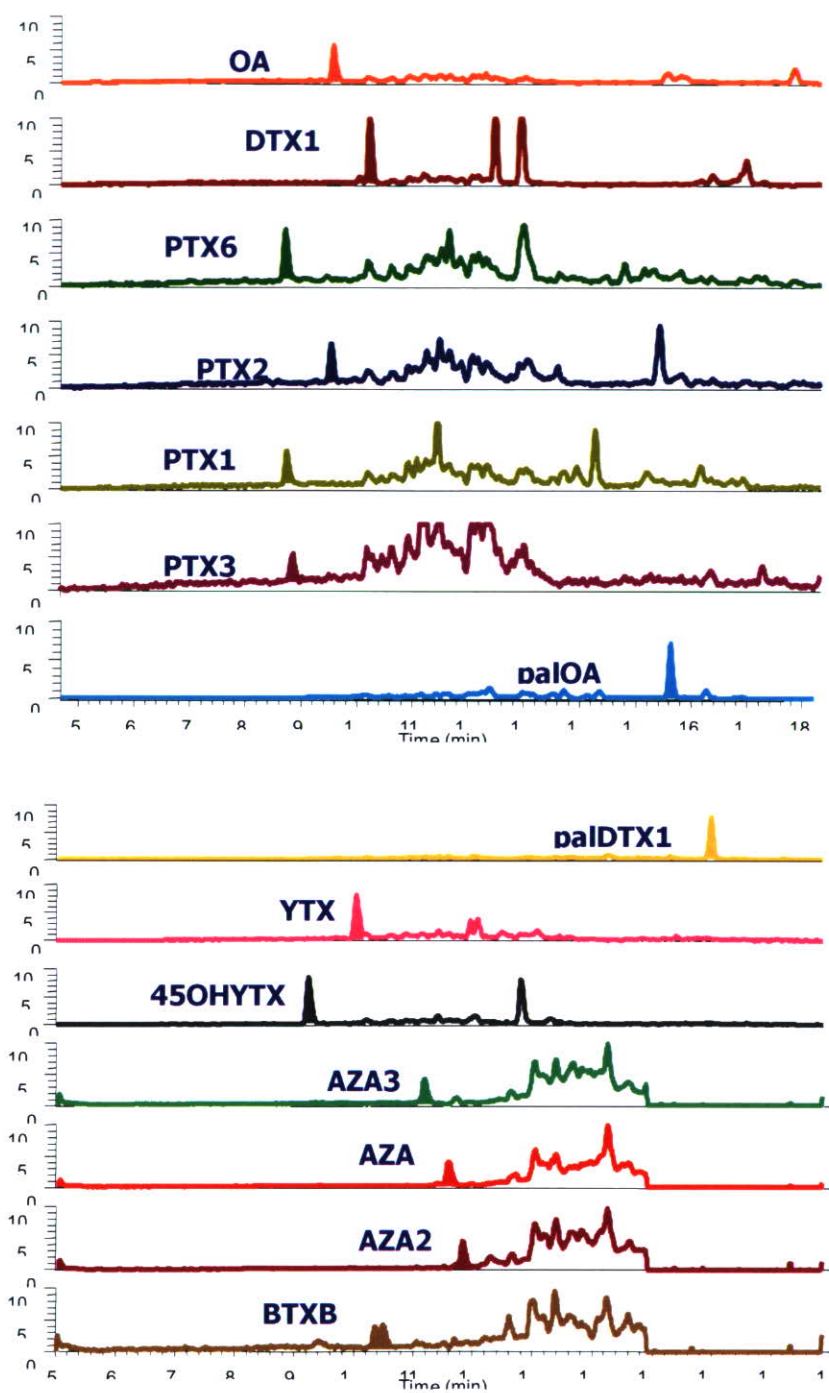


図6 ホタテガイ抽出液（標準品添加）のLCMS測定結果

初夏～初秋の試料(平成18年度実施)

