

紅麹サプリメントによる健康被害の原因物質である プベルル酸の HPLC 測定

佐多建一・大木望・坂本智徳

福岡市保健環境研究所保健科学課

Report on HPLC Measurement of Puberulic Acid, a Substance Responsible for Health Hazards Caused by Red Yeast Rice Supplements

Kenichi SATA, Nozomi OKI and Tomonori SAKAMOTO

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

要約

令和6年3月に紅麹サプリメントによる健康被害が報告された。当初は原因物質が不明であったが、9月に紅麹サプリメントの製造段階で混入した青カビが産生したカビ毒であるプベルル酸が原因物質であると断定された。そこで、福岡市内で新たな健康被害が発生した場合の検査体制確立を目指し、高速液体クロマトグラフによる分析法の検討を行った。分析機器はフォトダイオードアレイ検出器付き高速液体クロマトグラフを用いることとし、公知情報を参考に、溶離液及び試験溶液の調製方法の検討を行った。その結果、検量線は0.25～50 µg/mLの範囲で良好な直線性が得られ、健康食品検体を用いたプベルル酸の添加回収試験でも約75%の回収率が得られた。

Key Words : プベルル酸 puberulic acid, 青カビ *Penicillium. adametzioides*, 機能性表示食品 functional labeling food, 高速液体クロマトグラフ high performance liquid chromatograph (HPLC)

1 はじめに

令和6年3月、紅麹を原料とする機能性表示食品について健康被害が報告された¹⁾。当初は原因物質が不明であったが、4月に厚生労働省から、紅麹サプリメントの製造段階で混入した青カビが産生したカビ毒であるプベルル酸が原因である可能性が高いと発表され、9月に原因物質であると断定された²⁾。

プベルル酸は、昭和7年に最初の報告がされた比較的古い物質であるが、学術情報³⁾が少なく、健康被害が報告された当初は標準品も市販されておらず、分析は困難な状況であった。令和6年6月に国内の企業からプベルル酸の標準品が発売されたことを受け、福岡市内で新たな健康被害が発生した場合の検査体制確立を目指し分析法の検討を行ったので、その結果を報告する。

2 方法

2.1 標準品・試薬等

プベルル酸標準品：長良サイエンス（株）製

プベルル酸標準原液：プベルル酸標準品をメタノールで希釈し標準原液（1000 µg/mL）を調製した。

メタノール：富士フイルム和光純薬（株）製 LC/MS 用を用いた。

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物：（株）同仁化学研究所製

リン酸二水素ナトリウム無水物：富士フイルム和光純薬（株）製

ギ酸：富士フイルム和光純薬（株）製 LC/MS 用を用いた。

超純水：水道水を超純水製造装置で処理したもの（比抵抗>18.2 MΩ・cm, TOC<5 ppb）を用いた。

1 mmol/L EDTA+24 mmol/L NaH₂PO₄ 水溶液：エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物を 372.24 mg, リン酸二水素ナトリウム無水物を 2.88 g 量り、超純水に溶解し 1000 mL とした。

1%ギ酸含有メタノール：ギ酸 2 mL をメタノールに溶解し 200 mL とした。

2.2 装置・器具等

超純水製造装置：オルガノ（株）製 PURELAB flex-UV

蒸留水製造装置：アドバンテック東洋（株）製 RFD240NA

HPLC-PDA：Thermo Fisher Scientific 社製 Vanquish Duo HPLC

分析カラム：GLサイエンス社製 Inertsil ODS-SP, 2.1 $\phi \times 150$ mm, 5 μ m

2.3 測定条件の検討

長良サイエンス（株）から提供された測定条件を基に溶離液の水系：溶媒系の割合を検討した。フォトダイオードアレイ検出器付き高速液体クロマトグラフ（以下、「HPLC-PDA」とする。）で測定した測定条件を表1及び表2に示す。プベルル酸標準原液をメタノールで希釈した標準溶液（10, 50, 100 μ g/mL）を試験溶液とした。

