Sterigmatocystin のガスクロマトグラフィーによる分析

真鍋 勝, 南沢正敏*, 松浦慎治
(農林省食糧研究所, *財団法人日本穀物検定協会)

昭和 46 年 5 月 31 日 受 理

Gas-liquid Chromatographic Assay of Sterigmatocystin

By Masaru MANABE, Masatoshi MINAMISAWA* and Shinji MATSUURA
National Food Research Institute, Ministry of Agriculture and Forestry;
*Japan Grain Inspection Association

The possibility of gas-liquid chromatographic assay of sterigmatocystin, one of mycotoxins, was examined. A Shimadzu GC-5AP gas chromatograph equipped with an all glass flow way was used in this work. As a result of experiments comparing various column materials, it was recognized that gas-liquid chromatographic assay of sterigmatocystin was possible by using diatom earth (Shimalite W or Chromosorb W) or crystal (Shimalite Q) as support and methyl silicone (SE-30 or OV-1) or methyl phenyl silicone (OV-17) as liquid phase. But the treatment of support by using acid and dimethyl dichloro silane was necessary. The minimum detection quantity of sterigmatocystin by gas-liquid chromatography was generally $0.1\mu\text{g}$, but it was $0.02\mu\text{g}$ by using the column material coated with 0.56% SE-30 on Shimalite Q. The gas-liquid chromatogram of crude sterigmatocystin, extracted and cleaned up from moldy rice (*Asp. versicolor*), using 1.5 % SE-30 on Chromosorb W showed better separation than the other column materials. In case of using that column material, the relative retention time of sterigmatocystin (relative to cholestane as internal standard material) was 1.21. (Received May 31, 1971)

緒 言

Sterigmatocystin は, 1954 年初田ら^(1,2)により発見され命名されたマイコトキシン(かび毒)の一種で, *Aspergillus versicolor* の代謝産物として分離される淡黄色の針状結晶である。また Holzapfel ら⁽³⁾は, *Aspergillus nidulans* や *Bipolaris* のある種の菌株によっても, 大量にこのマイコトキシンが生産されると報告している。sterigmatocystin の化学構造は, Bullock ら⁽⁴⁾により明らかにされているが, この構造 (Fig. 1) はマイコトキシンの中で最も毒性が強いといわれる aflatoxin に似ており, Dickens ら⁽⁵⁾のラットによる試験で, ガン原性のあることが確認され, このマイコトキシンが注目されるにいたった。

宮木ら⁽⁶⁾は, わが国の農家の保有米より産生菌の一種である *Asp. versicolor* をかなりの頻度で検出してお

り, そのうち人工培地で sterigmatocystin の産生能を有するものが約 30% あったと報告している。従って, 今後穀類について sterigmatocystin の汚染の有無を検査する必要があると思われるので, 分析方法について検討を加えた。sterigmatocystin の分析方法については, すでに Vorster ら⁽⁷⁾や Stack ら⁽⁸⁾の他に 2~3 の報告があるが, いずれも確認には薄層クロマトグラフィー (TLC) を使用している。しかし TLC による方法では,

Fig. 1. The Chemical Structure of Sterigmatocystin and Aflatoxin B₁.

sterigmatocystin 自体の蛍光が弱く検出感度が落ちる。また、化学処理により蛍光を強くする方法^(7,8)も報告されているが、この反応物質は光に不安定な欠点があり、定量に不便である。そこで精度も高く、定量も容易であるガスクロマトグラフィー (GLC) による分析の可能性について検討を加えたので報告する。

