Fusarium 属の培養物および穀類中からの Zearalenone のガスクロマトグラフィーによる定量

(昭和 52 年 10 月 11 日受理)

鈴木敏正* 星野庸二* 栗栖 誠*
能勢憲英* 渡辺昭宣*

Gas Chromatographic Determination of Zearalenone in the Culture of Genus *Fusarium* and Cereal

Toshimasa SUZUKI, Youji HOSHINO, Makoto KURISU,
Norihide NOSE and Akinobu WATANABE

(Saitama Institute of Public Health: 639-1, Kamiookubo-higashi, Urawa)

A simple method for determination of zearalenone in the culture of Genus *Fusarium* and cereal by gas chromatography equipped with a flame ionization detector (FID-GC) was investigated.

The presented method was composed of the following steps: Sample was extracted with methanol. To the methanol extract 1% sodium chloride solution was added. The aqueous methanol was defatted with *n*-hexane and was reextracted with chloroform. After the chloroform extract was cleaned up by column chromatography using a silica gel and Florisil mixture, zearalenone was silylated with *N*, *O*-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide in ethyl acetate. The TMS-derivative was determined by FID-GC with a column (3 mm × 1 m) of 2% OV-1 on Gaschrom Q.

The recoveries of zearalenone added to cereals at level of 0.4 ppm were from 71.8 to 87.6%.

By this method, zearalenone was determined in the range of 4~3051 µg/g in the culture of *Fusarium* species and was not determined in wheat and barley of Saitama growth in 1975, although zearalenone producing strain were isolated three strains from the wheat.

(Received October 11, 1977)

緒 言

Zearalenone は *Fusarium* 属の産生する赤カビ毒の一つで、欧米において古くから知られているカビ汚染飼料摂取による家畜の中毒の原因物質の一種とされているマイコキシンである。

このマイコキシンは Stob¹⁾ らによって *Gibberella zae* (*Fusarium graminearum*) に汚染されたブタ飼料用とうもろこしについて追求されて以来、Christensen²⁾, Mirocha ら³⁾によって estrogen (F-2) として研究がなされていたが、その化学構造が Urry ら⁴⁾によって解明され、Zearalenone(6-(10-hydroxy-6-oxo-trans-undecenyl)-β-resorcylic acid lactone) (以下 Ze と略

記) と命名された。

Ze の自然汚染例は、アメリカでは主としてとうもろこしに多く見いだされており^{5)~8)} 最高 1,700 ppm に達する汚染⁹⁾ も知られている。一方、イギリスでは飼料用大麦に自然汚染があり、ブタの中毒と関連して Miller ら¹⁰⁾によって報告がなされている。

我が国でも Ze 生産菌が見いだされている¹¹⁾ほか、杉本ら¹²⁾による輸入とうもろこしの汚染の報告があり、飼料の汚染問題とともに食品衛生上からも深い関心が持たれている。

穀類中の Ze の分析については、既に、Eppley,^{13), 14)} Caldwell¹⁴⁾, Owens¹⁵⁾, Ueno¹⁶⁾, Stoloff¹⁷⁾, Sarudi¹⁸⁾, Thomas²⁰⁾, Wilson²¹⁾, Seitz²²⁾ および Malaiyandi ら²³⁾

* 埼玉県衛生研究所：埼玉県浦和市上大久保東 639-1

により、多くの薄層クロマトグラフィー（以下 TLC と略記）による方法が報告されている。また、ガスクロマトグラフィー（以下 GC と略記）による方法は Mirocha⁷⁾、杉本¹²⁾ および Holder ら²⁴⁾ によって検討されている。

Mirocha ら⁷⁾ は TLC clean up 後、*N, O*-bis(trimethylsilyl) acetamide (以下 BSA と略記)—trimethylchlorosilane (以下 TMCS と略記) (5:1) を用いて trimethylsilyl (以下 TMS と略記) 誘導体とし、昇温 GC で測定しているが、定量分析に TLC clean up と昇温 GC を用いることは迅速性と簡便性に欠け、必ずしも最良の方法ではない。杉本ら¹²⁾ は酢酸鉛溶液による除タンパク処理後、silica gel カラムクロマトグラフィーを行い直接 Ze を GC で測定しているが、小麦試料の場合には除タンパクが不十分であり、操作に時間を要し、検出感度は悪く、ピークに tailing を認めた。また、Holder ら²⁴⁾ は高速液体クロマトグラフィーのための clean up も併用しているが、緩衝液による液々分配、Sephadex LH-20 および silica gel カラムクロマトグラフィーなどの複雑な操作を行っている。