表1 測定条件1

カラム温度	40℃
移動相 A	1 mmol/L EDTA + 24 mmol/L NaH ₂ PO ₄ 水溶液
移動相 B	メタノール
移動相混合比率	A液：B液＝95：5
流速	0.2 mL/min
注入量	2 μ L
サンプル温度	4℃
測定波長	270 nm

表2 測定条件2

カラム温度	40℃
移動相 A	1 mmol/L EDTA + 24 mmol/L NaH ₂ PO ₄ 水溶液
移動相 B	メタノール
移動相混合比率	A液：B液＝50：50
流速	0.2 mL/min
注入量	2 μ L
サンプル温度	4℃
測定波長	270 nm

2.4 抽出条件の検討

本市内を流通していた、いわゆる健康食品（錠剤）を粉砕し、均質化したものを添加ブランク試料とした。1%ギ酸含有メタノールで抽出した試験溶液を作製し、表1の条件を使用しHPLC-PDAにて測定した。

2.4.1 試料試験溶液

試料 100 mg を 15 mL 遠沈管に採取し、1%ギ酸含有メタノール 5 mL を加え、5 分間超音波抽出後、1%ギ酸含有メタノールで 10 mL に定容した。さらに 5 分間超音波抽出後、3000 $\times$ g で 10 分間遠心分離した。上清をメタノールで 20 倍希釈後、メンブランフィルターでろ過したもの

のを試験溶液とした。フローチャートを図1に示す。

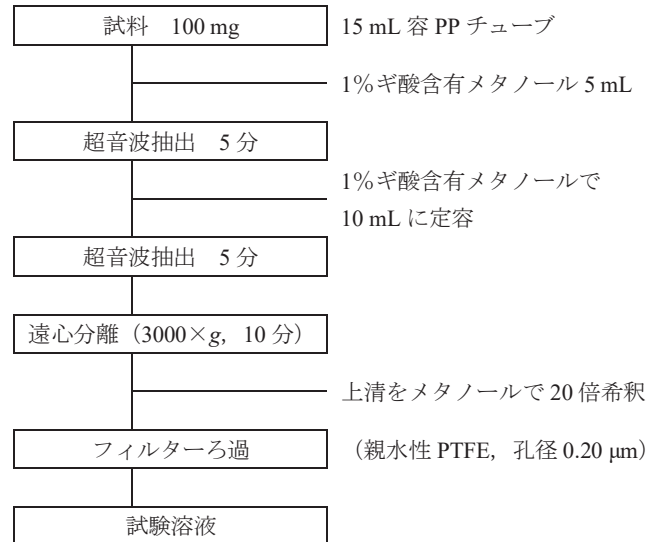


図1 抽出操作のフローチャート

2.4.2 添加回収試験溶液

試料 100 mg に 2 μ g/mg 相当（測定値として 1 μ g/mL 相当）となるようにプベルル酸標準溶液（1000 μ g/mL）を 200 μ L 添加した試料を作製し、2.4.1 に従い試料試験溶液と同様に操作したものを添加回収試験溶液とし、2 併行で実施した。

2.4.3 検量線の作成及び定量

プベルル酸標準溶液 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 50 μ g/mL を HPLC で測定し、得られたクロマトグラムのピーク面積を用いて、絶対検量線法により検量線を作成し定量値を算出した。

2.4.4 測定方法

HPLC-PDA の測定条件は表1のとおりである。

3 結果及び考察

3.1 測定条件の検討

はじめは水と有機溶媒のみで移動相を検討したが、テリングが非常に大きく適切なピークにならなかった。原因として、プベルル酸は構造中に水酸基を多く有するため、分析系中の金属イオンへの吸着が考えられた。プベルル酸の構造式を図2に示す。そこで、移動相を酸性にし、EDTA を加えて金属イオン吸着の抑制を試みた。表1、表2の測定条件で HPLC 測定した結果をそれぞれ

示す(図3, 図4)。

表1の測定条件では、保持時間5.2分付近にピークが検出され、表2の測定条件では、保持時間2.3分付近にピークが検出された。表1の測定条件が保持時間も長く、安定して測定できると考えられた。

