

トリコテセン系カビ毒による食品汚染について (第2報)

Contamination of Foodstuffs by Trichothecene Mycotoxins (Part II)

堀 義宏 佐藤 正幸 長南 隆夫

Yoshihiro Hori, Masayuki Sato and Takao Chonan

目的

近年、国内産穀類がフザリウム属菌の產生するデオキシニバレノール(DON)、ニバレノール(NIV)などのトリコテセン系カビ毒により汚染されていることが明らかになってきた^{1)~7)}。また、DONおよびNIVが市販穀類および穀類を原料とする加工食品から検出されている^{2)8)~12)}ことから、国内産穀類およびその加工食品を対象としたこれらカビ毒の汚染実態調査は食品衛生上重要なことと考える。

著者らは、1984年から北海道内で市販されている加工食品についてDONおよびNIVの汚染実態調査を行っているが、今回は1986年の北海道産穀類(小麦、小麦粉)およびめん類(うどん、そば)について行ったDONおよびNIVの残留調査の結果を報告する。

実験方法

1. 試料

穀類(小麦11試料、小麦粉2試料)は北海道内の生産地より、めん類(うどん8試料、そば13試料)は北海道内の製造所より入手した。

2. 試薬および標準溶液

溶媒: 酢酸エチルは和光純薬工業(株)製、残留農薬試験用、アセトニトリル、ヘキサン、エタノール、メタノール、クロロホルムは和光純薬工業(株)製、一級品を蒸留したもの用いた。

アンバーライト XAD-4カラム: アンバーライト XAD-4樹脂(オルガノ(株)製)約250ccを水で洗浄し、次いで1N水酸化ナトリウム溶液200mlで再生した後、水で中性になるまで洗浄した。更にメタノールで数回洗浄した後、水洗してメタノールを除去した。この樹脂を水を用いて内径15mmのカラム管に5cmの高さになるよう充てんした。

SEP-PAK®フロリジルカートリッジ: Waters 社製、あらかじめクロロホルム10mlで洗浄した。

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、トリメチルクロルシラン(いずれも和光純薬工業(株)製)、酢酸エチルを1:0.2:9の割合で用時調製した。

DON、NIV標準溶液: NONおよびNIV(いずれも和光純薬工業(株)製)各2.0mgをクロロホルム-メタノール(3:1)に溶解して50mlとし、これを標準原液とした(40μg/ml)。この標準原液を2.5ml分取しメタノールで100mlとした後、0.1、0.2、0.5mlを試験管にとり溶媒を留去した。これにTMS化剤0.5mlを加えて振とうし室温で一夜放置後、酢酸エチルを加えて10mlとし、DON、NIV標準溶液とした(1ml中にはDONおよびNIVとして10、20、50ngを含有する)。

3. 装置

ガスクロマトグラフ: 偶島津製作所製、GC-14A型(ECD検出器付)

データ処理装置: 偶島津製作所製、クロマトパック CR5A型

遠心形エバポレーター: ヤマト科学(株)製、RD-31型

4. 試験溶液の調製

粉碎試料10gを200ml容共栓三角フラスコに秤取し、アセトニトリル-水(3:1)100mlを加えて30分間振とう抽出し、ろ紙でろ過後、ろ液50mlを分液ロートにとり、ヘキサン50mlを加えて軽く振とうした。静置後、下層をとりエタノール20mlを加えてロータリーエバポレーターで5~10mlまで濃縮した。濃縮液はアンバーライト XAD-4カラムに負荷した。水50mlでカラムを洗浄した後、メタノール50mlでDON、NIVを溶出した。溶出液を濃縮乾固後、残留物をクロロホルム5mlに溶解し、SEP-PAK®フロリジルカートリッジに注入した。クロロホルム5mlでカートリッジに注入した。

