Fusarium 属の産生するマイコトキシンの同時分析法

上 村 尚*

H. KAMIMURA*: Simultaneous detection of several mycotoxins from
Fusarium species in cereals and foodstuffs

Fusarium 属の産生するマイコトキシンの穀類における自然汚染例として、日本では deoxynivalenol および nivalenol による単独または複合汚染例が、諸外国では zearalenone, T-2 toxin などの汚染例が報告されている¹⁻³⁾。我が国は、穀類などの輸入農産物が非常に多いことなどから、*Fusarium* 毒素群の同時分析法あるいは系統分析法の確立が必要と思われる。

従来、マイコトキシンの食品中からの分析法は、一般に液-液抽出法が用いられていた。しかし、この方法は、汚染率が高いと考えられる nivalenol に応用できない欠点を有している。

そこで、穀類、豆類、種実類など広範囲の食品中の *Fusarium* 毒素群を対象とした系統的試験法について種々検討したところ、試料にメタノール・水を加え抽出後、アンバーライト XAD-4 カラムクロマトグラフィー、ついでフロリジルカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップを行った後、定性は薄層クロマトグラフィー、定量はガスクロマトグラフィーおよび薄層デンストメトリーにより、良好な結果が得られた。

実 験 方 法

1. マイコトキシン

Fusarium 属の産生するマイコトキシンのうち標品の得られた trichothecene 系マイコトキシン (nivalenol, deoxynivalenol, fusarenon-X, diacetoxyscirpenol, neosolaniol, T-2 toxin, HT-2 toxin, T-2 triol, T-2 tetraol), zearalenone, butenolide および moniliformin の計12種類を対象とした。

2. アンバーライト XAD-4 カラムの作製

アンバーライト XAD-4 樹脂 (オルガノ株社製) を共栓フラスコに取り、水洗後、1N NaOH を加え振とうし水層を除去した。さらに水を加え、水層が中性になるまで水洗をくり返した。次いでメタノール、さらに熱メタノールで洗浄後、水洗を行い、メタノールを除去したのち用いた。内径 1.5cm のカラム管に高さが 10cm になるまでアンバーライト XAD-4 樹脂を充てんしたカラムを作製した。

3. フロリジルカラムの作製

フロリジル (岩井化学社製) 10g を内径 1.5cm のカラム管にクロロホルム・メタノール (9 : 1) 混液を用いて充てんし、さらに無水硫酸ナトリウム 5g を積層させたカラムを作製した。

4. 試験溶液の調製

良く粉碎した試料 100g を秤取し、メタノール・水 (9 : 1) 混液 200ml を加え、30分間振とう

* 東京都立衛生研究所 (〒160 東京都新宿区百人町3-24-1)
Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health (24-1 Hyakunin-cho 3-chome, Shinjuku-ku, Tokyo 160)

後、ろ過した。ろ液を正確に 100 ml 分取し、減圧下で約 10 ml になるまで濃縮した。濃縮液はアンバーライト XAD-4 カラムに負荷した。カラムに水 50 ml を通し、moniliformin を溶出後、水をできるだけ溶出した後メタノール 20 ml を加え、生じた気泡をガラス棒でゆるやかに攪拌除去したのち、メタノール 80 ml を用いて trichothecene 系マイコトキシン、butenolide および zearealenone を溶出した。得られたメタノールは減圧下で濃縮乾固した。残留物にクロロホルム・メタノール (9:1) 混液 10 ml を加え、溶解後、フロリジルカラムクロマトグラフィー用の試料溶液とした。これをあらかじめ調製したフロリジルカラムに負荷したのち、クロロホルム・メタノール (9:1) 混液 100 ml を用いて溶出し、溶離液は減圧下で濃縮乾固後、残留物にメタノール 1 ml を加え、溶解したものを試験溶液 1 とした。

一方、アンバーライト XAD-4 カラムより溶出した水層はエタノールを加え、減圧下で濃縮乾固した。残留物にメタノール 5 ml を加え、溶解後、アセトン 15 ml を加え、生じた沈殿を濾別し、ろ液を減圧下で濃縮乾固した。残留物にメタノール 1 ml を加え、溶解したものを試験溶液 2 とした。

Fig. 1. Thin layer chromatograms of mycotoxins

NV, nivalenol; DON, deoxynivalenol; FX, fusarenon-x; DAS, diacetoxyscirpenol; NS, neosolaniol; T-2, T-2 toxin; HT-2, HT-2 toxin; Triol, T-2 triol; Tetraol, T-2 tetraol; Ze, zearealenone; Bu, butenolide.

