

and their isomeric ketones, which were converted to the corresponding 2,4-dinitrophenylhydrazones and 1-dimethylaminonaphthalene-5-sulfonylhydrazones, respectively. Thermodynamic properties of solutions were examined as a function of eluent composition. Enthalpies and entropies of transfer were calculated from retention data by evaluation of Van't Hoff plots. For all cases examined, the enthalpies of transfer were negative and increased with the concentration of organic modifier in the eluent. The entropies of transfer increased with increasing the concentration of methanol. With the increase in acetonitrile concentration, on the other hand, the entropies of transfer tended to decrease as the carbon numbers of both derivatives increased. This tendency suggested the existence of direct interaction between the bonded hydrocarbon chain and alkyl chains of derivatives. The bonded hydrocarbon chain

in aqueous acetonitrile mobile phase seemed to be pictured as an alkyl 'brush', whose individual bristles made up the surface with which the solute molecules in the mobile phase interacted. The bonded hydrocarbon chain in aqueous methanol mobile phase seemed to form 'liquid-droplet'-like phase, which behaved as a liquid with the analogous liquid-liquid partitioning systems.

(Received October 29, 1984)

Keyword phrases

thermodynamic investigation of retention; solvation of the bonded hydrocarbon chain; derivatives of aldehydes and their isomeric ketones; reversed phase liquid chromatography.

高速液体クロマトグラフィーによるベニテングタケ中のイボテン酸及びムッシモールの定量

込山茂久[®], 山浦由郎*, 中澤裕之, 藤田昌彦**, 桃澤洋三***

(1984年11月7日受理)

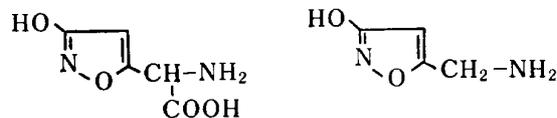
毒キノコのベニテングタケに含有され、中枢神経系に作用するイソキサゾール化合物のイボテン酸とムッシモールの高速液体クロマトグラフィーによる分析法を検討した。カラムはアミノプロピル基を化学結合した Shim-pack P NH₂-10/S2504 を使い、0.01 M リン酸塩緩衝液 (pH 4.5)-メタノール (30:70) を移動相とし、220 nm で検出した。陰イオン交換樹脂及びアルミナを積層したシリカゲルカラムによる前処理を行うことにより混在物の影響もなく、精度良くイボテン酸、ムッシモールの同時定量が可能である。

1 緒 言

毒キノコのベニテングタケ (*Amanita muscaria*) には生理活性を示すイソキサゾール化合物のイボテン酸 (α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-イソキサゾール-酢酸) とムッシモール (5-アミノメチル-3-ヒドロキシイソキサゾール) が含有されている¹⁾。ムッシモールはイボテン酸の

脱炭酸生成物であり、これらは中枢神経系の γ -アミノ酪酸のレセプターに作用し精神錯乱、幻覚など²⁾³⁾ を起こすといわれ薬理的にも興味深い化合物である。

著者らは毒キノコの熱水抽出液をマウスに投与してその生化学的作用を検討している⁴⁾⁻⁶⁾が、生理活性成分とその生体に対する影響の関係をより定量的に解析するた



Ibotenic acid

Muscimol

Fig. 1 Structures of ibotenic acid and muscimol

* 長野県衛生公害研究所 : 380 長野県長野市安茂里米村 1978

** 国立公衆衛生院衛生薬学部 : 108 東京都港区白金台 4-6-1

*** 日本大学理工学部薬学科 : 101 東京都千代田区神田駿河台 1-5

めに、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いたベニテングタケ中のイボテン酸とムッシモールの分析法を検討した。両化合物の測定にはペーパークロマトグラフィー⁷⁾、薄層クロマトグラフィー⁸⁾、アミノ酸分析計法⁹⁾及び HPLC¹⁰⁾ による方法が報告されている。しかし、この HPLC による方法はクリーンアップが不十分で混在物との分離が悪く、又、イボテン酸とムッシモールをそれぞれ異なったカラムで分析するなど煩雑な操作を必要とする。

