

## 健康食品中に含まれる経口血糖降下薬の系統的分析法

伊達英代,\* 寺内正裕, 杉村光永, 豊田安基江, 松尾 健

## Systematic Analysis of Oral Hypoglycemic Agents in Health Foods

Hideyo DATE,\* Masahiro TERAUCHI, Mitsunori SUGIMURA, Akie TOYOTA, and Takeshi MATSUO

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

(Received July 1, 2008; Accepted September 25, 2008)

A systematic analysis for 11 ingredients of oral hypoglycemic agent in health foods was established using three different analytical methods; *i.e.* thin-layer chromatography (TLC), high-performance liquid chromatography (HPLC) and comparison of MS/MS spectra analyzed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). In Normal-phase and reversed-phase TLC, each condition to separate and detect 10 ingredients except nateglinide was developed. On the other hand, 11 ingredients were detected qualitatively and quantitatively by HPLC. The recovery rates were 92–101% and each coefficient of variation was less than 5.4%. Then UV spectra were monitored using this HPLC method and furthermore MS/MS spectra of 11 ingredients were obtained by LC/MS/MS. Identification of each ingredient became precise and rapid by comparing UV and MS/MS spectra of standard solutions with that of extract solutions from health foods. Using this systematic analysis, glibenclamide was accurately determined and identified from health foods.

**Key words**—systematic analysis; oral hypoglycemic agent; health food; thin-layer chromatography; high-performance liquid chromatography; MS/MS spectrum

## 緒 言

近年、医薬品成分が含有された「無承認無許可医薬品」に該当する「健康食品」(以下、「健康食品」と称す。)による健康被害事例が全国で多発しており、死亡例もあることから大きな社会問題になっている。このような事例に迅速に対応するため、われわれはこれまで、特に、健康被害が深刻で、事例も多いダイエット用「健康食品」中の下剤、利尿剤、食欲抑制剤、向精神薬の一斉分析法<sup>1)</sup>について検討してきた。

2003–2005年、スルフォニルウレア系経口血糖降下薬(SU剤)であるグリベンクラミド(GLIB)が添加された「健康食品」が4製品発見され、2008年3月には、GLIBが高濃度に添加された「男根増長素」を服用した人が、低血糖による意識障害を起こして病院に搬送された事例が多発した。<sup>2)</sup> また、海外では、GLIB以外のSU剤及びSU剤以外の経

口血糖降下薬[ビグアナイド剤(BG剤)、チアゾリジン誘導体(TZ誘導体)及びフェニルアラニン誘導体(PA誘導体)]が添加された「健康食品」が複数発見され、国内と同様な健康被害も発生している。<sup>3)</sup>

これまで、「健康食品」中の経口血糖降下薬については、SU剤6成分の薄層クロマトグラフィー(TLC)及び高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた分析法が報告されている。<sup>4)</sup> また、臨床分野において、単独あるいは多剤併用療法による副作用(低血糖)の防止のため、血漿中のBG剤1成分及びSU剤4成分のHPLCを用いた分析法が報告されている。<sup>5)</sup>

これらの報告では、対象成分がBG剤及びSU剤に限られ、その他の化学構造の経口血糖降下薬については検討されていない。今回、われわれは、海外での事例から、BG剤及びSU剤以外の化学構造の経口血糖降下薬も対象に加えた、より多くの成分を迅速かつ正確に測定可能な分析法が必要であると考えた。そこで、SU剤2成分、BG剤7成分、TZ誘

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

導体 1 成分及び PA 誘導体 1 成分、計 11 成分の経口血糖降下薬について、TLC による確認、HPLC による迅速一斉分析及び液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (LC/MS/MS) を用いて分析した MS/MS スペクトルの比較による同定の 3 つの方法を組み合わせた、系統的分析法を検討した。

