

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

伊達英代,* 豊田安基江, 寺内正裕, 杉村光永, 松尾 健, 鵜池千恵子

Rapid Determination of Medical Components Found in the Health Food for Weight Loss by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS)

Hideyo DATE, Akie TOYOTA, Masahiro TERAUCHI, Mitsunori SUGIMURA,
Takeshi MATSUO, and Chieko MOCHIIKE

*Hiroshima Prefectural Technology Research Institute, Health and Environment Center,
1-6-29 Minami-machi, Minami-ku, Hiroshima 734-0007, Japan*

(Received August 31, 2007; Accepted December 27, 2007)

A method for the rapid determination of 11 medical components found in health foods for weight loss using liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) has been developed. HPLC separation is performed on an ODS column with the gradient elution method. The mobile phase consists of two solvents. Solvent A is water and solvent B is methanol/acetonitrile (1 : 1), and both contain 0.1% formic acid and 5 mmol/l of ammonium acetate. Each medical component is analyzed with multiple-reaction monitoring (MRM) in both negative and positive modes through electrospray ionization (ESI). The recovery rates of the 11 medical components added to commercially available health foods were 46.3–114% and each coefficient of variation was 13.7% or less. It was confirmed that this method is applicable to the urgent analysis of health foods that have caused damage to health.

Key words—health food; weight loss; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; electrospray ionization; multiple-reaction monitoring

緒 言

近年、健康志向の高まりに乗じて、テレビ、雑誌、インターネット等を通じて健康に関する様々な情報が氾濫し、多種多様な「健康食品」が市場に流通している。これらの「健康食品」の中には、高濃度の医薬品成分が添加された「無承認無許可医薬品」に該当するものが存在し、知らず知らずに摂取した人に重篤な健康被害をもたらした事例が平成 14 年以降、全国で多発しており、死亡例もあることから社会問題となっている。

しかし、医薬品成分は、紫外 (UV) 検出高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、薄層クロマトグラフィー (TLC)、ガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS)、液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) 等の手法を駆使して分析を行う必要がある、「健康食品」に添加された場合、同定が

極めて困難である。さらに、多種類の医薬品成分の含有が疑われる場合は、多大な労力と時間を要する。

近年、分子イオンやそのフラグメントイオンを高感度かつ選択的に測定できることから、代謝物の構造推定など医薬品開発分野で活用されてきた液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (LC/MS/MS) は、技術開発によりその汎用性が向上したことで、保健衛生分野の調査研究や開発に急速に普及しており、ポジティブリスト制が導入された食品中の残留農薬、動物薬等の迅速多成分一斉分析法の開発に多用されている。

そこで、筆者らは、健康被害が発生した場合、「健康食品」に含有された医薬品成分の同定・定量分析の迅速化を図り、もって「無承認無許可医薬品」に該当する「健康食品」を市場から速やかに排除する目的で、特に、症状が重篤になる恐れのある、ダイエット用「健康食品」より過去に検出された向精神薬のマジンドール等 11 成分の LC/MS/MS による迅速一斉分析法の検討を行ったので報告する。

広島県立総合技術研究所保健環境センター

*e-mail: h-date81371@pref.hiroshima.lg.jp

実験の部

1. 試料

1-1. 試料 健康被害発生により当センターでの分析の結果、医薬品成分が含有された「健康食品」の10検体

1-2. 添加回収試験用試料 広島県内で購入し、医薬品成分を含有しないことを確認した「健康食品」

2. 試薬

2-1. 標準物質 ヒドロクロロチアジド (Hyd), マジンドール (Maz), フェンフルラミン (Fen), ビサコジル (Bis), フロセミド (Fur), ジアゼパム (Dia): SIGMA 社製, センノシド A (Sen.A), センノシド B (Sen.B): 和光純薬製生薬分析用, シブトラミン塩酸塩一水和物 (Sib): Alexis 製, フェノールフタレイン (Phe): 和光純薬製試薬特級, *N*-ニトロソフェンフルラミン (*N*-Fen): 和光純薬製薬理研究用.

