

健康食品に添加されていた経口血糖降下薬グリベンクラミドの検出事例

熊坂謙一,* 小島 尚, 土井佳代, 佐藤修二

Analysis of the Oral Hypoglycemic Agent, Glibenclamide, in a Health Food

Kenichi KUMASAKA,* Takashi KOJIMA, Kayo DOI, and Shuji SATOH

Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, 1-3-1 Shimomatiya, Chigasaki City 253-0087, Japan

(Received August 7, 2003; Accepted October 3, 2003)

Glibenclamide, a sulfonylurea derivative (SU) antidiabetic agent was detected in a health food by three different methods: TLC, HPLC, and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). For analysis of SU antidiabetics, the sample was extracted with acetone as a sample solution. TLC analysis of the sample solution showed a specific spot that had the same characteristics as those of glibenclamide standard solution. HPLC analysis monitored using a photo-diode array detector showed that the sample solution had a peak with a unique UV spectrum, with coincided with that of standard glibenclamide. In sample solution, LC-MS analysis in positive and negative modes indicated that the $(M+H)^+$ and $(M-H)^-$ ions occurred at m/z 494 and m/z 492, respectively. These results indicate that the monoisotopic mass is 493, coincident with that of glibenclamide. Quantitative HPLC analysis showed that the glibenclamide content in the health food was 0.78 mg/capsule (1.55 mg/g of sample contents). Because the initial dosage of glibenclamide for diabetics is 1.25—2.5 mg per day, this health food has sufficient medicinal effect and also has the potential to cause adverse effects.

Key words—glibenclamide; sulfonylurea derivatives; health food; TLC; HPLC; liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)

緒 言

近年、健康食品への医薬品の添加・混入事例が多数報告されている。例えば、いわゆる痩身用健康食品から下剤であるセンナの検出、¹⁾ 食欲抑制作用を持つフェンフルラミンの検出、²⁾ 強壮強精を謳った健康食品よりバイアグラの成分であるシルデナフィルの検出、³⁾ 鎮痛及び抗炎症作用を持つステロイドホルモンの検出⁴⁾などが挙げられる。このような医薬品の添加は、製品に標榜した効果を増強するためと思われるが、場合によっては服用による思わぬ副作用を引き起こす恐れがある。最近の事例では、痩身効果を謳った中国製健康食品の服用による大規模な健康被害が引き起こされた。この原因として、フェンフルラミンの誘導体である N-ニトロソフェンフルラミン及び医薬品である甲状腺粉末などが添加されていたことが判明している。この被害が拡大してしまった要因として、主な原因となった N-ニト

ロソフェンフルラミンがデザイナーズドラッグと言われるような新規化学物質であったこともさることながら、添加されていた製品は、食品としてインターネット及び一般販売店などを介して誰でも容易に入手できること、また、天然成分配合といった製品の広告及び漢方・生薬に対する安全であるというイメージにより服用しやすいことも影響していると考えられる。

このような健康被害を未然に防止することを目的に、神奈川県においても衛生部薬務課及び衛生研究所が協同して健康食品への医薬品の添加の有無について調査を行っており、その一環として、血糖降下作用を謳った健康食品についても医薬品添加の有無を調査している。現在までに7検体について調査しており、対象とした医薬品成分は、経口血糖降下薬としてスルホニル尿素系血糖降下薬 (SU 剤) が汎用されていること、また、平成 10 年の厚生労働省の発表では、個人輸入した健康食品より SU 剤の一種であるグリベンクラミド (Fig. 1) が検出され、健康被害が引き起こされていることから、今回は代

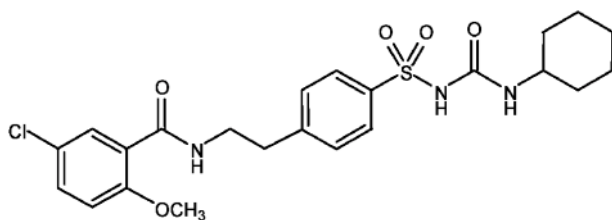


Fig. 1. The Structure of Glibenclamide

表的な SU 剤であるグリベンクラミド、トルブタミド、クロルプロパミドの添加の有無について分析を行った。

SU 剤の分析方法としては、血清などの臨床的なサンプルの測定において、固相抽出による前処理及び液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC-MS) を用いた方法等が報告されている。⁵⁻⁷⁾ しかし、今回は検体に含まれる成分を目視しやすく、また、試験の実施が比較的簡易である TLC をスクリーニング法として使用し、さらに HPLC 及び LC-MS により確認・定量分析を行った。その結果、1 検体よりグリベンクラミドが添加された製品が確認されたので報告する。