## 実験の部

### 1. 試料

**1-1. 試料** 経口血糖降下薬等が添加されていた「健康食品」は、2008 年 2 月、広島県内で健康被害が発生し、当センターで分析した「健康食品」(I : NangenZengzhangsu, 日本語品名 : 男根増長素) と、神奈川県保健福祉部薬務課及び神奈川県衛生研究所より提供された「健康食品」2 検体 (II : ANADA THUKHA : 2005 年 8 月に発見, III : Nigauri GOLD : 2003 年 4 月に発見) である。

**1-2. 添加回収用試料** 茶剤に医薬品成分が添加される例が多いことから、市販の緑茶及び紅茶を粉砕し、各成分を一定量添加したものを、添加回収用試料とした。

### 2. 試薬

**2-1. 標準品** メトホルミン (METF), トログリタゾン (TROG) : ALEXIS Biochemicals Inc. 製, フェンホルミン塩酸塩 (PHEN), クロロプロパミド (CHLO), グリピジド (GLIP), トルブタミド (TOLU) : Sigma-Aldrich Inc. 製, アセトヘキサミド (ACET), トラザミド (TOLA), グリクラジド (GLIC) : 和光純薬 (株) 製生化学用, グリベンクラミド (GLIB) : MP Biomedicals Inc. 製, ナテグリニド (NATE) : Toronto Research Chemicals Inc. 製

各成分について、化学構造別に分類したものを Fig. 1 に示した。

**2-2. その他試薬** メタノール, アセトニトリル, 蒸留水 : Sigma-Aldrich Inc. 製 HPLC 用。その他試薬は特級品を使用した。

**3. 装置** HPLC (フォトダイオードアレイ検出器付) は HP1100 シリーズ (Agilent Technologies 製) を、MS/MS は、API3000 (Applied Biosystems 製) を用いた。

### 4. 標準溶液の調製

**4-1. TLC 用標準溶液** 各標準品をメタノール

で希釈して 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  とし、TLC 用標準溶液とした。

**4-2. HPLC 用混合標準溶液** 4-1. で調整した各 TLC 用標準溶液を、1.0–50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の範囲で段階的に希釈し、検量線用混合標準溶液を調整した。その際、METF 及び PHEN はアセトニトリル/蒸留水 (2 : 3) 溶液で、他の 9 成分はメタノールを用いて希釈した。

**4-3. MS/MS スペクトル測定用標準溶液** 4-1. で調整した各 TLC 用標準溶液をメタノールで各々希釈し、1.0–100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度に調製した。

### 5. 試料溶液の調製

**5-1. TLC 用試料溶液及び MS/MS スペクトル測定用試料溶液** 各試料を粉砕し、その約 50–100 mg を量り取り、メタノールを正確に 5 ml 加え、10 分間超音波抽出したのち、遠心分離 (3000 rpm, 3 min) し、上澄みを TLC 用及び MS/MS スペクトル測定用試料溶液とした。

**5-2. HPLC 用試料溶液** 5-1. の試料溶液を 1 ml 正確に分取し、METF 及び PHEN 分析用はアセトニトリル/蒸留水 (2 : 3) 溶液で、他の 9 成分分析用はメタノールで便宜希釈して各分析用試料溶液とした。

### 6. 経口血糖降下薬の系統的分析法

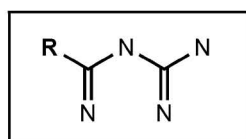
**6-1. TLC による確認** 順相系は Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (MERCK 製), 逆相系は RP-18 F<sub>254</sub> (MERCK 製) を用い、TLC 用標準溶液及び試料溶液を 10  $\mu\text{l}$  スポットした。展開溶媒は、順相系では、酢酸エチル/ベンゼン/ジエチルエーテル/酢酸 (30 : 10 : 10 : 0.1), 逆相系では、メタノール/水/酢酸 (75 : 25 : 0.1) を用い、約 10 cm 展開した。各成分の検出は、紫外線 (UV) 254 nm の照射及びニンヒドリン・ブタノール試液<sup>6)</sup> を噴霧後、105°C で 30 分加熱する方法により行った。

**6-2. HPLC による一斉分析** カラムは、YMC-Pack ODS-AQ (4.6  $\times$  150 mm, 5  $\mu\text{m}$ , YMC 製) を用い、カラム温度は 40°C, 流量は 1 ml/min, 注入量は 10  $\mu\text{l}$  とした。

