

生薬中アフラトキシン類の HPLC による分析方法の検討

理化学課 大窪 かおり 中山 秀幸
医薬品課 植松 京子

キーワード：アフラトキシン 生薬 HPLC 多機能カラム イムノアフィニティーカラム

1 はじめに

Aspergillus flavus 及び *Aspergillus parasiticus* が産生するカビ毒の一種であるアフラトキシン類は、強い発ガン性を有している。これら 2 種の産生菌は熱帯や亜熱帯地方に広く分布することが知られており、トウモロコシ、落花生、アーモンド、香辛料など種々の輸入食品において汚染が報告されている。わが国は、こういった地域から食品だけでなく漢方薬の原料となる生薬も輸入している。

食品中アフラトキシン類の分析については、イオン交換樹脂等を用いた多機能カラム(以下、MF カラムという)を用いて精製した後 HPLC で定量する公定法が準備されているが、穀類、豆類、種実類及び香辛料類の食品を対象としており、生薬は対象となっていない。

今回、12 種類の生薬(粉末)を対象とし、食品中アフラトキシン類の分析法の適用について検討を行ったので報告する。

2 方法

公定法に採用されている多機能カラムを用いた精製のほか、イムノアフィニティーカラム(以下、IA カラムという)を用いた精製方法についても検討した。なお、対象はアフラトキシンG₁,B₁,G₂及びB₂の 4 種類の類縁体とした。

1) 試料

ウコン、オウバク、ケイヒ、ケンゴシ、シャクヤク、ジュウヤク、センキュウ、タクシャ、チンピ、トウキ、ニンジン及びニンドウを用いた。

2) 抽出

生薬の粉末 5g を共栓付き遠沈管にはかり取り、アセトニトリル:水(9:1)40ml を加えて 30 分間振とう抽出し、3000rpm で 20 分間遠心分離した上清を粗抽出液とした。

3) 精製

MF カラムは、MultiSep#228(Romer Labs 社)及び Autoprep MF-A 1000(昭和電工社)の 2 種類を使用した。粗抽出液 3~5ml を多機能カラムに注入、流速 1ml/min で滴下し、最初に溶出してくる約 1ml を試験管に集めた。そのうち 0.5ml を正確に分取し、試験溶液とした。

IA カラムは、EASI-EXTRACT AFLATOXIN(R-Biopharm-Rhone 社)及び RIDA Aflatoxin column(r-Biopharm 社)の 2 種類を使用した。粗抽出液 0.5ml を 0.1%Tween/PBS 緩衝液 20ml で希釈したものを、水又は PBS 緩衝液で予備洗浄したカラムに負荷、流速 1drop/sec で滴下した。カラムを水で洗浄した後、メタノールで溶出させたものを試験溶液とした。

MF カラムあるいは IA カラム処理によって得られた試験溶液は、窒素気流下で乾固させた。これに蛍光化試薬としてトリフルオロ酢酸 0.1ml を加え、密栓し激しく攪拌した後、暗所に 15 分間放置、アセトニトリル:水(1:9)0.4ml を加えたものを HPLC 分析に供した。

4) HPLC 分析

HPLC 分析は表 1 に示す条件で操作した。また、蛍光スペクトルを採取し、アフラトキシン類の確認に用いた。

表 1 HPLC の分析条件

HPLC : Agilent1100 蛍光検出器
 カラム : Mightysil RP-18(関東化学) i.d.4.6mm × 150mm(5 μ m)
 カラム温度 : 40
 移動相 : アセトニトリル:水(22:78) * 1
 流速 : 1.0ml/min
 注入量 : 10 μ l
 検出波長 : 励起波長 365nm , 蛍光波長 450nm

* 1 アフラトキシン類溶出後、アセトニトリル:水(50:50)でカラム洗浄

3 結果

1) MF カラム MultiSep#228 による精製

オウバク、ケイヒ、ケンゴシ、シャクヤク、タクシャ、チンピ、ニンジン及びニンドウの 8 生薬については、成分由来物質による妨害は認められなかったが(図 1)、ウコン、ジュウヤク、センキュウ及びトウキの 4 生薬については幾つかの妨害ピークが認められた (図 2)。12 種類の生薬に対する MF カラム MultiSep#228 の精製効果を表 2 にまとめた。

