

# 食品中のマイコトキシンに関する研究 (第1報)

トリコテセン系マイコトキシンのガスクロマトグラフィー(電子捕獲型検出器)による分析法

黒田弘之 毛利孝明 西岡千鶴 岡崎秀信 高樹正浩

Studies on Mycotoxins in Food(I)  
Gas chromatographic Determination  
of Trychothecene Mycotoxins

Hiroyuki KURODA, Takaaki MORI, Chyzuru NISHIOKA, Hidenobu OKASAKI  
Masahiro TAKAGI.

Kagawa Prefectural Institute of Public Health;  
17-28, Matushima-cho, I-chome, Takamatsu, Kagawa Prefecture

Several methods for the determination of trichothecene mycotoxins in food have been published. Most of them, however, are not always exact. In this report, gas chromatographic method using an electron capture detector for the ultra micro analysis of trichothecenes in food is described.

The principle of this method is based on the fact that trichothecenes is converted to TMS ether of trichothecenes by the reaction of trimethyl silylation (N-trimethyl imidazol (I): Trimethyl chlorosilane (0.2): pyridin (9) and injected to gas chromatography using an electron capture detector.

The minimum limit of detection was approximately 0.002 ng-0.4 ng of trichothecenes.

By this method, trichothecenes was determined in the range of 0.02 ppm-5.2ppm in wheat and barley of Kagawa growth in 1977.

## 緒 言

西日本では気象条件により、しばしば麦の赤カビ病が大発生し(麦類に被害<sup>1)</sup>)を与えておりその病原菌である *Fusarium* 属菌の有毒代謝産物トリコテセン系化合物による食品汚染が憂慮されている。*Fusarium* 属菌はかなり広範囲に分布していることが知られており農作物が恒常的に微量汚染されている可能性も考えられる。トリコテセン系化合物の分析法としてはガスクロマトグラフィー(GC)、薄層クロマトグラフィー(TLC)、高速液体クロマトグラフィー等があるが検出感度の点で十分であるとは言えなかった。われわれは天野<sup>2)</sup>らの報告に従ってトリコテセン系化合物をTMS化した後n-ヘキサンで希釈し(電子捕獲型検出器)(ECD)GCを用いて分析する方法を検討したところ微量分析が可能であった。又本法を用いて市販食品及びほ場より採取した麦類を分析した結果についてもあわせて報告する。

## 実 験 方 法

### 1 試 料

1) 天ぷら粉, 小麦粉, 押麦, そうめん, ビスケット, トウモロコシ, 醤油, 大豆, ほしうどん及びそば粉の市販食品を購入し, 細粉した。

2) ほ場より採取した大麦及び小麦を自然乾燥後細粉した。

3) 芳沢氏より分与された汚染の明らかな大麦(香川県産)及びトウモロコシ(米国产)を細粉した。

### 2 試 薬

1) メタノール, n-ヘキサン, クロロホルム, デイノーニルフタレート(DNP): 特級品を用いた。

2) ピリジン: 市販の特級品を蒸留後水酸化カリウム粒を入れて乾燥保存したものを使用した。

3) フロリジル: 米国フロリジル社製のもを105℃で2時間活性化後使用した。

4) イオン交換樹脂アンバライトXAD-2: オル

ガノ社製のものを水、1N水酸化ナトリウム、メタノールで交互に洗浄後使用した。

5) トキシン標準品: Nivalenol (N), Deoxynivalenol (DN) は香川大学農学部芳沢氏より分与, Fusarenon-X (F), Diacetoxyscirpenol (DS), Neosolaniol (NS), T<sub>2</sub>-Toxin (T<sub>2</sub>) は国立衛生試験所天野氏より分与されたものを用いた。

6) トリメチルシリル (TMS) 化剤: TMIM (トリメチルシリルイミダゾール)・TMS (トリメチルクロロシラン)・ピリジン (1:0.2:9) はいずれもガスクロ工業製を用いた。

7) カラム充填剤: OV-17, SE-30 / クロモソルブW はいずれもガスクロ工業製を用いた。

8) TLC用薄層板: メルク社製

### 3 装置

ガスクロマトグラフ (GC): 島津製作所製 (GC-4BM型 FID, ECD (Ni<sup>63</sup>)検出器付)

