

図5 DTX1の調製例

試料: 1995年陸奥湾産ホタテガイ中腸腺ヘキササン区 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: アルミナ(活性度Ⅲ)

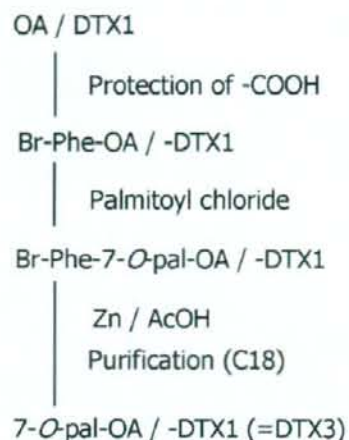


図6 オカダ酸及びジノフィシストキシン-1からバルミトイルオカダ酸 (7-*θ*-pal-OA),
 バルミトイルジノフィシストキシン-1 (7-*θ*-pal-DTX1) の合成方法概略図

表2 作成した貝毒標準品の純度

| | ¹ H-NMR | LC-AD | LC-MS |
|----------|--------------------|-------|-------|
| OA | ○ | ○ | ○ |
| DTX1 | ○ | ○ | ○ |
| pal-OA | ○ | ○ | ○ |
| pal-DTX1 | ○ | ○ | ○ |
| PTX1 | ○ | ○ | ○ |
| PTX2 | ○ | ○ | ○ |
| PTX3 | □ | ○ | ○ |
| PTX6 | ○ | ○ | ○ |
| YTX | ○ | ○ | ○ |
| homoYTX | □ | ○ | ○ |

○ : >97%, □ : 分担研究者の関口が制作

市販されている標準品 : OA, PTX2

貝毒標準品事業 (農林水産省消費・安全局) より入手可能な標準品 : DTX1, YTX, PTX1, PTX6

本事業により精製・作製した標準品 : PTX3, pal-OA, pal-DTX1, homoYTX, AZA1

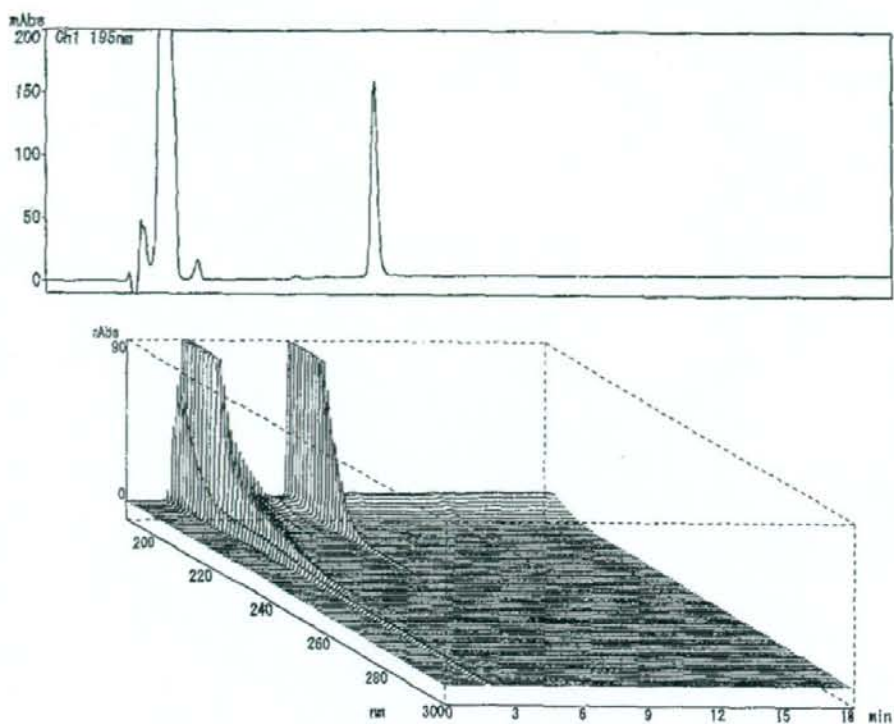


図7-a オカダ酸精製品のHPLC測定結果

CapcellpakC18 UG120 ϕ 4.6 \times 250, 0.05%AcOH/MeCN (3:7), 1.0mL/min, 40 $^{\circ}$ C

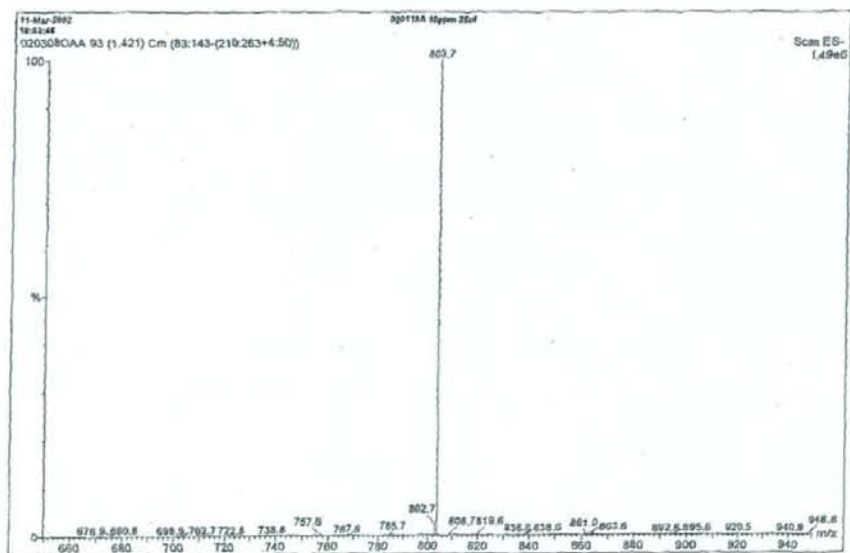


図7-b オカダ酸精製品のMSスペクトル

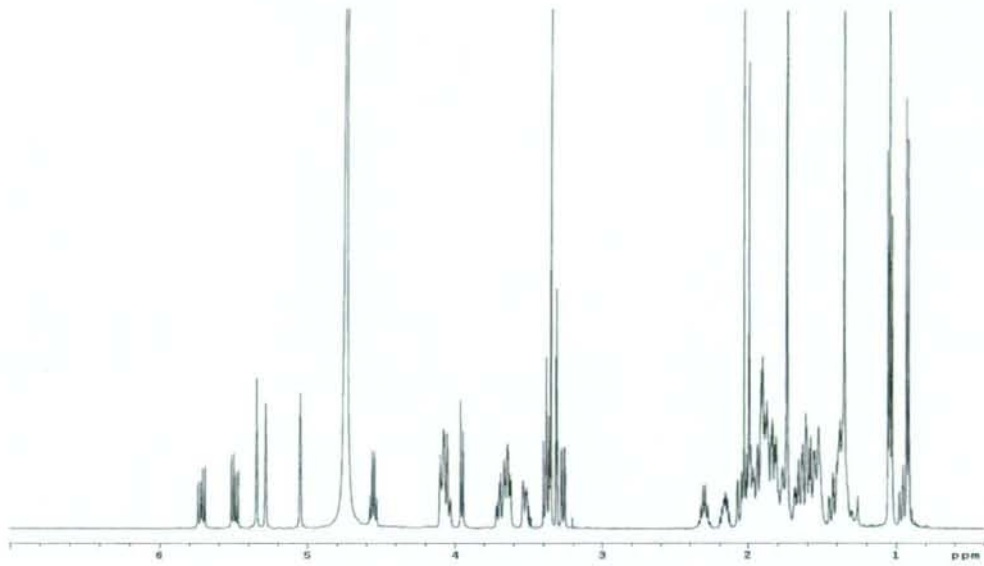


図7-c オクタ酸精製品の¹H-NMRスペクトル
(500 MHz, CDCl₃-CD₃OD (1:2))

