

(別添 1)

アザスピロ酸-2 精製標準手順書

原料： *Azadinium poporum* 培養藻体 (約 400 g)

抽出操作

1-溶媒抽出

- ① 凍結・融解した培養藻体試料 400 g に対し等量のアセトニトリルを加える。
- ② 攪拌し超音波槽で約 10 分間超音波処理をする。
- ③ 遠沈管に分注する。
- ④ 遠心分離 (1000 ×g 以上) し上清を凍結可能な容器に収集する。
- ⑤ 遠心分離の残渣にアセトニトリル：蒸留水 (8：2, v/v) を 400 mL 加える。
- ⑥ 攪拌し超音波槽で約 10 分間超音波処理をする。
- ⑦ 遠沈管に分注する。
- ⑧ 遠心分離 (1000 ×g 以上) した上清を④の凍結可能な容器に収集する。
- ⑨ 冷凍庫 (-20 °C) で冷凍する。
- ⑩ 水層 (下層) と含水アセトニトリル層 (上層) に分離する。
- ⑪ 上層を分取する。
※下層が過冷却により凍結しない場合はピペット等で上層を除く
- ⑫ 下層をエバポレーター用のフラスコに移す。
- ⑬ ロータリーエバポレーターで溶媒を除去し、アザスピロ酸-2 (AZA2) 精製原料とする。

精製操作

2- (1) 固相抽出 (例：Waters, Sep-Pak C18 Vac)

- ① ODS 固相抽出カラム (担体量：5 g) にメタノール 30 mL を通し、次に蒸留水を 30 mL 通しコンディショニングする。
- ② ①-⑬全量をメタノール：水 (4：6, v/v) で懸濁し、洗い込みながら全量 ODS 固相抽出カラムに供す。
- ③ 蒸留水 30 mL で洗浄する。
- ④ 固相抽出カラムに空気を通し、カラム内の溶媒を出す。
- ⑤ アセトニトリル 60 mL で洗浄する。
- ⑤ アセトニトリル：蒸留水 (8:2, v/v) 60 mL で溶出する。
- ⑥ メタノール：蒸留水 (9:1, v/v) 60 mL で溶出する。

⑦ メタノール 60 mL で溶出する。

⑤から⑦をそれぞれエバポレートして、メタノールで定容・希釈した試料を LC/MS/MS 分析し、マイトトキシンを含む画分を確認する。

※概ね⑤から⑥の画分にアザスピロ酸-2 (AZA2) が溶出する。溶出が不十分だった場合は⑦に AZA2 が溶出する。AZA2 が多く含まれる画分を合わせて乾固し、次のカーボングラファイトによる精製を行う。

2- (2) グラファイトカーボンによる精製 (例：メルク, グラファイトカーボン)

- ① グラファイトカーボン粉末(約 50 g)をエタノール 100 mL で 2 回デカンテーションして微粉末を除去し、エタノール 50 mL に懸濁して用いる。
- ② C18 固相抽出の AZA2 画分 2- (1) -⑦全量にグラファイトカーボンのエタノール懸濁物を 10 mL 加え攪拌する。
- ③ 遠心分離 (1000 ×g 以上) し、上清を分取する。
- ④ 遠心分離残渣にエタノールを 5 mL 加えて攪拌する。
- ⑤ 遠心分離 (1000 ×g 以上) し、上清を分取し、③と合わせる。
- ⑥ ④-⑤を再度行い、収集したエタノール溶液をエバポレートする。
- ⑦ メタノールで定容・希釈した試料をフロリジル固相抽出カラムによる精製に用いる。

2- (3) フロリジル固相抽出カラムによる精製 (例：GL サイエンス, InertSep FL)

- ① フロリジル固相抽出カラム (担体量：200 mg) にメタノール 3 mL 酢酸エチル 3 mL を通し、コンディショニングする。
- ② エバポレーターで乾固した 2- (2) -⑦全量を、酢酸エチルで合計 5 mL 程度洗いこみながら全てフロリジル固相抽出カラムに供す。
- ③ 酢酸エチル 6 mL でカラムを洗浄する。
- ④ イソプロパノール 6 mL で洗浄する。
- ⑤ メタノール 6 mL で溶出する。
- ⑥ 各フラクションは乾固し、メタノールで定容・希釈した試料を LC/MS/MS 分析する。

※AZA2 はメタノール画分にほとんど溶出し、次の逆相 HPLC 精製に用いる。

2-(4) 逆相 HPLC カラムによる液体クロマトグラフィー精製(例：関東化学, Mightysil RP-18GP)

フロリジル固相抽出カラムによる精製を行った画分を液体クロマトグラフィーで精製する。精製条件を以下に示す。

カラム：Mightysil RP 18 GP ϕ 4.6 mm $\times$ 250 mm

カラム温度：室温

移動相：アセトニトリル：蒸留水 (7:3, v/v), 0.1% ギ酸, 10 mM ギ酸アンモニウム含む

流速：1 mL/min

試料注入：乾固した 2-(3)-⑥全量を、メタノール約 0.5 mL で完全に溶解させた試料を 50 μ L 注入して精製する。

検出器：PDA 検出器 190-400 nm (235 nm をモニタ波長とする。)

