

いわゆる健康食品中に含まれる医薬品成分の一斉分析法の検討

岩本 安未*¹ 林 貴寛*² 長谷川富子 橋本 和久
佐々木珠生 石村 勝之 光野 幸一 末田 義博*³
吉岡 嘉暁*³ 笠間 良雄

健康食品中の痩身および強壯用医薬品成分 14 成分について、TLC, HPLC, LC/MS/MS を用いた一斉分析法を検討した。検討方法は、スクリーニング、確認において十分な特異性が得られ、定量性においても検量線直線性および直線範囲、および添加回収とも良好な結果であった。以上の結果から、本分析法は検討した 14 成分等において有効な試験法となると考えられた。

キーワード：健康食品, 痩身・強壯医薬品, 一斉分析法, TLC, HPLC, LC/MS/MS

はじめに

近年の健康ブームにより、何らかの健康機能をうたった食品が数多く市場に流通している。さらに最近では、インターネットやドラッグストア等で簡単にそのような健康食品を入手でき、海外からの個人輸入も可能となっている。しかしそれらの中には、効果をあげるため医薬品成分を添加したものもあり、重篤な健康被害や、一部の健康食品では死亡事例も出てきている^{1)~3)}。広島市内においても、無承認無許可医薬品摂取による被害が報告されている。

そこで、健康被害事例の多い痩身、強壯成分である、フェンフルラミン、タダラフィル等 14 成分について、一斉分析法を検討したので報告する。

方法

1 標準品

センノシド A (Sen. A), センノシド B (Sen. B), N-ニトロソフェンフルラミン (N-Fen), ヒドロクロチアジド (Hyd), フェノールフタレイン (Phe), フェンフルラミン塩酸塩 (Fen), フロセミド (Fur), シブトラミン塩酸塩一水和物 (Sib), リドカイン (Lid) は和光純薬工業 (株) 製, マジンドール (Maz) は SIGMA 社製, タダラフィル (Tad), バルデナフィル塩酸塩 (Var) は Tront Research Chemicals Inc. 社製, ヨヒンビン塩酸塩 (Yoh)

は関東化学 (株) 製, ビサコジル (Bis) は (財) 日本公定書協会製を用いた。また, メタノール, アセトニトリルは HPLC 用 (関東化学 (株) 製) を用い, その他の試薬, 試液は特級以上のものを使用した。標準原液は, Sen. A, Sen. B については炭酸水素ナトリウム溶液 (1→100)⁴⁾, その他の成分についてはメタノールを用い, 各々 1000mg/L に調製した。試験に用いる標準溶液は適宜各移動相 A 液およびメタノールで希釈した。

2 分析方法

(1) 試料溶液の調製

試料は粉末とし, 約 1/2 用量を量りとり, 70% メタノールを 10ml 加えた後 15 分間超音波抽出した²⁾。3000rpm で 10 分間遠心分離した後, 上清を分取し, 0.45 μm メンブランフィルターでろ過したものを試験原液とした。さらに HPLC 用移動相 A 液で 10 倍に希釈したものを HPLC 用試験溶液とし, LC/MS/MS 用移動相 A 液で約 100ppb に希釈したものを LC/MS/MS 用試験溶液, 試験原液 5ml を濃縮乾固した後 0.5ml のメタノールに溶解したものを TLC 用試験溶液とした。なお, N-Fen は光に不安定であるとの報告から, 使用器具は褐色とした⁵⁾。

(2) TLC 条件

薄層板: MERCK 社製 Silicagel60 F254, スポット量: 5 μl, 展開溶媒: 酢酸エチル: メタノール: 25%アンモニア (85:10:5), 検出方法: UV254nm, 365nm 照射, ドラージェンドルフ試薬+10%硫酸噴霧

*1: 現 健康福祉局保健部環境衛生課

*2: 現 環境局産業廃棄物指導課

*3: 退職

表 1 TLC 試験結果 (n=5)