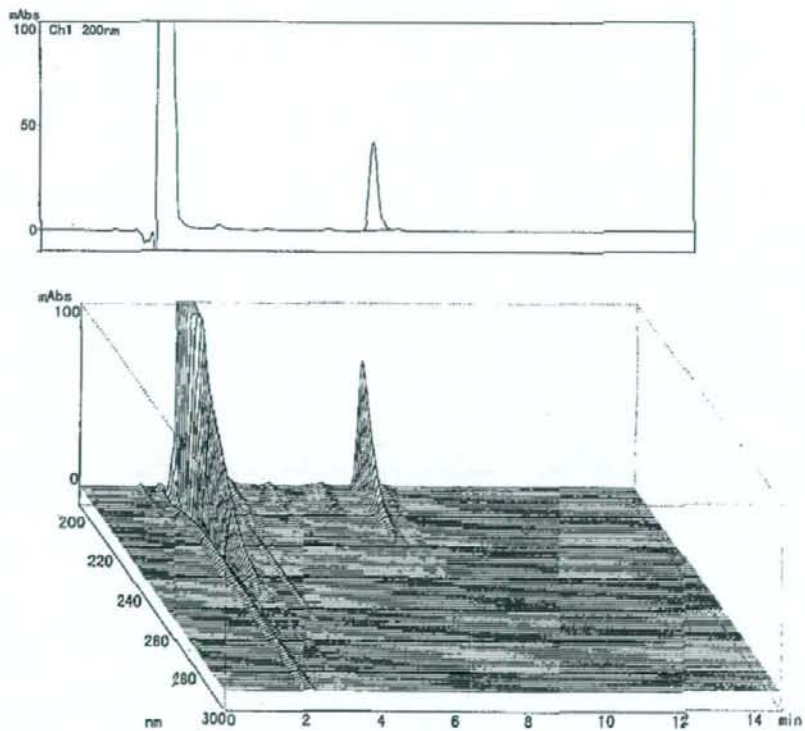


図8-a DTX1精製品のHPLC測定結果

CapcellpakC18 φ4.6×250, 75%MeCN (0.05%AcOH 含有), 1.0mL/min, 35°C

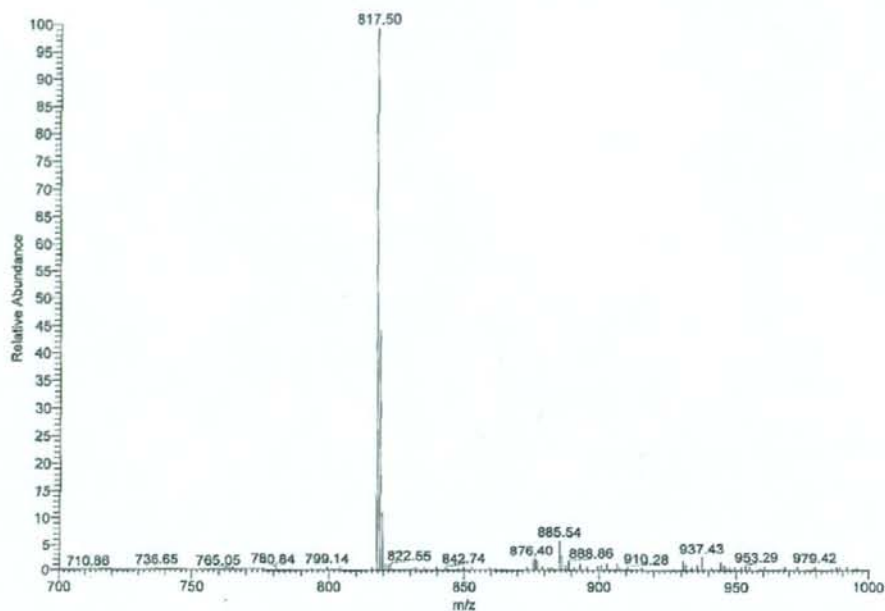


図 8 - b DTX1精製品のMSスペクトル

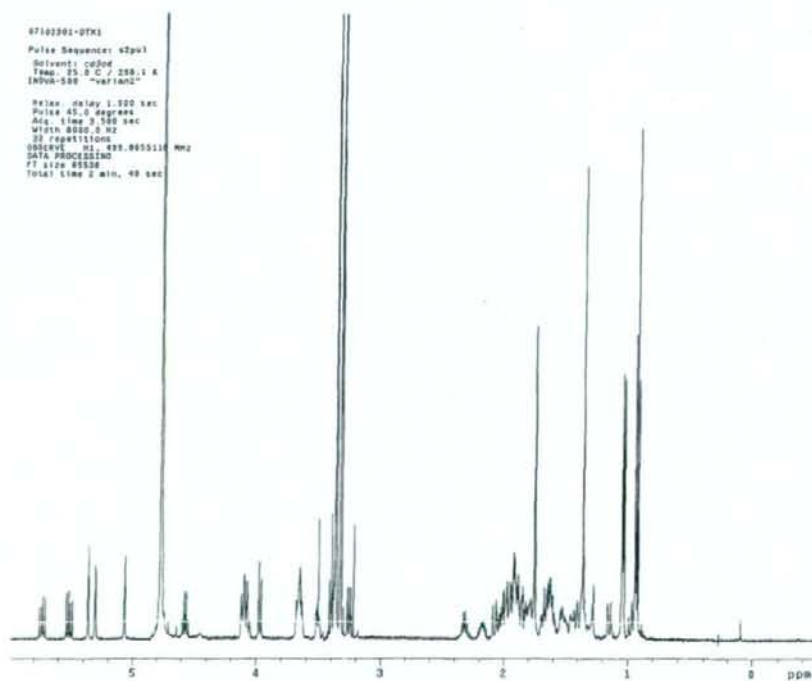


図 8 - c DTX1精製品の¹H-NMRスペクトル
(500 MHz, CDCl₃-CD₃OD (1:2))

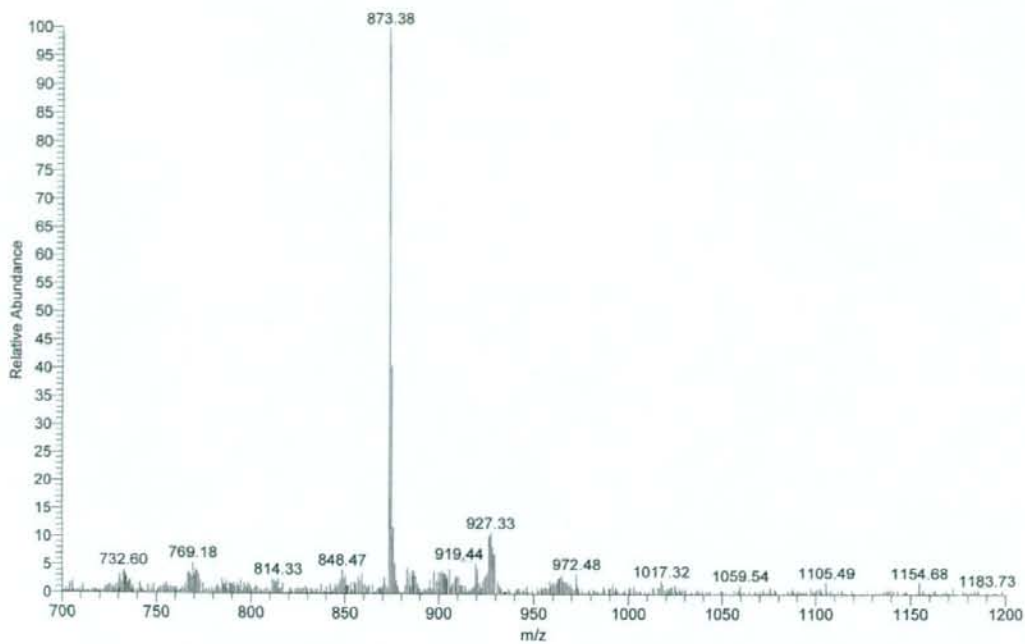


図9-a PTX1精製品のMSスペクトル (陰イオンモード)

