

コーヒー豆中のアフラトキシン様物質に関する検討

矢崎 廣久¹⁾ 高橋 治男¹⁾ 上野 郁子²⁾ 萩川貴美江³⁾ 上野 芳夫³⁾

Chemical Confirmation of Aflatoxin-like Compound in Coffee Beans :

Hirohisa YAZAKI, Haruo TAKAHASHI, Ikuko UENO,
Kimie HARAICAWA and Yoshio UENO

I はじめに

強力発癌性かび毒であるアフラトキシンが、非常に高い割合で健康人の血清中より検出されたとする報告¹⁾が出されて以降、国公立の研究機関を中心に、その原因と思われる日常食品の検索が行われてきた。とりわけ輸入コーヒー豆については、当初から推定汚染食品としての疑問も持たれていたため、著者らも市販のインスタントコーヒーおよびコーヒー豆について、アフラトキシンの汚染調査を行なった。その際分析法として公定法に準じた分析操作を行なったところ、多数の検体からアフラトキシン類似のけい光物質が確認された。この物質は、薄層クロマトによる検出の際にアフラトキシンB₂ときわめて判別困難な性質を有するので、これらを誤りなく判定するため、種々の検討を行なった。

II 実験方法

1. 装置

- 1) けい光自記濃度計 島津クロマトスキャナーCS-910形(けい光付属装置付)
- 2) 分光けい光光度計 日立けい光光度計MPF-4形(キセノンランプ付)
- 3) 分光光度計 日立自記分光光度計320形
- 4) 赤外分光光度計 日立赤外分光光度計260-30形

2. 試薬

- 1) マイコトキシン標準溶液 アフラトキシンB₁、B₂、G₁、G₂を各々1mg 精秤し、メタノールに溶解し、0.1mg/ml溶液とした。
- 2) 薄層クロマト用プレート MN-シリカゲルG-

HR、アドゾルブジュール-1およびバイオジュール-Aは、厚さ0.25mmにと布ののち、またメルク・プレコート・シリカゲル60についても110°、1時間活性化して使用した。

3) 有機溶剤 メタノール、ヘキサン、クロロホルム、アセトン、2-プロパノール、ベンゼン、エタノール、エチルエーテル等は、いずれも和光純薬の特級品を、またフェニルヒドラジンおよびヒドラジンヒドレートは、東京化成の特級品を用いた。

3. 実験操作

- 1) 供試料 昭和56年初期~57年後期にかけて輸入、製造されたコーヒー豆およびインスタントコーヒー各々10検体ずつ、計20検体について調査した。
- 2) 抽出・分離 コーヒー豆は粉碎・混和を充分に行

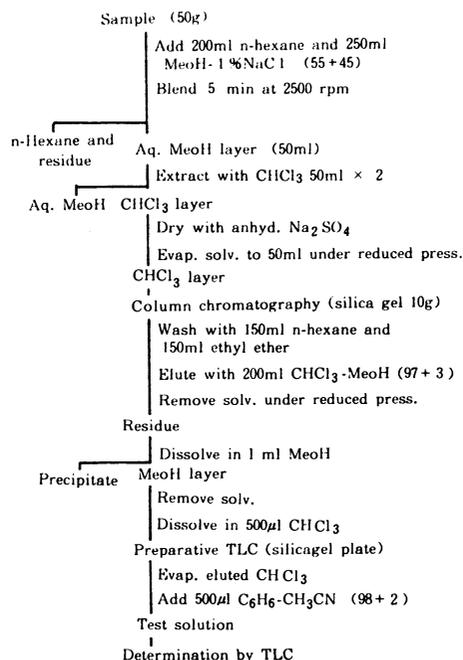


Fig.1 Procedure for extraction and determination of aflatoxins in green coffee beans and instant coffee

1) 千葉県衛生研究所
2) 東京大学医学研究所
3) 東京理科大学薬学部
(1983年10月28日受理)

ない、インスタントコーヒーは粉体のまま、Fig.1の方法に従って分析した。すなわち、公定法に準拠して処理を行なったのち、メタノール抽出によりワックス性夾雑分を除去し、さらにメタノール溶解成分をプレパレイティブ薄層クロマトグラフィーにより精製した、

