

LC/MSによる痩身用健康食品中未承認医薬品の一斉分析法について

赤城理恵 味戸一宏 金成徹 川田好徳 鈴木昭彦 竹村悦子 斎藤和男
理化学グループ

要 旨

健康食品中において痩身目的で使用された報告例のある 10 成分（シブトラミン，センノシド A，センノシド B，N-ニトロソフェンフルラミン，ピサコジル，ヒドロクロロチアジド，フェノールフタレイン，フェンフルラミン，フロセミド，マジンドール）について LC/MS による一斉分析法を検討した。

本法で添加回収試験を実施したところ，概ね良好な結果が得られ，痩身用健康食品中の未承認医薬品の検査に適用可能であることが明らかとなった。

キーワード LC/MS，健康食品，痩身，未承認医薬品

はじめに

近年，食生活の乱れによる栄養の偏り，食生活の多様化，肥満や生活習慣病の増加等により国民の健康に対する関心が高まるなか，食品に対して健康に関する効果を求めるニーズが増えており，その求められる食品機能も多様化してきている¹⁾。

その一方で，中国製ダイエット用健康食品をはじめとする痩身を目的としたいわゆる健康食品中から医薬品成分が発見され薬事法違反に問われたり，その摂取による重篤な健康被害事例が報告されるなど，大きな社会問題となっている。

本県でも平成 17 年 5 月にネットオークション等で入手した中国製ダイエット食品である「天天素清脂こう囊」により 13 名の健康被害が発生し，検査を実施したところ医薬品成分であるマジンドール，シブトラミンと発ガン性のあるフェノールフタレインが検出された。

痩身を目的としたいわゆる健康食品と称する未承認医薬品の分析法については，厚生労働省より個別に通知されているものもあるが，抽出法，分析条件等が異なり，多成分を分析するには手間がかかる。

そのため，今回健康危機管理対策の一環として痩身を目的とした健康食品中に含まれる

医薬品成分等について迅速に分析するため，

LC/MS による一斉分析法を検討したので報告する。

方 法

1 試料

行政検査で搬入された健康食品（医薬品成分不検出確認済み粉末）A，B を試料とした。

2 試薬および標準品

1) 試薬

- (1)アセトニトリル：HPLC 用
- (2)水：HPLC 用
- (3)メタノール：HPLC 用
- (4)ぎ酸：HPLC 用
- (5)ぎ酸アンモニウム：試薬特級
- (6)炭酸水素ナトリウム：試薬特級
- (7)酢酸：試薬特級
- (8)50mM ぎ酸アンモニウム 0.5%ぎ酸水溶液
- (9)0.1%炭酸水素ナトリウム溶液
- (10)0.1%酢酸メタノール溶液

2) 標準品

- (1)シブトラミン塩酸塩：国立医薬品食品衛生研究所より分与
- (2)センノシド A：和光純薬 生薬試験用
- (3)センノシド B：和光純薬 生薬試験用
- (4)N-ニトロソフェンフルラミン：和光純薬

薬理研究用

- (5)ピサコジル：シグマ社 試薬
- (6)ヒドロクロロチアジド：ICN Biomedicals Inc. 試薬
- (7)フェノールフタレイン：和光純薬 試薬 特級
- (8)フェンフルラミン：和光純薬 生化学用
- (9)フロセミド：和光純薬 生化学用
- (10)マジンドール：シグマ社 試薬

3) 標準品の調製

(1)標準原液

- ①センノシド A, センノシド B [1000 μ g/mL] : 各 10mg を 0.1%炭酸水素ナトリウム溶液 10mL に溶かす.
- ②ピサコジル [1000 μ g/mL] : 10mg を 0.1%酢酸メタノール溶液²⁾ 10mL に溶かす.
- ③シブトラミン, N-ニトロソフェンフルラミン, ヒドロクロロチアジド, フェノールフタレイン, フェンフルラミン, フロセミド, マジンドール [1000 μ g/mL] : 各標準品 10mg をメタノール 10mL に溶かす.

(2)混合標準液

(1)①, ②, ③を混合し, メタノールで適宜希釈する.

3 装置

高速液体クロマトグラフ：Waters2695
 フォトダイオードアレイ：Waters2996
 質量分析計：WatersZQ4000 (ESI)

4 試料溶液の調製

香川県環境保健研究センターの方法に準じた³⁾.