### 4 実験操作

#### 4.1 試験溶液の作製<sup>3)</sup>

粉砕した試料 2.5 g にメタノール 100 ml を加え 1 時間マグネチックスターラーを用いてかく拌抽出する。メタノール層を遠心分離して上層 50 ml を分取しエバポレーターでメタノールを留去した後残留物を蒸留水約 30 ml で分液ロートに移し n-ヘキサンで洗浄する。

水層をアンバーライト XAD-2 カラム (径 1.5 × 10 cm, 11.6 g) に負荷し水 100 ml で洗浄した後メタノール 100 ml で溶離させる。メタノールを減圧留去した後残留物をクロロホルム・メタノール (19:1) 15 ml でフロリジルカラム (径 2.2 cm, 10 g) に負荷しクロロホルム・メタノール 9:1) 100 ml で溶出させた。溶離液をエバポレーターで濃縮乾固後メタノール 1.0 ml に溶かし、試験溶液とした。

#### 4.2 薄層クロマトグラフィー<sup>4)</sup>

4.1 で得られた試験溶液を次の条件で常法により薄層クロマトグラフィーを行った。

1) 薄層: シリカゲル

2) 展開溶媒: CHCl<sub>3</sub>: CH<sub>3</sub>OH (5:95, 20:80)

3) 発色剤: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, AlCl<sub>3</sub>

4.3 ガスクロマトグラフィー

4.1 で得られた試験溶液に TMS 化剤 (TSIM: TMCS: ピリジン (1:0.2:9) 0.1 ml) 及び内部標準溶液 0.02% DNP ピリジン溶液 0.1 ml を加え下記の条件でガスクロマトグラフィーを行った。又 ECD-GC を行う場合は本溶液を n-ヘキサンで 100 倍に希釈後ガスクロマトグラフィーを行う。Schemel に試験方法の概略を示した。