BG 剤 2 成分は、5 mmol/l のラウリル硫酸ナトリウムを含む 0.1% リン酸溶液/アセトニトリル (60 : 40) を移動相に用い、検出波長は 235 nm とした。

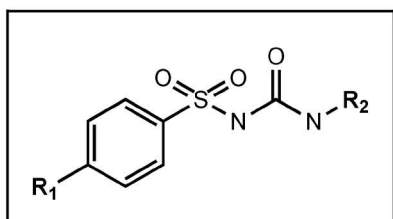
他の 9 成分は、25 mmol/l リン酸二水素ナトリウ

## Biguanides ( BG )



	R	Mm
1 :	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	129.10
2 :	NHC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	205.13

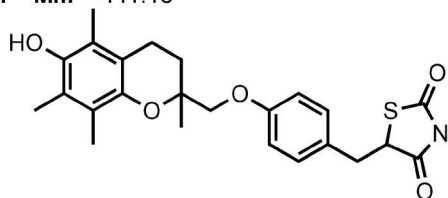
## Sulfonylureas ( SU )



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Mm
3 :	Cl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	276.03
4 :	COCH <sub>3</sub>		324.11
5 :	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> NHCO-		445.17
6 :	CH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	270.10
7 :	CH <sub>3</sub>		311.13
8 :	CH <sub>3</sub>		323.13
10 :	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> NHCO-		493.14

## Thiazolidine derivative ( TZ )

9 : Mm = 441.16



## Phenylalanine derivative ( PA )

11 : Mm = 317.20

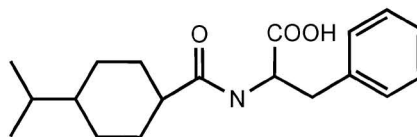


Fig. 1. Each Chemical Structure and Monoisotopic Mass of 11 Oral Hypoglycemic Agents

Mm: Monoisotopic mass,

1: Metformin (METF), 2: Phenformine (PHEN), 3: Chlorpropamide (CHLO), 4: Acetohexamide (ACET), 5: Glipizide (GLIP), 6: Tolbutamide (TOLU), 7: Tolazamide (TOLA), 8: Gliclazide (GLIC), 9: Troglitazone (TROG), 10: Glibenclamide (GLIB), 11: Nateglinide (NATE).

ム溶液 (A 液) とアセトニトリル (B 液) によるリニアグラジエント法を用いた。グラジエント条件は、A 液/B 液 (60 : 40) を 10 分保持したのち、10 分間で (40 : 60) とし、さらに 10 分間保持した。検出波長は 210 nm (NATE) 及び 230 nm (その他 8 成分) とした。

**6-3. MS/MS スペクトルによる同定** MS/MS スペクトルの測定は、杉村ら<sup>7)</sup>の方法を用いた。まず、スペクトル測定用標準溶液及び試料溶液について Q1 スキャンを行い、[M+H]<sup>+</sup> 及び [M-H]<sup>-</sup> と推察されるイオンを確認した。次に、そのイオンをプレカーサーイオンとし、Table 1 に示した LC/

MS/MS 条件を用いて、プロダクトイオンスキャン測定を実施した。得られた MS/MS スペクトルの比較により、各成分の同定を行った。

## 結果及び考察

## 1. 経口血糖降下薬の系統的分析法の検討

**1-1. TLC 条件の検討** まず、各種展開溶媒について検討を行った。その結果、順相系では、酢酸エチル/ベンゼン/ジエチルエーテル/酢酸 (30 : 10 : 10 : 0.1) で、原点に留まった BG 剤 (METF 及び PHEN) 及び NATE を除き、残りの 8 成分が分離した。逆相系では、メタノール/水/酢酸

