

# 食品汚染の赤かび毒に関する研究 トリコテセン系マイコトキシンの分析法

矢崎 廣久 高橋 治男

## Studies on *Fusarium* Toxins in Foods Analytical Procedures of Trichothecene Mycotoxins

Hirohisa YAZAKI and Haruo TAKAHASHI

### Summary

A method was described for the quantitative determination of 3 trichothecene mycotoxins (fusarenon-X, nivalenol and T-2 toxin) in cereals, applying thin layer chromatography (TLC), high pressure liquid chromatography (HPLC) and gas liquid chromatography (GLC).

TLC was performed applying silica gel plate and a mixture of ethyl acetate - toluene (4 : 1) or benzene - acetone (1 : 1) as developing solvent. The fluorescent coloration of thin layer spots of trichothecenes were showed by spraying with 10% sulfuric acid - 20% aluminium trichloride or 5% zirconyl nitrate - 5% ethylenediamine before heating.

Fusarenon-X and nivalenol were determined by using HPLC with JASCO HP-01 column and with an UV detector set at 220 nm.

Using a mixture of N-trimethylsilyl imidazole, trimethylchlorosilane and chloroform as silylating reagent, trichothecenes were easily converted to trimethylsilyl ethers, which were determined by GLC with SE-30 or OV-17 column.

The recoverys of trichothecenes added to rice, wheat and barley samples at level of 1 ppm were 77~98%.

### 1 緒言

赤かびは、穀類の収穫期に、低温多雨の気象条件下で、しばしば大発生して、赤かび病と呼ばれる病害を引きおこす。この原因菌は *Fusarium* 属菌 (完全世代は *Gibberella* 属菌) であり、有毒代謝産物であるトリコテセン系化合物を産生し、これが動物体内に取りこまれた場合、嘔吐、下痢、食欲減退等の諸症状を呈し、死の転帰を取ることもある。<sup>1-3)</sup>我が国においても、*Fusarium* 菌は広範囲に分布しており、種々の穀類が汚染を受ける可能性はきわめて高く<sup>4,5)</sup>、食品衛生的にも深く憂慮されている。食品中における個々のかび毒の分析については、すでにガスクロマトグラフィー (GLC)<sup>6,7)</sup>および薄層クロマトグラフィー (TLC)<sup>8,9,14,15)</sup>等報告されている。一方、

*Fusarium* 菌の産生毒素は通常数種に及ぶため、それらの複合汚染を考慮する必要があり、赤かび毒の汚染調査には、これら複数マイコトキシンを同時に検出・定量可能な微量分析法が望まれる。

そこで著者等は、トリコテセン構造を有する代表的マイコトキシンである Fusarenon-X (FX), Nivalenol (NV), T-2 toxin (T-2) について、穀類から分離検出する目的で、TLC, GLC および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 等を用いた、同時分析法の検討<sup>10)</sup>を行なったので報告する。

### II 実験方法

#### 1. 装置

- 1) けい光用自記濃度計 島津クロマトスキャナーCS-900型 (けい光付属品付)
- 2) ガスクロマトグラフ 島津GC-7 AG型

3) 高速液体クロマトグラフ 日本分光 FLC-A20型

## 2. 試薬

1) マイコトキシン標準溶液FX, NV, T-2標準品(国立衛生試験所より分与)を各々1mg精秤して, エタノールに溶解し, それぞれ0.1mg/ml溶液とした。

2) カラムクロマト用充てん剤 (1)アンバーライト XAD: アンバーライト XAD-2 (日本オルガノ製)に, IN 水酸化ナトリウム溶液を通し, 水, メタノールで洗浄し PH7.0とした。(2)フロリジル: フロリジル (100-200メッシュ)は, 105°で2時間活性化した。

3) 薄層クロマト用発色試薬 (1)20%塩化アルミニウム・メタノール水溶液:  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  36gを水に溶解して50mlとし, これに等容のメタノールを加えて混和した。(2)10%硫酸・メタノール溶液: メタノール90ml中に硫酸を滴下し, 全量100mlとした。(3)5%硝酸ジルコニル・メタノール溶液:  $\text{ZrO}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  500mgをメタノールに溶解し, 10ml容とした。(4)5%エチレンジアミン・メタノール溶液: エチレンジアミン0.5mlをメタノールに溶解し, 10mlとした。

