

高分子電解質の添加がカキ試料からの ドウモイ酸抽出に及ぼす効果について

The Effect of Polyelectrolyte Addition on the Extraction of Domoic Acid from Oysters

橋本 諭 加賀 岳朗 青柳 直樹

Satoshi HASHIMOTO, Takero KAGA and Naoki AOYANAGI

Key words : polyelectrolyte (高分子電解質) ; extraction (抽出) ; domoic acid (ドウモイ酸) ; oyster (カキ)

緒 言

生物学的試験法による急性毒性スクリーニングで重要な工程は抽出である。試験に際し毒性物質の化学的性質について情報がないことが多く、試料から幅広く物質を抽出する必要がある。試料から親水性有機化合物を抽出する場合、極性有機溶媒または含水極性有機溶媒の使用をまず考える。しかし、イオン基を有し、水溶性が高い有機化合物は有機溶媒の比率が高い抽出溶媒には溶解しにくいことがあり、水を主体とした溶媒（水系溶媒）による抽出を別に準備しておく必要があると我々は考えている。

しかし、水系溶媒による抽出には難点がある。それは抽出時に懸濁が発生しやすいことである。また、水のみでは試料と有機化合物の間の相互作用を切断する力が弱い酸やアルカリ、無機塩などが添加されるが、生物学的試験法での使用を前提とするとそのような添加は極力避けたい。

我々は抽出助剤として高分子電解質（PE）を添加することにより、そのような点が改善できるのではないかと考えている。高分子電解質（PE）とはイオン基を有する単量体で構成される重合体である。その特徴的な構造から様々な用途で利用されており、条件により親水性コロイド間の架橋となるため凝集剤としても使用されている^{1, 2, 3)}。水系溶媒による抽出液も一種の親水性コロイド溶液とみなせるため、PEの添加により懸濁状態の改善が期待できる。

さらに吸着物の離脱効果も期待できる。回収されにくい水溶性有機化合物はコロイド界面の対イオン固定層⁴⁾で試料のイオン基に吸着していると我々は予測している。PEが強酸や強塩基のイオン基を有する場合、それらの基は液性によらず解離すると考えられる。そのようなPEを、近傍の対イオンの影響を回避しつつ、吸着物に接近させることができれば、価数の小さい吸着物が離脱する⁵⁾可能性がある。

また、PEの中には上水処理や食品加工に使われる^{2, 3)}ものもあり、そのようなPEを選択すれば生物学的試験に与える影響も少ないと考えられる。

しかし、これまでにPEを試料から水溶性有機化合物を抽出するための助剤として利用した報告はなかった。そこで我々はPEの抽出助剤としての実用性を検証することにした。まず、強酸性または強塩基性イオン基型PEの水系溶媒への添加による抽出液の澄清化及び回収率向上の効果の有無について、カキ試料からのドウモイ酸抽出をモデルとして検討した。その結果、効果が確認できたので報告する。

方 法

1. 試料

水を抽出溶媒として抽出した場合に強い懸濁状態を生じるカキを検討用試料として選択した。カキ試料（ホモジネート）1.00 gずつをポリプロピレン製遠沈管に秤量し、実験まで-70℃で冷凍保管した。

2. 試薬等

強塩基性イオン基を有するPEとしてN/400ポリ（塩化ジアリルジメチルアンモニウム）（以降DADMAC）溶液を、強酸性イオン基を有するPEとしてN/400ポリビニル硫酸カリウム（以降PVSK）溶液を用いた。いずれも富士フィルム和光純薬（株）製のコロイド滴定用試薬であった。トリイジンブルー指示薬溶液も富士フィルム和光純薬（株）製のコロイド滴定用試薬を用いた。高速液体クロマトグラフィーで使用したアセトニトリル、トリフルオロ酢酸は富士フィルム和光純薬（株）製のHPLC測定用を用いた。

