

## TLC分析によるデオキシニバレノール産生*Fusarium*属菌の検出方法の検討

和田 紀乃<sup>a</sup>, 上原 さとみ<sup>b</sup>, 高橋 由美<sup>b</sup>, 岩越 一之<sup>c</sup>, 増渕 珠子<sup>d</sup>,  
横山 敬子<sup>b</sup>, 新開 敬行<sup>b</sup>, 三宅 啓文<sup>a</sup>, 貞升 健志<sup>e</sup>, 千葉 隆司<sup>e</sup>  
(外部機関査読者: 谷口 賢<sup>f</sup>)

食品から分離される真菌の一部はカビ毒を産生し、カビ毒の産生確認には薄層クロマトグラフィー (TLC) 等を用いた定性分析が一般的である。しかしながら、TLC 分析では抽出操作の煩雑さのみならず、TLC 実施時に有害な溶媒を使用する必要がある。今回、*Fusarium* 属菌が産生するカビ毒デオキシニバレノール (DON) の定性分析において、菌培養液からの毒素抽出の簡便化と操作時間の短縮化を図るとともに、TLC の検出試薬についてより毒性の低い試薬への置換を検討した。DON 産生 *Fusarium* 属菌を用いて菌培養液を作製後、塩とアセトニトリルによる抽出を行った結果、塩化ナトリウムの添加濃度が30%以上で、水とアセトニトリルの分離が良好となり抽出にかかる操作時間が短縮された。さらに、塩化ナトリウムを炭酸ナトリウムに変更することで、同じく *Fusarium* 属菌が産生するカビ毒ニバレノールの抽出も可能であった。TLC 分析においては、トルエンとアセトンを用いた展開溶媒で DON バンドの視認性が良好であったほか、DONのアセチル化体である15-アセチルデオキシニバレノール及び3-アセチルデオキシニバレノールの同時検出も可能であった。

**キーワード:** デオキシニバレノール, *Fusarium*属菌, カビ毒, 薄層クロマトグラフィー (TLC), 相分離

### はじめに

*Fusarium* 属菌は、デオキシニバレノール (以下、DON) をはじめ DON のアセチル化体である15-アセチルデオキシニバレノール (以下、15ADON) 及び3-アセチルデオキシニバレノール (以下、3ADON) やニバレノール (以下、NIV) などの様々なカビ毒を産生する。これらの毒素は、当該菌に汚染された麦類の喫食による食中毒事例の原因物質として報告されている<sup>1-3)</sup>。これまで当センターで行った都内流通食品検査においても *Fusarium* 属菌が検出されており<sup>4)</sup>、食品から分離される真菌のカビ毒産生性確認は、食品衛生及び食品のカビ毒汚染調査の一環として重要である。現在、食品から分離された *Fusarium* 属菌について、DON の産生確認を行うための公定法は定められていない。DON の産生試験には、一般的に麦などの天然培地を用いる方法と、合成液体培地を用いる方法が報告されている<sup>5)</sup>。前者では、天然成分由来の脂質などの夾雑成分が多くなり DON 抽出の際にカラム精製等の煩雑な手順を要する。一方、後者は夾雑成分が少なく、精製の簡便化が期待される。そこで、合成液体培地を用いて培養した菌培養液から、カラムを使用しない簡便な DON 抽出法として、塩を用いた相分離による抽出条件を検討した。また、DON を検出する迅速、簡便なスクリーニング方法として、薄層クロマト

グラフィー (以下、TLC) が用いられている。現在国内では、呈色試薬である4-(p-ニトロベンジル)ピリジン (NBP) 試薬を用いた検出報告が多い<sup>6,7)</sup>が、NBP を溶解する際に人体に有害とされるクロロホルムや四塩化炭素が使用されており、日常検査の一環としてはより安全性の高い検査方法が求められる。他の検出方法として、NBP 法と比べ感度が劣る方法ではあるが蛍光剤に塩化アルミニウムを用いた方法が報告されている<sup>8,9)</sup>。しかし、この方法の実際の検出感度に関する情報は乏しい。そこで今回、塩化アルミニウムを用いた検出法について検出限界などのスクリーニング性能についても検討を行ったので報告する。

