

生椎茸中のプレビタミンD₂およびビタミンD₂の同定

高村一知 星野浩子 叶多謙蔵

Identification of Pre-vitamin D₂ and Vitamin D₂ in Raw Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes*)

KAZUNORI TAKAMURA, HIROKO HOSHINO and KENZO KANOHTA

Pre-vitamin D₂ (pre-D₂) and vitamin D₂ (D₂) in raw shiitake mushroom were identified by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) with modified plasmaspay.

1. Pre-D₂ and D₂ in raw shiitake mushroom were separated by LC.
2. Pre-D₂ was confirmed parent ion (m/z 397 [M+H]⁺) to scan number 259 of total ion chromatogram.
3. D₂ was confirmed parent ion (m/z 397 [M+H]⁺) to scan number 296 of total ion chromatogram.
4. We have succeeded in obtaining mass spectra of pre-D₂ and D₂ that does not suffer from thermal ring closure.

椎茸中にはプロビタミンD₂であるエルゴステロール (以下Ergと略す) が存在する。Ergは紫外線照射反応によって9,10位間の開環が起こり、プレ-ビタミンD₂ (以下プレ-D₂と略す) となり、このプレ-D₂は加熱することによりビタミンD₂ (以下D₂と略す) になる。

市販されている椎茸には生椎茸と干し椎茸があり、後者は熱風乾燥により商品化されているのがほとんどで、そのためにプレ-D₂が存在していても熱異性化によりD₂に変換されている。これに対して、生椎茸は加熱していないので、プレ-D₂とD₂の両物質が存在することが示唆される。

竹内³⁾らはガスクロマトグラフ質量分析計 (以下GC-MSと略す) を用いて、生椎茸中のプレ-D₂の同定を行っている。しかし、D₂関連物質をGC-MSで同定するのは適切な方

法とは考えがたい。なぜならGC-MSでプレ-D₂を分析すると熱分解する。つまりプレ-D₂は、熱分解してピロビタミンD₂とイソピロビタミンD₂の熱分解物質になる。竹内ら³⁾はこの熱分解物質を分析することにより、プレ-D₂を同定したと報告しているが、適切でない確認方法と考えられる。さらにこの同定方法には大きな問題点がある。それはD₂も熱分解して、プレ-D₂と同じ熱分解物質になるからである。試料中にプレ-D₂とD₂が共存する場合の同定手段としては不適切な方法であり、その結果も信頼性に欠ける。

そこで著者らはプレ-D₂およびD₂が試料中に共存する時、熱分解しない状態で同定できないかと考え、前報²⁾のサーモスプレー方式の高速液体クロマトグラフ質量分析計 (以下LC-MSと略す) を改良した、プラズマスプレー方式のLC-MSで、プレ-D₂およびD₂を

Key words: pre-vitamin D₂, pre-ergocalciferol, vitamin D₂, ergocalciferol, raw shiitake mushroom, liquid chromatography-mass spectrometry, identification

分離，同定したので報告する。

実験方法

1. 試料

生椎茸は山梨県富士吉田市外二ヶ村恩賜県有財産保護組合で栽培されたものを使用した。生椎茸はビニールハウス内ではだ木栽培されたものを用いた。収穫時期は平成5年2月～3月である。

2. 装置

LC-MS装置の高速液体クロマトグラフ（以下HPLCと略す）はジャスコインターナショナル社製の875型で，カラムはLiChrosorb RP-18（150mm×4.5mm i.d.）を取り付け，移動相はアセトニトリル（溶液流量0.80ml/min）を用いた。また質量分析装置（以下MSと略す）はVG社製ZAB-2SEQを用いた。このLC-MS装置のインターフェイス部は既存のものとは異なり，ヒューズド・シリカ内管とステンレス・キャピラリー外管からなる同軸2重管を用いた¹⁾。これはMSのイオン源部で溶解液のイオン化率を安定化させるための改良をほどこしたものである。また，プレ-D₂およびD₂分取用HPLC装置は，日本精密科学社製でカラムはLiChrosorb RP-18（250mm×7.5mm i.d.），移動相にアセトニトリル・メタノール（1：1）を用いた。