ドウモイ酸（純度95%以上、HPLC確認）はTocris Bioscience Co. Ltd. 製を用いた。

水は純水製造装置Millipore Corp. 製Simplicity UVを用いて実験室で水道水から精製した脱イオン水を用いた。

シリンジフィルターはアズワン(株)製 AS FIL 013022NLCU-SEPTFE (親水性 PTFE、孔径 0.22 μm) を用いた。

ドウモイ酸標準液 200 $\mu\text{g/mL}$ は次のように調製した。内容量 1 mg のドウモイ酸試薬バイアル瓶に水：アセトニトリル = 9：1 を直接入れ、内容物を溶解させた後に溶液及びバイアル内洗浄液を合わせて 5 mL のメスフラスコに移し、水：アセトニトリル = 9：1 で定容した。

吸光度測定用の抽出溶媒は各 PE を 4~40 mL の範囲で段階的に計量し、それぞれに適宜水を加え 40 mL に定容した。また、ドウモイ酸添加回収実験用の抽出溶媒は DADMAC 溶液 2 mL、6 mL、15 mL または PVSK 溶液 2 mL、6 mL、12 mL を計量し、それぞれ適宜水を加えて 15 mL に定容した。

3. 装置

紫外可視吸光検出器付き高速液体クロマトグラフは(株)日立製作所製 L7000 シリーズを用いた。遠心機はエッペンドルフ・ハイマック・テクノロジー(株)製 CF18R を用いた。紫外可視分光光度計は(株)島津製作所製 UV-1800 を用いた。

4. HPLC 測定条件

高速液体クロマトグラフィーの測定条件及び移動相⁶⁾ は表 1 に示した。

5. 吸光度試験液の調製

カキホモジネート 1.00 g に吸光度測定用溶媒 20 mL を加え、1 分間手振りした後、2 分間ボルテックスにかけて振とうした。10 分間室温に静置した後、3,500 $\times$ g で 10 分間遠心した。上層を回収してカキ抽出液(試験液)とした。

6. 吸光度測定

「5. 吸光度試験液の調製」で準備した試験液を分光光度計で測定した。測定波長は「工業用水試験方法 (JIS K 0101)⁷⁾」の透過光及び散乱光濁度の測定に用いられる 660 nm を選択した。測定にはポリメチルメタクリレート製のセミマイクロタイプのディスポーザブル・セルを用いた。測定回数は、液を入れ替えて PVSK は 2 回、DADMAC は 3 回とした。

7. コロイド滴定

正・負コロイドの電荷量をコロイド滴定⁵⁾で測定した。検討の結果、正コロイドの定量手順は次のとおりとした。「6. 吸光度測定」で準備した DADMAC 添加カキ

抽出液上層から 2.0 mL をマイクロピペットで 30 mL ビーカーに量り採り、水 16.0 mL を加え試験液とした。これにトルイジンブルー指示薬溶液を 6 滴加え、液中の正コロイド(遊離 DADMAC と DADMAC が表面に結合した試料を含む)を PVSK で滴定した。正コロイドと PVSK は結合して、凝集・沈殿し、中和点で清澄となる。さらに中和点以降余剰となる PVSK にトルイジンブルーが結合することで呈色が青から赤紫に変化する。ここを終点とした滴下量を中和滴定量とした。測定は各添加量で 3 回ずつ行った。PVSK 溶液と DADMAC 溶液は共に当量濃度 N/400、20℃における Factor が 1.00 であり、等容量の混合で中和沈殿することから、PVSK による中和滴定量をカキ抽出液 2 mL 中に存在する正コロイド電荷量とみなせる(DADMAC 溶液の容量として提示)。一方、DADMAC 滴下における呈色変化は不鮮明で終点判定が難しいため、負コロイド量の測定は逆滴定で行った。これは、PVSK 添加抽出液 2 mL に DADMAC を 3 mL 加えて抽出液中の遊離 PVSK と結合させ、残った DADMAC を PVSK で滴定する手法である。この値から遊離 PVSK 量を算出し、さらにその量を PVSK 添加量から差し引き、抽出時に試料と結合した PVSK 量とした。

