生薬及び生薬関連製剤のアフラトキシン試験法

アフラトキシンは，一部の真菌が産生する二次代謝産物であり，ヒトに対する発がん性が認められる物質と評価されている[1)]．アフラトキシンは，ナッツ類，香辛料，穀類など農産物での汚染が確認されており，食品中のアフラトキシンは日本をはじめ世界各国で規制対象となっている[2, 3)]．一方，生薬においても農産物と同様にアフラトキシンによる汚染の可能性は否定できず，実際，諸外国では植物薬原料よりアフラトキシンの検出例が報告されている[4-6)]．そのため，生薬及び生薬を原料とする生薬関連製剤では，リスクに応じてアフラトキシンの試験検査を実施することが求められる．なお，アフラトキシン汚染のリスクについては，産生菌の存在，加工調製や製造の過程における汚染の可能性を考慮することが必要である．

参考となる基準の例として，日本では，総アフラトキシン(アフラトキシンB_1，B_2，G_1及びG_2の総和)を10 μg/kgを超えて検出する食品は，食品衛生法第6条第2号に違反するものとして取り扱うこととしている[3)]．

1. 試験の概要

アフラトキシンの分析法としては，蛍光検出液体クロマトグラフィー(蛍光検出HPLC法)，液体クロマトグラフィー／質量分析法(LC/MS)等による機器分析が用いられている[7-10)]．機器分析において定量の指標として用いるアフラトキシンは強い毒性を有することから，取扱いに際しては安全性に配慮する必要がある(4.注意事項を参照)．また，アフラトキシン溶液を用いることなく簡便にアフラトキシンを分析する方法として，簡易測定装置や定性用検査キットも一般的に用いられている[11)]．

試料の調製には，精製を目的としてカートリッジ型の精製用カラムが広く用いられる．カートリッジ型の精製用カラムには，アフラトキシン抗体が吸着した樹脂を充填したカラム(イムノアフィニティカラム)や複数の担体混合物を充填したカラムが存在するが，生薬関連製剤等の精製が困難な試料の前処理にはイムノアフィニティカラムの使用が効果的である．また，試料の性質によっては，複数の担体混合物を充填したカラムを使用して試料を調製することもできる．

本参考情報では，アフラトキシン溶液を用いることなく簡易的に一定濃度以上のアフラトキシンの有無を確認できるスクリーニング法として，定性用検査キットを用いた方法について記載する．併せて，一般的に用いられる機器分析法として蛍光検出HPLC法による試験法についても記載する．試験法は適用するものの性質及び汚染程度に応じて適切に選択し，単独又は併用して行う．必要に応じて操作及び条件の適正化を検討し，分析法バリデーションの実施，システム適合性等を設定する．なお，アフラトキシン試験は日本国内において食品での試験実績があることから，厚生労働省医薬食品局食品安全部通知[11)]を参考にすることも可能である．また，欧州薬局方[8)]及び米国薬局方[9)]に収載されている試験法の記載及びWHOガイドライン[10)]も参考にできる．

2. 試験法

2.1. 定性用検査キットを用いた試験法

キットに固定したアフラトキシン抗体とアフラトキシンの抗原抗体反応を利用することにより，試料中の一定濃度以上存在するアフラトキシンの有無を判定する試験である．定性試験においては総アフラトキシンの確認が可能なものを適用する．以下の試験法は，日本薬局方に収載されている一部のエキス剤又は軟エキス剤(黄連解毒湯エキス，葛根湯エキス，小青竜湯エキス，八味地黄丸エキス，牛車腎気丸エキス，大黄甘草湯エキス，無コウイ大建中湯エキス)において4 ppb以上のアフラトキシンの有無を判断できると示された方法である[12)]．アフラトキシン陽性と判断されるもので定量値を求める必要がある場合には，機器分析による試験法を実施する．