錠剤, 顆粒剤等は乳鉢で粉末状とし 50mg を秤量し, メタノール 10mL 加え, 超音波下 20 分抽出を行う. 3000 回転で 5 分間遠心分離後上清を分取し, 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とする.

検量線範囲に入らない場合は, メタノールで適宜希釈する.

結果

1 HPLC 分析条件の検討

緊急に分析を行う場合, HPLC で分析を実

施する場合も考えられるため, まず HPLC 分析条件を検討した.

Atrantis dc18(3.0mm i.d. \times 150mm 膜圧 3 μ m)カラム [Waters 社製] を使用し, 移動相には水-アセトニトリル系を用いた.

移動相中の濃度が 0.1%ギ酸, 10mM ギ酸アンモニウムになるようにそれぞれ添加し, 流速, グラジエント条件を変化させて, 10 成分が 30 分以内に分離する条件を検討してみたが, 全成分を完全に分離することができなかった.

0.1%ギ酸と 10mM ギ酸アンモニウムを比較すると, センノシド A, B やフロセミド, シブトラミン等で大きく溶出時間が変化した. そのためこれらを 1:1 の比率で混合し 0.05%ギ酸 5mM ギ酸アンモニウムになるように添加してみたところ良好に分離した.

分析条件を以下に示す.

- 1) カラム：Atrantis dc18(3.0mm i.d. \times 150mm 膜圧 3 μ m) [Waters 社製]
- 2) 移動相
 A 液：アセトニトリル
 B 液：50mM ギ酸アンモニウム 0.5%ギ酸
 C 液：水
- 3) グラジエント条件：
 A : B : C = 10/10/80 \rightarrow (20min) 75/10/15
 (20.01 ~ 45min)10/10/80
- 4) 流速：0.6mL/min
- 5) カラム温度：40 $^{\circ}$ C
- 6) 注入量：10 μ L
- 7) 測定波長：UV210nm
- 8) PDA 条件：200 ~ 400nm

2 LC/MS 条件の検討

LC 条件は HPLC 条件のカラムと流速のみを変えて検討した.

また, 各標準液ごとにフローインジェクションを行い MS スペクトルを測定し, ESI (\pm) で, [M+H]⁺または [M-H]⁻モニターイオンの強度が顕著になるコーン電圧を選択した. 脱 N-ジメチルシブトラミンについては, 標準品入手が出来ないため通知のスペクトルを参考に 252 [M+H]⁺をモニターイオンに加え, 合わせてモニターすることとした.

分析条件を以下に示す。

- 1) カラム：Inertsil ODS-3 (2.1mm i.d. ×150mm, 膜圧 5µm) [GLサイエンス社製]
- 2) 移動相
 - A 液：アセトニトリル
 - B 液：50mM ギ酸アンモニウム 0.5%ギ酸
 - C 液：蒸留水
- 3) グラジエント条件：
 - A : B : C = 10/10/80 →(20min) 75/10/15
 - (20.01 ~ 45min)10/10/80
- 4) 流速：0.2mL/min
- 5) カラム温度：40℃
- 6) 注入量：10µL
- 7) MS スペクトルの測定条件 (表 1)
- 8) PDA 条件：200 ~ 400nm
- 9) 定量試験：LC/MS(SIM)でピーク面積による絶対検量線法で行う。
- 10) 定性試験：標準品とモニターイオン及び保持時間が一致し、かつ定量下限値以上のピークが検出された場合は、標準品と試験品の PDA スペクトルが一致することを確認する。

表 1 MS 測定条件

成分名	測定イオン (m/z)	イオン電圧 (V)
ヒドロクロロシアジド	296 [M-H] ⁻	-40
セノシト A, B	861 [M-H] ⁻	-30
マジンドール	285 [M+H] ⁺	40
フェンフルラミン	232 [M+H] ⁺	30
ビスコジル	362 [M+H] ⁺	30
フロセト	329 [M-H] ⁻	-30
シブトラミン	280 [M+H] ⁺	20
フェノールフタレイン	319 [M+H] ⁺	30
N-ニトロフェンフルラミン	261 [M+H] ⁺	15
脱 N-ジメチル シブトラミン	252 [M+H] ⁺	20

3 試料の安定性について

分析に要する時間が 1 検体 45 分と比較的長く、標準液、試料調製から分析まで 24 時間以上になる場合もあるため 9 時間後 30 時間後の標準液の面積値を比較した。オートサンプラー内温度は 4℃で実施した。