3. 操作

竹内ら³⁾のプレ-D₂抽出法を参考に行った。生椎茸は全体1kgを用い1回の処理量は50gとした。生椎茸50gを細切しオスター社製のブレンダーに入れ，冷ジクロロメタン・メタノール（1：1）混液200mlを加えて3分間ホモジナイズし，濾紙ろ過した。全ろ液に少量の蒸留水を加え二層に分離し，下層のジクロロメタン層を取り，40℃以下で減圧留去後，10mlのヘキサンを加えて-20℃で一夜放置した。沈殿物以外のヘキサン層を取り，減圧留去後，前報²⁾の通り分取用HPLCでプレ-D₂およびD₂画分を分取して試験溶液とした。この試験溶液1μl（D₂濃度2μg）をLC-MS装置に注入して分析を行った。

MSの操作条件はプローブ部温度280℃，イオン源部温度220℃，プラズマプレーモード印加電圧6KV，分解能4000で行った。MSデータのスキャン条件は3秒/decade，待ち時間1秒であった。

実験結果および考察

1. HPLCによる生椎茸中のプレ-D₂およびD₂の分離

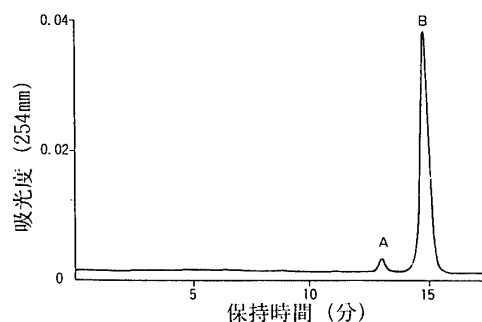


Fig. 1. 生椎茸中のプレビタミンD₂およびビタミンD₂の高速液体クロマトグラフ

カラム:LiChrosorb RP-18(150mm×4.5mm i.d.)
移動相:アセトニトリル(溶液流量 0.8ml/min)
検出器:測定波長254nm

Fig. 1は生椎茸から得られた試験溶液をLC-MS装置に取り付けた逆相型カラムLiChrosorb RP-18で分離したクロマトグラムである。保持時間13.3分のピークAにプレ-D₂画分，保持時間15分のピークBにD₂画分と思われる良好なクロマトグラムが得られた。保持時間13.3分のプレ-D₂と思われる物質の濃度が低いのは，試料の生椎茸がビニールハウス内で栽培されたために，プロビタミンD₂であるErgに日光中の紫外線がほとんど照射されなかったためと考えられる。

2. LC-MSによる生椎茸中のプレ-D₂およびD₂の同定

試験溶液をLC-MS分析した結果をFig. 2，Fig. 3，およびFig. 4に示す。Fig. 2はMSのトータルイオンクロマトグラムで，スキャンナンバー259がFig. 1のHPLCクロマトグラムAに，スキャンナンバー296がBに相当する。Fig. 3はスキャンナンバー259の質量スペクトルで，m/z397 [M+H]⁺に親イオンが認められた。また，Fig. 4はスキャンナンバー

