

中国製ダイエット用健康食品中の *N*-nitrosfenfluramine の光学純度の決定中台亜里,^a 稲垣弘文,^a 南 正康,^a 高橋秀依,^b
南目梨江,^b 大沢基保,^b 池上四郎^{*,b}**Determination of the Optical Purity of *N*-nitrosfenfluramine
Found in the Chinese Slimming Diet**Ari NAKADAI,^a Hirofumi INAGAKI,^a Masayasu MINAMI,^a Hideyo TAKAHASHI,^b
Rie NAMME,^b Motoyasu OHSAWA,^b and Shiro Ikegami^{*,b}
*Department of Hygiene and Public Health, Nippon Medical School,^a 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku,
Tokyo 113-8602, Japan, and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University,^b
Sagamiko, Tsukui-gun, Kanagawa 199-0195, Japan*

(Received May 9, 2003; Accepted June 19, 2003)

From 2001 to the summer of 2002, more than 800 cases of liver damage were reported in Japan among people taking Chinese diet aids. The Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare has recently announced that *N*-nitrosfenfluramine was the hepatotoxic compound contained in the diet aids based on animal experiments performed by the National Institute of Health Sciences. Although *N*-nitrosfenfluramine is a derivative of fenfluramine, a previously used anti-obesity drug, neither pharmacologic nor toxicologic properties have been reported for *N*-nitroso fenfluramine.

It should be noted that *N*-nitrosfenfluramine has two optical isomers, although it is not yet known which isomer damages the liver and other organs. The Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare has not commented on this point. Pursuing this question, 10 types of Chinese slimming aid samples including those obtained from patients with fulminating hepatitis were analyzed by NMR, GC/MS, and a newly established HPLC method using a chiral separation column. It was found that the *N*-nitrosfenfluramine in all of the toxic diet aids was the (*S*)-isomer form. No (*R*)-isomer was detected. These results strongly suggest that the nitroso-compound in the diets must be prepared from pharmacologically active (*S*)-fenfluramine (dexfenfluramine). Thus the pharmacologic and toxicologic properties of each isomer should be investigated.

Key words—fenfluramine; anorectic drug; optical purity; chiral; Chinese diet; *N*-nitrosfenfluramine

緒 言

2001年から2002年夏にかけて、中国製ダイエット用健康食品による健康被害が相ついで報告され、社会問題にまでなったのは記憶に新しい。その主な被害は、劇症肝炎や急性肝炎など、重篤な肝障害であり、死者が出るまでに至った。既に厚生労働省は、問題のダイエット食品中から、3—5%の濃度で *N*-nitrosfenfluramine が検出されたことを報告している。さらに、その後行われた国立医薬品食品衛生研究所での動物実験の結果から、*N*-nitrosfenfluramine がこのような肝障害の原因であると断定され

た。

N-nitrosfenfluramine は食欲減退剤として知られる fenfluramine¹⁾ のニトロソ化体であるが、その薬理作用や毒性などについては、国立医薬品食品衛生研究所の検討以前には全く報告されていなかった。我々は、fenfluramine がキラルな分子であり、その *S* 体は食欲減退剤としての効果が高いと言う点に着目し、そのニトロソ化体である *N*-nitrosfenfluramine についても、存在する2つの光学活性体 *S* 体及び *R* 体のそれぞれに生物活性の差異が認められるのではないかと予想した。このような観点に基づき、先の国立医薬品食品衛生研究所の報告を詳細に検討したが、光学活性体の存在については全く言及されていなかった。そこで、*N*-nitrosfenfluramine の光学純度の決定法を新たに確立し、これを用い

^a日本医科大学衛生学公衆衛生学教室, ^b帝京大学薬学部創薬化学教室
e-mail: shi-ike@pharm.teikyo-u.ac.jp

て、今回肝障害の症状が現れた患者（内1人死亡）がそれぞれ服用していた中国製ダイエット用健康食品中の *N*-nitrosfenfluramine について、その光学純度の決定を行った。