### 材料と方法

#### 1. 供試菌株

表1に示す購入菌株8株及び当センター保存菌株6株の計14株を供試した。DON産生性の確認は、既報<sup>10)</sup>に従いPCR法により行い、NIV産生性の確認は、後述の方法5に示すLC-MS/MSにより行った。各菌株はクロラムフェニコール (富士フィルム和光純薬 (株) 製) を添加したポテトデキストロース寒天培地 (栄研化学 (株) 製) に接種し、25℃で7日間の前培養したものを使用した。

<sup>a</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科  
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

<sup>b</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科

<sup>c</sup> 東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科

<sup>d</sup> 東京都市場衛生検査所大田出張所

<sup>e</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部

<sup>f</sup> 名古屋市衛生研究所

## 2. 培地及び試薬

### 1) 培地の調整

菌株毒素培養液の作製には、トリコテセン系カビ毒産生用合成培地である salts sucrose asparagine (SSA) 培地を用いた。既報<sup>5)</sup>に従って調製した溶液を攪拌溶解後、110°C、10分で滅菌した。

表 1. 使用菌株

No	菌株番号	菌種	毒素産生性
1	JCM9873	<i>Gibberella zeae</i>	DON, 15ADON
2	NBRC113358	<i>Fusarium asiaticum</i>	DON, 3ADON
3	NBRC4407	<i>Gibberella zeae</i>	—
4	NBRC6608	<i>Gibberella zeae</i>	—
5	NBRC9462	<i>Gibberella zeae</i>	NIV
6	NBRC32584	<i>Fusarium crookwellense</i>	—
7	NBRC32585	<i>Fusarium crookwellense</i>	—
8	NBRC32586	<i>Fusarium crookwellense</i>	—
9	保存株F8	<i>Fusarium asiaticum</i>	—
10	保存株F21	<i>Fusarium asiaticum</i>	—
11	保存株F61	<i>Fusarium asiaticum</i>	—
12	保存株F65	<i>Fusarium asiaticum</i>	—
13	保存株F69	<i>Fusarium asiaticum</i>	—
14	保存株F70	<i>Fusarium asiaticum</i>	—

### 2) TLC 検出用試料及び試薬

DON 及び15ADON, 3ADON, NIV の標準品は、関東化学(株)製のマイコトキシン混合液2 (B-トリコテセン) 100 µg/mL を使用した。また、DON 及び15ADON 精製試料として、菌株 No.1の培養液を Romar 社製多機能カラム MultiSep#227Trich+で処理したものをを用いた。塩化ナトリウム、炭酸ナトリウム、塩化アルミニウム(6水和物)及びペンタンは富士フィルム和光純薬(株)製特級を、アセトニトリルは富士フィルム和光純薬(株)製 LC/MS 用を、酢酸エチル及びエタノール(99.5%)は富士フィルム和光純薬(株)製 HPLC 用を、トルエンは富士フィルム和光純薬(株)製クロマトグラム用を用いた。

### 3. 器具及び装置

TLC プレートは、Merck 社製 TLC Silica gel 60アルミプレートに10 cm×10 cmに切って使用した。濃縮乾固装置は、タイテック社製遠心式濃縮機 (VC-15SP) を、TLC 展開槽は CAMAG 社製二槽式展開槽を使用した。

### 4. 抽出条件の検討

前培養した平板から直径約6 mm の菌体をかきとり、各菌株を SSA 培地10 mL に接種し、25°C、4-14日間培養後、培養液を試料とした。15 mL PP 製遠沈管または2 mL マイクロチューブに試料1 mL または標準品添加試料1 mL を採取し、図1に記載の①から④の条件で溶媒及び塩を加え、5分間ボルテックス後、3,500×g (15 mL PP 製遠沈管) また

は13,000×g (2 mL マイクロチューブ)、5分間、10°Cで遠心分離し、上層の溶媒層を採取し、抽出溶液とした。塩化ナトリウム添加量は試料1 mL に対し10%、30%、50%とし、各溶媒の添加量は全体量に対し60%または40%とした。各抽出溶液は約500 µL-1 mL 採取し、50°C、減圧下で遠心乾固濃縮後、アセトニトリル25-50 µL で溶解し試験溶液とし、TLC に供試し、結果を比較した。