フラクションコレクター： ウェイトタイム 1 min
1 tube/3 min

精製時の等高線プロット例を図 1 に示す。*保持時間 12-18 分間に AZA2 が溶出する。

各フラクションの LC/MS/MS 分析により、AZA2 を多く含む画分を合わせて次のゲルろ過 HPLC 精製に用いる。

*保持時間は注入ごとに前後するため各フラクションは希釈分析する。

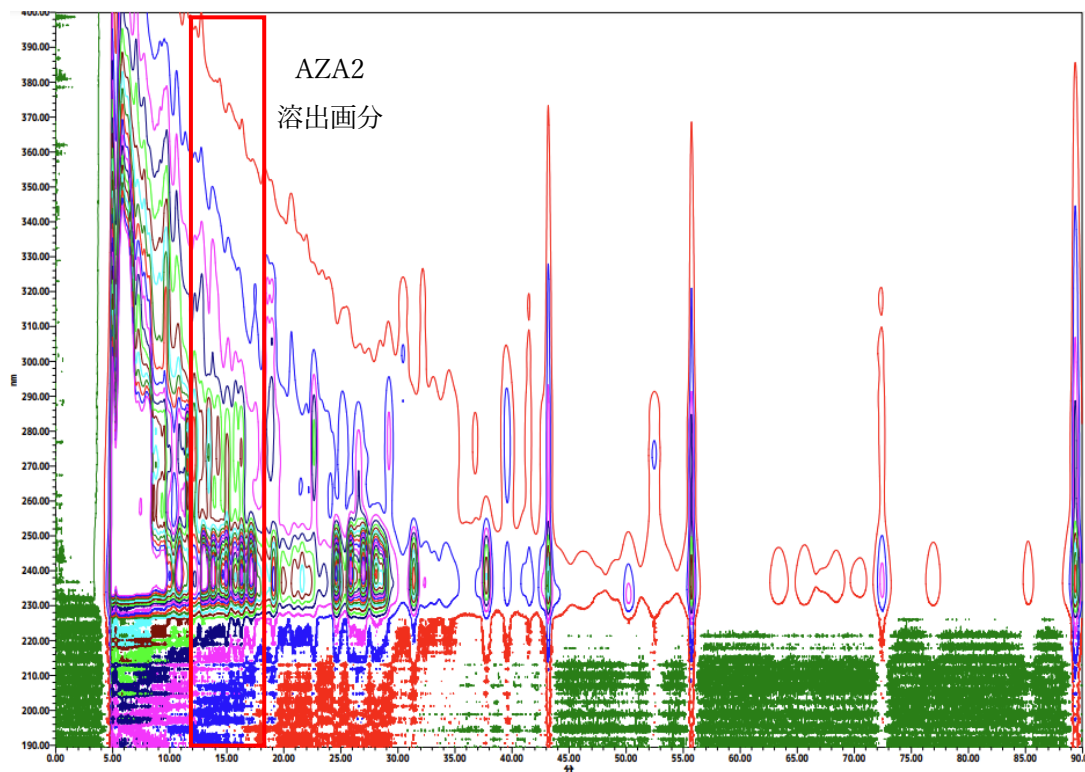


図 1. ゲルろ過クロマトグラフィー (HW-40S) による PDA 等高線プロット

2-（５）ゲルろ過クロマトグラフィー精製（例：Shodex, Asahipak GF-210HQ）

2-（４）逆相 HPLC により分画した AZA2 画分をゲルろ過クロマトグラフィー（HPLC）で精製する。精製条件を以下に示す。

カラム：Asahipak GF-210HQ ϕ 6.0 mm $\times$ 300 mm

カラム温度：室温

移動相：メタノール(0.1% 酢酸を含む)

流速：0.6 mL/min

試料注入：乾固した 2-（４）の AZA2 画分全量を、メタノール約 0.5 mL で完全に溶解した試料を 100 μ L 注入し精製する。

検出器：PDA 検出器 190-400 nm (235 nm をモニタ波長とした。)

精製時の等高線プロット例を図 2 に示す。＊保持時間 10-16 分間に AZA2 が溶出した。

各フラクションの LC/MS/MS 分析により、AZA2 を多く含む画分を合わせて次のイオン交換基を含む逆相 HPLC による精製に用いる。

※保持時間は注入ごとに前後するため各フラクションは希釈分析する

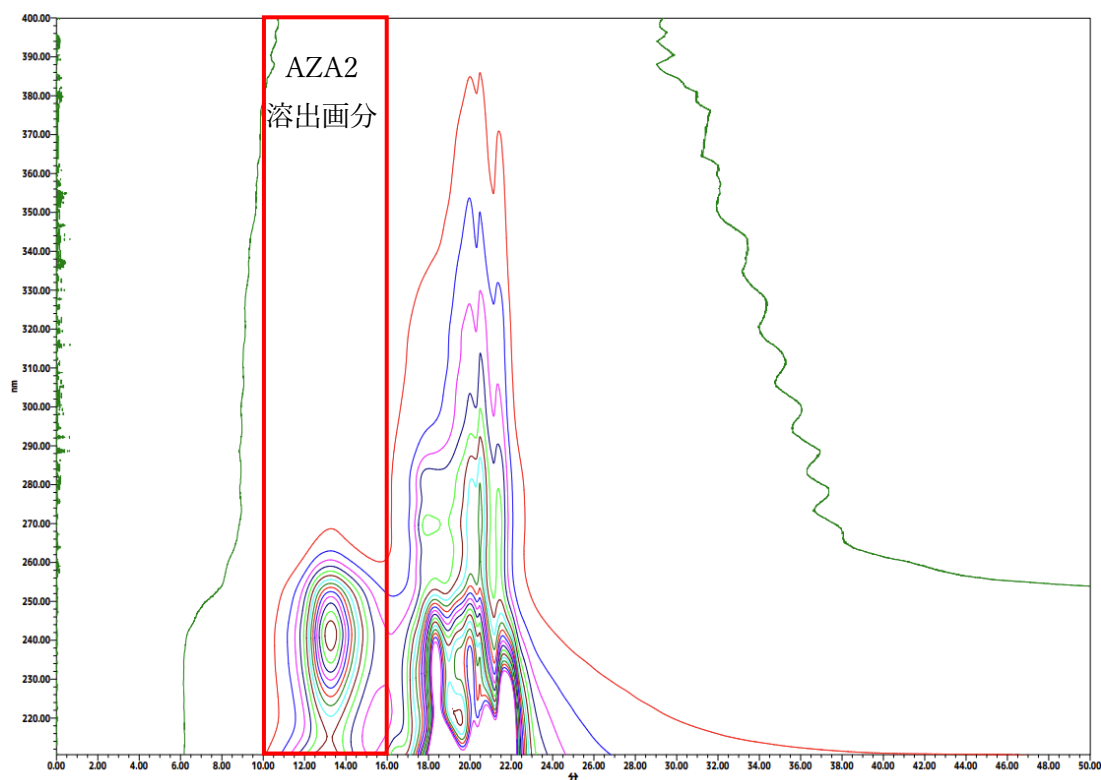


図 2. ゲルろ過カラム（Asahipak GF-210HQ）による PDA 等高線プロット

2 - (6) イオン交換基を含む逆相 HPLC 精製 (例: Imtakt, Scherzo SM-C18)

カラム: Scherzo SM-C18 ϕ 6.0 mm $\times$ 250 mm

カラム温度: 室温

移動相: アセトニトリル: 蒸留水 (6:4, v/v), 0.05% ギ酸, 10 mM ギ酸アンモニウム
含む

流速: 1 mL/min

試料注入: 乾固した 2- (5) の AZA2 画分を、メタノール約 0.3 mL で完全に溶解
した試料を 60 μ L ずつ注入し精製する。

検出器: PDA 検出器 190-400 nm (200 nm, 235 nm をモニタ波長とする。)

