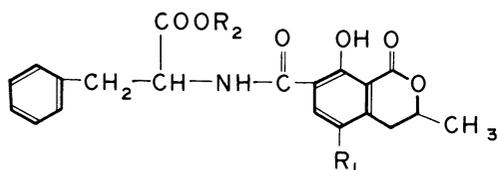


マイコトキシンに関する研究 オクラトキシンの抽出と分析について

矢崎 廣久* 高橋 治男* 七山 悠三*

I. 緒 言

オクラトキシンは、南アフリカの研究グループにより、肝および腎障害とカビ毒との関連化合物として発見された。¹⁾オクラトキシンの産生菌は、*Aspergillus ochraceus*をはじめ7種の*A. ochraceus*菌群、および*Penicillium viridicatum*など5種の*penicillium*菌群が報告されている。²⁻⁷⁾また、オクラトキシンの毒性本体としては、6種の代謝産物(図1)が知られているが、とりわけオクラ



	R ₁	R ₂
オクラトキシン A	Cl	H
オクラトキシン B	H	H
オクラトキシン C	Cl	C ₂ H ₅
オクラトキシンAメチルエステル	Cl	CH ₃
オクラトキシンBメチルエステル	H	CH ₃
オクラトキシンBエチルエステル	H	C ₂ H ₅

図1 オクラトキシンの構造式

トキシンAは動物に対する毒性が強いため、食品衛生上問題視されている。^{1),4)}数年来、著者らはオクラトキシンについて種々の課題を検討しているが、今回、トキシンの抽出分離と検出を試み、若干の知見を得たので報告する。

II. 実験方法

1. 試薬および測定装置

(1) 試 薬

- ① オクラトキシンA標準品 (Makor chemicals Ltd.) をクロロホルムまたはベンゼン-アセトニトリル (98+2) 混液に溶かし、100 μg/ml 濃度とした。
- ② 薄層クロマト用プレートは、Adsorbosil-1 (0.25mm, 20×20cm) および Wako gel plate を 110 °C, 2時間活性化して用いた。
- ③ カラムクロマト用シリカゲルは、Merck kieselgel 60 (0.063~0.200mm) を 110 °C, 2時間活性化後、水をシリカゲル重量の0.5%加え混和して使用した。
- ④ 各種試薬類および有機溶媒 (和光純薬製) は、すべて特級を用い、抽出用溶媒は蒸留したものを使用した。

(2) 測定装置

- ① 薄層用自記濃度計：島津二波長クロマトスキャナーCS-900
検出器：蛍光検出器 (高圧水銀ランプ使用),
Ex. 365nm, Em. 450nm, 500nm
モード：反射リニアスキャンニング
- ② 高速液体クロマトグラフ：日立液体クロマトグラフ 634形, 635形
検出器：蛍光分光光度計日立204, (Xeランプ使用)
Ex. 313nm, Em. 490nm
カラム：日立ゲル#3030 (4mmID×1000mmL)
移動層：2%酢酸飽和クロロホルム-水飽和n-ヘキサン (7+3)
流量, 圧力：0.5ml/min, 69kg/cm² 日本分光高速液体クロマトグラフFLC-350形
検出器：蛍光分光光度計 UVIDEC FP-4 (Xeランプ使用), Ex. 330nm, Em. 470nm

* 千葉県衛生研究所
(1978年2月18日受理)

カラム：JASCOPACK-SS-05 (2.3mmID×500mmL)

移動層：ジクロロメタン-イソプロピルアルコール (1+1)

流量, 圧力：1.0ml/min, 75kg/cm²

2. 培養および抽出分離

(1) 培養方法

培養基は穀類および液体培地を使用し、オクラトキシン産生菌 *A. ochraceus* IFM4443株を接種した。穀類は米、小麦、大麦を用い、液体培地は、4% シュークローズと2% イーストエキス含有のものとした。培養は、300mlのマイヤーに穀類30g、水15mlづつ加え、液体培地の場合は全量を100mlとして、滅菌後、28°C、9日間暗所で静置培養を行った。