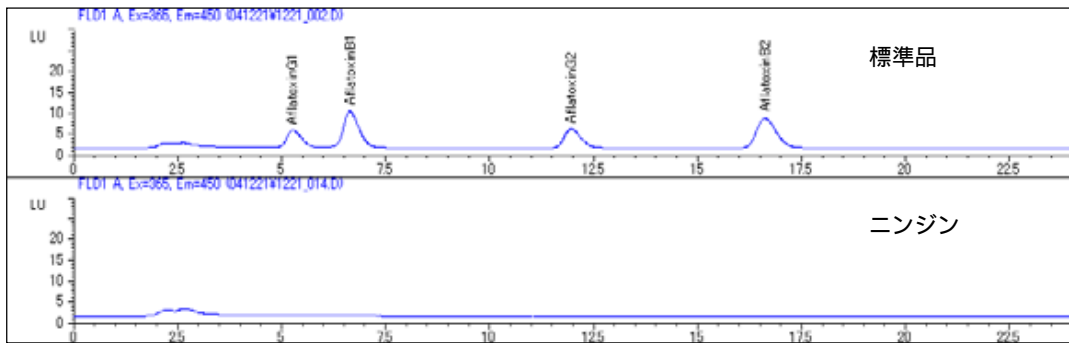


図 1 ニンジンの MultiSep#228 精製によって得られたクロマトグラム

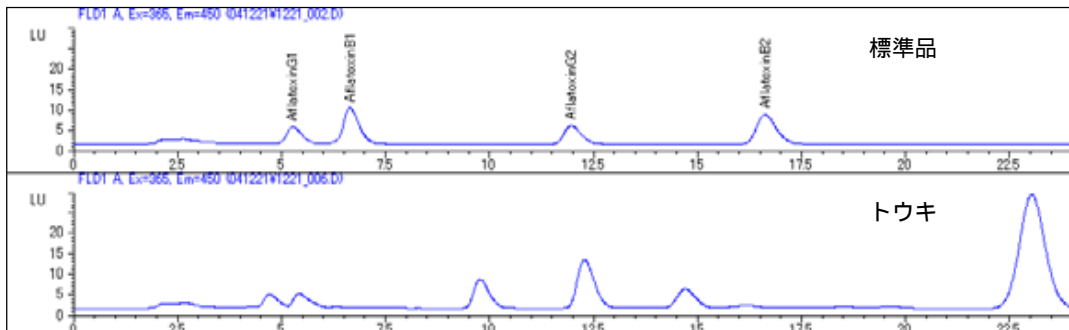


図 2 トウキの MultiSep#228 精製によって得られたクロマトグラム

表2 各種生薬に対するMFカラムMultiSep#228の精製効果^{*2}

	Aflatoxin G ₁	Aflatoxin B ₁	Aflatoxin G ₂	Aflatoxin B ₂
ウコン	×			
オウバク				
ケイヒ				
ケンゴシ				
シャクヤク				
ジュウヤク	×			
センキュウ		×		
タクシャ				
チンピ				
トウキ	×		×	
ニンジン				
ニンドウ				

^{*2} 標準品のRTの±30秒以内にピークが認められ、かつ、試料中濃度に換算して10ppb以上のピーク面積を持つものを×と判定した

2) MFカラム Autoprep MF-A 1000 による精製

ケイヒ、シャクヤク、タクシャ及びニンジンの4生薬については、成分由来物質による妨害は認められなかったが(図3)、ウコン、オウバク、ケンゴシ、ジュウヤク、センキュウ、チンピ、トウキ及びニンドウの8生薬については幾つかの妨害ピークが認められた(図4)。12種類の生薬に対するMFカラム Autoprep MF-A 1000の精製効果を表3にまとめた。

