

コーヒー焙煎で生じるオクラトキシンAの関連物質の同定と市販の焙煎コーヒーの汚染調査

谷口若奈・古本敏夫・川村 理

Identification of substances related to ochratoxin A produced by coffee roasting and investigation of its contamination of commercially available roasted coffee

Wakana Taniguchi, Toshio Furumoto and Osamu Kawamura

Abstract

The chromatogram of ochratoxin A (OTA) analysis of roasted coffee shows an unknown peak that appears about 2 minutes after OTA. This unknown peak was identified as (14R)-ochratoxin A ((14R)-OTA) based on the similarity of the formation pattern of thermal decomposition of OTA. As a result of (14R)-OTA contamination investigation of 29 commercially available roasted coffee samples, the contamination concentration of (14R)-OTA was $0.19 \pm 0.27 \mu\text{g}/\text{kg}$, and the contamination concentration of OTA was $1.99 \pm 1.98 \mu\text{g}/\text{kg}$. (14R)-OTA was about 1/10 of OTA. This suggests that the risk of (14R)-OTA in roasted coffee is not so high. The correlation coefficient between OTA and (14R)-OTA contamination levels was $R^2 = 0.3941$, showing a weak correlation, but no strong correlation. It was thought that this was because the amount of OTA decreased and the amount of (14R)-OTA produced differed depending on the coffee roasting temperature and time.

Key words : ochratoxin A, coffee roasting, (14R)-ochratoxin A

緒 言

オクラトキシンA (ochratoxin A, OTA) は, *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* や *Penicillium verrucosum* などのカビが産生するマイコトキシンで, 麦類を中心とした穀物やその加工品, コーヒー, ココア, ビール, ワインなどを汚染する腎毒性や腎発がん性を有する⁽¹⁾. 我々は, イムノアフィニティーカラム (immunoaffinity column, IAC)-HPLC法を確立して, 国内, タイやベトナムで市販されていたコーヒー製品の汚染調査を行ってきた^(2, 3). これらの分析のクロマトグラムには, OTAより約2分遅れて不明なピーク (以下OTA-X) がしばしば観察された. この不明なピークの物質は, HepG2細胞での毒性試験の結果, OTAと同程度の強さの細胞毒性を有していることを報告した⁽⁴⁾. そこで, まずOTA標品を加熱すると生成する不明なピークの量から不明なピークの構造を文献のデータと比較して同定した. また, 国内市販の焙煎コーヒー中の不明なピークの物質の汚染調査を行い, このリスクを評価した.

方 法

試薬類

OTAは富士フィルム和光純薬 (株) から購入した. また, 焙煎コーヒーはインターネットのサイトで2021年に購入した. HPLCの移動相はHPLCグレードをその他の試薬は特級をそれぞれ富士フィルム和光純薬 (株) から購入し, 実験に用いた.

OTAの加熱とHPLC分析

OTAを10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるようにメタノールに溶解後, 小試験管に100 μL づつ分注し, 遠心エバポレーターで減圧乾固した. 定温恒温乾燥器 (EYELA NDO-500, 東京理化工業 (株)) で180 $^{\circ}\text{C}$, 200 $^{\circ}\text{C}$, 210 $^{\circ}\text{C}$ と220 $^{\circ}\text{C}$ に温度設定し, 設定温度になった15分後にOTAの入った小試験管を全て入れ, 5分ごとに試験管を取り出し, 放冷後, 密封して-18 $^{\circ}\text{C}$ で保存した. 各試験管に1 mLの40%アセトニトリルを加え溶解し, HPLC分析を行った. HPLCはいずれも (株) 島津製作所のシステムコントロー

ラー (SCL-10A_{vp}), 送液ユニット (LC-20AD), オートインジェクター (SIL-20A_{HT}), カラムオープン (CTO-10A), 蛍光検出器 (RF-20A_{XS}) とカラム (Shim-pack XR-ODS, 3.0 mm×100 mm) を用い, 移動相には, アセトニトリル:水:酢酸 (40:58:2, v/v/v) を使用し, 注入量は 10 μ L, 流速は 0.5 mL/min, カラム温度は 50°C, 波長は 335 nm (励起), 465 nm (蛍光) で行った.