試験方法

1. 検体 グリベンクラミドが検出された検体はうすい褐色透明のカプセルタイプの製品であり、一粒の質量は約 0.6 g であった。内容物は褐色の粉末であり、平均内容物質量は約 0.5 g であった。検体の原材料名は苦瓜抽出物、ゼラチン、カラメル色素、摂取の目安は 1 日 4 粒から 6 粒と記載されていた。また、外箱等に「糖バランス」といった標榜がされていた。

2. 試薬及び器材 標準品として用いたグリベンクラミド及びトルブタミドはシグマ・アルドリッチ、クロルプロパミドは和光純薬よりそれぞれ購入した。また、アセトニトリルは HPLC 用を用い、他の試薬は市販の特級品を使用した。薄層板はメルク製 precoated HPTLC silicagel 60 F₂₅₄ を、シリンジフィルターは DISMIC-13HP (孔径 0.45 μm , アドバンテック) を用いた。

3. TLC 分析条件 展開溶媒は 1-プロパノール/クロロホルム/薄めたアンモニア試液 (4→5) (11 : 7 : 2) 混液 (展開溶媒 A) 及び酢酸エチル/メタノール/シクロヘキサン/アンモニア水 (28) (6 :

2 : 1 : 1) 混液 (展開溶媒 B) を用いた。薄層板へのスポット量は試料溶液 4 μl 及び標準溶液は 2 μl とした。検出は、展開終了後に薄層板を風乾したのち、紫外線 254 nm 照射 (検出条件 1)、ドラーゲンドルフ溶液噴霧 (検出条件 2)、薄層板に 30% 硫酸エタノール溶液を噴霧したのち 1 分程度加熱し、紫外線 254 nm 照射 (検出条件 3) により行った。

4. HPLC 装置及び条件

4-1. HPLC 装置 Agilent 1100 シリーズ (クオータナリーポンプ, カラムヒーター, オートサンプラー, デガッサー, DAD 検出器, Chemstation データ処理システム) を用いた。

4-2. HPLC 条件 Hsieh らの報告⁵⁾ 及び米国薬局方「Glyburide」⁸⁾ を参考に設定した。カラムは Inertsil ODS-3 (粒径 5 μm , 4.6 mm ϕ × 150 mm, ジーエルサイエンス) を用い、カラム温度は 40°C, 移動相は 20 mM 酢酸アンモニウムを含むアセトニトリル/水混液 (50 : 50, v/v), 流量は 0.8 ml/min とした。また、検出器はフォトダイオードアレイを用い、測定波長域 190 nm—400 nm, 定量波長 254 nm で測定した。なお、注入量は 10 μl とした。

5. LC-MS 装置及び条件

5-1. LC-MS 装置 Agilent 1100 シリーズ (バイナリーポンプ, カラムヒーター, オートサンプラー, デガッサー, 質量分析計 1100MSD 及び Chemstation データ処理システム) を用いた。

5-2. LC-MS 条件 カラムは Inertsil ODS-3 (粒径 3 μm , 2.1 mm ϕ × 150 mm, ジーエルサイエンス) を用い、カラム温度は 40°C とした。移動相は HPLC と同様の移動相を用い、流量は 0.2 ml/min とした。イオン化法は electrospray ionization (ESI), scan range は m/z: 100—700 とし, positive mode 及び negative mode で測定した。イオン化電圧は 100 V 及び 80 V とした。また、注入量は 5 μl とした。

6. TLC 用試料溶液及び標準溶液の調製 検体カプセル内容物 1.0 g を量り、アセトン 40 ml を加えて 10 分間振とうしたのち、3000 回転で 5 分間遠心分離した。この操作を遠心分離後の残渣について 2 回繰り返す。得られた上清を合わせて減圧留去したのち、残留物にアセトン 2 ml を加えて溶解し、試料溶液とした。また、標準溶液はグリベンクラミド、トルブタミド、クロルプロパミドをそれぞれ