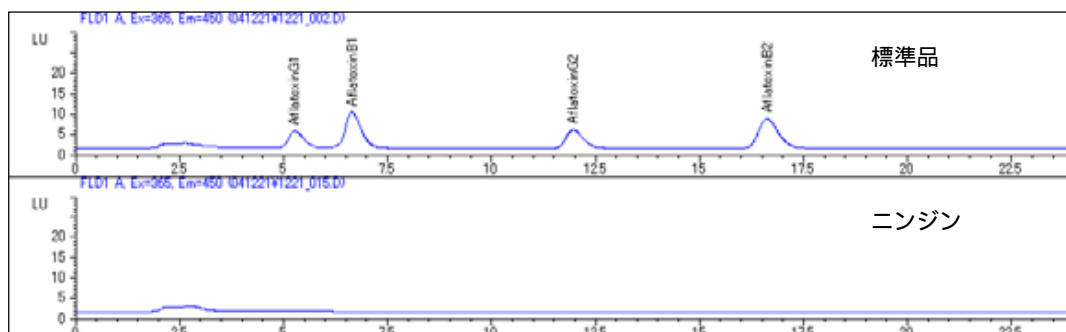


図3 ニンジンの Autoprep MF-A 1000 精製によって得られたクロマトグラム

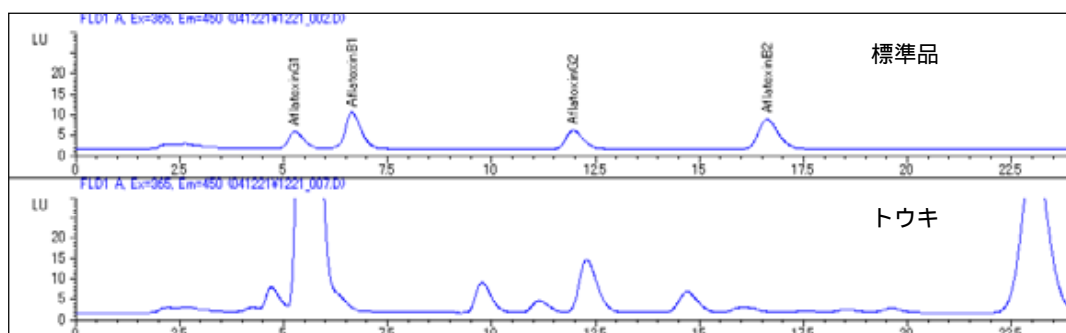


図4 トウキの Autoprep MF-A 1000 精製によって得られたクロマトグラム

表3 各種生薬に対するMFカラムAutoprep MF-A 1000の精製効果*²

	Aflatoxin G ₁	Aflatoxin B ₁	Aflatoxin G ₂	Aflatoxin B ₂
ウコン	×			
オウバク	×			
ケイヒ				
ケンゴシ	×			
シャクヤク				
ジュウヤク	×			
センキュウ	×	×	×	
タクシャ				
チンピ	×			
トウキ	×		×	
ニンジン				
ニンドウ	×			