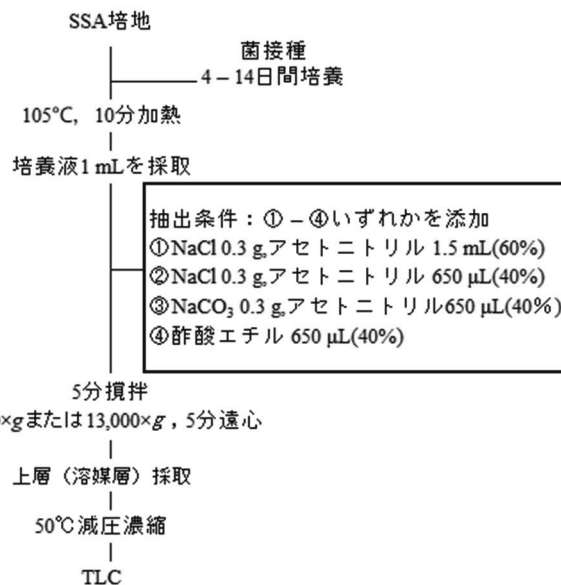


図1. 試験溶液の作製

### 5. LC-MS/MS による測定

上記4で作製した抽出溶液の DON, 15ADON, 3ADON, NIV の濃度を LC-MS/MS により測定した。抽出溶液は、多機能カラム Autoprep MF-T 1500を用いて精製し、検量線の濃度範囲 (1-50 ng/mL) に収まるよう適宜希釈 (10-1000倍) を行い装置に供した。

装置は WATERS 社製 Xevo TQ-XS を用いた。MS 測定条件はイオン化法 ESI (-)、測定法 MRM: DON (355 > 295), 15ADON (337 > 150), 3ADON (337 > 307), NIV (371 > 281) にて行い、LC 測定条件は分析カラム: Inertsil ODS-3 (2.1×150 mm, 3 µm, GL Science)、移動相 A: 水 (10mM 酢酸アンモニウム) B: アセトニトリル、流速 0.35 mL/min、グラジエント(A:B) 0min(96:4)→1min(96:4)→3min(92:8)→6min(82:18)→12min(73:27)で行った。各カビ毒の定量下限値は0.02 µg/mL とした。

### 6. TLC の条件検討

既報<sup>4)</sup>の酢酸エチル:トルエン (3:1,v/v) を参考に、アセトン及びトルエンの代替溶媒としてペンタンを使用し、DON, 15ADON, 3ADON の分離が良い組成を検討した。

展開方法は、展開溶媒を5 mL 入れた展開槽に、標準品5 µL または試験溶液2.5-5 µL を塗布し乾燥させた TLC プレートを挿入して15分展開した。展開後、TLC プレートを取り出し、十分に乾燥させ、エタノールで調整した20%塩化アルミニウム溶液を3-5回よく噴霧後、130°C、30分加熱し、UV 照射 (365 nm) を行い青色蛍光バンドの有無を確

認した. TLC の判定は複数名で実施し, 全員がバンドを目視により確認できた試験溶液を陽性とした.

較し, 検出限界の目安を確認した.

結 果

7. TLC のスクリーニング性能の評価

本手法による検査に要する菌培養日数と DON の検出限界を確認した.

1) 培養日数の確認

DON 産生株を用い培養日数ごとのバンドの視認性を判定し, 試験に最適な日数を比較した.

2) 検出限界の確認

DON 非産生株の菌培養液に標準品を添加し, 既知の DON 濃度 (1, 2, 5 µg/mL) に調整した培養液試料から試験溶液を作製し, TLC で展開後バンドの有無を判定した. また, DON 産生株培養液中の DON 濃度と TLC 結果を比

1. 供試菌株のカビ毒産生性の確認

購入菌株8株及び当センター保存菌株6株について, 各カビ毒産生性を確認した結果を表1に示す. 菌株 No.1及びNo.2では PCR 法により既報のサイズの PCR 産物を確認し, 菌株 No.5では7日目培養液試料で NIV 位置に定量ピークを検出した.