各成分の薬効を Table 1 に示した.

2-2. HPLC 用溶媒 メタノール, アセトニトリル, 蒸留水は SIGMA 社製 HPLC 用を使用した.

2-3. その他試薬 特級品を使用した.

3. 標準溶液の調製 Sen.A はメタノール/0.1%炭酸水素ナトリウム (7:3) 溶液で, それ以外の10標準物質はメタノールで溶かして標準原液を作成した. 各標準原液を便宜希釈し, Bis 及び Fen は 0.0001—0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で, Phe, Sib, Maz, *N*-Fen 及び Dia は 0.001—0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で, Fur,

Hyd, Sen.A 及び Sen.B は 0.1—10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で検量線用混合標準溶液を作成した. 希釈液としてメタノール含量 20% の蒸留水を使用した.

4. 試料溶液の調製 各試料を粉碎し, その約 50 mg を量り取り, メタノールを精密に 5 ml 加え, 10 分間超音波抽出した後, 3 分間遠心分離した. その上澄みを正確に 1 ml 量り取り, メタノール含量 20% とするため, 蒸留水を加えて全量 5 ml とし, 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過し, 試料溶液とした (Fig. 1).

5. 装置 HPLC は Agilent1100 シリーズ (Agilent 社製) を, MS/MS は, API3000 (Applied Biosystems 社製) を用いた.

6. LC/MS/MS 測定条件 MS/MS 条件は Table 2 に, HPLC の条件は Table 3 に示した.

結果及び考察

1. MS/MS 条件の検討 イオン化は, 汎用されているエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法とし, マルチプルイオンモニタリング (MRM) の条件を検討した.

各成分の標準原液をメタノールで適宜希釈してプレカーサーイオンスキャンを行い, 観測される [M

Table 1. Effects of 11 Medical Components

Effects	Medical components
Purgative	Phenolphthalein (Phe)
	Bisacodyl (Bis)
	Senoside A (Sen.A)
	Senoside B (Sen.B)
Suppression appetite	Sibutramine (Sib)
	Fenfluramine (Fen)
	<i>N</i> -nitrosofenfluramine (<i>N</i> -Fen)
Psychotropic drug	Mazindol (Maz)
	Diazepam (Dia)
Diuretic	Furosemide (Fur)
	Hydrochlorothiazide (Hyd)

