

## 市販穀類加工食品中のトリコテセン系カビ毒等の 検出状況

佐藤 繁・金沢利八郎・植木誠一郎  
青柳由美子・水谷 直樹・白井 文雄

### 1 はじめに

*Fusarium* 属のカビは、我が国に広範囲に分布しており、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、赤カビ病と呼ばれる病害を引き起こす<sup>1)</sup> *Fusarium* 属のカビによる穀類の被害は、単に作物の減収のみならず、これが産生する有機代謝物による胃腸障害・ATA (食中毒性無白血球症) などが知られており、人畜への危害<sup>2)</sup> も懸念される。

近年、大麦、小麦、トウモロコシ等の主要穀類がこのカビの被害を受けて、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がこれら穀類から高率で検出されている<sup>3), 4)</sup>。また、これらカビ毒が熱に対して安定である<sup>5)</sup> ことから、加工された食品類にまで残存することが予想される。

穀類加工食品は日常の食生活において多量に消費されているが、カビ毒等について新潟県内の実態は明らかにされていない。そこで新潟市で流通している穀類加工食品について、トリコテセン系カビ毒である DON, NIV 及びフザレノン-X (FX) の汚染状況を調査するとともにこれらカビ毒を産生する *Fusarium* 属のカビの検索を行い若干の知見を得たので報告する。

また、この調査を行うにあたり、カビ毒分析法について検討を行い衛生試験法<sup>6)</sup> に若干の改良を加え、更に高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) による簡易分析法についても検討したので、その結果も併せて報告する。

### 2 実験方法

#### 2.1 試料

新潟市内のスーパーマーケットから1994年2月に穀類加工食品34品目 (大麦製品3品目、小麦製品23品目、トウモロコシ製品8品目) を購入し試料とした。固形の試料は粉砕器で約1分間細砕してから分析に供した。

#### 2.2 試薬

クリーンアップ用ミニカラム: Waters社製 Sep-pak フロリジル, Sep-pak C<sub>18</sub> カートリッジを用いた。

シリル化剤: トリメチルシリルイミダゾール (TSIM), トリメチルクロロシラン (TMCS) は和光純薬工業製のガスクロマトグラフ (GC) 用を用い、TSIM/TMCS

/酢酸エチル (無水硫酸ナトリウムで脱水したもの) を 1:0.2:9 の割合で混合して用いた。

酢酸エチル, n-ヘキサン, クロロホルム, アセトニトリル, メタノール: 和光純薬工業製の残留農薬試験用又は HPLC 用を用いた。

標準溶液: DON, NIV, 及び FX の標準品は、和光純薬工業製を用い、各 10mg を精秤し、クロロホルムに溶解して各々 100 µg/ml の原液を調製し、各原液を GC 用にはクロロホルムで、HPLC 用にはメタノールで適宜希釈して標準溶液とした。

その他の試薬はすべて和光純薬工業製特級を用いた。

#### 2.3 装置

GC: 島津製作所製 GC-6A 型 (ECD 検出器)

HPLC: 日本分光製 LC-800 シリーズ (フォトダイオードアレイ検出器 MD-910)

#### 2.4 DON, NIV 及び FX の分析操作

分析操作の概略を図1に示す。抽出・試験溶液の調整は衛生試験法<sup>6)</sup> に準じて行い、アセトニトリル抽出後、水層を再度アセトニトリルで抽出する操作を加えた。また、ガスクロマトグラム上の夾雑ピークを少なくするため、シリル化後に鈴木ら<sup>7)</sup> の精製操作を用いた。

GC の測定条件は次のとおりである。

カラム: 2% OV-17 (2 m × 3 mm)

カラム温度: 200 °C

試料注入口及び検出器温度: 270 °C

キャリアーガス: N<sub>2</sub>, 40 ml/min

検出器: ECD

注入量: 2 µl

HPLC の測定条件は次のとおりである。

カラム: GL Sciences Inertsil ODS-2 (15 cm × 4.6 mm)

