

厚生科学研究費補助金（特別研究）
分担研究報告書

デオキシニバレノールの試験法に関する研究

分担研究者 熊谷 進 東京大学大学院

協力研究者 小西 良子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

平成14年に小麦玄麦中のデオキシニバレノールの暫定基準値が設定されたことを受けて、デオキシニバレノールの試験法の開発を行った。本研究で検討された試験法は、多機能カラムを用いて精製し、高速液体クロマトグラフで分析するものであった。この試験法の妥当性を評価する目的で12機関による Collaborative study を行った。検討した試料は小麦玄麦および小麦粉であった。その結果、小麦玄麦および小麦粉において良好な室内再現性、室間再現性を示した。従って、この試験法は小麦玄麦および小麦粉の試料で良好な真度、精度で分析が可能であることが分かった。

Collaborative study 協力研究者および協力機関名（あいうえお順）

合田 紀雄（独）東京肥飼料検査所仙台事務所、

木船 信行（財）日本食品分析センター大坂支所

田中健治、久城真代（独）食品総合研究所

田中 敏嗣 神戸市環境保健研究所、

田端 節子 東京都立衛生研究所、

長南 隆夫 北海道立衛生研究所、

中家 陽子 神戸検疫所、

中島 正博 名古屋市衛生研究所、

濃野 正典 横浜検疫所、

水野 和俊（独）東京肥飼料検査所本部、

南沢 正敏、金丸 直樹（財）日本穀物検定協会

A. 研究目的

2001年2月に開かれた JECFA で、初め

でトリコテセン系マイコトキシンについての

リスク評価が検討された。この会議でトリコ

テセン系マイコトキシンは代表的な食品汚染マイコトキシンであると認識され、科学的根拠に基づいて国際的な基準として一日摂取許容量 (ADI) が設定された。これを受けてわが国では昨年5月に小麦におけるデオキシニバレノールの暫定基準値設定が決められた。そのため、デオキシニバレノールを測定する試験法を早急に設定することが必要となった。本研究では、デオキシニバレノールの試験法として適切な方法を検討し、その妥当性を評価するため、12機関の協力を得て自然汚染小麦玄麦、自然汚染小麦粉を用いた Collaborative study を実施した。

B. 研究方法

1) 試験法案

1. 前実験

Collaborative study に供する試験法案を決定するために3機関による試験法の検討を①～⑤の方法 (表1) を行った。検討した項目は表1に示した。検討試料は、汚染小麦玄麦を用いた。

2. 測定試料

Collaborative study に供する試料は、食糧庁から供与された非汚染小麦および汚染小麦5種類、汚染小麦粉1種類を用いた。すべて遠心粉碎機で1mm以下の粒子まで粉碎し、V字型混合機で良く混合した後、均等になるように55gづつ分割した。

3. 試料の均一性試験

Collaborative study に供する試料は、粉碎した後、その均一性を評価するため、日本食品分析センターおよび神戸市環境保健研究所により均一性試験をおこなった。測定法は、

多機能カラム (Multi-Sep #227, Romer 社製) で前処理をおこなったのち、高速液体クロマトグラフィーで分析を行い、UV220 nm により検出した。なお、前実験、均一性試験、本実験とも標準品はデオキシニバレノール標準品 (WAKO) を用いた。

4. 機器

- (1) 前処理用多機能カラム (MultiSep #227 (Romer Labs, Inc. 社製))
- (2) グラスフィルター-Whatman 社、GF/B
- (3) 共栓つき三角フラスコ 500ml, 300ml またはそれに類するもの
- (4) 振とう器
- (5) 桐山ロート (目皿直径 6 cm)、吸引ろ過鐘 (吸引鐘) およびアスピレーター
- (6) 共栓メスフラスコ- 50 ml
- (7) 10 ml 目盛り付きガラス遠心管またはそれと同等のもの
- (8) ホールピペットおよびそれに類するもの-1000 μ l, 500 μ l, 250 μ l, 50 μ l
- (9) 濃縮装置 (ロータリーエバポレーター、遠心エバポレーターおよび窒素吹き付け装置等)
- (10) 高速遠心機または 0.45 μ m ポアサイズ PTFE シリンジフィルター
- (11) 高速液体クロマトグラフ: ポンプ、注入システム、UV 検出器、カラム恒温槽、記録計
- (12) HPLC 用 ODS カラム (4.3 mm id. X 250 mm, 粒径 5 μ m)
- (13) 計量器 (50.0g を小数点1位まで正確に量ることができるもの)