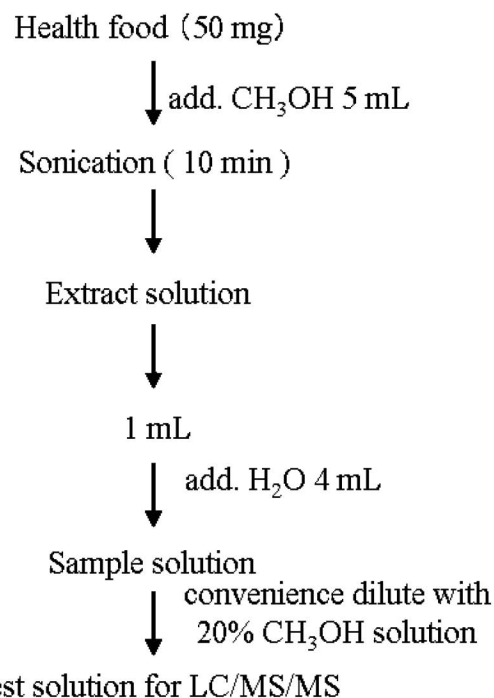


Fig. 1. Extract Method of Sample Solution from the Health Food for Weight Loss

Table 2. MS/MS Conditions for Analysis of 11 Medical Components

Medical component	MW	Q1 ion (m/z)	Mode	Q3 ion (m/z)	MS/MS parameter (eV)				Ion source parameter
					DP	FP	CE	CXP	
1: Phe	318.33	319	quant.	115	41	260	77	6	«Positive mode» Nebulizer gas: 9 Curtain gas: 12 Ion transfer voltage: 5000 ev Temperature: 450°C Collision gas: 11
			qualit.	151			55	14	
2: Sib	279.86	281	quant.	125	36	220	31	6	
			qualit.	139			23	8	
3: Bis	361.40	362	quant.	184	56	340	35	12	
			qualit.	226			25	14	
4: Maz	284.75	286	quant.	44	41	220	55	6	
			qualit.	243			31	22	
5: Fen	231.26	232	quant.	159	46	300	31	10	
			qualit.	109			59	18	
6: N-Fen	260.26	261	quant.	159	27	240	27	10	
			qualit.	187			17	18	
7: Dia	284.75	285	quant.	154	56	360	39	8	
			qualit.	193			45	10	
8: Fur	330.75	330	quant.	286	-16	-140	-20	-7	«Negative mode» Nebulizer gas: 12 Curtain gas: 10 Ion transfer voltage: -4500 ev Temperature: 450°C Collision gas: 12
			qualit.	205			-32	-11	
9: Hyd	297.74	297	quant.	269	-41	-170	-32	-13	
			qualit.	205			-26	-17	
10: Sen.A	862.74	430	quant.	386	-26	-190	-22	-9	
			qualit.	224			-46	-13	
11: Sen.B	862.74	430	quant.	386	-26	-190	-22	-9	
			qualit.	224			-46	-13	

Table 3. HPLC Conditions for Analysis of 11 Medical Components

Analytical column: XTerra MS C18, 3.5 μ m, 2.1 \times 150 mm (Waters)
Mobile phase: Solvent A: H ₂ O containing 0.1% HCOOH and 5 mmol/l CH ₃ COONH ₄ Solvent B: CH ₃ OH : CH ₃ CN (1 : 1) containing 0.1% HCOOH and 5 mmol/l CH ₃ COONH ₄
Gradient profile: A 80% (2 min) \rightarrow (18 min) \rightarrow A 30% (10 min)
Flow rate: 0.2 ml/min
Column temp.: 40°C
Inj. volume: 5 μ l

+H]⁺又は[M-H]⁻をQ1イオンとした。ただし、Sen.A及びSen.Bは、[M-H]⁻より高感度であった2価イオン([M-2H]²⁻)をQ1イオンとした。続いて、インフュージョン法による各種パラメータの最適化を実施した。その際に、最大感度が得られたプロダクトイオン(Q3イオン)を定量イオンとし、2番目に高感度であったイオンを定性イオンとした。さらに、ポジティブモードについてはPhe、ネガティブモードについてはSen.Bを用い、フローインジェクションアナリシス(FIA)でイオンソースの最適化を行った。その結果、各11医薬品成分の定量イオン、定性イオン及び各パラメータ値は、Table 2の通りであった。

2. HPLC条件の検討 われわれは、対象とした医薬品11成分のHPLCによる一斉分析を報告し

ている。¹⁾ この方法を参考に、1回の分析が30分程度で終了するHPLC条件を検討した。

まず、各11医薬品成分のメタノール溶液を対象に、イオン化を促進するための添加剤として残留農薬等の一斉分析で多用されている酢酸アンモニウム²⁻⁴⁾を用い、また、分子量が同じ構造異性体であるSen.A及びSen.Bを分離させる目的で、リン酸の代わりに揮発性の高いギ酸を用いて、移動相の条件を検討した。その結果、Table 3に示した通り、酢酸アンモニウムは5 mmol/l、ギ酸は0.1%の濃度となるよう添加した蒸留水及びメタノール/アセトニトリル(1:1)溶液によるグラジエント分析でHyd以外の10成分は、良好に分離分析することが可能であった。

Hydは、メタノール溶液ではピークの頭割れを生じたが[Fig. 2(1)]、試料溶液のメタノール含量を20%にすることで、良好なピークが得られることが報告されていることから、⁵⁾混合標準溶液を作成する際の希釈液を、メタノール含量20%の蒸留水に変更したところ、Hydを含む11成分すべて良好なMRMクロマトグラムが得られた(Fig. 2(2))。

