

分担研究報告書

貝毒を含む食品の安全性確保に関する研究

分担研究者 谷山茂人 長崎大学大学院生産科学研究科 助教

研究要旨

本研究では、高速液体クロマトグラフ質量分析装置(LC-MS)による麻痺性貝毒(PSP)成分の一斉分析法、すなわち絶対的PSP定量法の開発に資するため、有毒魚介類からのPSP成分、特にsaxitoxin(STX)群成分の精製を試みた。

まず、2002年9月に沖縄県で採集したウモレオウギガニ12個体の歩脚部の毒性を調べたところ、1個体に14,000 MU/gの極めて高い毒力が見出された。そこで、同カニから内臓と卵巣を除去してPSPの抽出ならびに精製を行った。1%酢酸-80%エタノールで毒を抽出後、ジクロロメタンで脱脂して、活性炭処理、次いでBio-Gel P-2カラムクロマトグラフィーに供し、精製毒として総毒力6,600 MUを得た。HPLC分析から、この精製毒にはSTX、dcSTX、hySTX、neoSTX、hyneoSTXの5成分が含まれており、得られた総毒量は13,000 nmolであった。特に、希少成分であるhyneoSTXについて総毒量100 nmolを精製した。さらに、LC/MS分析から、これらSTX群成分の混合精製品の精製度は極めて高かった。

A. 研究目的

現在、約30種の麻痺性貝毒(PSP)成分が知られているものの、日本では農林水産省主導で配布されているprotogonyautoxin(PX)1,2(C-toxin(C)1,2)、gonyautoxin(GTX)1~4、decarbamoyleGTX(dcGTX)2,3およびneosaxitoxin(neoSTX)の9種類のみが標準品として扱われている。しかも、それら配布量にも事実上の制限があ

るうえ、食用二枚貝などが毒化した際に検出頻度の高いhydroxySTX(hySTX)、加熱処理により硫酸基(SO₃)が容易に離脱してSTX、neoSTXに変換するGTX5,6などの成分は未配布である。さらに、毒性が非常に強く化学兵器に指定されているSTXは水産食品を含む多種多様な有毒魚介類に存在しているものの、その使用には極めて煩雑な制限がある。実際に、STX群の配布

標準品は neoSTX のみで、その量もごく僅かである。このような状況の下、高速液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC-MS) による PSP 成分の一斉分析法、すなわち絶対的 PSP 定量法の開発に資するため、本研究では、有毒魚介類からの PSP 成分、特に STX 群成分の精製を試みた。

B. 研究方法

1-1) 試料

2002 年 9 月に沖縄県石垣島川平のリーフで採取したウモレオウギガニ 12 個体を試料とした。試料は入手後、直ちに凍結して以下の試験に供するまで -20°C で保存し、供試の際、流水中で急速解凍した。

1-2) 毒性スクリーニングの方法

試料の歩脚部を分取し、公定法 (大島, 2005) に準拠して毒力を測定した。

試験には ddY 系の雄で体重が 19~21 g のマウスを用いた。1 投与量に対しては、1 群 3 尾のマウスを用い、試験液 1 ml をマウスの腹腔内に投与し、死に至るまでの時間を秒単位で計測した。毒量の算出には PSP の致死時間-MU 換算表を用いた。なお、PSP の 1 MU は体重 20 g のマウス 1 匹を 15 分間で死亡させる毒量と定義されている。

2) PSP の抽出と精製方法

B. 1-1) の試料のうち、毒力が最大値を示した試料 No. 1 (表 1) を用いた。

STX 群の抽出と精製は、マウス毒性を指標として、Arakawa ら (1995) の方法に準じた (図 1)。まず、内臓と卵巣を取り除いた試料 No.1 (68 g) を乳鉢中で磨砕後、3 倍量の 1% 酢酸-80% エタノールを加えてブレンダーで攪拌し、遠心分離

(5,000g、20 分間、室温) して上清を得た。残渣について同様の操作を 2 回行った。上清を合一して粗抽出液とし、ジクロロメタンにより 3 回脱脂した。次に、水画分 (抽出液) をして 1 M 水酸化ナトリウムで pH 5.5 に調整し、有毒成分をバッチ法により活性炭 (和光純薬工業株式会社, 大阪) に吸着させ、3 倍量の 1% 酢酸 20% エタノールで、吸着画分 (AC1~4) を繰り返し 4 回溶出させた。溶出液を Bio Rad 製 Bio-Gel P-2 (Bio Rad, USA) カラム ($\phi 40 \text{ mm} \times 750 \text{ mm}$) に付して有毒成分を吸着させた。カラムを蒸留水で洗浄後、0.05 M 酢酸、次いで 0.15 M 酢酸で吸着画分を溶出させた。溶出液 (BG-I-Fr. 1~300) のうち、STX 群成分の溶出量が特に多かった BG1-Fr. 237~250 を凍結乾燥後、0.05 M 酢酸で溶解し、再び Bio-Gel P-2 カラム ($\phi 18 \text{ mm} \times 900 \text{ mm}$) クロマトグラフィーに供し、0.05 M 酢酸により吸着画分 (BG-II-Fr. 1~50) を溶出させた。

3) HPLC 分析方法

B. 2) の粗抽出液、抽出液、AC-1~4、BG-I-Fr. 1~300、BG-II-Fr. 1~50 を試料として HPLC により毒成分を分析した。各試料を Waters 製 Sep-Pak C 18 (Waters, USA) と Ultra free C3LGC (Millipore, USA) で前処理した (Arakawa, 1995)。

PSP 全成分一括分析は、移動相 A として 5 mM ヘプタフルオロ酪酸 (HFBA) -10 mM 酢酸アンモニウム)、移動相 B として 10% アセトニトリルを含む 10 mM HFBA-30 mM 酢酸アンモニウム (pH 7.1) の 2 種を用い、流速を 0.6 ml/min とした。固定相には HG3013N カラム ($\phi 4.6 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$, 日立) と Develosil C 30 UG-5 カラ

ム (ϕ 4.6 mm \times 250 mm, 野村化学) を直結し、前者を 50°C、後者を 25°C に加温制御した。分析開始から 25 分間を移動相 A、26~45 分を移動相 B、46 分から分析終了時 (70 分後) を移動相 A とするグラジエントシステムで分析した。

STX 群のみの分析 (Arakawa, 1993) の際は、移動相を 2 mM ヘプタンスルホン酸ナトリウムを含む 4% アセトニトリル溶液-30 mM リン酸アンモニウム溶液 (pH 7.1)、固定相を野村化学製 Develosil C 8 カラム (ϕ 4.6 mm \times 250 mm, 野村化学) とした。