精製時の等高線プロット例を図 3 に示し、UV 波長 235 nm のクロマトグラムを図 4 に、
UV 波長 200 nm のクロマトグラムを図 5 に示す。高濃度の AZA2 は UV 波長 200 nm のク
ロマトグラム図 5 において約 23~37 分間に溶出する。UV 波長 235 nm (図 4) の約 25 分
に検出されるピークと分離する必要があるため、UV 波長 235 nm のクロマトグラムをモニ
タリングし、UV 波長 235 nm のピークが溶出後から AZA2 のピークを分取することで、高
純度な AZA2 が得られる。

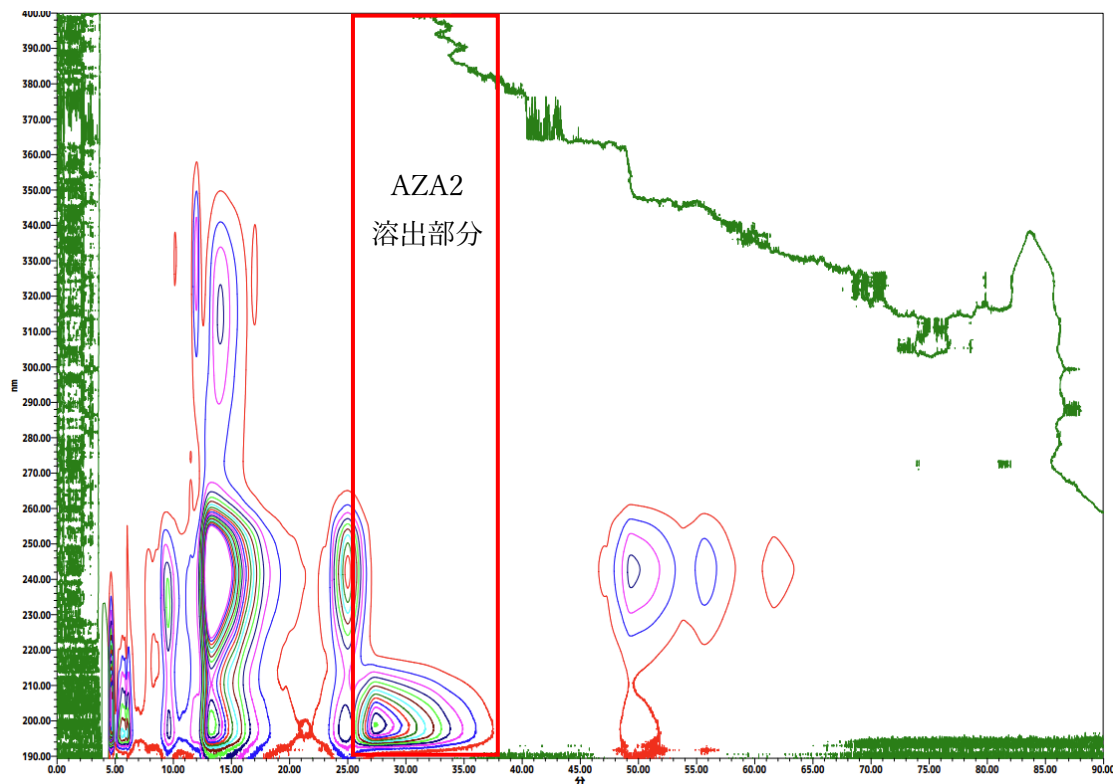


図 3. イオン交換機を含む逆相 HPLC カラム (Scherzo SM-C18) による PDA 等高線プロット

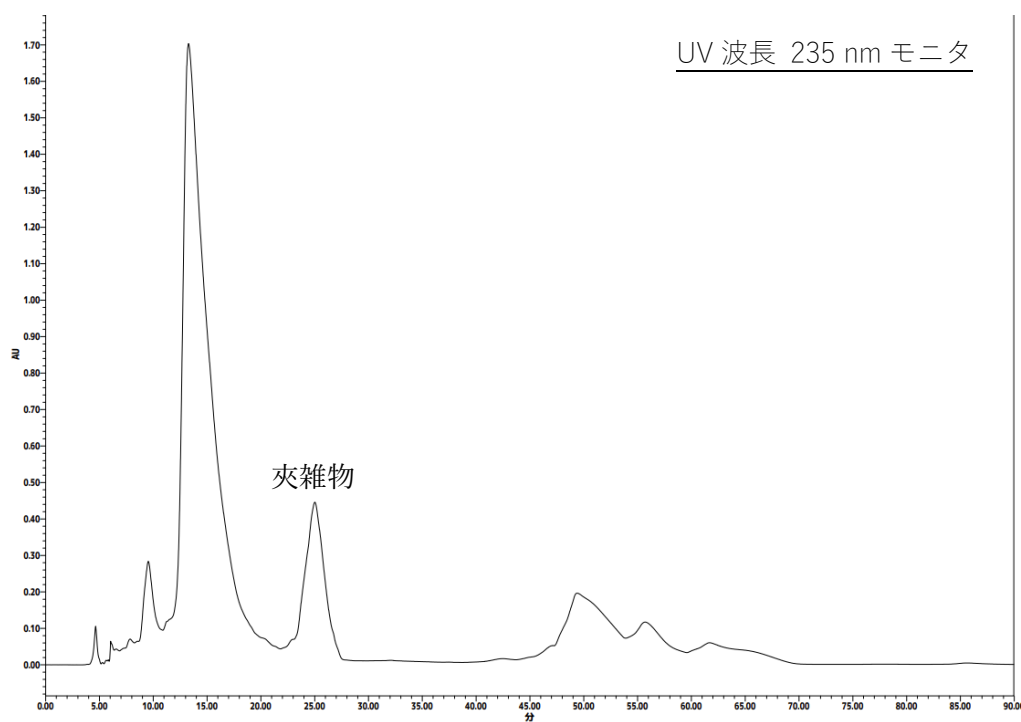


図 4. イオン交換機を含む逆相 HPLC カラム (Scherzo SM-C18) による精製クロマトグラム (235 nm)