なお、検出は、Phe, Sib, Bis, Maz, Fen, N-Fen及びDiaがポジティブモードで、Fur, Hyd, Sen.A及びSen.Bがネガティブモードで分析が可能であった(Fig. 3)。

3. 検量線 検量線用混合標準溶液を注入し、ピーク面積による絶対検量線法で検量線を作成したところ、Bis及びFenは0.0001-0.01 µg/ml、Phe及

びMazは0.001-0.1 µg/ml、Fur及びSen.Aは0.1-10 µg/ml、Sib, Dia及びN-Fenは0.005-0.1 µg/ml、Sen.Bは、0.5-10 µg/ml、Hydは0.1-5 µg/mlの範囲で $r=0.997$ と良好な検量線が得られた(Fig. 4)。

なお、検出限界値は、Bis及びFenは0.0001 µg/ml (0.5 pg/injection)、Pheは0.001 µg/ml (5 pg/injection)、Sib, Dia及びN-Fenは0.005 µg/ml (25 pg/injection)、Maz, Fur, Hyd及びSen.Aは0.1 µg/ml (0.5 ng/injection)、Sen.Bは0.5 µg/ml (2.5 ng/injection)であった(定性イオンのS/N比>3)。

4. 添加回収試験 添加回収試験用試料を粉碎し、その約50 mgを量り取り、Bis及びFenは0.04 µg、Phe, Sib, Maz, N-Fen及びDiaは0.4 µg、Fur, Hyd, Sen.A及びSen.Bは40 µgに相当する標準原液をそれぞれ添加した。これに、窒素を噴き付けて溶媒を留去し、以後、試料溶液の調製と同様に操作し、添加回収試験を実施した。その結果を、Table 4に示した。

Sen.A及びSen.Bは、回収率50%以下であった。これは、医薬品成分の抽出に幅広く対応でき、かつ簡易な抽出方法である100%メタノールによる超音波抽出法を用いたことが原因と考えられる。「健康食品」中に医薬品と同等の効果が期待できるセンノシド量(10 mg/g以上)⁶⁾が含有されている場合は、100%メタノール抽出によっても十分検出が可能である。そこで、Sen.A及びSen.Bについては、本法及びTLCで成分の確認を実施し、検出された場合は井上ら⁷⁾の方法により、改めて個別に定

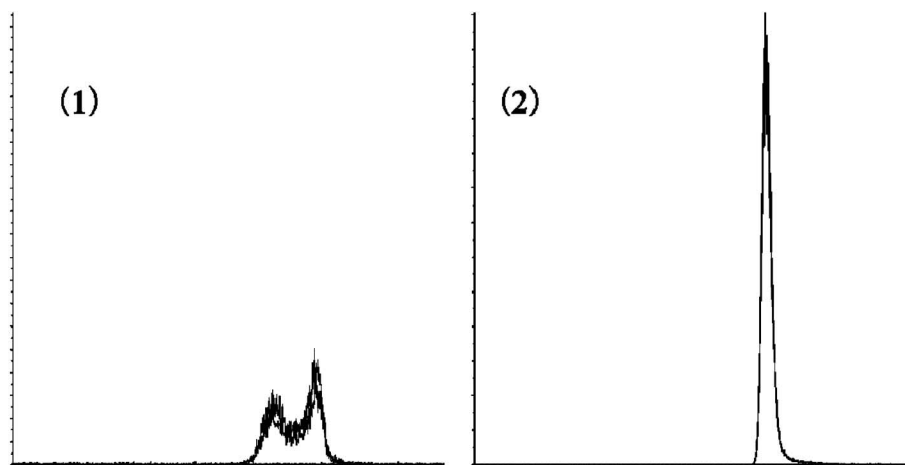


Fig. 2. Influence of Methanol Concentration on MRM Chromatogram for Hydrochlorothiazide
(1) 100% methanol solution, (2) 20% methanol solution.