いずれの分析もカラムからの溶離液に発色試薬である 7 mM 過ヨウ素酸-50 mM リン酸カリウム (pH 10.0) を 0.6 ml/min で注加して、恒温槽内で 65°C に加熱した。発色した溶離液に 0.5 M 酢酸を 0.6 ml/min で加えて蛍光強度を増大させた。蛍光測定には励起光 340 nm、蛍光波長 410 nm を使用した。

4) LC-MS 分析方法

B. 3) において、STX 群成分の精製が極めて良好と判断された BG-II-Fr. 41 を試料として、その精度を LC-MS にて確認した。2 種の移動相、すなわち移動相 C: 0.05% HFBA-10 mM 酢酸アンモニウム、移動相 D: 0.05% ペンタフルオロプロピオン酸 (PFPA) -10 mM 酢酸アンモニウム-1% メタノール (pH 7.1) を用い、流速を 0.6 ml/min とした。固定相には HG3013N カラム (ϕ 4.6 mm \times 50 mm, 日立) と Develosil C-30 RP AQUEOUS AR カラム (ϕ 4.6 mm \times 250 mm, 野村化学) を直結し、前者を 50°C、後者を 25°C に加温制御した。分析開始から 25 分間を移動相 C、26 分~

45 分を移動相 D、46 分から分析終了時 (70 分後) までを移動相 C とするグラジエントシステムで繰り返し分析した。MS 部には、音速噴霧イオン化法 (sonic spray ionization: SSI) を装備した HITACHI M-8000 を用い、極性ポジティブ、第一細孔温度 170°C、シールド温度 300°C、検出器 400 V、フォーカス電圧 30 V、ドリフト 30 V で分析した。

C. 研究結果

1) ウモレオウギガニの毒力

全ての歩脚部に毒性が認められた。その平均毒力 \pm 標準偏差は $2,100 \pm 3,900$ MU/g となり、最高毒力は 14,000 MU/g であった (表 1)。

2) PSP の抽出と精製過程における毒力

総毒力 50,000 MU を示した粗抽出液は脱脂により同 50,000 MU (抽出液)、続いて活性炭処理により得た AC1~4 の合一した画分の総毒力は 20,000 MU となった (図 1)。次いで、AC1~4 の合一画分を Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィーに供したところ、BG-I-Fr. 208~236 の合一画分に 800 MU、同 237~250 の合一画分に 20,000 MU の総毒力を得た。さらに、後者の合一画分を再度 Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィーに付し、BG-II-Fr. 39~40 の合一画分、同 41、同 42~44 の合一画分、同 45 から、それぞれ 2,200 MU、4,000 MU、400 MU、45 MU の総毒力を回収した。

3) PSP 成分組成

粗抽出液、抽出液、CA1~4 を HPLC 分析に供したところ、いずれも STX、dcSTX、hySTX、neoSTX、hyneoSTX、dcGTX2.3、

GTX2,3 と保持時間の一致するピークが検出された。それぞれの PSP 成分組成 (mol%) を比較したところ、80%以上が STX 群 5 成分であり、全てにおいて STX および neoSTX がそれぞれ 30%~40% を占めていた (図 2)。

次に、CA1~4 を合一し、Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィーに付して BG-I-Fr. 1~300 を得た。そのうち、BG-I-Fr. 50~55、56~73、74~120、121~165、166~207、208~236、237~250、251~254、255~300 につき、それぞれを合一後、HPLC 分析から各毒量を算出した (図 3)。BG-I-Fr. 237~250 の合一した画分に STX 群成分の最大毒量が得られた。その STX の毒量は 1,000 nmol、dcSTX は 81 nmol、hySTX は 220 nmol、neoSTX は 730 nmol、hyneoSTX は 34 nmol であった。そこで、BG-I-Fr. 237~250 の合一した画分を再び Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィー付したところ、BG-II-Fr. 39~42、45 に、いずれも STX、dcSTX、hySTX、neoSTX、hyneoSTX が検出された。BG-II-Fr. 39~42、45 には、それぞれ総毒量 2,000 nmol、3,600 nmol、7,000 nmol、660 nmol、17 nmol の STX 群成分が含まれていた (図 4)。最大値を示した BG-II-Fr. 41 に含まれる STX の毒量は 3,700 nmol、hySTX は 610 nmol、neoSTX は 2,700 nmol、hyneoSTX は 34 nmol であった。

4) STX 群成分の精製度

BG-II-41 の LC-MS クロマトグラムと MS スペクトラムを図 5 および図 6 に示す。

m/z 300、316、332 のクロマトグラムにおいて、それぞれ STX ($[M+H]^+=300$)、neoSTX ($[M+H]^+=316$)、hyneoSTX

($[M+H]^+=332$) の標準品と保持時間の一致するピークが得られた。また、STX、neoSTX、hyneoSTX と推定されるピークの保持時間における MS スペクトラムに、いずれも特徴的な脱水ピークである $[M+H-H_2O]^+=282$ 、298、314 のフラグメントイオンが検出された。従って、それぞれ STX、neoSTX、hyneoSTX と同定された。

D. 考察

1) ウモレオウギガニの毒力

供試したウモレオウギガニの毒力は、最小値 (150 MU/g) と最大値 (14,000 MU/g) では約 10 倍の差異があったことから、個体差が大きいといえる。また、1 個体当たりの総毒力の和は約 2,400,000 MU であったが、最大毒力を示した個体 (試料 No. 1) の総毒力は 1,500,000 MU となり、全体の 65% を占めていた (表 1)。一方、全個体 (約 1,000 g) を合一して PSP 成分を抽出・精製するには、多くの労力と時間を要することが予想された。しがしながら、試料 No. 1 の重量は 110 g であり、同試料から PSP 成分を抽出・精製することが合理的であると判断された。

2) PSP の抽出と精製過程における毒力

D. 1) から試料 No. 1 の総毒力は 1,500,000 MU と算出されたが、粗抽出液および抽出液の総毒力は、いずれも 50,000 MU であった。これは、内臓と卵巣を除去したこと、B. 1) は 0.1 N 塩酸を用いた加熱抽出法であるのに対して B. 2) は 1% 酢酸-80% エタノールによる非加熱抽出法であったことが影響していると考えられた。また、活性炭処理では、その

効率の向上を図るためにバッチ法を採用したものの、回収された総毒力は 20,000 MU と大きく減少したことから、今後はカラムクロマトグラフィーによる処理を検討する必要がある。しかしながら、繰り返し行った Bio-Gel カラムクロマトグラフィーにて、最終的に総毒力 6,600 MU が回収された。C. 3) ならびに後述の D. 3) と照らし合わせて、十分量の PSP 精製毒が確保されたと考えられた。