れ 0.02 g 量り，アセトン 10 ml に溶解し，各標準溶液とした。

7. HPLC 及び LC-MS 用試料溶液及び標準溶液の調製 検体カプセル内容物約 0.5 g を精密に量り，TLC 用試料調製と同様にアセトン抽出を行った。得られたアセトン抽出液を減圧留去したのち，残留物に HPLC 用移動相を加え超音波をかけて溶解し，全量を 20 ml とした。この液をシリンジフィルターでろ過して試料溶液とした。標準溶液はグリベンクラミドを 105°C で 4 時間乾燥したのち，その約 0.01 g を精密に量り，HPLC 移動相を加えて溶かし正確に 100 ml とする。この溶液を HPLC 移動相で正確に希釈し，定性試験では約 30 µg/ml の標準溶液を調製した。また，定量試験では，10.0, 30.5, 50.7, 100.5 µg/ml の 4 段階の標準溶液を調製し，検量線は得られたピークの面積値より絶対検量線法により作成した。

8. HPLC による定量範囲の直線性及び再現性 10.0, 30.5, 50.7, 100.5 µg/ml の濃度のグリベンクラミド標準溶液を調製し，その 10 µl を HPLC に注入し，ピーク面積値を求めた。この操作を 3 回繰り返し，ピーク面積値の直線性について確認した。また，30.5 µg/ml 標準溶液を 6 回繰り返し注入し，その再現性を求めた。

結果及び考察

1. TLC による検討 TLC 法は実施が比較的簡易であり，スポットした溶液に含まれる成分の全容を一目で確認でき，また，多検体を同時に処理できることから，混入成分が不明確な検体のスクリーニング方法として汎用されている。そこで，今回の検討では，日本薬局方「グリベンクラミド」及び「アセトヘキサミド」の純度試験の展開溶媒⁹⁾を用いて試験を行った。

Figure 2 に展開溶媒 A 及び B におけるクロマトグラムを示す。検出条件 1 において，展開溶媒 A におけるグリベンクラミド，トルブタミド，クロロプロパミド各標準溶液のスポットの Rf 値は，それぞれ 0.48, 0.37, 0.37 であり，また，試料溶液において認められたスポットの Rf 値は 0.48 であった。このうち，グリベンクラミド及び試料溶液で確認されたスポットは検出条件 2 により黄赤色を呈し，検出条件 3 では青色蛍光を呈した。一方，展開溶媒 B

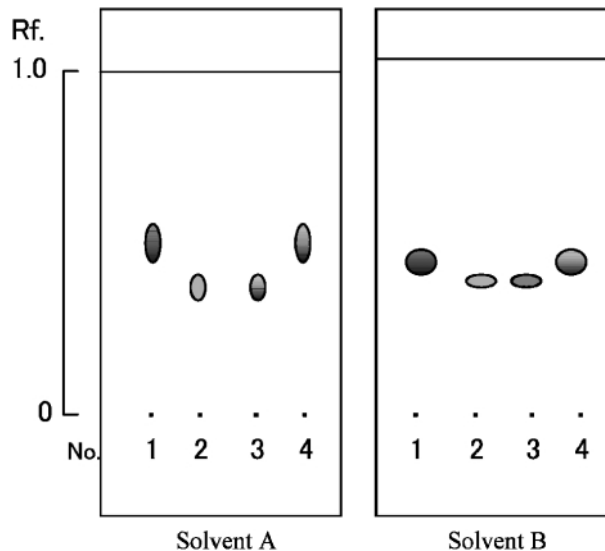


Fig. 2. Thin Layer Chromatograms of Glibenclamide in a Health Food under UV Irradiation at 254 nm

The TLC plates used HPTLC pre-coated silica gel F₂₅₄ (Merck). Solvent A is a mixture of 1-propanol, chloroform and diluted ammonia solution (11 : 7 : 2). Solvent B is a mixture of ethyl acetate, methanol, cyclohexane and 28% ammonia solution (6 : 2 : 2 : 1). 1: glibenclamide, 2: tolbutamide, 3: chlorpropamide, 4: sample solution. Each specific spot in glibenclamide (No. 1) and sample solution (No. 4) showed orange-color by spraying dragendorff reagent and blue fluorescence by spraying 30% sulfuric acid.