上図：陰イオンモード，下図：陽イオンモード

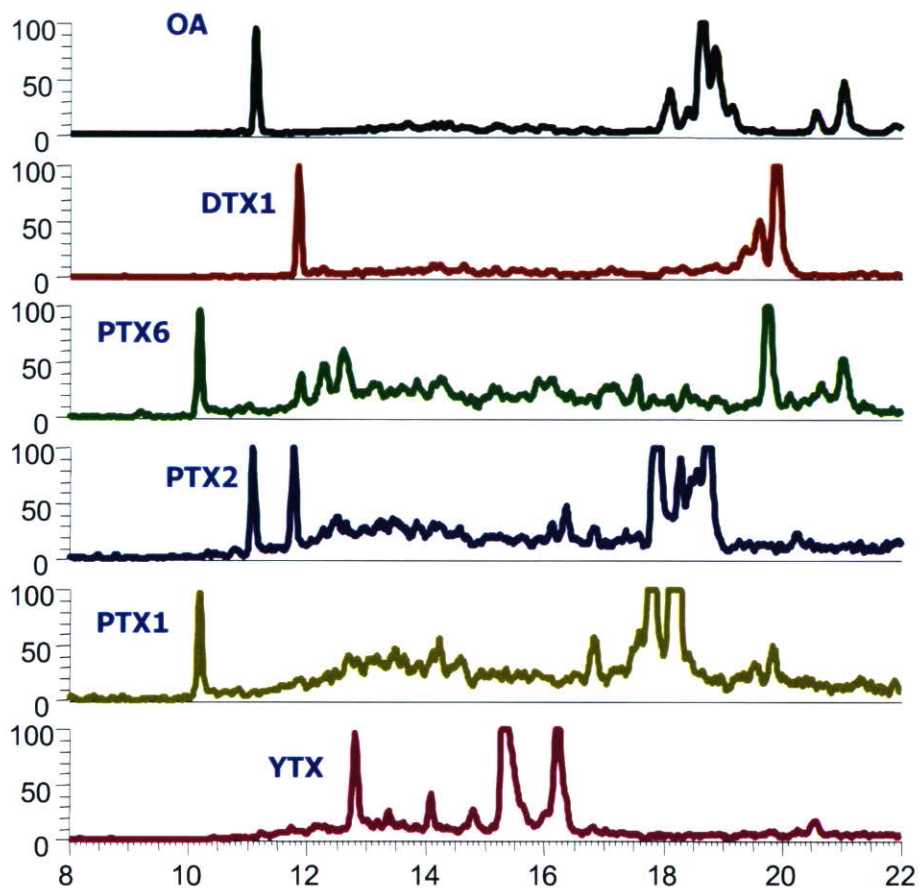


図7 ホタテガイ抽出液（標準品添加）のLCMS測定結果

冬季の試料(平成19年度実施)*，陰イオンモード

*:マトリックスの影響を受け易い成分について実施

表1-1 ホタテガイ中腸腺を用いた添加回収試験結果 (%)

ホタテガイ中腸腺 抽出液濃度	回収 (%)											
	OA		DTX1		PTX1		PTX2		PTX6		YTX	
0.5 $\mu\text{g/ml}$	121	118	127	127	93	98	92	98	91	94	77	86
0.25 $\mu\text{g/ml}$	112	113	129	123	89	91	87	96	92	89	76	80
0.15 $\mu\text{g/ml}$	110	108	130	126	95	95	91	92	86	97	75	84
0.05 $\mu\text{g/ml}$	101	108	124	132	92	95	79	100	95	101	80	83
0.03 $\mu\text{g/ml}$	107	106	123	140	108	118	95	95	95	102	73	84
0.015 $\mu\text{g/ml}$	113	107	115	140	96	110	130	115	113	82	70	89

ホタテガイ中腸腺：北海道産 (PTX1；トレースあり, PTX6；0.13 $\mu\text{g/g}$, YTX；0.15 $\mu\text{g/g}$)

表1-2 ムラサキイガイ中腸腺を用いた添加回収試験結果 (%)