(14) カラムスタンド

(15) 試験管ミキサー (ボルテックス等) またはこれと同等のもの

5. 試薬

(1) アセトニトリル (LC グレードまたは同等のもの)

(2) メタノール (LC グレードまたは同等のもの)

(3) アセトニトリル (特級)

(4) 蒸留水 (LC グレードまたは同等のもの)

(5) 抽出溶媒—アセトニトリル (特級) と蒸留水 (LC グレードまたは同等のもの) を 85:15 の割合で調製する。

(6) LC 用溶離液—アセトニトリル (LC グレードまたは同等のもの) / メタノール (LC グレードまたは同等のもの) / 蒸留水 (LC グレードまたは同等のもの) を 5:5:90 の割合で調製する。

(7) デオキシニバレノールのワーキング標準溶液 (2.00 μ g/ml) —送付したデオキシニバレノール標準液 (20.0 μ g/ml) から 5.00 ml をとり 50.0 ml 容のメスフラスコにいれアセトニトリル (LC グレードまたは同等のもの) で 50.0ml に定容してワーキング標準溶液とする。-20 $^{\circ}$ C 以下で保存する。

(8) デオキシニバレノール LC 用検量線溶液—デオキシニバレノールのワーキング標準溶液から 1.00 ml, 0.50 ml, 0.25 ml, 0.05 ml を正確にガラス試験管等にとり遠心エバポレーターなどで濃縮乾固したのち、LC 用溶離液を 1.00 ml を加える。それぞれの溶液は、2.00 μ g/ml, 1.00 μ g/ml, 0.50 μ g/ml, 0.10

μ g/ml に相当する。

6. 手順

1) 抽出

試料を正確に 50.0g 量りとした 500ml の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 [2. (5)] 200 ml を静かに加える。

(2) 振とう器を用いて 30 分間激しく振り混ぜてデオキシニバレノールを抽出し、その抽出液とする。

(3) 桐山ロート (直径 60mm) [1. (5)] を吸引ろ過鐘に取り付け、ガラスフィルター、[1. (2)] を装着する。桐山漏斗の下に 300-500 ml 容の三角フラスコを置く。

(4) 抽出物を静かに吸引ロートに注ぎ、吸引ろ過し、抽出溶液とする。

2) 精製

(1) 多機能カラム [1. (1)] をカラムスタンドなどにとりつけ、その下に 10 ml 目盛り付きガラス遠心管を置く。

(2) ろ液を十分に混合してからその約 10 ml を、多機能カラムに流し入れ、自然に流下させる。

(3) 初流 3 ml を捨てる。

(4) 新しい試験管をカラムの下におき次の流出液約 5ml を採取する。

(5) 流出液を十分に混合し正確に 2.00ml をとり 10 ml 目盛り付きガラス遠心管 [1. (7)] に移す。

(6) 40 $^{\circ}$ C 以下で遠心エバポレーター等 [1. (9)] で濃縮乾固する。

LC 用移動相 [2. (6)] を正確に 0.50 ml くわえ、試験管ミキサー [1. (15)] で攪拌する。

(7) 10,000rpm で 5 分間遠心分離した上澄み

液または孔径 0.45 μ m のフィルター [1. (11)] でろ過したろ液を、高速液体クロマトグラフィーに供する試験溶液とする。

7. 検量線の作成

(1) デオキシニバレノール LC 用検量線溶液 [2. (8)] を、10,000rpm で5分間遠心分離した上澄み液または孔径 0.45 μ m のフィルター [1. (11)] でろ過したろ液を、高速液体クロマトグラフィーに供する検量線溶液とする。

(2) それぞれの濃度から得られたピークの高さを縦軸に、デオキシニバレノールの濃度を横軸にとり検量線を作成する。

8. 測定

高速液体クロマトグラフィー装置による測定条件は下記のとおりにする。

測定条件

カラム：ODSカラム(4.3 mm id. X 250 mm, 5 μ m)

移動相：アセトニトリル、水及びメタノール (5 : 90 : 5)

流速：1 ml/min

カラム槽温度：40℃

検出器：紫外分光光度検出器 (波長 220nm)

注入量：10-20 μ l

9. 定量

試料溶液から得られたクロマトグラムから、標準液のデオキシニバレノールと溶出時間が同一のピークの高さをもとめ、3. で作成した検量線によって、試料中のデオキシニバレノール量を算出する。

