

高速液体クロマトグラフによる 麻痺性貝毒定量法の開発

井岡 久

現在、本県では毎年4～7月の間、貝毒の蓄積に関するモニタリング調査を実施しているところである。調査は大きくわけて、プランクトン調査、水質調査、貝毒調査であるが、貝毒の定量は衛生公害研究所でマウスによるバイオアッセイ法で対応している。このマウス試験の結果をもって、水産物の出荷の規制が制限されている。しかし、毒成分の組成や蓄積様態の解明などが弾力的にやりにくいこと、動物実験に対する国際的な自粛の流れなどから、今後機器分析の検討が必要となっていくことは明らかである。

また、本県ではイタヤガイ、ヒオウギガイ、イワガキなどの無給餌養殖を振興しようとしている最中であり、将来的にも機器分析の重要性は高まることが予想されている。

HPLC 分析による麻痺性貝毒の迅速定量は、モニタリング調査のみならず本県水産物の品質管理の一環としても重要であるとの見地から取り組んだ。本報告では、浜田湾産ムラサキイガイを試料とし、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による麻痺性貝毒（PSP）の迅速定量技術の確立を目的として検討したのでその概要を示す。

方 法

試料 浜田湾産のムラサキイガイを用いた。ムラサキイガイは採取後直ちに剥き身とし、フードカッターで均質化した後、PSP の抽出を行った。

ゲル濾過 ムラサキイガイ抽出液中には、定量妨害物質が存在するため、そのままでは HPLC により定量できない。そのため、妨害物質の除去を目的に、Bio-Gel P-2（Bio-Rad Laboratories 製）で調製したカラムクロマトグラフィーを実施し、毒成分を精製し、HPLC 装置に導入した。

HPLC 装置 図1に PSP 定量システムの概略を示した。島津 LC-10システムを用い、ポストカラム蛍光検出法により、水産庁より配布された貝毒標準品を基に定量化について検討した。

定量技術の概要

PSP の抽出法 基本的には、マウス試験で抽出する方法（AOAC 法）と同様の処理を行う。図2に抽出法を示した、均質化したムラサキイガイ試料10gに等量の0.1N HClを加え分散したのち、沸浴中で5分間毒成分の抽出を図る。この段階で pH が4.5より低くなりすぎると、PSP の分解が起こるため、抽出後必ずチェックをしておく。抽出液を冷却後、10,000rpm、5分間遠心分離して残さを取り除き、上澄液をさらに0.45μmディスクフィルターで濾過し、これを粗抽出液としてカラムクロマトグラフィーに付す。

ゲル濾過 図3に貝毒精製のためのゲル濾過の手順を示した。Bio-Gel P-2(200-400mesh)を純水で一晩膨潤させ内径9mm、長さ30cmのカラムに充填した。PSP は STX・GTX 群と C-Toxin 群とは性質が異なるため、STX・GTX 群精製操作と C-Toxin 群精製操作の2段階に分けて実施した。すなわち、蒸留水で調製した上記カラムに粗抽出液を付し、カラム体積の5倍量の蒸留水を流す。この段階で、STX・GTX 群は

カラムに保持され、妨害物質は除去される。つぎに、0.05M酢酸をカラム内に導入し、約10~20ml画分を採取し、この溶出液を HPLC にて定量した。ただし、充填剤のロットなど各種の条件により、溶出画分に変動が生じるため、調製カラムごとに PSP 溶出位置を確認しておく必要がある。

C-Toxin 群の溶出は、0.05M酢酸で STX・GTX 群を溶出させたカラムをそのまま用いる。0.05M酢酸で置き換わっているカラムに抽出液を導入し、カラム体積の5倍量の0.05M酢酸を流下させ、妨害物質を除去する。その後蒸留水に切り替えると、すぐに C-Toxin 群が溶出しするため、溶出開始から8~16mlの画分を採取し、HPLC にそのまま導入した。

このゲル濾過精製による貝毒標準品の回収率は98~102%を示し、精製による損失はほとんど認められなかった。

HPLC 分析条件 表1に PSP 分析のための HPLC 条件を示した。Neo-STX、GTX、C-Toxin 専用の3本のカラムを用意し、カラムおよび移動相を切り替えることにより、1~2日での3種類の PSP の迅速定量化を図った。