2. 抽出条件の検討

アセトニトリルを用いた抽出について, 塩化ナトリウム添加量を比較した結果を表2に示す. 試料とアセトニトリルの相分離は塩の析出を伴わない10%濃度でも可能であっ

表2. 塩化ナトリウム濃度における抽出の比較

NaCl濃度 (w/v)	10%	30%	50%
塩の析出	-	±	+ (飽和)
アセトニトリル回収量 (mL)	1.2	1.2-1.3	1.2-1.3
乾固時間 (分)	90	60	60

表4. 展開条件と各 Rf 値

溶媒組成	Rf値		
	DON	15ADON	3ADON
A 酢酸エチル:トルエン (3:1)	0.31	0.53	0.65
B アセトン:トルエン (2:3)	0.29	0.48	0.59
C 酢酸エチル:ペンタン (5:2)	0.42	0.68	0.79

表3. 抽出溶媒と添加割合における標準品回収率

条件	使用溶媒	溶媒割合	添加塩 (30%w/v)	抽出液回収量 (mL)	抽出液乾固時間 (分)	回収率 (%)			
						DON	15ADON	3ADON	NIV
①	アセトニトリル	60%	NaCl	1.2	60	26.3	37.9	35.2	8.8
②	アセトニトリル	40%	NaCl	0.45	45	43.3	80.7	73.7	6.5
③	アセトニトリル	40%	NaCO <sub>3</sub>	0.6	60	74.8	56.7	63.7	49.1
④	酢酸エチル	40%	なし	0.5	30	16.7	64.7	70.7	2.0

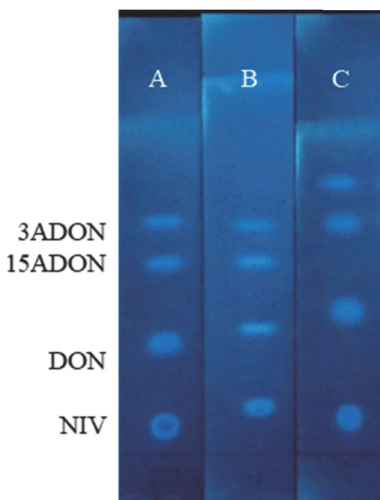


図2. 各溶媒組成における標準品展開像

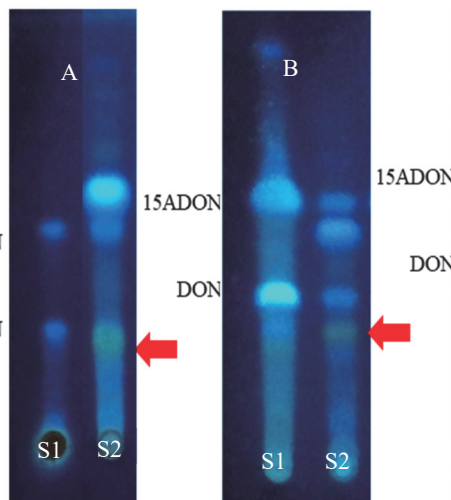


図3. 菌株 No.1培養7日目試験溶液の展開像  
S1: DON, 15ADON 精製試料  
S2: 菌株 No.1培養7日目試験溶液  
赤矢印: 夾雑物

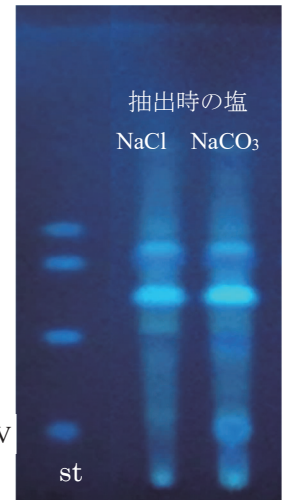


図4. 菌株 No.5 の展開像  
st: 標準品 100 µg/mL

た。また分離回収したアセトニトリル量は、各塩化ナトリウム濃度で同程度であったが、乾固時間は10%と比べ、30%及び50%では濃縮に要する時間が30分短縮された。このため、アセトニトリルを用いた抽出における塩化ナトリウム添加濃度は、操作の迅速性の観点から30%を採用し、この後の実験を実施することとした。なお、使用する塩を炭酸ナトリウムに変えて抽出操作を行ったところ、塩化ナトリウムと同様に30%以上の添加で塩の析出が認められ、10%と比べ抽出液の乾固時間は短縮された。

次にカビ毒非産生株培養液に B-トリコセセン標準品100 ng/mL を添加した試料について、各抽出条件で処理した際の標準品回収率を表3に示す。標準品の DON 回収率が最も高かったのは、条件③であり、ADON 回収率は条件②であった。溶媒割合の異なる条件①と②を比較すると、DON 回収率は条件②で良好であり、操作性についても使用する溶媒量が少なく乾固時間が短縮された。また、溶媒に酢酸エチルを用いた条件④では、条件②と比べて抽出液の乾固時間は短縮されたが、DON 及び ADON の回収率は低かった。