C. 研究結果・考察

1. 前実験の評価

①から④までは試料 20g とし、アセトニトリル：水 (85:15) の抽出液を 80ml くわえた。②は振とうに超音波 10 分を加えた。③はフィルアップ操作を加えた。④は多機能カラムに Autoprep MF-T (昭和電工 (株)) を用いた。⑤は試料 50g とし、アセトニトリル：水 (85:15) の抽出液を 200ml くわえた。①-③および⑤は多機能カラムとして Multi Sep #227 (Romer 社製) を用い、試料を濃縮乾固し、0.5 ml の移動相をくわえ、高速液体クロマトグラフィーで分析した(表 1)。分析条件は本実験と同様であった。その結果、分析に供する試料の量は 20g も 50g も同様な結果がえられたこと、多機能カラムとして Multi Sep #227 と MF-T は同等の性能を有していたこと、抽出液をフルアップしてもしなくても分析値に影響がなかったことがあきらかになった。このことから、Collaborative study をおこなう試験法案を以下の様に設定した。

試験法案：試料量 50g、抽出液 200ml としてフィルアップ操作をせず、ろ過後ろ液を Multi Sep #227 に通し、最初の 3ml を捨て次に流出してくる 5ml を採取し、そのうちから 2ml を正確に採り蒸発乾固後、移動相 0.5ml で溶解し、10 μ l-20 μ l を高速液体クロマトグラフィーで分析する。

2. 均一性試験の結果

Collaborative study に供給する試料の均一性を評価するために、1 試験機関で 7 回反復分析をおこなった。表 2 にその結果を示したが、標準偏差が 0.005-0.03、変動係数 1.46-5.19 であった。この結果から、均一性は問題がないと判断された。

3. Collaborative study の結果

図1に典型的なデオキシニバレノールのクロマトグラフを示した。内径 4.3 mm, 長さ 250 mm, 粒系 5 μ m の ODS カラムを用いると試料添加後約 12 分から 18 分の間にデオキシニバレノールのピークが検出された。220nm で検出しているため夾雑物のピークがデオキシニバレノールのピークを妨害する場合も認められたが、移動層に 0.2M 酢酸アンモニウム(pH 5.0)を加えると改善される場合もあることが示された(図2)それぞれの機関から得られた分析値を表3に示してあるが、試料 a~e までは汚染小麦玄麦である。試料 f は汚染小麦粉である。Youden pair の解析の結果デオキシニバレノールの濃度が 0.5 μ g/g と 0.6 μ g/g の Youden pair では、室内再現性 (RSDr) 15.1%, 室間再現性 14.4%を示し、回収率は 102.4%であった。すべての測定値が標準偏差の 2 倍の円内 (the 2s circle)に入っていた (data not shown)。1.0 μ g/g と 1.1 μ g/g の Youden pair では、室内再現性 (RSDr) 11.1%, 室間再現性 8.3%を示し、回収率は 103.7%であった。5種類の自然汚染小麦を測定した場合は、測定値の OUTLIER は統計学的に認められず、室内再現性 (RSDr) 5.8~12.5%, 室間再現性 12.0~20.8%の間であり、理論値との比率を表す HORRAT 値は 1.0 かそれ以下であった(表4)。これらの結果から、この試験法によるデオキシニバレノールの分析は室内再現性、室間再現性、回収率も良好であり、デオキシニバレノールの定量を行う分析法として適切であることが示された。なお、この方法では定量下

限は 0.2 μ g/g であることが示された。

D. 結論

小麦中のデオキシニバレノールの暫定基準値設定を受けて、小麦玄麦中のデオキシニバレノールの試験法案を検討し、多機能カラムを用いた前処理法を行い高速液体クロマトグラフィーで分析し、UV 検出器により 220nm で検出する方法が試験法案として適切であることを明らかにした。12 試験機関で Collaborative study した結果、RSDr, RSDR 共良好な値が得られ、HORRAT 値も 1.0 かそれ以下であった。このことから、本試験法案は小麦玄麦のデオキシニバレノール分析法として有用であることが判明した。

