

改良DEA固相抽出法によるコーヒーおよび穀物中の オクラトキシンAとBの分析法の検討

川村 理*

IMPROVEMENT OF DEA SOLID PHASE EXTRACTION COLUMN METHOD FOR THE DETERMINATION OF OCHRATOXIN A AND B IN GREEN AND ROASTED COFFEE AND CEREALS BY HPLC

Osamu KAWAMURA*

Abstract

Previously reported DEA solid phase extraction column method for the determination of ochratoxin A (OTA) and B (OTB) by Akiyama et al (1997) have some advantages over other methods in low cost, simple, and unnecessary toxic organic solvent, but low recoveries from green coffee and cereals. For improvement, in Akiyama's method, the extraction solvent and the HPLC column were changed to acetonitrile: 0.1% H_3PO_4 (90 + 1) and a Capcell Pak C₁₈ (MG 4.6 mm i.d. x 250 mm), respectively. In this improved method, the averaged recoveries from samples spiked with 1, 2 and 5 ng OTA and OTB/g in green coffee, brown rice, wheat and corn were 100.5 and 88.9%, 95.3 and 83.6%, 90.5 and 89.7%, and 96.7 and 101.2%, respectively. The limit of detection was 0.2 ng of OTA and OTB/g in green coffee and cereals. The improved DEA method was applied to the determination of OTA and B in roasted coffee. But concomitant matrices in roasted coffee were not adequately clean-upped. The limit of detection was only 2 ng of OTA/g.

Key words : Ochratoxin A, Ochratoxin B, DEA solid phase extraction, Green coffee, Brown rice, Wheat, Roasted coffee

緒 言

はじめに

オクラトキシンA (OTA, Fig. 1) は, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum* などによって生産されるマ

イコトキシンで, 肝臓・腎臓障害, 催奇形性, 尿路系発がんなどを有し, 麦類, トウモロコシ, 米, これらの加工品, ワイン, ビール, コーヒー, 乾燥果実, 肉類など広範囲な食品を汚染している^(1, 2)。国内でも, 小麦製品, トウモロコシ製品やライ麦粉, コーヒーやワイ

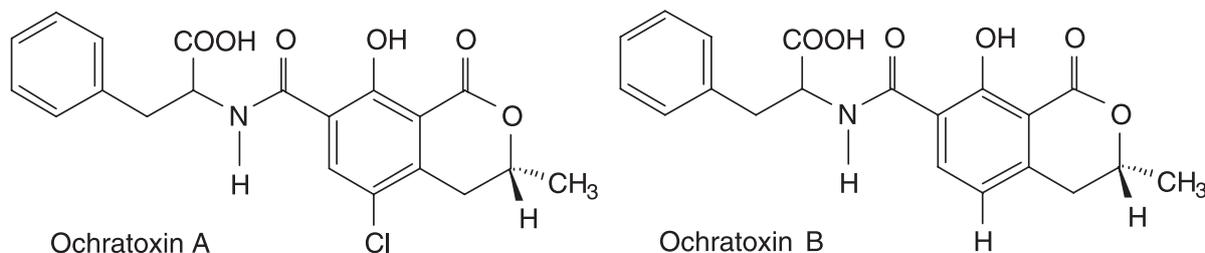


Fig.1. The structures of Ochratoxin A and B

* 鹿児島大学農学部 890-0065 鹿児島県鹿児島市郡元1-21-24

Faculty of Agriculture, Kagoshima University, 1-21-24 Koorimoto, Kagoshima, Kagoshima 890-0065