(2) 抽出法

試料からオクラトキシンを抽出分離する方法を図2に示した。培養基に酢酸エチルエステル100mlを

チルで2回抽出をくり返す。

これらの抽出液は約50mlになるまで減圧濃縮し、口過後、5%炭酸ナトリウム溶液50mlで各10分間、2回転溶をくり返す。得られた炭酸ナトリウム溶液層は、18%塩酸を用いてPH1とした後、50mlクロロホルムで10分間、2度逆抽出を行う。次いでクロロホルム層を50mlの水で洗浄、無水硫酸ナトリウム脱水後、減圧乾固して約10mlのクロロホルムを加え試料液とする。

(3) 分離精製

(2)の操作で得られた試料液について、カラムクロマトグラフィーを行った。1.5×30cmのクロマト用カラム管に、カラムの約半分の高さまでクロロホルムを満たし、無水硫酸ナトリウム5g、0.5%含水キーゼルゲル15g、無水硫酸ナトリウム10gを層積した後、試料液をカラム管に移して流下させ、続いてクロロホルム-メタノール(97+3)を10ml/minの流出速度で、15mlづつ取り、分離フラクションとする。各フラクションは薄層クロマトグラフィー(TLC)で確認を行い、オクラトキシンAとオクラトキシンBのフラクションに分離する。

3. 定性および定量

(1) 薄層クロマトグラフによる検出

2-(3)の操作で得られたカラム溶離液を、アドソルブジル-1またはワコーゲルプレートにスポットし、アセトン-1%フェノール-酢酸エチル(16+3+16)あるいはアセトン-水-酢酸エチル(4+1+4)を用いて展開を行う。展開後、3650Åの紫外線燈下でオクラトキシンの緑青色蛍光の有無を判定する。なお、定量値を求める場合は、本操作で得られた薄層プレートを蛍光検出器付薄層用自記濃度計を用いて測定する。励起波長365nm、蛍光波長450nmまたは500nmにセットし、オクラトキシン標準品を、あらかじめ0.1μg/spot~2.0μg/spotの濃度範囲で数点スポットしたものをを用いて検量線を作成する。測定はすべて反射リニアスキャンニング法により行った。

(2) 高速液体クロマトグラフによる検出

オクラトキシン検出の際、カラムは有機系トータリーポーラスポリマーゲルのJASCOSIL-SS-05および日立ゲル#3030、移動相として2%酢酸飽和クロロホルム-水飽和n-ヘキサン(7+3)、またはイソプロピルアルコール-ジクロロメタン(1+1)を用いて行う。検出器は、注入溶媒の影響を受けにくく、高感度検出可能な蛍光分光検出器を