成分名	平均 Rf 値	相対標準偏差 (%)	UV254nm	UV365nm	ドラーゲンドルフ試薬 +10%硫酸
Hyd	32	6.0	+	-	-
Sen. A, B	0	-	+	-	-
Lid	75	0.9	+	-	+
Yoh	59	2.1	+	+	+
Var	38	4.3	+	+	+
Maz	47	3.7	+	-	+
Fen	54	4.7	+	-	+
Fur	3	14	+	-	-
Bis	78	1.5	+	-	+
Phe	50	5.7	+	-	-
Tad	58	0.9	+	-	+
Sib	85	0.8	+	-	+
N-Fen	79	1.4	+	-	+

展開溶媒：酢酸エチル：メタノール：25%アンモニア (85:10:5) * +：検出，-：不検出
 スポット量：5 μ l 溶液濃度：1000ppm 温度：22 \pm 1 $^{\circ}$ C 湿度：45 \pm 10%RH

(3)HPLC/PDA 条件

装置：(株)島津製作所製 LC-20AB 型ポンプ，同 SPD-M20A 型フォトダイオードアレイ検出器，同 DGU-20A5 型デガッサー，同 SIL-20AC 型オートサンプラー，同 CTO-20AC 型恒温槽により構成されたもの，カラム：Waters 社製 XTerraPhenyl (4.6mmi. d. \times 150mm, 3.5 μ m)，カラム温度：40 $^{\circ}$ C，流速 0.5ml/min，検出：PDA 200~400nm，試料注入量：20 μ l，移動相：A 液-アセトニトリル/水/リン酸 (100:900:1, 5mmol/l ヘキサンスルホン酸ナトリウム含有)，B 液-アセトニトリル/水/リン酸 (900:100:1, 5mmol/l ヘキサンスルホン酸ナトリウム含有)，グラジエント条件：0 分 (A:B=90:10) \rightarrow 25 分 (A:B=55:45) \rightarrow 37-42 分 (A:B=10:90) \rightarrow 43-50 分 (A:B=90:10)，定量波長：220nm (Fen のみ 210nm)

(4)LC/MS/MS 条件

装置：LC 部分は (3) と同様，質量分析計部分は Applied Biosystems 社製 API4000 を使用，カラム：関東化学(株)製 Mightysil RP-18 (2mmi. d. \times 150mm, 3 μ m)，流速：0.2ml/min，試料注入量：10 μ l，移動相 A 液-0.1% 酸溶液，B 液-0.1% 酸アセトニトリル，測定モード：MRM-IDA-PI，カラム温度，グラジエント条件については HPLC/PDA と同様に行った。

結果と考察

1 TLC によるスクリーニング条件の検討

健康食品中に添加される医薬品成分は製品ごとに異なっており，多種にわたっている。このため，構成成分全体の概要を捉え得る TLC が，HPLC スクリーニング前のプレスクリーニングとして有効である^{6),7)}。TLC においては，目的成分の Rf 値が適度に分かれ，何らかの形で視覚的に検出されることが必要である。医薬品成分の極性を考慮し酢酸エチル-メタノール系の展開溶媒⁷⁾を用いて，温度湿度一定のもと，14 成分について Rf 値の検討を行った (表 1)。Rf 値は適度にわかれ，再現性も良好であったため，本条件を TLC 条件とした。検出方法は，対象成分全てがその構造中に共役二重結合を持つことから，まず UV254nm 照射を試みたところ，全ての物質において検出が可能であった。さらに，2 物質において 365nm 照射での発光も認められた。また，ほとんどの成分が構造中に窒素を含むことから，ドラーゲンドルフ試薬での検出も行うこととした。その際 10%硫酸も追って噴霧することにより色調を強めた²⁾。これらの方法を組み合わせることで，全成分について 500ng/スポット以上の感度が得られた。これは一番薬効量の低い Maz (1 日 1 回 0.5mg)⁸⁾を基準にしても，