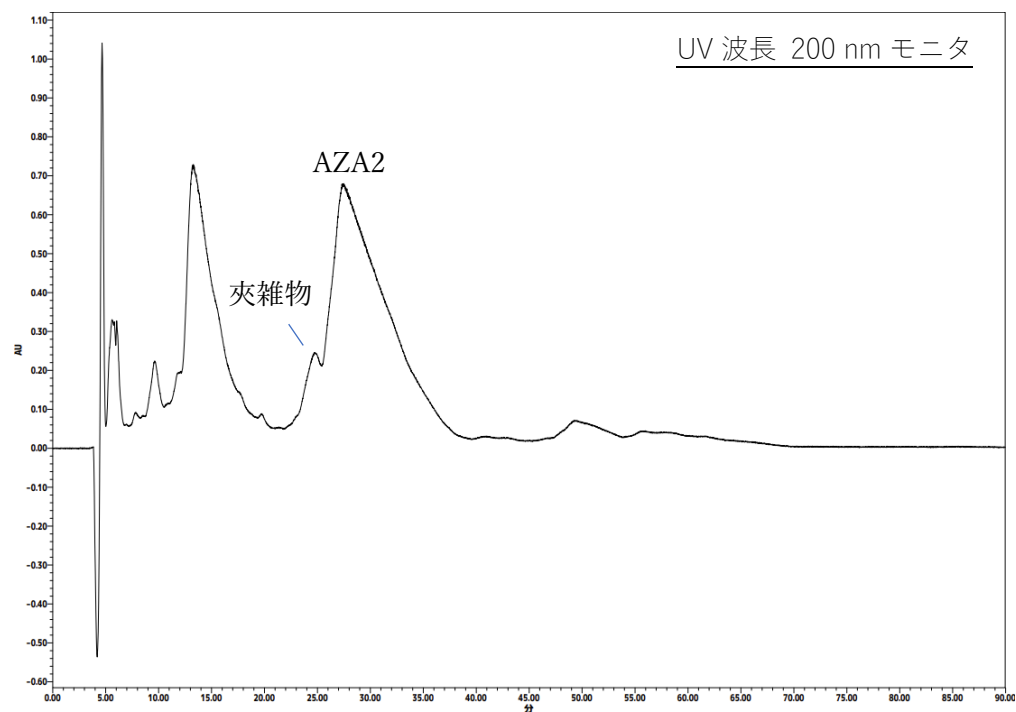


図 5. イオン交換機を含む逆相 HPLC カラム (Scherzo SM-C18) による精製クロマトグラム (200 nm)

精製した AZA2 画分はエバポレーターでアセトニトリルを除去し、メタノール 5 mL および蒸留水 5mL でコンディショニングした ODS 固相抽出 (Sep-Pak C18 Plus, 360 mg) に精製した AZA2 をメタノール：蒸留水 (4：6, v/v) で洗い込みながら全量供し、蒸留水 5 mL でギ酸およびギ酸アンモニウムを除去したのちにメタノール：蒸留水 (9:1, v/v) 10 mL で AZA2 を溶出し、エバポレーターで乾固したものが AZA2 精製物となる。

AZA2 の各種スペクトルデータ

AZA2 精製物について ^1H NMR および LC/QTOF の測定結果を以下に示す。

^1H NMR 測定条件

機器：Bruker 800 MHz Avance III

溶媒： CD_3OD

※高い純度な AZA2 は重メタノールへの溶解時に結晶状のものが生じる可能性がある。

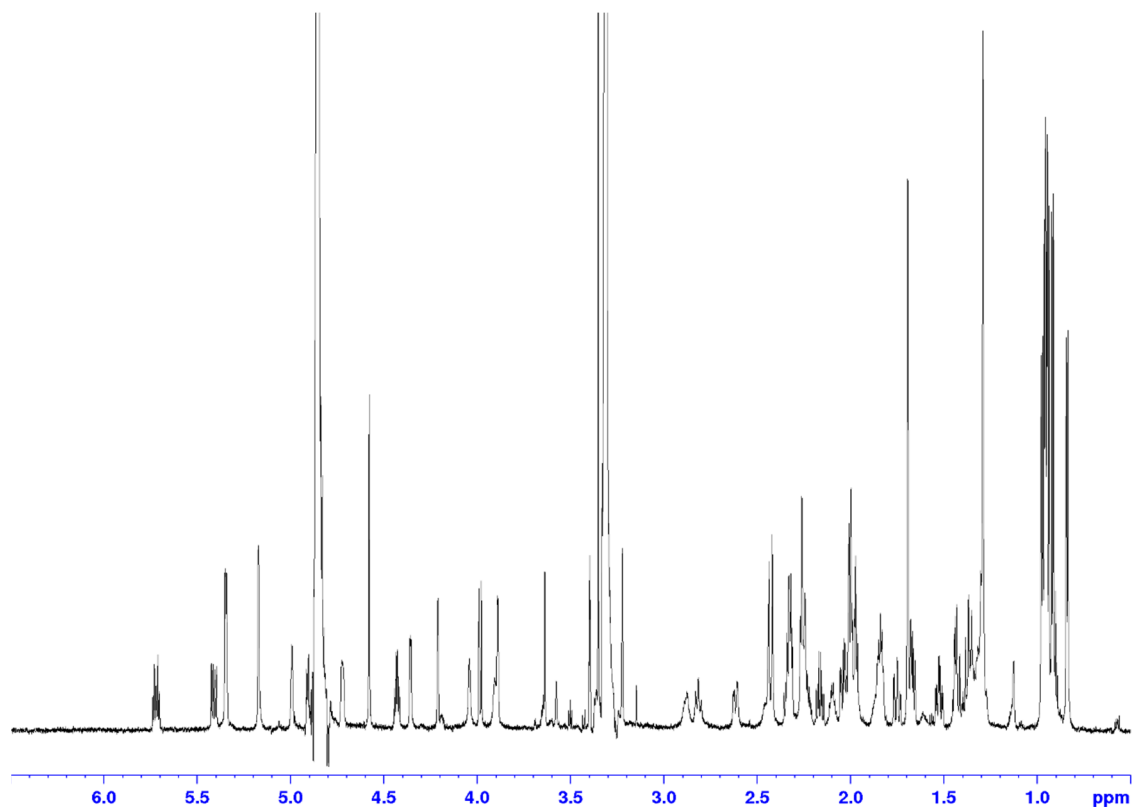


図 6. 精製した AZA2 の ^1H NMR スペクトル

LC /QTOF 測定条件

機器：Bruker MicrOTOF Q II

分析条件

カラム：Mightysil RP 18 GP ϕ 2.0 mm $\times$ 250 mm

カラム温度：30°C

移動相 A：蒸留水, 0.1%ギ酸, 10 mM ギ酸アンモニウム含む

B：アセトニトリル：蒸留水 (95：5, v/v)