においても，試料溶液のスポットの Rf 値 (0.40) 並びにこのスポットの各検出条件における呈色は，グリベンクラミド標準溶液のスポット (Rf 値 0.40) と同一の挙動を示した。

以上の結果から，試料溶液には，グリベンクラミドと同一の挙動を示す成分の混入が疑われ，トルブタミド及びクロロプロパミドの混入の可能性はないものと考えられた。したがって，以下の検討ではグリベンクラミドの含有について検討することとした。なお，本試験条件における検出限界は，スポット量としてグリベンクラミドは約 0.1 µg，トルブタミド及びクロロプロパミドは約 0.4 µg であった。

2. HPLC による検討 第 14 改正日本薬局方⁹⁾参照紫外可視吸収スペクトル及び JPTI (日本薬局方技術情報) 2001¹⁰⁾には日本薬局方収載 SU 剤の紫外吸収スペクトルが示されている。グリベンクラミドは他の SU 剤とは異なり 300 nm 付近にも吸収が見られることから，HPLC の検討ではフォトダイオードアレイ検出器により，ピークの紫外吸収スペクトルについて検討した。その結果，グリベンクラミド標準溶液では保持時間 4.5 分付近にピークを認め，その紫外吸収スペクトルは 209 nm, 229

nm 及び 300 nm 付近に極大吸収を持ち、また、極小は 275 nm 付近であった。一方、試料溶液についても約 4.5 分にピークが認められ、その紫外吸収スペクトルはグリベンクラミド標準溶液の紫外吸収スペクトルと一致した (Fig. 3)。また、この時の検出限界は、UV スペクトルが明瞭に確認できる注入量として約 5 ng であった。

3. LC-MS による検討 TLC 及び HPLC で確認された成分について最終的に同定するため、LC-MS によりマススペクトルを測定した。測定においては、100 V 及び 80 V の 2 種類のイオン化電圧を用いた。これは、高イオン化電圧である場合、マススペクトルにおけるフラグメントイオンピークのイオン強度が相対的に強くなり、定性情報に優れるためである。一方、低イオン化電圧では、分子イオンピークのイオン強度が相対的に強くなり、ポジティブモード及びネガティブモードにおいてそれぞれ分子イオンピークを測定することにより、確実にピークのモノアイソトピック分子量を検証できるためである。

Figure 4 に示したとおり、グリベンクラミド標準溶液のトータルイオンクロマトグラムでは保持時間約 5.2 分にピークを認め、イオン化電圧 100 V では、ポジティブモードにおいて (M+H)⁺ に由来する分子イオンピーク m/z : 494 及びフラグメントイオンピーク m/z : 369 を認めた。このフラグメントイオンピークはアミノヘキシル部位が脱離したもの

であると考えられ、また、このマススペクトルは過去の報告⁵⁻⁷⁾と一致した。試料溶液でも保持時間約 5.2 分にピークを認め、そのマススペクトルは、分子イオンピーク m/z : 494 及びフラグメントイオンピーク m/z : 369 であり、両者のマススペクトルは一致していた。また、Fig. 5 に示したとおり、イオン化電圧 80 V では、試料溶液において、ポジティブモードでは (M+H)⁺ に由来する分子イオンピーク m/z : 494 を認め、ネガティブモードでは (M-H)⁻ に由来する分子イオンピーク m/z : 492 を認めた。このことは、そのピーク成分のモノアイソトピック分子量が 493 であることを示し、グリベンクラミドのモノアイソトピック分子量 493 と一致した。また、図には示していないが、グリベンクラミド標準溶液でも同様の結果を得た。以上の結果より、検体にはグリベンクラミドが添加されていることが明らかとなった。また、この時の検出限界は、絶対注入量として約 0.25 ng であった。

4. HPLC による定量範囲の直線性、再現性及び検体の分析結果 グリベンクラミド標準溶液のピーク面積値より検量線を作成したところ、測定した 10.0—100.5 µg/ml の範囲で良好な直線性を示し、相関係数は 0.999 以上であった。また、標準溶液の繰り返し注入時の相対標準偏差は 0.1% 程度と良好であった。検体中のグリベンクラミドの含有量について HPLC により 3 回測定した結果、カプセル内容物 1 g 当たり約 1.55 mg のグリベンクラミド