移動層: メタノール/水 (15:85)<sup>8)</sup>

流速: 1.0 ml/min

検出器: フォトダイオードアレイ検出器

測定波長: 225 nm

注入量: 10 µl

#### 2.5 カビの分離と同定法<sup>9)</sup>

カビの分離同定は食品衛生検査指針に従って行った。

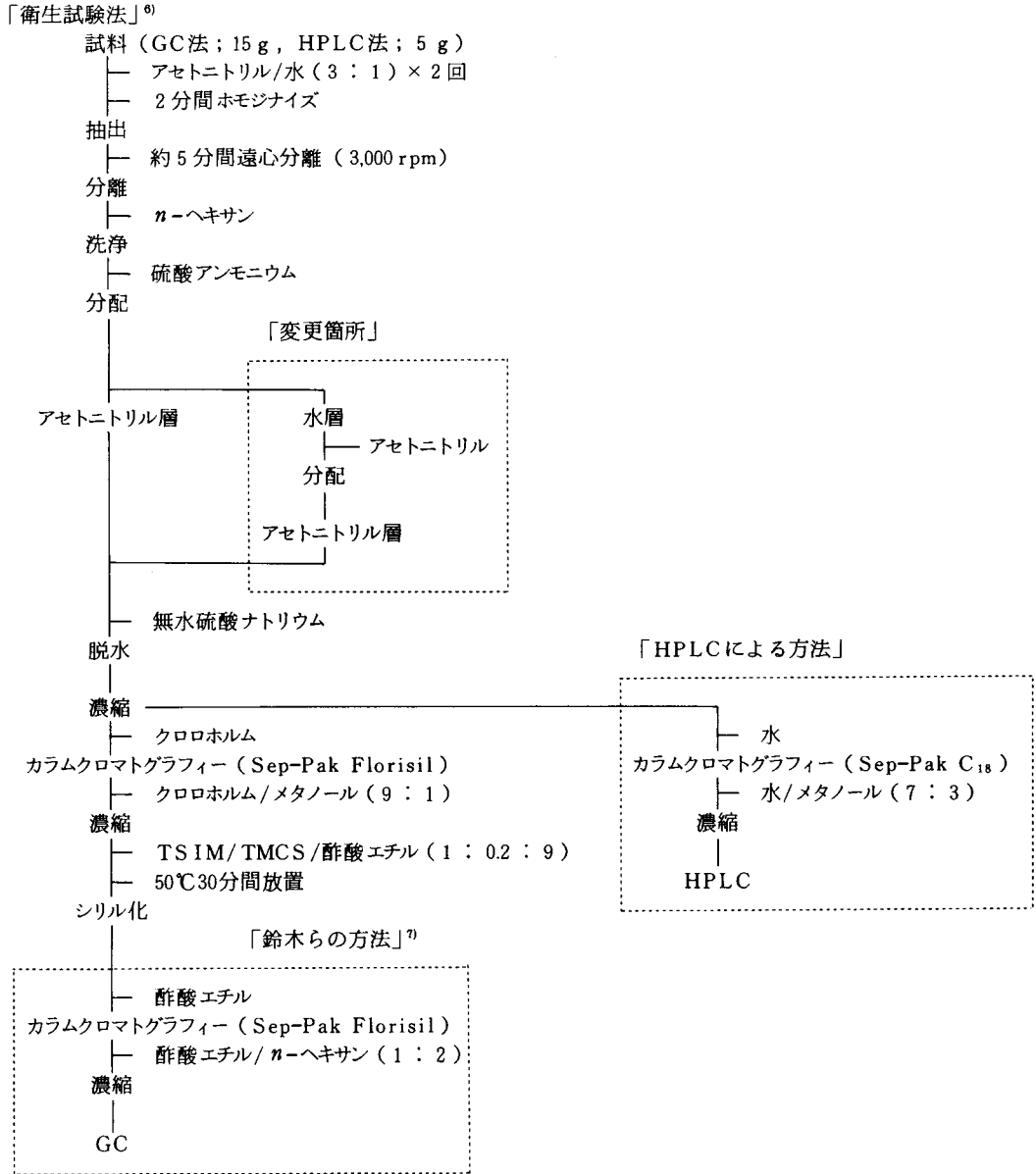


図1 DON, NIV及びFXの分析操作

### 3 結果及び考察

#### 3.1 GC法による分析

衛生試験法<sup>6)</sup>に基づいて、水試料にDON, NIV及びFXの各標準溶液を添加して回収率を求めたが、NIVの回収率は約40%程度であり、満足できる値が得られなかった。