本法では、前処理法として陰イオン交換樹脂とアルミナを積層したシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行った後、HPLC による同時定量法を検討し、満足すべき結果が得られたので報告する。

2 実 験

2.1 使用キノコ

実験に使用したベニテングタケは 1983 年 9~10 月に長野県内で採取し、土、枯れ葉などの付着物を除き分析時まで -20°C で冷凍保存した。

2.2 試 薬

標準溶液：イボテン酸は Aldrich Chemical 製、ムッシモールは Sigma 製を用い、蒸留水で各々 1 mg/ml の水溶液を原液とし適宜蒸留水で希釈して用いた。

イオン交換樹脂：ダウケミカル製 Dowex 1-X8 (強塩基性陰イオン交換樹脂) を酢酸型にして用いた。

カラムクロマトグラフィー用吸着剤：

1) シリカゲル；和光純薬工業製 Wako gel Q-23 を 100°C で 1 時間活性化して用いた。

2) アルミナ；和光純薬工業製活性アルミナ (300 メッシュ) を 1 M 塩酸に懸濁し、上澄みを傾斜法で除いた。この操作を数回繰り返してアルミナを分別し、母液が pH 6 になるまで水洗し 100°C で乾燥したものを用いた。

その他の試薬及び有機溶媒はすべて試薬特級品を用いた。

2.3 装 置

分光光度計：日本分光製 UVIDEK-610B を用いた。

高速液体クロマトグラフ：島津製 LC-3A に同社製可視紫外分光光度計 SPD-1 を接続し、測定波長 220 nm、感度 0.16 AUFS、カラム温度 40°C で測定した。

超音波発生装置：日本精機製作所 NS-300 を用いた。

カラム：Merck 製 LiChrosorb CN ($10\mu\text{m}$, $4.0\times 250\text{mm}$) と島津製 Shim-pack P NH₂-10/S2504 ($10\mu\text{m}$, $4.0\times 250\text{mm}$) を用いて検討した。

2.4 移動相

種々 pH の 0.05 M 酢酸塩緩衝液あるいは 0.01 M リン酸塩緩衝液とメタノールの組み合わせで使用直前に

超音波発生装置で 5 分間脱気して使用した。流速は 1.0 ml/min に設定した。

2.5 前処理用カラムの調製

陰イオン交換樹脂カラム：Dowex 1-X8 約 7 ml を内径 10 mm のクロマト管に詰め、0.25 M 塩酸約 15 ml を流し流出液の pH が 1 を示してから 0.25 M 酢酸ナトリウム溶液 30 ml を流した。流出液が pH 6 になった後 0.1 M 硝酸銀溶液により塩化物イオンが検出されなくなるまでカラムを水洗した。

アルミナ-シリカゲルカラム：シリカゲル 1.0 g を内径 10 mm のクロマト管にメタノールで湿式充てんし、シリカゲルが完全に沈降した後、アルミナ 0.5 g を同様にしてシリカゲル上に積層しアルミナ-シリカゲルカラムを調製した。

2.6 分析操作

キノコ 10 g に 50% メタノール溶液 100 ml を加え 5 分間高速ホモジナイズし、一夜冷暗所 (4°C) に放置した後、東洋濾紙 No. 5C で濾過し、50% メタノール溶液を用いて正確に 100 ml とした。母液 10 ml をイオン交換樹脂カラムに添加し、水 15 ml でカラムを洗浄した。カラム通過液と洗浄液を合わせ約 2 ml まで減圧濃縮し、アルミナ-シリカゲルカラムに添加しアセトン-メタノール-水 (2:2:1) 60 ml で溶出した。又、イオン交換樹脂に吸着した成分は 0.1 M 酢酸 70 ml で溶離させ、アルミナ-シリカゲルカラムからの溶出液と合わせ 40°C で減圧濃縮乾固した。この残留物を 50% メタノール溶液 1 ml に溶解し、その 5 μl を高速液体クロマトグラフに注入した。