今回、著者らは分析操作の迅速性および簡便性を意図し、培養物および穀類中からの Ze を除タンパク処理、TLC および Sephadex LH-20 などの clean up を行わず分離精製し、*N, O*-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (以下 BSTFA と略記) で TMS 誘導体とし、定温 GC で測定する分析法を検討した。そして、*Fusarium* 属の培養物および穀類試料からの定量分析に適用を試みたところ、良好な結果を得たので報告する。

実験方法

1. 試 薬

(1) Ze 標準溶液: Ze (国立衛生試験所真菌室より分与) 1 mg を精秤し、アセトン少量に溶解し、ベンゼン—アセトニトリル (98:2) 混液を加えて 0.1 mg/ml の液とする。

(2) 内部標準溶液: Cholesterol formate (東京化成(株)製) 10 mg を精秤し、酢酸エチルに溶解して 0.2 mg/ml の液とする。

(3) カラムクロマト用充てん剤: silica gel 60 (70~230 mesh, Merck 社製) および Florisil (100~200 mesh, 和光純薬(株)製) を用いた。

(4) TMS 化剤: BSTFA (東京化成(株)製) を用いた。

(5) GC およびガスクロマトグラフ質量分析計 (以下 GC-MS と略記) 用充てん剤: 2% OV-1 (Gaschrom Q, 80~100 mesh, 西尾工業(株)製) を使用した。

(6) メタノール、*n*-ヘキサン、ベンゼン、アセトニトリル、アセトン、酢酸エチルおよび無水硫酸ナトリウムは残留農薬用、クロロホルムは特級品を蒸留して用い、他の試薬は特級品を使用した。

2. 装 置

(1) 粉砕器: サンプルミル (協立理工(株)製)

(2) ガスクロマトグラフ: GC-4 BMPFF 型 ((株)島津製作所製)

(3) GC-MS: 島津 LKB-9000 型 ((株)島津製作所製)

(4) GC および GC-MS 用カラム管: 長さ 1 m, 内径 3 mm のガラスカラム

(5) カラムクロマト管: 長さ 30 cm, 内径 2.2 cm のガラス管

3. 実験材料

添加回収実験に用いた小麦、大麦および玄米と実際の分析試料に用いた小麦および大麦は 1975 年の埼玉県内産のものを、*Fusarium* 属の培養試料は国立衛生試験所真菌室において分離同定されたアメリカ産とうもろこし由来の *Fusarium graminearum* 5 株, *Fusarium moniliforme* 3 株, *Fusarium oxysporum* 1 株, 未同定の *Fusarium* 1 株の他、輸入落花生由来の *Fusarium equiseti* 5 株, *Fusarium semitectum* 5 株の合計 20 株を 1% ペプトン添加滅菌精白米に接種し、25° で 1 週間培養後、15° で 2 週間培養を継続させたものを用いた。(国立衛生試験所真菌室の好意により作成)

4. 実験操作

(1) 試験溶液の調製

細切均一化した試料 50 g を 500 ml 共せん三角フラスコにとり、メタノール 200 ml を加え、30 分間振とう抽出した後ろ過し、ろ液 100 ml を取る。これに 1% 塩化ナトリウム溶液 80 ml を加え、*n*-ヘキサン 70 ml で洗浄後、クロロホルム 50 ml で 2 回抽出し、抽出液を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水し、約 10 ml まで減圧濃縮する。この濃縮液にベンゼン 40 ml を加え、silica gel 10 g, Florisil 10 g および無水硫酸ナトリウム 10 g をベンゼンで湿式積層させたクロマトカラム上に注ぎ、ベンゼン 150 ml で洗浄し、ベンゼン—アセトン (9:1) 混液 150 ml で溶離する。