3) PSP 成分組成

粗抽出液、抽出液および CA1~4 の HPLC 分析から、ウモレオウギガニの毒成分の 8 割以上が STX 群 5 成分であった。そのうち、日本での入手が極めて困難である STX、dcSTX、hySTX、hyneoSTX が含まれていることが示された。そこで、2 回目の Bio-Gel カラムクロマトグラフィーから得られた BG-II-Fr. 39~42、45 につき、再度、HPLC 分析に供したところ、いずれも STX、dcSTX、hySTX、neoSTX、hyneoSTX の 5 成分が検出された。特に、BG-II-Fr. 41 の総毒量は 7,000 nmol と際立って高く、希少成分である hyneoSTX が 34 nmol も含まれていた。最終的に STX、dcSTX、hySTX、neoSTX、hyneoSTX を、それぞれ 6,200 nmol、14 nmol、1,300 nmol、100 nmol 調製した。

4) STX 群成分の精製度

総毒量が最も多かった BG-II-Fr. 41 につき LC-MS 分析を行ったところ、 m/z 300 クロマトグラムにおいて STX ($[M+H]^+=300$) の単一なピークが検出された。さらに、その保持時間における MS スペクトラムから特徴的な脱水ピーク ($[M+H-H_2O]^+=282$) が確認されたことか

ら (図 6)、精製度の極めて高い STX が得られた。一方、 m/z 316 と 332 のクロマトグラムに、それぞれ neoSTX ($[M+H]^+=316$) および hyneoSTX ($[M+H]^+=332$) が検出されたが (図 5)、前者は保持時間 45 分付近にも信号強度の低いピークが、後者にも同様のピークが複数みられた。しかしながら、neoSTX と hyneoSTX の保持時間における MS スペクトラムに、STX と同様の脱水ピーク (それぞれ $[M+H-H_2O]^+=298, 314$) が確認され (図 6)、いずれも十分な精製度であったと考えられた。

E. 結論

総毒量 6,600 MU (13,000 nmol) の STX 群の精製毒を調製した。それに含まれる STX 群成分は、STX、dcSTX、hySTX、neoSTX、hyneoSTX であり、それぞれ 6,200 nmol、14 nmol、1,300 nmol、100 nmol であった。特に、希少成分である hyneoSTX が得られたことは、大きな成果といえる。

F. 参考文献

- O. Arakawa, T. Noguchi, Y. Shida, Y. Onoue: Occurrence of carbamoyl-*N*-hydroxy derivatives of saxitoxin and neosaxitoxin in Xanthid Crab *Zosimus aeneus*. *Toxicon* **32**, 175-183 (1993).
- O. Arakawa, T. Noguchi, Y. Onoue: Paralytic shellfish toxin profiles of xanthid crab *Zosimus aeneus* and *Atergatis floridus* collected on reefs of Ishigaki Island. *Fish. Sci.* **61**, 659-662 (1995).
- 大島康克: 第 7 章自然毒・A 動物毒・2. 麻痺性貝毒. 食品衛生検査指針理化学

編 (厚生労働省監修), 日本食品衛生協会 (2005), p. 637-680.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 谷山茂人, 諫見悠太, 松本拓也, 長島裕二, 高谷智裕, 荒川 修: 腐肉食性巻貝キンシバイ *Nassarius (Alectrion) glans* に認められたフグ毒の毒性と毒成分. 食衛誌 **50**, 22-28 (2009).
 2. K. Ikeda, Y. Murakami, Y. Emoto, L. Ngy, S. Taniyama, M. Yagi, T. Takatani, O. Arakawa: Transfer profile of intramuscularly administered tetrodotoxin to non-toxic cultured specimens of the pufferfish *Takifugu rubripes*. *Toxicon* **53**, 99-103 (2009).
 3. L. Ngy, S. Taniyama, K. Shibano, C. F. Yu, T. Takatani, O. Arakawa: Distribution of tetrodotoxin in pufferfish collected from coastal waters of Sihanouk Ville, Cambodia. *J. Food. Hyg. Soc. Japan* **49**, 361-365 (2008).
 4. 石川 希, 西 見奈子, 桑野和可, 谷山茂人, 高谷智裕, 荒川 修: 紅藻 2 種の培養と駆虫性アミノ酸産生能. 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2009 年 3 月.
 5. 北田 稔, 古賀智隆, 持田浩治, 谷山茂人, 高谷智裕, 荒川 修: 有毒イモリ 2 種におけるテトロドトキシン保有量の地理的変異. 平成 20 年度日本水産学会九州支部大会, 長崎, 2009 年 1 月.
 6. T. Takatani, Y. Fukumori, Y. Morotomi, S. Taniyama, O. Arakawa: Accumulation and elimination of PSP toxins in the short-necked clam fed with the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. 5th World Fisheries Congress, Yokohama, Oct. 2008.
 7. K. Ikeda, Y. Emoto, R. Tatsuno, M. Yagi, S. Taniyama, T. Takatani, O. Arakawa: Maturation-associated accumulation of tetrodotoxin in pufferfish ovary. 5th World Fisheries Congress, Yokohama, Oct. 2008.
 8. N. Ishikawa, K. Kuwano, K. Ono, S. Taniyama, T. Takatani, O. Arakawa: Optimum culture condition anthelmintic amino acid productivity of two red algae, *Chondria armata* and *Digenea simplex*. 5th World Fisheries Congress, Yokohama, Oct. 2008.
- ### 2. 学会発表
1. 角南慶卓, 高谷智裕, 佐藤哲哉, 阪倉良孝, 中安純一, 山崎英樹, 崎山一孝, 谷山茂人, 荒川 修: フグ毒のトラフグ稚魚に対する作用-1: フグ毒の組織内動態. 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2009 年 3 月.
 2. 竹内絵梨子, 藤田雄介, 鶴田慎太郎, 谷山茂人, 相良剛史, 伊藤克敏, 浅川学: PSP 毒化アサリ投与によるアカニシの毒化試験. 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2009 年 3 月.
 3. 北田 稔, 池田光彦, 谷山茂人, 持田浩治, 高谷智裕, 荒川 修: 九州北西部におけるニホンイモリの TTX 保有量. 平成 21 年度日本水産学会春季大