また、NIV 抽出のため、塩の種類について条件③の炭酸ナトリウムの添加を追加で検討した。表3に示すとおり、DON 及び NIV の回収率は検討した条件の中で最も高かったものの、抽出液回収量は条件②と比較して約0.15 mL 多く、その結果、乾固に要する時間は約15分長かった。なお、各抽出条件で処理した試験溶液を TLC 分析したところ、DON の視認性はいずれも同程度であった。

以上より抽出条件として、回収率及び操作性の観点から条件②（アセトニトリル40%）を採用し、この後の実験を実施することとした。

### 3. TLC の条件検討

標準品を用いて DON, 15ADON 及び 3ADON の展開溶媒組成を検討したところ、表4に示す溶媒組成条件で各バンドは相互に分離された。各展開溶媒の Rf 値について既報の溶媒 A と比較し、B では DON, 15ADON, 3ADON の各 Rf 値はやや小さくなる傾向にあり、C では大きくなる傾向にあった。いずれの組成においても各バンドは相互に分離され、DON 及び 15ADON, 3ADON の各 Rf 値差も同程度

表5. TLC 結果と DON 測定濃度

毒素	検出法	DON		15ADON		3ADON	
		TLC	LC-MS/MS (µg/mL)	TLC	LC-MS/MS (µg/mL)	TLC	LC-MS/MS (µg/mL)
菌株No1 15ADON産生	3日	-	0.36	-	3.73	-	-
	5日	+	3.09	-	0.57	-	-
	7日	+	3.62	+	6.61	-	0.32
菌株No2 3ADON産生	3日	-	-	-	-	-	+
	5日	+	6.31	-	-	+	13.83
	7日	+	67.8	-	-	+	65.92