8. ドウモイ酸添加回収実験

カキホモジネート 1.00 g にドウモイ酸標準液 200 $\mu\text{g/mL}$ を 100 μL 加え、30 分室温に静置した後、ドウモイ酸回収実験用の PE 添加抽出溶媒各 15 mL を加え、「5. 吸光度試験液の調製」に従い抽出液を準備した。懸濁している場合は抽出液 5 mL を量り採り、添加した PE とは逆電荷の PE 液を少量滴下して手振りで振とうした後、3,500 $\times$ g で 10 分間遠心した。これを液が清澄となるまで繰り返し、一部をシリンジフィルターでろ過した後、HPLC で測定した⁶⁾。逆電荷 PE の添加で生じた希釈は計算で補正した。

結果と考察

1. 抽出液における清澄化効果について

清澄化効果の有無を確認するために抽出液の吸光度を測定した。結果を図 1 に示した。観察は目視でも行った。DADMAC 添加の場合、目視で軽微を含め清澄化効果が認められたのは、抽出溶媒への添加量 2~12.5 mL (吸光

表 1 高速液体クロマトグラフィー条件

カラム	Waters 社製 XBridge BEH C18 Column、4.6 $\times$ 150 mm、粒子径 5 μm
流速	0.7 mL/min
カラム恒温槽温度	40℃
注入量	25 μL
測定波長	242 nm
溶出液	A：0.1% ^{*1} トリフルオロ酢酸水溶液 B：0.1% ^{*1} トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液
溶出条件	低圧グラジエント B10%条件でアイソクラテック溶出
測定時間	23.5 分 ^{*2}

^{*1} % は体積分率を表す

^{*2} DA の保持時間は約 14.5 分

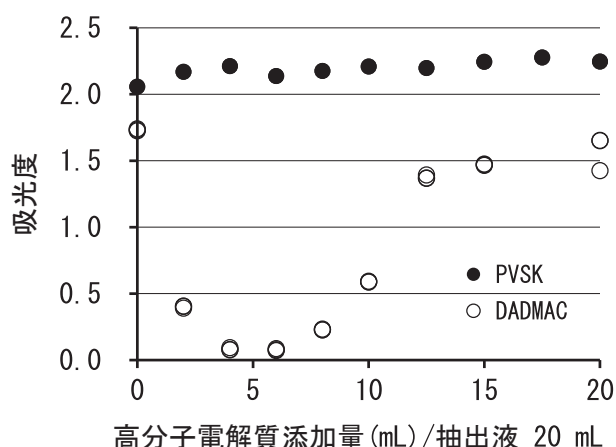


図1 カキ抽出液の吸光度 (660 nm)