Table 1. LC/MS/MS Conditions for Acquiring MS/MS Spectra

<b>○HPLC conditions</b>	
Device	: Agilent 1100
Column	: Phenomenex Mercury MS Luna <sup>®</sup> C18 (2.0×10 mm, 3 μm) or Waters Atlantis <sup>®</sup> HILIC Silica (2.1×15 mm, 3 μm)
Flow rate	: 0.2 ml/min
Column temp.	: 40°C
Inj. volume	: 1 μl
Mobile phase	: Sol. A: H <sub>2</sub> O containing 5 mmol/l CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> Sol. B: CH <sub>3</sub> OH/CH <sub>3</sub> CN (1 : 1) containing 5 mmol/l CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>
Gradient profile	: A : B (80 : 20) → 5 min → A : B (5 : 95) (Hold 3 min)
<b>○MS/MS conditions</b>	
Device	: Applied Biosystems API 3000
Ionization mode	: ESI (Negative and Positive)
Scan type	: Product ion scan
Ion spray voltage	: -4500 V (Negative) and 5500 V (Positive)
CE voltage	: ±20 eV, ±35 eV, ±50 eV
Ion source temp.	: 400°C
(The other conditions were default values of each device.)	

(75 : 25 : 0.1) を用いて展開したところ、ACET と TOLU は 0.51, GLIP と TOLA は 0.45 と同一の *R<sub>f</sub>* 値を示したが、その 4 成分及び NATE 以外の 6 成分は分離が可能であった。

次に、UV (254 nm) 吸収及び各種呈色試薬による各成分の検出について検討したところ、NATE 以外の 10 成分に UV の吸収が認められた。ニンヒドリン・ブタノール試液を噴霧後、105°C で 30 分加熱する方法では、TROG 及び NATE 以外の 9 成分を検出することが可能であった。逆相系で同一の *R<sub>f</sub>* 値を示した ACET と TOLU (*R<sub>f</sub>* 値 : 0.51) 並びに GLIP と TOLA (*R<sub>f</sub>* 値 : 0.45) は、黄紫色、濃赤紫色並びに黄紫色、橙色を呈することから、成分を識別することが可能であった。逆相系では、BG 剤は青色、Fig. 1 に示した SU 剤の基本骨格の R<sub>2</sub> にシクロヘキサン等の環状の置換基が結合した成分は黄紫色-橙色に、R<sub>2</sub> に直鎖のアルキル基が結合した成分は濃い赤紫色を呈した。特に、本呈色反応は、SU 剤の化学構造の推定に有用であると考えられる (Table 2)。

本法による NATE を除いた各 10 成分の検出限界 (LOD) は、UV 吸収による検出で 0.2-4.0 μg, ニンヒドリン・ブタノール試液の噴霧による呈色で 1.0-10.0 μg の範囲の値であった (Table 2)。GLIP 及び GLIB を除く 8 成分については、1 日投与量が

数百 mg-数 g と大量であり、健康被害を誘発する「健康食品」には、1 日投与量程度の量を含有している場合が多くみられることから、本法は確認法として有用であると考えられる。GLIP 及び GLIB の 2 成分については、1 日投与量が数 mg であり、本条件により「健康食品」を分析した場合に、検出感度を下回ることが推測されることから、スポット量を増やす等、検出感度を上げる必要がある。

以上のことから、UV230 nm より高波長側では吸収が認められず、ニンヒドリン・ブタノール試液の噴霧でも呈色しなかった NATE を除く 10 成分については、本 TLC 条件で確認が可能であった。

**1-2. HPLC による一斉分析条件の検討** 経口血糖降下薬 11 成分について、HPLC による一斉分析を試みたが、同一条件での分離は困難であった。このため、極性の高い BG 剤の 2 成分については、局方 METF 塩酸塩錠の定量法<sup>8)</sup> の HPLC 条件を参考に検討したところ、Fig. 2 に示した条件で良好なクロマトグラムが得られた [Fig. 2(A)]。BG 剤を除く 9 成分については、NATE は測定波長を 210 nm, それ以外の成分は 230 nm とし、25 mmol/l リン酸二水素ナトリウム溶液とアセトニトリルとのグラジエント分析を検討したところ、Fig. 2 に示した条件で、良好に分離した [Fig. 2 (B-1, 2)]。