ン⁽³⁾, ビール^(3, 4), 豚血清⁽⁵⁾などの汚染が報告されており, 日本人血中からも低濃度ながら高頻度に検出されている⁽⁶⁾. また, OTAよりは毒性が弱いながら同様な毒性を有しているオクラトキシンB (OTB, Fig.1) も知られている^(7, 8, 9). OTAおよびBの分析法としては液-液分配法, 固相抽出法, イムノアフィニティーカラム (IAC) などでクリーンアップを行い, 蛍光HPLCで分析されている^(10, 11). また, 最近では多機能カラム⁽¹²⁾を用いる方法も開発された. しかし, 液-液分配法は操作が煩雑であり, IACや多機能カラムではコスト面で問題がある. そこで, OTAおよびBを両方測定可能であるジエチルアミノプロピルシリル化シリカゲル (DEA) カラム用いるAkiyamaらの固相抽出法⁽¹³⁾に着目した. Akiyamaらの方法は, 毒性の強いクロロホルムなどを使用せず, 簡便であり, 衛生試験法・注解2000 (日本薬学会編, 金原出版) と食品衛生検査指針理化学編2005 (日本衛生協会) に記載されている方法の原法である. しかし, 我々が添加回収実験を行った結果, 試料抽出る液にOTAを添加した回収率は良好であったが (Table 1), 粉末試料にOTAおよびBを添加し, 回収実験を行った結果, 回収率はいずれの試料においても低く十分とは言えなかった (Table 2). そこで, 抽出溶媒に問題があるのではないかと考え, 抽出溶媒の組成を検討し, 1~5 ng/gのOTAおよびBの添加回収実験を行い, 改良DEAの適用性について検討した.

Table 1. Recovery of Ochratoxin A from the Spiked Extract with Acetonitrile : 1% Phosphoric Acid (99+1) from Roasted and Green Coffee and Cereals

The extract from	Recovery (%)	
	Means \pm SD (n=3)	
Roasted coffee	92.4 \pm 0.7	
Green coffee	95.6 \pm 2.1	
Brown rice	96.6 \pm 3.6	
Wheat	94.6 \pm 0.8	
Corn	98.3 \pm 3.8	

Table 2. Recovery of Ochratoxin A and B from the Spiked Roasted and Green Coffee and Cereals Extracted with Acetonitrile : 1% Phosphoric Acid (99+1)

Samples	Recovery (%), Means \pm SD, n=3)	
	Ochratoxin A	Ochratoxin B
Roasted coffee	42.2 \pm 5.6	52.6 \pm 3.5
Green coffee	10.7 \pm 1.9	9.5 \pm 1.0
Brown rice	64.6 \pm 2.9	60.7 \pm 9.2
Wheat	27.9 \pm 9.9	16.4 \pm 1.6
Corn	62.8 \pm 8.0	52.9 \pm 5.8

材料および方法

材料とその調製

分析試料は, すべて市販の玄米, 全粒小麦粉, コーンフラワー, 生コーヒー豆および焙煎コーヒー豆を使用した. 玄米, 生コーヒー豆および焙煎コーヒー豆は, 粉碎後1 mmのメッシュを通過するものを用いた. カビ培養生コーヒー豆は, 名古屋市衛生研究所中嶋正博博士より譲渡していただいた. 人工汚染生コーヒー豆は, 粉碎したカビ培養生コーヒー豆と粉碎した非汚染生コーヒー豆を段階的に混ぜ合わせ調製した.

試薬および標準溶液の調製

OTAとOTBはシグマアルドリッチジャパン社より購入した. D E A 固相抽出カラムはBOUND ELUT LRC-DEA, 500 mg (バリエント社製) をHPLCの移動相は和光純薬社製のHPLC用をそれぞれ用いた. その他の試薬はすべて和光純薬社製特級を用いた.

OTAは10 μ g/mLになるようにメタノールに溶解し, 吸光度を測定し, 333 nmのモル吸光係数6,400⁽¹⁴⁾ から正確な濃度を算出した. また, OTBも同様にエタノールに溶解し, 吸光度を測定し, 318 nmのモル吸光係数6,900⁽¹⁴⁾ から正確な濃度を算出した. OTAとOTB溶液を希釈混合し, それぞれが1 μ gになるように小試験管に分注し, 溶媒を完全に留去し, -20°Cで保存した. 必要に応じて, メタノールまたはアセトニトリル: 水 (40+60) に1 μ g/mLになるように溶解し, -20°Cで保存 (1ヶ月以内) した. 使用直前にこの溶液を希釈して実験に用いた.