溶離液は減圧濃縮後、10 ml 共せん試験管に移して溶媒を留去し、残留物を酢酸エチル 0.1 ml に溶解し、BSTFA 0.15 ml を添加して TMS 化し、内部標準溶液 0.25 ml を加えて試験溶液とした。

(2) 検量線用試験溶液の調製

Ze 標準溶液 0.05 ml から 0.6 ml の範囲を適宜 10 ml 共せん試験管にとり、溶媒を留去し、酢酸エチル 0.1 ml, BSTFA 0.15 ml および内部標準溶液 0.25 ml を加えて試験溶液とした。

(3) GC および GC-MS の操作条件

GC 検出器: FID

検出器および注入口温度: 250°

カラム温度: 230°

キャリアーガスおよび流量: N₂, 55 ml/min

水素および空気流量: 45 ml/min および 0.8 L/min
検出感度: 10^8 M $\Omega \times 0.16$ V

注入量: 1 μ l

GC-MS 検出器: TIC

注入口およびカラム温度: 250° および 240°

セパレーターおよびイオン源温度: 270° および 290°

キャリアガスおよび流量: He, 30 ml/min

イオン化および加速電圧: 70 eV および 3.5 kV

トラップ電流: 60 μ A

実験結果および考察

1. TMS 誘導体の生成条件の検討と確認

TMS 化剤として一般的には hexamethyldisilazane (以下 HMDS と略記)—TMCS—ピリジン混液が用いられているが、これは反応性が悪くピリジンを用いる難点がある。そこで、TMCS やピリジンを用いないで、反応溶媒に酢酸エチルを使用し、BSA, BSTFA, *N*-methyl-*N*-trimethylsilyl trifluoroacetamide (以下 MSTFA と略記), *N*-trimethylsilyl imidazole (以下 SIM と略記) および *N*-methyl-*N*-trimethylsilyl acetamide (以下 SMA と略記) の試薬を用いて反応性を検討した。その結果、SIM は 60.5% と反応性が悪く、BSA は Mirocha ら⁷⁾が用いているように TMCS を添加しないと 100% 反応が進まず、SMA および MSTFA は 100% の反応に時間を要し、前後に他のピークが出現しやすい。それに比較し、BSTFA は数分で 100% TMS 化が進み、他のピークも認められず、TMS 化剤として最適であった。

反応溶媒は酢酸エチル、アセトン、アセトニトリル、メチレンクロライド、メチルイソブチルケトン、ジメチルホルムアミドおよびクロロホルムの 7 種類を用いて比較したところ、いずれの溶媒も良好な反応性を示したが、Ze の溶解性が高く、安定性の良い酢酸エチルが好適であった。

Fig. 1. Effect of reaction time on production of the TMS-derivative of zearalenone

Reaction solvent, ethyl acetate 100 μ l;
amount of BSTFA, 150 μ l; applied zearalenone, 25 μ g.

反応時間は酢酸エチル溶媒中室温で調べた結果、Fig. 1 に示すように、BSTFA 添加後 5 分にはほぼ 100% TMS 化されることが認められた。また、この状態での TMS 誘導体の安定性は Fig. 2 に示すように、冷所では 5 日間、室温では 4 日間安定であり、以後急激に分解することが認められた。

BSTFA 試薬の添加量は Fig. 3 に示すように、酢酸エチル 100 μ l に対して 150 μ l の添加量で十分定量性が認められた。

以上の TMS 化条件で得られたガスクロマトグラム上の単一ピークを GC-MS で測定した結果、Fig. 4 に示すマススペクトルが得られ、*m/e* 462 である di TMS-Ze

Fig. 2. Effect of storage at 5°C or room temp. on the TMS-derivative of zearalenone

○—○, at 5°C; ●—●, at room temp.
applied zearalenone, 25 μ g/250 μ l; solution, ethyl acetate 100 μ l + BSTFA 150 μ l.

Fig. 3. Effect of amount of BSTFA on production of the TMS-derivative of zearalenone

Reaction time, 10 min.; reaction solvent, ethyl acetate 100 μ l; applied zearalenone, 25 μ g.