1) カラム充填剤: 2% OV-17 / クロモソルブW,

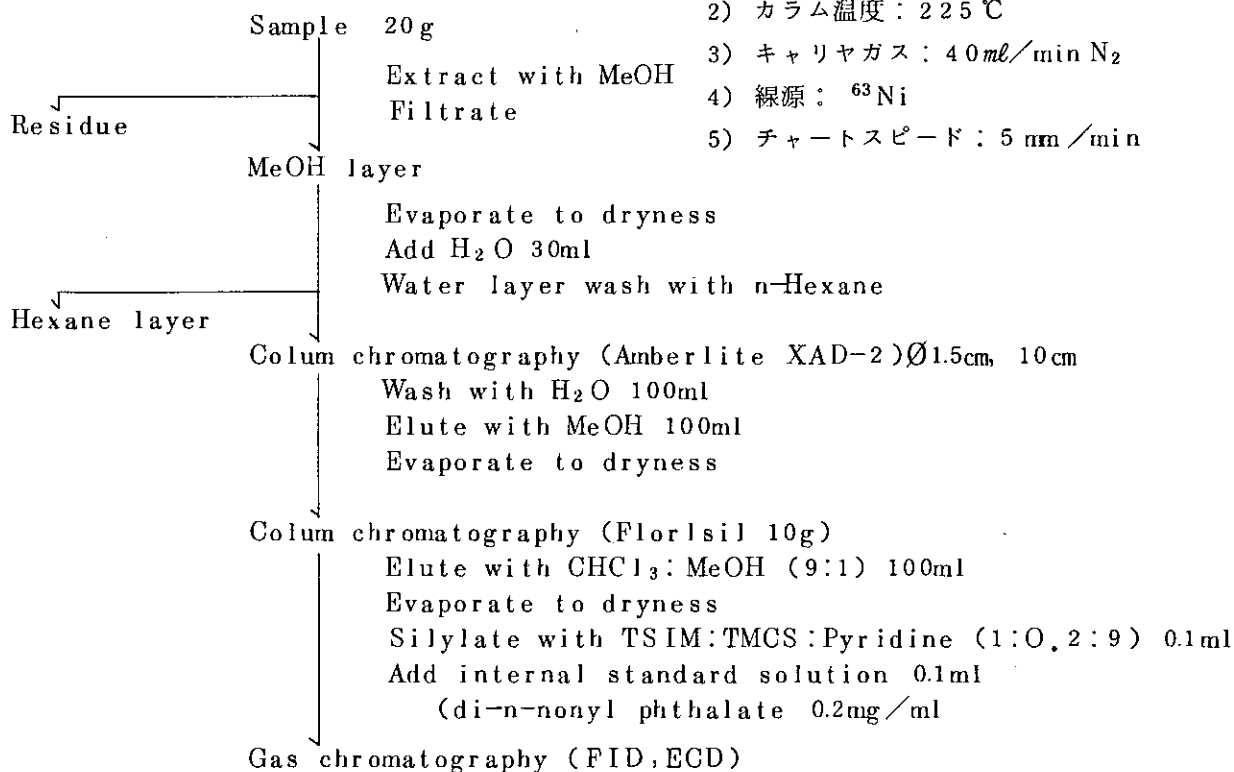
2% SE-30 / ガスクロム Q, 1 m ガラスカラム

2) カラム温度: 225 °C

3) キャリヤガス: 40 ml/min N<sub>2</sub>

4) 線源: <sup>63</sup>Ni

5) チャートスピード: 5 mm/min



Schem 1. Analytical method of tricothecenes

実験結果及び考察

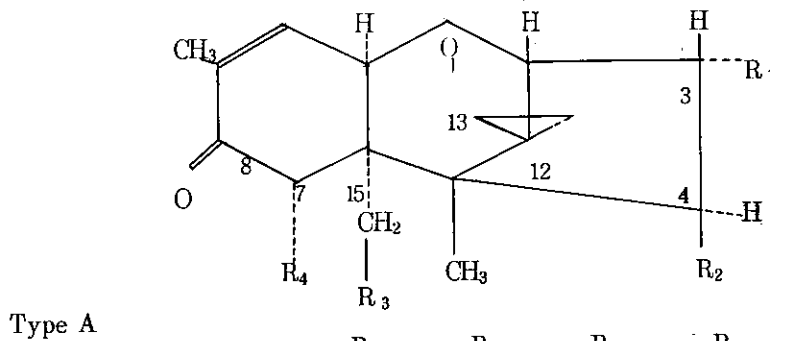
1 トリコテセン系化合物のガスクロマトグラフィー

トリコテセン化合物のTMS化体のFID-GCについては天野ら<sup>2)</sup>により研究されている。筆者らはこのTMS体をn-ヘキサン100倍に希釈後、FID-GC、ECD-GCの感度を比較したところFig 1に示す通りECD-GCの感度は著しく高かった。しかし、トリコテセン化合物の化学構造により感度は異なりこの原因はトリコテセン骨格の8位のC=O(カルボニル基)の有無に起因しているように思われる。(以下8位にC=O基のある方をType A, 無い方をType Bと分

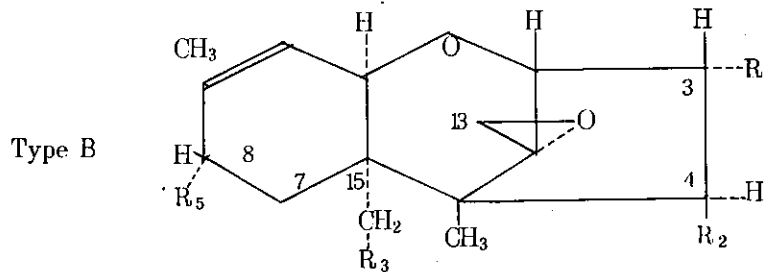
類する。) Type A (DN, N, F)のECD-GCはFID-GCの検出感度の約2500倍, Type B (DS, NS, T<sub>2</sub>)では約100倍であった。しかしType BではTMS体作製後n-ヘキサンで約100倍に希釈するのでFID-GCの感度とほぼ等しく分析上の利用面はあまり無いと思われる。Fig 2にType AのTMS体のFID, ECD-GCの標準クロマトグラフを示した。又Fig 3にType Aのトリコテセン化合物の検量線を示した。又n-ヘキサン希釈後のトリコテセンTMS体の安定性について検討したところFig 4に示す通り400日後もほとんど変化は認められなかった。

Trichothecenes (Type A)	Detection Limits	
	FID(ng)	ECD(ng)
Deoxynivalenol	5	0.002
Nivalenol	7	0.002
Fusarenon-X	10	0.004

Trichothecenes (Type B)	Detection Limits	
	FID(ng)	ECD(ng)
Diacetoxy-scirpenol	30	0.4
Neosolaniol	30	0.2
T <sub>2</sub> -toxin	60	0.4



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Nivalenol	OH	OH	OH	OH
Fusarenon-X	OH	OH <sub>c</sub>	OH	OH
Deoxynivalenol	OH	H	OH	OH