3 結果及び考察

3.1 HPLC 測定条件の検討

3.1.1 測定波長 イボテン酸及びムッシモールの水溶液について紫外吸収スペクトルを測定すると Fig. 2 に示すように 215~220 nm 付近に吸収極大を示した。そこで HPLC における測定波長を 220 nm に設定した。

3.1.2 分離用カラム及び移動相の検討 予試験としてオクタデシル基、四級アミン、シアノプロピル基、アミノプロピル基をそれぞれシリカゲルに化学結合させた 4 種類のカラムについて、酢酸塩緩衝液あるいはリン酸塩緩衝液とメタノールの組み合わせから成る移動相で、イボテン酸とムッシモールの分離挙動を検討した。その結果、後者 2 種のカラムにおいてイボテン酸、ムッ

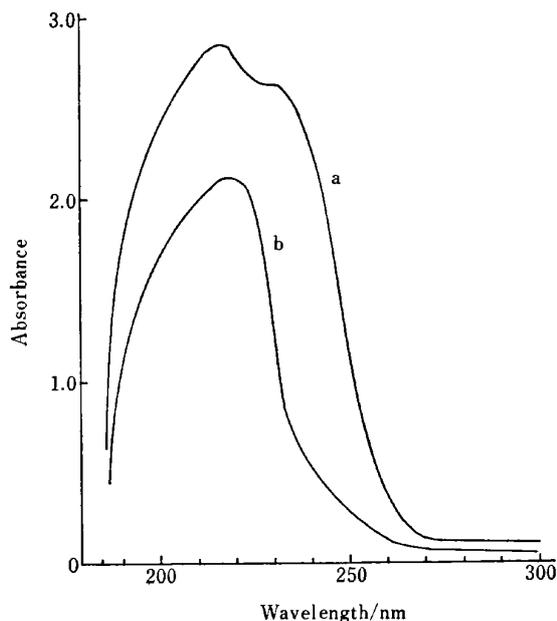


Fig. 2 Absorption spectra of ibotenic acid and muscimol in distilled water

a : Muscimol (100 $\mu\text{g/ml}$); b : Ibotenic acid (100 $\mu\text{g/ml}$)

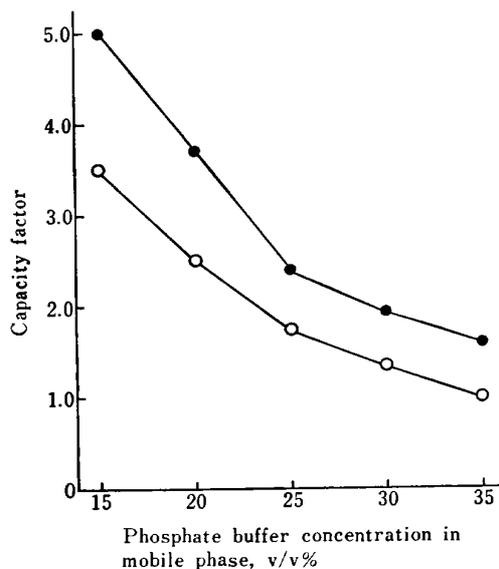


Fig. 3 Effect of phosphate buffer concentration in mobile phase on capacity factor