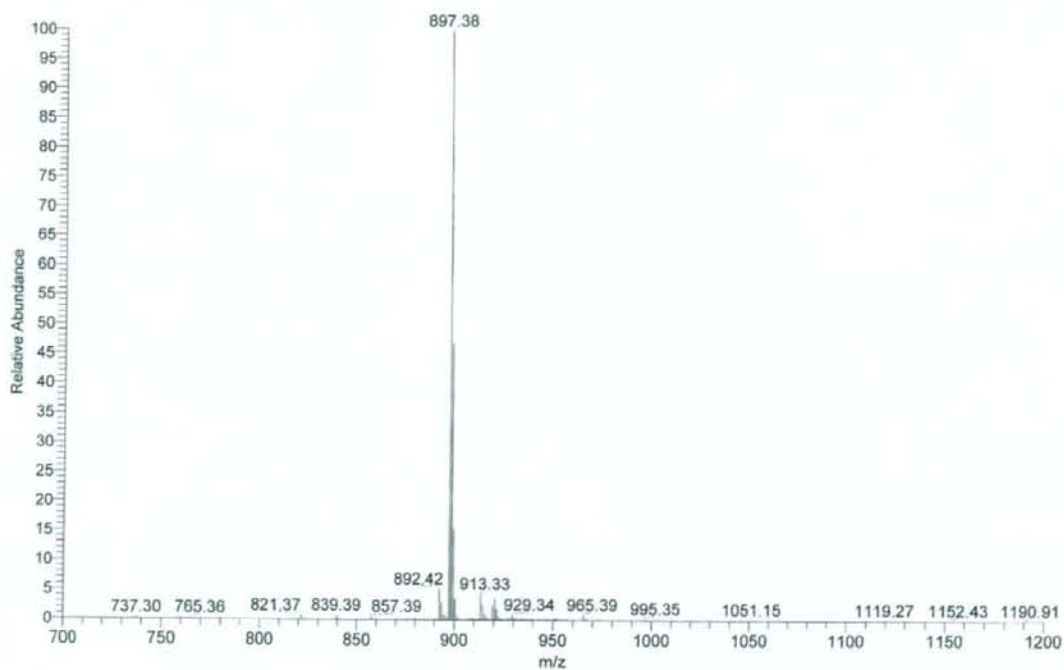


図9-b PTX1精製品のMSスペクトル (陽イオンモード)

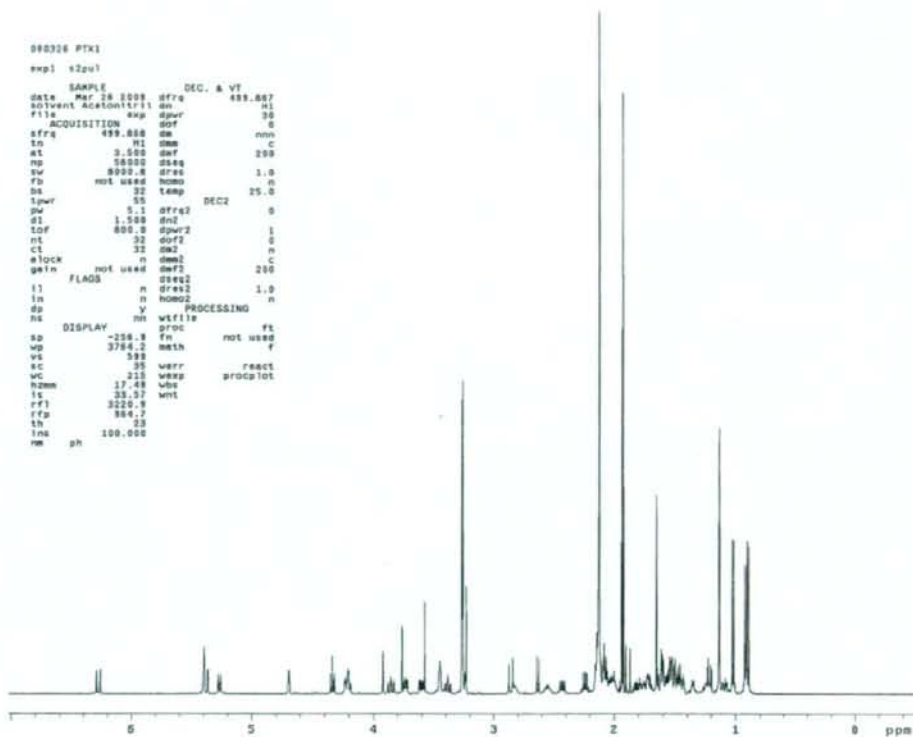


図9 - c PTX1精製品の¹H-NMRスペクトル
(500 MHz, CD₃CN)

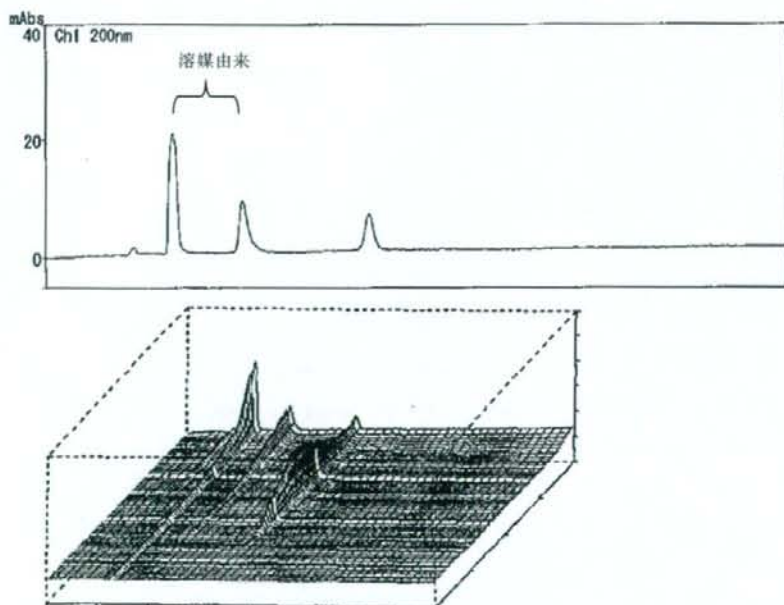


図10 - a PTX2精製品のHPLC測定結果

CapcellpakC18 φ4.6×250, 80%MeOH, 1.0mL/min, 35°C

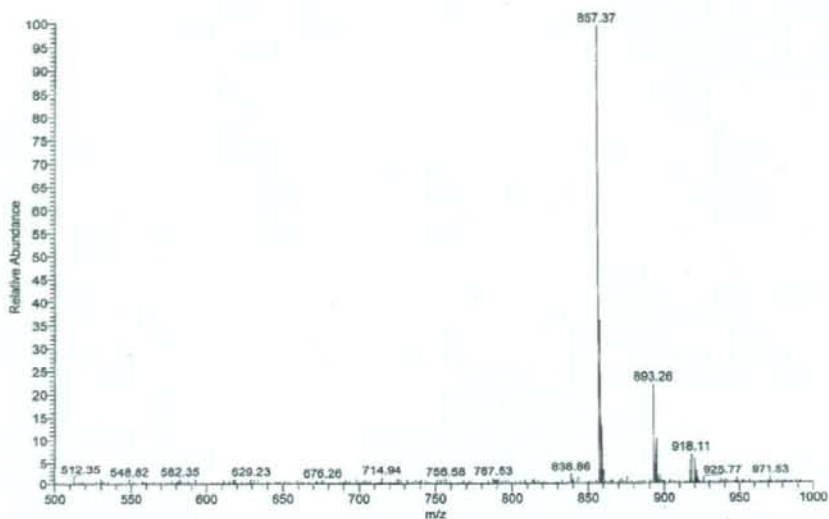


図10-b PTX2精製品のMSスペクトル

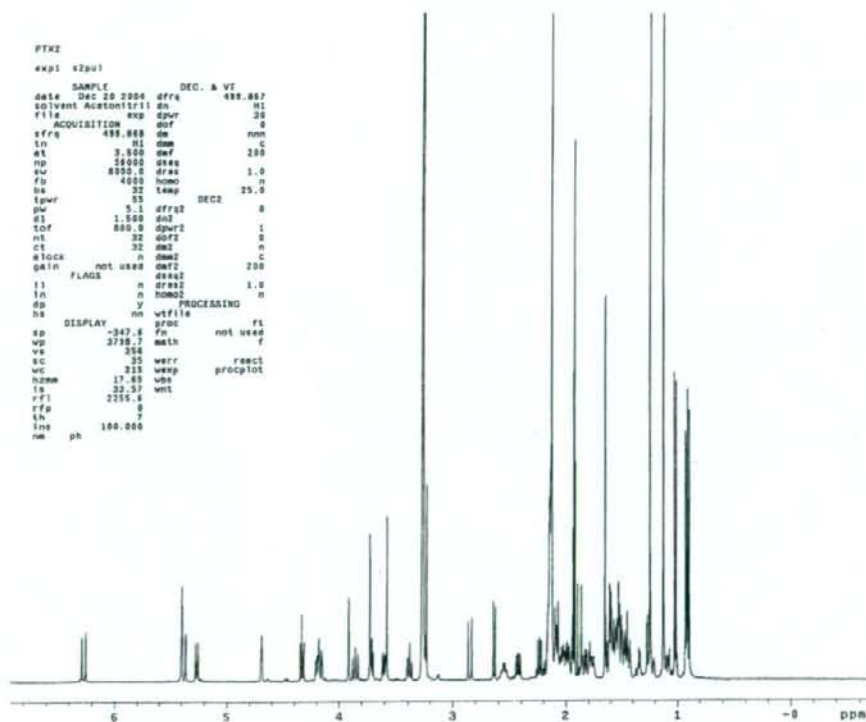


図10-c PTX2精製品の¹H-NMRスペクトル
(500 MHz, CD₃CN)