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>5</sub>
Diacetoxyscirpenol	OH	OAc	OAc	H
T-2 toxin	OH	OAc	OAc	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )
Neosolaniol	OH	OAc	OAc	OH

Fig 1. Detection limits and Chemical structures of trichothecenes

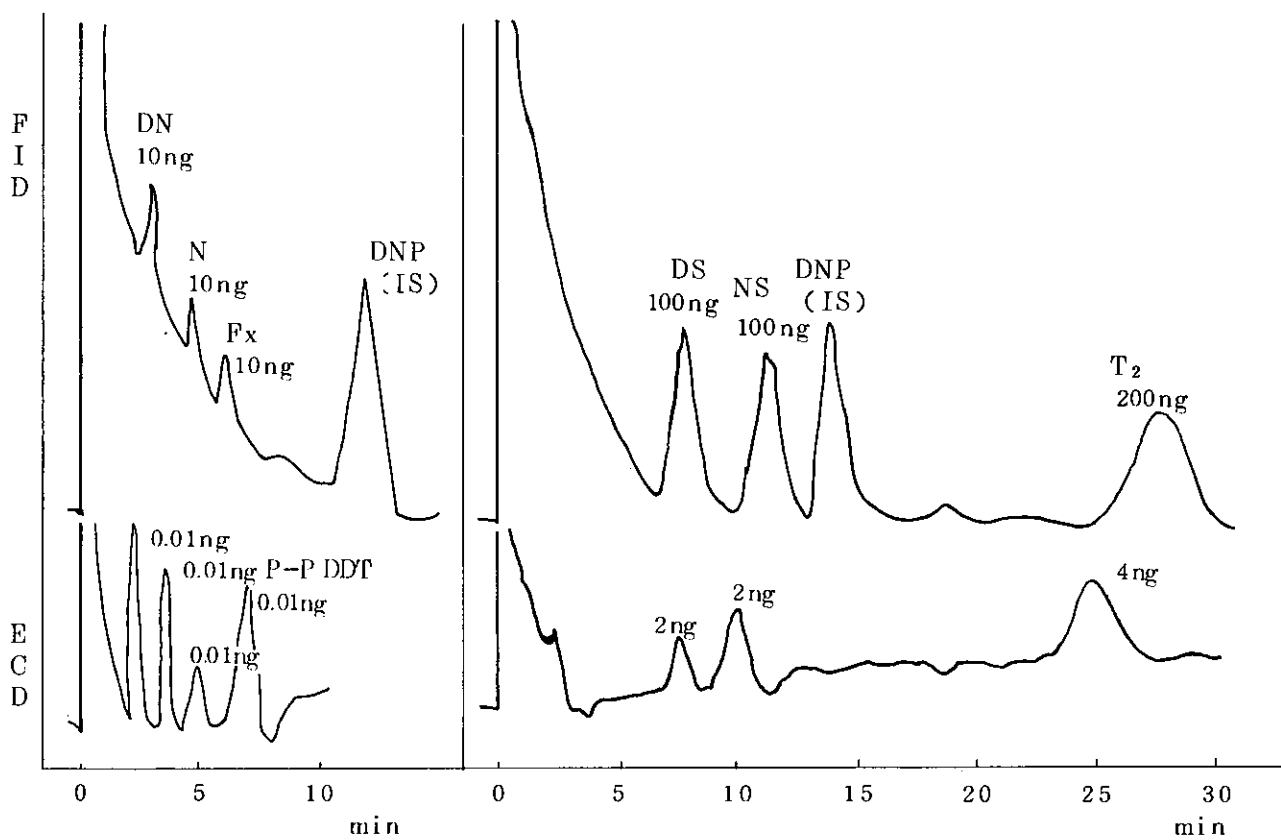


Fig 2. Gas chromatograms of TMS ethers of trichothecens

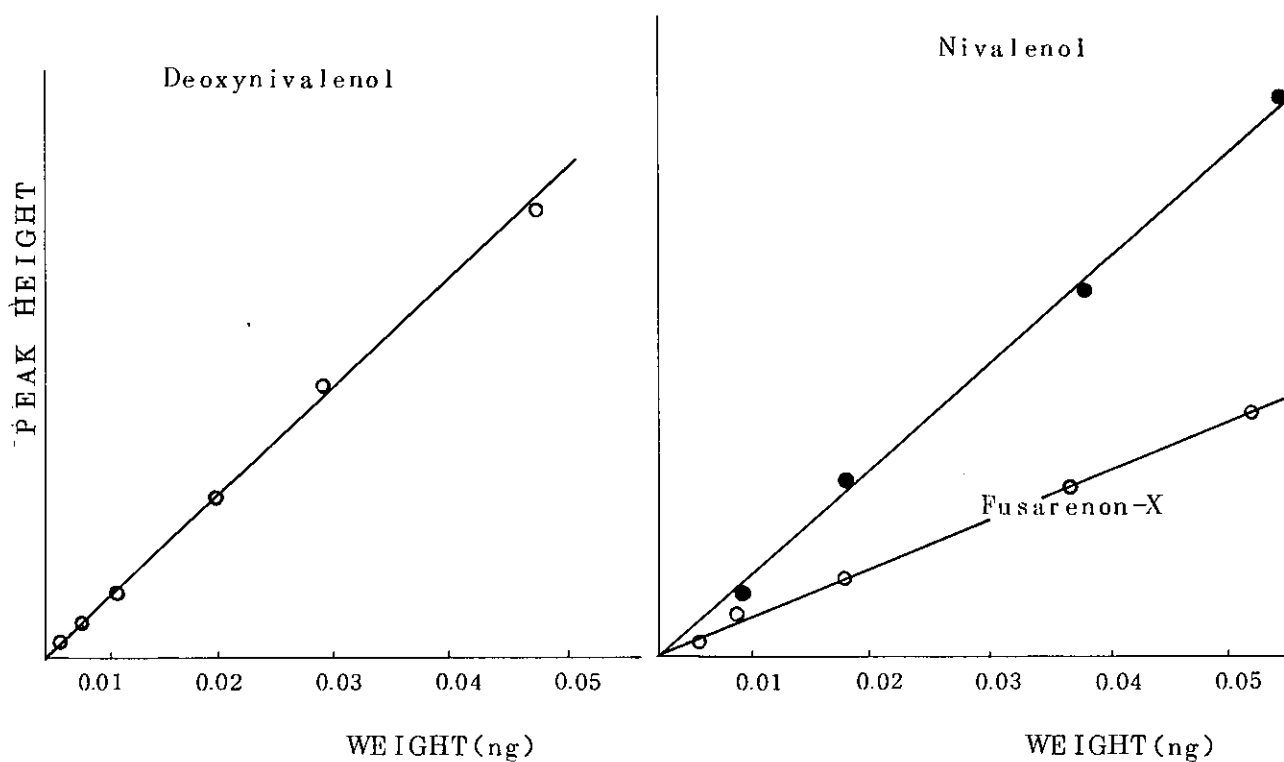


Fig 3. Calibration curves of TMS ether of trichothecens

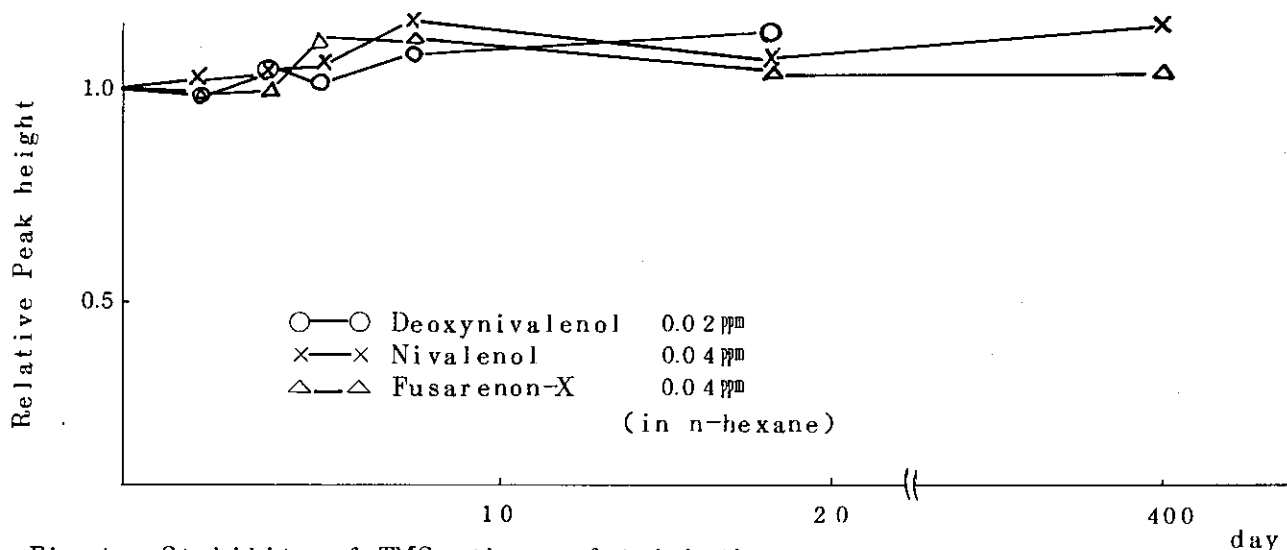


Fig 4. Stability of TMS ethers of trichothecens

## 2 食品中のトリコテセン化合物の分析

4・1に記した上村ら<sup>3)</sup>の方法に従ってType Aのトリコテセン化合物をそうめん、ビスケット、トウモロコシに1ppmになるように添加し、回収実験から得た結果をTable 1に示した。FID-GC及びECD-GCによる分析値とよく一致した結果が得られた。又、

市販食品10種類を本法により分析した結果をTable 2に示した。Type Aのトリコテセン化合物は全く検出されなかった。但しトウモロコシ、醤油ではXADカラムによるクリーンアップが充分でなく若干検出限界が他の食品より上まわった。