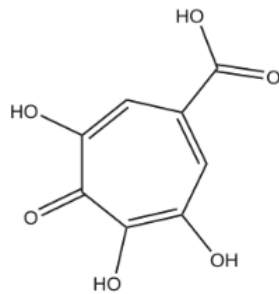


図2 プベルル酸の構造式

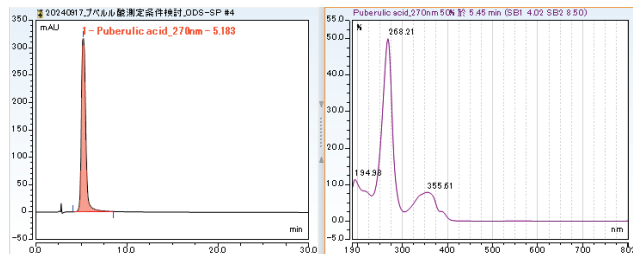


図3 水系：溶媒系=95：5クロマトグラム（100 ppm）
及びスペクトル

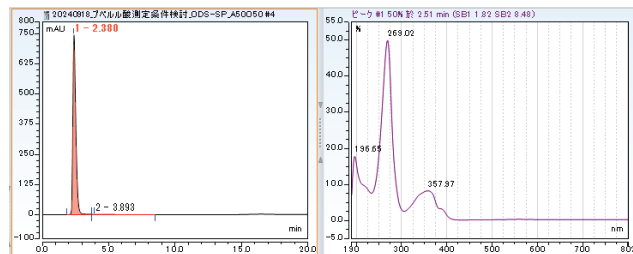


図4 水系：溶媒系=50：50クロマトグラム（100 ppm）
及びスペクトル

3.2 抽出条件の検討

はじめにメタノールのみで抽出を試みた結果、プベルル酸のピークは検出されなかった。原因として3.1と同様に試料中の金属イオンの影響が考えられたため、抽出液にギ酸を添加することとした。

2.4.1に従い作製した試験溶液で添加回収試験を行った結果、保持時間5.1分にプベルル酸のピークが検出さ

れ、回収率は74.5%及び75.9%であった。得られたクロマトグラムを図5に示す。また、検量線については、決定係数0.99以上の良好な直線性が得られた(図6)。

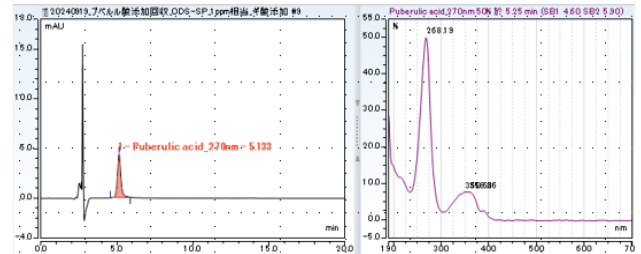


図5 1%ギ酸含有メタノールで抽出した試験溶液の
クロマトグラム

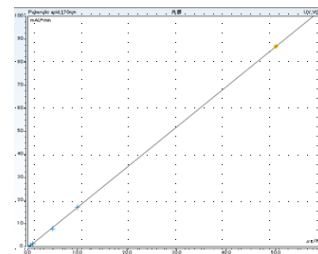


図6 検量線

4 まとめ

本市内においてプベルル酸による新たな被害疑いが発生した場合の検査体制確立に向け、HPLC-PDAによる測定を行った。その結果、移動相にEDTAを添加することで検量線は0.25～50 µg/mLの範囲で良好な直線性が得られ、ギ酸を加えたメタノールで抽出することにより健康食品検体を用いたプベルル酸の添加回収試験で約75%の回収率が得られた。

文献

- 1) 健生食監発 0326 第6号：紅麹を含むいわゆる健康食品の取扱いについて、令和6年3月26日
- 2) 厚生労働省公表資料：小林製薬社製の紅麹を含む食品の事案に係る取組について、令和6年9月18日
- 3) 木村 真, 他：紅麹サプリメントから検出されたプベルル酸に関する学術情報, *JSM Mycotoxins*, 74 (2), 59～64, 2