実験の部

1. *N*-nitrosfenfluramine (1-ethyl-1-{1-methyl-2-[3-(trifluoromethyl)phenyl]ethyl}-2-oxohydrazine)

の合成 市販の fenfluramine 塩酸塩 38.1 mg (0.14 mmol) を 10 ml 飽和炭酸水素ナトリウム水に溶解した後、塩化メチレン 50 ml によって抽出した。得られた有機相を硫酸ナトリウムによって乾燥後、溶媒を留去して fenfluramine を得た。続いてこれに、亜硝酸ナトリウム 5 g を溶解した 10 ml 水溶液を加え、さらに濃塩酸 3 ml を、氷冷下ゆっくりと滴下した後、徐々に昇温し、室温にて反応を行った。1 時間後、ジエチルエーテル 100 ml を加え、抽出した。得られた有機相を硫酸ナトリウムによって乾燥後、溶媒を留去し、黄色の粗生成物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー [Silica Gel 60 N (spherical, neutral) 3 g, 酢酸エチル：ヘキサン=1：5] で分離精製し、目的とする *N*-nitrosfenfluramine を major 体と minor 体が約 6：1 の混合物としてほぼ定量的に得た。なお、major 体と minor 体の生成比については得られた混合物の ¹H-NMR を測定し、それぞれのメチレン基に対応するピークの積分値の比から求めた。

R_f : 0.22 (酢酸エチル：ヘキサン=1：5), ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) major δ: 7.58—7.45 (3H, m), 7.23—7.13 (2H, m), 4.41 (1H, sext, *J*=6.87), 3.43 (1H, sext, *J*=7.15), 3.14 (1H, sext, *J*=7.15), 2.99 (1H, dd, *J*=13.75, 8.24), 2.67 (1H, dd, *J*=13.75, 6.87), 1.22 (3H, d, *J*=6.6), 0.95 (1H, t, *J*=7.15), minor δ: 7.58—7.52 (3H, m), 7.30—7.16 (2H, m), 4.99 (1H, m, *J*=6.87), 3.68 (2H, m), 2.86 (1H, dd, *J*=13.75, 6.60), 2.43 (1H, dd, *J*=13.75, 8.24), 1.19 (3H, m), 0.95 (3H, m), ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): major δ: 12.6, 20.9, 39.7, 42.7, 61.6, 124.7, 126.7, 130.0, 133.5, 139.4, 139.4, 144.3, IR (neat) cm⁻¹: 1450, 1331, 1124. HRMS (FAB-NBA + NaI): 261.1217 (calcd for C₁₂H₁₆ON₂F₃: 261.1214).

2. 中国製ダイエット用健康食品からの *N*-nitrosfenfluramine の抽出 中国製ダイエット用健康

食品として用いたのは以下の 10 種類である。

御芝堂減肥こう囊（劇症肝炎発症後死亡した患者が服用）、御芝堂減肥こう囊（急性肝炎発症）、茶素こう囊（GTP がピーク時 1360）、茶素減肥（劇症肝炎で肝移植：飲んでいた錠剤と同時に購入した未開封のもの）、紆之素こう囊青・黄（急性肝炎発症）、茶素ダイエット、軽身減肥こう囊青・黄、及び中国で購入した御芝堂減肥こう囊。

それぞれのカプセル中の粉体を蒸留水に溶解後、ジエチルエーテルで抽出し、有機相を硫酸ナトリウムで脱水した。溶媒を留去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [Silica Gel 60 N (spherical, neutral), 酢酸エチル：ヘキサン=1：5] で高極性及び低極性の不純物から分離精製し、目的とする *N*-nitrosfenfluramine を得た。なお、得られた *N*-nitrosfenfluramine はすべてのスペクトルデータにおいて化学合成された標準サンプルと一致した。これを HPLC のサンプルとして分析した。

3. 装置及び分析条件

3-1. HPLC ポンプ PU-980, 検出器 UV-970 (日本分光工業株式会社製), カラム CHIRALPAK-AS (粒径 10 μm, 0.46×25 cm, DAISEL 社製), 溶離液 3% Isopropanol/Hexane, 流量 0.5 ml/min, 注入量 10 μl, 検出波長 254 nm.