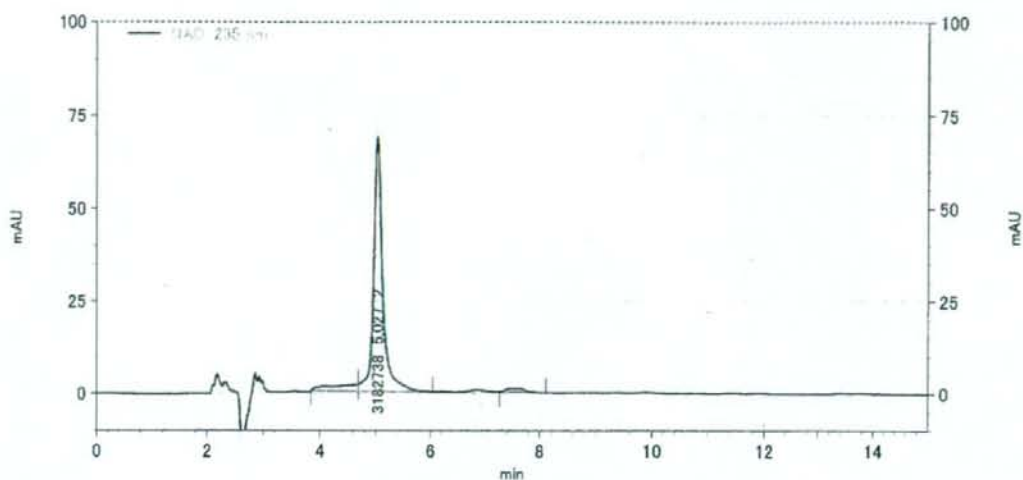


図 1 1 - a PTX3精製品のHPLC測定結果

CapcellpakC18 UG120 ϕ 4.6 \times 250, 65%MeCN/0.05%AcOH, 1.0mL/min, 35 $^{\circ}$ C

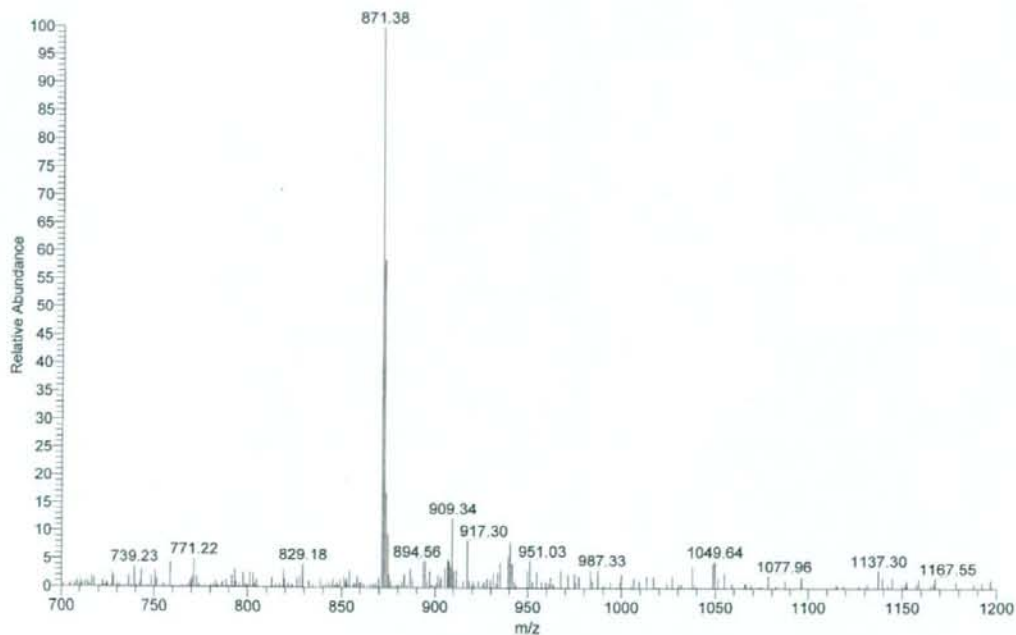


図 1 1 - b PTX3精製品のMSスペクトル (陰イオンモード)

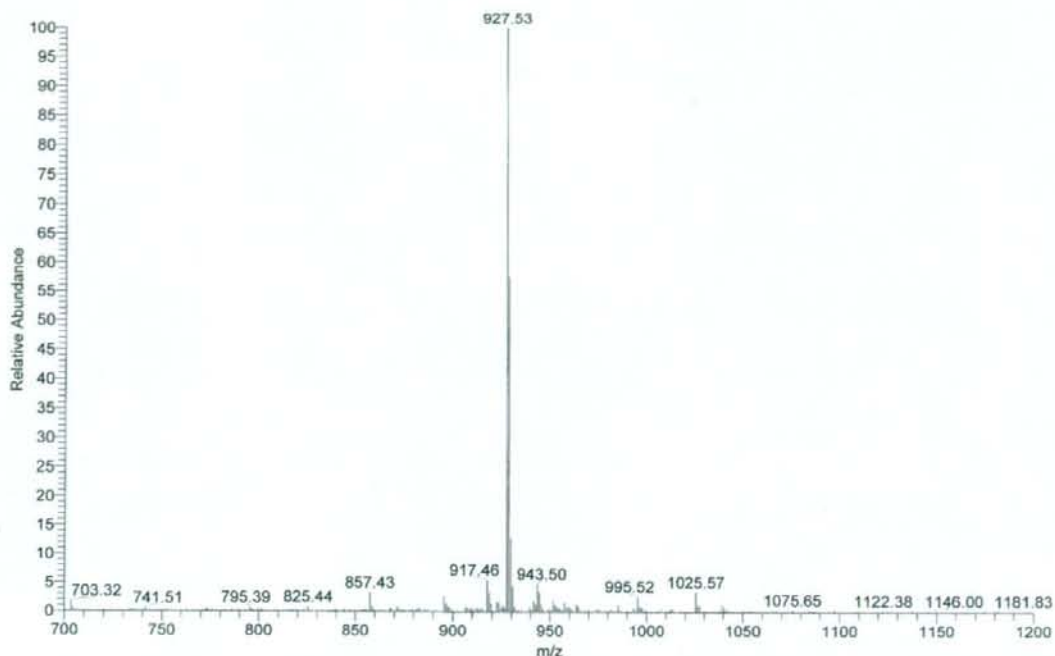


図 1 1 - c PTX3精製品のMSスペクトル (陽イオンモード)