- : TLC 陰性, LC-MS/MS 定量下限値以下 ; + : TLC 陽性

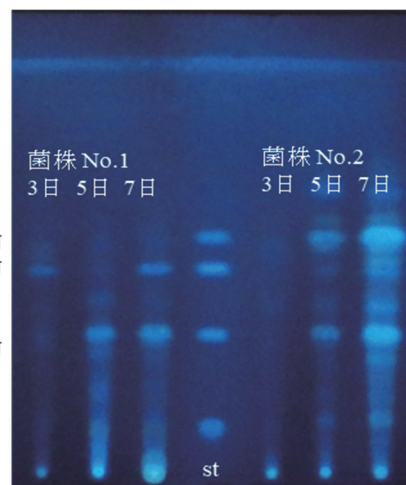


図5. 菌培養日数ごとの展開像

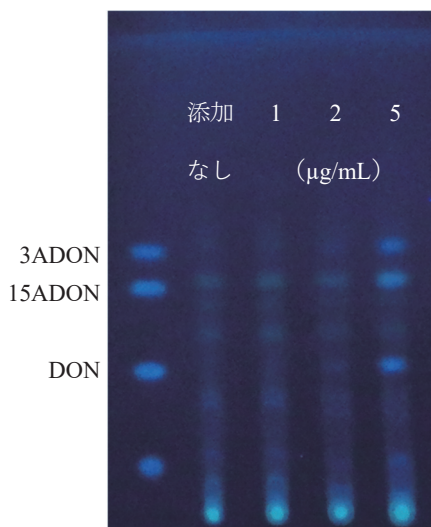


図6. 標準品添加試料の展開像

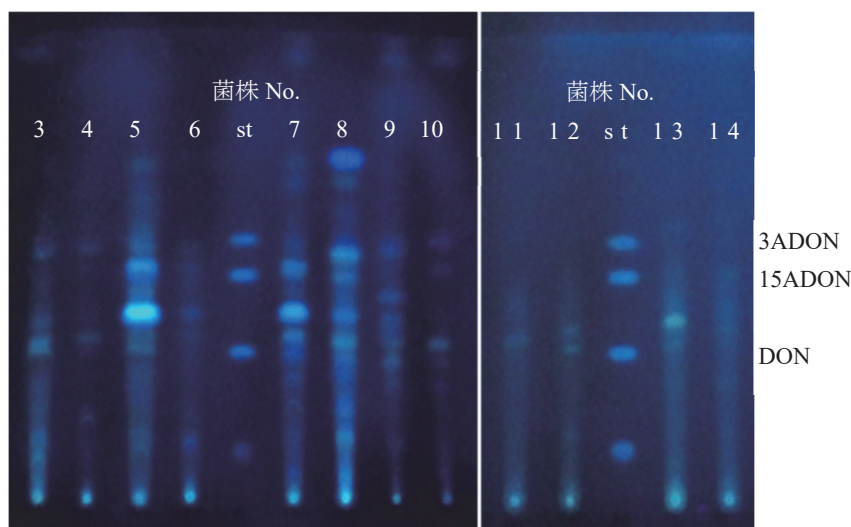


図7. 毒素非産生株の展開像

であった。

DON バンドの視認性については、B で最もバンドのまとまりが良好であった。ADON バンドについてはいずれの組成においても同程度のまとまりを示し、視認性に大きな違いは認められなかった(図2)。

次に、菌株 No.1 (DON, 15ADON 産生) の7日培養試料を用いて TLC 分析を行った結果を示す(図3)。DON については、溶媒 B では夾雑成分と良好に分離され、バンドの視認性が最も良好であった。一方、溶媒 A 及び C では、DON 付近に夾雑物(赤矢印)が出現し、DON バンドとの分離が不良であった。また、溶媒 B と比較してバンドが拡散し視認しづらい傾向にあった。15ADON については、いずれの溶媒においても夾雑バンドと分離し、明瞭なバンドが確認され、定性的な確認を行うことができた。

また、標準品を用いた NIV の視認性も溶媒 B で最もまとまりがあり、菌株 No.5 (NIV 産生) の14日培養試料を用いて TLC 分析したところ、抽出条件③で NIV 位置にバンドが認められた(図4)。

#### 4. TLCのスクリーニング性能の評価

##### 1) 培養日数の検討

DON 産生株について、培養日数ごとの TLC における DON 視認性を確認した結果を示す(図5)。菌株 No.1 (DON, 15ADON 産生) 試料では、培養5日目に DON バンドが確認され、培養7日目に15ADON バンドが明瞭に確認された。また、菌株 No.2 (DON, 3ADON 産生) 試料では、培養5日目に3ADON バンドが確認され、培養7日目に DON バンドが明瞭に確認された。

##### 2) 検出下限の検討

DON非産生株に標準品を添加し、本抽出法を行ったところ、標準品5 µg/mL添加試料でDON及び各ADONのバンドが検出された(図6)。また、TLCによる定性結果とLC-MS/MSによる定量値を比較するため、図5で用いた試料のTLCの定性結果とLC-MS/MSを用いた各化合物の定量結果を表5に示した。図5及び表5をみると、TLC像の蛍光強度はおおむね各毒素の濃度差を反映していた。すなわち、菌株No.1の5日と7日のDONについてはTLCの蛍光とLC-MS/MSの定量値は同程度であり、菌株No.2では5日と比較し、7日でTLCのDON及び3ADONの蛍光は明瞭に確認され定量値も約5-10倍以上高かった。

##### 3) 特異性の検討

本抽出法とTLC条件を用いたDON検出について、特異性の確認を行った結果を図7に示す。いずれのDON非産生株においてもTLCでDON位置に類似バンドは認められなかった。一方、DON及びADON以外の青色蛍光を発するバンドが確認された。

## 考 察

TLC法により培養液(水層)中のDONを検出するには、有機溶媒へDONを転溶する必要がある。抽出に使用する

溶媒には、DONの通知試験法「小麦中のデオキシニバレノール試験法」<sup>11)</sup>に記載のアセトニトリルと、アセトニトリルより安価で水との分離が容易である酢酸エチルの2種類について検討した。アセトニトリルは水との親和性が高いため、水層と有機層の分離を目的に塩の添加を行った。最適な添加濃度を検討したところ、30%以上で乾固時間の短縮の観点から良好であった。なおTLCの展開像を確認すると、10%、30%、50%の各濃度間でのDONバンドの視認性や夾雑バンドの出現について違いは認められず(データ未掲載)、塩の添加による影響は限定的と考えられた。また、添加する塩を塩化ナトリウムから炭酸ナトリウムに変更することで培養液試料中のNIV回収率が上昇し、TLC法での検出が可能であった。NIVは酸性官能基及びアニオン安定化因子に乏しいため、高いpKa値を示すと予測される。このため、試料をアルカリ性にして分子型にすることで水層から有機層に転用できたものと考えられる。さらに、本抽出法で使用する有機溶媒量は、試料1 mLに対し650 µLである。既報の固形培地からのDON抽出<sup>7,9)</sup>における有機溶媒の使用量は、試料5-10 gに対し約20 mLであり、固体材料及液体材料(培養液試料)の違いはあるが、本手法では既報と比較し、有機溶媒の使用量を削減でき、操作安全性の向上や環境負荷の低減に繋がると考えられる。