4) 薄層クロマト用シリカゲル Adsorbosil-1, Merck kieselgel G, Merck kieselgel HF<sub>254</sub>, MN-kieselgel G, Biosil Aは, 20×20cmプレートに0.25mmの厚さで塗布し, Wakogel Plateはプレコートされたものを用いて, それぞれ110°, 2時間活性化した。

5) ガスクロ用充てん剤 5%SE-30および2%OV-17 (Gas chrom Q) 60~80メッシュを用いた。

6) トリメチルシリル(TMS) 化剤 N-(Tri-methylsilyl)imidazole (TSIM), Trimethylchlorosilane (TMCS) および内部標準として n-Dinonyl Phthalate 0.2μg/g 含むクロロホルムを1:0.2:9に混合して用いた。

7) 試薬はいずれも特級品を使用し, 水および各種有機溶媒はすべて蒸留したものを用いた。

## 3. 実験操作

1) 抽出 試料は50gを採取し, 抽出およびクリーンアップは, 上村らの方法<sup>2)</sup>に準じて行なった。

2) 分離および検出 (1)薄層クロマトグラフィーによる確認: 抽出濃縮後の残留物にメタノール1mlを加え, 定量用試験溶液を調整した。この溶液をシリカゲル薄層プレートに10μl スポットして, 展開溶媒で約12cm展開したのち, 10%硫酸・メタノール溶液を噴霧し, 100°で3分間加熱して, 365nm 紫外線燈下でT-2の緑青色けい光の有無を確認した。さらに, プレートに20%塩化アルミニウム・メタノール液を多量に噴霧し, 100° 15分間加熱した後, 紫外線燈下でFX(青色けい光), NV(黄色けい

光)の検出をも行なった。FXとNVについては, この他に5%硝酸ジルコニル・メタノール溶液および5%エチレンジアミン・メタノール溶液をプレートに噴霧後, 100° 5分間の加熱で青色けい光スポットが現われてくるので, けい光の色およびRf.値の観察により, 再確認も可能であった。自記濃度計による定量は, 励起波長365nm, けい光波長450nmを用い, 0.2~1.0μg/spotの検量線範囲で試料およびマイコトキシン標準液を同一プレート上にスポットし, クロマトグラムの面積計算を行なうことにより求めた。(2)高速液体クロマトグラフィー: FXとNVについて, 定量用試験溶液を用い, 以下のような測定条件により検出, 定量を行なった。検量線は, 0.1~10μgで直線性を示した。

### 測定条件

検出器: 波長可変型UV検出器 波長……220nm, 感度……0.16 O. D. FS

カラム: JASCO HP-01 4.6φ×250mm, 移動相……メタノール, 流速……1.0ml/min, 圧力……29kg/cm<sup>2</sup>  
(3)ガスクロマトグラフィー: 抽出・クリーンアップ後の残留物に, あらかじめ作成したTMS化剤混液0.3mlを加え, 室温で10分以上反応させたものを使用した。

### 測定条件

検出器: 水素炎イオン化検出器, 検出器温度……250°

カラム: 5%SE-30, 2%OV-17 3φ×2000mm, N<sub>2</sub>流量……45ml/min, カラム温度……230°

## III 結果

### 1. 定性および定量方法の検討

1) 薄層クロマトグラフィー Table1.に示すように, FX, NV, T-2に適すると考えられる6種の薄層担体, 5種の展開溶媒について, マイコトキシン間の分離が良く, 試料中の妨害物質の影響を受けない条件について, 検討を行なった。担体はAdsorbosil-1, MN-Kieselgel G, Wakogel plate等を用いた場合, けい光発色およびRf.値について良好であり, 溶媒は酢酸エチル・トルエン(4+1)またはベンゼン・アセトン(1+1)が, 分離もよくテーリング現象も現われなかった。トリコセチン系化合物は, それ自体けい光を有しないので, 薄層プレート上で確認する場合, 噴霧試薬による呈色反応を行なう必要があり, FX, NV, T-2を同時検出するために, 発色試薬に関する種々の条件検討を行なった。この結果, TLC展開プレートに10%硫酸を少量噴霧して短時間加熱後, 20%塩化アルミニウム液を多量に噴霧, 長時間加

熱することにより、3種のマイコトキシンを感度良く同時検出が可能となった。各マイコトキシンの検量線域は、FX 0.1 ~ 2.0 $\mu$ g / spot, NV 0.5 ~ 2.0 $\mu$ g / spot, T-2 0.1 ~ 1.0 $\mu$ g/spot (Fig. 1) であった。