次に、ピーク面積による絶対検量線法で検量線を

Table 2. Detections of 10 Oral Hypoglycemic Agents in Analysis of TLC

		Normal-phase			Reversed-phase			
		<i>R<sub>f</sub></i> Value	Ninhydrine-Buthanol		<i>R<sub>f</sub></i> Value	Ninhydrine-Buthanol		
			Spot colore	LOD (μg)		LOD (μg)	Spot colore	LOD (μg)
1. METF	0	—	—	—	0.26	Blue	2.0	1.0
2. PHEN	0	—	—	—	0.23	Blue	2.0	1.0
3. CHLO	0.50	Red purple	2.0	2.0	0.54	Red purple	2.0	1.0
4. ACET	0.45	Orange	4.0	0.5	0.51	Yellow purple	2.0	0.5
5. GLIP	0.18	Orange	10.0	2.0	0.45	Yellow purple	10.0	1.0
6. TOLU	0.58	Red purple	1.0	2.0	0.51	Red purple	1.0	2.0
7. TOLA	0.43	Orange	1.0	2.0	0.45	Orange	1.0	2.0
8. GLIC	0.34	Orange	2.0	4.0	0.42	Yellow purple	2.0	4.0
9. TROG	0.66	—	—	0.4	0.17	—	—	1.0
10. GLIB	0.36	Orange	4.0	0.2	0.30	Yellow purple	10.0	0.4

LOD: Limit of detection (Each LOD value is absolute quantify of spot), — : Not detected

TLC conditions, Normal-phase chromatography, Plate: Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (MERCK), Developing solvent: Ethyl acetate/Benzene/Diethyl ether/Acetic acid (30 : 10 : 10 : 0.1), Reversed-phase chromatography, Plate: RP-18 F<sub>254</sub> (MERCK), Developing solvent: Methanol/Water/Acetic acid (75 : 25 : 0.1), Detection: UV irradiation at 254 nm and Spraying Ninhydrin-Buthanol solution following heated at 110°C (30 min), Spot volume: 10 μl, Development distance: 10 cm.

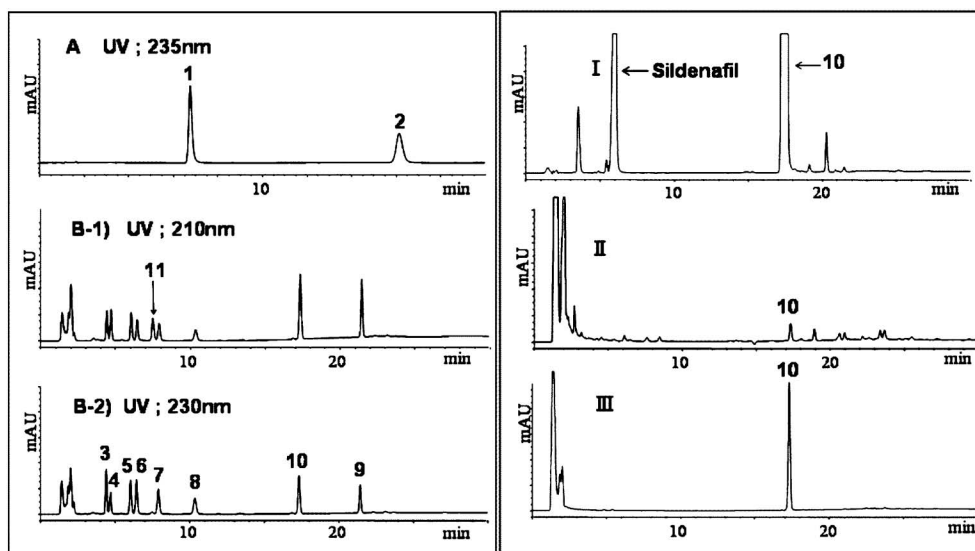


Fig. 2. HPLC Chromatograms of Standard Solution and Each Extract Solution from Health Foods