A, B ともに 50 mM ギ酸, 2 mM ギ酸アンモニウムを含む

80%B アイソクラティック条件、流量 0.3 mL/min

MS：陽イオンモード, m/z 100-1500, survey scan 分析

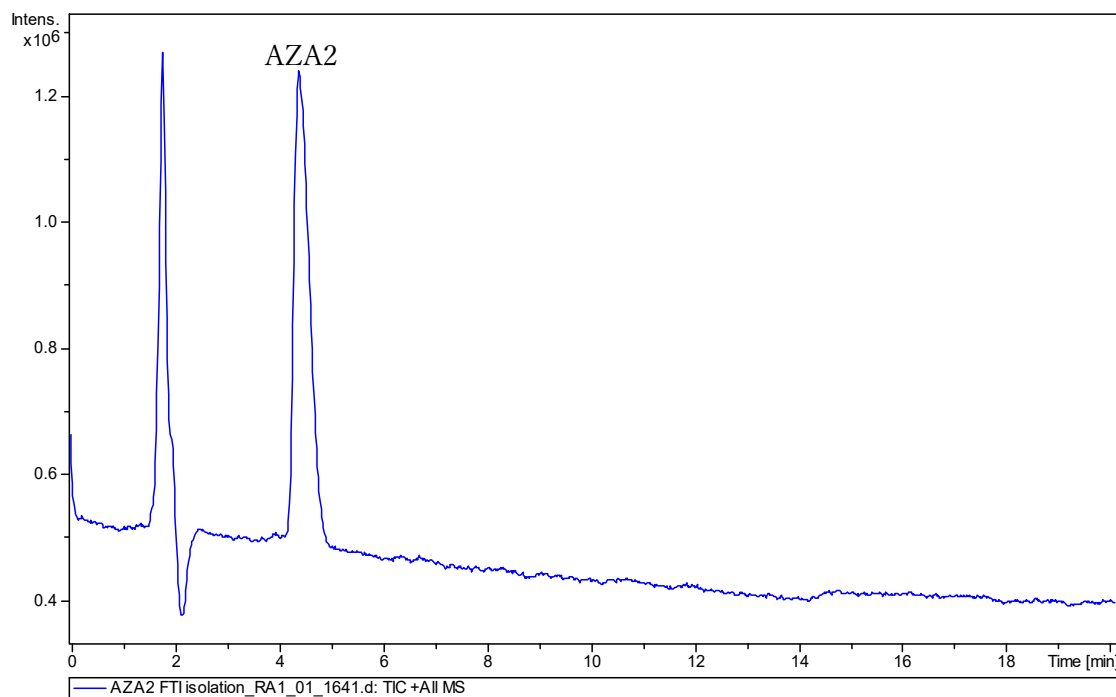


図 7.精製した AZA2 (5 ng 相当注入) の LC/QTOF トータルイオンクロマトグラム

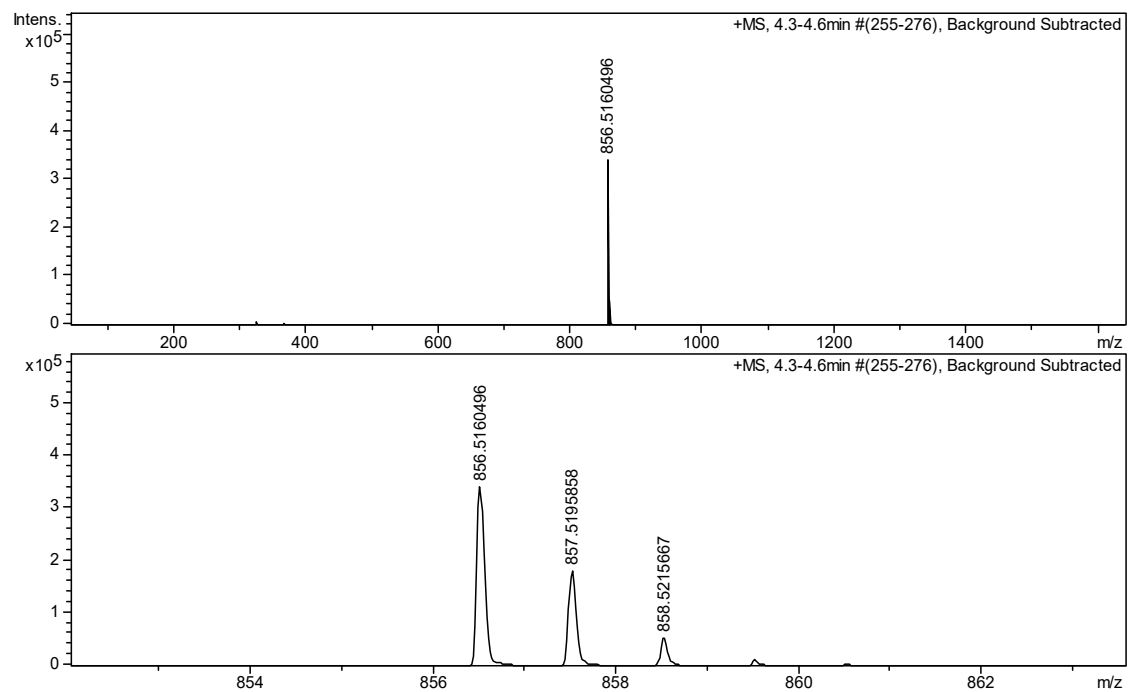


図 8.精製した AZA2 (5 ng 相当注入) の高分解能 MS スペクトル (上段 バックグラウンド減算) および安定同位体比 (下段)

(別添 2)

マイトトキシシン精製標準手順書

原料：*Gambierdiscus australis* 培養藻体 (約 200 g)

抽出操作

1- (1) 溶媒抽出

- ① 凍結・融解した培養藻体試料 200 g に対し等量のアセトニトリルを加える。
- ② 攪拌し超音波槽で約 10 分間超音波処理をする。
- ③ 遠沈管に分注する。
- ④ 遠心分離 (1000 ×g 以上) し上清を凍結可能な容器に収集する。
- ⑤ 遠心分離の残渣にアセトニトリル：蒸留水 (1：1, v/v) を 200 mL 加える。
- ⑥ 攪拌し超音波槽で約 10 分間超音波処理をする。
- ⑦ 遠沈管に分注する。
- ⑧ 遠心分離 (1000 ×g 以上) した上清を 1- (1) -④の凍結可能な容器に収集する。
- ⑨ 冷凍庫 (-20 °C) で冷凍する。
- ⑩ 水層 (下層) と含水アセトニトリル層 (上層) に分離する。
- ⑪ 上層を除去する。
※下層が過冷却により凍結しない場合はピペット等で上層を除く
- ⑫ 下層をエバポレーター用のフラスコに移す。
- ⑬ ロータリーエバポレーター (約 35 °C, 80 hPa) でアセトニトリルを除去する。
- ⑭ アセトニトリルを除去した水層 (約 200 mL) を ODS 固相抽出カラムで抽出する。

1- (2) 固相抽出 (例：Sep-Pak C18 Vac, 5g)