リッジを洗浄した後、クロロホルム—メタノール(9:1)15mlでDON, NIVを溶出した。溶出液を濃縮乾固後、残留物をメタノールに溶解して試験管に移し、遠心形エバボレーターで溶媒を留去した。残留物にTMS化剤0.5mlを加えて振とうし室温で一夜放置後、酢酸エチルを加えて10mlとし、試験溶液とした。

5. ガスクロマトグラフィー(GC)による定性・定量

試験溶液をECD付キャピラリーGCに $3\mu\text{l}$ 注入し、ガスクロマトグラム上のリテンションタイム、レコーダーレスポンス(面積)からDON, NIVの同定および定量を行った。測定条件を下記に示す。

カラム：柳島津製作所製、メチルシリコン0.2mm i.d. \times 25m、膜厚0.25μm

注入法：スプリット方式(スプリット比1:40)

カラム温度：230°C

注入口温度：270°C

検出器温度：300°C

キャリヤーガス：He 1.5kg/cm²

結果および考察

前回、DON, NIVの抽出、分離精製は統一分析法¹⁰⁾に準じて行い、パックドカラムGCで測定した¹³⁾。しかし、フロリジルカラムクロマトグラフィーでクリーンアップするこの前処理法では試料由来の妨害ピークを除去できない試料も認められ、また、パックドカラムGCではDON, NIVと妨害ピークの分離が十分ではなかった。そこで今回は、クリーンアップにアンバーライトXAD-4カラムクロマトグラフィー⁴⁾およびSEP-PAK[®]フロリジルカートリッジを用いて試験溶液を調製し、キャピラリーカラムGCでDON, NIVを定量した。このときの小麦粉試験溶液のガスクロマトグラムの1例をFig.1に示す。

本操作により妨害物質の影響もなくDON, NIVを測定することができた。なお、試料中のDON, NIVの定量限界はいずれも10ppbであった。

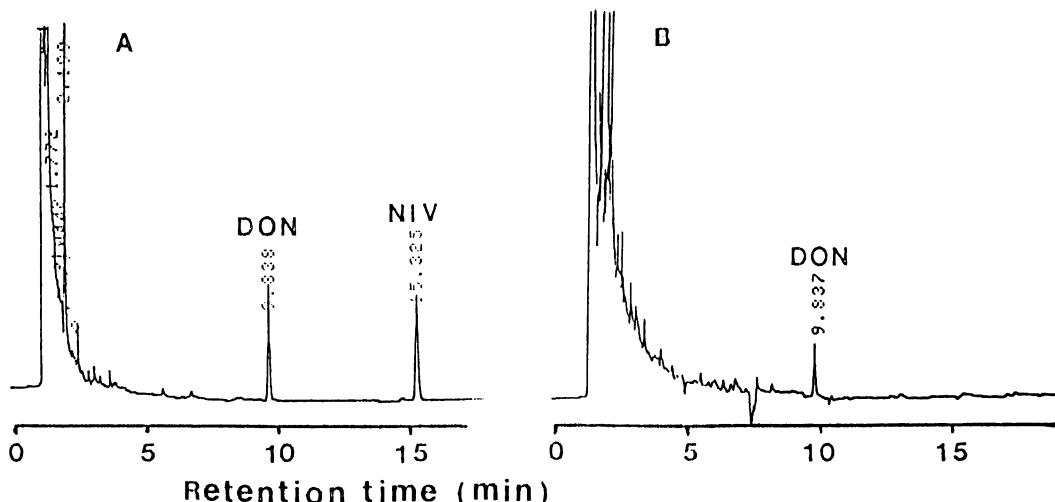


Fig. 1 Capillary Gas Chromatograms of the TMS-derivatives of Trichothecenes (A) and Extract of Flour (B)

DON: deoxynivalenol NIV: nivalenol

GC conditions:

column, methyl silicone 0.2mm i.d. \times 25m; column temp., 230°C;
injection mode, split (split ratio 1:40); injection volume, 3μl