表 2 LC/MS/MS MRM-IDA-PI 条件

成分名	MW	プレカーサー イオン(m/z)	プロダクト イオン(m/z)	MS/MS パラメーター(eV)			Ion source parameter
				DP	CE	CXP	
Lid	234	235	58	56	51	10	Curtain Gas:20 Ion Source Gas1:70 Ion Source Gas2:40 Ion Spray Voltage:5500 Temperature:600 Collision Gas:7
			86		29		
Yoh	354	355	144	101	41	10	
			212		33		
Var	489	489	151	146	67	14	
			72		93		
Maz	285	285	44	61	30	15	
			102		79		
Fen	231	232	159	51	31	12	
			109		63		
Bis	361	362	184	71	37	12	
			167		77		10
Phe	318	319	225	81	31	16	
			115		77		6
Tad	389	390	268	56	19	20	
			169		51		12
Sib	280	280	125	56	35	10	
			139		23		10
N-Fen	260	261	159	56	29	10	
			187		17		14
Hyd	298	296	269	-65	-28	-13	Curtain Gas:20 Ion Source Gas1:60 Ion Source Gas2:30 Ion Spray Voltage:-4500 Temperature:600 Collision Gas:8
			205		-34		
Sen. B	863	861	224	-125	-84	-11	
			386		-56		
Sen. A	863	861	224	-110	-104	-11	
			386		-54		
Fur	331	330	286	-50	-22	-11	
			206		-30		

IDA:Exclude former target ions:for 10 (sec) after 1 occurrence PI scan time:0.20(sec)

注 : DP : Declustering Potential(eV) CE : Collision Energy(eV) CXP : Collision Cell Exit Potential(eV)

その 5 分の 1 を検出できる感度であり、スクリーニングとしては十分であると考えられた。

2 HPLC/PDA によるスクリーニング条件の検討

健康食品においては、既存の物質の構造を少し変化させた構造類似成分もしばしば検出されているため、西條らの報告⁹⁾を基に、HPLC/PDA を用いた二次スクリーニング条件を検討した。Fen と Fur の分離が不十分であったため、流速を変更し分離を改善した。また、試料溶媒に 100%メタノールを用いたところ Hyd のピークに頭割れが見られたため(図 1)、試料溶媒を溶離液に変更し、ピーク形状を改善した。この条件で、14 成分および健康食品に含有されている可能性のある保存料等 20 成分の PDA スペクトルをライブラリ登録し、実試料測定時のスクリーニングが効率的に行えるようにした。スペクトルが確認できることを条件としたとき、検出限界は、0.1ppm であった。

3 LC/MS/MS による確認試験の条件検討

LC/MS/MS では、TLC および HPLC/PDA スクリーニングで検出された成分の同定を想定し、条件を検討した。まず各成分の標準溶液をインフュージョン測定し、各種パラメータを最適化すると共にプレカーサーイオン、2つのプロダクトイオンを決定した。ポジティブモードについて

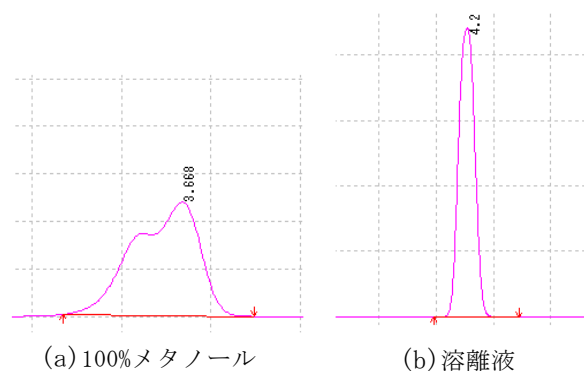


図 1 試料溶媒によるピーク形状の違い

は Maz, ネガティブモードについては Sen. B の条件をベースにし, フローインジェクションアナリシス (FIA) を行った (表 2)。MRM 測定だけでは最終同定できかねる場合を想定し, MRM 測定を行いながら CE を 2 段階にふり Product ion scan を行えるメソッドを, 今後新たな測定対象成分を導入していくことを考慮しポジティブ, ネガティブ別に作成した。このメソッドを用い, 健康食品試料に混合標準液を 100ppb になるよう添加したサンプルを測定したところ, MRM, Product ion scan 共に良好な同定が可能であった。