3) 検出・同定 精製した試料は、薄層クロマトグラフィー (TLC) で確認することとし、TLC条件は、Table 2に記載した展開溶媒系ならびに担体を使用した。

4) 吸光分光分析法による確認 試料から単離精製したアフラトキシン様けい光物質ならびにアフラトキシン B₂標準品のメタノール溶液について、けい光光度計を用いて励起、けい光波長を求めると共に、分光光度計により紫外外部吸収スペクトルの比較も行なった。さらにクロホルム溶液法により、赤外吸収スペクトル (IR) を計測した。

5) 誘導体調整反応による比較 試料10 μgをエタノール1 mlに溶かし、これにヒドラジン・ヒドレート10 μlと水酢酸1滴を加え、還流冷却器をつけて水浴上、1時間半加熱した。フェニルヒドラジンの反応についても同様な操作を行なったが、反応時間は30分とした。反応終了の後、生成物をTLCプレート上にスポットし、クロホルム-アセトン (9 + 1) 溶媒系で約12cm展開してから、365nm紫外線灯下で、誘導体生成物のR_f値、ならびにけい光色の比較確認を行なった。

6) 酵素免疫測定法 (ELISA) による確認²⁾ 今回用いたELISAによる操作法をFig.2に示す。すなわ

ちマイクロプレートに抗アフラトキシンB₁血清 (ウサギ血清IgG) を吸着させ、そこにアフラトキシンB₁標識パーオキシダーゼおよびアフラトキシンを同時に加え、反応を十分に行なう。その後プレートを良く洗浄し、余分な酵素を除去してから基質を加え、一定時間反応を行なうと、酵素量に比例しアフラトキシン量に反比例した発色が得られた。

```

Polystyrene microtissue culture Plate with 96wells 50 μl of 0.02% BSA
|
| 50 μl of 0.2% glutaraldehyde-phosphate buffered saline ( pH 7.5 )
| added to each well
| Kept for 30 min at room temperature
| Wells washed with water
| Air-dried overnight
| 50 μl of anti-AFB1IgG ( × 1000 diluted ) added to each well
| Air-dried
|
Anti-AFB1IgG-coated microwells
|
| Washed 3 times with 0.05% Tween 20 in phosphate buffered saline
| ( pH 7.5 )
| 100 μl of a mixture of 3.7 mM O-phenylenediamine and 3.5mM H2O2
| in 25 mM citrate phosphate buffer ( pH 5.0 ) added
| 100 μl of 2.5 M H2SO4 added
|
Spectrophotometry at 492 nm
    
```

Fig. 2 Procedures of Enzyme-linked Immunosorbent Assay

III 結果および考察

1. 試料のアフラトキシン分析

コーヒー豆のアフラトキシン分析法としては、従来から Levi³⁾ および Scott⁴⁾ らによる A.O.A.C⁵⁾ 法

No.	sample	country	aflatoxin found	aflatoxin B-like compound (μg/kg)
1	green coffee beans	Guatemala	ND	9
2	"	"	"	7
3	"	"	"	7
4	"	Ethiopia	"	100
5	"	Indonesia	"	255
6	"	Hawaii	"	trace
7	"	Tanzania	"	19
8	"	"	"	8
9	"	Jamaica	"	ND
10	"	Colombia	"	ND
11	instant coffee	"	"	33
12	"	Colombia	"	29
13	"	"	"	trace
14	regular coffee	"	"	trace
15	instant coffee	"	"	39
16	"	USA	"	11
17	"	Brazil	"	28
18	"	USA	"	trace
19	"	Netheralands, Brazil	"	14
20	coffee beans	"	"	ND

Table 1. Analitical results of aflatoxins in green coffee beans and instant coffee