加藤等は、FX および NV がアミンおよびジルコニル

塩と反応して、青色けい光を発すると報告している。<sup>11)</sup> 著者等はこの反応を TLC に応用して、プレートに5%硝酸ジルコニル溶液および5%エチレンジアミン溶液をそれぞれ噴霧し、加熱することにより高感度けい光検出(検出限界0.05 $\mu$ g/spot)が可能であった。

Table 1 Thin-layer chromatography of trichothecenes

Plate	Rf. value*			Detection limits
	Fusarenon-X	Nivalenol	T-2 toxin	
Adsorbil - 1	0.41	0.08	0.64	FX, T-2 0.1 $\mu$ g ~ NV 0.5 $\mu$ g ~
Wakogel plate	0.45	0.09	0.62	FX, T-2 0.1 $\mu$ g ~ NV 0.3 $\mu$ g ~
MN-kieselgel G	0.40	0.08	0.58	FX, T-2 0.1 $\mu$ g ~ NV 0.5 $\mu$ g ~
Merck kieselgel G	0.38	0.07	0.57	FX, T-2 0.2 $\mu$ g NV 1.0 $\mu$ g
Biosil A	0.42	0.07	0.77	FX, T-2 0.2 $\mu$ g NV 1.0 $\mu$ g
Merck kieselgel HF <sub>254</sub>	0.35	0.07	0.50	Non detec. at low level

Solvent system	Rf. value**			Fluorescent spots
	Fusarenon-X	Nivalenol	T-2 toxin	
ethylacetate - toluene (4 : 1)	0.40	0.08	0.58	light blue
ethylacetate - n-hexane (7 : 2)	0.41	0.07	0.58	tailing (NV)
benzene - acetone (1 : 1)	0.67	0.23	0.81	skylight blue
chloroform - methanol (95 : 5)	0.45	0.05	0.83	
chloroform - acetone (3 : 2)	0.55	0.08	0.75	tailing (NV)

\* Developer; ethylacetate - toluene (4 : 1)

\*\* plate; MN-kieselgel G

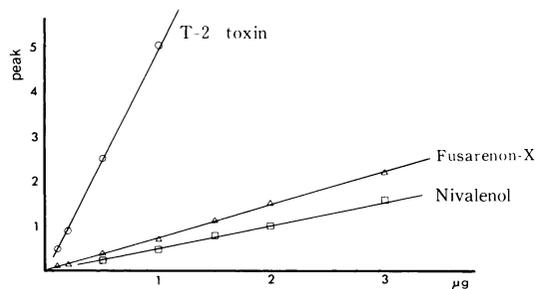


Fig. 1 Calibration curves of trichothecenes in TLC

2) 高速液体クロマトグラフィー 各トキシンの紫外外部吸収スペクトルは、Fig. 2の通りである。T-2に関しては吸光度がきわめて弱く、吸収極大の位置も明確でないが、FX, NV では220nm 付近に強い吸収を示すので、UV 検出器付き HPLC を用い、分析法の検討を行なった。ス

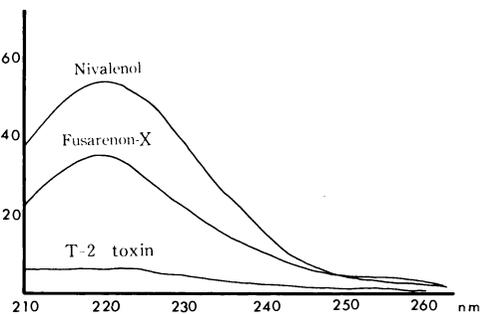


Fig. 2 Ultraviolet spectrums of trichothecenes

チレンジビニルベンゼン系のポラスポリマーゲルカラム JASCO HP-01 およびメタノール移動相の組合わせが最適であり、得られた FX, NV のクロマトグラムと検量線は Fig. 3, Fig. 4 に示した。検量線は0.1~10 $\mu$ g に直線域を有し、米、麦類による添加回収試験において