そこで同法で用いられているアセトニトリル分配及び2.4に示したSep-pak フロリジルカラムの操作における各標準物質の回収率をHPLCを用いて調べた。その結果、Sep-pak フロリジルカラムの操作では、各標準物質

とも回収率はほぼ100%であった。アセトニトリル分配操作においては、DONとFXは1回の操作で84~88%の良好な回収率を得たのに対し、NIVは55%と抽出効率が低いことが分かった。その原因としてアセトニトリル分配で、NIVの一部が水層に残留することが考えられた。

そこでアセトニトリル分配操作でアセトニトリル層と水層に分離後に、再度水層をアセトニトリル30mlで抽出する操作を行った。その結果、表1に示すように、NIVの回収率を75%に高めることができた。

この操作を加えた衛生試験法による抽出法を用いて、

小麦粉、押し麦及びコーンスターチ各15gに各標準物質をそれぞれ2 $\mu$ g添加して回収試験を行った結果を表2に示す。NIVの回収率はやや低かったものの、再現性はおおむね良好であり、DON、FXについては89%~104%の高い回収率が得られた。

小麦粉及び小麦粉に各標準物質を添加し測定したガスクロマトグラムを図2に示す。ガスクロマトグラムには妨害となるピークは少なく、3物質とも分離よく測定できた。また、定量限界(S/N=3)はDON及びNIVで10ng/g、FXで20ng/gであった。

### 3.2 HPLC法による分析

DON、NIV及びFXの分析には主としてGCによる方法が用いられているが、GC法はシリル化等の前操作が繁雑かつ長時間を要することから、操作の簡便なHPLC法の適用性について検討した。

各標準物質2 $\mu$ gを添加した小麦粉5gを試料として、2.4により抽出を行い、Sep-pak フロリジルカートリッジを用いて精製した後、直接HPLCで測定を行ったが、クロマトグラム上に夾雑ピークが多くみられ、各標準物質とも測定が困難であった。

そこでSep-pakC<sub>18</sub>カートリッジによる精製法について検討を行った。まずDON、NIV及びFXの混合標準溶液(2 $\mu$ g/ml)1mlをSep-pakC<sub>18</sub>カートリッジに負荷し、水10mlを通過させたのち、水/メタノール(7:3)10mlで溶出した場合、3物質とも100%近く溶出した。そこで小麦粉5gに各標準物質2 $\mu$ gを添加して2.4の抽出及びこの方法による回収試験を行った。NIVのピークは妨害物質のそれと重なり、NIVの測定は不能であったが、DON、FXについては良好な単一ピークが得られた。回収率はNIVを除き、DONが73.0%(n=3)、FXが88.0%(n=3)であった。なお、この時のHPLCク

表1 アセトニトリル分配における回収率

操 作	平均回収率(%)		
	DON	NIV	FX
1回抽出	87.6	55.0	83.6
2回抽出	97.6	74.6	85.7

添加量：標準物質各2 $\mu$ g/水50ml (n=3)

DON：デオキシニバレノール

NIV：ニバレノール

FX：フザレノン-X

表2 GC法による添加回収試験

試 料	平均回収率(%)		
	DON	NIV	FX
小麦粉	92.5 (4.2)	65.5 (4.8)	104 (4.4)
押し麦	88.5 (11.2)	58.5 (16.5)	97.5 (8.7)
コーンスターチ	93.0 (7.6)	56.0 (7.5)	97.5 (7.8)