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

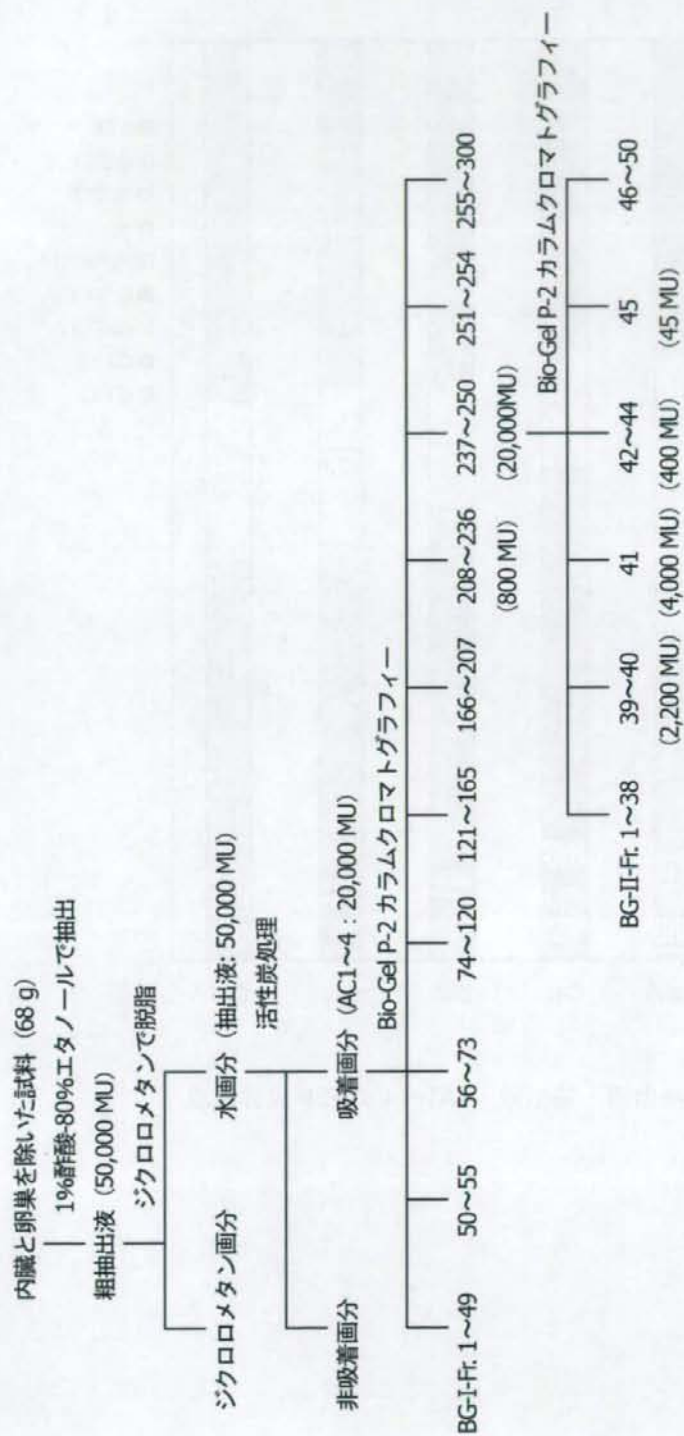


図1 ウモレオウギガニからの有毒成分の抽出と精製方法

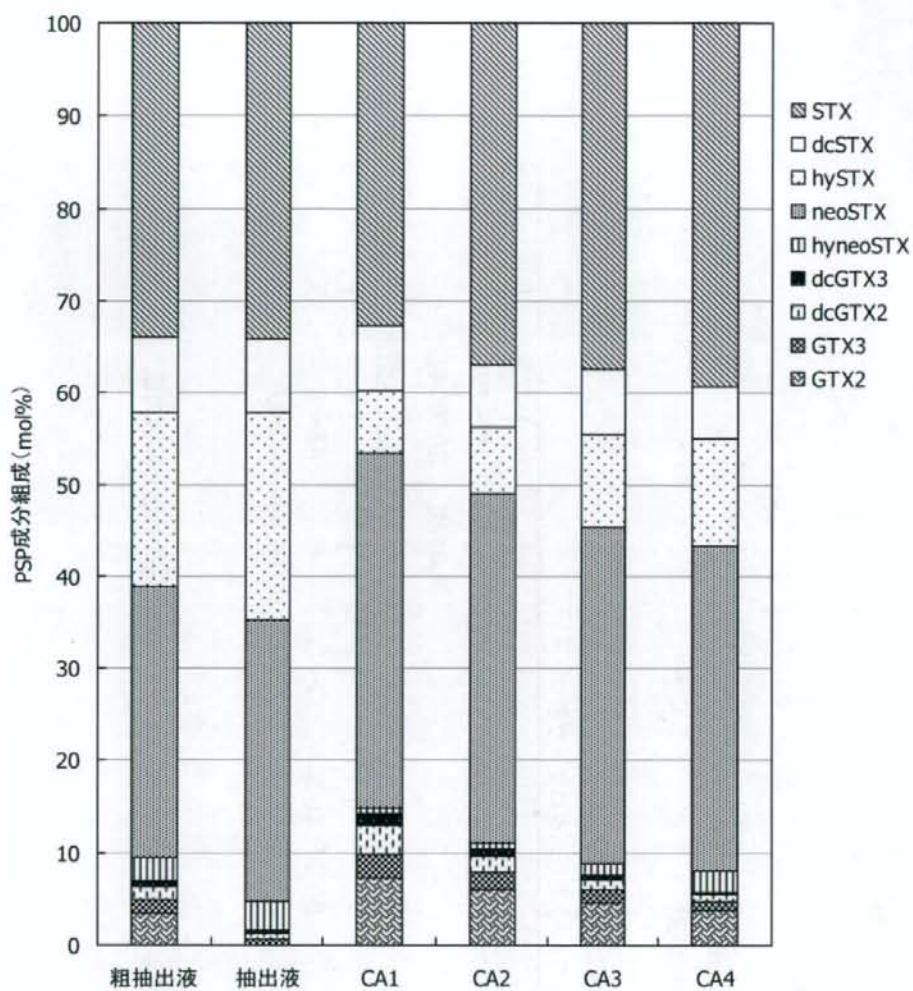


図2 粗抽出液・抽出液・CA1~4のPSP成分組成

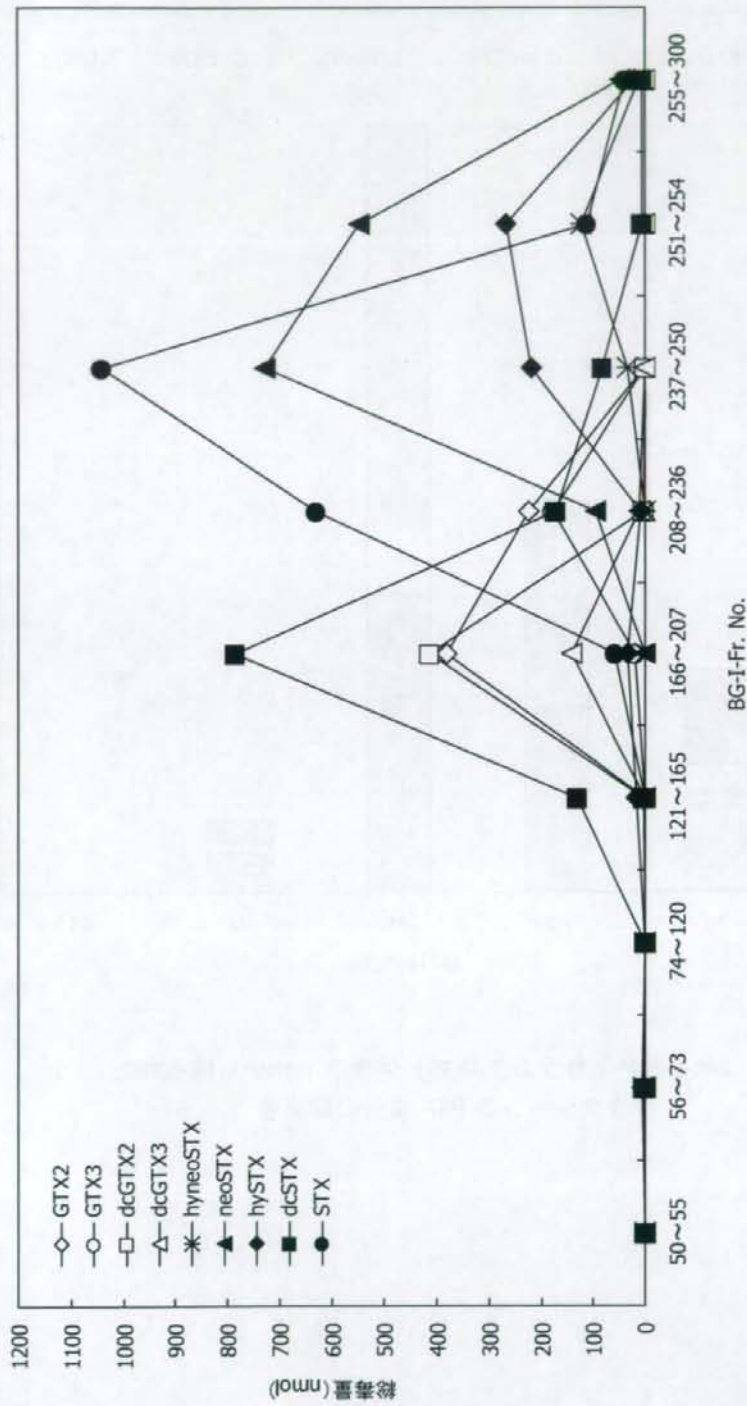


図3 Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィーから得られた合一流フラクションのPSP成分の総毒量