3-2. GC/MS GC HP 5890 II plus, MS HP 5972 (Hewlett Packard 社製), カラム HP-5 Trace analysis (5% diphenyl and 95% dimethylpolysiloxane, 0.25 mm×30 m, Film Thickness: 0.25 μm).

3-3. 分析条件 温度条件カラムオープン 60°C (1 min)—(10°C/min)—150°C (5 min)—(20°C/min)—250°C (10 min)—(20°C/min)—280°C (3 min), 注入口 250°C インターフェイス 280°C, 流速 1 ml/min, 注入法 1：10 スプリット注入, キャリアガス He, イオン化法電子衝撃イオン化 (EI), イオン化エネルギー 70 eV, 測定モード *m/z* 30—500 SCAN モード.

結果及び考察

1. NMR, GC/MS による *N*-nitrosfenfluramine の決定 合成した *N*-nitrosfenfluramine を NMR, GC/MS を用いて解析した。GC/MS 分析による *N*-nitrosfenfluramine の保持時間とスペクトルを Fig. 1 に示す。*N*-nitrosfenfluramine のピークは 14.4

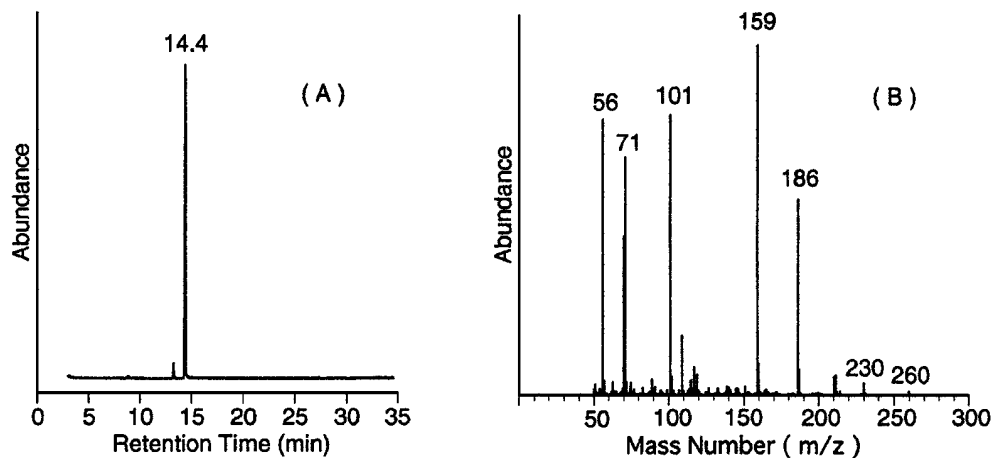


Fig. 1. GC/MS Total Ion Chromatogram (A) and Mass Spectrum (B) of *N*-nitrosfenfluramine

min に現れた。スペクトルは分子イオンである m/z 260, フラグメントイオンとしてニトロソ基が離脱した m/z 230, trifluoromethylbenzyl の m/z 159 などを示した。この結果を基に中国製ダイエット食品中の *N*-nitrosfenfluramine の存在の同定を行った。