(ⅰ) 試料溶液の調製

均一に粉砕した試料約1 gを精密に量り，アセトニトリル／水／メタノール混液(6：4：1) 4 mLを正確に加え，試料が分散するまで振り混ぜた後，30分間振り混ぜ，遠心分離し，上澄液を分取する．この液2 mLを正確にとり，ポリソルベート20 (4 %)リン酸塩緩衝塩化ナトリウム溶液を加えて50 mLとする．この液をイムノアフィニティカラム(使用直前にリン酸塩緩衝塩化ナトリウム試液を流して調整したもの)に入れる．ポリソルベート20 (0.01 %)リン酸塩緩衝塩化ナトリウム溶液10 mL，水10 mLの順にカラムを洗い，次にアセトニトリル1 mLを注入して5分間静置した後，アセトニトリル2 mLで溶出させる．溶出液は窒素気流下で溶媒を留去し，残留物に薄めたメタノール(7→10) 0.5 mLを正確に加えて試料溶液とする．このとき試料溶液0.5 mL中の試料量は0.5 g相当である．

(ⅱ) 測定方法及び評価方法

キットによる測定は，試験紙，内部底面を金コロイドで覆ったウェル及び専用の希釈液を用いる．ウェル中に希釈液50 μLを正確に添加し，ピペッティングにて金コロイドを剥がして混合する．試料溶液50 μLを正確に加えて混合したのち，試験紙をウェル中の溶液に浸し，5分間静置して吸収，反応させる．試験紙を取り出し，コントロールラインとテストラインを判別することにより結果を読み取る．テストラインが目視にて判別できるものを4 ppb未満と判断する．

2.2. 機器分析による試験法

アフラトキシンは蛍光物質であるため蛍光検出器にて測定できるが，アフラトキシンB_1及びG_1は有機溶媒中での蛍光強度が得にくい物質であるため，アフラトキシンB_1及びG_1の蛍光強度を増加させる誘導体化操作が必要となる．誘導体化の方法として，フォトケミカルリアクターによる誘導体化法，トリフルオロ酢酸による誘導体化法，電気化学的誘導体化法等が用いられる．なお，いずれの誘導体化法操作でもアフラトキシンB_2及びG_2は誘導体化されない．以下に示す試験法は，日本薬局方に収載されている一部のエキス剤又は軟エキス剤において適用できると確認された方法である[11)]．本法はあくまで例示であり，その他の適切な条件の適用を妨げるものではない．

(ⅰ) 試料溶液の調製

均一に粉砕した試料約1 gを精密に量り，アセトニトリル／水／メタノール混液(6：4：1) 4 mLを正確に加え，試料が分散するまで振り混ぜた後，30分間振り混ぜ，遠心分離し，上澄液を分取する．この液2 mLを正確にとり，ポリソルベート20 (4 %)リン酸塩緩衝塩化ナトリウム溶液を加えて50 mLとする．この液をイムノアフィニティカラム(使用直前にリン酸塩緩衝塩化ナトリウム試液を流して調整したもの)に入れる．ポリソルベート20 (0.01 %)リン酸塩緩衝塩化ナトリウム溶液10 mL，水10 mLの順にカラムを洗い，次にアセトニトリル1 mL

を注入して5分間静置した後，アセトニトリル2 mLで溶出させる．溶出液は窒素気流下で溶媒を留去し，残留物に薄めたメタノール(7→10) 0.5 mLを正確に加えて試料溶液とする．このとき試料溶液0.5 mL中の試料量は0.5 g相当である．

（ⅱ） 測定方法及び評価方法

分離にはODSカラムを用いる．アフラトキシンの蛍光は励起波長365 nm，蛍光波長450 nmで検出できるため，蛍光検出HPLC法を用いる．アフラトキシンB_1及びG_1の誘導体化にはトリフルオロ酢酸を用いる．移動相として水／メタノール／アセトニトリル混液(6：3：1)を用いた場合，アフラトキシンG_1誘導体，B_1誘導体，G_2，B_2の順に検出する．継続的にアフラトキシン試験を実施する際は，トリフルオロ酢酸による誘導体化ではなく，カラムと蛍光検出器の間にフォトケミカルリアクターを連結したポストカラム誘導体化が便利である．この場合の検出順は，アフラトキシンG_2，G_1誘導体，B_2，B_1誘導体となる．本法によりアフラトキシンを定量するとき，各アフラトキシンの濃度が0.5～20 μg/Lのアフラトキシン溶液を試料溶液と同様の溶解溶媒にて数点調製し，必要範囲の直線性を検証することが必要である．

