マコンブ中のヒ素の化学形態について^{*1}

(昭和 57 年 7 月 19 日受理)

吉田 政晴^{*2} 田中 凉一^{*2} 榎 本 隆^{*2}Chemical Form of Arsenic in Makonbu, *Laminaria japonica* Aresh.(Studies on Arsenic Compounds in Makonbu, *Laminaria japonica* Aresh. I)

Masaharu YOSHIDA, Ryoichi TANAKA and Takashi KASHIMOTO

(Osaka Prefectural Institute of Public Health: 3-69, Nakamichi 1-chome,
Higashinari-ku, Osaka, Japan)

The chemical form of arsenic in *Laminaria japonica* Aresh. (Japanese name: "makonbu", *Laminariaceae*) was investigated and the following results were obtained.

1) The arsenic in "makonbu" is easily extracted with water-methanol (4:1) mixture (the recovery was more than 90%).

2) Ultrafiltration indicated that the water-methanol soluble arsenic compounds have low molecular weight (MW 500-1,000).

3) In activated charcoal column chromatography, the arsenic compounds in "makonbu" were eluted with water-ethanol (4:1) mixture, but not with water (column recovery 99.2%). In QAE-Sephadex A-25 (Cl type) column chromatography, the arsenic compounds in "makonbu" were eluted with acetic acid-methanol (1:25) mixture (column recovery 80.1%). After both procedures, the content of arsenic in the eluate reached 2.78%.

4) The arsenic compounds gave negative reactions with ninhydrin, dithizon and phenol-sulfuric acid reagent.

(Received July 19, 1982)

Key words: 化学形態 chemical form; マコンブ sea tangle (*Laminaria japonica* Aresh.); ヒ素 arsenic; ゲルろ過 gel filtration; 限外ろ過 ultrafiltration; カラムクロマトグラフィー column chromatography; 薄層クロマトグラフィー thin layer chromatography

まえがき

ヒ素は広範な生物種中に見い出され、特に海洋生物では陸上生物にくらべてかなり高いヒ素含有量を示している^{1)~4)}。そして Lunde⁵⁾ らは海洋生物中のヒ素は、その大部分が有機ヒ素化合物であると報告している。一般に重金属の毒性及び生体内挙動を追究する際、その化学形態を明確にすることがその毒性を評価するうえで重要である。従来海洋生物中のヒ素の化学形態については Edmonds⁶⁾ ら、品川^{*3}がイセエビやミズダコからアルセ

ノベタインの存在を明らかにしている。またヒジキ中のヒ素については、分子量 200~1,500 の有機ヒ素化合物^{7),8)}であり、塩酸 (pH 2) 酸性で容易に無機化すると報告⁹⁾がある。コンブのヒ素についてはゲルろ過パターンがヒジキと異なるほか⁷⁾、2N 塩酸で無機化しない⁹⁾、などの報告があるものの詳細は不明である。そこで著者らはコンブ中のヒ素の化学形態を明らかにする目的で、溶出剤、及び活性炭、QAE-Sephadex、薄層などのクロマトグラフィーを用い強酸、強アルカリを使用せずに精製することに留意して実験を行い若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 試料

大阪市内で購入した北海道産マコンブ (55 µg As/g)

^{*1} マコンブ中のヒ素化合物に関する研究 (第1報)

^{*2} 大阪府立公衆衛生研究所: 大阪市東成区 中道 1-3-69

^{*3} 品川 明ら: 日本水産学会春季講演要旨集 p. 261 (1982)

を用いた。また比較のためにメタンアルソン酸ナトリウム、ジメチルアルシン酸ナトリウム: Sigma 社製, フェニルアルソン酸: 片山化学工業(株)製, 亜ヒ酸カリウム: 和光純薬工業(株)製を対照試料とした。

2. 試薬及び試料

(a) メタノール, エタノール: 和光純薬工業(株)製 残留農薬用

(b) ジエチルジチオカルバミン酸銀: (株)同仁化学研究所製

(c) Sephadex G-10, G-15, QAE-Sephadex A-25 (C1-型): Pharmacia 社製

(d) 限外ろ過用ウルトラフィルター UK-10 (分画分子量 10,000), UH-1 (分画分子量 1,000): 東洋濾紙(株)製, UM-05 (分画分子量 500): Amicon 社製

(e) 塩酸, 砂状亜鉛: 和光純薬工業(株)製ヒ素分析用

(f) 活性炭: 和光純薬工業(株)製クロマトグラフ用

(g) 薄層クロマトグラフィー (以下 TLC) 用展開溶媒: *n*-ブタノール-アセトン-28% アンモニア-水 (10:10:2:5)