実験方法

1. 試験試料——sterigmatocystin sterigmatocystin の標品としては、Israel の Makor Chemical Ltd. 製のものと、千葉大学腐敗研究所の山崎幹夫氏より分与を受けたものを使用した。GLC における分離具合などを調べるための粗 sterigmatocystin 試料は、産生菌株である *Asp. versicolor* 0056 (千葉大腐敗研) を培養して調製した。調製方法は、綿栓殺菌済み 300 ml 三角フラスコに、それぞれ精白米 30 g と水 15 ml の割合で入れ、高压滅菌 (120°C, 15 min) の後、上記菌株を接種、25°C で約 24 時間培養後に一度三角フラスコの内容物をよく振盪し、続けて 25°C で約 20 日間静置培養した。培養終了後は、菌の飛散を防止するために高压滅菌した。滅菌済みのかび米を Vorster ら⁽⁷⁾ の方法に準じて、抽出・精製を行ない、TLC にかける前までの乾固物の粗 sterigmatocystin 試料を得た。収量は精米 100 g 当り、sterigmatocystin 約 6 mg であった。これら固体試料を GLC にかけるための溶剤としては、検知器に水素炎イオン化検出器を使用するのでクロロホルム、ベンゼンの代りに、溶解度が落ちるがアセトンを使用した。

2. GLC の機器および操作条件 GLC 用の装置は、総ガラス流路が使用できる島津 GC-5 AP を使用した。検知器としては、水素炎イオン化検知器 (FID) と熱伝導度型検出器 (TCD) の 2 種がついているが、おもに FID を使用した。レコーダーは島津記録計 R 201 を使用し、ピーク面積はタケダ理研のデジタル・インテグレータ TR-2213 型によって測定した。カラム、温度、流速などの操作条件は下記に示した。カラムのコンディショニングは、窒素を 80 ml/min の割合で流しながら、280~300°C で 12~24 時間行なった。

GLC の操作条件

カラム：ガラス、1.0~2.0 m, 5 mm O. D., 3 mm I. D.

温度：導入部 250°C

カラム槽 180~230°C

流速：キャリア・ガス 窒素 80 ml/min

水素 50 ml/min

空気 1 l/min

3. GLC の充てん剤 充てん剤は、sterigmatocystin の化学構造や物理的性質より、固定相担体には吸着性の少ないフラックス添加焼成の白色ケイ藻土 (商品名：Shimalite W, Chromosorb W) や水晶 (Shimalite Q) を選び、液体には一般に高沸点物質やステロイド、アルカロイドの分析に使用されている methyl phenyl silicone (OV-17) や methyl silicone (SE-30, OV-1) や nitrile silicone (XE-60) を選んだ。試験に使用した充てん剤を、Table I に示す。

ケイ藻土の担体である Shimalite W または Chromosorb W に上記の液体をコーティングした充てん剤は市販されているが、最も吸着性の弱いと思われる水晶を担体にしたものはないので、水晶担体と SE-30 の液体より充てん剤を常法により自製した。調製方法は、水晶をシラン処理するために、3% ジメチルジクロロシラン (DMCS) のトルエン溶液に加えて攪拌し、数分後吸引濾過した。ついでメタノールで数回洗浄し、100°C で 2 時間乾燥した。次にこの担体を SE-30 でコーティングするために、SE-30 の 1.5% トルエン溶液を調製し、シラン処理した水晶担体を加えて数分減圧にしたのち、5 時間放置し、吸引濾過を行ない、室温で風乾後 100°C, 2 時間乾燥した。このフィルター法では、担体のコーティング量を正確に算出するのはむずかしいが、本実験では水晶担体のトルエン溶液の吸着量より、コーティング量を算出した。

4. Sterigmatocystin の TLC GLC で検出されるピークが、sterigmatocystin そのものかどうかを調べるために、GLC より分取したものの TLC による定性を行なった。薄層板は、常法によりガラス板にシリカゲル G (Merck 社製) を 0.3 mm の厚さに作り、105°C, 2 時間加熱し、デシケーター中に保存したものを使用した。展開は上昇法により行ない、展開液はベンゼン-酢酸-メタノール (90:5:5 v/v/v) を使用した。TLC 上の sterigmatocystin は、長波長紫外線 (365 mμ) を照射すると、暗褐色の蛍光を発することにより確認した。

5. 検出感度および検量曲線 Sterigmatocystin の GLC における最低検出量を調べるために、標品 sterigmatocystin を 20 μg/ml のアセトン溶液とし、GLC の装置感度をあげて検討を加えた。検討したカラムは、液