この方法で小麦粉10gにDONおよびNIV $1\mu\text{g}$ を添加したときの回収率は、Table 1に示したようにDONが98%、NIVが82%と良好な結果が得られた。

そこで、本法を用いて1986年産の小麦、小麦粉、うどんおよびそばについて分析を行った。その結果をTable 2に示す。

Table 1 Recovery of DON and NIV Added to Flour

	Added μg/10g	Recovery (%)	Average (%)	C. V. (%)
DON	1	96, 99, 100	98	2.2
NIV	1	76, 83, 86	82	6.3

C. V. : coefficient of variation

Table 2 Analytical Results of DON and NIV in Cereals and Noodles Produced in Hokkaido, 1986

Sample	Number of Samples	Number of Positives	Concentrations (ppb)	
			DON	NIV
Wheat	11	3	13, 37, 81	ND
Flour	2	1	35	ND
Udon, dried	3	2	13, 37	ND
Udon, raw	5	3	10, 27, 36	ND
Soba, dried	10	1	11	ND
Soba, raw	3	0	—	—

Udon : japanese noodle Soba : buckwheat noodle

ND : not detected (the limits of detection are 10ppb for DON and NIV)

34試料中10試料からDONが検出されたが、NIVはすべて不検出であった。種類別に見ると、小麦は11試料中3試料(27%)からDONが検出され、その含有量は13~81ppbの範囲であった。黒田ら²⁾は、ほ場より採取した外観上正常な香川県産小麦(1977年産)3試料について調査を行っているが、3試料すべてからDONおよびNIVが検出され、その含有量はそれぞれ20~110ppb, 15~140ppbの範囲であったと報告している。この結果と今回調査した北海道産小麦中のDONの含有量は同程度であった。また、千葉県内で収穫された1985年産小麦45試料中36試料(80%)からDONが検出されている¹⁴⁾。それぞれ収穫された年が異なるが、北海道産小麦のDONの検出率は、香川県産および千葉県産小麦より低い傾向にあった。

小麦粉については、2試料中1試料からDONが35ppb検出された。上村ら¹²⁾は、1983年から1985年に東京都内で市販されている小麦粉について調査しているが、65試料中19試料からDONおよびNIVを検出している。この内訳を見ると、DONのみ検出された試料は8試料(3~210ppb), NIVのみ検出された試料は2試料(4, 12ppb), 両者が同時に検出された試料は7試料(DON 4~24ppb, NIV 5~18ppb)であった。また、地方衛生研究所8ヶ所で1984年に市販の小麦粉18試料について調査した結果を見ると、7試料からDONが検出され(このうち3試料はNIVも同時に検出), その含有量は4~30ppbであった¹⁰⁾。

DONおよびNIVに汚染された小麦は、製粉工程を経てもそのDON, NIVの含有量は変わらないか、むしろ2倍になったとの報告がある¹⁰⁾。また、上村ら¹⁵⁾は、通常の調理加工工程ではDON, NIVは30~60%が分解除去されずに残存することを明らかにしている。従って今回著者らの調査でDONの検出された小麦および小麦粉が加工食品に用いられた場合、これらの加工食品にDONが残留することが予想される。

うどんについては、乾うどん3試料中2試料、生うどん5試料中3試料からDONが検出され、その含有量は10~37ppbの範囲であった。DONが10ppbおよび36ppb検出された試料の原料である小麦粉を分析した結果、DONがそれぞれ54ppb, 42ppb検出された。前者の原料の生産地は不明であり、後者はアメリカおよび北海道内産小麦粉を混合したものであった。また、DONが27ppb検出された試料は北海道内産の小麦粉を原料とした製品であった。

そばについては、乾そば10試料中1試料からDONが11ppb検出され、生そば3試料からはDONは検出されなかった。DONが検出された試料の原料である小麦粉およびそば粉を分析した結果、小麦粉からDONが52ppb検出されたが、そば粉からはDONは検出されなかった。なお、DONが検出された小麦粉は輸入品であった。