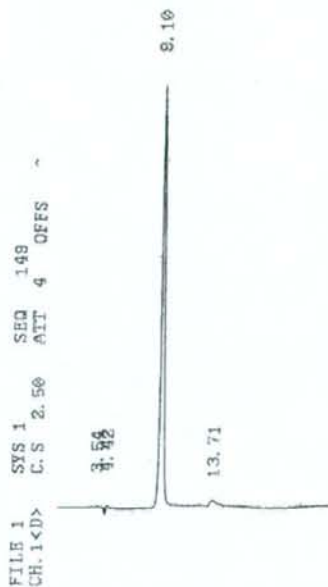


図 1 2 - a PTX6精製品のHPLC測定結果

CapcellpakC18 ϕ 10 \times 250, 65%MeCN/0.01%AcOH, 3.0mL/min, 30 $^{\circ}$ C

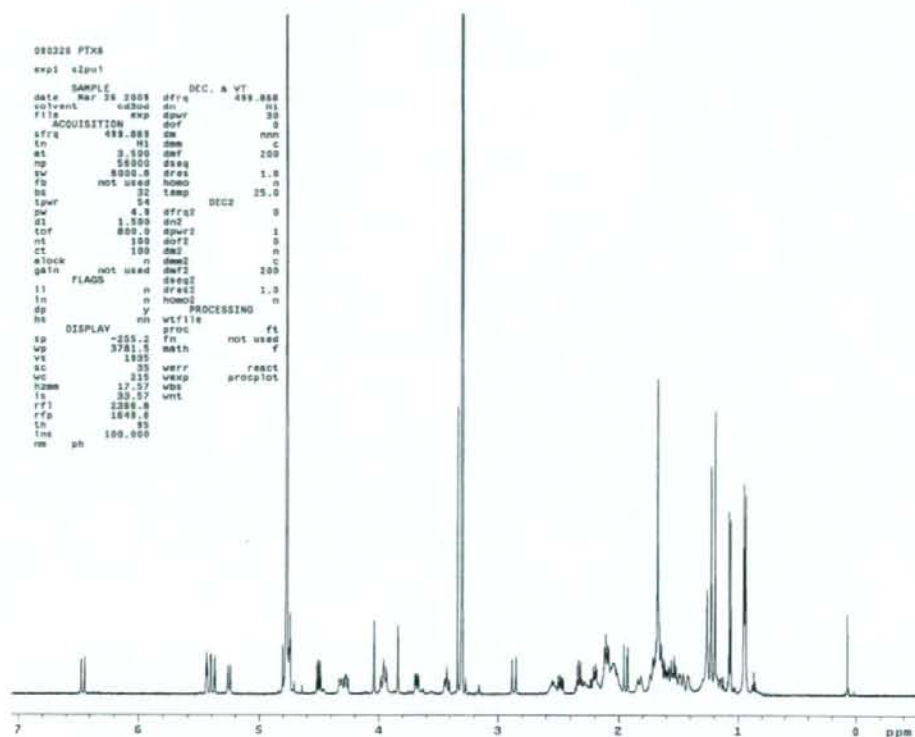


図 1 2 - c PTX6精製品の¹H-NMRスペクトル
(500 MHz, CDCl₃-CD₃OD (3:7))

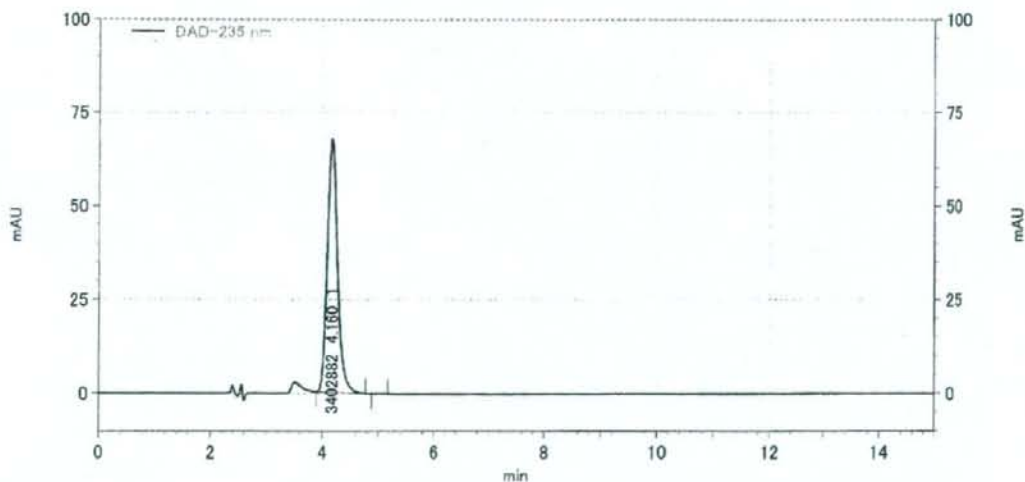


図 1 3 - a YTX精製品のHPLC測定結果
CapcellpakC18MG φ4.6×250, MeOH:CH₃COONH₄ (9:1), 1.0mL/min, 35°C

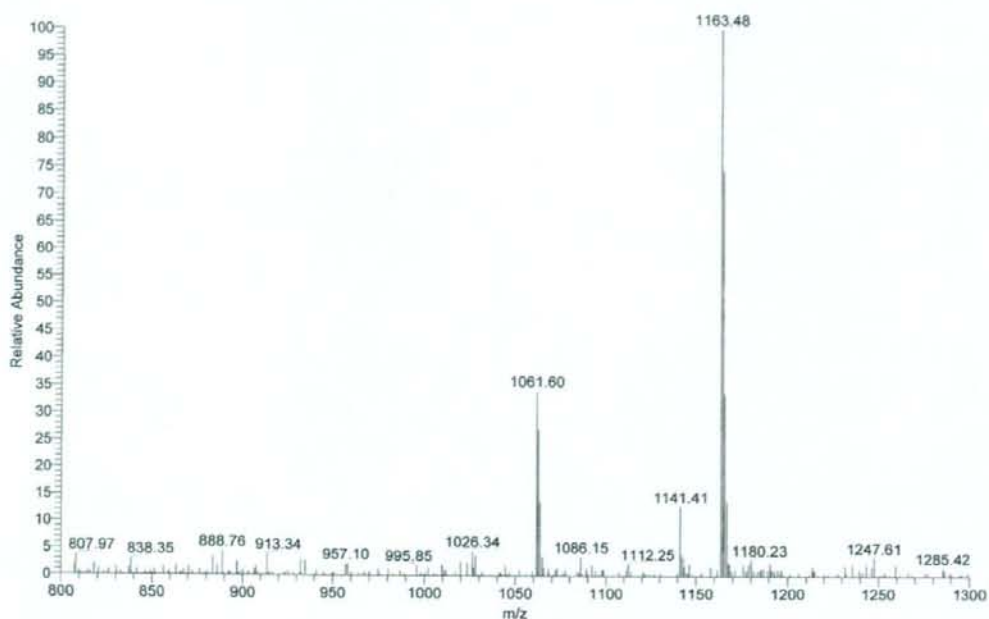


図 1 3 - b YTX精製品のMSスペクトル

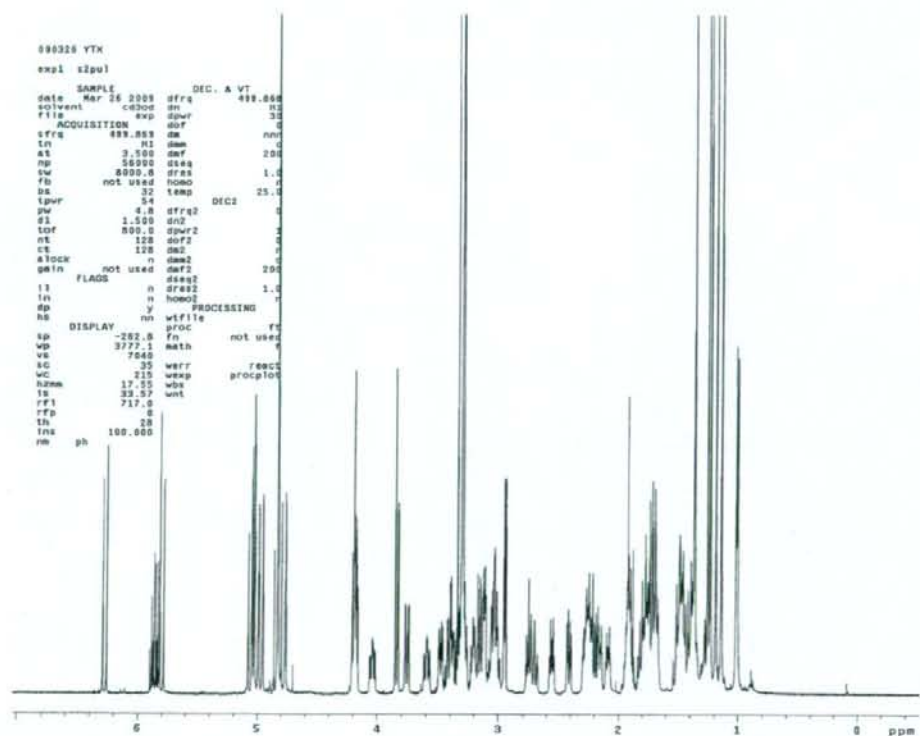


図 1 3 - c YTX精製品の¹H-NMRスペクトル
(500 MHz, CD₃OD)