1: METF, 2: PHEN, 3: CHLO, 4: ACET, 5: GLIP, 6: TOLU, 7: TOLA, 8: GLIC, 9: TROG, 10: GLIB, 11: NATE (Each concentration: 10 μg/ml). I: Nan-genZengzhangsu, II: ANADA THUKHA, III: Nigauri GOLD. Device: HP1100 (Agilent Technologies), Column: YMC-Pack ODS-AQ (4.6×150 mm, particle size 5 μm), Flow rate: 1 ml/min, Column oven temperature: 40°C, Injection volume: 10 μl. Condition A for analysis of 1 and 2, Mobile phase: 0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> solution containing 5 mmol/l SDS/Acetonitrile (60 : 40), Run time: 20 min, Wavelength to detect: 235 nm. Condition B for analysis of 3–11, Mobile phase: Solvent A is 25 mmol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> solution and solvent B is Acetonitrile., Gradient profile: Sol.A/Sol.B (60 : 40) (Hold 10 min)→(10 min)→40: 60 (Hold 10 min), Run time: 30 min, Wavelength to detect: B-1) was 210 nm and B-2) was 230 nm.

作成した。11成分は、1.0–50 μg/mlの範囲で  $r = 0.999$  以上と、良好な直線性を示した。また、各11成分の LOD [シグナル対ノイズ比 (S/N)=3] 及び定量限界 (LOQ) (S/N=10) は、それぞれ 0.2–1.4 ng, 0.6–4.1 ng の範囲の値を示した (Table 3)。

なお、経口血糖降下薬 11成分の UV スペクトル

は、Fig. 3 に示した。

**1-3. MS/MS スペクトルによる同定** イオン化はエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法の Positive, Negative の両モードで、コリジョンエネルギー (CE) は ±20, ±35, ±50 eV とし、Table 1 に示した条件でプロダクトイオンスキャンを行っ

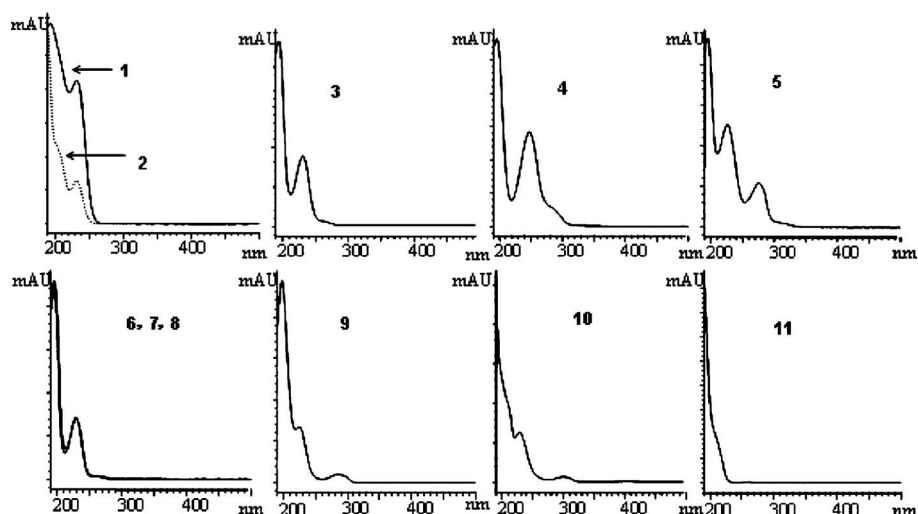


Fig. 3. UV Spectra of 11 Oral Hypoglycemic Agents

1: METF, 2: PHEN, 3: CHLO, 4: ACET, 5: GLIP, 6: TOLU, 7: TOLA, 8: GLIC, 9: TROG, 10: GLIB, 11: NATE.