陰地ら¹¹⁾は、1985年に奈良市内で市販されているうどんおよびそばについて調査しているが、うどん2試料中1試

料から DON および NIV がそれぞれ 4 ppb 検出され、そば 1 試料については、DON, NIV 共不検出であったと報告している。また、上村ら¹²⁾の調査では、うどん(1983年から 1985 年に東京都内で市販されていた製品) 10 試料からは DON, NIV は検出されていない。

我国では DON の残留基準が決められていないが、カナダでは小麦中に 2 ppm 以下、アメリカでは FDA が農務省など関連機関への勧告基準として小麦を原料とした最終製品で 1 ppm、製粉を行う小麦で 2 ppm、飼料で 4 ppm 以下としている^{12), 16)}。今回検出された DON の汚染レベルはカナダやアメリカの残留基準よりかなり低かったが、うどんに見られるように検出率が高いことから、今後も継続調査が必要と思われる。

要 約

1986年の北海道産小麦11試料、小麦粉 2 試料および北海道内製造所より入手したうどん 8 試料、そば 13 試料についてトリコテセン系カビ毒の DON, NIV の汚染実態調査を行った。

- 1) 小麦 3 試料から DON が 13~81 ppb の範囲で検出され、また、小麦粉 1 試料から DON が 35 ppb 検出された。
- 2) うどん 5 試料から DON が 10~37 ppb の範囲で検出され、また、そば 1 試料から DON が 11 ppb 検出された。
- 3) NIV はすべての試料に検出されなかった。

終りに本調査にあたり試料の採取に御協力いただいた北海道保健環境部食品衛生課および道内各保健所の関係各位に厚く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 諸岡信一他：食衛誌，13(5)，368 (1972)
- 2) 黒田弘之他：食衛誌，20(2)，137 (1979)
- 3) 佐藤信俊他：宮城衛研年報，55，106 (1980)
- 4) Kamimura, H. et al.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 64(5), 1067 (1981)
- 5) 土肥祥子他：食衛誌，25(1)，1 (1984)
- 6) 吉沢朋子他：栃木衛研所報17号，87 (1987)
- 7) 杉本貞三他：食衛誌，28(3)，169 (1987)
- 8) Yoshizawa, T. et al.: J. Food Hyg. Soc. Japan, 24(4), 413 (1983)
- 9) 山田わか他：宮城県保健環境センター年報，3，88 (1985)
- 10) フザリウム属が产生するトリコテセン系カビ毒についての毒性学的作用等に関する研究班：総括研究報告書 (1985)

- 11) 陰地義樹他：食衛誌，28(1)，50 (1987)
- 12) 上村 尚他：食衛誌，28(5)，322 (1987)
- 13) 堀 義宏他：道衛研所報，36，47 (1986)
- 14) 千葉県衛研年報、業務概要，34，43 (1985)
- 15) 上村 尚他：食衛誌，20(5)，352 (1979)
- 16) 上野芳夫他：衛生化学，30(5)，251 (1984)

英 文 要 約

Trichothecene mycotoxins, deoxynivalenol, nivalenol in cereals and noodles collected from Hokkaido in 1986 was investigated. Samples were extracted with acetonitrile-water (3:1) and purified by Amberlite XAD-4 column chromatography and SEP-PAK Florisil cartridge. The toxins in the final extracts were then derivatized with N-trimethylsilylimidazole-trimethyl-chlorosilane- ethyl acetate (1:0.2:9) and determined by gas chromatography (ECD).

By this method, deoxynivalenol was detected in the range of 10~81 ppb in 10 samples of 34 samples of wheat, flour, Japanese noodle and buckwheat noodle, but nivalenol was not detected in any of the samples.

Key Words: trichothecene mycotoxins, deoxynivalenol, nivalenol, wheat, flour, Japanese noodle, buckwheat noodle, gas chromatography (ECD)