Fig. 4. Mass spectrum of the TMS-derivative of zearalenone obtained on LKB-9000 GC-MS

Fig. 5. Typical gas chromatogram of the TMS-derivative of zearalenone

A, TMS-zearalenone 50 ng; B, cholesterol formate 100 ng; column, 2% OV-1/Gaschrom Q (80~100 mesh) 1.0 m; temp., 230°C; N₂ flow rate, 55 ml/min; sens. 10³ MΩ×0.16 V; injection volume, 1 μl

を確認した。これは Mirocha ら⁷⁾ のマススペクトルと一致した。

2. GC 用充てん剤の選択と検量線の作製

充てん剤としてはガスクロム Q を担体とした 2% DEGS, 0.5% NPGS, 2% OV-1, 5% SE-30, 8% QF-1 および 1% OV-17 のカラムを用いて選択した結果, 2% OV-1, 5% SE-30, 8% QF-1 および 1% OV-17 などの silicone 系カラムで分離検出は十分可能であった。特に 2% OV-1 カラム (3 mm×1 m) は Fig. 5 に示したように, TMS 誘導体の定温 GC 分析において tailing の少ない高感度の単一ピークが得られた。

検量線は 4. (2) の検量線用試験溶液の調製の項に従い行ったところ, Fig. 6 に示すように, Ze として 0.015 ~ 0.12 μg の範囲でほぼ直線性を示し, 検出限界は 0.01

Fig. 6. Calibration curve for zearalenone

The detector response was measured as the relative peak height based on the internal standard.

Column, 2% OV-1/Gaschrom Q (80~100 mesh) 1.0 m; temp.; 230°C; N₂ flow rate, 55 ml/min; sens. 10³ MΩ×0.16 V

であった。Ze の直接測定法¹²⁾ では, 溶媒ピークが太く tailing するため感度は低く, 検出限界は 0.2 μg 前後であった。

3. 穀類からの抽出 clean up の検討

杉本¹²⁾, Eppley¹³⁾, Stoloff¹⁷⁾ および Thomas ら²⁰⁾ はメタノール-4% 塩化ナトリウム (11:9), クロロホルム-水 (10:1), アセトニトリル-4% 塩化カリウム (9:1) およびメタノール-水 (6:4) 混液で抽出し, *n*-ヘキサンまたは *iso*-オクタンで洗浄後, silica gel カラムクロマトグラフィーを行い TLC および GC 分析を行っている。また, Mirocha ら⁷⁾ は酢酸エチル抽出物を 1 N 水酸化ナトリウム溶液に転溶し, 2 N リン酸溶液で pH 9 に調整後クロロホルムで再抽出し, TLC clean up を行った後 GC 分析を行っている。

最初に, 迅速かつ簡便性の観点から, 除タンパク処理と TLC clean up 操作を行わず, これらの抽出方法と silica gel カラムクロマトグラフィーを組み合わせ検討した結果, いずれの方法も TMS 誘導体のピークを妨害する物質は除去できず, Ze の測定は困難であった。

そこで, マイコトキシンの抽出に一般に用いられている, メタノール-1% 塩化ナトリウム (11:9) 混液の抽出液をクロロホルムで再抽出する操作に, silica gel と Florisil の二層カラムクロマトグラフィーを組み合わせ検討した。その結果, 小麦, 大麦および玄米の空試験において TLC clean up を行わなくても妨害物質は除去され, Ze の測定は可能となった。

しかし, 杉本ら¹²⁾ の報告に述べられているように, 試料によってはメタノール-1% 塩化ナトリウム (11:9) 混液の抽出液をクロロホルムで再抽出するとき, 両液層

の分離は悪く、実験操作上困難を生じやすいことから、最初の抽出をメタノール抽出とし、この抽出液に1%塩化ナトリウム溶液を5:4の割合になるように加えた後、*n*-ヘキサンで洗浄後、クロロホルムで再抽出した。この結果、特に分離しにくい小麦試料の場合でも、酢酸鉛溶液の除タンパク処理を行わなくても分離は良好となり、実験操作が非常に容易となった。

5. 穀類における回収試験

4. (1) の試験溶液の調製の項に従い、小麦、大麦および玄米の試料に0.4 ppmの濃度になるよう Ze を添加して回収試験を行った。その結果、Ze の TMS 誘導体および内部標準物質を妨害するピークは認められず、回収率は Table 1 に示すように、平均71.8~87.6%を得、分析限界は0.2 ppmであった。