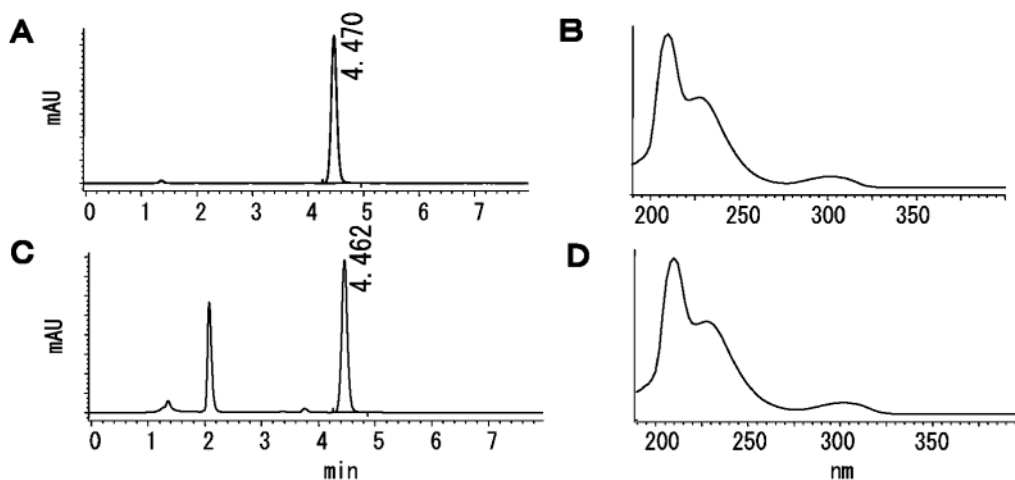


Fig. 3. High-Performance Liquid Chromatograms and UV Spectra of Glibenclamide

A and B show chromatogram of glibenclamide standard solution and UV spectrum, respectively. C and D show chromatogram of sample solution and UV spectrum, respectively. Rt: 4.5 min.

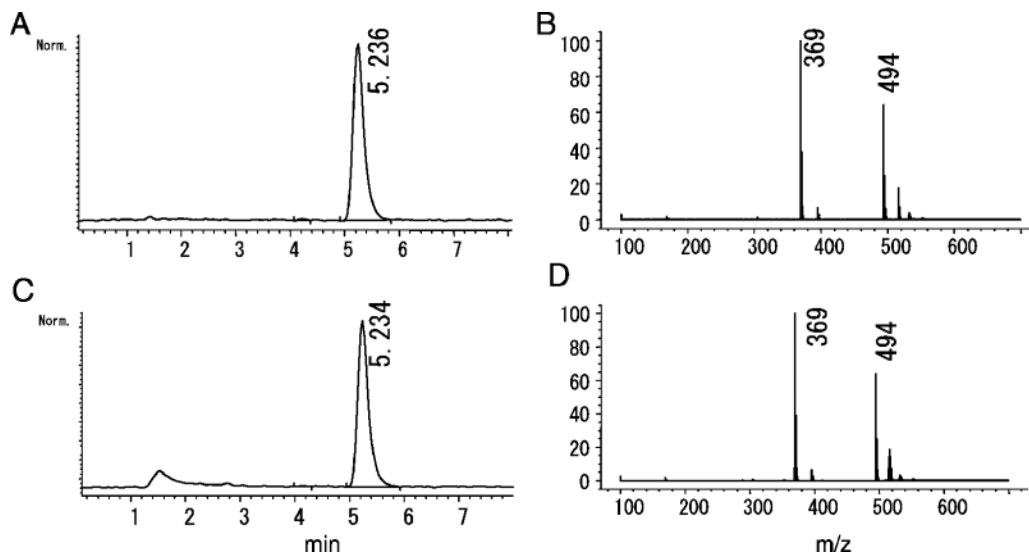


Fig. 4. Total Ion Chromatograms (TIC) and Electro spray Ionization Mass Spectra of Glibenclamide

A and B: glibenclamide standard solution TIC (A) and the mass spectrum (B), C and D: sample solution TIC (C) and mass spectrum (D). The ordinate represents the abundance of the ions in A and C, and the relative abundance of fragment ions [%] in B and D. Rt: 5.2 min.