Developing solvent: CHCl_3 -methanol (93:7)

Treatment-step 1: observe under UV light

step 2: spray with 20% AlCl_3

step 3: spray with 20% H_2SO_4

step 4: spray with 0.3% 2, 4-dinitrophenylhydrazine

5. 薄層クロマトグラフィーによる定性

試験溶液 1 および 2 について薄層クロマトグラフィーにより、トキシシンの有無の確認を行った。

試験溶液 1 および 11 種類のマイコトキシン混合溶液を Kiesel gel 60 プレート (Merck 社製 Art. 5721) に塗布し、展開溶媒としてクロロホルム・メタノール (93:7) を用い薄層クロマトグラフィーを行った。展開後、四段階の操作方法により各トキシシンの検出を行った。それらのクロマトグラムを Fig. 1 に示した。第一段階として 365nm および 254nm の紫外線照射によりいずれの波長でもけい光を有する zearalenone のスポットを確認した。第二段階として 20% 塩化アルミニウム・エタノール溶液を噴霧し、110°, 10 分間加熱後、365nm の紫外線照射により nivalenol, deoxynivalenol, fusarenol-X および増けい光された zearalenone の他に、けい光強度は弱くなるが HT-2 toxin, T-2 triol および T-2 tetraol の確認も併せて行った。第三段階として 20% 硫酸を同一プレートに噴霧し、110°, 10 分間加熱後、365nm の紫外線照射により、diacetoxyscirpenol, neosolaniol, T-2 toxin, HT-2 toxin, T-2 triol および T-2 tetraol のけい光スポットの確認を行った。Rf 値が同一である nivalenol および T-2 tetraol はこれらの操作により判別することが可能であった。塩化アルミニウムを噴霧すると nivalenol は強く、T-2 tetraol は弱いけい光を有した。しかし、同一プレート上に硫酸を噴霧すると nivalenol のけい光は消失し、T-2 tetraol は増けい光することにより、いずれかを判定できた。さらに 0.3% 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) 塩酸溶液を噴霧し、110°, 10 分間加熱後、butenolide の黄色スポットの確認を行った。

Fig. 2. Thin layer chromatograms of moniliformin

Mo, moniliformin

Developing solvent: toluene-acetone-methanol (5:3:2)

Treatment-step 1: observe under UV light,

step 2: spray with 0.3% 2,4-dinitrophenylhydrazine

一方、試験溶液2および moniliformin 標準溶液を Kiesel gel 60 F₂₅₄ プレート (Merck 社製 Art. 5715) に塗布し、展開溶媒として、トルエン・アセトン・メタノール (5:3:2) を用いた薄層クロマトグラフィーを行った。展開後のプレートに 254nm の紫外線照射により moniliformin の吸収スポットを確認後、0.3% 2,4-DNPH 塩酸溶液を噴霧し、110°, 10分間加熱後、褐色のスポットを確認した。発色後のクロマトグラムを Fig. 2 に示した。

これらの薄層クロマトグラフィーによりトキシンの有無を確認後、ガスクロマトグラフィーおよび薄層デンストメトリーにより各トキシンの定量を行った。

6. ガスクロマトグラフィー

6-1 FID ガスクロマトグラフィー

試験溶液1を0.5ml 秤取し、減圧下で濃縮乾固後、残留物にシリル化剤 (TSIM・TMCS・酢酸エチル 1:0.2:9) を0.5ml 加え密封し、15分間室温に放置後、ガスクロマトグラフに付した。条件は充てん剤として 2% OV-17 を使い、カラム温度 240° チッ素流量 50ml/min で測定した。シリル化後の trichothecene 系マイコトキシンおよび zearalenone のガスクロマトグラムを Fig. 3

Fig. 3. Gas chromatogram of TMS-derivatives of mycotoxins

DON, deoxnivalenol; NV, nivalenol; FX, fusarenol-x; DAS, diacetoxyscirpenol; NS, neosolaniol; T-2, T-2 toxin; HT-2, HT-2 toxin; triol, T-2 triol; Tetraol, T-2 tetraol; Ze, zearalenone.

Column condition: 2% OV-17 on 80-100 mesh Gas Chrom Q. carrier gas flow rate, 50ml/min. column temperature, 240°.

に示した. この条件では nivalenol および T-2 tetraol の保持時間がほぼ同一であるため分離することは困難であった. そこで nivalenol および T-2 tetraol の分離を目的として, カラム温度 210° で測定したときのクロマトグラムを Fig. 4 に示した.

6-2 ECD ガスクロマトグラフィー

deoxynivalenol, nivalenol および fusarenon-X などは保持時間が短いため, 食品によっては妨害を受けることが考えられる. そこで ECD ガスクロマトグラフィーの検討を行った. FID ガスクロマトグラフィー用試験溶液に酢酸エチル 20ml を加え, 希釈後 ^{63}Ni を用いた ECD ガスクロマトグラフィーを行った. 条件は, 充てん剤として FID 同様 2% OV-17 を用い, カラム温度 240°, 検出器温度 280°, チッ素流量 40 ml/min で測定した.

7. 薄層デンストメトリー

butenolide および moniliformin の定量を目的として薄層デンストメトリーを行った.