機 器

粉碎器はABS-W (大阪ケミカル) を振盪機はAS-1 (アズワン) をそれぞれ用いた. 遠心濃縮装置は, いずれも東京理化学器械社製のCYE-3100遠心エバポレーター, UT-1000冷却トラップ, TC-21ダイアフラムポンプを用いた. HPLCはいずれも島津製作所製でLC-10ADvpポンプ, SIL-10ADvpオートインジェクター, CTO-10ADvpカラムオーブン, RF-10ADXL蛍光検出器を使用した.

抽出とクリーンアップ

Akiyamaらの方法⁽¹³⁾に準じ, 一部改変して, 抽出とクリーンアップを行った. すなわち, 粉碎試料5 gを100 mLのガラス製サンプル瓶に秤り取り, 抽出溶媒を50 mL加え, 15分間, 約200回/分の速度で振盪した. 抽出液をろ紙 (ADVANTEC 5C, 125 mm) で濾過した. ろ液5 mLをあらかじめ蒸留水, メタノール, 抽出溶媒の

順番でそれぞれ10 mL流しコンデショニングを行ったDEA固相抽出カラムに負荷した。次にアセトニトリル：アセトン (1+1), 80%メタノール：酢酸 (99+1) 各10 mLで洗浄後, 10 mLの80%アセトニトリル:TFA (99+1)で溶出した。流速は, ろ液負荷時と溶出時は1.5 mL/分でコンデショニングと洗浄時は3 mL/分で行った。溶出液は, 遠心濃縮装置を用い40°Cで減圧乾固した。残渣をアセトニトリル：水 (4+6, 0.5 mL) に溶解し, 20 μ LをHPLCで分析した。

OTAおよびOTBの試料への添加

抽出ろ液への添加は, 各試料からの抽出ろ液5 mLに250 ng/mLのOTAメタノール溶液を100 μ L (5 ng/g汚染に相当) ずつ添加した。各粉碎試料への添加は, 各粉碎試料5 gを110 mL容のガラス製スクリュウ管瓶 (アズワン) に秤取り, これにOTAとBの濃度がそれぞれ50, 100, 250, 500 ng/mLになるように調整したメタノール溶液を各100 μ L (それぞれ1, 2, 5, 10 ng/g汚染に相当) を添加した。添加後, 口をキムワイプで覆い, 遮光してドラフト内で一晚 (12~16時間) 静置し, メタノールを蒸発させた後, 抽出を行った。

抽出溶媒の比較

抽出溶媒はAkiyamaら⁽¹³⁾と同じアセトニトリル：1%リン酸 (99+1) と1%リン酸の比率を変えず, 含水量を変化させたアセトニトリル：水：1%リン酸 (94+4+1), 同 (90+9+1), 同 (85+14+1), 同 (80+19+1) について比較した。

HPLCの条件

Akiyamaら⁽¹³⁾のとはほぼ同様に行った。すなわち, 移動相はアセトニトリル：水：酢酸 (40+58+2) を用い, カラムオープン40°C, 流速1 mL/分, 蛍光検出は励起波長335 nm, 蛍光波長465 nmで行った。カラムはカプセルパックC₈ UG120内径4.6 mm×150 mm (資生堂) を用いた。また, 抽出溶媒の含水量が増えると抽出される夾雑物の量も増え特に5.5分付近のOTBのピークの検出が困難となったので, 抽出溶媒を変更した後の実験では, カプセルパックC₁₈ MG内径4.6 mm×250 mm (資生堂) を使用した。なお, ガードカラムは使用しなかった。

結果及び考察

抽出溶媒アセトニトリル：1%リン酸 (99+1) での回収率

各試料からの抽出ろ液にOTAを5 ng/g相当量添加し,

クリーンアップを行った結果, いずれの試料抽出液で回収率は90%以上で良好であった (Table 1)。しかし, 各粉碎試料に5 ng/g汚染相当のOTAとOTBを添加し, 回収実験を行った。その結果 (Table 2), 焙煎コーヒー豆ではOTAとOTBの平均回収率は, それぞれ42.2%と52.6%で, 生コーヒー豆では10.7%と9.5%, 玄米では64.6%と60.7%, 小麦で27.9%と16.4%, トウモロコシで62.8%と52.9%といずれの試料においても低値であった。アセトニトリル：1%リン酸 (99+1) では, 蛋白質変性作用が強く, 炭水化物や糖類をほとんど溶解しないアセトニトリルがほとんどであり, 粉碎試料内部まで充分抽出溶媒が浸潤しないのではと考えられた。抽出溶媒に問題がある可能性が示唆された。なお, Akiyamaらの報告⁽¹³⁾には, 明確に粉碎試料へのOTAの添加方法は記載されていない。