3. 標準溶液及び試薬・試液

本試験には，日本薬局方に規定するもののほか，以下の標準溶液及び試薬・試液を用いる．

（ⅰ） ポリソルベート20 (4 %)リン酸塩緩衝塩化ナトリウム溶液　塩化ナトリウム8.0 g，塩化カリウム0.2 g，リン酸水素二ナトリウム十二水和物2.9 g，リン酸二水素カリウム0.2 g及びポリソルベート20 40 gを水900 mLに溶かした後，必要ならば0.1 mol/L塩酸試液又は希水酸化ナトリウム試液でpH 7.4に調整後，水を加えて1000 mLとする．2～8 ℃で保存する．

（ⅱ） ポリソルベート20 (0.01 %)リン酸塩緩衝塩化ナトリウム溶液　塩化ナトリウム8.0 g，塩化カリウム0.2 g，リン酸水素二ナトリウム十二水和物2.9 g，リン酸二水素カリウム0.2 g及びポリソルベート20 0.1 gを水900 mLに溶かした後，必要ならば0.1 mol/L塩酸試液又は希水酸化ナトリウム試液でpH 7.4に調整後，水を加えて1000 mLとする．2～8 ℃で保存する．

（ⅲ） アフラトキシン溶液　アフラトキシン標準原液の一定量をとり，アセトニトリル又はメタノールを用いて希釈したもの．アフラトキシン標準原液は，正確に濃度調製された市販標準原液を使用する．

4. 注意事項

（ⅰ） アフラトキシンは強い発がん物質であるため，取扱いに注意する必要がある．特に高濃度のアフラトキシンを扱うときは，最大限の注意を払う．操作時には，実験衣，手袋，眼鏡，マスク等の保護具を着用すること．また，アフラトキシン溶液を取扱う際には局所排気装置を用いることが望ましい．

（ⅱ） 使用した器具は廃棄，洗浄する前に次亜塩素酸ナトリウム溶液に2時間以上浸漬すること．次亜塩素酸ナトリウム溶液は次亜塩素酸ナトリウム〔CAS No. 10022-70-5〕を水に溶かし0.5～1.0 %に調整したものである．市販の消毒用又は食品添加物規格の次亜塩素酸ナトリウム溶液を濃度調整した後，利用することもできる．

（ⅲ） アフラトキシン溶液は，遮光して保冷庫内で保管する．市販のアフラトキシン原液は定められた保管条件にて保管すること．

（ⅳ） ガラス等の容器にアフラトキシンが吸着する場合がある．この場合，シラン処理した容器(使用前に薄めたアセトニトリル(1→5)等で洗浄し，乾燥させたもの)を用いることが望ましい．

（ⅴ） イムノアフィニティカラムは，使用前にカラム中のゲルに気泡や亀裂が生じていないことを確認し，気泡や亀裂が生じている場合には，カラム上部から加圧し除去すること．

（ⅵ） イムノアフィニティカラムを使用する際，必要に応じて添加回収試験などにより性能を確認すること．

（ⅶ） 試料溶液の調製において，イムノアフィニティカラムではなく，複数の担体混合物を充填したカラムを使用する場合，イムノアフィニティカラムと同等の試験結果が得られることをあらかじめ添加回収試験などにより検証しておくことが必要である．

5. 参考文献

1) IARC, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Volume 82.

2) FAO, FAO food and nutrition paper 81, Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003 (2004).

3) 平成23年3月31日，食安発0331第6号.

4) Trucksess M., J. AOAC Int. 89 (3), 624-630 (2006).

5) Cavit Bircan, Int. J. Food Science and Technology 40, 929-934 (2005).

6) Halil Tosun and Recep Arslan, The Scientific World Journal (2013).

7) 平成23年8月16日，食安発0816第2号.

8) European Pharmacopoeia 8.0 (2013), 2.8.18. Determination of Aflatoxin B_1 in herbal drugs.

9) US Pharmacopeia 37 (2014), 〈561〉 Articles of botanical origin.

10) WHO, WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues.

11) 平成23年8月16日，食安監発0816第7号.

12) 佐久間久子，他.，生薬学雑誌68 (2)，53-57 (2014).