Table 1. Recoveries of trichothecenes added to food

Recovery(%) Food	Deoxynivalenol		Nivalenol		Fusarenon-X	
	FID	ECD	FID	ECD	FID	ECD
Somen	102	95	73	69	96	95
Biscuit	111	96	59	62	96	99
Corn	106	94	56	63	89	95

Table 2. Analytical result of trichothecenes in food

No	Sample	Deoxynivalenol (ppm)	Nivalenol (ppm)	Fusarenon-X (ppm)
1	Wheat flour	ND(0.003<)	ND(0.003<)	ND(0.006<)
2	Wheat flour	ND(0.003<)	ND(0.003<)	ND(0.006<)
3	Milled, pressed	ND(0.003<)	ND(0.003<)	ND(0.006<)
4	Somen	ND(0.003<)	ND(0.003<)	ND(0.006<)
5	Biscuit	ND(0.003<)	ND(0.003<)	ND(0.006<)
6	Corn	ND(0.015<)	ND(0.015<)	ND(0.03 <)
7	Shoyu	ND(0.015<)	ND(0.015<)	ND(0.03 <)
8	Soybeans, dried	ND(0.003<)	ND(0.003<)	ND(0.006<)
9	*Kan-men, dried	ND(0.003<)	ND(0.003<)	ND(0.006<)
10	Buckwheat flour	ND(0.003<)	ND(0.003<)	ND(0.006<)