Table 3. LOD and LOQ of 11 Oral Hypoglycemic Agents in Analysis of HPLC

	LOD (ng)	LOQ (ng)
1. METF	0.3	1.0
2. PHEN	0.2	0.6
3. CHLO	0.6	1.8
4. ACET	1.2	4.1
5. GLIP	0.8	2.7
6. TOLU	0.7	2.4
7. TOLA	0.3	1.0
8. GLIC	0.2	0.7
9. TROG	0.3	1.1
10. GLIB	0.5	1.5
11. NATE	0.5	1.7

LOQ: Limit of quantification, The LOD and LOQ were determined with signal-to-noise (S/N) ratios of 3 and 10.

Table 4. LOD of 11 Oral Hypoglycemic Agents in Analysis of LC/MS/MS for Acquiring MS/MS Spectra

	Pos. (ng)	Neg. (ng)
1. METF	0.044	—
2. PHEN	0.098	—
3. CHLO	3.3	1.4
4. ACET	0.13	0.041
5. GLIP	0.050	0.69
6. TOLU	0.16	0.037
7. TOLA	0.044	0.031
8. GLIS	0.024	0.026
9. TROG	8.0	2.0
10. GLIB	0.31	0.35
11. NATE	1.0	0.34

— : Not detected, The LOD was determined with S/N ratio of 20.

た。その結果、BG 剤の 2 成分は Positive モードのみで、他の 9 成分は、Positive, Negative の両モードで MS/MS スペクトルを測定することが可能であった (Fig. 4)。また、11 成分の LOD [トータルイオンカレントクロマトグラム (TIC) の S/N=20] は、0.044–3.3 ng (Positive モード)、0.026–2.0 ng (Negative モード) の値であった (Table 4)。なお、一般的に LOD は S/N=3 を用いるが、本条件で得られた TIC の S/N=3 では、フラグメントイオンを明瞭なシグナルとして得ることが困難であった。MS/MS スペクトルを確実に得るためには、TIC の S/N が 20 以上必要であったことから、LOD は、

TIC の S/N=20 を用いた。

上記の測定で得られた SU 剤の MS/MS スペクトルは、Negative モードで、Fig. 1 に示した基本骨格から-CO-NH-R<sub>2</sub> が脱離したもの (CHLO :  $m/z=190$ , ACET :  $m/z=198$ , TOLU, TOLA, GLIC :  $m/z=170$ )、又は-CO-NH-R<sub>2</sub> 及びメチル基を残して R<sub>1</sub> が脱離したもの (GLIP, GLIB :  $m/z=170$ ) と推測されるイオンが観測された。Positive モードでは、CHLO, ACET, TOLU, TOLA, GLIC で、スルフォニル基とベンゼン環の間で脱離した、-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-R<sub>1</sub> と推測されるイオン (CHLO :  $m/z=111$ , ACET :  $m/z=119$ , TOLU, TOLA, GLIC :  $m/z=91$ ) が観