その結果 30 時間後ではマジンドールで 36%、シブトラミンで 29%面積値の減少が見られた。その他の標準品では ±10%以内であったが、経時的に面積値の変化が見られたため標準液と試料を交互注入し、検量線作成と試料注入の間隔を短くすることとした。

4 検量線及び定量下限値

HPLC で混合標準液 2 ~ 50µg/mL の範囲で検量線を作成したところ相関係数 0.99 以上と良好な直線性を示した。

定量下限値は 0.4mg/g であった。

LC/MS では 0.05 ~ 2µg/mL の範囲で検量線を作成したところ、感度が高いマジンドール、フェンフルラミン、ビスコジルは高濃度側で傾きが小さくなる二次曲線となったため、これら 3 成分については検量線範囲を低濃度側の 0.005 ~ 0.2µg/mL にしたところ、相関係数が 0.99 以上で良好な直線性が得られた。

本法による定量下限値はマジンドール、フェンフルラミン、ビスコジルは 0.001mg/g、その他は 0.01mg/g であった。

医薬品成分の効能効果を示すためにはある程度高濃度で添加されていることが推測されることから、本分析法は検査に十分対応できるものと思われる。

5 添加回収試験

検体 0.050g に 100µg/mL (マジンドール、フェンフルラミン、ビスコジルは 10µg/mL) 混合標準液を 100µL 添加し添加回収試験を実施した。その結果を表 2 に示す。

検体 B ではマトリックスの影響により回収率の高い成分があったが、マトリックススタンダード (マトリックスで希釈した標準液) で再測定したところ概ね良好な回収率が得られた。

実際の検査で定量する場合は、成分の含有量が多いため、かなり希釈が必要となり、それほどマトリックスの影響は受けないと推測される。

表 2 添加回収試験結果 (N=3)

	検体 A		検体 B		検体 B (マトリックススタンダード)	
	回収率 (%)	変動係数 (%)	回収率 (%)	変動係数 (%)	回収率 (%)	変動係数 (%)
ヒドロクロチアジド	114.4	0.4	136.7	13.8	103.2	13.7
センシト B	83.8	2.3	85.4	2.2	91.4	4.5
センシト A	91.9	4.3	84.7	5.0	91.2	4.8
マジントール	113.2	2.4	252.7	11.1	100.7	11.1
フェンフルラミン	110.5	2.5	231.7	11.2	102.7	11.9
シブトラミン	104.4	1.5	149.3	8.0	116.7	9.9
フロセチド	118.8	0.4	175.2	6.6	106.0	6.9
フェノールブタレイン	91.5	7.0	206.3	19.1	86.9	9.2
ビスコジル	122.7	2.9	123.0	9.5	98.3	7.4
N-ニトロソフェンフルラミン	104.7	6.0	153.2	13.3	92.4	9.6

6 市販痩身用健康食品検査

H18 年度医薬品含有 (疑い) 食品等検査で買い上げた 1 製品について検査した結果は、10 成分いずれも検出されず、測定を妨害する夾雑物も認められなかった。

まとめ

LC/MS による痩身を目的とした健康食品中に含まれる未承認医薬品 (10 成分) の一斉分析法を検討した。

添加回収試験ではマトリックスの影響により回収率の高い成分があったが、マトリックススタンダードで定量することにより概ね良

好な結果が得られた。本法を痩身用健康食品

中の未承認医薬品等の検査に適用可能であることが明らかとなった。

本法はメタノール抽出のみの簡易な前処理のため、健康食品中の医薬品成分の迅速かつ確かな検出という目的には適した分析法である。

しかしマトリックスの影響を受けることもあることから、検出が認めれた場合の定量については HPLC を併用するなど工夫が必要と思われる。

引用文献

1) 厚生労働省医薬局長通知。「健康食品」に係る制度の見直しについて。薬食発第 0201001 号, 平成 17 年 2 月 1 日。

2) 森田邦生, 毛利隆美, 中川礼子. 健康食品中のビスコジルの HPLC 分析. 福岡県保健環境研究所年報 2005 ; 32 : 64-68.

3) 西岡千鶴, 千田有美, 安永恵, 他. 香川県において脱法ドラッグ等から検出された医薬品成分について. 第 42 回全国衛生化学技術協議会年会講演集 2005 ; 242-243.