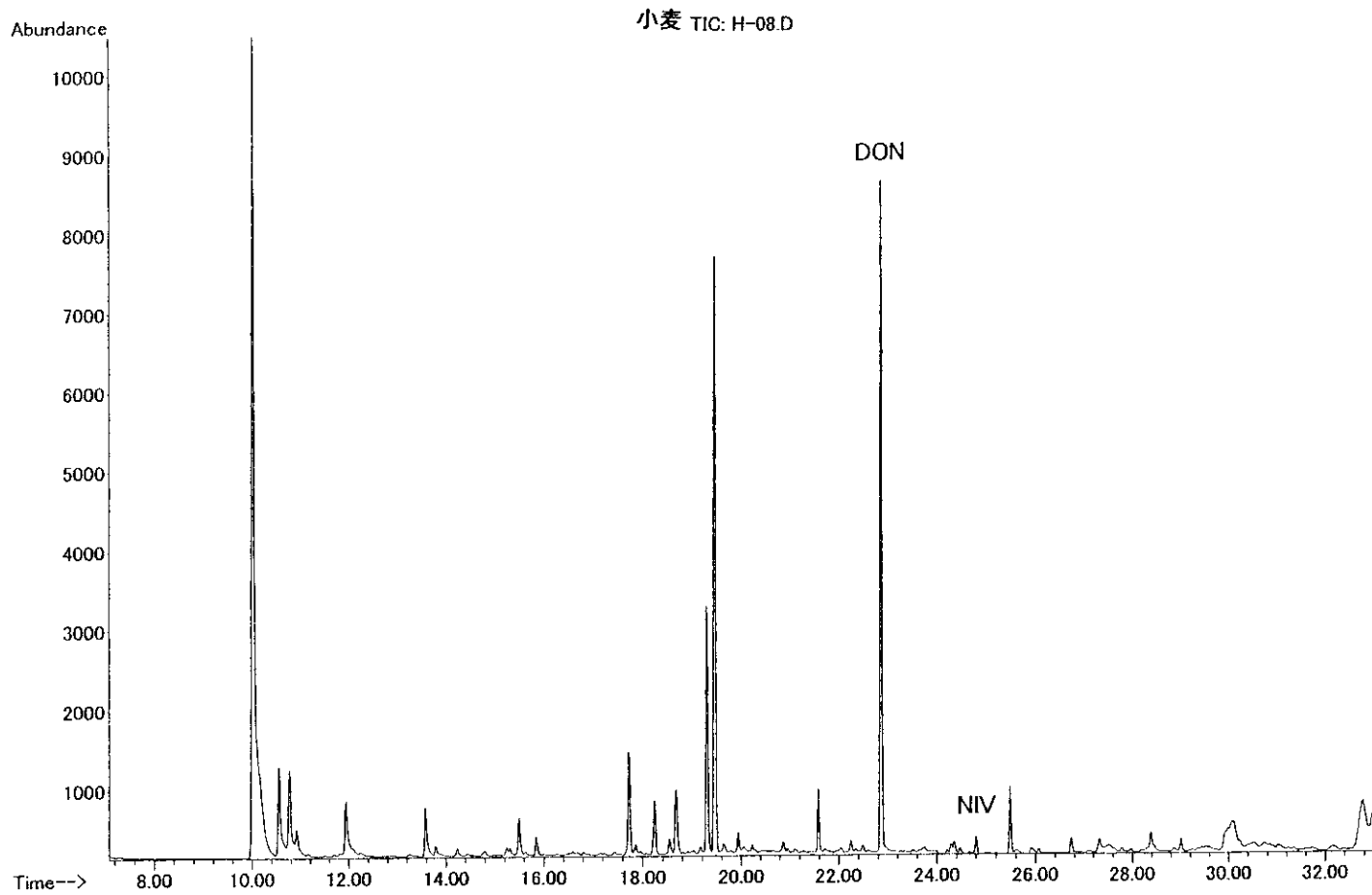


Sample Name: H-08
Misc Info :
Vial Number: 18



Sample Name: FH-08
Misc Info :
Vial Number: 8

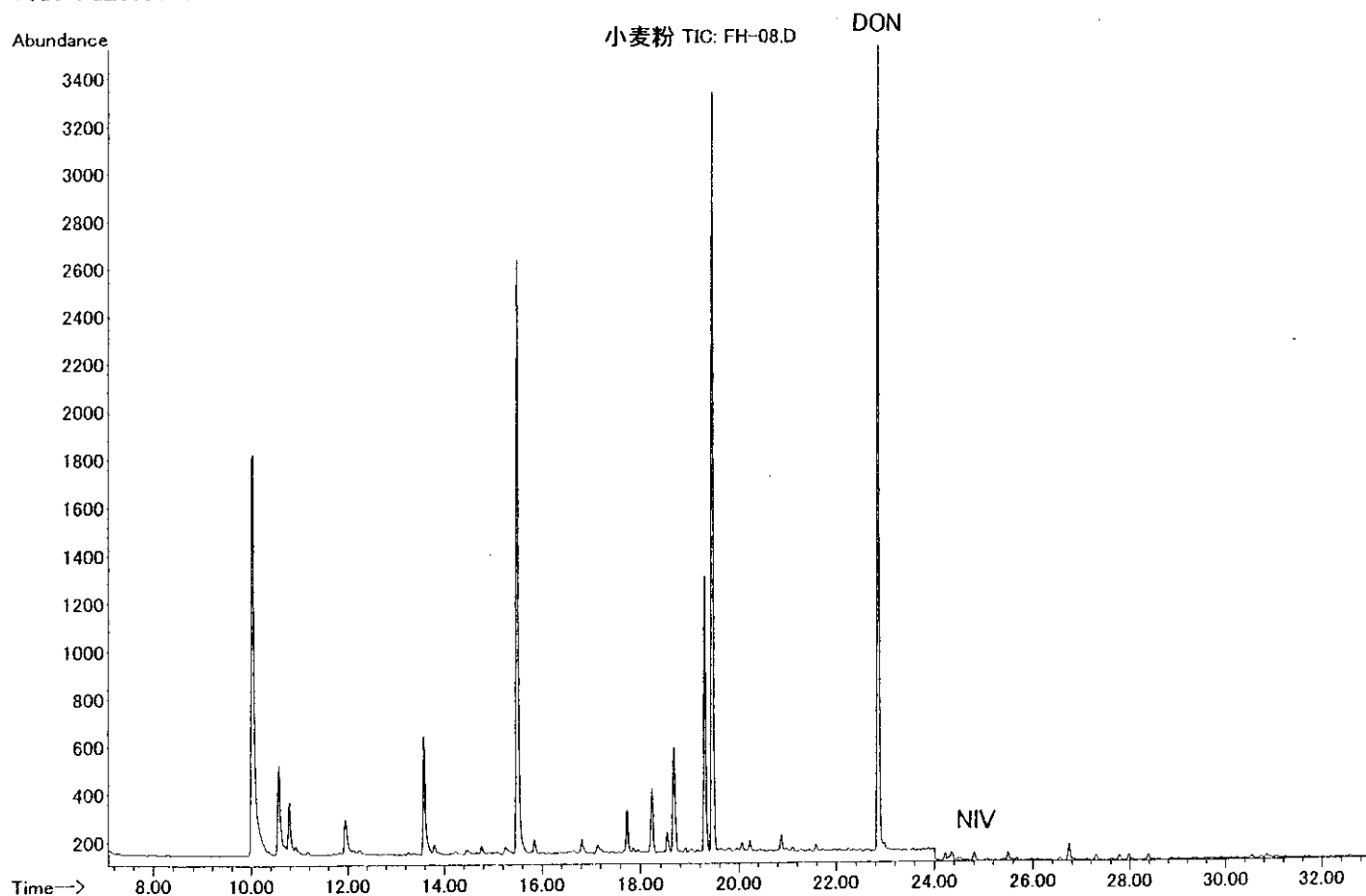


Fig. 2
19

厚生科学研究費補助金（特別研究）

分担研究報告書

製粉工程および調理工程におけるデオキシニバレノールの減衰に関する研究

分担研究者 高鳥 浩介 国立医薬品食品衛生研究所

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

昨年5月に小麦等のデオキシニバレノールに対して暫定基準値が設定されたが、基準値を決定するにあたり製粉工程および調理工程におけるデオキシニバレノールの減衰を正確に把握する必要がある。本研究では、小麦から小麦粉への製粉過程によるデオキシニバレノールの減衰率を、汚染小麦を用いて製粉工程を実験的スケールで行い、得られた各画分の濃度を測定することで算出した。さらに、調理工程における減衰率は、日本人が良く食する小麦粉製品の中から、パン、うどん、むしパンに焦点をあて、実際に汚染小麦を用いて調理し、調理前とあとのデオキシニバレノールの濃度を測定して算出した。その結果、製粉工程により得られた60%小麦粉における減衰率は高汚染小麦では約60%、低汚染小麦では50%であった。パンの製造工程による減衰率は0.1%-6.0%ほどであり、小麦粉に含まれたデオキシニバレノールのほとんどがパンに移行することが明らかになった。うどんを茹でることによる減衰は72%程度であった。蒸しパンでは蒸し時間によってやや異なる結果が得られたがおおむね18-25%であった。これらの結果から、製粉工程では半分程度の減衰が認められ、調理工程では茹でる工程がもっとも減衰が期待されることがわかった。