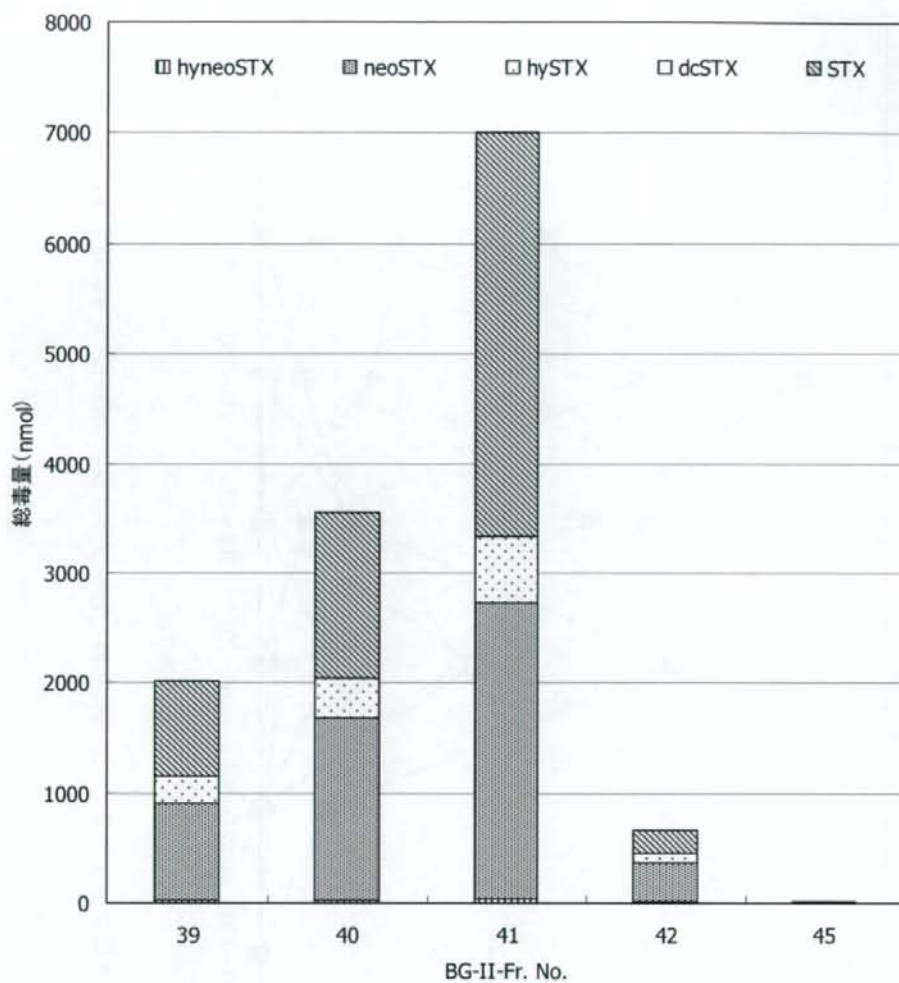


図4 Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィーから得られたフラクションのPSP成分の総毒量

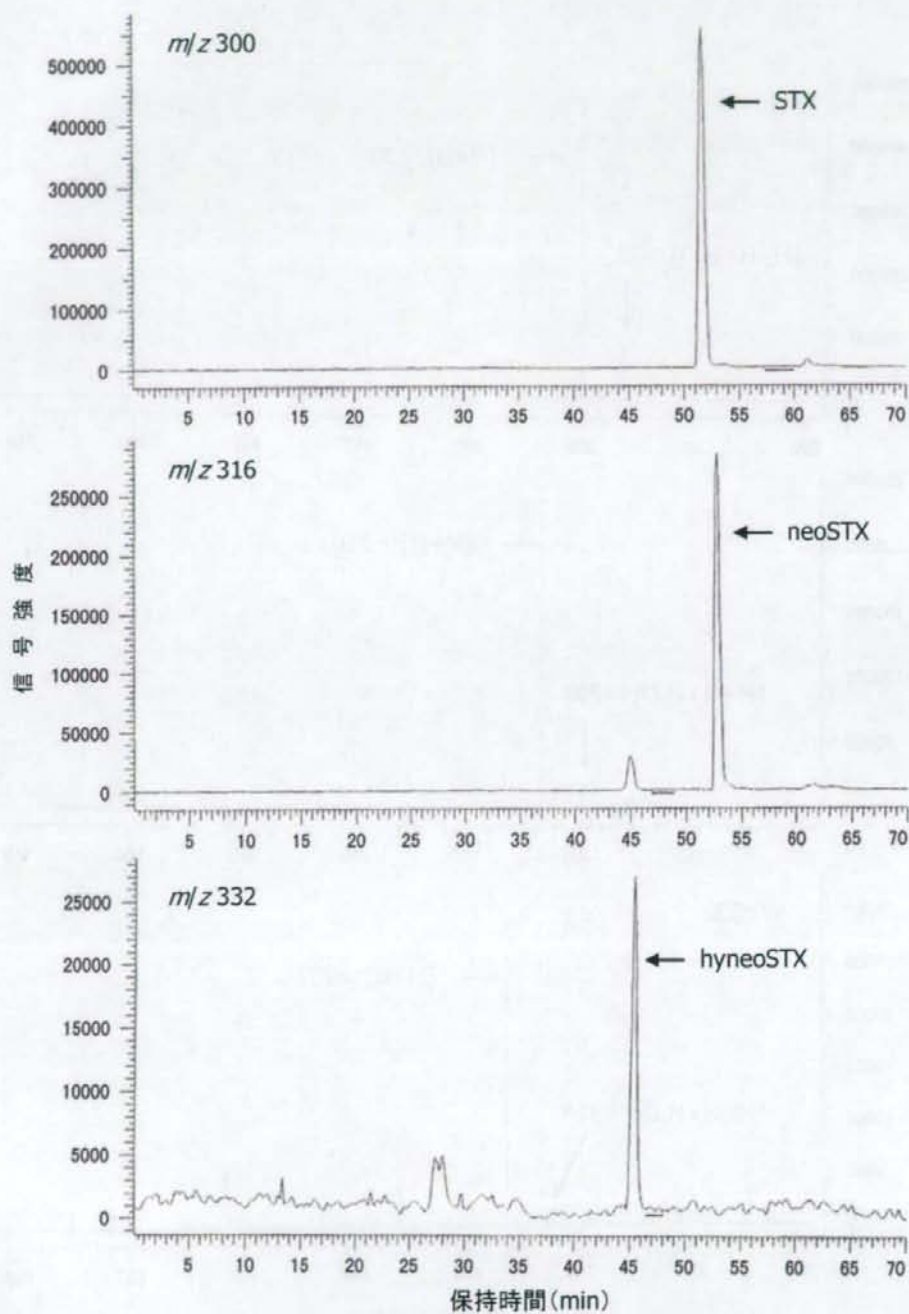


図5 BG-II-Fr. 41のLC-MSクロマトグラム

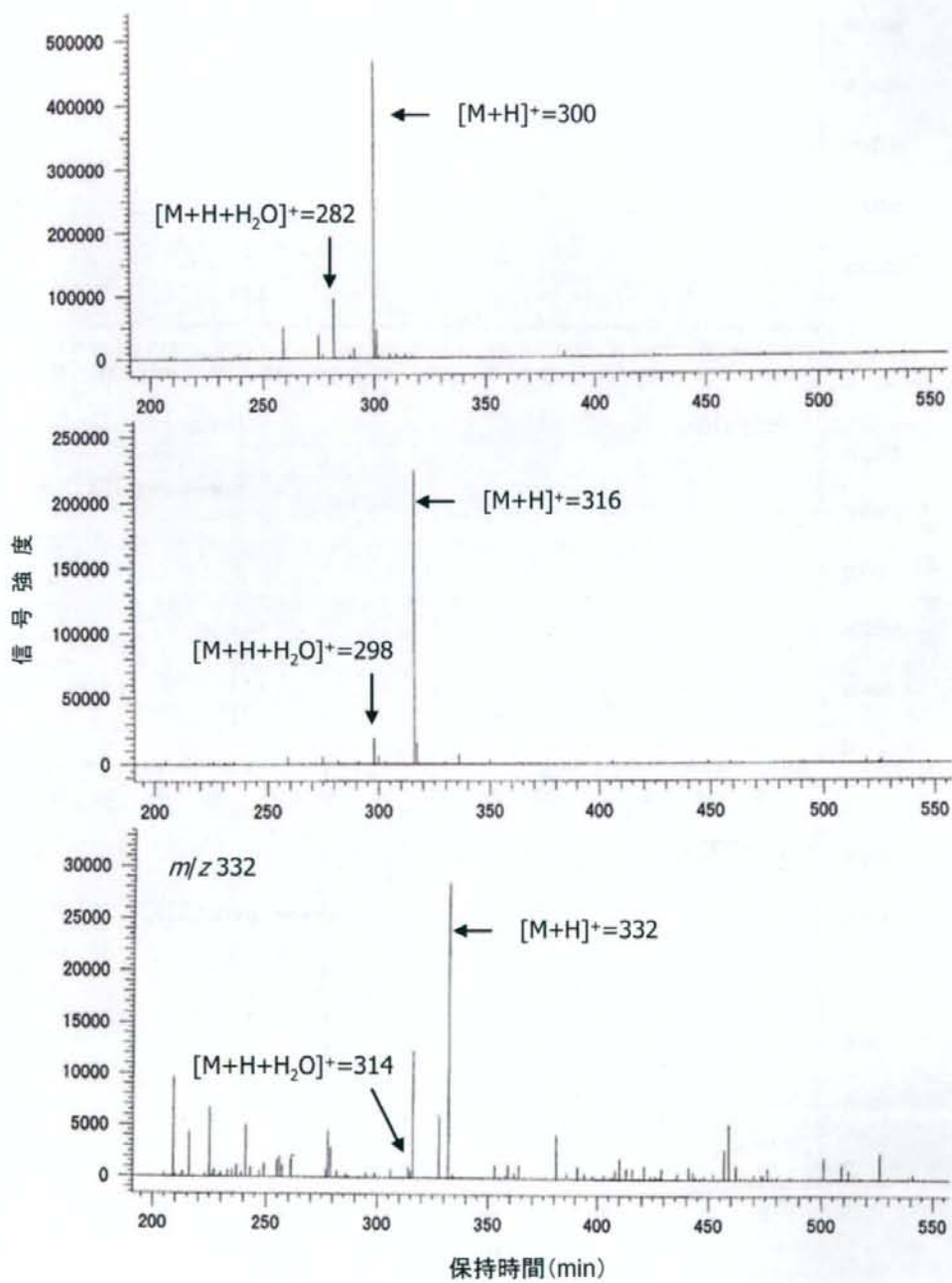


図 6 BG-II-Fr. 41 の MS スペクトラム

表1 石垣島産ウモレオウギガニの歩脚部の毒力

試料No.	雌雄	体重(g)	毒力(MU/g)	総毒力(MU)
1	♀	110	14,000	1,540,000
2	♂	47	3,200	150,400
3	♂	75	2,000	150,000
4	♂	50	1,500	75,000
5	♂	79	1,400	110,600
6	♂	160	880	140,800
7	♂	98	750	73,500
8	♀	87	600	52,200
9	♂	97	270	26,190
10	♂	76	210	15,960
11	♂	140	160	22,400
12	♂	120	150	18,000
平均±標準偏差		95±34	2,100±3,900	200,000 ±430,000

分担研究報告書

貝毒を含む食品の安全性確保に関する研究

分担研究者 高谷智裕 長崎大学水産学部 准教授

研究要旨

本研究では、魚介類の食品としての安全性を確保し、国民の健康保護を図ることを目指し行っている貝毒一斉分析法の開発に用いる記憶喪失性貝毒(ASP)の分離定量法を検討することを目的とする。本年度は、LC/MS 分析用標準品の作成を目的として記憶喪失性貝毒の一つであるドウモイ酸(DA)の精製を試みた。

試料は鹿児島県花瀬崎で採取した紅藻ハナヤナギ *Chondria armata* を用いた。試料 1,114 g から粗抽出液中に DA を 416 mg 得た。活性炭処理後の DA 量は 132 mg であり、その回収率は 32% であった。Bio-Gel P-2 によるカラムクロマトグラフィーに供したところ、有毒画分 (Fr.20~32) に DA 124 mg が精製された。