- ① ODS 固相抽出カラム (担体量：5 g) にメタノール 30 mL を通し、次に蒸留水を 30 mL 通しコンディショニングする。
- ② 1- (1) -⑭の水層を蒸留水で洗い込みながら全量 ODS 固相抽出カラムに供す。
- ③ 蒸留水 30 mL で洗浄する。
- ④ メタノール：蒸留水 (6:4, v/v) 60 mL で溶出する。
- ⑤ アセトニトリル：蒸留水 (9:1, v/v) 60 mL で溶出する。
- ⑥ ④および⑤をそれぞれエバポレートして、メタノール：蒸留水 (8:2, v/v) で定容・希釈した試料を LC/MS/MS 分析し、マイトトキシシンを含む画分を確認する。
※概ね④の画分にマイトトキシシンが溶出する。④画分の溶出が不十分だった場合は⑤の画分を合わせてマイトトキシシン精製原料とする。

精製操作

2- (1) Diol 固相抽出カラムによる精製 (例: Sep-Pak diol Plus, 360 mg)

- ① Diol 固相抽出カラム (担体量: 360 mg) にメタノール 5 mL, 蒸留水 5 mL, アセトニトリル: 蒸留水(9:1, v/v) 5 mL を通し、コンディショニングする。
- ② 乾固したマイトトキシシン精製原料 1-(2)-⑥全量をアセトニトリル: 蒸留水(9:1, v/v)で合計 5 mL 程度になるように試料容器を洗い込みながら Diol 固相抽出カラムに供す。
- ③ アセトニトリル: 蒸留水(9:1, v/v) 5 mL で Diol 固相抽出カラムを洗浄する。
- ④ アセトニトリル: 蒸留水(8:2, v/v)で合計 5 mL 程度になるように試料容器を洗い込みながら Diol 固相抽出カラムに供す。
- ⑤ アセトニトリル: 蒸留水(8:2, v/v) 5 mL で Diol 固相抽出カラムから溶出する。
- ⑥ アセトニトリル: 蒸留水(7:3, v/v) 10 mL でカラムから溶出する。
- ⑦ ④+⑤, ⑥をそれぞれエバポレートして定容・希釈した試料を LC/MS/MS 分析し、マイトトキシシンを含む画分を確認する。

※概ね④+⑤の画分にマイトトキシシンが溶出する。④+⑤画分の溶出が不十分だった場合は⑥の画分を合わせて次の固相抽出カラム精製に用いる。

2- (2) Phenyl 固相抽出カラムによる精製 (例: InertSep Ph, 500 mg)

- ① Phenyl 固相抽出カラム (担体量: 500 mg) にメタノール 5 mL, 蒸留水 5 mL を通し、コンディショニングする。
- ② エバポレーターで乾固した Diol 固相抽出カラムの MTX 画分 2-(1)-⑦を蒸留水で合計 5 mL 程度洗いこみながら Phenyl 固相抽出カラムに供す。
- ③ 蒸留水 5 mL をカラムに供す。
- ④ ②+③を合わせてエバポレートして定容・希釈した試料を LC/MS/MS 分析し、マイトトキシシンを含む画分を確認する。

※マイトトキシシンは Phenyl 固相抽出カラムにほとんど吸着しない。回収率が低い場合はアセトニトリル: 蒸留水 (8:2) で Phenyl 固相抽出カラムを洗浄し、LC/MS/MS 分析で確認を行う。

2- (3) ゲルろ過カラムによる液体クロマトグラフィー精製(例：HW-40S)

固相抽出カラムによる精製を行った画分を液体クロマトグラフィーで精製する。精製条件を以下に示す。

カラム：Toyopearl HW-40S ϕ 10 mm $\times$ 500 mm

カラム温度：室温

移動相：メタノール：蒸留水 (1:1, v/v)

流速：0.6 mL/min

試料注入：2- (2) -④全量を乾固し、メタノール：蒸留水(1:1, v/v) 約 0.5 mL で完全に溶解した試料を 100 μ L ずつ注入し精製する。

検出器：PDA 検出器 190-400 nm (235 nm をモニタ波長とする。)

フラクションコレクター： ウェイトタイム 1 min

1 tube/3 min

精製時のクロマトグラム例を図 1 に示す。各フラクションの LC/MS/MS 分析により、MTX を多く含む画分を合わせて次の逆相 HPLC 精製に用いる。

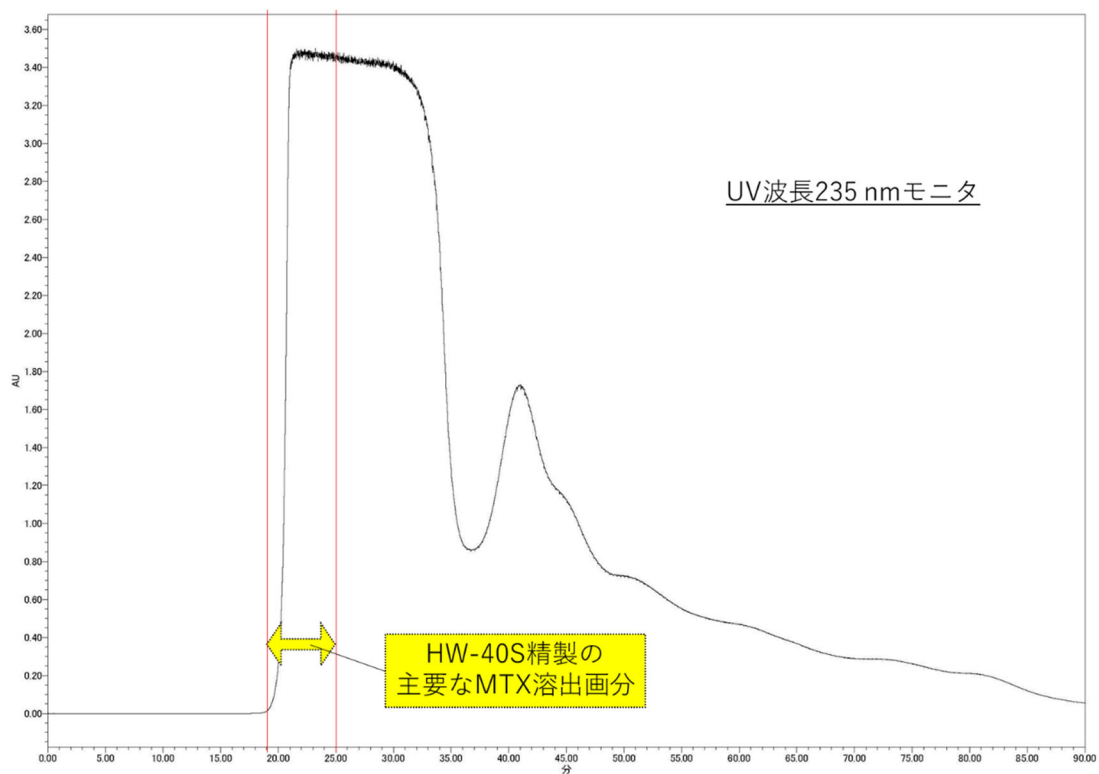


図 1. ゲルろ過クロマトグラフィー (HW-40S) による精製クロマトグラム

2- (4) 逆相分配カラムによる高速液体クロマトグラフィー精製 (例: Mightysil RP-18GP)
ゲルろ過カラムによる精製を行った画分を逆相分配カラムによる高速液体クロマト
グラフィー (HPLC) で精製する。精製条件を以下に示す。