市販の焙煎コーヒーの分析

佐藤と川村の方法⁽⁴⁾で行った. すなわち, 粉碎し, 微粉末にした焙煎コーヒー 8 g をコーヒーフィルターに量りとり, 市販のコーヒーメーカー EUPA (ユーパ) TSK-191A (水容器一体型ドリップ式) を用いて蒸留水 140 mL を加え, 電源を入れ熱水で抽出した. 放冷後, 抽出液 36 mL に 5% 炭酸水素ナトリウムを 4 mL を加えて pH 7.4 に調整した. ガラス繊維ろ紙 (ADVANTEC GS-25) でろ過した溶液をサンプル溶液とした. ムロマックカラム S (室町ケミカル (株)) に OTB.2 抗体⁽²⁾ 結合ゲルを 0.3 mL 充填し, ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水 pH 7.4 (Dulbecco's phosphate buffered saline, 以下 PBS) 10 mL で平衡化を行い, サンプル溶液を 10 mL 負荷させた. PBS 10 mL でゲルを洗浄後, メタノール 3 mL で溶出し, 通気させて溶出液を完全にカラムから除去した. 溶出液は減圧乾固した後, 40% アセトニトリル 1 mL で再溶解し, HPLC 分析を行った. 注入量は 50 μ L で行った以外, HPLC 分析は上記の方法と同様に行った.

結果および考察

OTA の加熱と不明なピークの同定

OTA を加熱した場合の代表的な HPLC クロマトグラムとして, 200°C で 20 分加熱した検体のクロマトグラムを図 1 に示した. 主要なピークは 4 つ認められ, OTA から約 2 分遅れた大きなピークを OTA-X, 6 分付近のピークを

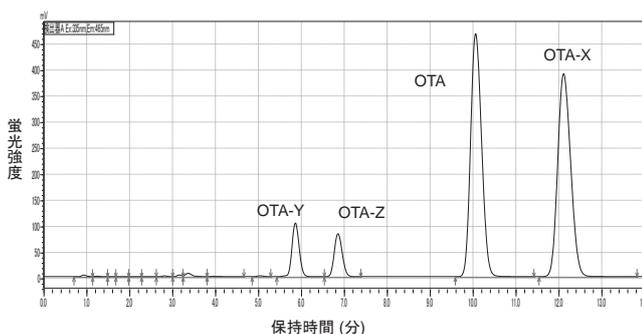


図1 OTA (1 μ g/tube) を 200°C で 20 分加熱した検体のクロマトグラム

OTA-Y, 7 分付近のピークを OTA-Z とそれぞれ名付た. 180°C で加熱した場合の非加熱の OTA に対するそれぞれのピーク面積比率と OTA, OTA-X, OTA-Y と OTA-Z のピーク面積の合計の比率を図 2 に示した. 180°C で加熱した場合は, 加熱 10 分から OTA-X のピークが出現し, 15 分に最大になり, 20 分にはやや減少した. OTA-Y と OTA-Z のピークはほとんどなかった. 200°C では 20 分加熱しても OTA-X のピークの減少が認められなかった. 35 分まで加熱を行った. 200°C で加熱した場合 (図 3) も加熱 10 分から OTA-X のピークが大きくなり, 20 分に最大になったが, 25 分以降あまり変化はなかった. OTA-Y と OTA-Z のピークは 15 分から増加し, 25 分後最大となり, その後あまり変化しなかった. OTA は, 25 分まで減少したが, その後大きな減少はなかった. 210°C で

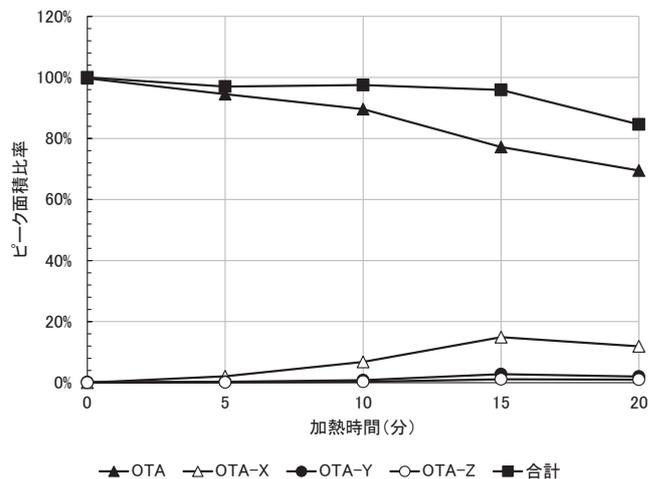


図2 180°C で加熱した場合の非加熱の OTA に対するそれぞれのピーク面積比率と OTA, OTA-X, OTA-Y と OTA-Z のピーク面積の合計の比率