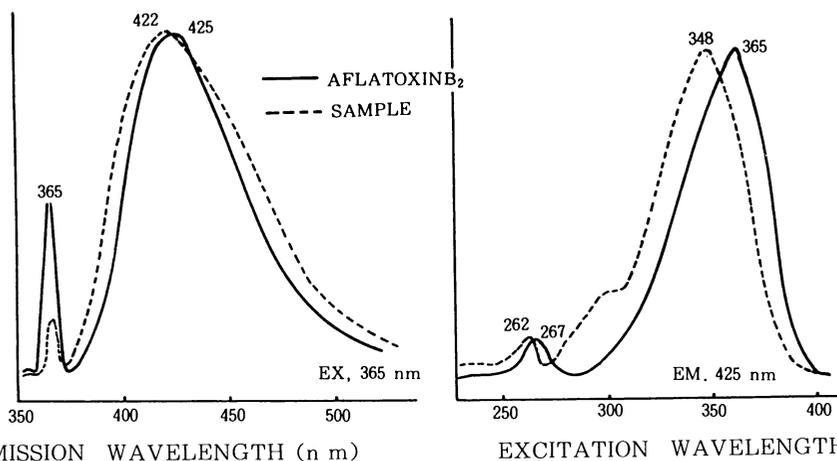


Fig. 3. Fluorescence Spectra of Aflatoxin B₂ and Aflatoxin B₂-like Compound in Methanol

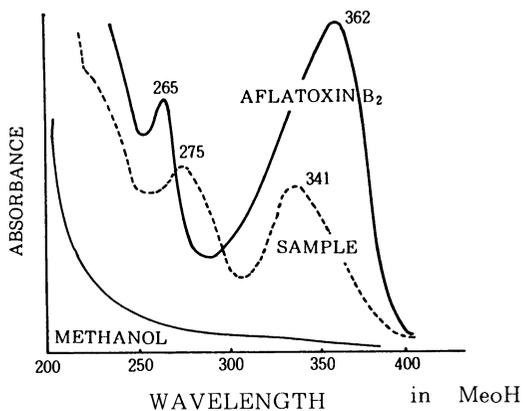


Fig. 4. UV Spectrum of Aflatoxin B₂ and Aflatoxin B₂-like Compound

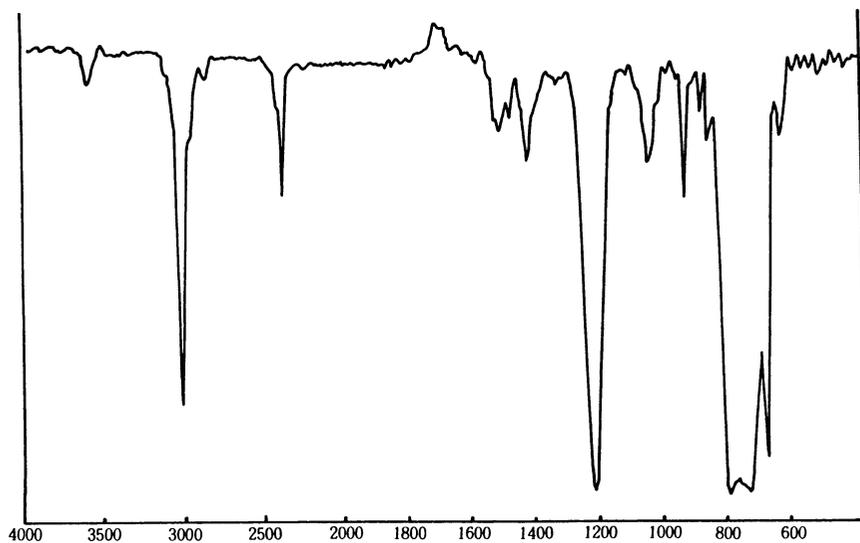


Fig. 5. IR spectrum of Aflatoxin B₂-like Compound

が知られているが、著者らの追試験によると、多量の油脂状来雑物による妨害が見られ、分析は困難であった。そこで環食128号の抽出法に準じた分析を行なったが、操作中に多量に析出するカフェイン等のワックス分を除去するため、メタノールによる溶解度差を利用した抽出段階を追加した。

そして、MN-シリカゲルG-HRならびにクロロホルム-アセトン(9+1)を用いたプレパレイティブ TLCにより、単離精製を行なった。今回調査した検体については、アフラトキシンは検出されていないが、Table 1に示すように多数の検体からアフラトキシンB₂様けい光物質が認められた。薄層デンストメトリーによると、これらはコーヒー豆10検体中7件より7~255ppb、またインスタントコーヒー10検体中6件より、11~39ppbの濃度であった。本物質は、従来使われているシリカゲルTLCでは、アフラトキシンB₂との判別がきわめて困難なため、以下に記載するように各種の機器分析、誘導体化反応、酵素免疫法等により検索を進めた。