ムラサキイガイ中腸腺 抽出液濃度	回収 (%)											
	OA		DTX1		PTX1		PTX2		PTX6		YTX	
0.15 $\mu\text{g/ml}$	176	168	156	161	97	89	94	99	96	94	81	85
0.075 $\mu\text{g/ml}$	176	170	154	164	90	102	102	101	96	96	78	91
0.05 $\mu\text{g/ml}$	182	167	171	140	100	90	98	101	93	91	86	85
0.015 $\mu\text{g/ml}$	166	191	144	158	68	96	105	127	84	123	81	102
0.01 $\mu\text{g/ml}$	164	177	109	156	69	125	131	93	95	101	56	94
0.005 $\mu\text{g/ml}$	148	193	108	148	7	81	77	60	110	86	42	101

ムラサキイガイ中腸腺：三重県産 (PTX1；トレースあり?)

平成 19 年厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進 研究事業）
貝毒を含む食品の安全性確保に関する研究
分担研究報告書

麻痺性貝毒の定量分析に関する研究

分担研究者 大島泰克 東北大学大学院生命科学研究科 教授

研究要旨：アルカリ下で酸化すると蛍光物質に変換する麻痺性貝毒の特異な性質を利用したポストカラム蛍光化 HPLC に改良を加え、Dual column-Gradient elution による主要 10 成分の一斉分析に最適の資材を見出した。また、溶離液の変化に伴って生ずるベースラインの乱れが毒の定量性に影響を与える点について、移動相に関わる全ての要素を検討した結果、イオンペア試薬に含まれる不純物であることを発見し、問題を解決した。さらに、バリデーション試験に必要な標準毒混合液および主要二枚貝 6 種(ホタテガイ、マガキ、アサリ、コタマガイ、ヒオウギ、ムラサキイガイ)からなる分析試料を調製するなど、次年度の試験実施にそなえ、準備した。

A. 研究目的

麻痺性貝毒について標準毒の作出法から蛍光 HPLC 分析法を改良して、その実用検証を行うことを目的とする。また、麻痺性貝毒定量にかかわる基盤技術の整備に努める。本年度は以下の 3 項目について基礎データを収集することとした。

1) 蛍光 HPLC による一斉分析法の改良

昨年度設定したグラジエント溶出を導入した分析法をさらに改良する。特に、溶媒フロントに溶出する不純物と C1/C2 との良好な分離を目指す。

2) 移動相変化に伴うベースラインの乱れの原因の追究と解決

グラジエント溶出の開始に伴い、平衡化等の段階で蓄積されていた蛍光不純物が押し出され、ベースラインの乱れとなって定量分析を妨害することがある。この原因となる物質の由来を系統的に追及し、除去して問題の解決をはかる。

3) 標準溶液の調製

蛍光 HPLC 法をはじめ、麻痺性貝毒の化学分析には多数存在する全成分の標準品をそろえることが不可欠である。乾燥に不安定な麻痺性貝毒にあっては、正確な濃度測定法として定量 NMR 法が適していることを示してきたが、本年度はデカルバモイルゴニオトキシニン-2, 3 (dcGTX2/3) を使って 11 位硫酸エステルのエピマー平衡混合物にこの方法が適用可能かどうか

調査するとともに、同毒の基準溶液を調製する。

4) 分析サンプルの調製等、バリデーション試験にそなえた準備

次年度のバリデーション試験にそなえ、分析サンプルとして、多様な二枚貝の有毒抽出液を調製した。また、貝毒分析に習熟しているコースロン研究所(ニュージーランド)を訪問し、担当者とバリデーションをめぐる諸問題について討論、検討した。

B. 研究方法

1) 蛍光 HPLC 法の改良

逆相分配系の Synergi 4 μ Hydro RP カラム(ϕ 4.6 \times 150mm)に連結し、C1/C2の保持と分離を担うカラムとして、以下の陰イオン交換系のカラムを検討した。

- ・ Inertsil AX (\square 4.6 \times 33 mm)
- ・ IC-Pak A HC (\square 4.6 \times 150 mm)
- ・ HITACHI GEL 3103-N (\square 4 \times 35 mm)
- ・ TSK-GEL DEAE-5PW (\square 7.5 \times 75 mm)
- ・ TSK-GEL DEAE-NPR (\square 4.6 \times 35 mm)
- ・ Shim-Pak PAG-DEAE (\square 8.0 \times 10 mm)
- ・ Shim-Pak WAX-2 (\square 4.0 \times 50 mm)