### 3 穀類のトリコテセン化合物

明らかに赤カビにより被害のあった大麦(1975年産)及びトウモロコシ<sup>5)</sup>(1972年産)について本法を用いて分析したところ Table 3 に示した通り DN(2~24 ppm) N(ND~2.3 ppm)を検出した。日本産の大麦からは DN, N の両化合物が検出されたが米国产のトウモロコシからは DN だけが検出され日本と米国ではトリコテセン化合物の生産菌の違いがあり興味深い。又 Fig 5 にそのときのガスクロマトグラフを示す。Fig 5 より ECD-GC のチャートは溶媒ピークも小さくテーリングも認められず良好なクロマトグラフが得られた。次にほ場より無作為に採取し自然乾燥した香川県産大麦 6 件, 小麦 3 件(1977年産)についてトリコテセン化合物を TLC 及び GC の両法により分析した結果は Table 4 のとおりである。DN が 0.02~3.1 ppm,

N が 0.015~5.2 ppm の範囲ですべての小麦及び大麦より検出された。これらの分析結果は ECD-GC と FID-GC の分析値にはかなり差があり ECD-GC による値が FID-GC の値より低い値を示した。このことは ECD-GC による分析値は試料溶液が n-ヘキサンで 100 倍希釈されているので夾雑物による影響はほとんど認めがたく真の値に近いものと推定される。芳沢ら<sup>1)</sup>は赤カビ被害の麦から DN, N を検出したと報告しているが、このように非汚染麦のすべてから DN, N を検出した報告は初めてであり今後の赤カビ毒の研究に重要な問題提起となるであろう。又これらのことは高温多湿の西日本では多かれ少なかれ恒常的にトリコテセン化合物の汚染を受けていることを示しており食品衛生上の問題は残るが、精麦した麦からは Table 2 に示した通りトリコテセン化合物が検出されておらず、表面汚染の可能性が強くその除去は可能である。トリコテセン化合物の低濃度の汚染は食品衛生上の指導により解決すると思われる。