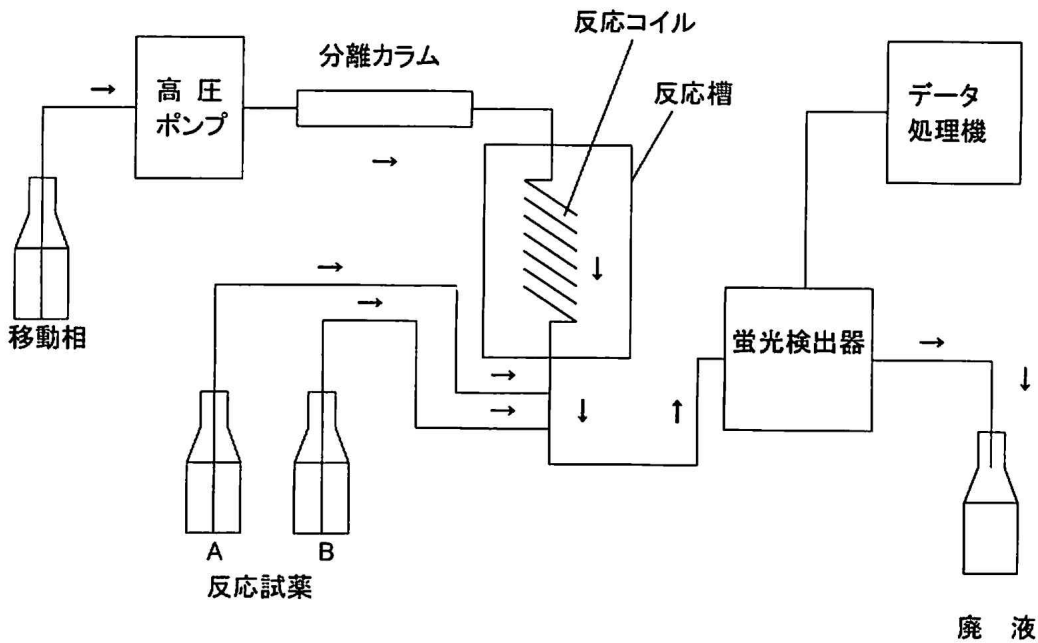


図1 貝毒定量HPLCシステムの概略図

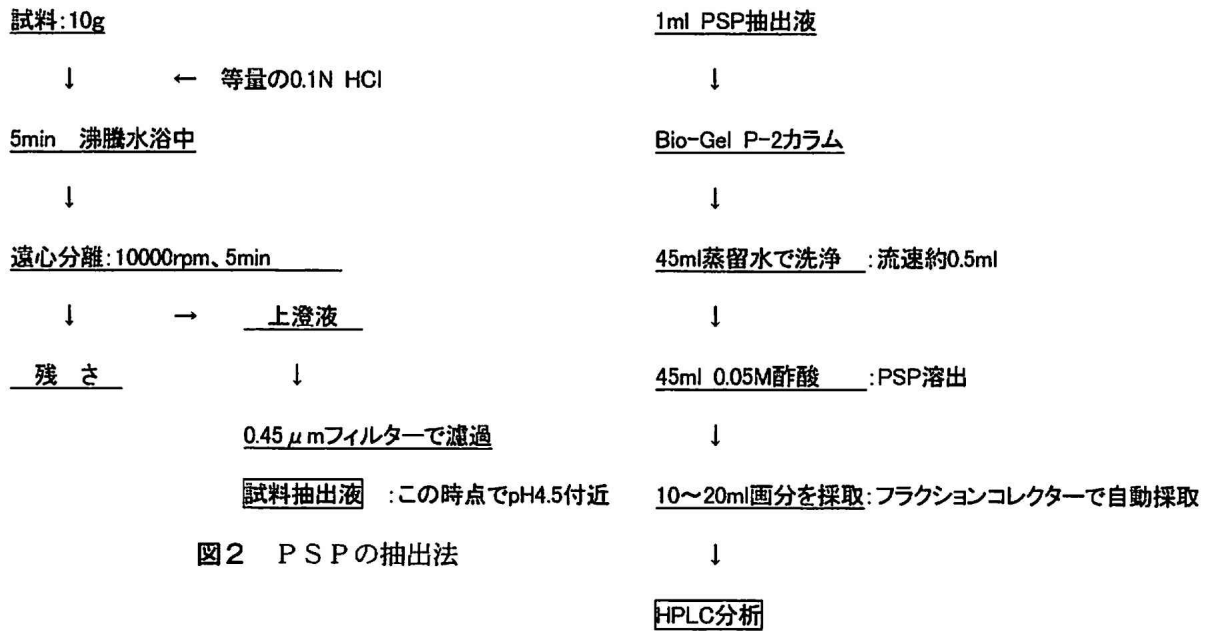


図2 PSPの抽出法

図3 ゲル濾過の概略

表1 HPLCによるPSP分析条件

項目	各種条件
C-Toxin	4mM 塩化テトラブチルアンモニウムを含む10mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) / Me-OH = 99 : 1
GTX	3mM ヘプタンスルホン酸ナトリウムを含む10mMリン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) (メタノールは加えない)
STX	2mM ヘプタンスルホン酸ナトリウムを含む30mMリン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) / アセトニトリル = 100 : 4
検出試薬	A液 (酸化試薬) : 70mM 過ヨウ素酸 B液 (アルカリ試薬): <ul style="list-style-type: none"> • 1.5M KOH 10% • 2.5M ギ酸アンモニウム 40% • ホルムアミド 50%
反応温度	65°C (カラムオープン)
移動相流速	0.6ml/min
検出試薬流量	各々約0.3ml/min (但し、pH7.0になるよう微調整:重要ポイント)
検出波長	EX = 336 nm EM = 390 nm
カラム	Superspher 100 RP-18 (e) (4 μm) *当場では、1~2日で上記3種のPSPを定量する必要があるため、各PSP専用カラムを1本 (計3本) 用意している。