まず、ヘプタンスルホン酸をイオンペアーとして含む GTX 用の移動相を流した場合に C1/C2 および GTX 群標準がどのような挙動を示すかを検討し、もっとも良好な分離を示したカラムを Synergi カラムの直前に接続し、GTX 群、STX 群分離用の移動相の内容、タイムプログラムを微調整して最適化をはかった。標準毒混合液の連続分析を実施して検出感度、再現性等を検

証した。

2) 溶離液変化に伴うベースラインの乱れの原因の追究と解決

移動相を構成する水、緩衝材であるリン酸アンモニウム、アセトニリル及びイオンペアー試薬の 1-ヘプタン硫酸ナトリウムの個々について高純度化をはかり、そのクロマトグラムに与える影響を調べて妨害物質の原因を特定した。

3) 標準溶液の調製

C1/C2 混合溶液を中性溶液中で加水分解し dcGTX2/3 を調製した。tert-ブタノールを内部標準として含む重酢酸溶液に溶解し $^1\text{H NMR}$ を測定し、濃度を決定した。

C. 研究結果

1) 蛍光 HPLC 法の改良

図 1 に示すように Inertsil AX (\square 4.6 \times 33 mm) が C1/C2 を保持し、分離能はわずかであるが、IC-Pak Anion HC より良好であった。DEAE 系カラムはさらに強く C1/C2 を保持したが、Dual カラム系では後続の GTX 毒群と重複するため適用しなかった。

Inertsil AX カラムを Synergi Hydro-RP カラムと直列に接続し、昨年度設定した GTX 群、STX 群分離の溶離条件を微調整したタイムプログラムにより図 2 に示す良好なクロマトグラムが得られた。以下に最終的に設定した溶出条件を示す。

- A 液 : 4 mM ヘプタンスルホン酸
20 mM リン酸アンモニウム

2%アセトニトリル

pH 7.1

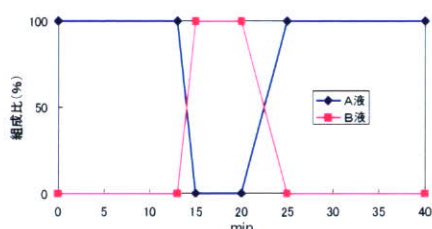
B液：4 mM ヘプタンスルホン酸

20 mM リン酸アンモニウム

10% アセトニトリル

pH 7.1

プログラム



標準溶液を10回の繰り返し分析に供し、再現性を調べた。保持時間とピーク面積の変化を図3、図4に示す。40分間の繰り返し分析で保持時間には良い再現性が見られている。また、ピーク面積は室温の変化に伴って徐々に低下する傾向が見られたが、外部標準を間にはさみながら行なう分析では問題ない範囲と思われる。

実資料の分析例として、C1/C2を比較的多量に含む愛知県産のアサリのクロマトグラムを図5に示す。

4) 溶離液変化に伴うベースラインの乱れの原因の追究と解決

系統的な移動相構成要素のチェックにより以下の事実が判明した。通常の蒸留水、HPLC用以上の高純度のアセトニトリルを使用すれば問題ない。また、リン酸バッファーも汚染源としては問題ない。一方へ1-ブタンスルホン酸ナトリウムはメーカーにより極端な妨害物質が含まれていた。今のところ、東京化成工業(株)のHPLC用イオンペア試薬(Sodium 1-Heptanesulfonate)を使えば良好なクロ

マトグラムが得られる(図2)。

3) 標準溶液の調製

図6にdcGTX2/3混合物のNMRスペクトルを示す。シグナルが独立している 10β 面積からdcGTX3の濃度を決定し、両者が重複している 10α の面積のこの値を適用してdcGTX2の濃度を決定することができた。