カラム: Mightysil RP-18GP ϕ 4.6 mm $\times$ 250 mm

カラム温度: 室温

移動相: アセトニトリル: 蒸留水 (6:4, v/v) 10 mM 酢酸アンモニウムを含む

流速: 1.0 mL/min

試料注入: HW-40S のマイトトキシシン画分 2-(3)全量を乾固し、メタノール: 蒸留水(8:2, v/v) 0.2mL で完全に溶解した試料を 50 μ L ずつ注入し精製する。

検出器: PDA 検出器 190-400 nm (235 nm をモニタ波長とする。)

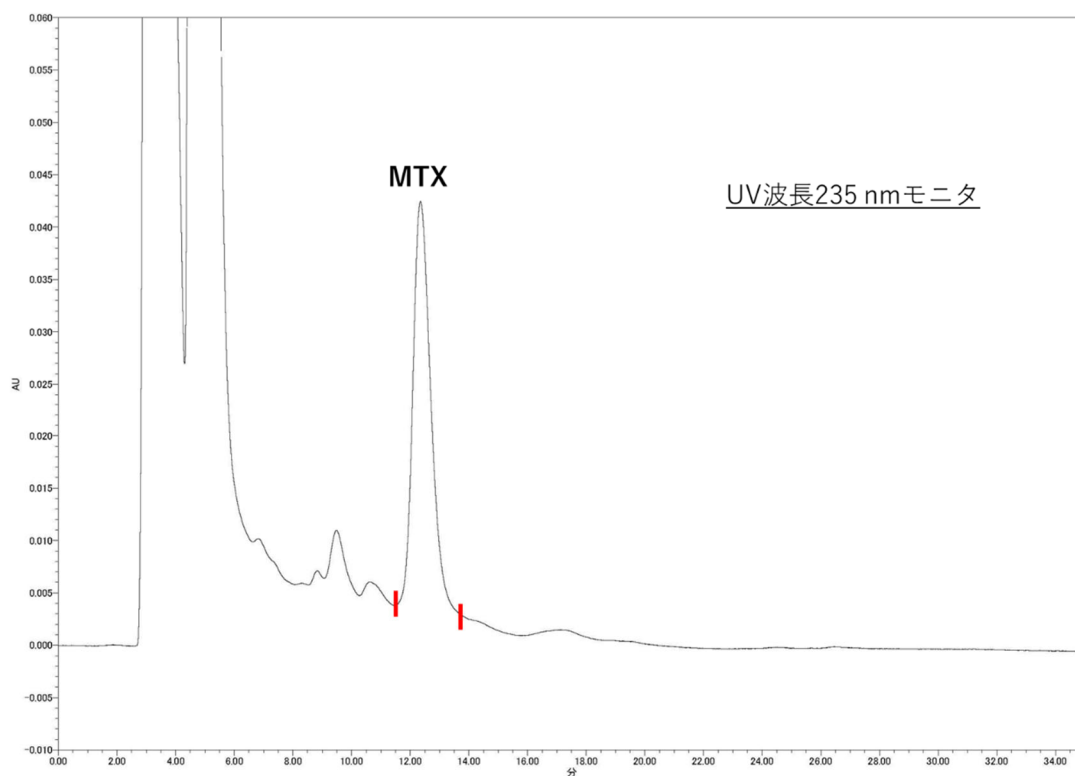


図 2. 逆相 HPLC による精製クロマトグラム

精製した MTX 画分はエバポレーターでアセトニトリルを除去し、メタノール 5 mL および蒸留水 5 mL でコンディショニングした ODS 固相抽出 (Sep-Pak C18 Plus, 360 mg) に精製した MTX を蒸留水で洗い込みながら全量を供し、蒸留水 5 mL で酢酸アンモニウムを除去したのちにメタノール: 蒸留水 (8:2, v/v) 10 mL で MTX を溶出し、エバポレーターで乾固したものが MTX 精製物となる。

MTX 精製物の各種測定データ

MTX 精製物について LC/PDA/QTOF 分析ならびに ^1H NMR の測定結果を以下に示す。

^1H NMR 測定条件

機器：Bruker 800 MHz AvanceIII

溶媒： $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ (19/1, v/v)