2. スペクトルによる同定

本けい光物質をスペクトル解析するため、特に高い値を示すインドネシア産コーヒー豆の抽出物について、精製を行ない微量の単一物質を得た。この物質およびアフラトキシンB₂に関するけい光、紫外部、赤外部吸収スペクトルをFig.3~Fig.5に示す。本けい光物質の励起波長はEx348nm、けい光波長はEm422nmに極大吸収を持ち、いずれもアフラトキシン標準品のEx365nm、Em425nmとは明らかに相違している。さらに紫外部吸収についても、本物質の入max275nm、341nmに対してアフラトキシンB₂は入max265nm、362nmなど、一致しない値を示した。

IRスペクトルは $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$ cm⁻¹ 3020、2400、1525、1440、1215、1050、940、790に吸収を示し、オレフィン系化合物が推測された。とりわけ2400cm⁻¹の鋭いピークは、三重結合性炭素の伸縮振動に特有な吸収であり、アルキンあるいはニトリルが含まれることが分った。

3. 誘導体調整化反応

誘導体作成は、アフラトキシンB₂がビスフラン環の2、3位に二重結合を持たないため、無水トリフルオロ酢酸、あるいは塩化チオニル-ギ酸などの通常の試薬による確認は困難であり、また本けい光物質もこれらの試薬とは反応しなかった。そこで著者らは、カルボニル試薬による反応を種々検討し、ヒドラジンまたはフェニルヒドラジンにより、TLCプレート上単一スポットとし

Table 2. Approximate Rf values on TLC*
silicagel plate for derivatization reagents

Substance	Rf values of products	
	Hydrazine	Phenyl hydrazine
Aflatoxin B ₂ **	0.03 (Blue-green)	0.65 (Violet)
Aflatoxin B ₂ -like compound	0.35 (Yellow-green)	Unreactive

* TLC condition : Merck pre-coated silicagel 60
Devel. solv. CHCl₃-acetone (9 + 1)
UV. 3650 A

** Rf value of aflatoxin B₂ : 0.25

て誘導体化する条件を見出した。その結果をTable 2に示した。アフラトキシンB₂は、反応前Rf 0.25に青色けい光スポットとして認められるが、ヒドラジンとの反応後はRf 0.03に青緑色けい光の生成物を与える。しかしながら本けい光物質の場合、同一の反応による生成物はRf 0.35の位置に黄緑色けい光のスポットを示した。同様に試薬としてフェニルヒドラジンを使用した場合、アフラトキシンB₂はRf 0.65に紫色のけい光スポットが現れるのに対し、本けい光物質については反応しなかった。

4. 酵素免疫法による検定

今回の実験でELISAに用いた抗体は、抗アフラトキシンB₁タイプであったが、抗体に対する特異性および検出感度は、アフラトキシンB₂についても十分なこ

Table 3. ELISA of aflatoxin B₂-like compound isolated from green coffee beans

B,G	OD ₄₉₂ (x1/5) average				binding inhibition		
					%	%	
aflatoxin B ₂ (pg/w)	0	0.477	0.469	0.537	100	0	
	40	0.519	0.527	0.443	0.496	101	0
	132	0.428	0.423	0.446	0.432	89	11
	400	0.345	0.313	0.353	0.337	68	32
	1320	0.250	0.274	0.299	0.274	55	45
sample (pg/w)	500	0.446	0.500	0.487	0.478	97	3
	1000	0.481	0.466	0.471	0.466	96	4
	5000	0.500	0.517	0.501	0.506	102	0
	10000	0.479	0.487	0.435	0.467	95	5

とを確認の上使用した。Table 3に見られる通り、アフラトキシンB₂は1320pg/wellで45%の阻害が認められるが、本けい光物質では500pg~10ng/wellの濃度範囲においても、有意な阻害は見られなかった。