A. 研究目的

小麦のデオキシニバレノールの規格基準値を設定するために、より正確な製粉工程における減衰率および調理による減衰率を把握することが必要である。本研究は、

実験室レベルの製粉機を用いて製粉工程の再現し、食用となる小麦粉（60%小麦粉）、末粉および大ふすま、小ふすまの画分にわけそれぞれのデオキシニバレノールの含有量を測定し、減衰率を算出した。調理による減衰率は、むす、

ゆでる、焼く（パン）を汚染小麦粉から実際に調理して測定を行った。

B. 研究方法

1. 製粉工程による減衰率の測定

実験的製粉は2種類の汚染小麦を用いて行った。高濃度汚染小麦として $0.50 \mu\text{g/g}$ 程度のデオキシニバレノール汚染のある玄麦を用いた。低濃度汚染小麦として $0.20 \mu\text{g/g}$ 程度のデオキシニバレノール汚染のある玄麦を用いた。両者とも食糧庁の協力を得て（財）製粉協会製粉研究所にてテストミルを用いて製粉を行った。得られた画分は高濃度汚染小麦からは、60%粉、末粉、大ふすま、小ふすまの4画分であり、低濃度汚染小麦からは60%粉、末粉、ふすまの3画分であった。高濃度汚染小麦の製粉は4回行い、その内2回は4画分を採取し、残りの2回は60%粉のみを採取した。低濃度汚染小麦の製粉は1回のみおこなった。

2. 調理による減衰率の測定

パン製造における減衰率の検討は、2種類のデオキシニバレノール汚染の強力小麦粉を用いて行った。実験1は $0.71 \mu\text{g/g}$ デオキシニバレノール汚染の強力粉を用いて2回同様

な実験を行った。実験2は $0.86 \mu\text{g/g}$ デオキシニバレノール汚染の強力粉を用いて3回同様な実験を行った。パン生地は、食塩 5.6g, 脱脂粉乳 5.6g, 上白糖 14.0 g, 強力粉 280.0 g を混合した後、ショートニング 14 g を加えてさらに混合し作成した。このパン生地を自動ホームベーカリー（National）にセットしたのちミネラルウォーター196ml をいれドライイースト 2.8g を加えて4時間反応させ、室温で十分冷却させたあと、パンの外側、中間、内側の3ヶ所から50g ずつ分取し、 -30°C で保存した。測定にあたり、水分含量は（財）日本穀物検定協会において 40°C 1晩予備乾燥後、 135°C で1時間の常圧加熱乾燥法で測定した。

うどんは、 $0.85 \mu\text{g/g}$ デオキシニバレノール汚染のうどん用小麦粉を用い作成した。食塩 2g, ミネラルウォーター25 ml, うどん用小麦粉 50 g を満遍なくまぜ、こねてから平にし、4mm の太さに切断した。沸騰した湯 3L に 50g のうどんを入れ、15分茹でた後水を十分切って -30°C で保存した。

むしパンは、 $0.78 \mu\text{g/g}$ デオキシニバレノール汚染の強力粉を用いて作成した。食塩 2g, ミネラルウォーター30 ml, 強力粉 50 g を均等にまぜ、団子状にして蒸し器で10分およ

び 20 分蒸した。湯の温度は 100 度であった。室温で十分冷やした後、-30℃で保存した。

3. デオキシニバレノールの測定

テストミリングで得られた各画分および調理により得られた小麦粉製品は、50g を秤量し、アセトニトリルおよび水 (85:15) を 200 ml 加えてワーニングブレンダーで 5 分間攪拌した。その後 3500rpm で 5 分間遠心分離を行い上清をとり、多機能カラム法により精製し、紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフを用いて 220nm の波長で検出した。さらに確認試験はトリメチルシリル化を行い、ガスクロマトグラフ・質量分析計でおこなった。