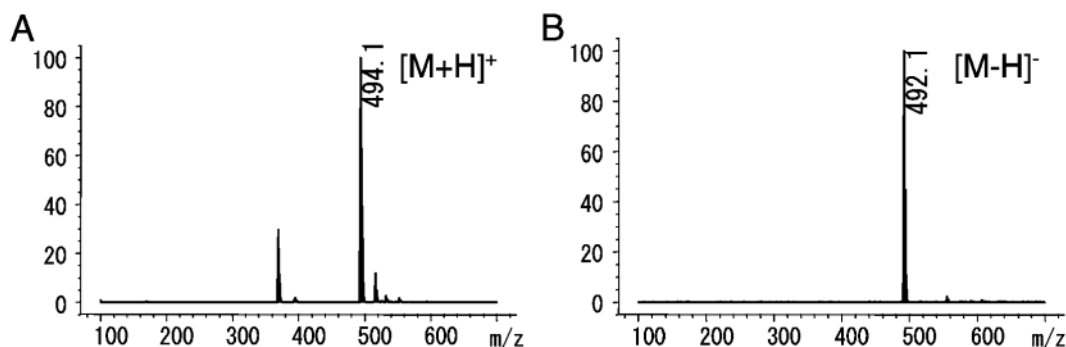


Fig. 5. Electro spray Ionization Mass Spectra of the Sample Solution in Positive and Negative Modes

A and B show mass spectra of the sample solution in positive and negative modes, respectively. The ordinate represents the relative abundance of fragment ions [%].

の含有を認めた。

結 論

検体について TLC, HPLC 及び LC-MS により試験を行った結果, グリベンクラミドの含有を認め, その含有量は, 1.55 mg/g であった. 検体 1 カプセル当たりの内容量がおおよそ 0.5 g であることから, 1 カプセル当たりのグリベンクラミド含有量は約 0.78 mg となる. また, 1 日量は 4—6 粒と記載されていたことから, グリベンクラミド量として 3.1—4.7 mg 程度となる. グリベンクラミドの糖尿病患者への 1 日投与量は初期量 1.25—2.5 mg, 最大 10 mg であることから, このカプセルは十分な薬効を持つものであった. グリベンクラミドは医師

の指示なしで服用すると低血糖症等重篤な副作用を引き起こしかねない医薬品である. 標榜した作用を増強させるために健康食品へ安易に医薬品成分を添加することは危険なことであり, 絶対に避けるべきことである. また, 健康危害防止のため, 消費者も由来の不明確な健康食品等の摂取を控えることが重要であると思われた.

謝辞 サンプルの収集にご尽力いただきました, 神奈川県衛生部薬務課, 芝頭三氏に感謝申し上げます. また, LC-MS の測定に際しご協力いただきました, 神奈川県衛生研究所理化学部, 甲斐茂美氏に感謝いたします.

REFERENCES

- 1) Kojima T., Kishi M., Sekita S., Satake M., *J. Food. Hyg. Soc. Jpn*, **41**, 303–306 (2000).
- 2) Doi K., Ohmori K., Kishi M., *Bull. Kanagawa. P. H. Lab.*, **30**, 20–22 (2000).
- 3) Moriyasu T., Shigeoka S., Kishimoto K., Ishikawa F., Nakajima J., Kamimura H., Yasuda I., *Yakugaku Zasshi*, **121**, 765–769 (2001).
- 4) Doi K., Kojima T., Ohmori K., Kishi M., Nakaoka T., *Bull. Kanagawa. P. H. Lab.*, **27**, 43–47 (1997).
- 5) Hsieh S., Selinger K., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **772**, 347–356 (2002).
- 6) Maurer H. H., Kratzsch C., Kraemer T., Peters F. T., Weber A. A., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **773**, 63–73 (2002).
- 7) Magni F., Marazzini L., Pereira S., Monti L., Galli Kienle M., *Anal. Biochem.*, **282**, 136–141 (2000).
- 8) USP-XXV, United State Pharmacopoeial Convention, 2002.
- 9) The Japanese Pharmacopoeia Fourteenth Edition, 2001.
- 10) The Japanese Pharmacopoeia Technical Information 2001, Jiho, Tokyo 2001.