今後、順次再検討していくGTX1/4, GTX2,3, C1/C2等エピマー混合物の濃度決定のための基礎情報を得ることができた。

4) 分析サンプルの調製等、バリデーション試験にそなえた準備

次年度のバリデーション試験にそなえ、分析サンプルとして、これまでに各地で集めた試料から以下の有毒抽出液を調製した。毒濃度は現行規制値の2-3倍の範囲に入るものを選び、マウス試験法に従って抽出し、SepPak C-18カラムを使い脱脂した後、0.75 mLずつ分注し、凍結保存した。

ホタテガイ	岩手県
マガキ	宮城県
アサリ	愛知県
コタマガイ	宮城県
ヒオウギ	徳島県
ムラサキイガイ	宮城県

また、旧法の蛍光分析を常用し、他の多くの貝毒分析に習熟しているため、新法を容易に実施できることが予想されるコースロン研究所(ニュージーランド)を訪問し、担当者とバリデーションをめぐる諸問

題について討論、検討した。また、新一斉分析法のテストランを依頼した。

D. 考察

新陰イオン交換カラムを接続することにより C1/C2 群から STX 群にいたる一斉分析法を改良した。また、ブランクのベースラインの乱れの原因がイオンペア試薬の純度にあることを明らかにし問題を解決し、ほぼバリデーション実施のめどがたった。

ただし、これまでに麻痺性貝毒の分析の経験があり、グラジエント溶出、オートサンプラーによる一斉分析法に移行できる可能性のある研究室は少ない。しっかりしたシングルラボバリデーションを実施するとともに、国内 2 機関、海外 1 機関に実施を依頼する予定である。

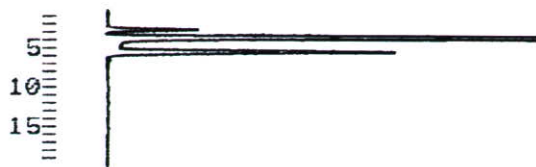
これとは別に旧法をルーチンで実施している国内の研究機関に呼びかけて参加者をつのり、旧法のバリデーションを併せて実施する予定である。

E. 研究発表

今年度の研究成果については一部を国内の学会で口頭発表する予定である。また、早急に論文に取りまとめる予定である。

F. 知的財産権の出願・登録状況

特に予定はない。



Inertsil AX(ϕ 4.6×33 mm)



TSK-GEL DEAE-5PW (ϕ 7.5×75 mm)

図1 Inertsil AX および TSK-GEL DEAE-5PW による C1/C2 の分離
(4mM ヘプタンスルホン酸、2%アセトニトリルを含むリン酸緩衝液を移動相とした)