C. 研究結果

1. 製粉工程による減衰率

表 1 はテストミルにより得られた各画分の比率をしめしたものである。高濃度小麦からは 60%粉が 59.9%、末粉が 11.5%、大ふすまが 18.9%、小ふすまが 9.6%の割合で得られた。低濃度玄麦からは 60%粉が 59.8%、末粉が 10.8%、ふすまが 29.4%の割合であった。高濃度小麦の 60%粉に残留するデオキシニバレノールは、玄麦の汚染濃度の約 35%から 41%であった。すなわち減衰率は平均して

61.3%であった。高濃度汚染の大ふすままでは玄麦の 200%近くが残留していた。高濃度汚染の小ふすままでは残留率は玄麦の 145-160%であった。末粉ではほぼ 60%粉同じ程度の残存率および減衰率を示した。一方低濃度小麦の製粉ではそれぞれの残留率が 60%粉で 50.5%、末粉が 58.9%、ふすまが 110.5%の割合であった。すなわち減衰率は 60%粉で 49.5%であった。低濃度小麦の末粉の残存率は 58.9%であり、60%粉より減衰率は低かった (表 2)。

表 3 は、パン製造後の製品のデオキシニバレノールの減衰率を示したが、 $0.71 \mu\text{g/g}$ デオキシニバレノール汚染の強力粉を用いた実験 1 ではパンの部位による違いがわずかに認められたが、パン全体としては玄麦の汚染濃度の 0.12%しか減衰していなかった。そこでパンの部位による違いを検討することも含めて汚染濃度がやや異なる汚染の強力粉を用いて実験 2 をおこなった。その結果パン外側では平均減衰率 4.38%、中間では 5.53%、内側では 6.65%とパンの部位による減衰率に有意差はみとめられなかった。パン全体としての減衰率も 5.7%と低い値を示した。

表 4 はうどん調理時における減衰率を示した。茹でたあとのうどん中のデオキシニバレノールは、茹でる

前の 65.9-74.2%まで減衰した。この結果、平均減衰率は 71.1%であり、茹でる工程はデオキシニバレノールの減衰が期待できることがわかった。

表5は、蒸しパンを想定した小麦製品の減衰率を表したものである。蒸し時間を 10 分および 20 分の 2 種類を比較検討した。10 分間の蒸し工程では減衰率は 17.9-19.2%であり、平均減衰率は 17.9%であった。20 分の蒸し工程では 12.8-33.3%の減衰率であり、平均の減衰率は 25.4%であった。これらの結果から蒸す工程では蒸し時間に比例して減衰率が上昇する傾向があるが、それでも小麦粉の汚染濃度の 80%程度のデオキシニバレノールは残存していることから、蒸す工程は低毒素化は期待できないことが示唆された。時間の長さによる減衰率の上昇は、小麦粉中のデオキシニバレノールは湯気が接触することにより水に溶けたものと考えられた。

D. 考察

小麦中のデオキシニバレノールの製粉工程の減衰に関して、テストミルを用いて検討した結果、玄麦中のデオキシニバレノールの約 60%が製粉工程中に減衰することが判明した。減衰率はデオキシニバレノールの汚染濃度によりやや差違が見られるが、これはデオキシニバレノール

の局在部位に関係しているものと考えられる。汚染デオキシニバレノールの多くはふすまに存在しており、ふすまを除くことによりデオキシニバレノールの汚染もある程度除去できる可能性が示された。

製粉工程の減衰率に関する国内外の研究は比較的多く行われているが、減衰率には幅があり、少ないもので 24-41%¹⁾多いもので 66±20%^{2),13)}との報告があったが、55-69%程度がもっとも多かった³⁾⁻⁶⁾。

調理による影響では、うどん>むしパン>パンの順でデオキシニバレノールの減衰率が高かった。デオキシニバレノールは水溶性であることから、茹でる工程で小麦中のデオキシニバレノールがゆで汁に溶出し、最も効果的に減衰できることが明らかになった。パンにおいてほとんど減衰は期待できないこともわかった。パン製造中のデオキシニバレノールの減衰に関しては、イーストを使用しない場合には 0-35%の減衰することが報告されているが^{2),7)}、イースト発酵のパンにおいてはほとんど減衰は期待できないとの報告が多い^{6),8)-11)}。中にはイースト発酵によりデオキシニバレノールが増加するという報告もなされている²⁾。うどんの調理過程における減衰の報告としては、自然汚染小麦を用いた研究としては