2. HPLC による *N*-nitrosfenfluramine の光学純度の決定法の確立

2-1. ラセミ体 *N*-nitrosfenfluramine の分析

合成した *N*-nitrosfenfluramine (ラセミ体) を光学活性カラム (CHIRALPAK-AS) によって分析した (Fig. 2)。Fraction 1 (保持時間: 21 min, 24 min) と fraction 2 (保持時間: 29 min, 31 min) にそれぞれ一対のピークを認めた。Fraction 1 及び fraction 2 を分取し, GC/MS を用いて分析したところ, 両分画とも *N*-nitrosfenfluramine であることが確認された。*N*-nitrosfenfluramine にはニトロソ基のシス・トランス異性²⁾に由来すると推定される異性体があり, NMR によってもその存在が観察されている。したがって, fraction 1 及び fraction 2 に 2 本ずつ, 計 4 本存在するピークはそれぞれ *N*-nitrosfenfluramine の 4 つの異性体 (Fig. 3) に対応すると考えられる。Figure 2 に示されたように, 2 つの fraction それぞれにおいてほぼ 50 : 50 の面積比の 2 つのピークに分割されていることから, シス体及びトランス体についてそれぞれ光学分割がほぼ完全になされたと判断した。

2-2. 光学活性 *N*-nitrosfenfluramine の分析

次に, (±)-fenfluramine を常法³⁾に従って光学分割し, *S* 体が優先する光学活性 fenfluramine と *R* 体が優先する光学活性 fenfluramine を得た。⁴⁾ それぞ

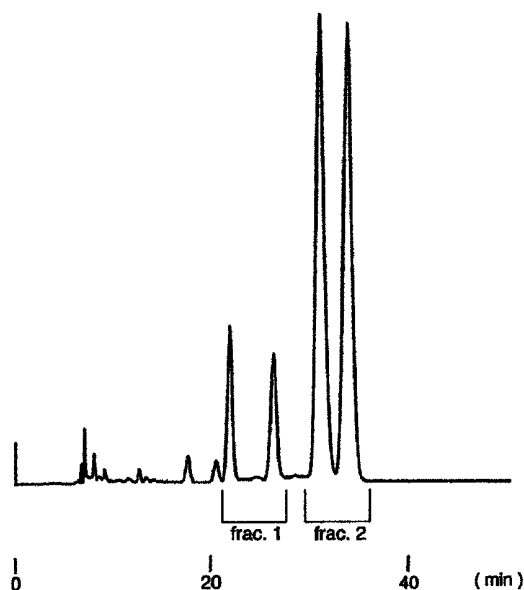


Fig. 2. HPLC Chromatogram of Racemic *N*-nitrosfenfluramine

れをニトロソ化し, *S* 体が優先する光学活性 *N*-nitrosfenfluramine (サンプル A) と *R* 体が優先する光学活性 *N*-nitrosfenfluramine (サンプル B) とした。これらサンプル A 及びサンプル B を 2-1. 項と同様に HPLC で分析した。

その結果, *S* 体が優先する光学活性サンプル A では, fraction 1 (保持時間: 21 min, 24 min) と fraction 2 (保持時間: 29 min, 30 min) ともに対になっている 2 つのピークのうちの前半に溶出するピーク (保持時間: 21 min, 29 min) の比率が高く, 後半に溶出するピーク (保持時間: 24 min, 30 min) の比率が低かった。したがって, 前半に溶出する

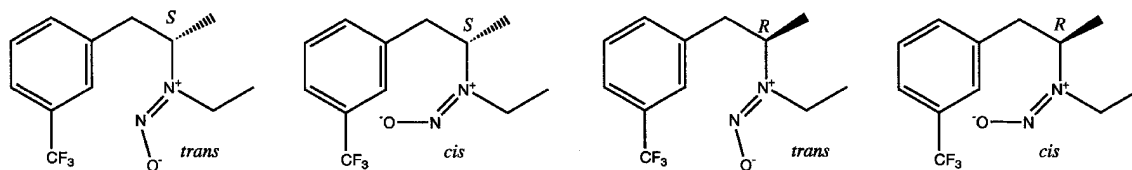
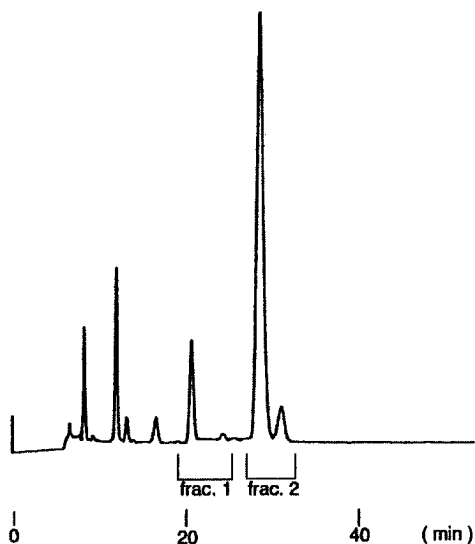
Fig. 3. Diastereomers of *N*-nitrosifenfluramine