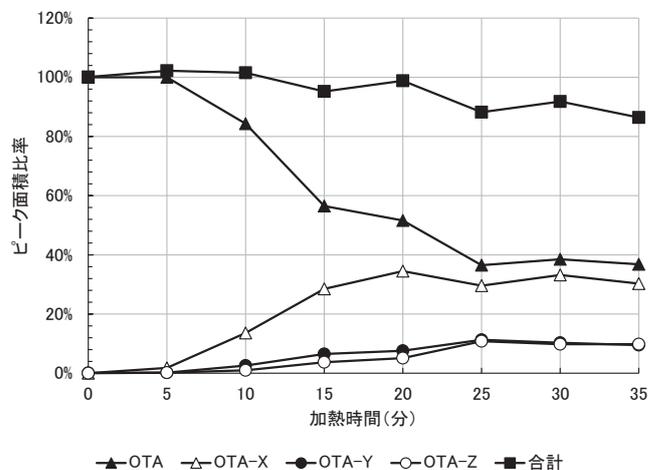


図3 200°C で加熱した場合の非加熱の OTA に対するそれぞれのピーク面積比率と OTA, OTA-X, OTA-Y と OTA-Z のピーク面積の合計の比率

加熱した場合 (図4) は、概ね200℃で加熱した場合と同様の結果であった。220℃で加熱した場合 (図5) は、OTA-Xの生成とOTAの減少が210℃より5分早いこと、ピーク面積の合計の減少がやや大きかったこと、以外は概ね210℃の場合と似ていた。以上の結果を過去のCramer, B.ら (2008) (5) と Sueck, F.ら (2019) (6) の報告と比較した結果、OTA標準品を温度別に加熱して生じるOTA分解生成物の生成パターンが (14R)-ochratoxin A (以下、(14R)-OTA) と OAT-Xはほぼ一致していた。さらに、佐藤と川村の報告 (4) から、OTB.2抗体結合IACに結合すること、OTAと保持時間が近いこと、およびOTAと同じ極大吸収波長を持つことから、OTA-XはOTAのエピマーである (14R)-OTA (図6) であると断定した。