も妨害ピークは見られなかった。

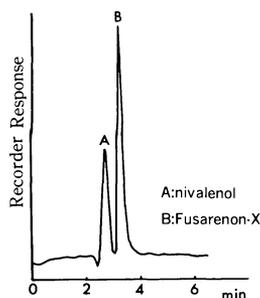


Fig. 3 HPLC chromatogram of trichothecenes

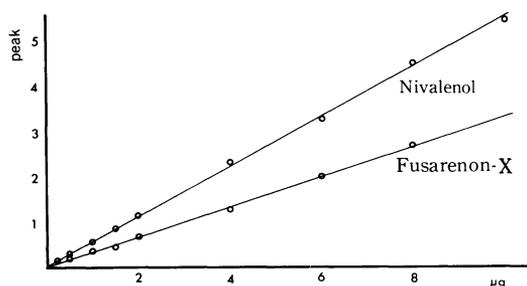


Fig. 4 Calibration curves of fusarenon-X and nivalenol

3) ガスクロマトグラフィー トリコテセン系マイコトキシンを揮発性誘導体としてGLCで検出する場合、メチル化、アセチル化、トリフルオロアチル化、トリメチルシリル(TMS)化がある<sup>6,7,12,13</sup>。3種のマイコトキシ(FX, NV, T-2)の検出を同時に行なう場合、反応の容易さ、速やかさからみて、TMS化が良く、試薬の組合わせとしてはN-(Trimethylsilyl)imidazole(TSIM)とTrimethylchlorosilane(TMCS)の2種を用いるのが適当であった。カラムは、OV-17およびSE-30など、2種類以上のカラムを適用することにより、マイコトキシンの検出・同定は一層確実なものとなった。

4) 穀類による添加回収試験 この回収試験は、赤かび汚染されていないことを確かめた米・小麦および大麦粉を用い、各試料50gに3種類のマイコトキシ標準溶液を添加し、攪拌して、濃度がそれぞれ1ppmとなるように調整したのち、既述の試験法による操作を行ない回収率を求めた。最終的な定量は、GLCの内部標準法によるピーク高比より算出した。この結果、回収率はFXが最も良く、T-2はそれよりもやや低い値を示した。

#### IV 考察

TLCによるトリコテセン系マイコトキシンの検出法

について、種々の報告例がある。中野らは、*P*-Anisaldehyde呈色液によるFXおよびDiacetoxyscirpenolの検出を試みており<sup>14</sup>、加藤らもトリコテセン系マイコトキシンの共通構造である12,13-エポキシ基が、4-(*p*-nitrobenzyl)pyridineと反応して、定量可能な青色呈色することを見いだした<sup>15</sup>。トリコテセン類を検出する際、これらの方法は特異的かつ簡便ではあるが、実際の検体に応用した場合、定量限界などの点でお検討の余地が残されている。一方、直井らは、FXに塩化アルミニウム溶液を反応させ、キレート化することにより、紫外線燈下で高感度蛍光検出が可能であると報告している<sup>8</sup>。しかし、この方法もT-2タイプのトリコテセン類については、キレート化できないため検出不能である。著者らは、硫酸・メタノールと塩化アルミニウム溶液を組合わせて噴霧する方法を用い、これらのマイコトキシンを容易に感度良く検出した。

GLC分析に関するトリコテセン類のTMS化反応については、いくつかの報告があり、TMS化剤もN,O-Bis-(trimethylsilyl)acetamide(BSA), N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide(BSTFA), Hexamethyl-disilazane(HMDS), N-(trimethylsilyl)imidazole(TSIM)などに、触媒としてTMCSを加えた各種試薬に関する検討がなされている<sup>11,7)</sup>。これらの試薬類を調べた結果、TSIMとTMCSが反応の容易さおよび生成誘導体の安定性などの点において、満足できる結果となった。

本分析法による穀類への添加回収試験は、今回、マイコトキシ1ppm添加の試料を用いたが、実際の自然汚染例については低濃度の場合も多いので、今後さらに検討が必要と思われる。

Table 2 Recovery (%) of trichothecenes added to various grains

Mycotoxin	Recovery (%)		
	Rice	Wheat	Barley
Fusarenon-X	87	80	98
Nivalenol	90	79	85
T-2 toxin	80	77	82