Nowicki らの報告がある。これによると、日本のうどんではデオキシニバレノールがゆで汁に移行することによって、24%まで減衰し、中華麺ではカンスイ処理による減毒素化がおこるため 20%まで減衰すること、スパゲティーにおいては通常の湯がき条件では 44-51%の減衰しか認められないが、湯で時間を長くすることによって 38-45%減衰率をあげることができる¹²⁾。

以上の結果から、本研究で得られた減衰率はおおむね今まで報告のある調理工程における減衰率にあてはまっており、妥当な結果であると評価できる。また、小麦粉をパンとして食する場合、製粉工程による減衰率だけが期待されるが、茹でて食する場合は玄麦のデオキシニバレノール汚染量の 88%が減衰されることが期待できる。本研究の結果は、デオキシニバレノールの摂取量の判定に必須な知見であり、基準値の見直しに活用されることが期待される。

E. 参考文献

- 1)Hart,L.P., et al., J. Agric Food Chem., 31, 657-659, 1983
- 2)Young,J.C.,et al., J. Agric Food Chem., 32, 659-664, 1984
- 3)Lee,U.S. et al., J. Agric Food Chem., 35, 126-129, 1987
- 4)Accerbi,M. et. al., J. Food

- Protection 62, 1485-1487, 1999
- 5)Seitz,L.M. et al., Cereal Chem., 62, 467-469, 1985
- 6)Scott. P.M, et al., Food additives and contaminant., 1, 313-323, 1984
- 7)Tanaka,T. et.al., J. Food Hyg. Soc.Japan, 27, 653-655, 1986.
- 8)Boyacioglu,D. et.al., J.Food Sci., 58, 416-418,1993
- 9)EI-Banna,A. et.al., J.Food Protect. 46, 484-485, 1983.
- 10)Scott, P.M.et al., Cereal Chem., 63, 146-160, 1986.
- 11)Seitz,L.M. et al.,, J. Agric Food Chem., 33, 373-377, 1985
- 12)Nowicki,T.W. et.al., J.Cereal Science. 8,189-202, 1988
- 13) Tanaka,K., Hara,N., Goto,T. and Manabe,M., "Proceeding of International Symposium of Mycotoxicology'99," pp96-100, 1999

E. 研究発表

なし

表1 テストミルでの比率

高濃度小麦玄麦	kg	比率
60%粉	1.9	59.9
末粉	0.4	11.5
大ふすま	0.6	18.9
小ふすま	0.3	9.6

低濃度玄麦	kg	比率
60%粉	6.1	59.8
末粉	1.1	10.8
ふすま	3.0	29.4

表 2 ミリングによる減衰率

測定試料	mg/kg	残留率 (%)	減衰率 (%)	平均減衰率 (%)
高濃度汚染玄麦	0.51	100.0	0.0	
高濃度汚染 60%粉 1回目	0.2	39.2	60.8	61.3
高濃度汚染 60%粉 2回目	0.18	35.3	64.7	
高濃度汚染 60%粉 3回目	0.2	41.2	58.8	
高濃度汚染 60%粉 4回目	0.21	39.2	60.8	
高濃度汚染 大ふすま 1回目	0.96	217.6		
高濃度汚染 大ふすま 2回目	1.11	188.2		
高濃度汚染 小ふすま 1回目	0.74	160.8		
高濃度汚染 小ふすま 2回目	0.82	145.1		
高濃度汚染 末粉 1回目	0.2	41.2	58.8	59.8
高濃度汚染 末粉 2回目	0.21	39.2	60.8	
低濃度汚染玄麦	0.22	100.0	0.0	
低濃度汚染 60%粉	0.12	50.5	49.5	49.5
低濃度汚染 大ふすま	0.52	110.5		
低濃度汚染 末粉	0.13	58.9	41.1	41.1

表3 パン製造による減衰率

実験1

	重量 (g)	水分含量	DON濃度 (mg/g)	残存率 (%)	減衰率 (%)	平均減衰率 (%)	パン全体の減衰率	標準偏差 (%)
パン用小麦粉	50	14.00	0.71	100.00				
パン 外側 1回目	50	15.50	0.84	118.46	0.00	0.00	0.12	0.24
パン 外側 2回目	50	13.60	0.86	120.75	0.00			
パン 中間 1回目	50	40.20	0.77	108.24	0.00	0.00		
パン 中間 2回目	50	49.20	0.77	108.24	0.00			
パン 内側 1回目	50	50.60	0.71	99.89	0.11	0.36		
パン 内側 2回目	50	46.10	0.71	99.39	0.61			