E. 発表論文

なし

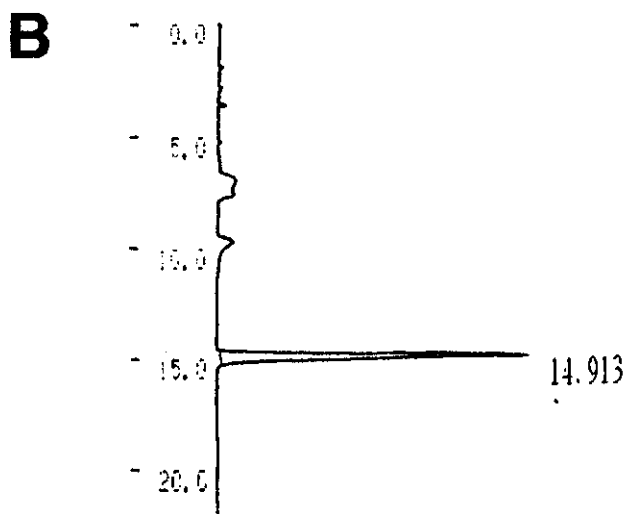
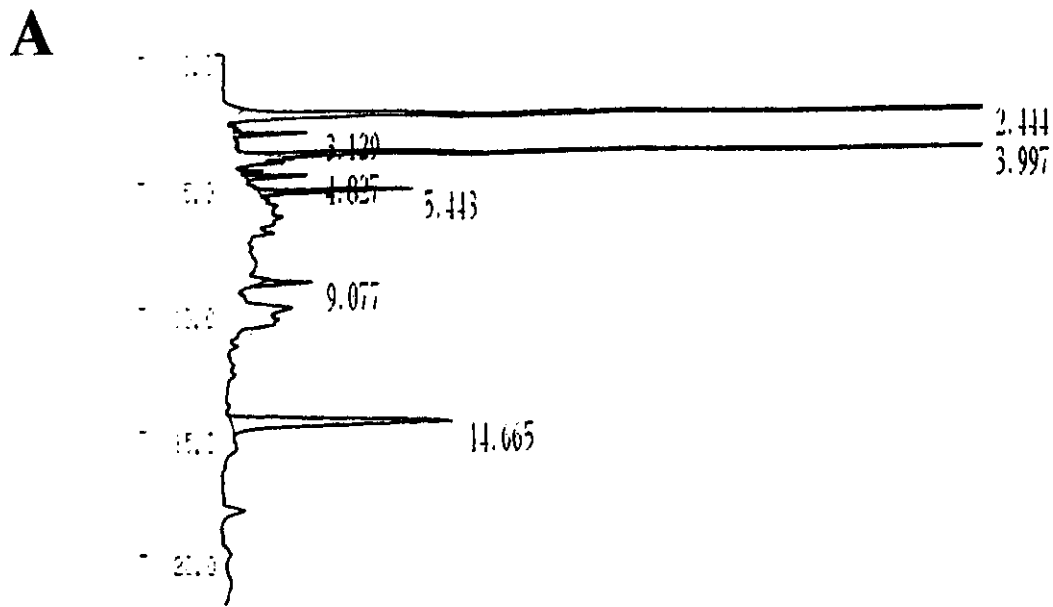


Fig. 1 Typical HPLC patterns of DON
A: Contaminated sample wheat (10 μ l)
B: DON standard 2 μ g/ml (10 μ l)