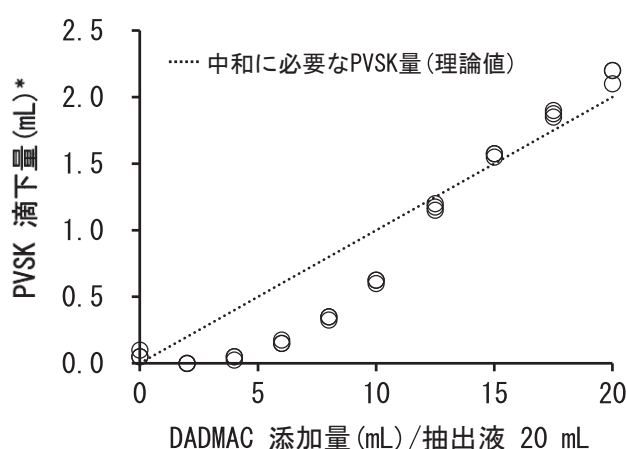


図2 カキ抽出液中 DADMAC の中和に要する PVSX 量

* 抽出液から 2 mL 分取して測定

度 0.07~1.39) であり、抽出液が完全に透明であると感じられたのは添加量 4 mL 及び 6 mL (吸光度 0.07~0.09) のみであった。水のみあるいは添加量 15 mL 以上の抽出液は目視での懸濁状態がいずれも強く、吸光度も高い値 (1.47~1.65) となった。結果より、DADMAC 添加には清澄化効果が認められたがその適正範囲は 4~6 mL の間のみであること、添加量の増加に伴い抽出液の状態が初期の懸濁から一旦清澄へと向かい、再び懸濁へと変化することが分かった。一方、PVSK 添加では清澄化効果は全く観察されなかった。

コロイド分散系への PE 添加による吸着・分散の仕組みについては「ループ・トレイン・テイル形態」で説明される作用モデル^{1,8,9)} が支持されている。分散コロイドに適切な PE を加えると、まずコロイド表面に吸着し、コロイド間の架橋となり、凝集・沈殿させる。さらに吸着する PE が増えると PE の電荷による反発が発生し分散にいたるというものである。正確を期すにはコロイド表面電荷の確認が必要だが、DADMAC 抽出液で観察された吸光度の変化はこのモデルで説明できると考えられた。また同モデルに沿えば、PVSK 添加溶媒における結果は、沈殿に至るほど

の PVSK の試料表面吸着が発生しなかったことを示すものと考えられた。これらの結果から、カキホモジネートの表面は負電荷が多く、正電荷が少ないことが推測された。

上記のように DADMAC と PVSK の添加量増減に対する液の清澄具合の変化を確認することは、試料本来の表面電荷の正負度合 (陰・陽イオン交換基の多少) についての予測をもたらし、抽出条件の設定に寄与するものと考えられた。

2. ドウモイ酸添加回収率の向上効果について

1) コロイド滴定

コロイドの凝集・分散には表面電荷が影響する^{1,8,9)}。添加回収試験における PE 添加量を決定するために、表面電荷の変化を確認する必要がある。コロイド滴定で求めた抽出液中の正・負コロイド量からそれを推測した。図 2 に抽出液中の正コロイド量を PVSK で滴定した結果を示した。DADMAC 添加量と PVSK 滴下量の関係は下記の 3 グループに分けることができた。①水のみ抽出液：中和に要した PVSK 滴下量が極めて少なかった。② DADMAC 添加量 2~12.5 mL：PVSK 滴下量が、添加した DADMAC 全量を中和するのに必要な量 (理論値) を下回った。③ DADMAC の添加量 15 mL 以上：PVSK 滴下量が理論値を上回った。

我々は吸着物質の離脱はイオン交換の結果として生じると考えていた。そのため、回収率を向上させるには試料への PE 吸着量を最大にする必要がある。吸光度測定の結果と同様にコロイド滴定で生じた変化も先のモデル^{1,8,9)} で説明できるものと考えたので、PE 吸着量が最大となるのはモデルで提示された「添加した PE の電荷の働きで試料が完全に分散している」状態であろうと推測した。

①では正コロイドがわずかししか検出されなかったもので、観察された懸濁は試料本来の「負電荷」に起因するものであると考えた。また、②では DADMAC が試料負コロイド表面に吸着して架橋形成し、凝集して共に沈殿することで滴定量が減少したと考えられた。一方で、③は凝集沈殿により系から外れる DADMAC が発生せず、試料は「正電荷」により懸濁していると考えられた。よって、③が PE の試料吸着が飽和し、PE 電荷により分散している状態であると推測された。

吸光度及びコロイド滴定の結果より、今回使用したカキ試料の場合、試料 1.00 g からの抽出液を PE 吸着により分散させるために必要な DADMAC の添加量は 15 mL 以上であると考えられた。この結果をもとに、2~15 mL の範囲で PE 添加量を変化させて、ドウモイ酸添加回収率に生じる変化を観察することにした。