また、TLC分析の展開溶媒について国内での使用報告<sup>5,6)</sup>が多い溶媒A(トルエンと酢酸エチル)を対照に、アセトン及びトルエンの代替溶媒として人体への毒性がより低いとされるペンタンを使用した3種類の溶媒組成を検討した。標準品の展開像では、溶媒B(トルエンとアセトン)でDONバンドがまとまり視認性が最も良好であったが(図2)、これは酢酸エチルと比べアセトンは極性が高く<sup>12)</sup>、シリカゲル担体と溶媒間の分子の移動がよりスムーズになり良好に分離したためと考えられた。一方、培養液試料を用いた展開像では、DONのバンド形状及び夾雑バンドとの分離について視認性が最も良好であったのは標準品展開時と同様に溶媒Bであった(図3)。溶媒A及びCではDONバンドはやや拡散するほか、夾雑バンドと重なりDONの蛍光が不鮮明であり、バンドの蛍光が弱い場合は拡散により蛍光がさらに薄くなるほか、DONと近傍に夾雑バンドが出現した際は拡散したDONバンドと重なってしまい、判定に苦慮すると考えられた。各ADONの確認については、溶媒Bと比較しAとCでは若干の拡散が認められたものの、大きく視認性が低下するものではなく、どの溶媒も適用できると考えられた。

さらに、検討した抽出法及びTLC条件のスクリーニング性能を確認したところ、菌株の毒素産生の確認に要する培養日数は5-7日であり、本手法の検出限界は約5 µg/mLであった(図6、表5)。今回用いた菌株のDON産生量を確認したところ、菌株No.1の7日目抽出溶液で約4 µg/mLであり表3の抽出時の回収率を考慮すると、7 µg/mL程度と考えられた。菌株のDON産生量を調べた報告によると1 µg/mLといった毒素産生株も報告されている<sup>13)</sup>。このため、今回の

供試株よりも毒素産生能が低い株をスクリーニングする際は、TLCプレートへの塗布量の調整や、培養日数を伸ばすといった対応を行う必要があると考えられた。

また、陰性株を用いて本手法の特異性を確認したところ、DONと同位置のバンドは認められず特異性が確認できた。しかし、毒素産生株と比較し様々な蛍光を発するバンドを認め、培養液中の夾雑物やバックグラウンドの蛍光によりバンドが視認しづらい傾向が確認された。また、ADONに関しては図7の菌株No.8において15ADON位置に夾雑バンドと思われる青色バンドが薄く確認された。これについては、分離能が異なる酢酸エチルを使用した溶媒AまたはCを使用し15ADON位置とバンドがずれることを確認し、LC-MS/MSによる測定でも検出下限値以下であった。今回採用した塩化アルミニウムによる検出では、DON以外の夾雑バンドも蛍光を発するとされており<sup>8)</sup>、本検討からもそのことが確認された。

以上より、培養液試料を用いたスクリーニングを行う際は、DONバンドの視認性が良い溶媒Bトルエン：アセトンを基本に使用することが適当と考えられた。バンドの重なりが認められた場合は、分離能の異なる展開溶媒で分離しバンドの位置を再度確認し判定の際には陽性対象のバンド位置と注意して見比べる必要がある。

## ま と め

*Fusarium*属菌のDON及びNIV産生性の確認方法として、菌培養液からの毒素抽出法とTLCの展開溶媒を検討した。本手法は、塩とアセトニトリルによる抽出とTLCによる分析という、特別な機器を必要としない簡便なスクリーニング方法である。また、TLCの展開溶媒を酢酸エチルからアセトンへ変更することで、培養液試料中のDONと夾雑成分の分離が可能となった。本手法と塩化アルミニウム法による検出を組み合わせることで、クロロホルムやNBPといった有害試薬の使用を排し、食品から分離された菌株のDON及びNIV産生試験を簡便かつ安全に実施することが可能となる。これにより、食品中の毒素産生菌の汚染実態把握に寄与すると考えられる。