抽出溶媒の含水量の違いによる回収率の比較

そこで, 最も回収率が低かった生コーヒー豆で抽出溶媒の含水量を変え添加回収実験を行った。抽出溶媒の含水量を上げた場合, 抽出される夾雑物の量も増え, 特に5.5分付近のOTBのピークと夾雑物のピークの重なりが大きかった (Fig. 2(A))。そこで, HPLCのカラムをカプセルパックC₈ UG120内径4.6 mm×150 mmから, カプセルパックC₁₈ MG内径4.6 mm×250 mmに変更した。その結果 (Fig. 2(B)), OTBとOTAのピークはそれぞれ13分付近と25分付近に移行し, 10分以前の大きな夾雑物のピークと分離することができた。以下の実験では, カプセルパックC₁₈ MG内径4.6 mm×250 mmを用いて, HPLCを行った。抽出溶媒の含水量を変え添加回収実験の結果 (Table 3), 含水量が1~10%までは, 含水量が上昇するに従って, 回収率は上昇し, アセトニトリル：

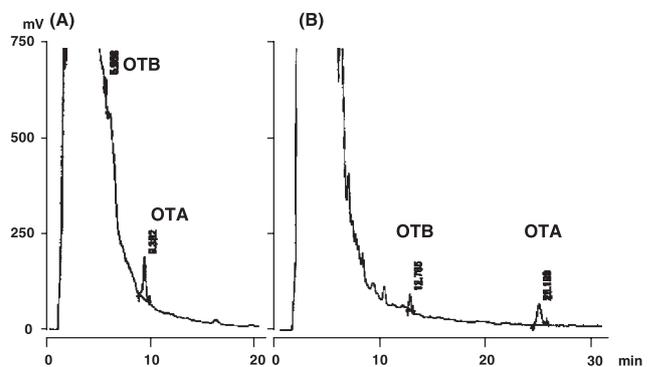


Fig.2. The HPLC chromatograms of the extract from green coffee spiked ochratoxin A and B (5 ng/g) with acetonitrile : water : 1% phosphoric acid (90+9+1) using the different columns (A) Capcell pack C₈ UG120 (4.6 x 150 mm), (B) Capcell pack C₁₈ MG (4.6 x 250 mm)

Table 3. Recovery of Ochratoxin A and B from Green Coffee, spiked of 5 ng/g, Extracted with Various Solvent.

The extracte solvent acetonitrile:water:1% phosphoric acid	Recovery (% Means \pm SD, n=3)	
	Ochratoxin A	Ochratoxin B
99+0+1	10.7 \pm 1.9	9.5 \pm 1.0
95+4+1	66.9 \pm 0.6	65.7 \pm 3.5
90+9+1	96.8 \pm 3.2	92.4 \pm 4.1
85+14+1	64.0 \pm 2.8	41.1 \pm 1.9
80+19+1	33.1 \pm 4.4	43.3 \pm 1.3

水：1%リン酸（90+9+1）では、OTAとOTBの平均回収率はそれぞれ96.8%と92.4%と高かった。しかし、含水率が15%と20%では、回収率は低下した。含水率が15%と20%の溶媒にOTAを溶解しDEA固相抽出を行った結果、DEAカラムへのOTAの結合率が低下することを確認できたので、これが回収率の低下の原因であると考えられた。アセトニトリル：水：1%リン酸（90+9+1）で抽出を行えば、高回収率でOTAとOTBの測定が可能であることが示された。