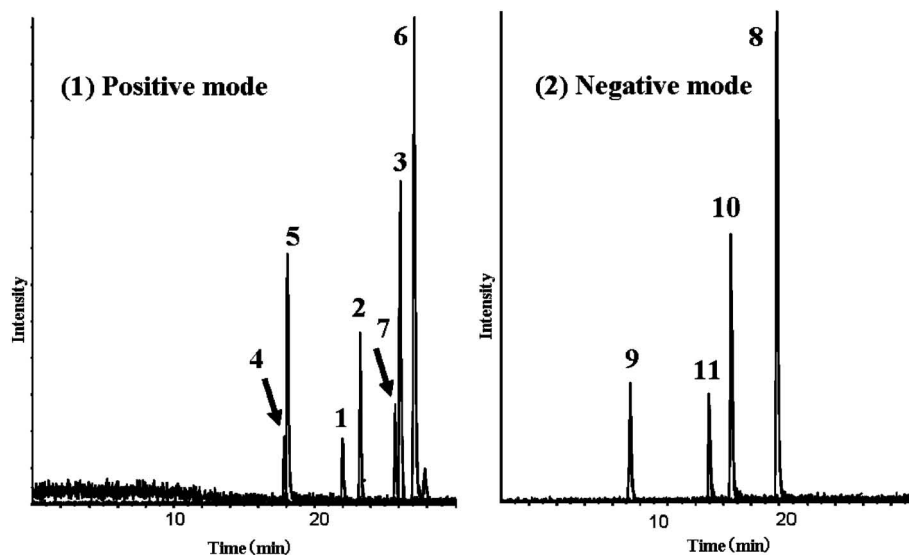


Fig. 3. MRM Chromatograms of 11 Medical Components

1: Phe, 2: Sib, 3: Bis, 4: Maz, 5: Fen, 6: *N*-Fen, 7: Dia, 8: Fur, 9: Hyd, 10: Sen.A, 11: Sen.B, Each concentrations: 1,2,4,6 and 7 (0.01 $\mu\text{g/ml}$), 3,5 (0.001 $\mu\text{g/ml}$), 8,9,10 and 11 (1.0 $\mu\text{g/ml}$).

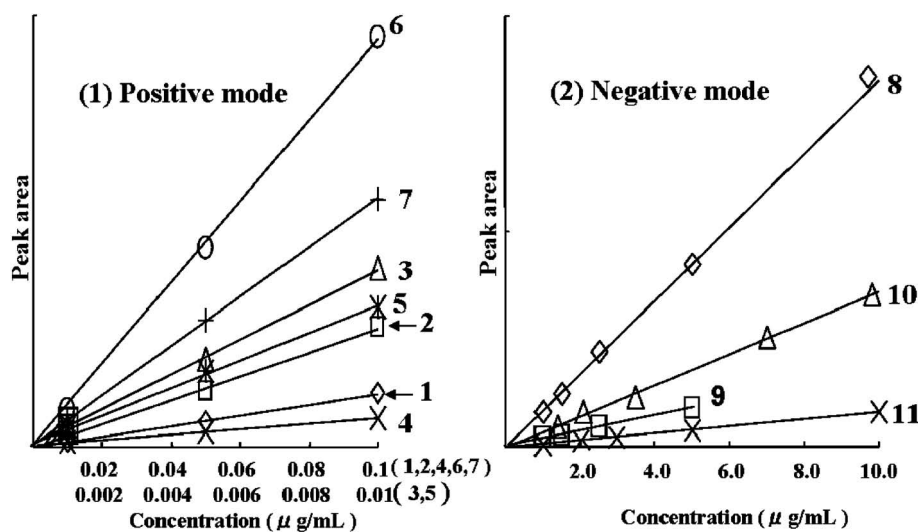


Fig. 4. Calibration Curves of 11 Medical Components

1: Phe ($r=0.9995$), 2: Sib ($r=0.9990$), 3: Bis ($r=0.9994$), 4: Maz ($r=0.9997$), 5: Fen ($r=0.9988$), 6: *N*-Fen ($r=0.9998$), 7: Dia ($r=0.9998$), 8: Fur ($r=0.9986$), 9: Hyd ($r=0.9983$), 10: Sen.A ($r=0.9974$), 11: Sen.B ($r=0.9992$).