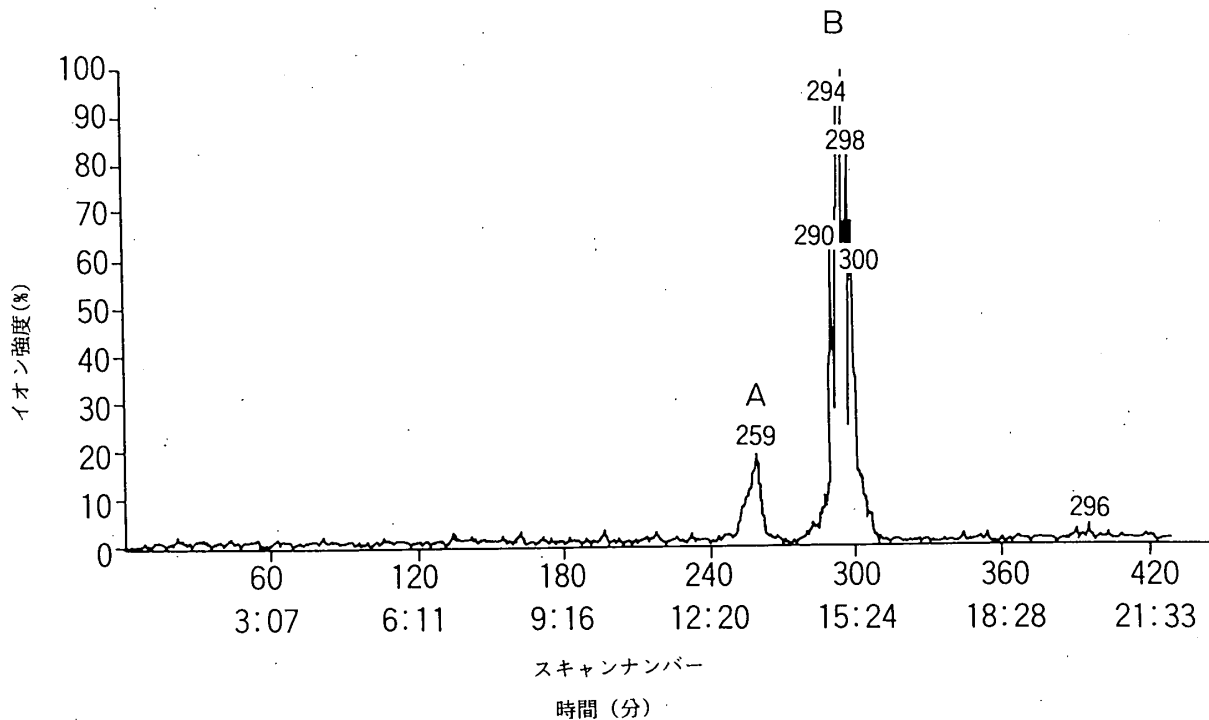


Fig. 2. LC-MSのトータルイオンクロマトグラム

スキャン条件：3sec/decade, 待ち時間1秒

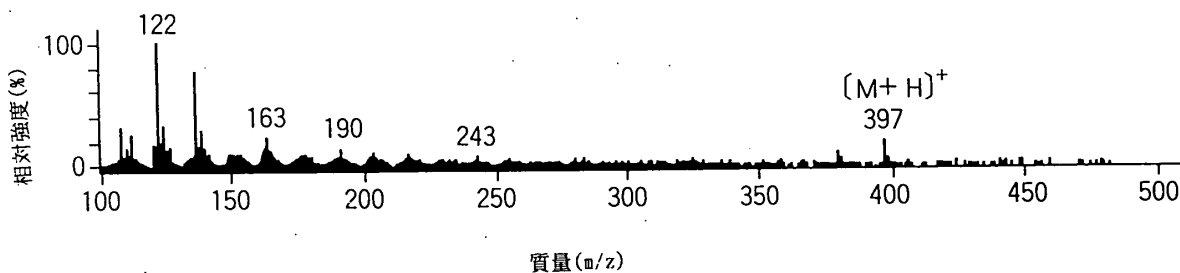


Fig. 3. スキャンナンバー259の質量スペクトル

プローブ部温度:280℃, イオン源部温度:220℃, プラズマスプレーモード印加電圧: 6 KV, 分解能: 4000

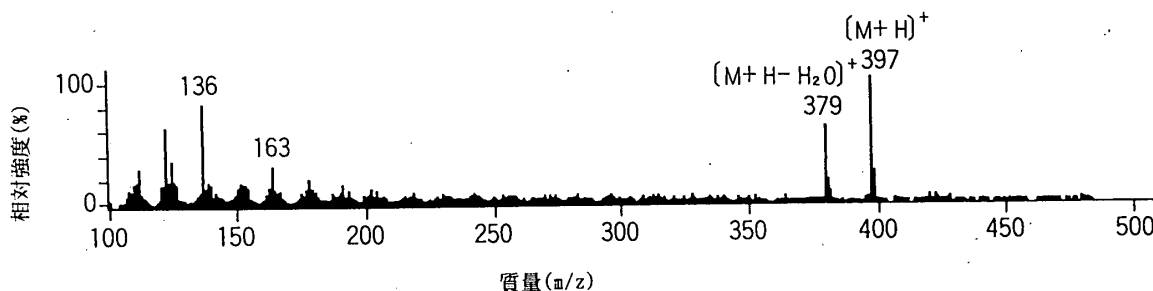


Fig. 4. スキャンナンバー296の質量スペクトル

プローブ部温度:280℃, イオン源部温度:220℃, プラズマスプレーモード印加電圧: 6 KV, 分解能: 4000

296の質量スペクトルでm/z397 [M+H]⁺に強い親イオンと, LC-MSに特徴的なm/z379 [M+H-H₂O]⁺の脱水ピークが認められている。

Fig. 5に示すようにプレ-D₂とD₂の分子量は共に396.338と同じで, 化学構造式が異なるだけであるが, Fig. 1のHPLCのクロマトグラムAとBの保持時間の相違, Fig. 2の

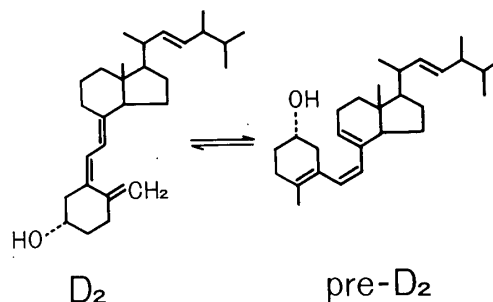


Fig. 5. ビタミンD₂およびプレビタミンD₂の構造式(D₂, プレ-D₂の分子量396.338)

トータルイオンクロマトグラムのスキャンナンバー259, 296の各MSクロマトグラムの親イオンの結果から, Fig. 3はプレ-D₂, Fig. 4はD₂であることを確認した。