体に OV-17 を使った No. 3, SE-30 の No. 5, 6, OV-1 の No. 10 の 4 本である。

続いて sterigmatocystin 1mg/ml のアセトン溶液を作り, No. 3, 5, 6 の 3 本のカラムについて検量曲線を作成した。

実験結果および考察

1. 標品 sterigmatocystin の GLC

1-1 充てん剤について: 検討を加えた充てん剤の結果については, Table I に示す。この結果から分かるように, 検討を加えたカラムの中で, No. 7, 8 の 2 本は sterigmatocystin を検出できなかった。この原因は, 固定相液体とは関係なく担体に関係していると考えられる。担体には吸着性の弱いケイ藻土の Chromosorb W を使用しているが, より吸着性を減少するための DMCS などによるシラン処理がなされてい

ないために, sterigmatocystin がカラム中で吸着されたと思われる。

XE-60 の No. 9 の担体は, 酸処理のみで sterigmatocystin の吸着が大であったが, 一応検出できた。また, 吸着性のより少ない水晶を担体にした No. 4, 5 のカラムでは, 他のカラムに比較して sterigmatocystin の吸着が少なく, 検出ピークが大きく出た。しかし, 水晶はケイ藻土に比較して表面積が小さく, 他の混合物との分離の点で問題が残った。以上のことから, 吸着性の弱いケイ藻土を担体を使用するときでも, 前処

理, 特にシラン処理する必要があると考えた。

固定相液体の違いによる差については, 担体の違いによる影響も考えられるが, 4 種類の液体より選んだカラム No. 3, 6, 9, 10 について検討を加えた。記録計に現われる sterigmatocystin 5 μ g の検出ピークを Fig. 2 に示す。XE-60 の No. 9 の検出ピークは, 他のピークに比較して小さく, 大きくテーリングしていることが分かる。これは, 前に述べた担体の処理が不十分であることも関係していると思われるが, XE-60 の許容温度が他の 3 種類の液体に比べて低い欠点もあり, 分析に使用するのが不適当と判断した。カラム No. 3, 6, 10 については, 保持時間の違いの他は差が認められなかった。そこで, カラム温度の変化による保持時間の変化について測定した結果を Fig. 3 に示す。この結果から保持時間 (T min) とカラム温度 (K °C) の関係が下記の式で表

Fig. 2. The Gas-liquid Chromatogram of Sterigmatocystin by Using Various Columns.

Column: 1. No. 10 (OV-1), 200°C, 2. No. 6 (SE-30), 220°C, 3. No. 9 (XE-60), 220°C, 4. No. 3 (OV-17), 220°C.
Sterigmatocystin: 5 μ g.

Table I. The Retention Times of Various Columns

Column No.	Liquid phase	Liquid loading (%)	Support	Surface treatment	Mesh	Column temp. (°C)	Injection temp. (°C)	Retention time (min/m column)
1	Silicone OV-17	1.0	Shimalite W	AW**, DMCS***	80~100	220	250	12.14
2	"	1.5	"	DMCS	80~100	220	250	19.34
3	"	1.5	"	AW, DMCS	80~100	240	250	10.80
4*	Silicone SE-30	0.13	Shimalite Q	DMCS	100~180	210	250	5.73
5*	"	0.53	"	DMCS	100~180	220	250	8.66
6	"	1.5	Chromosorb W	DMCS	60~80	220	250	9.80
7	"	1.5	"	AW	60~80	220	250	—
8	"	5.0	"	"	80~100	220	250	—
9	Silicone XE-60	1.0	"	AW	60~80	220	250	10.00
10	Silicone OV-1	1.5	"	AW, DMCS	80~100	220	250	3.30

* sec text, ** treatment by acid, *** treatment by dimethyl-dichloro-silane.

Fig. 3. The Relationship between Retention Time and Column Temperature in Various Columns.

- No. 3, 1.5% OV-17 on Shimalite W,
 ○—○ No. 6, 1.5% SE-30 on Chromosorb W,
 △—△ No. 10, 1.5% OV-1 on Chromosorb W.