その他試薬は特級品を使用した。

3. 装置・器具

(a) TLC 用展開槽: 8×24×25 cm カマグ社製

(b) TLC プレート: Schleicher & Schüll 社製 PLC-セルロースプレート (厚さ 0.5 mm)

(c) ウルトラターラックス: Janke & Kunkel 社製 TP 18-10

(d) フラクションコレクター: 東洋濾紙(株)製 SF-160K

(e) 限外ろ過装置: 東洋濾紙(株)製 UHP-43, UHP-62

(f) 分光光度計: 日立 124 Spectrophotometer

4. ヒ素濃度測定

微量ヒ素の測定には原子吸光法¹⁰⁾, 二波長クロマトスキャナを利用したグートツァイト法, などがあるが, 著者らは実験室で容易に測定でき, しかも感度, 精度ともにすぐれているジエチルジチオカルバミン酸銀法 (以下 Ag-DDTC 法)¹¹⁾ を採用した。

5. ヒ素化合物の抽出

マコンプは市販の状態に細切し, 1 g 当り 4 ml の割合で水-メタノール混液 (4:1) を加え, ウルトラターラックスで粉砕抽出した。抽出液を1夜放置後, 東洋濾紙 No. 4 を用いて吸引ろ過を行い試験溶液 I とした。

6. 活性炭カラムクロマトグラフィー

試験溶液 I を 4 ml (試料 4 g に相当) を活性炭カラム (1×5 cm) に吸着させ, 蒸留水 150 ml で洗浄の後, ヒ素化合物をエタノール-水 (1:4) 混液 150 ml で溶出し, 試験溶液 II とした。

7. QAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィー

あらかじめ水で膨潤させて作成した QAE-Sephadex A-25 カラム (1×15 cm) に試験溶液 II を 10 ml (試料 10 g に相当) 吸着させ, 蒸留水 100 ml で洗浄の後酢酸-メタノール (1:25) 混液 300 ml でヒ素化合物を溶出した。

8. ゲルろ過

試験溶液 II を 5 ml 及び対照試料のメタンアルソン酸ナトリウム, ジメチルアルシン酸ナトリウム, フェニルアルソン酸, 亜ヒ酸カリウムをそれぞれ 1 ml (50 µg/ml) を Sephadex G-10 (2.5×95 cm) 及び Sephadex G-15 (2.5×95 cm) に加え, ゲルろ過 (0.1 M 塩化ナトリウム溶液, 10 ml/hr) を行い, その溶出液 (5 ml/tube) について, Ag-DDTC 法によるヒ素の測定を行うとともに, 還元糖類との関連性を見るために, 各フラクションをフェノール・硫酸法¹²⁾により 490 nm における吸光度を測定した。

9. セルロース TLC

活性炭カラムと QAE-Sephadex A-25 カラムで精製したヒ素化合物について, セルロースプレート (20×20 cm) を用い, *n*-ブタノール-アセトン-28% アンモニア-水 (10:10:2:5) を展開溶媒として展開し, 0.1% ジチゾン・クロロホルムの噴霧及び 5% 塩化第一スズ-6 M 塩酸溶液を噴霧乾燥後 15% ヨウ化カリウムを噴霧する方法¹³⁾を用いた発色によりヒ素の検出を行った。試料中のヒ素化合物はこれらの発色試薬で呈色しなかったため, 展開後のセルロースプレートを原点から 5 mm づつかき取り, 径 1 cm のミニカラムにつめ, 蒸留水 10 ml で溶出させた。溶出液中のヒ素は, 硫酸硝酸分解の後 Ag-DDTC 法で測定した。

10. 限外ろ過

試験溶液 II (試料 1 g/ml に相当) を限外ろ過用ウルトラフィルター UK-10, UH-1, UM-05 をそれぞれセットした限外ろ過装置に加え, 窒素加圧下 (3 kg/cm²) でろ過を行った。なお内液は水 5 ml で2回洗浄した。

結果と考察

1. 抽出溶媒の検討

乾燥マコンプの中に含まれるヒ素化合物の抽出率の検討を各種の溶媒を用いて行った。

この結果, 試料 (55 µg As/g) 中のヒ素化合物は Fig. 1 に示すごとく水-メタノール系溶媒に比較的によく抽出され, 特に水-メタノール (4:1) では 90% 以上のヒ素化合物の溶出が見られた。よって以後, この溶媒を抽出溶媒とすることにした。

2. マコンプ中のヒ素化合物と市販ヒ素化合物のゲルろ過クロマトグラフィー

市販ヒ素化合物と試料中のヒ素化合物のゲルろ過を Sephadex G-10 カラムを用いて行ったときの溶出パターンを Fig. 2 に示した。

Fig. 1. As-content in makonbu extracted with various solvents

Fig. 2. Sephadex G-10 gel filtration chromatogram

Column size, 2.5 cm×95 cm; solvent, 0.1 M-KCl; flow rate, 10 ml/hr

Peaks: (A), As in makonbu; (B), methane arsonic acid (MW, 139.9); (C), dimethyl arsinic acid (MW, 137.9); (D), phenyl arsonic acid (MW, 202.0); (E), potassium arsenite (MW, 146.0)