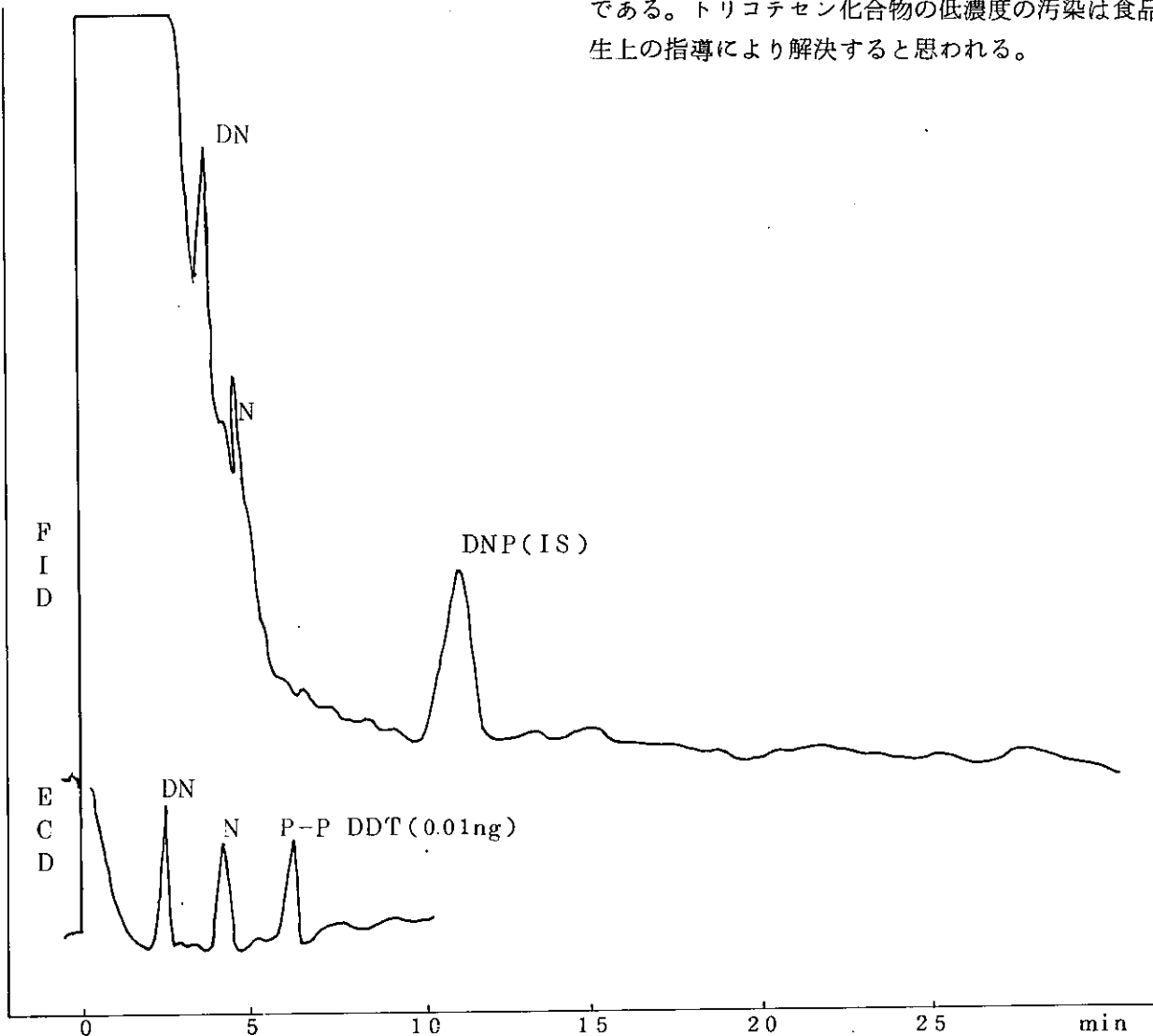


Fig 5. Gas chromatograms of extracts from Fusarium-infected barley

Table 3. Analytical result of trichothecenes in Fusarium-infected grain

No	Sample	Deoxynivalenol (ppm)		Nivalenol (ppm)		Fnsarenon-X (ppm)	
		FID	ECD	FID	ECD	FID	ECD
1	Barley (Kagawa 1975)	1.9	2.0	1.8	2.3	ND	ND
2	Barley (Kagawa 1976)	2.5	2.3	2.0	1.8	ND	ND
3	Corn (U.S.A. 1972)	2.2	2.4	ND	ND	ND	ND