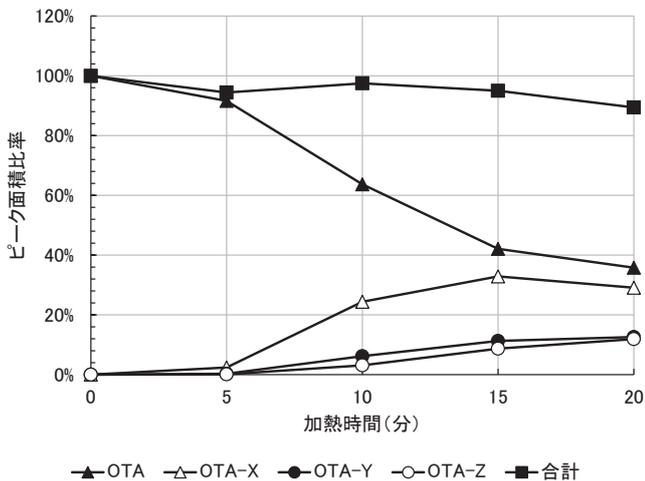


図4 210℃で加熱した場合の非加熱のOTAに対するそれぞれのピーク面積比率とOTA, OTA-X, OTA-YとOTA-Zのピーク面積の合計の比率

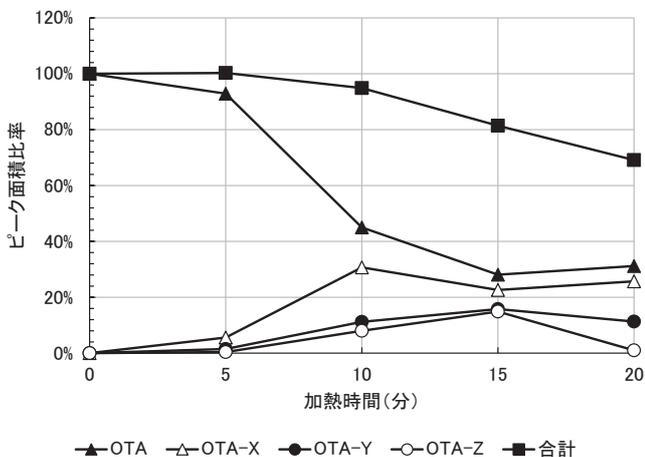


図5 220℃で加熱した場合の非加熱のOTAに対するそれぞれのピーク面積比率とOTA, OTA-X, OTA-YとOTA-Zのピーク面積の合計の比率

国内の市販焙煎コーヒーの分析

HepG2細胞での毒性試験の結果、(14R)-OTAはOTAと同程度の細胞毒性を有していることが分かっている (4)。そこで、市販焙煎コーヒーがどの程度 (14R)-OTAに汚染されているかを明らかにするために、IAC-HPLC法で汚染調査を行った。その結果を表1に代表的なクロマトグラムを図7示した。29検体全てからOTAは検出され、その平均値±SDは1.99±1.98 µg/kgであった。(14R)-OTAは25検体 (86.2%) から0.19±0.27 µg/kgで検出された。OTAの脱クロル体であるオクラトキシンB (OTB) は20検体 (69.0%) から0.25±0.51 µg/kgで検出された。OTAと (14R)-OTAを合計した汚染濃度の平均は2.17±2.09 µg/kgであった。欧州食品安全機関 (European Food Safety Authority, EFSA) が定めた焙煎コーヒーの基準値5.0 µg/kgを超えていたのは、RCJ2101 6.85 µg/kg, RCJ2105 6.29 µg/kgとRCJ2107 7.31 µg/kgの3検体 (10.3%) であった。これら検体のOTAと (14R)-OTAの合計値はそれぞれRCJ2101 7.11 µg/kg, RCJ2105 6.56 µg/kgとRCJ2107 7.99 µg/kgであった。また、OTA単独では5.0 µg/kg以下で、(14R)-OTAとの合計値で5.0 µg/kgを超える検体はなかった。

(14R)-OTAの自然汚染濃度は0.19±0.27 µg/kgで、OTAの自然汚染濃度1.99±1.98 µg/kgの約1/10であった。我々は、(14R)-OTAは、HepG2細胞に対してOTAと同程度の細胞毒性があると報告 (4) しているが、仮にOTAと(14R)-OTAが同程度の毒性であったとしても、焙煎コーヒーのリスクは10%程度しか増加しない。よって、焙煎コーヒー中の (14R)-OTAが、リスクを大きく高め

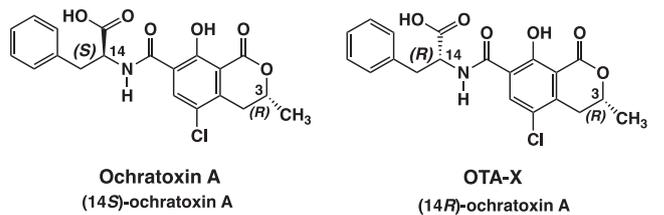


図6 Ochratoxin Aと (14R)-ochratoxin Aの構造式

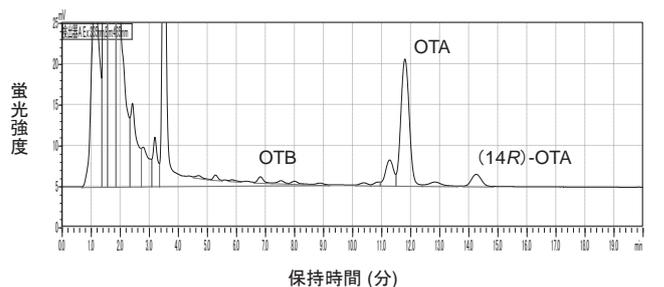


図7 市販焙煎コーヒー (RCJ2105) のクロマトグラム

るとは考え難いと判断した。ただし、IAC-HPLC法では、OTAと(14R)-OTAを同時に分析できるので、今後焙煎コーヒー中の(14R)-OTAの汚染についても注視していく必要があると考えられた。

また、OTAと(14R)-OTAの汚染濃度の相関を図8に示した。相関係数は $R^2 = 0.3941$ で弱い相関性は認められたが、強い相関性はなかった。これは、コーヒーの焙煎温度と時間によって、OTAの減少量と(14R)-OTAの生成量が様々であるためと考えられた。今後、コーヒーの焙煎温度と時間によって、OTAの減少量と(14R)-OTA生成量に関する詳細な研究が必要と考えられた。