添加量：標準物質各2 $\mu$ g/試料15g (n=3)

カッコ内の値はC.V.%

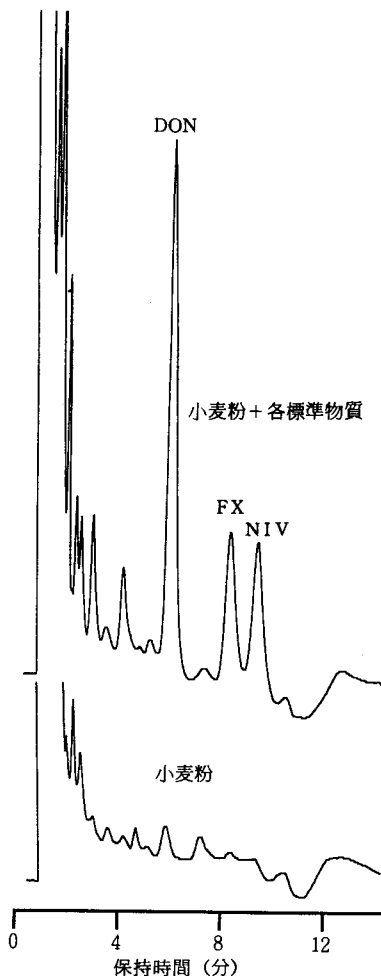


図2 小麦粉抽出物のガスクロマトグラム

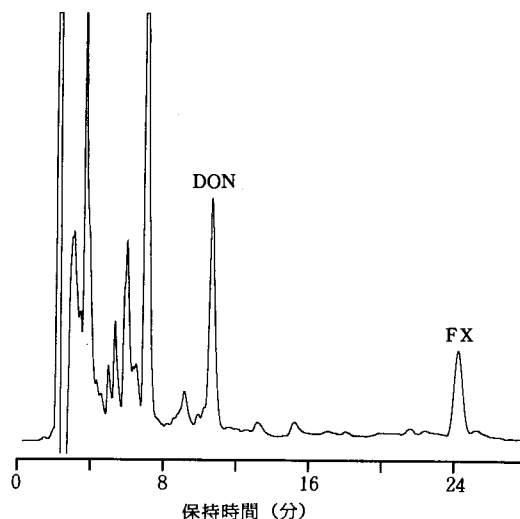


図3 小麦粉抽出物(各標準物質添加)の液体クロマトグラム

ロマトグラムを図3に示す。定量限界(S/N=3)はDONで100 ng/g, FXで200 ng/gであった。

以上の結果から、HPLC法はGC法に比べて感度が低く、かつNIVについては妨害ピークのため測定不能であり精製法について改良を加える必要があるが、操作が簡便であることからDON及びFXによる高濃度のカビ毒汚染が予想される検体のスクリーニング法としては適用できると考えられる。

### 3.3 市販穀類加工食品の汚染状況調査

市販穀類加工食品中のカビ及びカビ毒の汚染状況調査結果を表3に示す。なお、カビ毒の分析は定量限界の低いGC法を用いた。

その結果、*Fusarium*属のカビの汚染状況については、小麦製品2検体からわずかながらその着生が確認された。

また、カビ毒の検出状況は、DONがトウモロコシ製品から2試料、小麦製品から11試料それぞれ10~31ng/gの範囲で検出された。

DONは、国内・外国産原料穀類の大麦、小麦及び外国産トウモロコシにおいて数百ppb~数ppmレベルでの自然汚染が知られている<sup>3,4)</sup>。また、穀類加工食品においても高い検出率で数十~数百ppbのレベルでの汚染が報告されている<sup>5,7,10,11)</sup>。当調査結果はこれらの報告例と比べて若干低い値であった。DONは熱に対して化学的に安定な物質であること<sup>5)</sup>及び*Fusarium*属のカビの陽性率が低かったことを考え合わせると当調査で検出されたDONは原料由来のものが加工工程で分解されず食品中に残存したものと考えられる。なお、今回調査した試料中DONの同定確認の手段としてDONが最も高く検出された小麦粉について、HPLC/フォトダイオードアレイ検出器を用いて検討したところ、その吸収スペクトルは標準DONとよく一致した。