モデル汚染生コーヒー豆での測定値の比較

添加回収実験の結果、抽出溶媒としてアセトニトリル：水：1%リン酸（90+9+1）を用いると高回収率でOTAとOTBの測定が可能であったが、このことを確認するために、カビ培養生コーヒー豆を非汚染生コーヒー豆と混同し調整した人工汚染生コーヒー豆で、抽出溶媒アセトニトリル：水：1%リン酸（99+0+1）と同（90+9+1）での測定値を比較した。その結果（Table 4）、アセトニトリル：水：1%リン酸（99+0+1）を用いた場合、低濃度試料では、OTAとOTBはいずれも検出されず、高濃度試料で平均0.25 ng/gのOTAのみが検出された。一方、アセトニトリル：水：1%リン酸（90+9+1）を用いた場合、低濃度試料では、OTAとOTBはそれぞれ平均1.34と0.34 ng/g検出された。また、高濃度試料では、OTAとOTBはそれぞれ平均4.91と1.94 ng/gが検出された。高濃度試料でのOTAの測定値を比較するとアセトニトリ

ル：水：1%リン酸（90+9+1）を用いた場合、約20倍程度高い測定値であり、生コーヒー豆でのアセトニトリル：水：1%リン酸（99+0+1）の回収率が約10%程度であったことと、おおむね一致していた。以上の結果から、アセトニトリル：水：1%リン酸（90+9+1）を抽出溶媒として用いれば、高い回収率でOTAとOTBの測定が可能であることが示された。

生コーヒー豆、焙煎コーヒー豆及び穀物での回収率

そこで、EUでの穀物およびその加工品の規制値がそれぞれ5 ng/gと3 ng/gである⁽¹⁵⁾ことを考慮して、玄米、小麦、トウモロコシ、生および焙煎コーヒー豆のそれぞれ1, 2と5 ng/g（焙煎コーヒー豆では1, 2, 5と10 ng/g）のOTAとOTBの添加回収実験を行った。その結果（Table 5）、OTAとOTBの添加回収は、それぞれ、玄米では89.1~98.3と85.0~91.8%、小麦で89.5~91.1と87.0~93.8%、トウモロコシでは101.7~88.1と86.2~108.7%、生コーヒー豆では96.3~104.6と85.7~92.4%であり、バラツキも1 ppb添加群で若干高めであるがほぼ満足のいく値であった。また、穀物及び生コーヒー豆での測定感度は0.2 ppbであった。一方、焙煎コーヒーでは、本法でのクリーンアップは十分に行えず、1~10 ppb添加においていずれにおいてもOTBのピークは確認できなかった。OTAに関しても、1 ppb添加では回収率は50%以下であり、バラツキも大きかったが、2~10 ppb添加でのOTAの回収率は83.2~95.6%であり、本方法で2 ppb以上の

Table 4. Determination of Ochratoxin A and B from the Artificial Contaminated Green Coffee Samples Extracted with Acetonitrile:Water:1% Phosphoric Acid (99+0+1) or (90+9+1)

The extracte solvent acetonitrile:water:1% phosphoric acid	Samples*	ng/g (Means \pm SD, n=3)	
		Ochratoxin A	Ochratoxin B
99+0+1	low level	ND	ND
	high level	0.25 \pm 0.03	ND
90+9+1	low level	1.34 \pm 0.14	0.34 \pm 0.09
	high level	4.91 \pm 0.32	1.09 \pm 0.14

*The artificial contaminated green coffee samples were prepared that the ground green coffee inoculated with ochratoxin-producing fungus was diluted with non-contaminated ground green coffee. Low level and high level were diluted 50,000 and 10,000 times, respectively.

