(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3673116号
(P3673116)
(45)発行日　平成17年7月20日(2005.7.20)　(24)登録日　平成17年4月28日(2005.4.28)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
B01D 15/00	B01D	15/00	Z
B01D 15/08	B01D	15/08	
G01N 1/10	G01N	1/10	A
G01N 30/08	G01N	30/08	L

請求項の数 13　(全 7 頁)

(21)出願番号　特願平11-163770
(22)出願日　平成11年6月10日(1999.6.10)
(65)公開番号　特開2000-354702(P2000-354702A)
(43)公開日　平成12年12月26日(2000.12.26)
審査請求日　平成12年12月18日(2000.12.18)

(73)特許権者　596118493
アカデミア・シニカ
ＡＣＡＤＥＭＩＡ　ＳＩＮＩＣＡ
台湾タイペイ、ナンカン、イェン・チュー・ユアン・ロード、セクション２、１２８番
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(74)代理人　100092624
弁理士　鶴田　準一
(74)代理人　100089901
弁理士　吉井　一男
(74)代理人　100082898
弁理士　西山　雅也

最終頁に続く

(54)【発明の名称】試料中のフザリウム毒素を精製する方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
溶液中のフザリウム毒素を精製する方法であって、
前記溶液を、その溶液が酸化アルミニウムの層より前に活性炭の層を通るように、活性炭の層と、酸化アルミニウムの層とを有する装置中を通すことを含む方法。
【請求項２】
フザリウム毒素に汚染された源が植物に由来する請求項１の方法。
【請求項３】
前記フザリウム毒素が、ベルカロール、シルペントリオール、ジアセトキシシルペノール、Ｔ－２テトロール、ＨＴ－２毒素、Ｔ－２毒素、イソＴ－２毒素、ニバレノール、フザレノン－Ｘ、デオキシニバレノール（ＤＯＮ）、３－アセチル－ＤＯＮ、１５－アセチル－ＤＯＮ、３，１５－ジアセチル－ＤＯＮ、３－アセチルＲ－２毒素、１５－アセチルＴ－２毒素、３－ヒドロキシＨＴ－２毒素、またはジヒドロニバレノールである請求項１の方法。
【請求項４】
前記フザリウム毒素が、ジアセトキシシルペノール、Ｔ－２毒素、またはデオキシニバレノールである請求項１の方法。
【請求項５】
前記フザリウム毒素が水溶液中に溶解されている請求項１の方法。
【請求項６】

前記水溶液がアセトニトリル、メタノールまたはクロロホルムを含む請求項５の方法。
【請求項７】
前記水溶液がアセトニトリルを含む請求項５の方法。
【請求項８】
前記活性炭が１００～４００メッシュの粒径の範囲を有する請求項１の方法。
【請求項９】
前記酸化アルミニウムが７０～２３０メッシュの粒径の範囲を有する請求項１または８の方法。
【請求項１０】
前記酸化アルミニウムが中性である請求項１の方法。
【請求項１１】
前記フザリウム毒素が水溶液中に溶解されている請求項９の方法。
【請求項１２】
前記水溶液がアセトニトリルを含む請求項１１の方法。
【請求項１３】
試料中のフザリウム毒素を精製する方法であって、
前記試料を装置の入口に導入し、
試料を装置内の活性炭の層に通し、
試料を装置内の酸化アルミニウムの層に通し、そして
装置の出口を通してその試料を取り出すことを含む方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、フザリウム毒素を精製する装置および方法に関する。
【０００２】
【従来の技術】
フザリウム菌は、例えばトウモロコシ等の穀物類、および、例えば干し草等の動物飼料に感染して、フザリウム毒素を生成する可能性がある。フザリウム毒素は発癌性があり、且つ消化障害または腎不全を引き起こす可能性がある。したがって、植物が動物によって消費されるより前に、このような感染した植物を同定することが重要である。
【０００３】
【発明が解決しようとする課題】
穀物類中のフザリウム毒素を分析するための簡略化された検出方法の開発において、Romer のカラムが、このニーズに応えるものであることが判明した。しかしながら、Romer のカラムにおける毒を収集する能力は、満足すべきものではない。したがって、フザリウム毒素を精製するための非常に効率的な装置が必要とされている。
【０００４】
【課題を解決するための手段】
本発明は、その一面において、液体から不純物を除去するための装置を特徴とする。その装置、例えばカラムは、それぞれ液体を導入し、および除去するための入口および出口を含む。その入口および出口は、流路により接続される。流路は、溶媒がその装置を通して移動するルートである。活性炭の層が酸化アルミニウムの層より入口に近くなるように、活性炭の層と酸化アルミニウムの層とが、入口と出口との間の流路中に配置される。換言すれば、入口から導入された液体は、酸化アルミニウムの層を通って流れて出口から出るより前に、活性炭の層を通って流れる。１００～４００メッシュの粒径の範囲を有する活性炭と、７０～２３０メッシュの粒径の範囲を有する酸化アルミニウム、例えば中性の酸化アルミニウムとが、本発明において使用することができる充填材料、例えば固定相の例である。
【０００５】
本発明は、他の一面において、それぞれ液体を導入し、および除去するための入口および