一方、NIVについては、国内・外国産原料麦類から数百ppb~数ppmのレベル<sup>3,4)</sup>で、麦類の加工食品では、数十~数百ppbのレベルでの自然汚染が認められている<sup>5,7,10,11)</sup>が、当調査では麦類加工食品からは検出されなかった。

表3 市販穀類加工食品中のカビ毒等汚染状況調査結果

試料名	料数	検出数	カビ毒			陽性数	<i>Fusarium</i> 属菌数(個/g)
			NIV (ng/g)	DON (ng/g)	FX (ng/g)		
スイートコーン	4	2	N.D.	10, 13	N.D.	-	-
コンスターチ	4	0	N.D.	N.D.	N.D.	-	-
小麦粉	5	1	N.D.	31	N.D.	-	-
そうめん	7	3	N.D.	13~25	N.D.	2	40, 230
うどん	6	5	N.D.	11~16	N.D.	-	-
スパゲティ	5	2	N.D.	11, 13	N.D.	-	-
押し麦	3	0	N.D.	N.D.	N.D.	-	-

N.D. : NIV ; 10 ng/g 以下  
DON ; 10 ng/g 以下  
FX ; 20 ng/g 以下

また、FXは、原料穀類及びそれらの加工食品から検出された報告例はなく<sup>9)</sup>、当調査も同様の結果であった。

ところで、わが国ではDON、NIV及びFXについて食品衛生上の残留基準は定められていないが、諸外国を見るとDONについて暫定的基準値を設定している国もあり、例えばアメリカでは小麦中に2 ppm以下、小麦の加工品に1 ppm以下の暫定基準値を定めている。DONの当調査結果はこれらの基準値を大きく下回っているが、小麦製品からの検出率が高いことから継続的な調査が必要と考えられる。

## 4 ま と め

穀類加工食品中のトリコテセン系カビ毒(DON, NIV, FX)の定量法を検討し、市販穀類加工食品中のカビ及びカビ毒汚染状況調査に適用した。

1) GC法によるカビ毒の分析法については、衛生試験法による分析操作に加えアセトニトリル分配操作を2回繰り返すことでNIVの回収率が向上し、3物質とも十分な感度で再現性よく測定できた。

2) HPLC法によるカビ毒の分析は、NIVは妨害物質で測定できなかったが、抽出後の精製操作にSep-pakC<sub>18</sub>カートリッジを使用することによって、DON及びFXは分離よく測定できた。

3) 新潟市内のスーパーマーケットでの穀類加工食品のカビ及びカビ毒の汚染状況調査では、*Fusarium*属のカビは小麦製品2試料から微量検出された。トウモロコシ製品及び小麦製品からDONが数十ppbレベルで検出された。NIV及びFXはすべての製品から検出されなかった。

## 文 献

- 1) 宇田川俊一他：菌類図鑑(上), p.137(1991), (講談社)。
- 2) 同上：p.160
- 3) 藤原喜久夫他：食品衛生ハンドブック, p.614(1992), (南江堂)。
- 4) 田中敏嗣他：マイコトキシン, **24**, 57(1986)。
- 5) 上村 尚他：食品衛生学雑誌, **28**, 322(1987)。
- 6) 日本薬学会編：衛生試験法注解, p.415(1990), (金原出版)。
- 7) 鈴木 滋, 菊池 格：宮城県保健環境センター年報, **9**, 141(1990)。
- 8) Denis R. L. and Roy G.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., **70**, 479(1987)。
- 9) 宇田川俊一：食品衛生検査指針, p.262(1990), (日本食品衛生協会)。
- 10) 陰池義樹他：食品衛生学雑誌, **28**, 50(1987)。
- 11) 中野謙一, 白木康一：岐阜県衛生研究所報, **34**, 31(1989)。