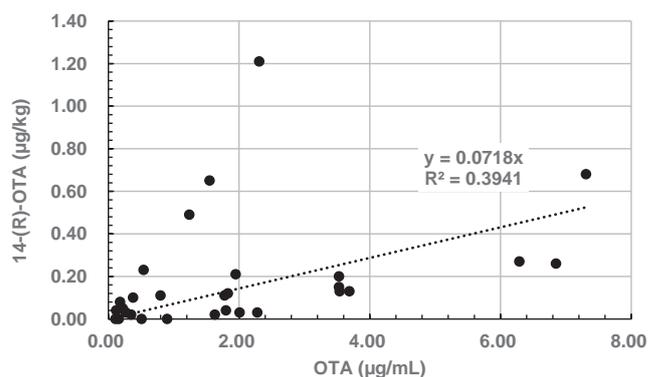


図8 市販焙煎コーヒー中のOTAと(14R)-OTAの濃度の相関

表1 国内の市販焙煎コーヒーのオクラトキシン関連物質の汚染調査

検体番号	OTB (µg/kg)	OTA (µg/kg)	(14R)-OTA (µg/kg)	OTAと(14R)-OTAの合計 (µg/kg)
RCJ2101	0.32	6.85	0.26	7.11
RCJ2102	0.28	3.69	0.13	3.83
RCJ2103	0.25	3.53	0.15	3.68
RCJ2104	0.27	3.53	0.20	3.74
RCJ2105	0.26	6.29	0.27	6.56
RCJ2106	0.25	3.54	0.13	3.67
RCJ2107	0.57	7.31	0.68	7.99
RCJ2108	2.35	1.80	0.04	1.84
RCJ2109	0.07	1.83	0.12	1.95
RCJ2110	0.89	2.28	0.03	2.31
RCJ2111	ND*	1.78	0.11	1.90
RCJ2112	0.14	2.01	0.03	2.04
RCJ2113	ND	1.63	0.02	1.65
RCJ2114	0.06	0.35	0.02	0.37
RCJ2115	0.10	0.18	0.08	0.26
RCJ2116	0.06	1.95	0.21	2.16
RCJ2117	ND	0.54	0.23	0.77
RCJ2118	0.08	1.24	0.49	1.73
RCJ2119	0.05	1.55	0.65	2.20
RCJ2120	ND	0.80	0.11	0.92
RCJ2121	0.05	0.27	0.03	0.29
RCJ2122	ND	0.51	ND	0.51
RCJ2123	0.08	0.38	0.10	0.48
RCJ2124	ND	0.11	ND	0.11
RCJ2125	ND	0.16	ND	0.16
RCJ2126	ND	0.12	0.04	0.16
RCJ2127	0.06	0.22	0.05	0.27
RCJ2128	0.47	2.31	1.21	3.51
RCJ2129	ND	0.90	ND	0.90
平均	0.25	1.99	0.19	2.17
SD	0.51	1.98	0.27	2.09

*ND：検出限界未満，OTBは0.04 µg/kg未満，(14R)-OTAは0.02 µg/kg未満

摘 要

焙煎コーヒーのオクラトキシンA (OTA) 分析のクロマトグラムでは、OTAより約2分遅れて出現する不明なピークが出現する。この不明なピークは、OTAの加熱分解の生成パターンの類似性などから (14R)-Ochratoxin A (14R)-OTAと同定した。29検体の市販焙煎コーヒーの (14R)-OTAの汚染調査をおこなった結果、14-(R)-OTA

の自然汚染濃度は $0.19 \pm 0.27 \mu\text{g}/\text{kg}$ で、OTAの自然汚染濃度 $1.99 \pm 1.98 \mu\text{g}/\text{kg}$ の約1/10であった。このことから、焙煎コーヒーの (14R)-OTAのリスクはそれほど高くないと考えられた。また、OTAと14-(R)-OTAの汚染濃度の相関係数は $R^2 = 0.3941$ で、弱い相関性は認められたが、強い相関性はなかった。これは、コーヒーの焙煎温度と時間によって、OTAの減少量と (14R)-OTAの生成量が異なるためと考えられた。

引 用 文 献

- (1) 本山聖子, 小山典子: オクラトキシンAのリスク評価, *JSM Mycotoxins* 66, 31-35 (2016).
- (2) 川村 理, 鈴木祐介: オクラトキシンBに対するモノクローナル抗体の作製 香川大学農学部学術報告 65, 25-28 (2013).
- (3) 川村 理, 鈴木祐介, 佐々木絢子: イムノアフィニティーカラム-HPLC法による国内市販コーヒー製品のオクラトキシンAとBの汚染調査, 香川大学農学部学術報告, 67, 47-53 (2015).
- (4) 佐藤朱音, 川村 理: コーヒー分析時のオクラトキシンAに関連する不明ピーク (OTA-X) の毒性評価, 香川大学農学部学術報告 74, 19-24, (2022)
- (5) Cramer, B., Königs, M., and Humpf, H.-U. : Identification and in vitro cytotoxicity of ochratoxin A degradation products formed during coffee roasting. *J. Agric. Food Chem.* 56, 5673-5681 (2008)
- (6) Sueck, F., Hemp, V., Specht, J., Torres, O., Cramer, B., Humpf, H.-U. : Occurrence of the Ochratoxin A Degradation Product 2'R-Ochratoxin A in Coffee and Other Food: An Update. *Toxins* 11, 329, doi : 10.3390/toxins11060329 (2019)