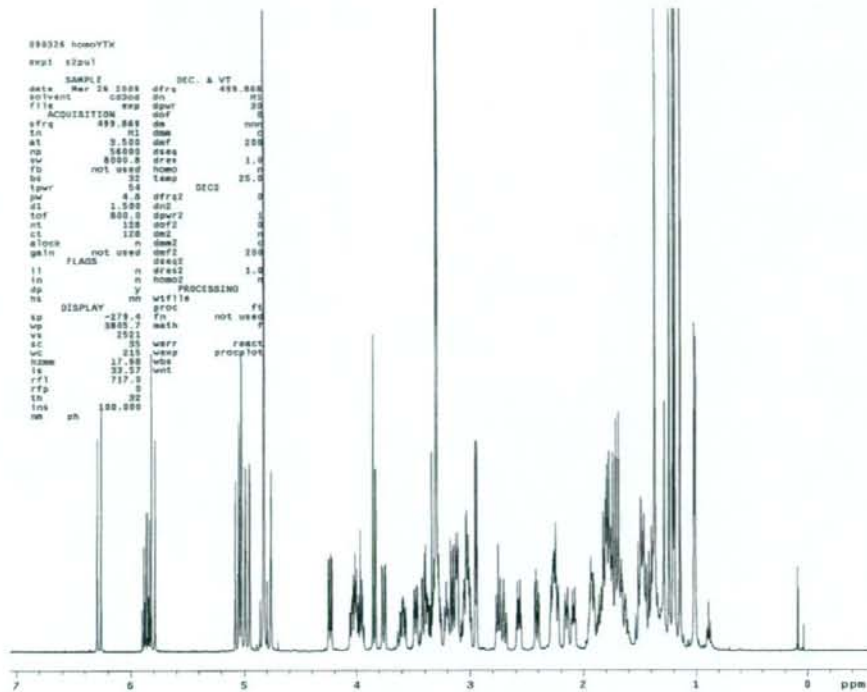


図 1 4 - c homoYTX精製品の¹H-NMRスペクトル
(500 MHz, CD₃OD)

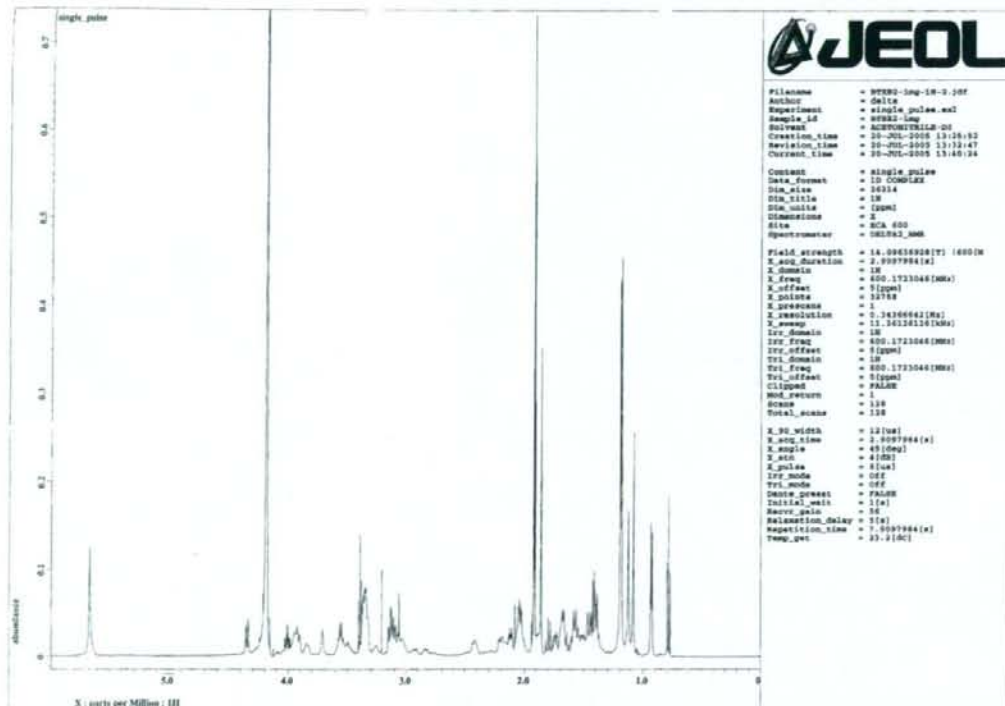


図 1 5 - a BTXB2精製品の¹H-NMRスペクトル
(600 MHz, CD₃CN)

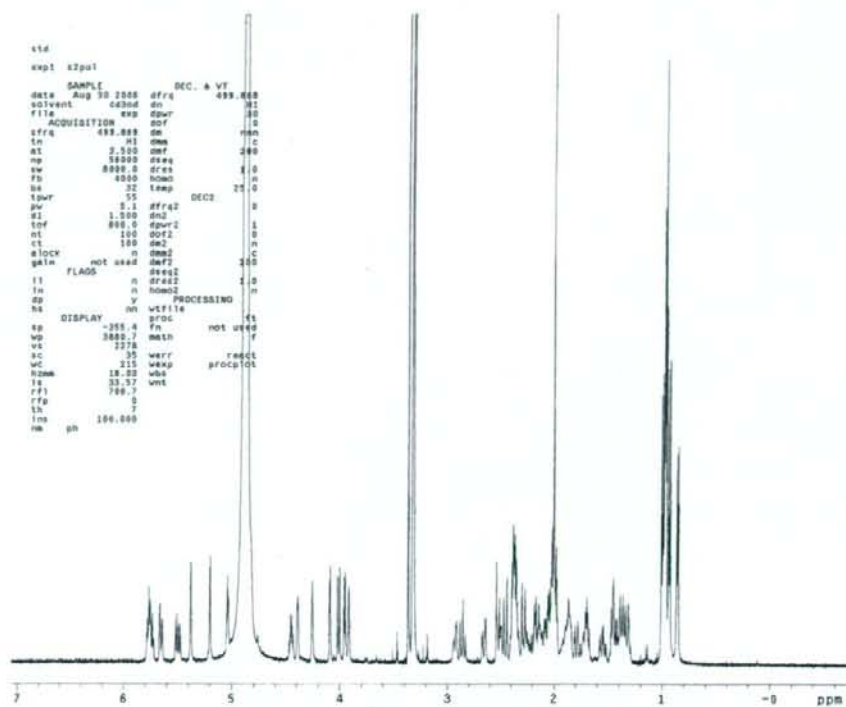


図16-a AZA1精製品の¹H-NMRスペクトル
(500 MHz, CD₃OD - CD₃COOD (1000:5))