Fig. 4. HPLC Chromatogram of Sample A

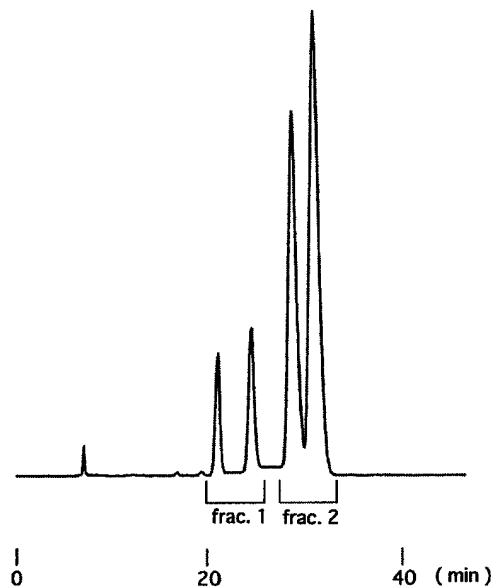


Fig. 5. HPLC Chromatogram of Sample B

ピーク（保持時間：21 min, 29 min）が *S* 体であると断定された (Fig. 4).

また、*R* 体が優先する光学活性サンプル B では、fraction 1（保持時間：21 min, 24 min）と fraction 2（保持時間：29 min, 30 min）とも対になっている 2 つのピークのうちの後半に溶出するピーク（保持時間：24 min, 31 min）の比率がラセミ体及びサンプル A と比較して増加していることから、後半に溶出するピークが *R* 体であると断定された (Fig. 5).

以上により、保持時間 21 min, 及び 29 min に (*S*)-*N*-nitrosifenfluramine が認められ、保持時間 24 min 及び 30 min に (*R*)-*N*-nitrosifenfluramine が認められることが明らかになった。これによって、光学活性カラムを用いた HPLC による *N*-nitrosifenfluramine の光学純度の決定法が確立された。

3. 中国製ダイエット用健康食品中の *N*-nitrosifenfluramine の光学純度の決定 上述の方法に従い、中国製ダイエット用健康食品中の *N*-nitrosifenfluramine の光学純度の決定を行った。劇症肝

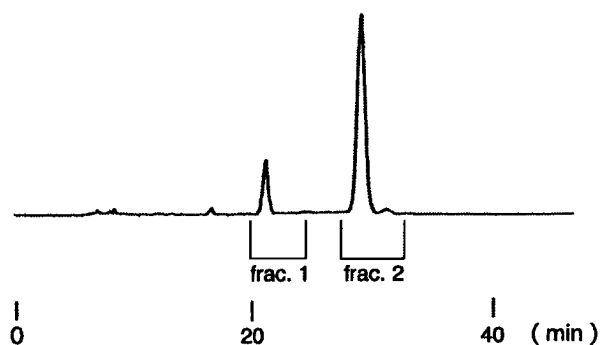


Fig. 6. HPLC Chromatogram of an Extract Obtained from Chinese Slimming Diet 'ONSHIDO-GNPIKOUNOU'

炎で死亡した患者が服用していた「御芝堂減肥こう囊」のクロマトグラムを Fig. 6 に示す。Fraction 1, fraction 2 とともに保持時間 21 min, 及び 29 min に溶出するピークが確認され、保持時間 24 min 及び 30 min にはピークがほとんど認められなかった。この結果から、本サンプル中の *N*-nitrosifenfluramine はほぼ *S* 体のみで存在しており、*R* 体の比率