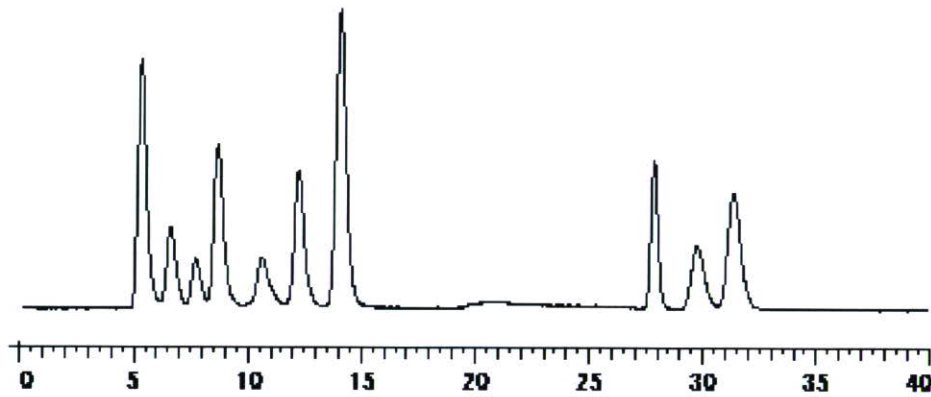


図2 Inertsil AX+Synergi Hydor-RP カラムによる標準毒混合溶液のクロマトグラム

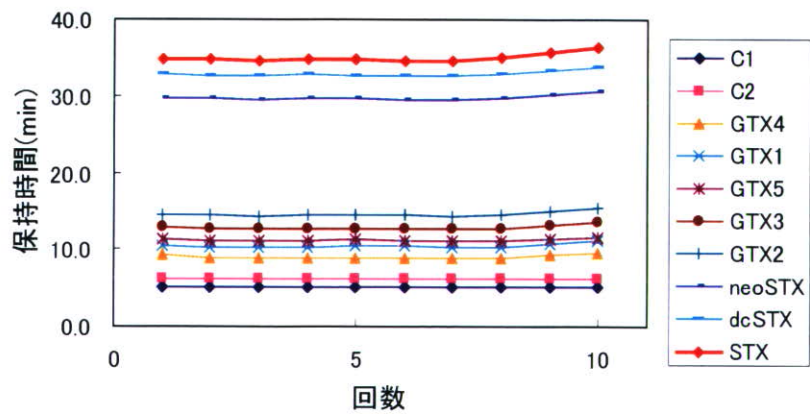


図3 繰り返し分析における各毒の保持時間の変化

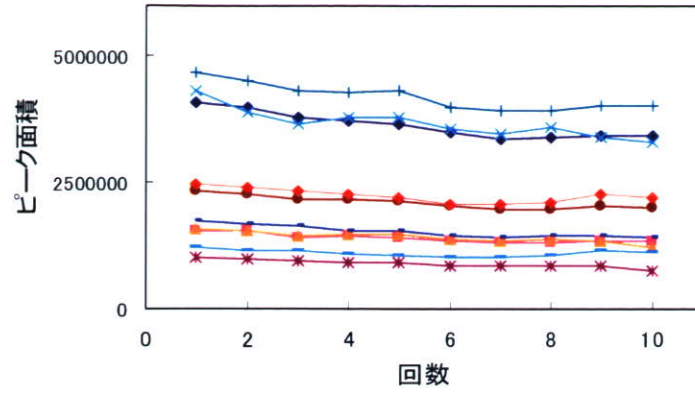


図4 繰り返し分析における各毒のピーク面積の変化

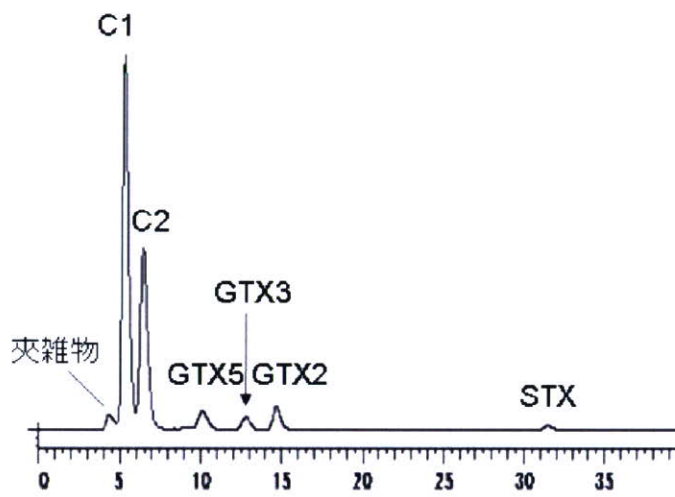


図5 実試料の分析例(愛知県産アサリ)

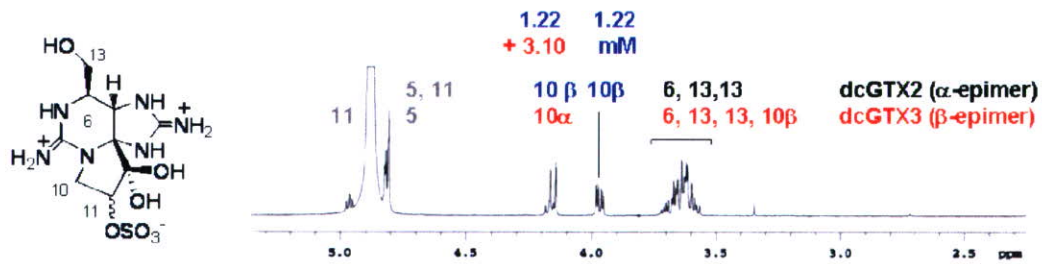


図6 定量NMRによるdcGTx2/3の濃度決定