ND; not detected

Table 5. Recovery of Ochratoxin A and B from the Spiked Cereals, Green and Roasted Coffee

Samples	Added (ng/g)	Recovery (% Means \pm SD, n=3)	
		Ochratoxin A	Ochratoxin B
Braown rice	1	89.1 \pm 4.9	91.8 \pm 6.4
	2	98.4 \pm 2.8	85.0 \pm 3.6
	5	98.3 \pm 3.2	88.2 \pm 4.1
	Average	95.3	88.3
Wheat	1	91.1 \pm 4.9	93.8 \pm 2.8
	2	90.9 \pm 1.3	87.0 \pm 1.7
	5	89.5 \pm 1.0	90.2 \pm 2.9
	Average	90.5	90.3
Corn	1	100.4 \pm 7.4	108.7 \pm 0.8
	2	101.7 \pm 2.1	108.6 \pm 2.1
	5	88.1 \pm 5.4	86.2 \pm 2.6
	Average	96.7	101.2
Green coffee	1	104.6 \pm 5.7	88.7 \pm 6.4
	2	100.1 \pm 0.6	85.7 \pm 2.8
	5	96.8 \pm 3.2	92.4 \pm 4.1
	Average	100.5	88.9
Roasted coffee	Average	95.8	92.2
	1	48.2 \pm 15.3	ND
	2	83.2 \pm 5.3	ND
	5	85.6 \pm 3.9	ND
	10	95.5 \pm 3.1	ND

ND; not detected

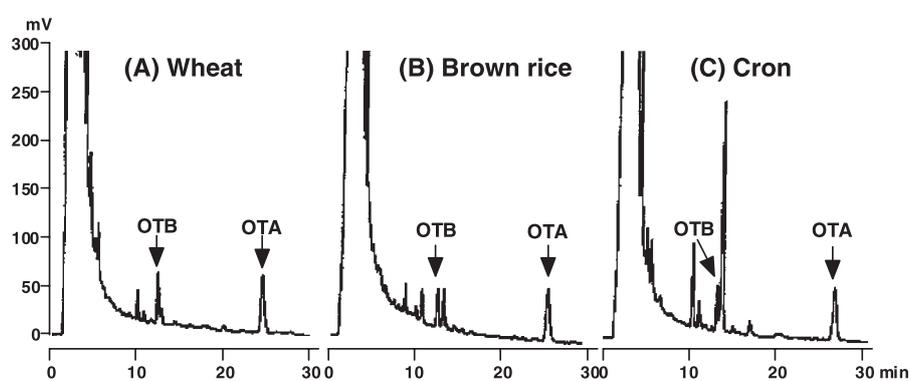


Fig. 3. The typical HPLC chromatograms of the extract from wheat (A), brown rice (B) and corn (C) spiked ochratoxin A and B (5 ng/g)

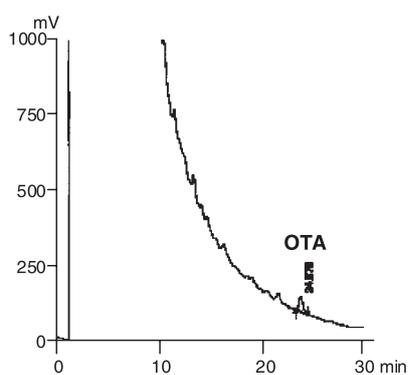


Fig. 4. The typical HPLC chromatogram of the extract from roasted coffee spiked ochratoxin A and B (5 ng/g)

OTAの検出は可能であった。以上のことから、本法は玄米、小麦、トウモロコシなどの穀物や生コーヒー豆の汚染調査に充分活用しうる方法だと言える。

謝 辞

カビ培養生コーヒー豆を譲渡していただいた名古屋市衛生研究所中嶋正博博士に深く感謝いたします。

要 約

本改良DEA固相抽出法は、Akiyamaらの方法⁽¹³⁾から抽出溶媒をアセトニトリル：水：1%リン酸(90+9+1)に、HPLCカラムをカプセルパックC₁₈ MG内径4.6mm×250mm変更した方法であるが、玄米、小麦、トウモロコシ、生コーヒー豆中の0.2ng/gまでのOTAおよびOTBの検出が可能であった。ただし、焙煎コーヒー豆の場合は、2 ng/gまでのOTAのみの検出が可能であり、IACを用いた場合より劣っていた。また、本法はクロロホルムなどの毒性の強い有機溶媒を使用せず、コスト面でもIACや多機能カラムより有利であった。操作性の面ではIACより若干劣るが、本法で、一人で1日20検体以上の抽出、クリーンアップ操作が充分可能であった。以上のことから、本法は玄米、小麦、ウモロコシなどの穀物や生コーヒー豆の汚染調査に充分活用しうる方法だと言える。