出口を有する容器を含む装置を特徴とする。その入口と出口とは、流路によって接続される。入口から導入された液体が、酸化アルミニウムの層を通って流れて出口から出るより前に、活性炭の層を通って流れるように、活性炭の層と酸化アルミニウムの層とが、容器の入口と出口との間の内部容積（interior volume ）内に配置される。

【０００６】

他の一面において、本発明は、溶液中のフザリウム毒素を精製する方法を特徴とする。その溶液は、感染した源、例えば植物から抽出することができる。その源が動物に由来するとき、その毒素は、フザリウム毒素を含む植物を経口摂取した結果である。本発明の方法は、溶液が酸化アルミニウムの層より前に活性炭の層を通るように、活性炭の層と酸化アルミニウムの層とを含む装置に、フザリウム毒素を有する溶液を通す工程を含む。上述したように、１００～４００メッシュの粒径の範囲を有する活性炭と、７０～２３０メッシュの粒径の範囲を有する酸化アルミニウム、例えば中性の酸化アルミニウムとを、この方法において使用することができる。フザリウム毒素は、ベルカロール（verrucarol）、シルペントリオール（scirpentriol）、ジアセトキシシルペノール（diacetoxyscirpenol）、Ｔ－２テトロール、ＨＴ－２毒素、Ｔ－２毒素、イソＴ－２毒素、ニバレノール（nivalenol ）、フザレノン（fusarenon ）－Ｘ、デオキシニバレノール（ＤＯＮ）、３－アセチル－ＤＯＮ、１５－アセチル－ＤＯＮ、３，１５－ジアセチル－ＤＯＮ、３－アセチルＲ－２毒素、１５－アセチルＴ－２毒素、３－ヒドロキシＨＴ－２毒素、またはジヒドロニバレノールであることができる。フザリウム毒素は、活性炭および酸化アルミニウムの層を通すより前に、水溶液中に溶解してもよい。その水溶液は、有機溶媒を例えば９０％（ｖ／ｖ）まで含むことができる。有機溶媒のいくつかの例は、アセトニトリル、メタノールまたはクロロホルムである。

【０００７】

更なる一面において、本発明は、試料を装置の入口に導入する工程と；その試料を装置内で活性炭の層に通す工程と；試料を装置内で酸化アルミニウムの層に通す工程と；最終的に、装置の出口を通して試料を取り去る工程とを含む、試料中のフザリウム毒素を精製する方法を特徴とする。

特に定義しない限り、ここで用いられた技術的および科学的な用語は、本発明が属する技術の当業者によって共通に理解されるものと同じ意味を有する。適切な方法および材料を以下に記述するが、ここで記述された方法および材料と同様または均等なそれらを、本発明の実施またはテストにおいて使用することが可能である。ここで言及された全ての刊行物は、参照することによって、それらの全部をここに組み込む。矛盾が生じる場合には、定義を含む本明細書が支配的となる。加えて、それらの材料、方法および例は、実例となるのみであって、制限的であることを意図しない。