Table 4. Analytical result of trichothecenes in barley and wheat(Kagawa 1977)

No	Sample	Detector	Fnsarenon-X	Diacetoxy-scirpenol	T <sub>2</sub> -toxin	Deoxy-nivalenol	Nivalenol
1	Barley	TLC	—	—	—	—	—
		EID	—(0.05 <)	—(0.25 <)	—(I <)	0.43	0.08
		ECD	—(0.006 <)			0.06	0.14
2	Barley	TLC	—	—	—	—	—
		EID	—(0.05 <)	—(0.25 <)	—(I <)	0.32	0.41
		ECD	—(0.006 <)			0.10	0.28
3	Barley	TLC	—	—	—	+	±
		EID	—(0.05 <)	—(0.25 <)	—(I <)	0.99	0.52
		ECD	—(0.006 <)			0.94	0.53
4	Barley	TLC	—	—	—	+	±
		EID	—(0.05 <)	—(0.25 <)	—(I <)	0.70	1.6
		ECD	—(0.006 <)			0.50	1.67
5	Barley	TLC	—	—	—	++	++
		EID	—(0.05 <)	—(0.25 <)	—(I <)	3.0	4.9
		ECD	—(0.006 <)			3.1	5.2
6	Barley	TLC	—	—	—	+	±
		EID	—(0.05 <)	—(0.25 <)	—(I <)	0.44	0.46
		ECD	—(0.006 <)			0.21	0.45
7	Wheat	TLC	—	—	—	—	—
		EID	—(0.05 <)	—(0.25 <)	—(I <)	0.51	trace
		ECD	—(0.006 <)			0.02	0.015
8	Wheat	TLC	—	—	—	—	±
		EID	—(0.05 <)	—(0.25 <)	—(I <)	0.29	0.14
		ECD	—(0.006 <)			0.07	0.14
9	Wheat	TLC	—	—	—	—	—
		EID	—(0.05 <)	—(0.25 <)	—(I <)	0.31	0.07
		ECD	—(0.006 <)			0.11	0.036

(ppm)

## 結 論

1) トリコテセン化合物のTMS体のn-ヘキサン溶液はECD-GCに対して0.002 ng ~ 0.4 ngの高感度であり、溶媒のテーリングも無く良好なクロマトグラムが得られた。本法を用いることにより食品中のトリコテセン化合物の微量分析を可能にした。

2) ECD-GCにより市販食品10種類を分析したところ、トリコテセン化合物はすべての食品から検出されなかった。

3) ECD-GCにより、ほ場より採集した非汚染麦9検体について分析したところ、DNが0.02~3.1 ppm, Nが0.015~5.2 ppmと初めてすべての検体より検出された。これらのことは西日本の麦類は多かれ少なかれ恒常的にトリコテセン化合物により汚染されていることを示しており、今後の赤カビ毒の研究に重要な意味を持つと考えられる。しかし食品衛生上、この汚染は表面的なものであり精麦により除去できるので直ちに問題とはならない。

終りに、本研究を行なうにあたり御援助を賜った国立衛生試験所食品部内山充部長、天野立爾室長ならびに香川大学農学部芳沢宅実氏に深謝致します。なお本報の要旨は日本食品衛生学会第35回学術講演会(昭和53年5月、東京都)において発表した。

## 文 献

- 1) 諸岡信一, 裏辻憲昭, 芳沢宅実, 山本弘幸: 食衛誌, 13, 5, 368(1972)
- 2) 天野立爾, 田中邦幸, 川田公平, 田辺弘也: 食衛誌 15, 3, 195(1974)
- 3) 上村尚, 西島基弘, 斉藤和夫, 高橋尚子, 井部明広, 落合節子, 直井家壽太: 食衛誌 19, 5, 443(1978)
- 4) 直井家壽太, 斉藤和夫, 風間栄治, 小川仁志, 木村康夫: 東京都衛生研究所年報 23, 175(1971)
- 5) D.M.Forsyth, T.Yoshizawa, N.Morooka, J.Tuite: Appl. Environ. Microbiol., 34, 5, 547(1977)