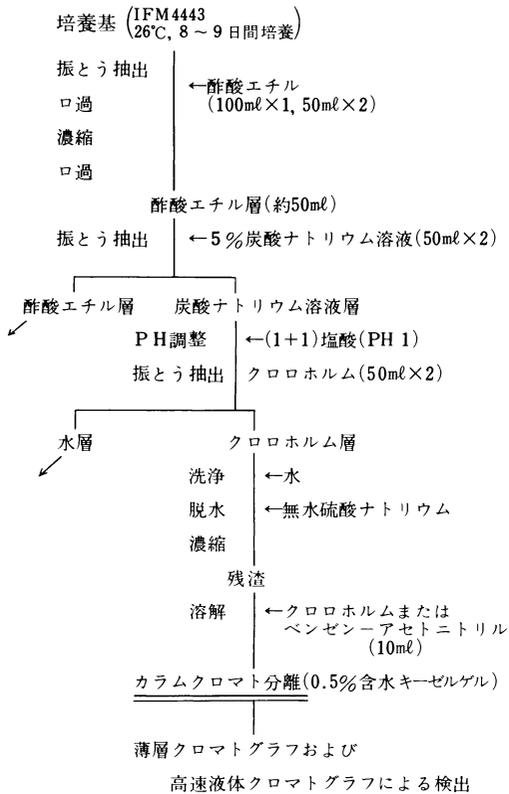


図2 オクラトキシン分離精製のフローチャート

加えて15分間振とう抽出を行い、同様に50ml酢酸エ

使用した。オクラトキシン標準クロロホルム溶液により、 $0.05\mu\text{g/ml} \sim 2\mu\text{g/ml}$ の範囲で検量線を作成し、試料中のトキシンを算出する。

III. 実験結果および考察

1. 培養基の選択

A. *ochraceus* 株を、各培養基別に培養した場合のオクラトキシン収量 (平均値) を表1に示す。液体培地は、

表1 培養基別オクラトキシン産生量の比較

穀物培地→30g 穀物+15ml H₂O/300ml マイヤー } 28℃ 9日間
 液体培養→4%シュクローズ }
 2%イーストエクトラクト 100ml H₂O/300ml マイヤー } それぞれ10本

AcoEt 抽出→分離精製・定量

培地の種類 産生量	穀物培地				液体 培地
	米	大麦(粍)	小麦	割小麦	
300ml マイヤー 1本あたりの OchraAの含量	6.7mg	21.5mg	23.8mg	28.3mg	0.1mg

*含量は抽出物の薄層クロマトスキャナーによる定量値から算出した。

培養後の抽出操作が容易な反面、天然物培養基よりトキシンの収量は悪いと言われているが、本実験においてもその傾向が見られた。

2. 抽出法の検討

(1) 抽出溶媒の選択

培養物の抽出に際し、通常実験室で汎用される溶媒11種について抽出率を調べた。オクラトキシンA添加の割小麦による実験結果では、クロロホルム、ベンゼン、テトラヒドロフラン、エーテル、酢酸エチルエステルの5種類について良好な回収率が得られた。しかしながら、抽出後の有機溶媒層から、アルカリ溶液に転溶を行う際、エマルジョン形成に伴う妨害が見られない点を考慮して、酢酸エチルエステルを選択した。なお、本抽出段階は、滅菌および粗毒抽出を兼ねる為、操作的にも簡便である。

(2) 液々分配法の検討

抽出後のオクラトキシンは、液々分配操作によりクリーンアップする事とし、表2、図3に記載の条件検討を行った。トキシンの抽出後の酢酸エチル層から転溶を行うアルカリ溶液としては、5%炭酸ナトリウム溶液が最も良い回収率(表2)を示した。また、炭酸ナトリウム溶液層からの再抽出については、図3で明らかな様に(1+1)塩酸により水層のPH

表2 オクラトキシン抽出用アルカリ溶液の比較

濃度 & 種類	chart上の面積	相対比 (割合)%
3% NH ₃	2.2	84.6
1% NaOH	2.3	88.5
5% Na ₂ CO ₃	2.6	100
Sat. NaHCO ₃	2.0	76.9