実験2

	重量 (g)	水分含量	DON濃度 (mg/g)	残存率 (%)	減衰率 (%)	平均減衰率 (%)	標準偏差 (%)	パン全体の減衰率	標準偏差 (%)
パン用小麦粉	50	14.00	0.86	100.00	0.00				
パン 外側 1回目	50	20.90	0.88	102.85	0.00	4.89	4.24	5.69	2.46
パン 外側 2回目	50	25.80	0.80	92.41	7.59				
パン 外側 3回目	50	23.70	0.80	92.91	7.09				
パン 中間 1回目	50	45.70	0.81	94.17	5.83	5.53	0.26		
パン 中間 2回目	50	45.70	0.81	94.62	5.38				
パン 中間 3回目	50	43.50	0.81	94.62	5.38				
パン 内側 1回目	50	55.80	0.82	95.09	4.91	6.65	1.95		
パン 内側 2回目	50	51.60	0.79	91.24	8.76				
パン 内側 3回目	50	50.40	0.81	93.72	6.28				

表 4 うどんによる減衰率

測定検体	DON濃度 (mg/g)	残存率 (%)	減衰率 (%)	平均減衰率 (%)	標準偏差 (%)
うどん茹でる前	0.85	100.00	0.00		
うどん茹でたあと* 1回目	0.22	25.81	74.19	71.11	4.57
うどん茹でたあと* 2回目	0.21	24.34	75.66		
うどん茹でたあと* 3回目	0.27	31.38	68.62		
うどん茹でたあと* 4回目	0.29	34.02	65.98		

*茹でる条件は、湯3リットルで15分でおこなった。

表 5 蒸した場合の減衰率

測定検体	蒸し温度	蒸し時間(min)	DON濃度 (mg/g)	残存率 (%)	減衰率 (%)	平均減衰率 (%)	標準偏差
蒸す前			0.78	100.00			
蒸したあと 1回目	100℃	10	0.64	82.05	17.95	17.95	1.05
蒸したあと 2回目	100℃	10	0.63	80.77	19.23		
蒸したあと 3回目	100℃	10	0.65	83.33	16.67		
蒸したあと 4回目	100℃	10	0.64	82.05	17.95		
蒸したあと 1回目	100℃	20	0.68	87.18	12.82	25.38	9.08
蒸したあと 2回目	100℃	20	0.52	66.67	33.33		
蒸したあと 3回目	100℃	20	0.62	79.49	20.51		
蒸したあと 4回目	100℃	20	0.51	65.38	34.62		
蒸したあと 5回目	100℃	20	0.58	74.36	25.64		

製粉工程による減衰率

	使用小麦	小麦粉画分	小麦中のDON濃度 (mg/g)	減衰率	参考文献
今回の研究結果	自然汚染小麦	60%粉	0.51	61.30%	
	自然汚染小麦	60%粉	0.21	49.50%	
今までの報告	自然汚染小麦	ストレートグレード (クッキーの原料)	0.02	65%	Hart, L.P., et al., (1983)
	自然汚染小麦	小麦粉	0.9	24-41%	Lee, U-S, et al., (1987)
	自然汚染小麦	小麦粉	0.17	33%	Tanaka, T., et al., (1986)
	自然汚染小麦 (熊本産)	60%粉	0.37	73%	Tanaka, K., et al., (1999)
	自然汚染小麦 (大分産)	60%粉	0.15	74%	
	自然汚染小麦	細上粉 低品質	10.4	69.30%	Scott, P.M., et al., (1984)
		ストレートグレード (クッキーの原料)		47.40%	
				50.60%	
		ケーキ用		64%	Young, J.C., et al., (1984)
		ストレートグレード (クッキーの原料)		61%	
	汎用		76%		