はごくわずか、*S*体に対して2%未満であることが分かった。

他の9サンプルについても同様に分析を行ったところ、すべてのサンプルで検出された*N*-nitrosfenfluramineはほぼ*S*体のみであった。よって肝障害を起こすとされる中国製ダイエット食品中には光学活性な(*S*)-*N*-nitrosfenfluramineのみが含まれ、(*R*)-*N*-nitrosfenfluramineはほとんど存在しないことが明らかになった。

結 論

Fenfluramineは肥満治療用の食欲減退剤として1973年に食品医薬品局(FDA)によって認可された。初めは短期間、少量で処方されていたがphenfluramineと併用することで低量、低副作用ですむという利点から汎用されるようになり、1996年にはアメリカでのfenfluramine-phenfluramine処方量は1800万を超えた。⁵⁾また1996年には(*S*)-fenfluramineであるdexfenfluramineがFDAによって食欲抑制剤として認可されるに至った。⁶⁾しかし、1997年8月、Connollyらがfenfluramine-phenfluramineを摂取していた女性24人において心臓の僧帽弁、大動脈弁そして三尖弁に異常が確認されたことを発表し、副作用被害の報告⁷⁾が相ついだことから、fenfluramine, dexfenfluramineは市場から回収された。現在は研究に使用する目的でのみfenfluramineの販売が許可されているが、試薬として市販されている(*S*)-fenfluramineは非常に高価であり、比較的に入手の容易なラセミ体fenfluramineからの光学分割による調製は効率の面からは問題がある。したがって、そのニトロソ化体である、(*S*)-*N*-nitrosfenfluramineの入手も極めて困難であることは言うまでもない。

このような状況下、今回我々が行った分析により、実際に肝障害の症状が現れた患者が服用していたものも含む中国製ダイエット用健康食品のすべてから(*S*)-*N*-nitrosfenfluramineが検出されたことは驚きであった。2003年2月に厚生労働省から動物実験による*N*-nitrosfenfluramineの肝毒性についての報告がなされているが、実験に使用した*N*-

nitrosfenfluramineの光学純度に関する記述は全くなかった。また予備実験では中国製ダイエット用健康食品から抽出した*N*-nitrosfenfluramineを用いているが、本実験では市販のfenfluramineから合成したものを用いている。ラセミ体を使用したのであれば(*S*)-*N*-nitrosfenfluramineとしての摂取量は半分になってしまう。一般に光学異性体の生理活性が異なるのは周知の事実である。今回、我々が得た結果から、中国製ダイエット用健康食品中の*N*-nitrosfenfluramineの毒性及び、生理活性については、光学活性な(*S*)-*N*-nitrosfenfluramineを用いて再検討する必要があることは明らかである。今後、動物実験などによってそれらを解明していきたい。

謝辞 サンプルをご提供下さいました足立雅之先生(慶応大学医学部)、若林寛二先生(公立福生病院内科)、山本恵一先生(カネボウ㈱漢方ヘルスケア研究所)に深く感謝いたします。またサンプルの分析にご協力いただきました帝京大学薬学部中央機器室の下出順子様、橘川まろか様に厚く御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Wales J. K., *Acta Endocrinol.*, **90**, 616-623 (1979).
- 2) Karabatsos G. J., Taller R. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 4373-4378 (1964).
- 3) Morehead Jr. A. T., Reges R. A., Lewin A. H., Carroll F. I., *Enantiomer*, **1**, 63-68 (1996).
- 4) No racemization was observed during nifrosation of optically active fenfluramine.
- 5) Weintraub M., Hasday J. D., Mushlin A. I., Lockwood D. H., *Arch. Intern. Med.*, **144**, 1143-1148 (1984).
- 6) Langreth R., *Wall Street Journal*, **8B** (1997).
- 7) Connolly H. M., Crary J. L., McGoon M. D., Hensrud D. D. H., Edwards B. S., William D., Edwards W. D., Schaff H. V., *N. Engl. J.*, **337**, 581-588 (1997).