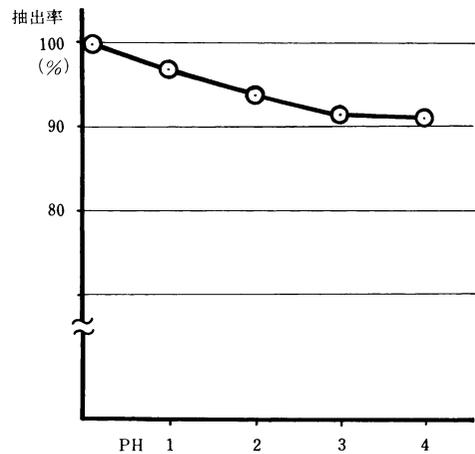


図3 オクラトキシン抽出におけるPH値および抽出率

(註) 抽出溶媒はクロロホルムを使用した。

を1とした後、クロロホルム抽出を2度行い、好結果を得た。

(3) カラムクロマトグラフィーによる分離精製

オクラトキシンは、カルボキシル基やフェノール性OH基を有する為、通常のシリカゲルカラムを使用した場合、極度に回収率が低下する。この為、過去いくつかの報告例においても、種々の工夫が行われた。^{1-2), 8-9)} 我々は、失活させた担体、すなわち含水キゼルゲルとメタノールを含む溶離溶媒を組み合わせる事により、操作的にもより簡易で収量良くトキシンを得る事が出来た。溶出は、はじめにオクラトキシンA、つづいてオクラトキシンBの順序であった。

3. 検出方法の検討

(1) 薄層クロマトグラフィー

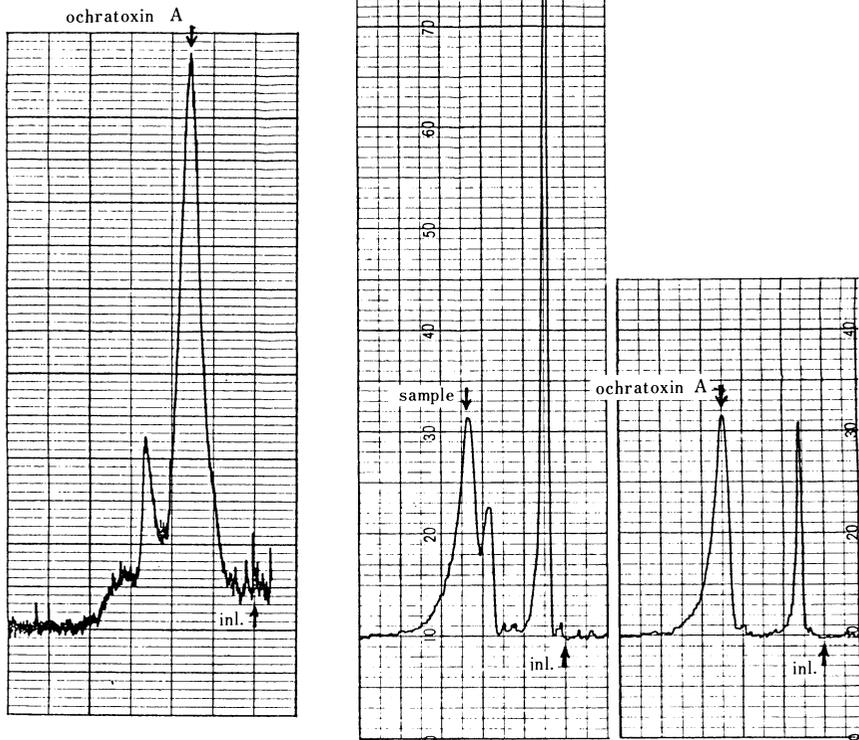
今回、薄層用自記濃度計を用いた実験で、 λ_{EX} , 365nm, λ_{EM} , 450および500nmの場合、 $0.1\mu\text{g} \sim 2\mu\text{g}$ の範囲で測定可能であった。オクラトキシンAは薄層上紫外線照射下で肉眼によっても10ng前後の確認が可能であるが、¹⁰⁻¹¹⁾ Nesheimおよび山崎らは、薄層用自記濃度計を用いて、それぞれ10~100ng, 0.17

~5 μ gの濃度で検量線が直線になると報告している。
2).¹²⁻¹⁴⁾したがって我々の結果も、これらの報告例
に近いものであった。

(2) 高速液体クロマトグラフィー

過去、有機物検出に多大な威力を発揮したガスク

ロマトグラフは、検出の際、試料の高温ガス化を余
儀無くされる為、オクラトキシン等の揮発性および
加熱安定性を欠く物質に関しては不向きであった。
そこで今回、高速液体クロマトグラフィーを応用し
て図4に示すクロマトグラム、および分析条件を得