4 HPLC/PDA による定量試験の検討

スクリーニング条件と同条件で, 定量分析が可能かどうか検討した。健康食品試料にそれぞれの標準物質を 50 μg 添加し窒素を吹き付け乾燥させた後, 2(1)の方法で試料溶液を調製し, 添加回収試験を行った。回収率, 相対標準偏差 (%) 共に良好であった (表 3)。検量線は 0.5~10ppm の範囲で作成し, r²=0.999 以上の直線性が得られた。これらの結果から, 同条件で定量分析も可能であると考えられた。以上の結果をもとに, 分析フローを作成した (図 2)。

5 実試料の測定

Yoh が 9.95mg 含有表示 (一回 2 カプセル中) された試料を, 分析フローをもとに測定した。

試料採取 (1/2用量)

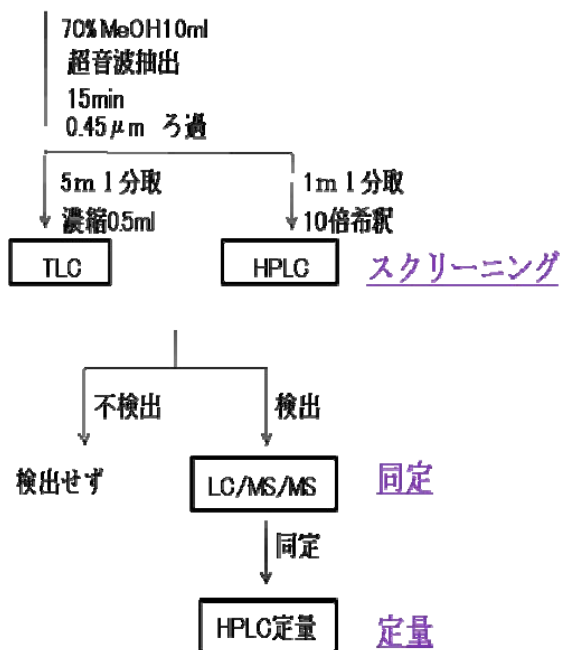


図 2 分析フロー

表 3 HPLC による添加回収試験結果

成分名	保持時間 (分)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
Hyd	6.8	100	2.5
Sen. B	7.9	94	1.6
Sen. A	10.2	93	1.9
Lid	10.9	120	3.2
Yoh	14.5	101	5.8
Var	15.1	98	5.3
Maz	16.0	101	6.6
Fen	17.2	98	0.9
Fur	19.5	106	4.1
Bis	19.9	114	0.7
Phe	22.2	97	1.1
Tad	24.6	96	2.7
Sib	25.4	92	8.6
N-Fen	32.8	88	6.3

TLC においては, UV 照射で, Yoh 標準溶液と同一 Rf 値の箇所他にもいくつか吸収スポットが認められた。これは試料中の夾雑成分に UV 吸収を持つものがあつたためと考えられた。続いてのドラージェンドルフ試薬+10%硫酸噴霧では, Yoh 標準溶液と同一の箇所のみ発色が認められた (図 3)。HPLC でのスクリーニングでは, Yoh 標準溶液と同一 RT の箇所にピークが認められ, スペクトルも一致した (図 4)。スペクトル登録した他 13 医薬品成分は認められず, 他のピークも確認されなかったため, 本試料に含有されている医薬品成分は Yoh のみと考えられた。LC/MS/MS の MRM-IDA-PI 測定で同定し (図 5), HPLC で定量した (表 4)。全フローを通して, 良好な測定結果が得られた。