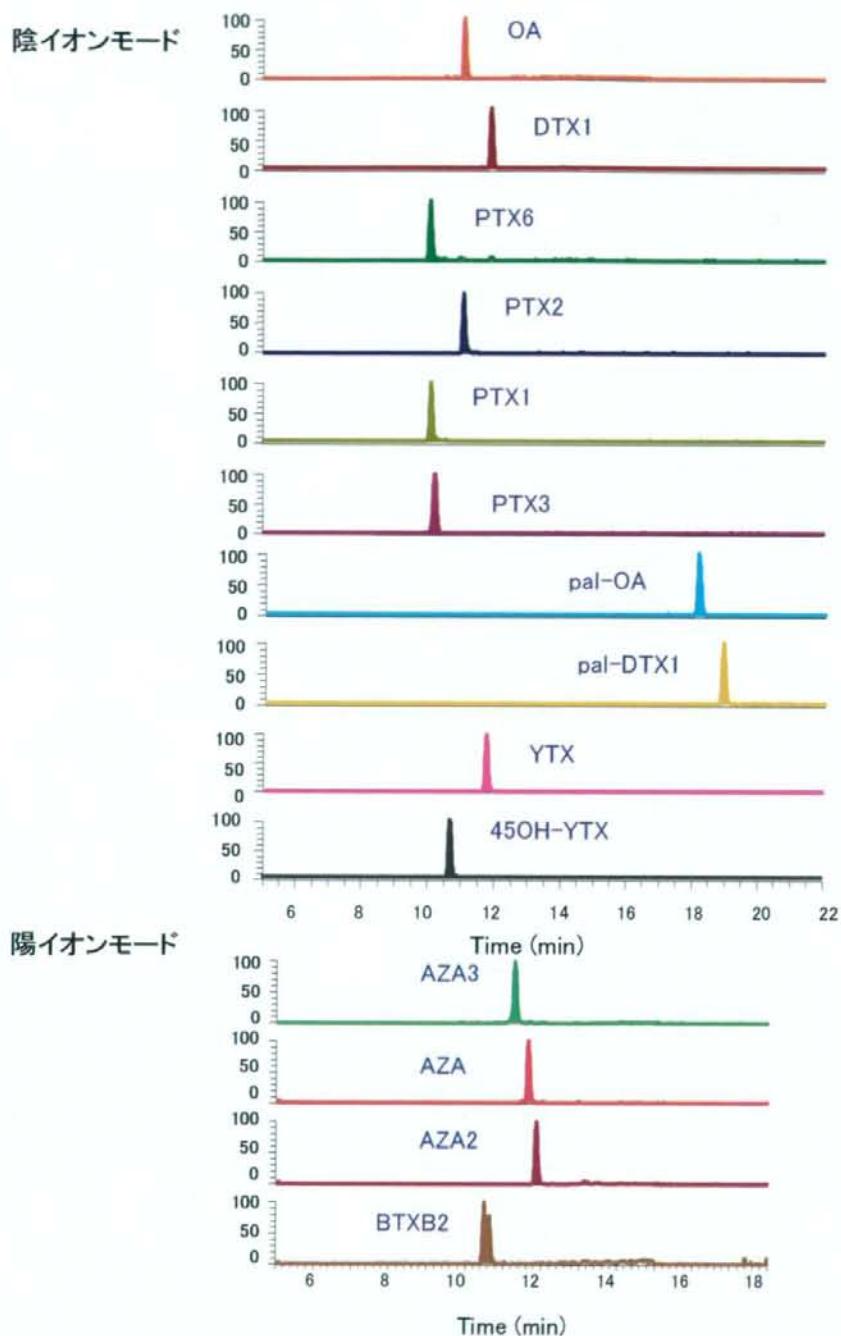


図17 貝毒標準品のマスクロマトグラム

・LC : NANOSPACE (SHISEIDO)

Column; Capcellpak C18 MG II 2.0×100 mm(SHISEIDO) , Flow rate; 0.2mL / min

Mobile phase; A: 2mMHCOONH₄+50mMHCOOH / H₂O

B: 2mMHCOONH₄+50mMHCOOH / MeCN:MeOH 2: 8

・MS : FINNIGAN TSQ Quantum DISCOVERY (Thermo)

Ion mode; ESI negative or positive

Capillary voltage; 4.0kV

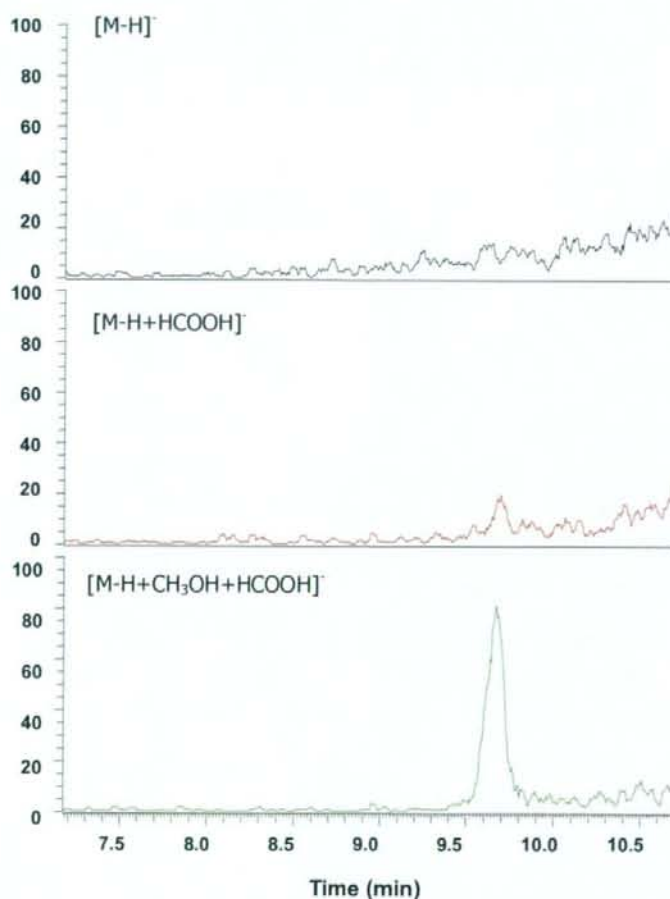


図18 PTX3のマスクロマトグラム

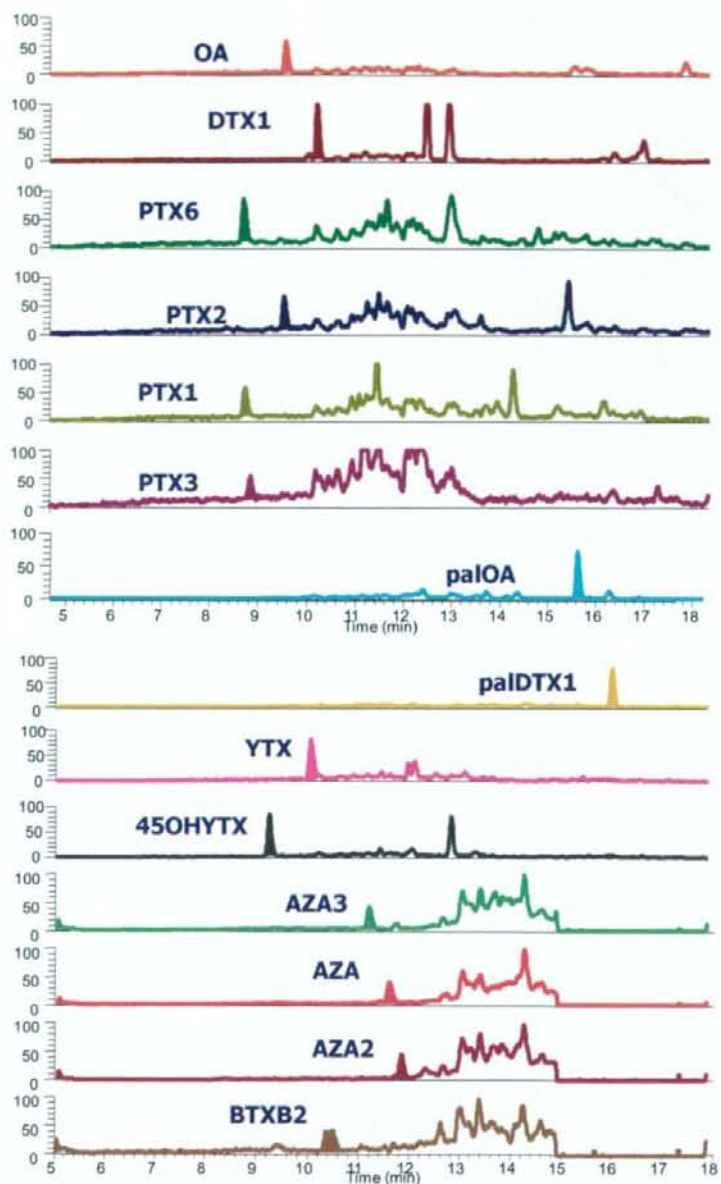


図 19 ホタテガイ抽出液 (標準品添加) の LCMS 測定結果

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

・LC : NANOSPACE (SHISEIDO)

Column; Capcellpak C18 MG II 2.0 × 100 mm(SHISEIDO) , Flow rate; 0.2mL / min

Mobile phase; A: 2mMHCOONH₄+50mMHCOOH / H₂O

B: 2mMHCOONH₄+50mMHCOOH / MeCN:MeOH 2:8

・MS : FINNIGAN TSQ Quantum DISCOVERY (Thermo)