量することとした。

N-Fen は、メタノール抽出で 90% 以上の高回収率を示す報告がある。⁸⁾しかし、本法では 85.2% であった。これは、添加回収実験の際に透明器具を使用したため、抽出操作中に光に不安定である *N*-Fen が分解した⁹⁾可能性が考えられた。そこで、添加回収実験に使用する器具を褐色器具に変えて実施したところ、98.4% と回収率が改善された。以上のことから、本分析法は、褐色器具を使用して行うこととした。

相対標準偏差はすべて 13.7% 以内であり、再現性についても良好であった。

5. 実試料の分析 実際に医薬品成分が添加されていた健康食品は、平成 17 年 5 月に Phe, Sib 及び Maz が検出された天然系 No.1-No.4, 平成 15 年 8 月に Sib, Bis 及び Hyd が検出されたホスピタルダイエット, 平成 16 年 9 月に Sen.A 及び Sen.B が検出されたダイエット茶 No.1 及び No.2, 平成 9 年 3 月に Sen.A 及び Sen.B が検出されたダイエット茶 No.3 である。これら健康食品について、本法

を用いて分析した結果を Table 5 に、MRM クロマトグラムを Fig. 5 に示した。各製品中の医薬品成分を、定量イオンを用いて定量すると同時に、定性イオンで確認、同定することができた。

結 語

ダイエット用「健康食品」より過去に検出された事例のある医薬品 11 成分について、LC/MS/MS

Table 4. Rates of Recovery ($n=3$)

	Recovery (%)	CV (%)
1: Phe	106	5.1
2: Sib	98.8	3.4
3: Bis	89.2	5.3
4: Maz	112	6.1
5: Fen	102	13.7
6: <i>N</i> -Fen	98.4	3.5
7: Dia	114	2.2
8: Fur	101	3.1
9: Hyd	112	2.3
10: Sen.A	47.8	6.8
11: Sen.B	46.3	6.0

Table 5. Analytical Results of the Health Food for Weight Loss

Health food name		Result
TenTenso No.1	1: Phe	140
	2: Sib	9.8 mg/cap
	4: Maz	1.3
TenTenso No.2	1: Phe	110
	2: Sib	6.1 mg/cap
	4: Maz	1.1
TenTenso No.3	1: Phe	90
	2: Sib	5.3 mg/cap
	4: Maz	1.1
TenTenso No.4	1: Phe	110
	2: Sib	6.3 mg/cap
	4: Maz	1.2
Hospital diet (white capsule) (orange tablet) (pink tablet)	2: Sib	7.7 mg/cap
	3: Bis	4.4 mg/tab
	9: Hyd	54 mg/tab
Diet tea No.1	10: Sen.A	0.04 mg/g
	11: Sen.B	0.06 mg/g
Diet tea No.2	10: Sen.A	0.11 mg/g
	11: Sen.B	0.15 mg/g
Diet tea No.3	10: Sen.A	0.26 mg/g
	11: Sen.B	0.32 mg/g

