食品中の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による分析法

(昭和 53 年 11 月 15 日受理)

黒田 弘之* 毛利 孝明* 西岡 千鶴*
岡崎 秀信* 高樹 正浩*

Studies on Gas Chromatographic Determination of Trichothecene Mycotoxins in Food

Hiroyuki KURODA, Takaaki MÖRI, Chizuru NISHIOKA
Hidenobu OKASAKI and Masahiro TAKAGI

(Kagawa Prefectural Institute of Public Health:
17-28, Matsushima-cho 1-chome, Takamatsu, Kagawa)

Several methods for the determination of trichothecene mycotoxins in food have been published. Most of them, however, are not always satisfactory. In this paper trichothecenes were converted to their TMS derivatives by the reaction with silylating agent (*N*-trimethyl imidazol (1) : trimethyl chlorosilane (0.2) : pyridin (9)) and analyzed by gas chromatography equipped with an electron capture detector.

The minimum limits of quantitation were approximately 0.002 ng for nivalenol, deoxynivalenol, fusarenon-X and 0.4 ng for neosolaniol, diacetoxyscirpenol, T₂-toxin.

This method was applicable to ultra micro analysis of trichothecenes, and by this method, trichothecenes in the range of 0.02~5.2 ppm were detected in wheat and barley collected from Kagawa area in 1977.

(Received November 15, 1978)

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を与えており、その病原菌である *Fusarium* 属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などがあるが検出感度の点で十分であるとはいえなかった。我々は天野ら²⁾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。また本法を用いて市販食品およびほ場より採集した麦類を分析し

た結果についても併せて報告する。

実験方法

1. 試料

1) てんぷら粉、小麦粉、押麦、そうめん、ビスケット、トウモロコシ、しょう油、大豆、ほしうどんおよ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および小麦を自然乾燥後細粉した。

3) 香川大学農学部芳沢氏より分与された汚染の明らかな大麦 (香川県産) およびトウモロコシ (米国産) 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、ジノニルフタレート (DNP): 和光純薬工業 (株) 製特級品を用いた。

2) ビリジン: 市販の特級品を蒸留後水酸化カリウ

* 香川県衛生研究所: 高松市松島町 1-17-28

ムを入れて乾燥保存したものを使用した。

3) フロリジル: 米国フロリジン社製のものを 105° で 2 時間活性化後使用した。

4) イオン交換樹脂アンバーライト XAD-2: オルガノ社製のものを水, 1N 水酸化ナトリウム溶液, メタノールで交互に洗浄化後使用した。

5) トキシシン標準品: 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), T₂-toxin (T₂) 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: トリメチルシリルイミダゾール (TMIM)・トリメチルクロルシラン (TMS)・ピリジン (1:0.2:9) はいずれもガスクロ工業 (株) 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 (株) 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): (株) 島津製作所製 GC-4 BM 型 FID, ECD (⁶³Ni) 付

4. 実験操作

4.1 試験溶液の作製³⁾

粉碎した試料 25 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 で分液漏斗に移し *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⁴⁾

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: クロロホルム: メタノール (5:95, 20:80)

3) 発色剤: 50% 塩化アルミニウム溶液

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 および内部標準溶液 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。また 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。Scheme 1 に試験方法の概略を示した。

1) カラム: 2% OV-17/クロモソルブ W, 2% SE-

Scheme 1. Analytical method of tricothecenes

30/ガスクロムQ, 1 m ガラス管

2) カラム温度: 225°

3) キャリヤガス: 40 ml/min 窒素ガス

4) チャートスピード: 5 mm/min

実験結果および考察

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²⁾により研究されている。筆者らはこの TMS

体を *n*-ヘキサンで100倍に希釈後、FID-GC, ECD-GC の感度を比較したところ Fig. 1 に示すとおり 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、

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)
Diacetoxyscirpenol	30	0.4
Neosolaniol	30	0.2
T ₂ -Toxin	60	0.4

Fig. 1. Detection limits and chemical structures of trichothecenes

Fig. 2. Gas chromatograms of TMS ethers of trichothecenes

Fig. 3. Calibration curves of TMS ether of trichothecenes

Fig. 4. Stability of TMS ethers of trichothecenes

type B (DS, NS, T₂) 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ないと思われる。Fig. 2 に type A の TSM