【０００８】

いくつかの態様の詳細な説明から、および添付の請求項からも、本発明の他の特徴または利点は明らかとなろう。

【０００９】

【発明の実施の形態】

本発明は、被検体を含む液体から、不純物を除去し、それにより、液体中のこのような被検体の分析を容易にする装置および方法を特徴とする。

図１は、クロマトグラフィーのカラム１を示す。カラム１は、精製されるべき液体の試料を導入するための入口２と、精製された液体の試料を出させる出口６とを含む。入口２と出口６とは、液体試料の流路１０によって接続される。

【００１０】

カラム１は、入口２および出口６の間の静止した相として、活性炭３の層と、酸化アルミニウム４の層とを含む。液体の試料が酸化アルミニウムの層より前に活性炭の層を流過するように、これらの２つの層を充填することが重要である。換言すれば、活性炭の層は、酸化アルミニウムの層よりも入口の近くに配置されるべきである。液体の試料がこれらの２つの層を通過する順番が、不純物、例えば色素を除去するために、より大きいキャパシ

ティーを有する活性炭層と、その液体の試料とが第一に接触することを可能とする。次いで、その試料は、残っている不純物、例えば脂肪、炭水化物、および蛋白質を除去するのに有用な酸化アルミニウムの層を通過する。満足すべき結果は、１００～４００メッシュのサイズの活性炭と、７０～２３０メッシュのサイズの酸化アルミニウムとにより得ることができる。

【００１１】

不溶性の不純物をろ別し、静止相を一緒に固く充填しておくために、静止相の各端にグラスウールの層を配置してもよい。精製の間に大きな体積の溶媒を保持するために、必要に応じて、リザーバを入口２に接続することもできる。

上記のカラムを、試料、例えばフザリウム毒素を含む抽出物から不純物を除去する際に用いることができ、それにより、その試料中の所望の化合物、例えばフザリウム毒素を精製することができる。フザリウム毒素を含む抽出物は、フザリウム菌に感染し、淡い（pale）グレーまたはピンクの着色の存在により特徴づけられる植物試料、例えば豆、トウモロコシ、またはオート麦から得ることができる。その試料は、粉末へ摩砕され、ブレンダー中で水溶液、例えば水とアセトニトリルの溶液で抽出することができる。次いで、フザリウム毒素は、上述したように抽出物をカラムに通すことによって、精製することができる。この不純物を除去するプロセスは、抽出物が酸化アルミニウムの層より前に活性炭の層を通るのを必要とすることに注意すべきである。抽出物の静止相の通過を容易にするために、出口６をアスピレーターまたは真空ポンプに接続していてもよい。集められた溶離液は、次いで、薄層クロマトグラフィー（ＴＬＣ）、ガスクロマトグラフィー等の技術によって、フザリウム毒素について分析することができる。

【００１２】

カラムのセットアップ、感染した植物試料の調製および精製、および溶離液のの分析を記述する以下の特定の例は、単なる例示であって、開示の残りの部分を如何なる形においても全く制限しないと解されるべきである。

【００１３】

【実施例】

<u>カラムの調製</u>

カラムの出口の上に、先ずグラスウールが直接に配置された（高さ約１ｍｍの層を形成した）。そのカラムに、０．６ｇの中性のアルミナ（７０～２３０メッシュ、メルク）と、０．２ｇの活性炭（１００～４００メッシュ、Ｓｉｇｍａ）とが順に充填された。活性炭およびアルミナの層の堅い充填を確実にするために、そのカラムは軽くたたかれた。次いで、活性炭層の最上部の上に、グラスウールが配置された。次いで、真空ポンプに接続された吸引フラスコの最上部の上に、カラムが置かれた。気密系を形成するために、そのフラスコとカラムとの間の内部に（in between）ゴムリングが配置された。

<u>試料の調製</u>

豆（Phaseolus vulgarisＬ．）の約５ｋｇが、０．５ヘクタールの豆農場から収穫された。それらがフザリウム毒素の分析のために３つのタイプに視覚的に分類されるより前に、その豆は４℃で貯蔵された。それらは：如何なる明白な着色もない健康な豆（S_1）、白っぽいグレーまたはピンクの着色を有する豆の混合物（S_2）、およびピンクの着色を有する豆（S_3）であった。フザリウム菌が感染した豆は、白っぽいグレーまたはピンク色の特徴的な着色を有する点に注意すべきである。