一方、PVSK の添加量を定めるための滴定も試みたが、すべての滴定値が理論値を超え、正確な測定はできなかった。これは逆滴定用に加えた DADMAC が、遊離の PVSK だけではなく、試料由来の負電荷にも吸着したためと考えられた。しかし、吸光度測定の結果から表面の正電荷は負電荷より少ないと考えられたので、PVSK を不足なく吸着させるのに必要な添加量は 15 mL を超えないと推測した。

表2 カキ試料におけるドウモイ酸回収率

抽出液組成 ^{*1}	添加回収率 ^{*2} (%)	回収比 ^{*3}
水	39.7	1
PVSK：水＝2：13	37.7	0.95
PVSK：水＝6：9	46.4	1.17
PVSK：水＝12：3	61.2	1.54
DADMAC：水＝2：13	44.8	1.13
DADMAC：水＝6：9	21.2	0.53
DADMAC	16.1	0.41

^{*1} 抽出液量：試料 1.00 g に対し 15 mL

^{*2} 添加量：濃度 200 µg/mL のドウモイ酸標準液を 100 µL

^{*3} 水抽出における回収率を 1 とする

過剰添加による影響発現を危惧し、PVSK 量は 2～12 mL と少なくした。

2) ドウモイ酸添加回収実験

PE の添加が抽出工程に与える影響を確認するため、カキ試料を用いてドウモイ酸の添加回収実験を行った。調製した抽出液はほぼ懸濁していたが、先のモデル^{1, 8, 9)}に沿って、抽出時に添加した PE とは逆電荷を持つ PE を別途適宜滴下することで、懸濁物を凝集沈殿させることができた。

結果を表 2 に示した。PVSK 添加量とドウモイ酸回収率の間で正の相関が観察された。この結果から、ドウモイ酸の回収率向上には強酸性イオン基型 PE の添加が有効であると考えられた。また解離したドウモイ酸と同符号の電荷を持つ PE の添加でのみ回収率が向上したことから、その主な機構は試料イオン基に吸着したドウモイ酸と PE 強酸性イオン基の間の交換であると推測された。

本研究の結果、強酸・強塩基性交換基を持つ高分子電解

質 PVSK、DADMAC を組み合わせて使用することで抽出液の清澄化や抽出率向上のための助剤として機能することがわかった。適用範囲が狭ければスクリーニングの抽出法として利用できない。今後汎用性の確認が必要である。引き続きカキ試料からの塩基性有機化合物の抽出における DADMAC、PVSK 添加の効果も検証し、さらに他の魚介類試料における効果を確認し、DADMAC、PVSK 抽出法の実用化をめざす。

文 献

- 堀内照夫：水溶性高分子の物理化学的性質。表面技術, **60**(12), 746-753 (2009)
- 野田公彦：用排水処理用水溶性高分子。CMC テクニカルライブラリー 008 水溶性高分子の開発技術, シーエムシー出版, 東京, 1999, pp.132-148
- 徳安 健：食品産業におけるキチン・キトサンの高度利用。食科工誌, **46**(5), 356-360 (1999)
- 橋田紳乃介：コロイド粒子の分散性評価 ゼータ電位測定的基础。日本接着学会誌, **55**(7), 266-270 (2019)
- 千手諒一：コロイド滴定法。高分子, **22**(7), 407-411 (1973)
- 橋本 諭, 細川 葵, 上野健一：産卵期ホタテガイ試料中のドウモイ酸定量法。道衛研所報, **71**, 49-52 (2021)
- 日本産業標準調査会ホームページ：JIS 検索, <https://www.jisc.go.jp/app/jis/general/GnrJISSearch.html> (確認：2025 年 5 月 21 日)
- 高橋 彰：固体表面への高分子の吸着。表面科学, **10**(10), 758-764 (1989)
- 角井寿雄：高分子分散剤による液中微粒子の分散制御とその応用。粉砕, **48**, 46-55 (2004)