Amounts of mycotoxins in grains were 1 μg/g

## V まとめ

3種のトリコテセン系マイコトキシンFX, NV, T-2に関する同時微量分析法の検討を行ない、次のような結果を得た。

1. これら3種のマイコトキシンは、TLC分析法により微量検出可能で、Adsorbil-1, MN-kieselgel G, Wakogel plate担体に、酢酸エチルエステルトルエン(4+1)あるいはベンゼン-アセトン(1+1)溶媒にて展開を行なうのが適当とわかった。薄層プレート上で、マイコトキシンの同時検出を行なう際の噴霧呈色試薬を調べ、10%硫酸および20%塩化アルミニウム溶液をそれぞれ噴霧し、加熱することにより、紫外線灯下で3種のマイコトキシンを検出する条件を見いだした。なお、けい光検出器付自記濃度計を用いた場合、Ex. 365nm, Em. 450nmにおいて微量定量(0.2ppm)が可能であった。同様に、FXとNVについても5%硝酸ジルコニルおよび5%エチレンジアミンを噴霧、加熱することにより、検出限界0.05 $\mu$ g/spotにおいてもけい光検出が可能であった。

2. HPLCを用いた分析法において、スチレン・ジビニルベンゼン系のポーラスポリマーゲルカラムとメタノール移動相、さらに220nmの検出波長をセットすることにより、FXとNVの分離、検出、定量測定(検出限界0.1 $\mu$ g)を行なった。

3. GLCは、TSIM-TMCS-クロロホルム混液による反応を応用して、TMS化を行なうことが、種々提案されている条件のうちで最も良く、FX, NV 0.15ppm, T-2 0.2ppm以上の微量分析も可能であった。

4. これらのマイコトキシンについて、米・小麦および大麦粉を用いて1ppmレベルの添加回収試験を行なったところ、77~98%の回収率が得られ、クロマトグラム上の妨害ピークも認められなかった。従がって、本法はフザリウムかび毒による穀類汚染の分析に際して、有効な方法と考えられる。

終りに臨み、貴重なマイコトキシン標準品を分与下さった国立衛生試験所、倉田 浩部長、一戸正勝博士、内山 充部長ならびに天野立爾博士に深謝致します。

## VI 文献

- 1) Purchase, I. F. H.: Mycotoxins, Elsevier scientific publishing Co. (Amsterdam), P443, 1974.
- 2) Kadis, S., Ciegler, A., Ajl, S. J.: Microbial Toxins (VIII), Academic press (New York), P401, 1971.
- 3) 上野芳夫: 赤カビ毒(1), 食衛誌, 14, 403-414, 1973.
- 4) 諸岡信一: 穀類に寄生するカビ類のマイコトキシン, 食衛誌, 12, 459-472, 1971.
- 5) 一戸正勝: *Fusarium*属菌の産生するマイコトキシン, 植物防疫, 32, 417-422, 1978.
- 6) 田中邦幸, 天野立爾, 川田公平, 田辺弘也: 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, 食衛誌, 15, 195-200, 1974.
- 7) 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: 食品中のマイコトキシンに関する研究(第8報), 食衛誌, 19, 443-448, 1978.
- 8) 直井家壽太, 斉藤和夫, 風間栄治, 小川仁志, 木村康夫: 食品中のマイコトキシンに関する研究(第3報), 都衛研年報, 23, 175-182, 1971.
- 9) 直井家壽太, 斉藤和夫, 風間栄治, 小川仁志, 志村公子, 木村康夫: 食品中のマイコトキシンに関する研究(第5報), 都衛研年報, 25, 203-206, 1974.
- 10) 矢崎廣久, 高橋治男, 七山悠三: 食品汚染の赤カビ毒に関する研究, 第16回千葉県公衆衛生学会講演会要旨, 54, 1978.
- 11) 加藤俊博, 浅部喜博, 鈴木政雄, 滝谷昭司: フザレノン-X及びその関連マイコトキシンのけい光定量, 分析化学, 25, 659-662, 1976.
- 12) Burunelle, R. L., schoeneman, R. L., Martin, G. E.: Quantitative Determination of Fixed Acids in Wines by GLC Separation of Trimethylsilylated Derivatives, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 50, 329-333, 1967.
- 13) Collins, G., Rosen, J.: Gas-Liquid Chromatographic Mass Spectrometric Screening Method for T-2 Toxin in Milk, *ibid.*, 62, 1274-1280, 1979.
- 14) 中野尚子, 国元武彦, 栗飯原景昭: 穀物中に含まれる赤カビ毒の化学的および生物学的定量法について, 食衛誌, 14, 56-64, 1973.
- 15) 加藤俊博, 滝谷昭司: 4-(P-ニトロベンジル)ピリジンによる薄層上でのトリコテセン系マイコトキシンの検出・定量, マイコトキシン, 7, 22-23, 1978.