● Ibotenic acid, ○ Muscimol

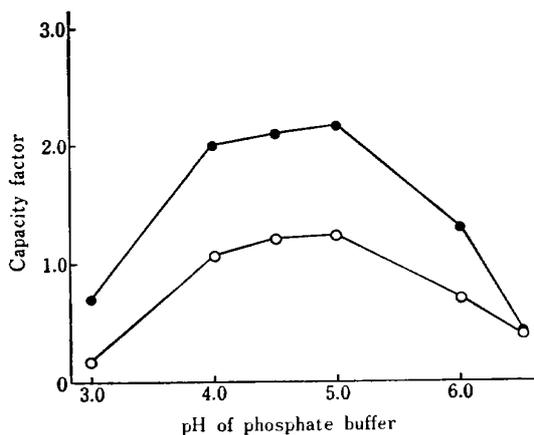


Fig. 4 Effect of pH of phosphate buffer in mobile phase on capacity factor

● Ibotenic acid, ○ Muscimol

シモール 相互分離の 可能性が 認められた。すなわち、Lichrosorb CN カラムの場合、0.05 M 酢酸塩緩衝液 (pH 4.0)-メタノール (5 : 95) でイボテン酸とムッシモールは相互分離されたが、イボテン酸は溶媒先端近くに溶出され混在物の影響を受けた。又、リン酸塩緩衝液-メタノールの系でも、ほぼ同様な結果であった。Shim-pack P NH₂-10/S2504 カラムを用いた場合、酢酸塩緩衝液-メタノール系ではイボテン酸がカラムに保持され溶出されなかった。一方、リン酸塩緩衝液-メタノール系では混合割合を検討することにより両化合物は完全に相互分離され、混在物の影響を受けないことが分かった。そこでリン酸塩緩衝液の濃度を変化させ、イボテン酸とムッシモールの保持比 (k') に対する影響を調べた (Fig. 3)。ただし、保持比は $k' = (t_R - t_0) / t_0$ で計算し、 t_R は物質の保持時間、 t_0 は溶媒先端の時間である。イボテン酸、ムッシモールとも移動相中のリン酸塩緩衝液濃度の増加につれて k' は減少し溶出は早まった。又、リン酸塩緩衝液濃度が 25% 以下ではイボテン酸のピークにテイリングが見られたことから混在物との分離も考慮し、溶媒組成を 0.01 M リン酸塩緩衝液-メタノール (30 : 70) とした。更に k' に対するリン酸塩緩衝液の pH の影響を 3~6.5 の領域で検討した (Fig. 4)。その結果、pH 4~5 の範囲では k' の変化も少なく、ピークの形状も良好であった。そこで、リン酸塩緩衝液の pH をクロマトグラム上混在物の影響も少ない

4.5 に設定した。

3.2 前処理法の検討

キノコ中の生理活性成分の抽出溶媒としては水¹¹⁾、メタノール⁸⁾¹²⁾、エタノール⁹⁾¹³⁾ あるいはこれら有機溶媒と水の混合溶媒⁷⁾⁸⁾¹⁴⁾¹⁵⁾ が多く使用されているが、ここでは Stijve⁸⁾、Faulstich ら¹⁵⁾ の方法に準じて 50% メタノールを用いた。

キノコ中には糖、タンパク質、アミノ酸、色素など多くの成分が含まれており微量の目的成分を分析するにはクリーンアップ及び濃縮操作が必要である。Lund¹⁰⁾ はキノコ粗抽出液に同量のメタノールを加え、メタノー

ル不溶性物質を除去する方法を用いているが、この方法ではクリーンアップが不完全で HPLC による分析においては共存物質の影響を受ける。

シリカゲルあるいはアルミナカラムについてそれぞれクリーンアップ法を検討したところ、イボテン酸はシリカゲルカラムを通すことにより部分的に脱炭酸され、アルミナカラムでは吸着されて溶出しなかった。しかし、ムッシモールはシリカゲルカラムによりクロマトグラム上ピーク近くに認められる共存物質が除去された。又、アルミナカラムでは色素などの混在物が除かれた。

次に陰イオン交換樹脂を用いイボテン酸とムッシモールの挙動を調べたところ、イボテン酸は樹脂に吸着されたがムッシモールは吸着されずカラムを通過した。更に樹脂に吸着されたイボテン酸は 0.1 M 酢酸で溶離された。以上の結果より、キノコ粗抽出液をまずイオン交換樹脂カラムに添加しイボテン酸を吸着させ、通過したムッシモールをアルミナを積層したシリカゲルカラムでクリーンアップすることにした。この溶出液は種々検討した結果、ムッシモールの溶出が比較的早く、後の溶媒除去も容易でクロマトグラム上妨害物質の影響も少ないアセトン-メタノール-水 (2:2:1) とした。

以上の抽出、クリーンアップ操作の間に 3.5 で述べるようなイボテン酸のムッシモールへの脱炭酸は認められなかった。すなわち、本法によるイボテン酸、ムッシモールの回収率はベニテングタケにそれぞれ 50 ppm を添加し、5 回繰り返し測定した結果、イボテン酸が平均 99.3%、ムッシモールが平均 90.6% で、相対標準偏差はそれぞれ 1.0%、1.5% と良好であった。