その結果から、試料中のヒ素化合物は対照市販試料の何れとも一致せず、メタンアルソン酸ナトリウム、ジメチルアルシン酸ナトリウム、フェニルアルソン酸、及び亜ヒ酸カリウムよりも溶出が速く、このことから試料中のヒ素化合物は、これらの市販試料より高分子量を有する化合物ではないかと考えられた。

3. 活性炭カラムクロマトグラフィーによる精製

試料抽出液中のヒ素化合物の精製を目的として、活性炭カラムを用いて検討した結果、ヒ素化合物の大部分は活性炭に吸着し、エタノール-水 (1:4) 混液で溶出されることが判明した。その際、カラムからのヒ素化合物の溶出は、注入ヒ素量の 99.2% に相当し、このヒ素化合

Fig. 3. Gel filtration profile of As-compound on Sephadex G-15 after the treatment with activated charcoal column chromatography
Column size, 2.5 cm×95 cm; solvent, 0.1 M-KCl; flow rate, 10 ml/hr
—, A_{525} As in makonbu; ---, A_{490} reducing sugar

物がマコンブ中の水溶性ヒ素化合物の大部分を占めていると思われる。またこのときのヒ素含有量は 0.54% で、活性炭カラムがヒ素化合物の精製に極めて有効であることを示している。

4. Sephadex G-15 カラムによるゲルろ過

活性炭カラムクロマトグラフィーで精製した試験溶液 II について、Sephadex G-15 カラムでのゲルろ過パターンを調べた。(Fig. 3)

各フラクションについて還元糖類との関連性を見るために、フェノール・硫酸法による 490 nm における吸光度を測定するとともに、Ag-DDTC 法によるヒ素の測定を行ったところ、フェノール・硫酸陽性物質が試料中のヒ素化合物にやや遅れて溶出することが判明した。しかし溶出位置がややずれていることからマコンブ中のヒ

素とは直接関係ないものと考えられる。この時のヒ素含有量は 1.36% であった。

5. QAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィーによる精製

活性炭カラムで精製した試験溶液 II をさらに精製する目的で強陰イオン交換体の QAE-Sephadex A-25 (C1-型) カラムを用いて検討を行ったところ、活性炭カラムで除去出来なかったフェノール・硫酸陽性物質は水洗により溶出することが明らかになった。またこのときのヒ素化合物の挙動を調べたところ、水では溶出せず酢酸-メタノール混液で溶出することが判明した。この事実はヒ素化合物が何らかのアニオン基をその構成成分中に有している可能性を示唆している。酢酸濃度は検討の結果から酢酸-メタノール (1:25) 混液が適していた。このときのカラムからのヒ素化合物の溶出は、注入ヒ素量の 80.18% に相当し、このときのヒ素含有量は 2.78% であった。

6. ヒ素化合物の TLC

(3) (5) によって精製した試料中のヒ素化合物と対照市販ヒ素化合物のクロマトグラムを Fig. 4 に示す。

対照市販ヒ素化合物 (ヒ素含有量 0.5%) はジチゾン、塩化第一スズ-ヨウ化カリウムなどの発色試薬ですべて呈色し、それぞれの R_f 値はメタンアルソン酸ナトリウム $R_f=0.04$ 、亜ヒ酸カリウム $R_f=0.05$ 、フェニルアルソン酸 $R_f=0.12$ 、ジメチルアルシン酸ナトリウム $R_f=0.13$ であった。しかし試料中のヒ素化合物は、ヒ素含有量が 2.78% と対照試料にくらべてかなり高濃度にもかかわらず、いずれの発色試薬とも反応しなかった。このことは、マコンブ中のヒ素化合物は対照市販ヒ素化合物とは異なった化学形態を有していることを示すものである。そこで試料中のヒ素化合物を確認する目的で TLC プレートに原点から 5 mm ずつ薄層をかきとりヒ素を測定する方法を用いて R_f 値を求めたところ 0.13~0.32 でかなりテーリングしたスポットが観察された。ヒ素濃度の測定では、2 か所にピークが存在するので、あるいは 2 種類のヒ素化合物の存在が考えられるが、こ

Fig. 4. Thin layer chromatogram of As-compounds

Solvent, *n*-butanol-acetone-ammonia-water (10:10:2:5); plate, PLC-cellulose (thickness; 0.5 mm); spot (A) was detected with Ag-DDTC after scraped off with a spatula, spots (B-E) were detected with 5% SnCl_2 solution in 6 *M*-HCl and 15%-KI solution.