これらの結果から生椎茸中にはプレ-D₂とD₂が存在することを同定した。また, プレ-D₂とD₂は熱分解していないことも確認された。

要 約

試料中にプレ-D₂とD₂が共存する物質を熱分解しない状態で同定することを目的として, プラズマプレー方式のLC-MSで, ほだ木栽培された生椎茸中のプレ-D₂およびD₂の同定を行った。

1. 生椎茸中のプレ-D₂およびD₂画分をLC-MS分析した結果, トータルイオンクロマトグラムのスキャンナンバー259はm/z397 [M+H]⁺に親イオンを認め, スキャンナンバー296はm/z397 [M+H]⁺に親イオンを認めた。このことから前者はプレ-D₂, 後者はD₂で

あることが同定された。

2. HPLCのクロマトグラム, トータルイオンクロマトグラムおよび質量スペクトルの結果からプレ-D₂およびD₂は熱分解しない状態で同定することができた。

3. 生椎茸中にはプレ-D₂およびD₂が存在することを確認した。

おわりに, 本研究を行うにあたり質量分析装置を使用させていただいた国立衛生試験所に深く謝意を表します。

文 献

- 1) K. KANOHTA: Analytical sciences, **7**, 1507 (1991).
- 2) K. TAKAMURA, H. HOSHINO, N. HARIMA, T. SUGAHARA and H. AMANO: J. Chromatogr., **543**, 241 (1991).
- 3) 竹内敦子, 岡野登志夫, 寺岡澄子, 村上裕美子, 鞆本万里子, 澤村節子, 小林正: ビタミン., **58**(11)501 (1984).