3.3 検量線

3.1.1 の結果より測定波長を 220 nm に設定しピーク高さより検量線を作成した。イボテン酸は 90 ng、ムッシモールは 50 ng からそれぞれ 5.0 μg まで原点を通る直線性を示した。

3.4 試料の分析

ベニテングタケをかさと茎の部位に分け 2.6 に従いイボテン酸とムッシモールを分析した結果を Table 1 に示す。又、代表的なクロマトグラムを Fig. 5 に示す。イボテン酸の含有量はかさ、茎ともムッシモールの数倍の値であり、部位別の含有量は両化合物ともかさのほうが高い値であった。

又、本法で分析した際の定量限界はイボテン酸が 18 ppm、ムッシモールが 10 ppm であった。

Table 1 Determination of ibotenic acid and muscimol in *A. muscaria*

Sample	Ibotenic acid (ppm : wet weight basis)	Muscimol (ppm : wet weight basis)
1 cap stalk	360 180	120 30
2 cap stalk	460 320	210 160
3 cap stalk	280 140	150 50

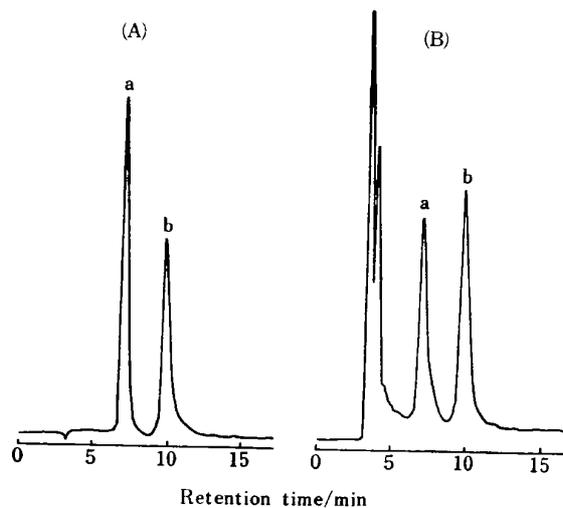


Fig. 5 Chromatograms of (A) ibotenic acid and muscimol standard (1.5 μg) and (B) extracts from *A. muscaria*

a : Muscimol; b : Ibotenic acid

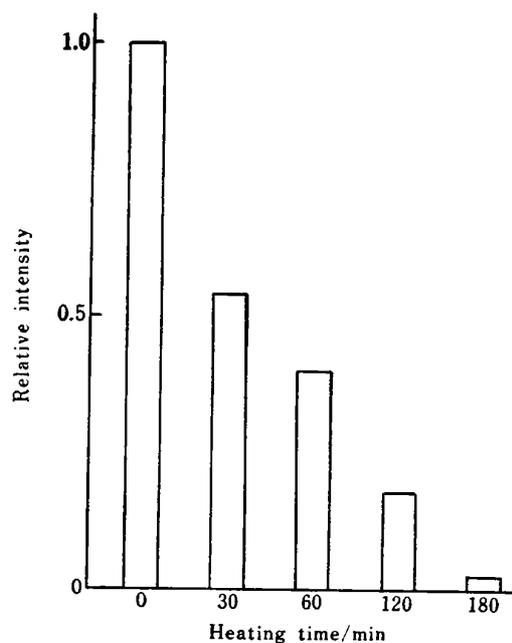


Fig. 6 Effect of heating time on decarboxylation of ibotenic acid

3.5 加熱によるイボテン酸の脱炭酸

イボテン酸は酸^{7)~9)}, 熱¹⁶⁾により脱炭酸してムッシモールを生成することが報告されている。そこで約 500 µg/ml のイボテン酸を含むキノコ抽出液を沸騰水浴上で加熱し加熱時間と脱炭酸率の関係を本法を用いて調べた。その結果を Fig. 6 に示す。加熱 1 時間では約 60 % が, 3 時間では 95 % が脱炭酸されムッシモールに変わったことが本法を用いることにより容易に確認された。