CONDITION

INSTRUMENT 634, 635 dataNo _____
 SAMPLE ochratoxin A

 COLUMN 4 mmID×1000mmL, RT °C
 COLUMN PACKING 3030
 SOLVENT 2%acetic acid sat. CHCl₂

 (Gradient V= K₁= K₂=)
 FLOW RATE 0.5 ml/min
 PRESSURE 60 kg/cm²
 DETECTOR fluorescence, Ex313, Em490
 SENSITIVITY X10, 10 AUFs, RIUFS
 CHART SPEED 2.5 mm/min
 NOTE Xe lamp HITACHI
 DATE _____ OPERATOR _____

CONDITION

INSTRUMENT FLC-350 dataNo _____
 SAMPLE ochratoxin A, sample

SS-05-500
 COLUMN mmID ×500 mmL RT °C
 COLUMN PACKING JASCO PACK-SS-05
 COLVENT CH₂Cl₂-isopropyl alcohol

 (Gradient V= K₁= K₂=)
 FLOW RATE 1.0 ml/min
 PRESSURE 75 kg/cm²
 DETECTOR fluorescence, Ex330, Em470
 SENSITIVITY _____ AUFs, RIUFS
 CHART SPEED 0.5 mm/min
 NOTE Xe lamp JASCO
 DATE _____ OPERATOR _____

図4 オクラトキシンAの高速液体クロマトグラム

た。さらに、図2の方法により抽出分離した米、小麦、大麦等の試料についても高速液クロ測定を試み、応用出来る事を確めた。高速液クロは、機器自体充分普及していない為、報告は余り見られないが、オクラトキシンに関する我が国の例として著者および五十畑らの報告がある。¹⁵⁻²¹⁾

IV. 結 び

A. ochraceus IFM4443株を用いて培養、抽出分離、精製、検出に関する検討を行った。培養には小麦等の穀類が最適であり、産生されたオクラトキシンは、初め酢酸エチルにより滅菌および粗毒抽出を行い、図2の方法に従って液々分配した後、失括した含水シリカゲルカラムにクロロホルム-メタノール混液を流下させ、オクラトキシンAおよびオクラトキシンBに精製分離した。分離後のトキシン検出は薄層クロマトグラフで行い、アセトン-水-酢酸エチル溶媒で展開後、紫外線燈下オクラトキシン個々の蛍光スポットにより、定性確認した。この場合、蛍光検出器付薄層用自記濃度計を並用して、0.1 μ g~2.0 μ gの濃度で検量線を作成すると定量が可能であり、検出限界は10ngであった。なお、有機系トータリーポーラスポリマーゲルカラムを用いた蛍光検出器付高速液体クロマトグラフを応用した場合も、高感度検出が可能であり、検量線は0.05 μ g/ml~2 μ g/mlの範囲で良好な直線性を示した。

おわりに臨み、本研究に対し培養物等のご援助を下さった国立衛生試験所衛生微生物部、一戸正勝博士、倉田浩部長および有益な助言や御協力をいただいた衛生研究所、安田敏子室長ならびに千葉大学、宮入正人教授に深謝致します。