A. 研究目的

本研究では、魚介類の食品としての安全性を確保し、国民の健康保護を図ることを目指し行っている貝毒一斉分析法の開発に用いる記憶喪失性貝毒(ASP)の分離定量法を検討することを目的とした。本年度は、高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)による分析用標準品の作成を目的としてASPの一種であるドウモイ酸(DA)の精製を試みた。

DAは分子量が311のグルタミン酸骨格を含む化合物(図1)で、水溶性の興奮性アミノ酸のひとつであり、多量に摂取すると大脳

の記憶を司る海馬のC₃領域が破壊され、記憶障害をもたらすとされている。これまで、DAによる食中毒は1987年にカナダ東岸でムラサキイガイを喫食して起こった例が知られるが、日本国内では幸い発生していない。DAは日本では古くから、ヒトの回虫の駆虫剤として服用されてきた海藻である紅藻類ハナヤナギに含まれる有効成分として知られ、これまで様々な研究が行われてきた。また、DAは珪藻の *Pseudonitzschia pungens* などが産生することも知られており、貝類やカニ類からの検出が報告されている。また、テトロドトキシン(TTX)以外に麻痺性貝毒(PSP)や

DAを保有している海産または淡水産フグの報告例もある。このような状況の下、食用魚介類の検査を実施するにあたり、PSP、TTXに加えてDAを対象とする必要性が生じている。現在、DAの検査はマウス毒性試験法とHPLCまたはLC/MS法が主として行われている。マウス毒性試験法ではスクラッチングシンドロームとよばれるマウスの特異な症状からDAの存在を確認することが出来る。これまで、DA、TTXおよびPSPはそれぞれ機器分析法により定量を行っており、試料の分析には多大な時間と労力を必要としていた。また、DA分析に用いる標準品は市販されているものの、入手が非常に困難になってきており、これらの精製品を確保しておく必要がある。このような背景から、LC/MSによる貝毒一斉分析法の開発に用いる標準品を作成することを目的とし、天然試料からのDAの分離精製を試みた。

B. 研究方法

1) 試料