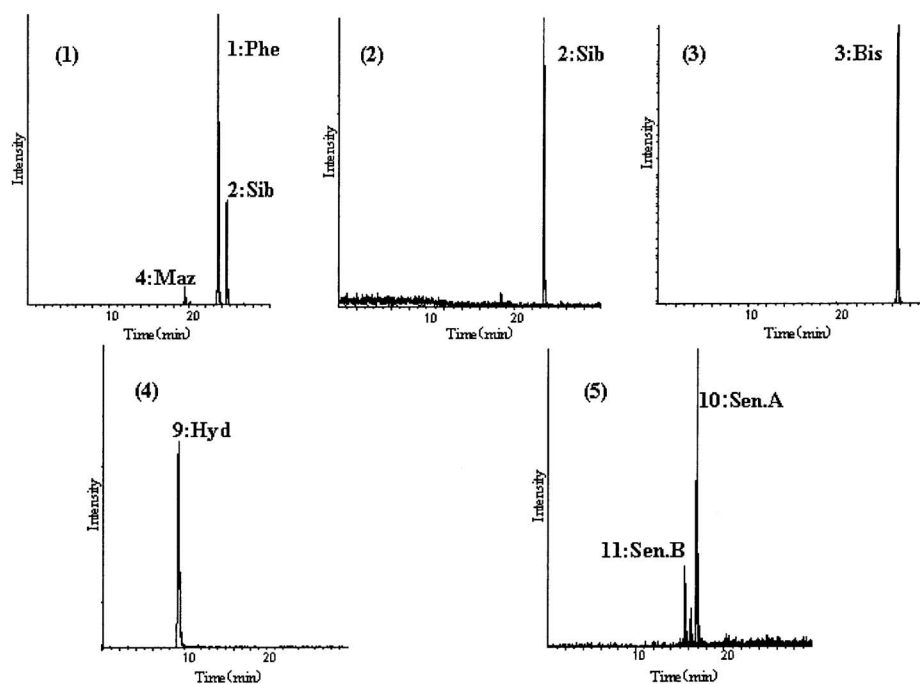


Fig. 5. MRM Chromatograms of Extract Solution from the Health Food

(1) TenTenso No.1, (2) Hospital diet (white capsule), (3) Hospital diet (orange tablet), (4) Hospital diet (pink tablet), (5) Diet tea No.1.

による一斉分析を検討した。その結果、良好なMRMクロマトグラムが得られ、定量用イオンで定量分析を実施すると同時に、定性用イオンで成分を確認することができた。

Sen.A及びSen.B以外の9成分については回収率、再現性ともに良好であった。なお、Sen.A及びSen.Bについては抽出方法に問題があり、回収率が低値となったが、健康被害を引き起こす程の健康食品には高濃度に添加されている可能性が高いことから、本法でも検出可能であると考えられる。

本法を用いて、医薬品成分が添加された健康食品を分析したところ、ポジティブ、ネガティブの両モードで、各成分を1時間程度で確認、定量することが可能であった。

以上のことから、本法がダイエット用「健康食品」による健康被害が発生した際の迅速分析法として有用であることを明らかにした。

REFERENCES

- 1) Date H., Toyota A., Terauchi M., Sugimura M., Matsuo T., Mochiike C., 42th Zenkoku Eiseikagakugijyutukyougikai Nenkai Kouensyu, 212-213 (2005).
- 2) Sugimura M., Toyota A., Mochiike C., *Bull. Hiroshima Pref. Inst. Publ. Health Environ.*, **13**, 57-63 (2005).
- 3) Konishi T., Akaki K., Hatano K., *Annu. Rep. Fukuoka City Inst. Hyg. Environ.*, **31**, 99-105 (2006).
- 4) Ishii R., Takahashi K., Horie M., *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **47**(5), 201-212 (2006).
- 5) Yamamoto M., Maeda Y., Owada K., Sano S., Masui T., *Iyaku hin Kenkyu*, **22**(6), 1130-1134 (1991).
- 6) Ministry of Health, Labour and Welfare, "The Japanese Pharmacopoeia Fifteenth Edition," 1231 (2006).
- 7) Inouye M., *Rep. Nara Pref. Pharma Lab.*, **10**, 54-59 (1990).
- 8) Inouye S., Shinno M., Ogasawara M., Kanamoto A., Oseto M., Inouye H., *Annu. Rep. Ehime Pref. Inst. Publ. Health*, **6**, 34-38 (2003).
- 9) Moriyasu T., Kishimoto K., Nakajima J., Shigeoka S., Minowa K., Kamimura H., Yasuda I., *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. P.H.*, **54**, 69-73 (2003).