わせる。

$$\log T = -0.0185 K + C$$

$$\left(\begin{array}{l} C: \text{No. 3 (OV-17)} = 5.3676 \\ \text{No. 6 (SE-30)} = 5.1009 \\ \text{No. 10 (OV-1)} = 4.5168 \end{array} \right)$$

ただし、キャリアガス: 80ml/min

ガラスカラム: 1m, 3mm I. D.

1-2 分取 GLC とマススペクトル: 充てん剤を検討した場合、標品 sterigmatocystin を GLC にかけると 1 つのピークを検出しているが、このピークがはたして sterigmatocystin を正しく検知しているか、またカラム中で変化を起こした物質を検知していないかを検討するために、簡単な分取 GLC を行なった。機器は同じ装置を使用し、カラムは No. 6 を取り付け、検知器を FID から TCD の回路に切り換え、ピークの現われる時点で TCD の排気口にステンレスカラムをつなぎ、TCD に検知された物質を分取した。ガス状で出てきた物質は、接続したカラムの中で温度が下がり、カラム壁面に固体粉末として付着した。この付着物をクロロホルムで溶出し、濃縮して TLC にかけて 365 mμ の紫外線で照射すると、標品 sterigmatocystin と全く同じ R_f の暗褐色蛍光物質が現われ、sterigmatocystin 自身が検出されていることを確認した。またガスクロマトグラフ質量分析装置 (島津 LKB-9000 形) により、マススペクトルを取ることによって、GLC における検出ピークが

sterigmatocystin であることを再確認した。

1-3 検出感度と検量曲線: 4 種類の充てん剤について、sterigmatocystin の最低検出量を調べた結果、担体にケイ藻土を使用したカラム No. 3, 6, 10 は 0.1 μg まで検出可能であったが、sterigmatocystin が 1 μg 以下の量で少なくなるにしたがって、保持時間が長くなっていた。水晶を使用したカラム No. 5 は、0.02 μg と最も微量を検出することができ、sterigmatocystin の量の変化による保持時間の変化は、ほとんどなかった。この結果は、標品 sterigmatocystin を使用した場合のものであり、実際に食料などから抽出、測定する定量分析での最低検出量は、混入する不純物の影響で上記の値より大きくなると考えられる。

次に検量曲線を測定した結果、実験に使用した No. 3, 5, 6 の 3 本のカラムは、ほぼ同じ結果を得た。装置の感度 sensitivity 10² MΩ, range 16×10⁻² V の条件で sterigmatocystin 2~10 μg の間で、また sensitivity 10² MΩ range 8×10⁻² V の条件では 1~5 μg の間で、検量曲線はそれぞれ直線性を示した。1 μg 以下でも検出はされるが、測定値は 1~5 μg の検量曲線の一直線上にはいなかった。

2. 粗 sterigmatocystin の GLC

標品の sterigmatocystin を使用しての GLC 試験から、カラム No. 3, 5, 6, 10 が分析用に使用できると考察し、これらのカラムについて、かび米より調製した粗 sterigmatocystin を使用しての GLC を行なった。これは、sterigmatocystin に汚染された食品の分析の可能性について検討を加えるもので、先に調製した sterigmatocystin に含まれている不純物が、GLC における sterigmatocystin の検出に、どのような影響を与えるかを調べた。カラム No. 3, 6, 10 のクロマトグラムを Fig. 4~Fig. 6 に示した。No. 5 の結果は No. 6 の結果に似ているが、sterigmatocystin の検出ピークに続いて出る 2 個のピークとの分離が悪かった。3 種類のカラムの中では、No. 10 のカラムの分離具合が最も悪く、No. 6 が最も良い分離を示した。No. 6 と No. 3 では、sterigmatocystin の保持時間はもちろん異なるが、不純物のピークの出る位置が異なり、No. 6 は sterigmatocystin のピークの直前には大きな不純物ピークがないことが分析に便利であると思われた。No. 3 の場合は、前後に大きな不純物のピークが出てくる欠点があった。No. 6 のクロマトグラムで、sterigmatocystin のピーク

Fig. 4. The Gas-liquid Chromatogram of Crude Sterigmatocystin by Using No. 3 (OV-17) Column.