引 用 文 献

- (1) WHO Food Additive Series #47: In The 56 meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (eds.). Ochratoxins. pp.281-415, World Health Organization (2002).
- (2) AISH, J. L., RIPPON, E. H., and HATTERALEY, J.: Mycotoxins in food Detection and control, In MAGANM, N. and OLSEN, M. (eds.) . Ochratoxin A. pp.307-338, CRC Press, New York (2004).
- (3) 川村 理: 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、ワイン、ぶどうジュースおよびビール中のオクラトキシンの測定, 香川大学農学部学術報告, **57**, 35-41 (2005).
- (4) NAKAJIMA, M., TSUBOUCHI, H., MIYABE, M.: Related Articles, Links A survey of ochratoxin A and aflatoxins in domestic and imported beers in Japan by immunoaffinity and liquid chromatography. *J. AOAC Int.*, **82**, 897-902 (1999).
- (5) KAWAMURA, O., SATO, S., NAGURA, M., KISHIMOTO, S., UENO, I., SATO, S., UDA, T., ITOH, Y. and UENO, Y.: Enzyme-linked immunosorbent assay for detection and survey of ochratoxin A in livestock sera and mixed feeds. *Food and Agric. Immunol.*, **2**, 135-143 (1990).
- (6) UENO, Y., MAKI, S., LIM, J., FURUYA, M., SUGIURA, Y., and KAWAMURA, O.: 4-year study of plasma ochratoxin A in a selected population in Tokyo by immunoassay and immunoaffinity column-linked HPLC. *Food and Chemical Toxicology*, **36**, 445-449 (1998).
- (7) MALLY, A., KEIM-HEUSLER, H., AMBERG, A., KURZ, M., ZEPNIK, H., MANTLE, P., VOLKEL, W., HARD, G. C., and DEKANT, W.: Biotransformation and nephrotoxicity of Ochratoxin B in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **206**, 43-53 (2005).
- (8) MALLY, A., PEPE, G., RAVOORI, S., FIORE, M., GUPTA, R. C., DEKANT, W., and MOSESSO, P.: Ochratoxin A causes DNA damage and cytogenetic effects but no DNA adducts in rats. *Chem. Res. Toxicol.*, **18**, 1253-1261 (2005).
- (9) HEUSSNER, A. H., DIETRICH, D. R., and O' BRIEN, E.: In vitro investigation of individual and combined cytotoxic effects of ochratoxin A and other selected mycotoxins on renal cells. *Toxicology In Vitro*, **20**, 332-41 (2006).
- (10) VAN EGMOND, H. P.: Analytical methodology and regulations for ochratoxin A. *Food Addit. Contam.*, **13**, 11-13 (1996).
- (11) Scott P. M., Methods of analysis for ochratoxin A. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **504**, 117-134 (2002).
- (12) BUTTINGER, G., FUCHS, E., KNAPP, H., BERTHILLER, F., SCHUHMACHER, R., BINDER, E. M., and KRISKA, R.: Performance of new clean-up column for the determination of ochratoxin A in cereals and foodstuffs by HPLC-FLD. *Food Addit. Contam.*, **21**, 1107-1114 (2004).
- (13) AKIYAMA, H., CHEN, A., MIYAHARA, M., GODA, Y., and TOYODA, M.: A rapid analysis of ochratoxin A in coffee beans and cereals. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **38**, 406-411 (1997).
- (14) COLE, R. J. and COX, R. H.: Handbook of toxic fungal metabolites. In COLE, R. J. and COX, R. H. (eds.). Ochratoxins, pp.128-151, Academic Press, New York (1981).
- (15) VAN EGMOND, H. P. and JONKER, M. A.: Mycotoxins in food Detection and control, In MAGANM, N. and OLSEN, M. (eds.). Current regulations governing mycotoxin limits in food. pp.49-68, CRC Press, New York (2004).

(2009年10月31日受理)