<u>試料の抽出および精製</u>

集められた豆の各々について、２５ｇの微粉砕された試料が、CH_3 ＣＮ／水（８／２）の１００ｍＬの溶液と混ぜ合わされ、混合物が形成された。抽出は、その混合物をUltra TurraxＴ－２５ブレンダー（Janke & Kunkel Gmbh & Co.、ドイツ）中で９，５００ｒｐｍで３分間混合し、濾紙（ワットマンＮｏ．４）を通して濾過することによって行われた。次いで、その濾液の約８ｍＬが、上述した活性炭およびアルミナを含むカラムに通された。比較のために、濾液の同じ量が、MycoSep （商標）＃２２５カラム（Romer, J. Assoc. Off. Anal. Chem.,６９（４）：６９９～７０３（１９８６））によって精製された。

全ての実験は３回ずつ行われた、そして、提示されたデータは、それぞれの値の平均である。

毒素の同定

２つのカラムの各々から集められた溶出液は、薄層クロマトグラフィー（ＴＬＣ）によって、ジアセトキシセルペノール（ＤＡＳ）、デオキシニバレノール（ＤＯＮ）、およびＴ－２毒素（Ｔ－２）の同定のために分析された。溶出液試料は、ＴＬＣプレート（Aluminum Sillca gel ６０、Merck ）上に、標準品と一緒にスポットされ、そしてトルエン／酢酸エチル／８８％ギ酸（６／２／１）の溶液中で展開された。毒素のスポットは、メタノール中の２０％$AlCl_3$を用い、標準品中に存在する毒素と比較することによって検出された。毒素は、ガスクロマトグラフィー（炎イオン化検出器を備えた日立１６３型）によって定量された。Kanhere ら、 J. Assoc. Off. Anal. Chem.,６９：８８９～８９３（１９８６）を参照のこと。

【００１４】

ＧＣ分析から、本発明のカラムを用いて集めたＤＡＳ、ＤＯＮ、およびＴ－２の量は、＃２２５カラムを用いて集めた量より、かなり多いものであった。例えば、本発明のカラムを用いて集められたＤＡＳの量は、＃２２５カラムを用いて集められたものより、約４倍多かった。他の例として、本発明のカラムを用いて集められたＴ－２の量は、＃２２５カラムを用いて集められたものの７倍を越えて多かった。このように、この実験は、本発明のカラムが＃２２５カラムのそれより遙かに高い効率を有することを証明した。

他の態様

上記の記述から、当業者は、簡単に、本発明の必須の特徴を確かめることができ、そして、その精神と範囲から逸脱することなく、種々の使用および条件にそれを適応させるために、本発明の種々の変更および修正を行うことができる。したがって、他の態様もまた、特許請求の範囲内である。

【図面の簡単な説明】

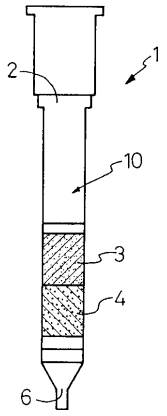
【図１】図１は、活性炭の層と酸化アルミニウムの層とを含む装置を示す。

【符号の説明】

１…カラム
２…入口
３…活性炭
４…酸化アルミニウム
６…出口
１０…流路

【図１】

図１



フロントページの続き

(74)代理人　100081330
弁理士　樋口　外治
(72)発明者　ツェン　ツン－チェ
台湾，タイペイ，パーテ　ロード，セクション　３，レーン　１５８，アレイ　８，ナンバー９，２エフ

審査官　山田　充

(56)参考文献　特開平０７－０００７０６（ＪＰ，Ａ）
特開昭４９－１１２４９１（ＪＰ，Ａ）
特開昭６４－０３４４２３（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.^{7}，ＤＢ名)
B01D 15/00
B01D 15/08
G01N 1/10
G01N 30/08