Column : 1.5 m glass, 240°C.

Fig. 6. The Gas-liquid Chromatogram of Crude Sterigmatocystin by Using No. 10 (OV-1) Column.

Column : 2.0 m glass, 200°C.

Fig. 5. The Gas-liquid Chromatogram of Crude Sterigmatocystin by Using No. 6 (SE-30) Column.

Column : 1.5 m glass, 220°C.

に続くピークが2個重なっており、定量に影響する可能性があるが、前処理工程中のヘキサン処理により、大部分除くことが可能であった。以上のことから、No. 6のカラムが sterigmatocystin の分析用に適していると考えた。

GLC による定量分析を行なう場合、内部標準物質を使用することにより、より正確に定量ができるので、内部標準物質としてステロイドの一種である cholestane を選び、保持時間を調べた。その結果カラム No. 6 につい

ては、カラム温度 220°C で保持時間が 8.1 min であり、sterigmatocystin が 9.8 min であるので、cholestane に対する sterigmatocystin の保持時間の相対比は 1.21 であった。また cholestane の検出ピークが粗 sterigmatocystin に含まれている不純物の大きなピークに重ならず、sterigmatocystin の保持時間に近いので、内部標準物質として適していると考えられる。

以上 sterigmatocystin の GLC による分析の可能性につき検討を加え、分析方法として充分使えることが分かった。今後食料などの sterigmatocystin 汚染を検査する場合には、食料のそれぞれについて抽出および精製方法について、検討を加える必要があると考えられる。

要 約

マイコトキシン的一种である sterigmatocystin のガスクロマトグラフィー (GLC) による分析の可能性について検討を加えた。GLC の装置としては、流路が総ガラス製の島津 GC-5 AP を使用し、種々の充てん剤について検討した結果、ケイ藻土 (Shimalite W, Chromosorb W) と水晶 (Shimalite Q) に methyl silicone (SE-30, OV-1), methyl phenyl silicone (OV-17) を低濃度にコーティングしたものであれば、sterigmatocystin を検出することが分かった。ただし、ケイ藻土は前処理として酸および DMCS 処理する必要があった。sterigmatocystin の産生菌である *Asp. versicolor* を培養したかび米より抽出、精製して調製した粗 sterigmatocystin

cystin の GLC では, SE-30 を使用したカラムが分離具合がよく, 内部標準物質としての cholestane との保持時間比は, カラム温度 220°C で 1.5% 液相 (SE-30) で, 1.21 であった.

以上の結果から, sterigmatocystin の GLC による分析が可能であることが分かったが, 実際に食料などについて検査する場合には, それぞれの食料からの抽出および GLC に対する阻害物質の除去について, 検討を加える必要があると思われる.

終りに, 本研究にあたり sterigmatocystin および *Asp. versicolor* 0056 を分与いただき, かつ有益なるご助言をいただいた千葉大学腐敗研究所宮木高明所長, 山崎幹夫博士ならびに同研究室の方々, また充てん剤についてご助言をいただいた島津製作所東京研究所松居正巳

氏に厚く感謝いたします.

- (1) 初田勇一, 久山真平: 農化, **28**, 989 (1954).
- (2) 初田勇一, 久山真平, 寺島典二: 農化, **28**, 992 (1954).
- (3) C. W. Holzapfel, I. F. H. Purchase, P. S. Steyn and L. Gouws: *S. Afr. Med. J.*, **40**, 1100 (1966).
- (4) E. Bullock, J. C. Roberts and J. G. Underwood: *J. Chem. Soc.*, **1962**, 4179.
- (5) F. Dickens, H. E. H. Jones and H. B. Waynforth: *Brit. J. Cancer*, **20**, 134 (1966).
- (6) 宮木高明, 山崎幹夫, 堀江義一, 宇田川俊一: 食衛誌, **11**, 373 (1970).
- (7) L. J. Vorster and I. F. H. Purchase: *Analyst*, **93**, 694 (1968).
- (8) M. Stack and J. V. Rodrick: *J. Assoc. Offici. Agri. Chemists*, **54**, 86 (1971).