## 文 献

- 1) 小笠原和夫：食衛誌，**6**(1)，81–82，1965.
- 2) Yosizawa, T., Morooka, N.: *Agr. Biol. Chem.*, **37**(12), 2933–2934, 1973.
- 3) Bhat RV., Beedu SR., Ramakrishna Y., *et al.*: *Lancet*, **333**(8628), 35–37, 1989.
- 4) 諸角 聖，藤川 浩，和宇慶朝昭，他：東京健安研七  
年報，**55**，3–12，2004.
- 5) 諸角 聖，和宇慶朝昭，一言 広，他：食品と微生物，**5**(2)，131–136，1988.
- 6) Takahashi-Ando, N., Tokai, T., Yoshida, M., *et al.*: *Mycotoxins* **58**(2), 115–117, 2008.
- 7) Tanaka, A., Shinkai, K., Maeda, K., *et al.*: *JSM Mycotoxins* **69**(1), 15–17, 2019.
- 8) 滝谷昭司：Proc.Jap.Assoc.Mycotoxicol, **13**，24–26，1981.
- 9) Rocha, D. F. de L., Oliveira, M. dos S., Furlong, E. B., *et al.*: *Food Addit. Contam., Part A*, **34**，2220–2229, 2017.
- 10) Suzuki, F., Koba, A., Nakajima, T., *et al.*: *J.Gen. Plant Pathol*, **76**，31–36，2010.
- 11) 大臣官房生活衛生・食品安全審議官：生食発0930第2号，小麦中のデオキシニバレノール試験法について，令和3年9月30日。
- 12) 高木由美子，橋本将一，荻野幸子，他：化学と教育，**44**(4)，261–264，1996.
- 13) 齊藤初雄：微生物遺伝資源利用マニュアル，**25**，2009.

**Evaluation of Thin Layer Chromatography Methods for Identifying Deoxynivalenol-Producing *Fusarium* spp.**

Kotono WADA<sup>a</sup>, Satomi UEHARA<sup>a</sup>, Yumi TAKAHASHI<sup>a</sup>, Katsushi IWAKOSHI<sup>a</sup>, Tamako MASUBUCHI<sup>b</sup>,  
Keiko YOKOYAMA<sup>a</sup>, Takayuki SHINKAI<sup>a</sup>, Hirofumi MIYAKE<sup>a</sup>, Kenji SADAMASU<sup>a</sup>, and Takashi CHIBA<sup>a</sup>

(Reviewed by Ken TANIGUCHI<sup>c</sup>)

Some fungi isolated from food are known to produce mycotoxins. Thin layer chromatography (TLC) is commonly used as a qualitative method for analyzing mycotoxins; however, it involves a complex extraction process and the use of hazardous reagents. In this study, we examined a method for detecting the mycotoxin deoxynivalenol (DON), produced by *Fusarium* spp., with the aim of simplifying toxin extraction from fungal culture broth and optimizing the TLC development solvent. Culture broths from DON-producing and non-DON-producing *Fusarium* strains were prepared and extracted using sodium chloride and acetonitrile. The results showed that adding >30% sodium chloride improved phase separation between the aqueous layer and acetonitrile, thereby reducing the time required for the extraction process. Additionally, replacing sodium chloride with sodium carbonate enabled the extraction of nivalenol, another mycotoxin produced by *Fusarium* spp. In the TLC analysis, the use of a toluene–acetone solvent system provided clear visualization of the DON band. Furthermore, simultaneous detection of the acetylated forms of DON—15-acetyl deoxynivalenol and 3-acetyldeoxynivalenol—was successfully achieved.

**Keywords:** deoxynivalenol, *Fusarium* spp., mycotoxin, thin-layer chromatography, phase separation

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

<sup>b</sup> Tokyo Metropolitan Sanitation Inspection Center Ota Branch Office

<sup>c</sup> Nagoya City Public Health Research Institute  
4-207 Sakurazaka, Moriyama-ku, Nagoya-city, Aichi, Japan