試験溶液 1 は 0.2ml, 試験溶液 2 は 0.5ml をそれぞれ減圧下で濃縮乾固後, あらかじめヘキサンで洗浄した 0.3% 2,4-DNPH 塩酸溶液を 1ml 加え, 攪拌後, 50° の水浴中で90分間加熱した. 加熱後, 分液ロートに水および少量のアセトンを用いて移した. 試験溶液 1 (butenolide) は酢酸

Fig. 4. Gas chromatogram of TMS-derivatives of mycotoxins
DON, deoxynivalenol; NV, nivalenol; FX, fusarenon-x; Tetraol, T-2 tetraol.
Column condition: 2% OV-17 on 80-100 mesh Gas Chrom Q.
carrier gas flow rate, 50ml/min. column temperature, 210°.

エチルで抽出し、試験溶液 2 (moniliformin) はクロロホルムで抽出を行い、無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧下で濃縮乾固した。残留物をアセトン 1ml で溶解したものを薄層デンストメトリー用試験溶液とした。この試験溶液をそれぞれ Kiesel gel 60 プレートに塗布し、さらに同一プレート上に 2,4-DNPH 誘導体とした標準品を塗布後、展開溶媒として butenolide-DNPH 用としてトルエン・アセトン・メタノール (5 : 1 : 1), moniliformin-DNPH 用としてトルエン・アセトン (97 : 3) を用いて展開した。展開後のプレートをよく風乾し、波長 430 nm (butenolide-DNPH) および 460 nm (moniliformin-DNPH) の条件で薄層デンストメトリーを行った。

結 果

1. 検出限界

本法による検出限界は Table 1 に示したとおりであり、測定方法により検出限界は異なるが、ECD ガスクロマトグラフィーにより nivalenol タイプのトキシンは 0.002 ppm また薄層デンストメトリーにより, butenolide は 0.03 ppm, moniliformin は 0.05 ppm の高感度が得られたことから, trichothecene 系マイコトキシンおよび zearalenone は FID ガスクロマトグラフィーで測定し, nivalenol タイプのトキシンが検出または疑いがもたれた場合は ECD ガスクロマトグラフィーを用い, butenolide および moniliformin は薄層デンストメトリーで測定した。

Table 1. Minimum detectable concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$) of mycotoxins

Mycotoxins	Detection limits ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
	Qualitative	Quantitative		
	TLC	GC-FID	GC-ECD	TLC
Nivalenol	20- 50	100	2	20- 50
Deoxynivalenol	20- 50	100	2	20- 50
Fusarenon-X	20- 50	100	2	20- 50
Diacetoxyscirpenol	100-500	200	80	100-500
Neosolaniol	100-500	200	80	100-500
T-2 toxin	100-500	200	80	100-500
HT-2 toxin	100-500	200	80	100-500
T-2 triol	100-500	200	80	100-500
T-2 tetraol	100-500	100	80	100-500
Zearalenone	10- 50	100	—	10- 50
Butenolide	100-500	—	—	30- 50
Moniliformin	200-500	—	—	50-100

Table 2. Concentrations of mycotoxins in naturally infected barley and wheat harvested in Japan

Sample	No. of samples	No. of positives	Analytical result (ppm)	
			Nivalenol	Deoxynivalenol
Wheat	18	15	tr-7.8 (1.5)	tr-4.7 (1.0)
Barley	25	19	tr-36.9 (3.9)	tr-40.4 (4.4)

Values in parentheses indicate the average

Fig. 5. Gas chromatograms of the silylated extracts from naturally infected barley contaminated with $1.8 \mu\text{g/g}$ deoxynivalenol (DON) and $1.4 \mu\text{g/g}$ nivalenol (NV)
 (A)-Gas chromatogram of flame ionization detection. GC condition: carrier gas flow rate, 50 ml/min. column temperature, 240° .
 (B)-Gas chromatogram of electron capture detection. GC condition: carrier gas flow rate, 40 ml/min. column temperature, 240° .

2. 添加回収実験

今回対象とした12種類のトキシンをコーン、大麦、精白米などの穀類に $1\sim 2\text{ppm}$ となる様に添加し、回収実験を行ったところ、いずれも71%以上の回収率が得られた。

3. 汚染調査

本法を用いて、1977年度国内産汚染麦（香川大 芳沢博士より分与）について試験した結果を Table 2 および Fig. 5 に示した。また市販の穀類およびそれらの製品などについて調査を行っているが現在のところトキシンは検出されていない。

本法は *Fusarium* 毒素の同時分析法として、収穫段階の穀類および市販品のモニタリングへの応用に有効であると考えられる。

参 考 文 献

- 1) Mirocha, C. J., Schauerhamer, B., Pathre, S. V.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., **57**, 1104 (1974).
- 2) Yoshizawa, T., Tsuchiya, Y., Teraura, M., Morooka, N.: Proc. Jap. Assoc. Mycotoxicol., **2**, 30 (1976).
- 3) Mirocha, C. J., Schauerhamer, B., Christensen, C. M., Kommedahl, T.: Appl. Environ. Microbiol., **38**, 557 (1979).