(1984 年 10 月, 日本食品衛生学会第 48 回学術講演会において一部発表)

文 献

- 1) G. F. R. Müller, C. H. Eugster : *Helv. Chim. Acta*, **48**, 910 (1965).
- 2) 横山和正 : 遺伝, **34**, (4) 54 (1980).
- 3) 山崎幹夫 : 医学のあゆみ, **112**, (13) 910 (1980)
- 4) 山浦由郎, 前沢 久, 高島英伍, 橋本 隆 : 食品衛生学雑誌, **22**, 203 (1981).
- 5) 山浦由郎, 前沢 久, 高島英伍, 橋本 隆 : 食品衛生学雑誌, **23**, 314 (1982).
- 6) 山浦由郎, 込山茂久, 福原守雄, 高島英伍, 橋本隆 : 食品衛生学雑誌, **24**, 459 (1983).
- 7) R. G. Benedict, V. E. Tyler, Jr., L. R. Brady : *Lloydia*, **29**, 333 (1966).
- 8) T. Stijve : *Mit. Gebiete Lebensm. Hyg.*, **72**, 44 (1981).
- 9) M. G. Gore, P. M. Jordan : *J. Chromatogr.*, **243**, 323 (1982).
- 10) U. Lund : *Arch. Pharm. Chemi, Sci. Ed.*, **7**, 115 (1979).
- 11) 竹本常松, 横部哲朗, 中島 正 : 薬誌, **84**, 1186 (1964).
- 12) H. P. Raaen : *J. Chromatogr.*, **38**, 403 (1968).
- 13) T. Stijve, R. Seeger : *Z. Naturforsch*, **34C**, 330 (1979).
- 14) M. Onda, H. Fukushima, M. Akagawa : *Chem. Pharm. Bull.*, **12**, 751 (1964).
- 15) H. Faulstich, D. Georgopoulos, M. Bloching : *J. Chromatogr.*, **79**, 257 (1973).
- 16) 竹本常松, 中島 正, 横部哲朗 : 薬誌, **84**, 1232

(1964).

☆

Determination of ibotenic acid and muscimol in *Amanita muscaria* by high performance liquid chromatography. Shigehisa KOMIYAMA, Yoshio YAMAZURA*, Hiroyuki NAKAZAWA, Masahiko FUJITA**, and YOZO KABASAWA*** (*Nagano Research Institute for Health and Pollution, 1978, Komemura, Amori, Nagano-shi, Nagano, 380; **The Institute of Public Health, 4-6-1, Shirokane-dai, Minato-ku, Tokyo, 108; ***Department of Pharmacy, College of Science and Technology, Nihon University, 1-5, Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo, 101)

Simultaneous determination of ibotenic acid and muscimol in *Amanita muscaria* has been developed by means of high performance liquid chromatography. The extracts of mushroom with 50 % methanol were poured onto a Dowex 1-X8 column (acetate form). Ibotenic acid was adsorbed and muscimol passed through the column. After concentration of the fraction containing muscimol, it was added on the bi-layer column (upper : alumina, lower : silica gel) and eluted with acetone-methanol-water (2 : 2 : 1). Ibotenic acid was eluted with 0.1 M acetic acid from the Dowex 1-X8 column. Both effluents were combined and evaporated to dryness at 40 °C. The residue was dissolved in 1 ml of 50 % methanol and injected into a Shim-pack P NH₂-10/S2504 column (10 µm, 4.0 × 250 mm) at 40 °C. The sufficient resolution was obtained using 0.01 M phosphate buffer (pH 4.5)-methanol (30 : 70) as mobile phase with the flow rate of 1.0 ml/min and detected at 220 nm. The recovery for ibotenic acid and muscimol were 99.3 % and 90.6 %, respectively. The method can be applicable for the determination of ibotenic acid and muscimol in poisonous mushroom such as *A. muscaria* with determination limit of 18 and 10 ppm, respectively.

(Received November 7, 1984)

Keyword phrases

determination of ibotenic acid and muscimol in *Amanita muscaria*; clean-up by anion exchange resin and alumina-silica gel column; high performance liquid chromatography with ultraviolet photometric detection.