(A), As-compound in makonbu; (B), phenyl arsonic acid (brown); (C), dimethyl arsinic acid (dark brown); (D), methane arsonic acid (dark brown); (E), potassium arsenite (yellow)

こでは不明である。

7. 限外ろ過によるマコンブ中のヒ素化合物の分画

試験溶液 II を分画分子量の異なる 3 種類のフィルターでろ過したときのヒ素化合物の透過性について検討した。結果を Scheme 1 に示す。

分画分子量が 1,000 と 10,000 の二種類のフィルターでは試料中のヒ素化合物の 90% 以上が外液へ溶出するが、分画分子量 500 のフィルターを使用した場合には外液へ 13% しか溶出せずヒ素化合物の 80% 以上が内液に残留していることが判明した。このことからマコンブ中のヒ素の大部分は推定分子量 500~1,000 の成分と結合していると考えられる。

Scheme. 1. Ultrafiltration of As-compound in makonbu

なお今後の課題としては、推定分子量 500~1,000 の成分と結合している大部分の水溶性ヒ素化合物の TLC プレート上での検出試薬の検索とともに、現在までのカラムクロマト等の組合せによりさらに精製率の向上に努め、その構造解析も同時に実施する予定である。

要 約

マコンブ含有ヒ素化合物の精製を行うとともにその化学形態について検討した。

1) マコンブ中のヒ素化合物は水-メタノール混液 (4:1) 抽出により 9 割以上が抽出された。

2) Sephadex G-10 ゲルろ過カラムを用いて市販ヒ素化合物 (メタンアルソン酸ナトリウム, ジメチルアルシン酸ナトリウム, フェニルアルソン酸, 亜ヒ酸カリウム) と比較検討したところ、マコンブ中のヒ素化合物は市販ヒ素化合物より高分子化合物である可能性を示した。また限外ろ過の結果から、マコンブ中のヒ素は推定分子量 500~1,000 の化合物と結合しているものと推定された。

3) 活性炭や QAE-Sephadex A-25 によるカラムクロマトグラフィーの検討を行ったところ、活性炭カラムではエタノール-水 (1:4) 混液がヒ素化合物の溶出に適していた。カラム回収率は 99.2% でこの時のヒ素含有量は 0.54%、また強陰イオン交換体の QAE-Sephadex A-25 を用いた場合も試料中のヒ素化合物は吸着し、酢酸-メタノール (1:25) 混液で溶出することが判明した。このことはヒ素化合物が何らかのアニオン基を構成成分に有している可能性を示している。このとき、活性炭カラムで除去できなかったフェノール・硫酸陽性物質を除くことができた。カラム回収率は 80.18%、活性炭カラム併用時のヒ素含有量は 2.78% であった。

4) セルロース TLC において、マコンブ中のヒ素化合物は、市販ヒ素化合物と異なり、ジチゾン、塩化第一

スズ-ヨウ化カリウムなどの発色試薬で陰性を示し、対照として用いた市販ヒ素化合物とは異なった化学形態を有していると推定された。またこのものはニンヒドリン反応も陰性であった。

謝 辞

本研究を行うに当り多くの御助言を戴きました大阪薬科大学小澤 貢教授、馬場きみ江講師に深謝致します。

なお本研究の一部は日本食品衛生学会第42回学術講演会 (昭和56年11月、大阪) で発表した。

文 献

- 1) 山崎素直: 化学と生物 **19**, 148~158 (1981).
- 2) Lunde, G.: Environ. Health Perspect **19**, 47~52 (1977).
- 3) 田中之雄, 池辺克彦, 田中凉一, 国田信治: 食衛誌. **18**, 75~85 (1977).
- 4) 竹下寿雄, 前田 滋: 油化学 **29**, 75~81 (1980).
- 5) Lunde, G.: J. Sci. Fd. Agric. **24**, 1021~1027 (1973).
- 6) Edmonds, J. S.: Tetrahedron Lett. **18**, 1543~1546 (1977).
- 7) 安達修一, 川井英雄, 細貝祐太郎: 食衛誌. **21**, 13~18 (1980).
- 8) 貝瀬利一, 渡辺重信, 池田陽男: 同上 **21**, 58~63 (1980).
- 9) 福井昭三, 平山晃久, 野原基司, 阪上嘉彦: 同上 **22**, 513~519 (1981).
- 10) 石崎睦雄: 分析化学 **26**, 667~671 (1977).
- 11) 日本薬学会編: “衛生試験法注解” 317~330 (1973) 金原出版.
- 12) 福井作蔵: “生物化学実験法 I, 還元糖の定量法” p. 45~47 (1979) 学会出版センター.
- 13) 田川昭治: 日水誌. **46**, 1257~1259 (1980).