V. 文 献

- 1) P.S.Steyn, *et al.*: Microbial toxins.Vol.VI,179~203, Academic press, New York, 1971
- 2) S. Nesheim: Isolation and purification of ochratoxins A and B and preparation of their methyl and ethyl esters, J.Assoc.Offic.Anal. Chem., 52, 975~979, 1969 Ibid. 50(2), 370~371, 1967
- 3) C. W. Hesseltine, *et al.*: Aspergilli as ochratoxin producers, Mycologia, 64, 539~550, 1972
- 4) J. Harwig, *et al.*: Mycotoxins, 345~367, Elsevier, Amsterdam, 1974
- 5) W.van Walbeek, *et al.*: *penicillium viridicatum* Westling:a new source of ochratoxin A, Can. J. Microbiol., 15, 1281~1285, 1969
- 6) P.M.Scott, *et al.*: Mycotoxins (Ochratoxin A, Citrinin, and Sterigmatocystin) and Toxicogenic Fungi in Grains and Other Agricultural products, J.Agr.Food Chem., 20(6) 1103~1109, 1972
- 7) 一戸正勝, 倉田 浩: マイコトキシン産生糸状菌の汚染の現状とその問題点, 食衛誌, 17, (5), 337~344, 1976
- 8) F.S.Chu, M.E.Butz, : Spectrophotofluorodensitometric Measurement of Ochratoxin A in Cereal products, J.Assoc.Offic.Anal.Chem., 53, (6), 1253~1257, 1970
- 9) S.Nesheim, *et al.*: Analysis of Ochratoxins A and B and Their Esters in Barley, Using Partition and Thin Layer Chromatography. I. Development of the Method, J.Assoc.Offic.Anal.Chem., 56, (4), 817~821, 1973 Ibid. 56(4), 822~826, 1973
- 10) 田辺弘也, 鈴木 隆, : マイコトキシンの衛生化学, 衛生化学, 15(2), 45~57, 1970
- 11) 田辺弘也, : マイコトキシン試験法の進歩, ぶんせき, 3, 172~177, 1975
- 12) W. Horwitz, *et al.* edit.: Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, (Twelfth Edition), 477~478, The AOAC, Benjamin Franklin, Washington, 1975
- 13) M. Uchiyama, *et al.*: A Case Report on the Detection of Ochratoxin A from Rice, J. Food Hyg. Soc. Japan, 17(1), 103~104, 1976
- 14) 宮木高明, 他: 米から分離した *Aspergillus ochraceus* の有害代謝産物について, 腐研報, 23, 41~46, 1970
- 15) 五十畑悦子: 高速液体クロマトグラフィーによるマイコトキシン類(かび毒)の分析について(2), 防菌防黴4(9), 27~31, 1976
- 16) 矢崎廣久, 安田敏子: マイコトキシンに関する研究(第2報), 穀類中のシトリニンとオクラトキシンAの同時検出について, 日本食品衛生学会第29回講演要旨, 21, 1975
- 17) 矢崎廣久, 安田敏子: マイコトキシンに関する研究, 高速液体クロマトグラフィーによるシトリニンとオクラトキシンAの同時検出について, 千葉衛研年報, 23, 101~106, 1973
- 18) 矢崎廣久, : 培養物からのマイコトキシン抽出, カ

- ピ毒研究連絡会, 第二回シンポジウム資料(於, 名古屋), 1975
- 19) 矢崎廣久, 他, :マイコトキシンに関する研究, Ochratoxinの抽出と分離分析について, 第15回千葉県公衆衛生学会講演会要旨, 39, 1977
- 20) 五十畑悦子:マイコトキシン(かび毒)と高速液体クロマトグラフィー, 和光純薬時報, 44(1), 30~33, 1975
- 21) 五十畑悦子:マイコトキシンの化学分析に関する研究(第6報), 高速液体クロマトグラフィーによるオクラトキシン, チトリニン, ペニシリン酸の同時分析, 日本食品衛生学会第29回講演要旨, 20, 1975

Studies on Mycotoxins

Extraction and Determination of the Ochratoxins

Hirohisa YAZAKI Haruo TAKAHASHI Yuuso NANAYAMA

Summary

A new procedure for the extraction, purification and detection of the ochratoxins, which is produced by the strain of *Aspergillus ochraceus*, was examined. Cereal grain was better medium for the production of ochratoxin rather than synthetic mediums. The toxic metabolites were extracted with ethyl acetate, and transferred to sodium carbonate solution. It was acidified with hydrochloric acid and extracted with chloroform. The mixture of ochratoxin A and B was separated by silicagel column chromatography.

As for quantitative analysis of the ochratoxin, each fraction was applied by thin-layer chromatography-fluorodensitometric method and high speed liquid chromatography. Good results could be obtained by such a method.