鹿児島県花瀬崎にて採取されたハナヤナギ 1,114 g を試料とした。

2) 精製方法

DAの精製手順を図2に示す。

試料を細切後、3倍量の精製水を加え、ホモジナイザー(15,000 rpm, 10 min)で十分に均質化した後、遠心分離(8,000 rpm, 20 min)を行い、上清を分取した。得られた上清を自然ろ過したものを粗抽出液とした。粗抽出液のpHを3.2に調整後、蒸留水で充分洗浄した活性炭(250 ml)を加えてよく攪拌しDAを吸着させた。蒸留水で洗浄後、3倍量の90%メタノールで2回溶出させ、ブフナー漏斗でろ過した。溶出液を合一し、

減圧濃縮後、0.45 μm フィルターでろ過したものを半分ずつ2回に分けてBio-Gel P-2カラム(ϕ 30 \times 300 mm, Bio-Rad Laboratories)に付し、0.03 M 酢酸で溶出(0.5 ml/min)させた。有毒画分を合一後、減圧濃縮し、0.45 μm フィルターでろ過した。

3) LC/MS 分析方法

LC/MS 分析条件を表1に示す。分析はイオン化法にESI⁺を用いて、Waters社製のZSprayTMMS検出器(ZMD)および同社HPLCであるalliance2690からなるLC/MSシステムにより行った。DAを選択イオン $m/z=312$ で検出した。カラムはMightysil RP-18 GP(ϕ 2.0 \times 250 mm, 関東化学株式会社)を用いた。移動相には1%酢酸-12%アセトニトリルを用い、流速は0.2 ml/minとした。DA標準品0.1、1、5、10 ppmを用いて検量線を作成し、試料のDA含量を算出した。

C. 研究結果

試料からDAを精製する過程でのDA含有量をLC/MSにより定量した結果、粗抽出液中には416 mg、活性炭処理後に132 mgのDAが含まれていた。次いで、Bio-Gel P-2カラムクロマトグラフィーにより得られた各フラクションをLC/MSにより選択イオン $m/z=312$ でモニターしたところ図3のような溶出パターンを得た。Bio-Gel P-2で分離した有毒画分(1回目:Fr.21~32, 2回目:Fr.20~31)の総DA量は124 mgであった。