3) IA カラム EASI-EXTRACT AFLATOXIN による精製

全ての生薬で、成分由来物質による妨害は認められなかった(図5)。

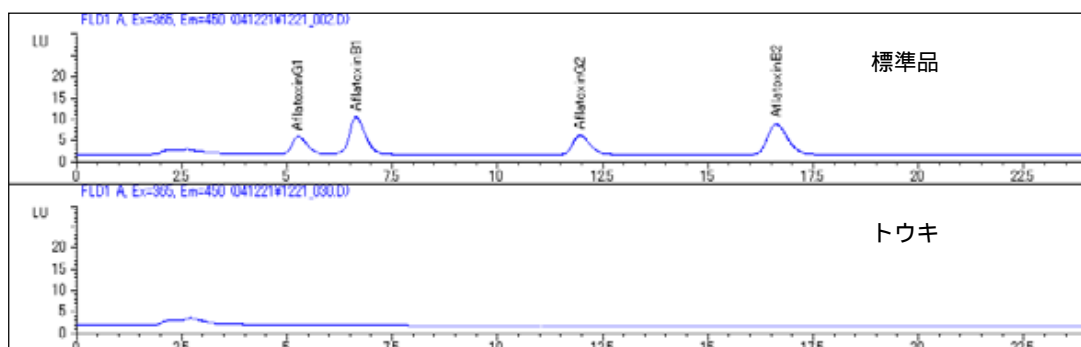


図5 トウキのEASI-EXTRACT AFLATOXIN精製によって得られたクロマトグラム

4) IA カラム RIDA Aflatoxin column による精製

全ての生薬で、成分由来物質による妨害は認められなかった(図6)。

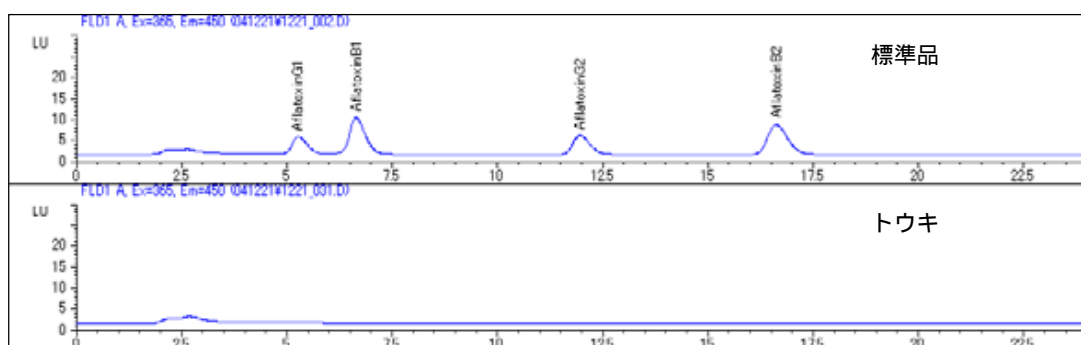


図6 トウキのRIDA Aflatoxin column精製によって得られたクロマトグラム

5) 添加回収試験

ケイヒについて、試料中の各アフラトキシン類の濃度が 10ppb となるように標準物質を添加し、回収率の検討を行った。それぞれの精製カラムにおける回収率は、MultiSep#228 が 57～96%、MF-A 1000 が 90～116%、EASI-EXTRACT AFLATOXIN が 79～96%、RIDA Aflatoxin column が 59～92%であった(表 4)

表 4 各種カラムにおける回収率(n=3)

単位:%

	Aflatoxin G ₁	Aflatoxin B ₁	Aflatoxin G ₂	Aflatoxin B ₂
MultiSep#228	95 ± 4.0	57 ± 5.7	96 ± 7.9	70 ± 2.1
Autoprep MF-A 1000	91 ± 4.9	93 ± 4.8	116 ± 7.6	90 ± 1.9
EASI-EXTRACT AFLATOXIN	89 ± 7.1	79 ± 8.0	96 ± 4.1	84 ± 5.7
RIDA Aflatoxin column	89 ± 14.2	59 ± 4.0	92 ± 12.9	61 ± 3.9

4 考察

今回使用した 2 種の IA カラムについては、アフラトキシン類の分析に影響を及ぼすピークは認められなかった。HPLC カラム洗浄過程(20 分以降)においても成分由来ピークがほとんど認められないことから、アフラトキシン類を特異的に捕集していることが示唆される(図 7)。

一方、MF カラムでは使用した 2 種で精製効果に差が見られた。MF カラムは、各製品で順相樹脂、逆相樹脂、陽イオン交換樹脂及び陰イオン交換樹脂の組合せや充填比率等が異なることから、精製効果に差が現れたものと考えられた。また、検体によっては、最初に溶出してくる 1ml を得る前に、着色層がカラムを通過してしまうものもあることから、検体ごとに最適なカラムを選択する必要がある。

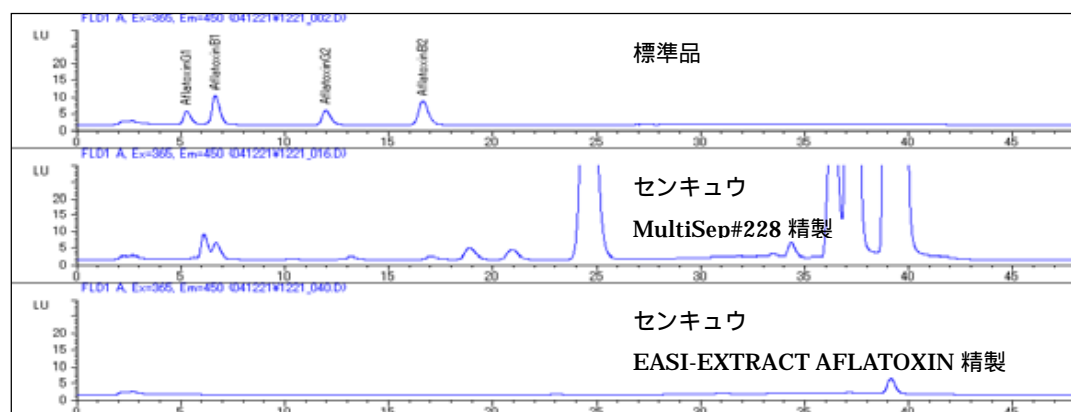


図 7 センキュウの MF カラム(MultiSep#228)精製及び IA カラム (EASI-EXTRACT AFLATOXIN)精製によって得られたクロマトグラム

5 まとめ

食品中アフラトキシン類の分析法(公定法)に示されるMFカラム精製が生薬に適用できるか、12種類の生薬について検討した。4種類のアフラトキシン類(G₁,B₁,G₂及びB₂)のうち、何れかがHPLCクロマトグラフにおいて夾雑物の影響を受けた生薬はMultiSep#228で4種類、Autoprep MF-A 1000で8種類であった。生薬中アフラトキシン類の精製にMFカラムを使用する場合、充填剤の性質や充填量等を考慮し、最適なカラムを選択することが必要であると考えられる。

また、IAカラムによる精製についても検討したところ、12種類の生薬すべてにおいて良好なHPLCクロマトグラフを得ることができた。MFカラムでは十分な精製効果が得られない場合の代替法として有用であると考えられる。