6. *Fusarium* 属培養試料への適用

精白米培養を行った *Fusarium* 菌株の *F. grami-*

nearum, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. semitectum* および未同定の株を含めて6種20株について本法を適用し、Ze 生産性を調べたところ、Table 2 に示す測定結果が得られ、*F. graminearum* と *F. equiseti* の1株に Ze 生産性が認められた。ガスクロマトグラムは Fig. 7 にその一例を示し、検出されたピークは GC-MS で diTMS-Ze であることを確認した。

7. 国産麦類への適用

1975年の埼玉県内産小麦10検体および大麦9検体について Ze の分析を行った結果、Table 3 に示すように、Ze はいずれの検体からも検出されなかった。

また、これらの試料について *Fusarium* 属の検出を行ったところ、小麦の6検体から *F. graminearum* 6株、*F. oxysporum* 3株および *F. sambucinum* 1株が分離され、それらの Ze 生産性を調べた結果、Table

Table 1. Recoveries of Zearalenone Added to Various Cereals

Cereal	Recovery at level added of 0.4 ppm (%)	Average (%)
Wheat	80.9, 78.5, 82.4, 75.4, 76.4	78.7
Brownrice	76.4, 95.7, 90.9, 86.0, 88.8	87.6
Barley	60.9, 78.2, 71.2, 75.1, 73.8	71.8

Table 2. Production of Zearalenone by *Fusarium* Species

Species	Strain No.	Origin	Zearalenone yield (μg/g)
<i>F. graminearum</i>	F-603	US corn	3051
"	F-608	"	635
"	F-609	"	48
"	F-614	"	13
"	F-615	"	6
<i>F. moniliforme</i>	F-616	"	ND
"	F-620	"	ND
"	F-621	"	ND
<i>F. oxysporum</i>	F-622	"	ND
<i>F. sp.</i>	F-633	"	ND
<i>F. equiseti</i>	F-582	Imported peanut	4
"	F-688	"	ND
"	F-689	"	ND
"	F-692	"	ND
"	F-700	"	ND
<i>F. semitectum</i>	F-672	"	ND
"	F-675	"	ND
"	F-678	"	ND
"	F-702	"	ND
"	F-704	"	ND

ND, Not detected

Fig. 7. Gas chromatograms of the silylated extracts from milled rice inoculated with *Fusarium graminearum* and *Fusarium equiseti* (incubation at 25°C for 1 week and at 15°C for 2 weeks)

A, TMS-zearalenone; B, cholesterol formate (internal standard) Column, 2% OV-1/Gaschrom Q (80~100 mesh) 1.0 m; temp., 230°C; N₂ flow rate, 55 ml/min; sens. 10³ MΩ×0.16 V; injection volume, 1 μl.

4に示すように、*F. graminearum* 3株より 0.23~0.77 μg/g の産生が認められた。

要 約

培養物および穀類中からの Ze を除タンパク処理および TLC clean up を行わず、簡便に定温 GC で分析する方法を検討した。

Table 4. Production of Zearalenone by *Fusarium* Species Isolated from the Wheat and Barley of Saitama Growth in 1975

Species	No. of strains examined	Zearalenone producer	Yield (on rice μg/g)
<i>F. graminearum</i>	6	3	0.23~0.77
<i>F. oxysporum</i>	3	0	ND
<i>F. sambucinum</i>	1	0	ND

ND, Not detected

文 献

- 1) Stob, M., Baldwin, R. S., Tuite, J., Andrews, F. N., Gillette, K. G.: *Nature*, **196**, 1318 (1962).
- 2) Christensen, C. M., Nelson, G. H., Mirocha, C. J.: *Appl. Microbiol.*, **13**, 653 (1965).
- 3) Mirocha, C. J., Christensen, C. M., Nelson, G. H.: *ibid.*, **15**, 497 (1967).
- 4) Urry, W. H., Wehrmeister, H. L., Hodge, E.