D. 考察

試料から調製した粗抽出液中416 mg含まれていたDAが活性炭処理後に132 mgしか回収できず、回収率は32%となった。今

回の DA の定量は検出の特異性の高い LC/MS により行っているため、狭雑物による検出への影響は少なく、正確に定量できた結果と考えれば、活性炭処理は DA の精製に効果的でないと思われた。

また、Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィーによる画分ごとの DA の溶出濃度は、1回目では Fr. 21 に始まった溶出が Fr. 24 に 9 mg/10 ml まで増加したが、次の Fr. 25 で 8 mg/10 ml と低下し、その後、また徐々に溶出濃度が増加した。Fr. 24~29 での各画分の DA 溶出濃度は 8~11 mg/10 ml であり、Fr. 32 で溶出が終了するまで、明確な溶出濃度のピークは見られなかった。ハナヤナギには DA の異性体も含まれることが知られているが、本研究で用いた LC/MS 条件により DA と分離できない異性体が試料に含まれていたら、Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィーにより微妙に分離しながらブロードに溶出された可能性も考えられる。何れにしても、この有毒画分の DA を今後さらに精製していくことが必要とされる。

E. 結論

LC/MS 分析用標準品の作成を目的として ASP の一つである DA の精製を試みた。紅藻ハナヤナギ試料 1,114 g の粗抽出液中の DA (416 mg) を、活性炭および Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィーで精製を行い、有毒画分に 124 mg の DA を得た。

F. 研究発表

今年度の研究成果については、残りのデータが出揃い次第、国内の学会発表を行う予定である。また、次年度以降のデータを加えて後日論文として公表する予定である。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

特に予定していない。

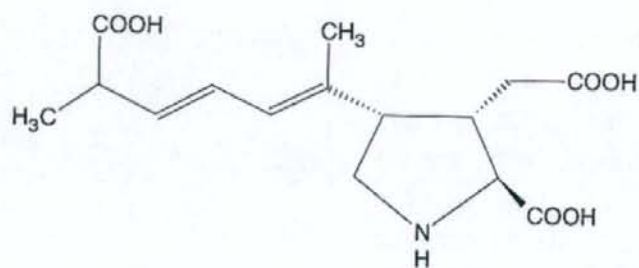


図 1. ドウモイ酸の化学構造

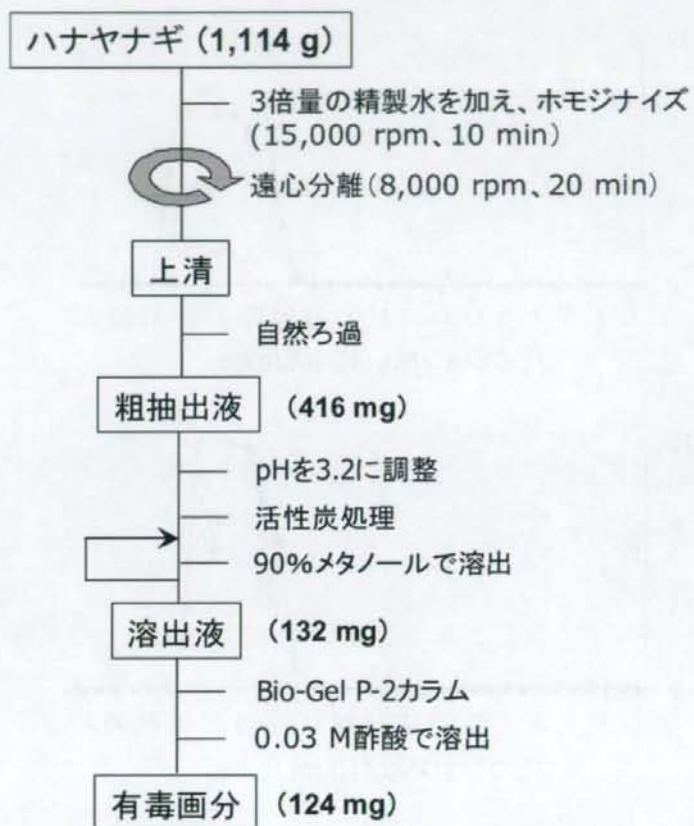


図2. ドウモイ酸の精製手順

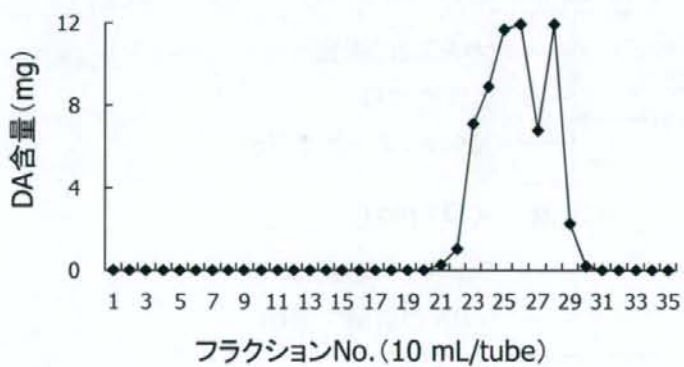
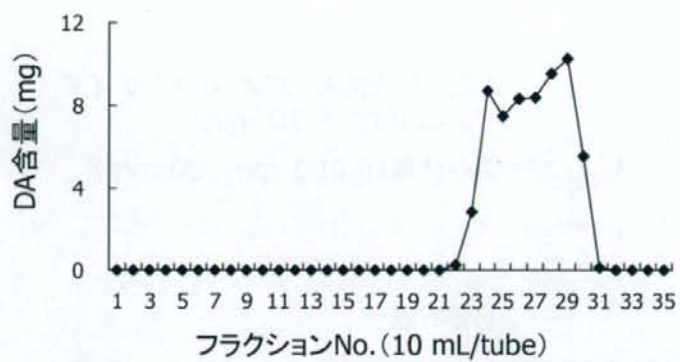


図 3. Bio-Gel P-2 による DA の溶出パターン
1 回目 (上)、2 回目 (下)

表1 LC/MS 分析条件 (DA 分析条件)

LC	HPLC	: Waters alliance 2690
	カラム	: Mightysil RP-18 GP (250×2.0 mm)
	移動相	: 1%酢酸-12%アセトニトリル
	流速	: 0.2 mL/min
	カラム温度	: 35°C
	注入量	: 4 µL
MS	MS	: Waters micromass ZMD
	イオン化	: ESI (positive)
	デゾルベーション温度	: 350°C
	ソースブロック温度	: 120°C
	コーン電圧	: 30V