5. TLCを用いた識別法の検討

これらの実験結果により、コーヒー豆に含まれる本けい光物質は、アフラトキシンB₂とは全く別の物質であることが判明したので、最後に出来るだけ簡便に識別する

方法を見出すため、TLCによる検討を試みた。すなわち、アフラトキシン分析について従来から文献上に頻出するTLC条件の主なものを選び、本けい光物質との比較を詳細に行なったものがTable 4である。公定法で

Table 4. Rf values of aflatoxins and sample under various TLC conditions

Solvent system	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	Sample
C : M (97+3)	0.64	0.59	0.52	0.44	0.55
C : A (9+1)	0.66	0.60	0.53	0.46	0.63
C:A:P (165+30+5)	0.75	0.69	0.62	0.62	0.36 (tailing)
B:E:W (92+70+38)	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60 (one spot)
Et:M:W (192+6+2)	0.34	0.29	0.23	0.18	0.65

Plate: MN-silicagel G-HR

Solvent system	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	Sample
C : M (97+3)	0.69	0.65	0.59	0.53	0.52
C : A (9+1)	0.54	0.47	0.41	0.33	0.43
C:A:P (165+30+5)	0.72	0.66	0.60	0.54	0.55
B:E:W (92+70+38)	0.49	0.45	0.41	0.37	0.37
Et:M:W (192+6+2)	0.27	0.21	0.17	0.12	0.61

Plate : Adsorbosil-1

Solvent system	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	Sample
C : M (97+3)	0.90	0.87	0.83	0.79	0.74
C : A (9+1)	0.63	0.57	0.51	0.44	0.57
C:A:P (165+30+5)	0.90	0.86	0.83	0.79	0.78
B:E:W (92+70+38)	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58 (one spot)
Et:M:W (192+6+2)	0.43	0.36	0.30	0.24	0.72

Plate : Bio-sil A

C : chloroform, M : methanol, A : acetone, P : 2-propanol, B : benzene, E : ethanol, W : water, Et : ethyl ether

使用されるクロロホルム-アセトン(9+1)混合溶媒に、バイオジールAあるいはメルク・プレコート・シリカゲル60などの担体を組合わせた場合、両物質のけい光スポットは判別が難しくなり、またMN-シリカゲルG-HRやアドソルブジール-1担体に関しても、きわめてわずかな差異しか認め得なかった。しかしながら、特別なTLC条件の選択により、アフラトキシンとこれらの疑似物質は明確に異なる様相を呈した。すなわちエチルエーテル-メタノール-水(96+3+1)の溶媒系に、MN-シリカゲルG-HR、アドソルブジール-1およびバイオジールAなどの担体を組合わすことにより、これら似かよった物質は確実に識別が可能となった。

IV まとめ

市販のコーヒー豆およびインスタントコーヒーについ

て、環食128号の方法に準じて分析したところ、多くの検体からアフラトキシンB₂様物質が検出された。これらのけい光物質を分離・精製のち、各種スペクトルによる同定、誘導体調整化反応による確認ならびに酵素免疫測定法などにより、アフラトキシンと全く別物質であることを確めた。さらに分析に際してのTLC条件を検討し、担体ならびに展開溶媒に特定の組合せを導入することにより、本けい光物質はアフラトキシンに対して明確に識別された。

稿の終りに際し終始多大なご援助および貴重な文献を賜わった国立予防衛生研究所 栗飯原景昭部長、国立衛生試験所 一戸正勝博士、倉田 浩部長に深謝致します。

V 文献

- 1) 坪井誠吉、富田昌宏、中川俊太郎、岩村 昇(1982) : 日本人血清中のアフラトキシン測定、日本癌学会第41回総会講演要旨、422
- 2) 上野郁子、祓川貴美江、上野芳夫(1983) : 酵素免疫法による Aflatoxin B₁ の定量とその食品中のAflatoxin B₁ 検出への応用、マイコトキシン、17、55-58.
- 3) Levi, C.P., Borker, E. (1968) : Survey of Green Coffee for Potential Aflatoxin Contamination, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 51, 600-602.
- 4) Scott, P.M. (1968) : Note on Analysis of Aflatoxins in Green Coffee, J. Assos. Off. Chem., 51, 609.
- 5) Natural Poisons, (1975) Chapt. 26, Official Methods of Analysis, A. O. A. C, Washington, DC.