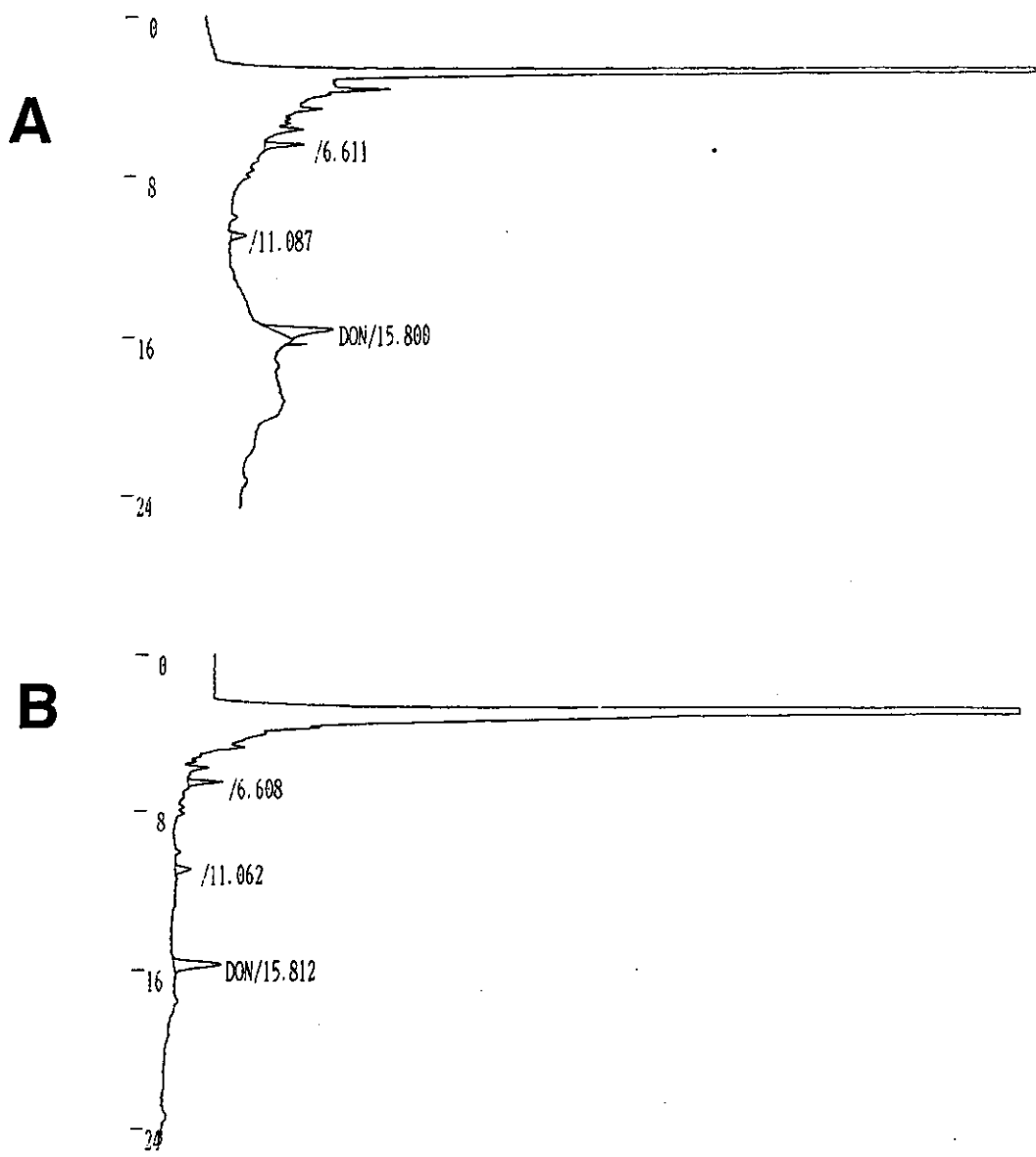


Fig. 2 HPLC patterns of DON with or without ammonium acetate

A: (-) 0.2M ammonium acetate buffer(pH 5.0)

B: (+) 0.2M ammonium acetate buffer(pH 5.0)

表1 前実験のプロトコール

方法	①	②	③	④	⑤
試料	20g	20g	20g	20g	50g
CH3CN- H2O(85:15)	80ml	80ml	80ml	80ml	200ml
抽出	振とう30分	振とう30分 超音波10分	振とう30分	振とう30分	振とう30分
ろ過	Whatman GF/B 6cm 使用	Whatman GF/B 6cm 使用	Whatman GF/B 6cm 使用	Whatman GF/B 6cm 使用	Whatman GF/B 6cm 使用
フィルアップ	ナシ	ナシ	100ml	ナシ	ナシ
精製	# 2 2 7 ① 0-3mlは捨てる ②3-8 mlを分取	# 2 2 7 ① 0-3mlは捨てる ②3-8 mlを分取	# 2 2 7 ① 0-3mlは捨てる ②3-8 mlを分取	Autoprep MF-T ① 0-3mlは捨てる ②3-8 mlを分取	# 2 2 7 ① 0-3mlは捨てる ②3-8 mlを分取
試験溶液	②の分画をホールピペットで2.0ml分取*して濃縮乾固				
移動相で溶解	0.5ml	0.5ml	0.4 ml	0.5 ml	0.5 ml
測定	10 μ lを注入 220nm 224nm	10 μ lを注入 220nm 224nm	10 μ lを注入 220nm 224nm	10 μ lを注入 220nm 224nm	10 μ lを注入 220nm 224nm

表2 均一性試験の結果
($\mu\text{g/g}$)