図 3 TLC ドラージェンドルフ試薬+10%硫酸

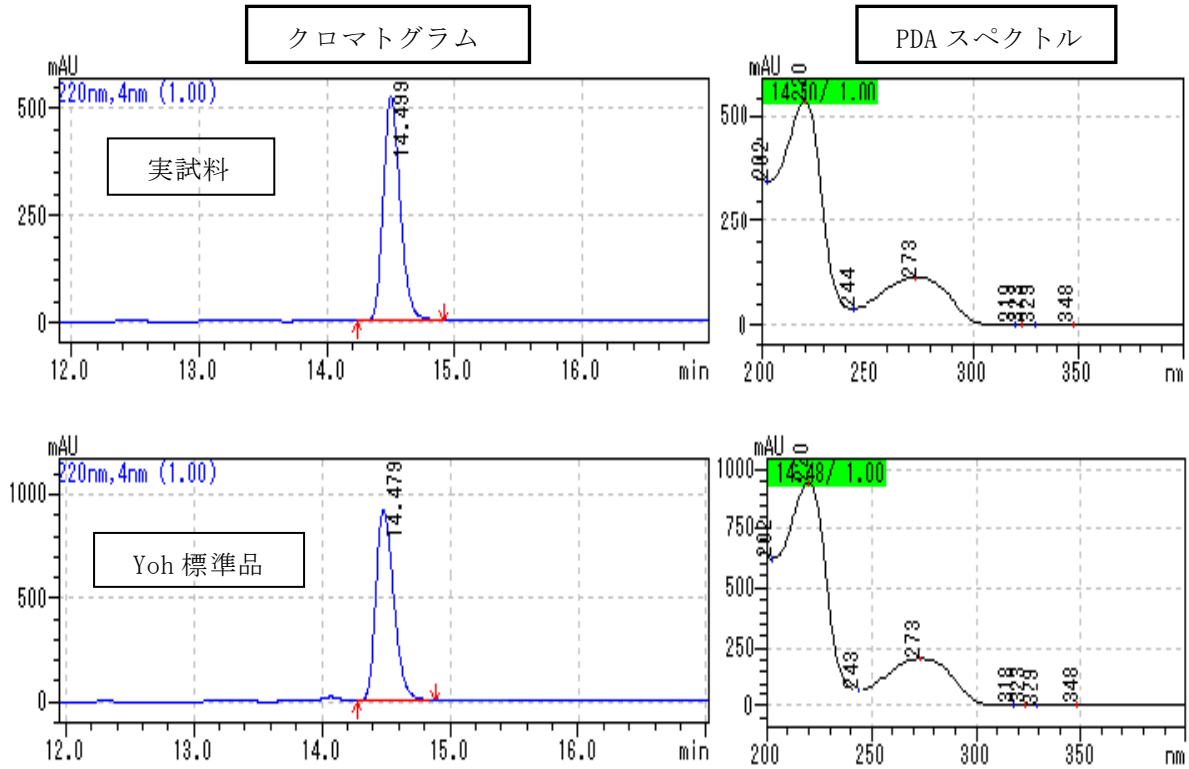


図4 実試料のHPLCスクリーニング結果

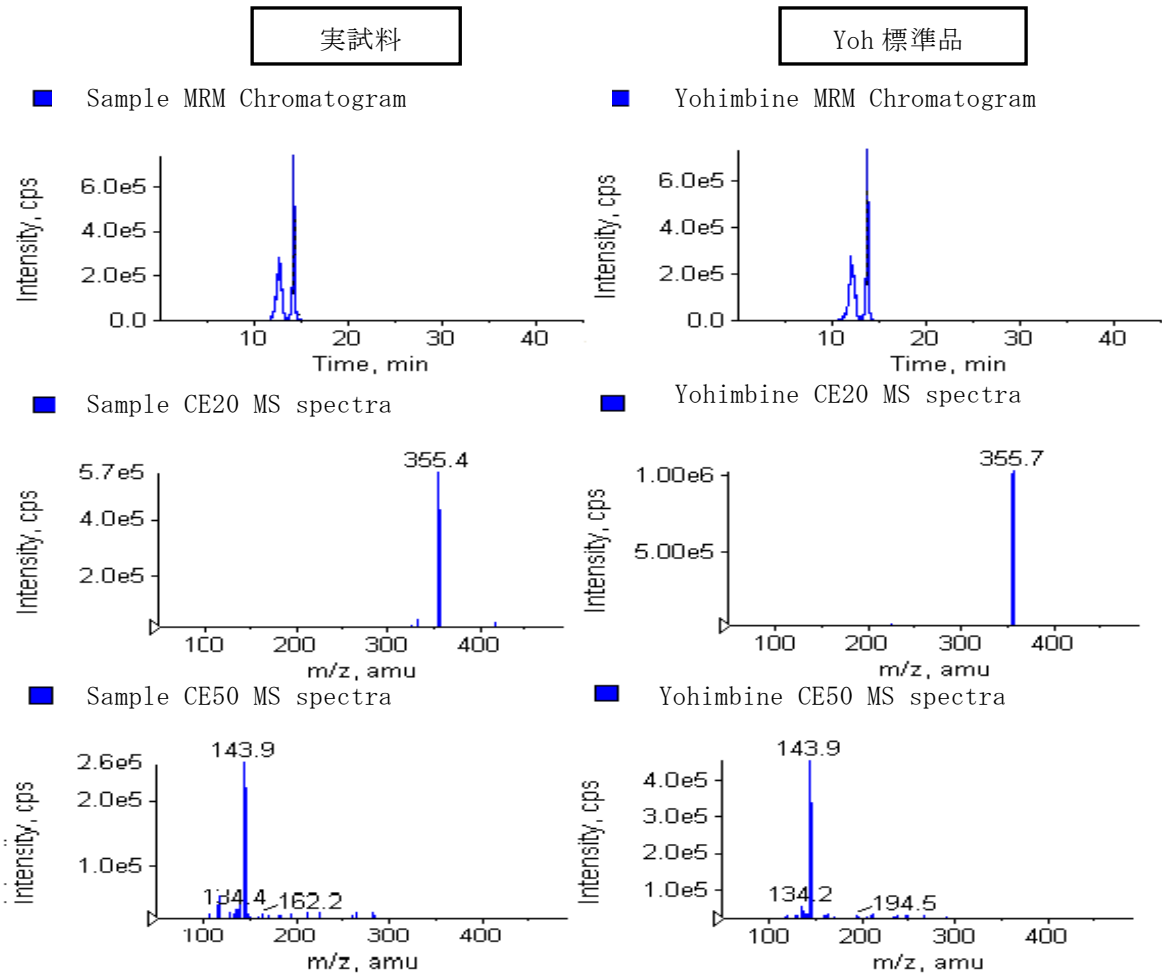


図5 実試料のLC/MS/MSによるMRM-IDA-PI分析結果

表 4 Yoh 検体の定量結果

検 体	Yoh(mg/用量)
カプセル 1	9.9
カプセル 2	9.1
カプセル 3	10.8
カプセル 4	11.2
カプセル 5	9.8

以上の結果から、本一斉分析法は、検討した 14 成分に対して有効な分析方法となると考えられた。

文 献

- 1) 浜野朋子 他：痩身を標榜する健康茶から検出された医薬品成分について，東京衛研年報，52，43-47 (2001)
- 2) 守安貴子 他：ダイエット健康食品中に含有される医薬品の検索法と健康被害を起こした「天天素清脂胶囊」への適用，東京健安研七報，56，81-86 (2005)
- 3) 厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課報

道発表資料：中国製ダイエット用健康食品による健康被害事例等，2003年5月30日

- 4) 小山和志 他：LC/MS/MSによる「いわゆる健康食品」中の痩身薬の分析，長野県環境保全研究所研究報告，6，21-26 (2010)
- 5) 伊達英代 他：ダイエットを目的とした健康食品中に含まれる医薬品成分の液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計(LC/MS/MS)による迅速分析法，薬学雑誌，128 (5)，811-817 (2008)
- 6) 熊坂謙一 他：薄層クロマトグラフィーを活用した医薬品成分を含有する健康食品の分析，Chromatography，28，37-42 (2007)
- 7) 栗田浩幸 他：いわゆる健康食品中の医薬品成分の二次元展開 TLCによるスクリーニング試験，薬学雑誌，128(3)，487-493 (2008)
- 8) サノレックス錠 0.5mg 添付書 2009年10月改訂 (第10版)
- 9) 西條雅明 他：「いわゆる健康食品」中の医薬品成分分析について (第2報)，千葉県衛研年報，56，55-59 (2007)