Hart, L. P., et al.,

J. Agric Food Chem., 31, 657-659, 1983

Lee, U. S. et al.,

J. Agric Food Chem., 35, 126-129, 1987

Tanaka, K., Hara, N., Goto, T. and Manabe, M.,

"Proceeding of International Symposium of Mycotoxicology '99," pp96-100, 1999

Scott, P.M. et al.,

Food additives and contaminant., 1, 313-323, 1984

Young, J.C., et al.,

J. Agric Food Chem., 32, 659-664, 1984

Tanaka, T. et al.,

J. Food Hyg. Soc. Japan, 27, 653-655, 1986.

調理食品	条件	減衰率	出典
パン		2.9% 0% 0% 0% 0%	今回の結果 Scott. P.M, et al., Boyacioglu,D. et.al., Seitz,L.M. et al., El-Banna,A. et.al.,
うどん	日本式うどん 日本式うどん 中華麺 スパゲティー	71.1% 76% 80% 56%	今回の結果 Nowicki,T.W., et al.,
むしパン	98℃、10分	20.0%	今回の結果
菓子	イーストドーナツ クッキー ケーキ	140% 51% 39%	Young,J.C.,et al.,

Nowicki,T.W., et al., J.Cereal Science 8,189-202, 1988

Young,J.C.,et al., J. Agric Food Chem., 32, 659-664, 1984

Scott. P.M, et al., Food additives and contaminant., 1, 313-323, 1984

Boyacioglu,D. et.al., J.Food Sci., 58, 416-418,1993

Seitz,L.M. et al., J. Agric Food Chem., 33, 373-377, 1985

El-Banna,A. et.al., J.Food Protect. 46, 484-485, 1983.

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

て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 $\mu\text{g}/\text{ml}$) —送付したデオキシニバレノール標準液 (20.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.10

$\mu\text{g}/\text{ml}$ に相当する。

6. 手順

1) 抽出

試料を正確に 50.0g 量りとった 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 ぐわえ、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 $^{\circ}$ C

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) を使い、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 1 2 分から 1 8 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。1 2 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

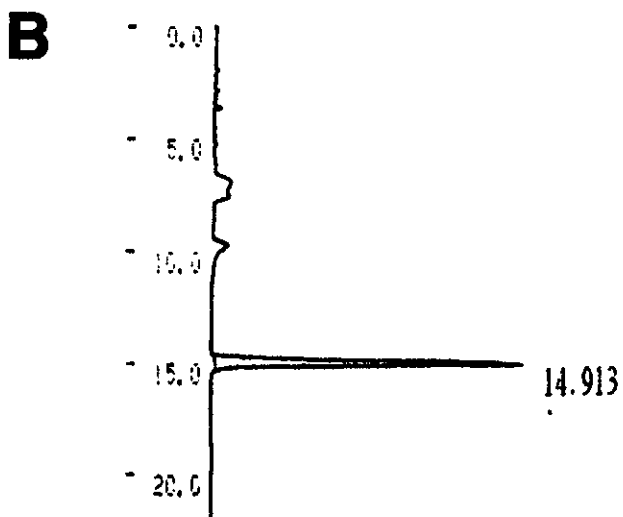
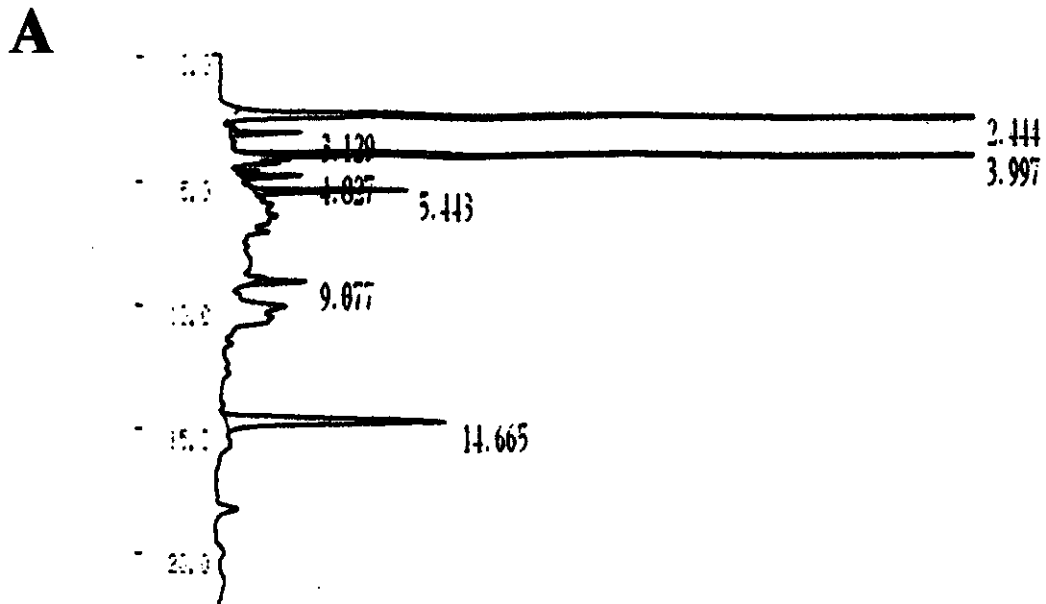