	1	2	3	4	5	6	7	平均値	標準偏差	変動係数(%)
汚染無し	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	-	-	-
低濃度	0.21	0.19	0.19	0.19	0.20	0.20	0.18	0.19	0.01	5.19
中濃度	0.36	0.36	0.36	0.37	0.35	0.36	0.36	0.36	0.01	1.49
高濃度	0.85	0.87	0.88	0.87	0.93	0.86	0.89	0.88	0.03	3.07
超高濃度	1.52	1.52	1.58	1.60	1.52	1.51	1.59	1.55	0.04	2.39
小麦粉	0.53	0.51	0.51	0.50	0.52	0.50	0.51	0.51	0.01	1.67

表 3. Collabrative study参加機関による分析結果

Lab.ID	Deoxynivalenol concentration $\mu\text{g/g}$															
	0.5	0.6	1	1.1	a ^a	a	b	b	c	c	d	d	e	e	f ^b	f
1	0.54	0.71	1.22	1.06	<0.05	<0.05	0.26	0.31	0.46	0.45	1.1	1.01	1.53	1.8	0.58	0.69
2	0.48	0.58	1.01	1.13	<0.05	<0.05	0.2	0.2	0.33	0.33	0.8	0.84	1.25	1.31	0.43	0.41
3	0.53	0.61	1.03	1.17	<0.05	<0.05	0.26	0.26	0.38	0.37	1.02	1.02	1.56	1.77	0.56	0.46
4	0.55	0.71	1.05	1.15	<0.05	<0.05	0.17	0.23	0.35	0.33	0.9	0.82	1.47	1.41	0.46	0.6
5	0.46	0.56	0.97	1.15	<0.05	<0.05	0.23	0.24	0.37	0.34	0.9	0.94	1.51	1.65	0.49	0.51
6	0.52	0.68	1.07	1.2	<0.05	<0.05	0.27	0.3	0.44	0.47	1.11	1.07	1.81	1.92	0.6	0.61
7	0.58	0.68	1.11	1.24	<0.05	<0.05	0.23	0.24	0.41	0.41	1.06	0.98	1.74	1.74	0.51	0.56
8	0.5	0.63	1.16	1.08	<0.05	<0.05	0.22	0.29	0.47	0.41	0.99	0.96	1.57	1.54	0.53	0.53
9	0.53	0.52	0.93	1.33	<0.05	<0.05	0.22	0.21	0.33	0.32	0.88	0.79	1.35	1.17	0.48	0.39
10	0.51	0.61	1.02	1.1	<0.05	<0.05	0.19	0.2	0.34	0.33	0.89	0.92	1.47	1.53	0.47	0.47
11	0.5	0.63	1.03	1.13	<0.05	<0.05	0.23	0.23	0.37	0.39	0.95	0.93	1.61	1.67	0.56	0.55
12	0.44	0.46	0.99	0.79	<0.05	<0.05	0.1	0.16	0.26	0.18	0.53	0.75	1.55	1.55	0.3	0.51

^a a,b,c,d,e=blind duplicate pairs of naturally contaminated wheat

^b f=blind duplicate pairs of naturally contaminated flour

表 4 Collaborative studyの結果

Sample ID	No. of labs a(b)	Matrix	X Average ($\mu\text{g}/\text{Sr}$)	Sr	RSDr(%)	r	SR	RSDR(%)	R	HORRAT value	Rec., (%)
spiked(1)	12(0)	wheat	0.56 ^b	0.09	15.18	0.24	0.08	14.42	0.23	0.58	102.42
spiked (2)	10(2)	wheat	1.09 ^c	0.12	11.17	0.34	0.09	8.39	0.26	0.53	103.71
a	12(0)	wheat	< 0.05	-	-	-	-	-	-	-	-
b	12(0)	wheat	0.23	0.03	11.33	0.07	0.05	20.75	0.13	1.01	
c	12(0)	wheat	0.37	0.02	6.32	0.07	0.07	18.76	0.19	1.00	
d	12(0)	wheat	0.92	0.06	6.42	0.17	0.13	14.20	0.37	0.87	
e	12(0)	wheat	1.56	0.09	5.79	0.25	0.19	11.99	0.52	0.80	
f	12(0)	flour	0.51	0.06	12.47	0.18	0.08	16.36	0.23	0.92	

^a Number of labs retained after eliminating outliers; (b)=number of labs removed as outliers.

^b Spike level=0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 0.60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (youden pair)

^c Spike level=1.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 1.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (youden pair)