Table 3. Analytical Result of Zearalenone in the Wheat and Barley of Saitama Growth in 1975

Sample	No. of sample examined	Zearalenone (ppm)
Wheat	10	ND
Barley	9	ND

ND, Not detected

1) Ze は酢酸エチル溶媒中 BSTFA 試薬によって容易に TMS 化され、2% OV-1 (3mm×1m) カラムを用いた定温 GC で良好な分離能を示し、検出限界は 0.01 μg と高感度であった。

2) 培養物および穀類中からの抽出 clean up は、メタノール抽出液に 1%塩化ナトリウム溶液を 5:4 の割合になるよう加え、*n*-ヘキサンで洗浄後クロロホルムで再抽出し、silica gel と Florisil の二層カラムクロマトグラフィーを行うのが迅速かつ簡便であった。

3) 本分析法による穀類からの回収率は、0.4 ppm 添加で 71.8~87.6%を得た。また、*Fusarium* 属20株の培養試料に適用した結果、*F. graminearum* と *F. equiseti* から 4~3051 μg/g の Ze を検出した。

4) 1975年の埼玉県内産の小麦と大麦を分析した結果、Ze は検出されなかったが、Ze を産生する *F. graminearum* 3株が分離された。

終りに臨み、Ze 標準品の分与ならびに *Fusarium* 属の培養試料の作製をお願いした国立衛生試験所一戸正勝博士、宇田川俊一博士、倉田浩博士の各位に深謝の意を表します。

B., Hidy, P. H.: *Tetrahedron Letter*, **27**, 3109 (1966).

5) Caldwell, R. W., Tuite, J.: *Phytopathol.*, **60**, 1696 (1970).

6) Shotwell, O. L., Hesseltine, C. W., Goulden, M. L., Vandegraft, E. E.: *Cereal Chem.*, **47**, 700 (1970).

7) Mirocha, C. J., Schauerhamer, B., Pathre, S. V.: *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, **57**, 1104

- (1974).
- 8) Stoloff, L., Henry, S., Francis, J. O. J.: *ibid.*, **59**, 118 (1976).
- 9) Shottwell, O. L., Goulden, M. L., Bothast, R. J., Hesseltine, C. W.: *Cereal Chem.*, **52**, 687 (1975).
- 10) Miller, J. K., Hacking, A., Harrison, J., Gross, V. J.: *Veterinary Record*, **93**, 555 (1973).
- 11) Ishii, K., Sawano, M., Ueno, Y., Tsunoda, H.: *Appl. Microbiol.*, **27**, 625 (1974).
- 12) 杉本貞三, 南沢正敏, 高野和子, 古川靖子: *食衛誌*, **17**, 12 (1976).
- 13) Eppley, R. M.: *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, **51**, 74 (1968).
- 14) Caldwell, R. W., Tuite, J., Stob, M., Baldwin, R.: *Appl. Microbiol.*, **20**, 31 (1970).
- 15) Owens, R. G., Wetiy, R. E., Lucs, G. B.: *Anal. Biochem.*, **35**, 249 (1970).
- 16) Ueno, Y., Ishikawa, Y., Nakajima, M., Sakai, K., Ishii, K., Tsunoda, H., Saito, M., Enomoto, M., Ohtsubo, K., Umeda, M.: *Japan J. Exp. Med.*, **41**, 257 (1971).
- 17) Stoloff, L., Neshein, S., Yin, L., Rodricks, J. V., Stack, M., Campbell, A. D.: *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, **54**, 91 (1971).
- 18) Eppley, R. M., Stoloff, L., Trucksess, M. W., Chung, C. W.: *ibid.*, **57**, 632 (1974).
- 19) Sarudi, I. J.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **154**, 65 (1974).
- 20) Thomas, E., Eppley, R. M., Trucksess, M. W.: *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, **58**, 114 (1975).
- 21) Wilson, D. M., Tabor, W. H., Trucksess, M. W.: *ibid.*, **59**, 125 (1976).
- 22) Seitz, L. M., Mohr, H. E.: *ibid.*, **59**, 106 (1976).
- 23) Malaiyandi, M., Barrette, J. P., Wavrock, P. L.: *ibid.*, **59**, 959 (1976).
- 24) Holder, C. L., Nony, C. R., Bowman, M. C.: *ibid.*, **60**, 272 (1977).