Fig. 1 Typical HPLC patterns of DON
A: Contaminated sample wheat (10 μ l)
B: DON standard 2 μ g/ml (10 μ l)

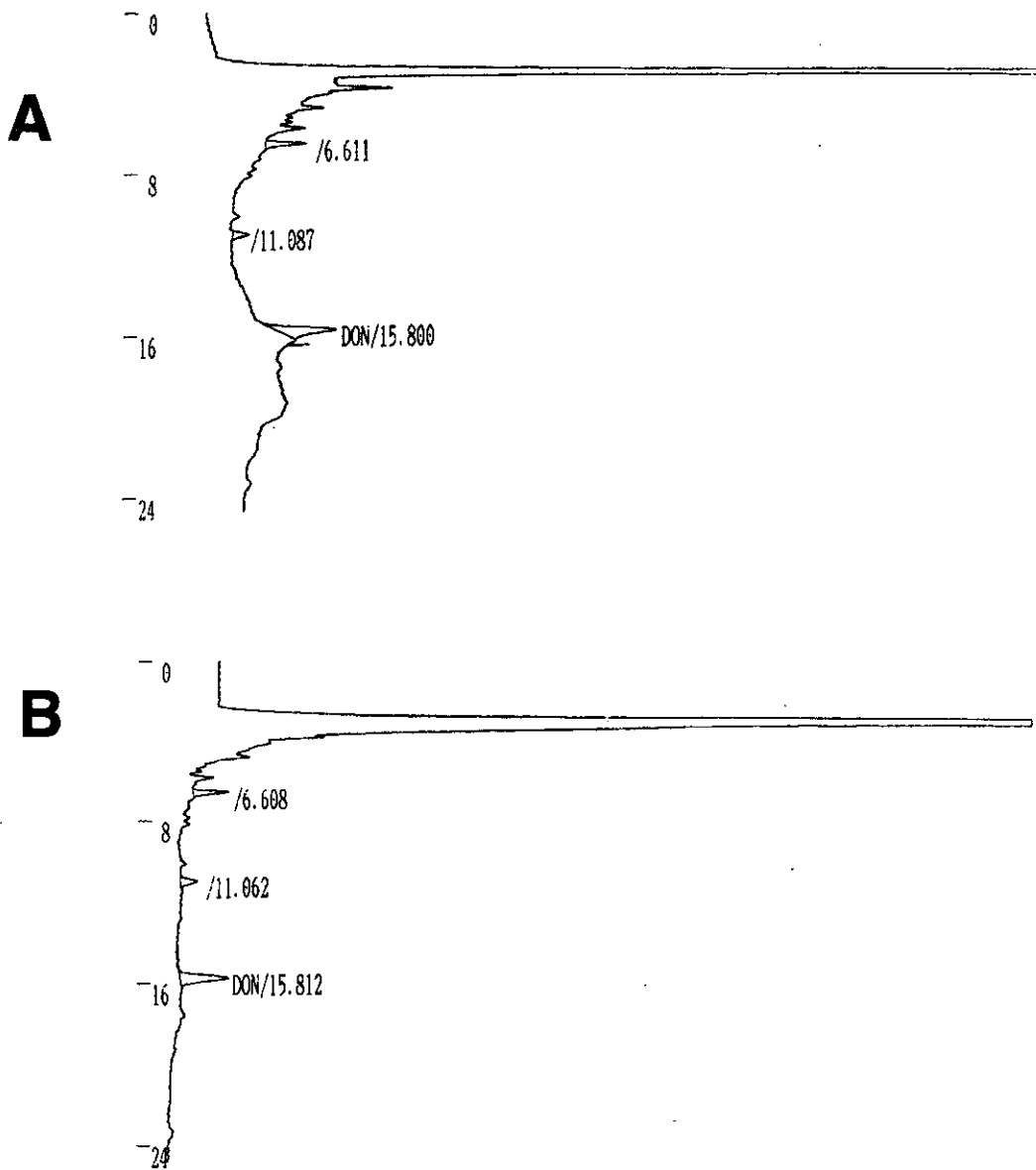


Fig. 2 HPLC patterns of DON with or without ammonium acetate

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

	①	②	③	④	⑤
方法					
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