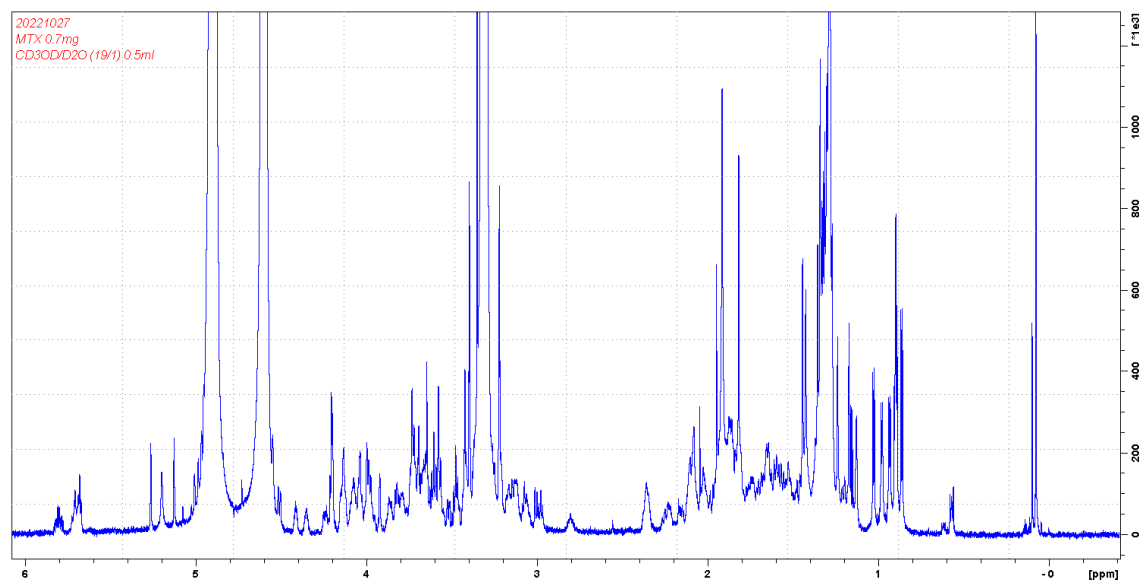


図 3. 精製した MTX の ^1H -NMR スペクトル

LC/PDA/QTOF

機器：Bruker MicrOTOF Q II

分析条件

カラム：Mightysil RP 18 GP ϕ 2.0 mm $\times$ 250 mm

カラム温度：30°C

移動相 A：蒸留水, 0.1%ギ酸, 10 mM ギ酸アンモニウム含む

B：アセトニトリル：蒸留水 (95：5, v/v)

A, B とともに 50 mM ギ酸, 2 mM ギ酸アンモニウムを含む

65%B アイソクラティック条件、流量 0.3 mL/min

MS：陰イオンモード, m/z 300-3000, survey scan 分析

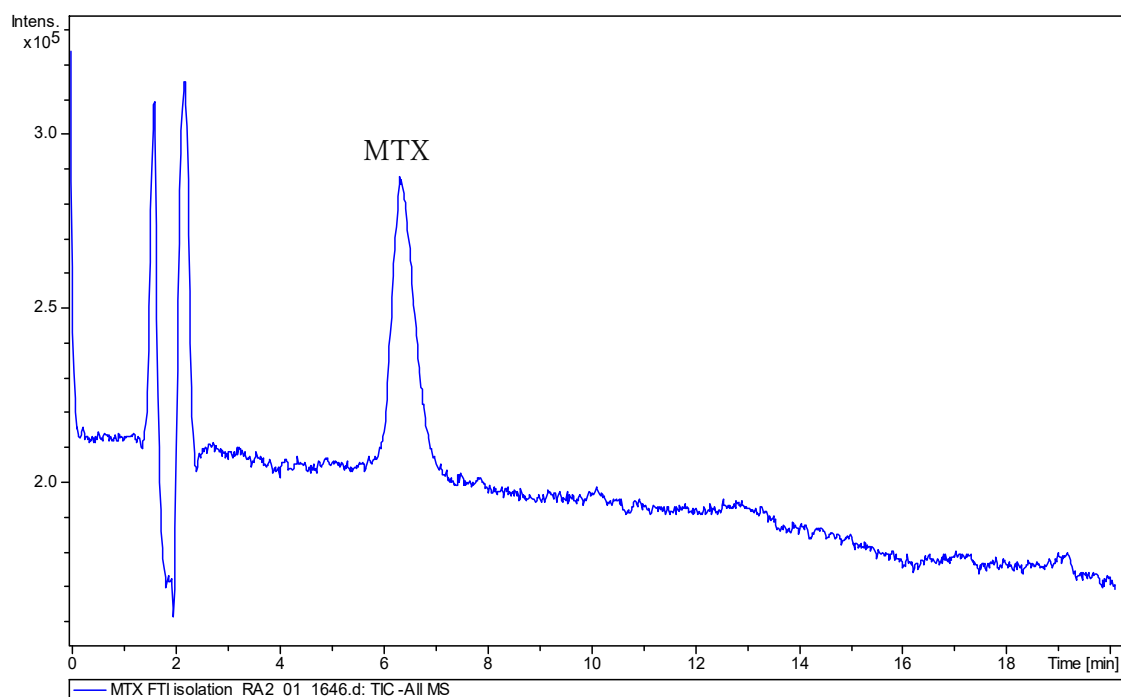


図 7.精製した MTX (50 ng 相当注入) の LC/QTOF トータルイオンクロマトグラム

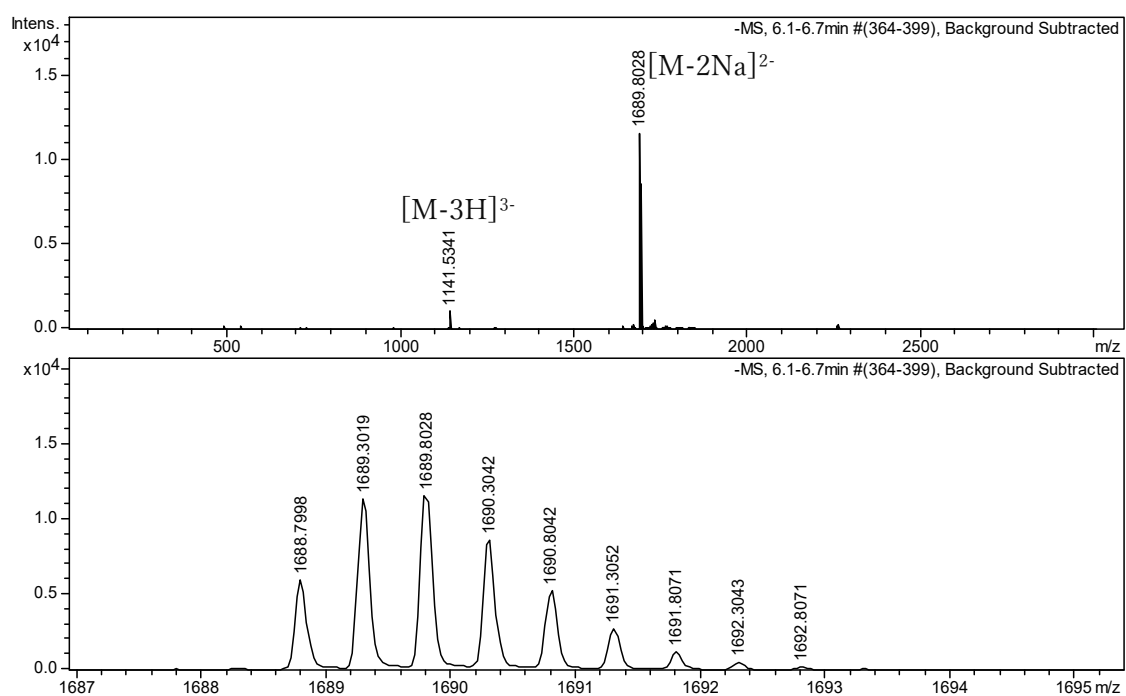


図 8.精製した MTX (50 ng 相当注入) の高分解能 MS スペクトル(バックグラウンド減算, 上段)および安定同位体比 (下段)