Ion mode; ESI negative or positive

Capillary voltage; 4.0kV

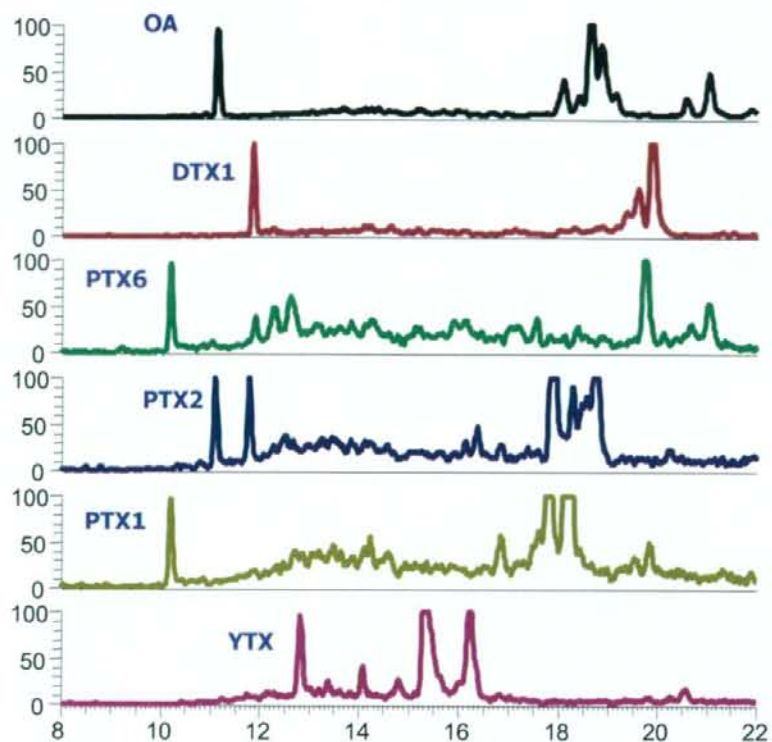


図20 ホタテガイ抽出液（標準品添加）のLCMS測定結果

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

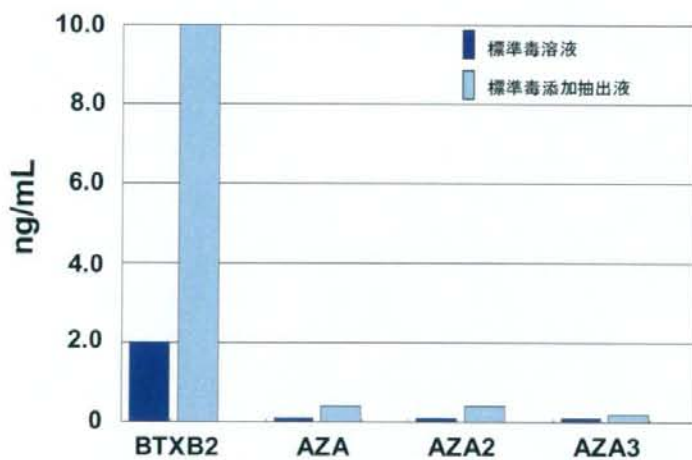
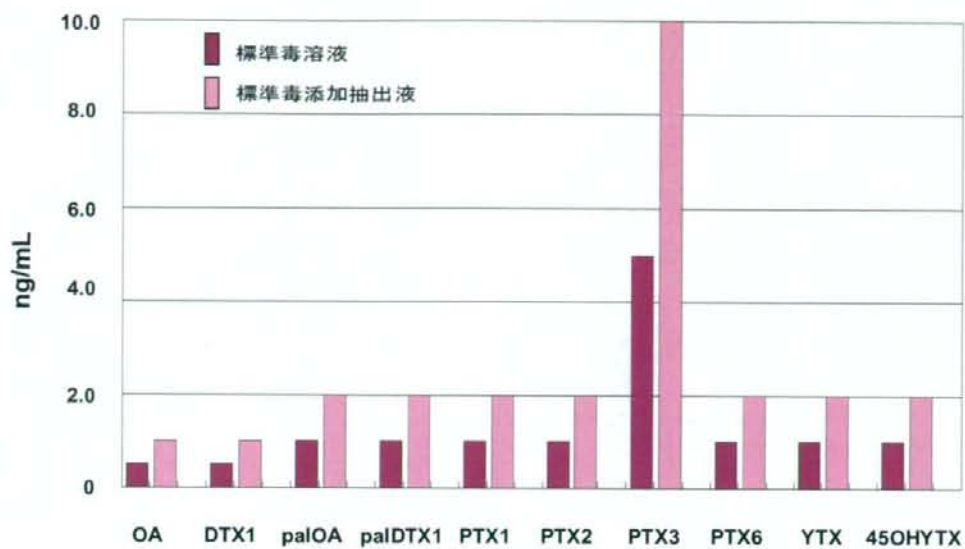


図21 標準毒溶液及び添加試料での検出下限

上図:陰イオンモード測定 of 標準毒
 下図:陽イオンモード測定 of 標準毒

表4 再現精度の測定結果 (RSDr%)

1) 標準毒溶液(n=3)

| ($\mu\text{g/mL}$) | OA | DTX1 | PTX6 | PTX2 | PTX1 | PTX3 | palOA | palDTX1 | YTX | 450HYTX | BTXB2 | AZA* | AZA2* | AZA3* |
|----------------------|-----|------|------|------|------|------|-------|---------|-----|---------|-------|------|-------|-------|
| 0.005 | 7.1 | 4.3 | 2.7 | 10.1 | 5.5 | 13.8 | 4.4 | 15.1 | 6.3 | 5.6 | - | - | - | - |
| 0.01 | 2.5 | 1.5 | 2.8 | 10.9 | 7.3 | 6.7 | 2.8 | 5.1 | 5.5 | 2.5 | 5.9 | 7.1 | 2.9 | 8.5 |
| 0.02 | 2.7 | 2.6 | 1.6 | 4.7 | 2.9 | 10.3 | 2.8 | 5.0 | 2.3 | 5.0 | 2.0 | 10.4 | 9.2 | 7.9 |
| 0.05 | 4.7 | 3.5 | 3.9 | 3.0 | 1.7 | 7.9 | 4.0 | 7.6 | 1.8 | 2.0 | 5.4 | 6.0 | 3.4 | 4.9 |
| 0.1 | 4.7 | 0.0 | 3.5 | 7.2 | 5.5 | 4.3 | 3.2 | 8.4 | 4.1 | 3.4 | 3.5 | 3.8 | 3.9 | 3.0 |
| 0.2 | 0.0 | 0.0 | 5.8 | 4.7 | 5.4 | 3.7 | 4.6 | 7.8 | 6.2 | 3.6 | 3.1 | 1.1 | 2.0 | 1.2 |

* AZA1~3: 0.001 $\mu\text{g/g}$, 0.002 $\mu\text{g/g}$, 0.005 $\mu\text{g/g}$, 0.01 $\mu\text{g/g}$, 0.02 $\mu\text{g/g}$ について実施

2) 標準毒添加抽出液(n=5)

| | OA | DTX1 | PTX6 | PTX2 | PTX1 | PTX3 | palOA | palDTX1 | YTX | 450HYTX | BTXB2 | AZA | AZA2 | AZA3 |
|-----------|-----|------|------|------|------|------|-------|---------|-----|---------|-------|-----|------|------|
| scallop 1 | 5.6 | 3.6 | 3.8 | 5.3 | 7.4 | 7.9 | 8.2 | 3.9 | 2.8 | 1.4 | 0.0 | - | - | - |
| scallop 2 | 6.6 | 2.6 | 9.8 | 10.2 | 8.6 | 9.0 | 5.5 | 9.3 | 6.7 | 2.8 | 7.1 | 1.2 | 13.8 | 19.5 |
| scallop 3 | - | 6.2 | 5.4 | - | - | - | - | 11.1 | 1.6 | 4.9 | 0.0 | - | - | - |
| mussel 1 | 4.2 | 5.0 | 4.0 | 2.7 | 4.6 | 4.4 | 4.2 | 5.2 | 1.7 | 1.5 | 0.0 | - | - | - |
| mussel 2 | 7.4 | 4.4 | 6.2 | 7.6 | 4.2 | 7.2 | 11.1 | 8.0 | 3.5 | 4.3 | 8.0 | 4.8 | 5.2 | 10.1 |
| mussel 3 | 7.7 | 9.5 | 6.7 | - | - | - | 3.1 | - | 5.0 | - | - | 1.8 | 1.8 | 1.7 |

scallop 1; 0.05 μg spiked (BTXB2, AZAsは除く) scallop2; 0.02 μg spiked scallop3; raw sample
 mussel 1; 0.05 μg spiked (BTXB2, AZAsは除く) mussel2; 0.02 μg spiked mussel3; raw sample