Table 1. Recoveries of Trichothecenes added to Food

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

体の FID, ECD-GC の標準クロマトグラフを示した。また Fig. 3 に type A のトリコテセン化合物の検量線を示した。また *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 に示すとおり 400 日後もほとんど変化は認められなかった。

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⁹⁾の方法に従って type A のトリ

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	Sōmen	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 noodle)	ND(0.003<)	ND(0.003<)	ND(0.006<)
10	Buckwheat flour	ND(0.003<)	ND(0.003<)	ND(0.006<)

コテセン化合物をそうめん、ビスケット、とうもろこしに 1 ppm 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 および ECD-GC による分析値とよく一致した結果が得られた。また、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。ただしとうもろこし、しょう油では XAD カラムによるクリアアップが十分でなく若干検出限界が他の食

品より上回った。

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) およびとうもろこし⁹⁾ (1972 年産) について本法を用いて分析したところ Table 3 に示したとおり 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産のとうもろこしからは DN だけが検出され日本と米国ではトリ

Table 3. Analytical Result of Trichothecenes in Fusarium-infected Grain

No.	Sample	Deoxynivalenol (ppm)		Nivalenol (ppm)		Fusarenon-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)	22	24	ND	ND	ND	ND

Table 4. Analytical Result of Trichothecenes in Barley and Wheat (Kagawa 1977)

No.	Sample	Detector	Fusarenon-X	Diacetoxy-scirpenol	T ₂ -Toxin	Deoxynivalenol	Nivalenol
1	Barley	TLC FID ECD	— — (0.05 <) — (0.006 <)	— — (0.25 <)	— — (1 <)	— 0.43 0.06	— 0.08 0.14
2	Barley	TLC FID ECD	— — (0.05 <) — (0.006 <)	— — (0.25 <)	— — (1 <)	— 0.32 0.10	— 0.41 0.28
3	Barley	TLC FID ECD	— — (0.05 <) — (0.006 <)	— — (0.25 <)	— — (1 <)	+ 0.99 0.94	± 0.52 0.53
4	Barley	TLC FID ECD	— — (0.05 <) — (0.006 <)	— — (0.25 <)	— — (1 <)	+ 0.70 0.50	± 1.6 1.67
5	Barley	TLC FID ECD	— — (0.05 <) — (0.006 <)	— — (0.25 <)	— — (1 <)	++ 3.0 3.1	++ 4.9 5.2
6	Barley	TLC FID ECD	— — (0.05 <) — (0.006 <)	— — (0.25 <)	— — (1 <)	+ 0.44 0.21	± 0.46 0.45
7	Wheat	TLC FID ECD	— — (0.05 <) — (0.006 <)	— — (0.25 <)	— — (1 <)	— 0.51 0.02	— trace 0.015
8	Wheat	TLC FID ECD	— — (0.005 <) — (0.006 <)	— — (0.25 <)	— — (1 <)	— 0.29 0.07	± 0.14 0.14
9	Wheat	TLC FID ECD	— — (0.05 <) — (0.006 <)	— — (0.25 <)	— — (1 <)	— 0.31 0.11	— 0.07 0.036

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

コテセン化合物の生産菌の違いがあり興味深い。また 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ムが得られた。次には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 および 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およ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にくく真の値に近いものと推定される。芳沢¹⁾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、このように外観上、正常な麦のすべてから 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。また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 に示したとお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。

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 0.002~0.4 ng の高感度であり、溶媒のテーリングもな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、ほ場より採集した外観上、正常な麦 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。

終わりに、本研究を行うに当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) 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, 368 (1972).
- 2) 天野立爾, 田中邦幸, 川田公平, 田辺弘也: 同上, 15, 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: 同上, 19, 443 (1978).
- 4) 直井家壽太, 斉藤和夫, 風岡栄治, 小川仁志, 木村康夫: 東京衛研年報, 23, 175 (1971).
- 5) D. M. Forsyth, T. Yoshizawa, N. Morooka, J. Tuite: Appl. Environ. Microbiol., 34, 547 (1977).