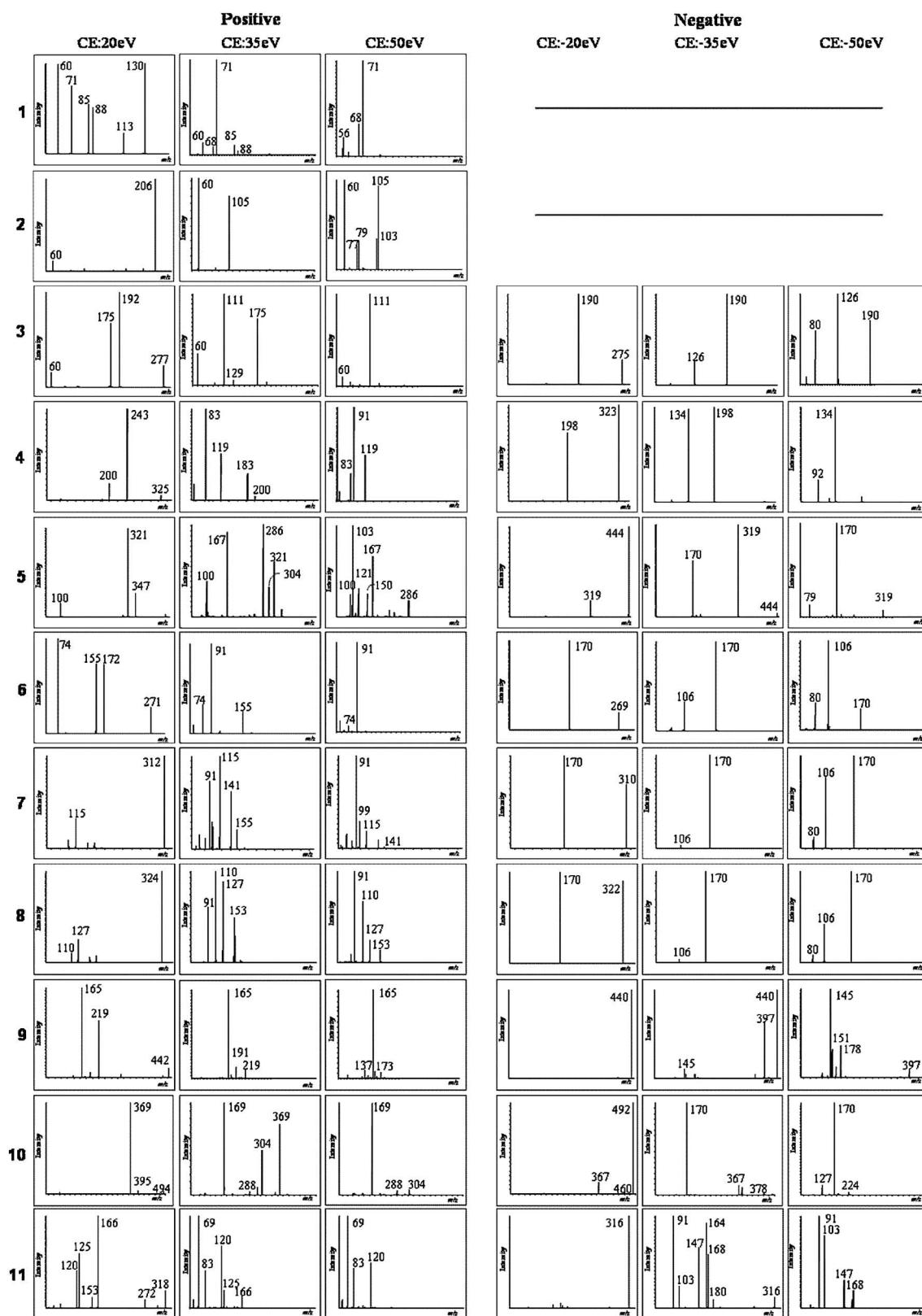


Fig. 4. MS/MS Spectra of 11 Oral Hypoglycemic Agents

1: METF, 2: PHEN, 3: CHLO, 4: ACET, 5: GLIP, 6: TOLU, 7: TOLA, 8: GLIC, 9: TROG, 10: GLIB, 11: NATE.

測された。BG 剤は、基本骨格より-C(NH)-R が脱離した-CN<sub>3</sub>H<sub>4</sub> と推測されるイオン  $m/z=60$  が観測された。これらの情報は、成分の同定を迅速化するのに有用であると考えられる。

**2. 添加回収試験** 市販の緑茶及び紅茶をそれぞれ粉碎し、その約 50–100 mg を量り取り、各 11 成分が 50  $\mu\text{g}$  に相当する標準原液をそれぞれ添加した。これに、窒素ガスを噴きつけて溶媒を留去し、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、各 11 成分の回収率は 92–101%，変動係数 (CV) は 0.4–5.4% と良好であった (Table 5)。

**3. 試料の分析** GLIB 等が添加されていた健康食品 3 検体について、試料溶液の調製と同様に操作し、本系統的分析法を用いて分析を行った。

**3-1. TLC による確認** まず、UV 吸収による確認を行ったところ、順相系では、3 検体すべて、GLIB の標準と同じ  $R_f$  値付近にスポットが認められた。そのうち、II については、TLC へのスポッ

ト量が約 0.04  $\mu\text{g}$  と、GLIB の LOD (順相系、UV 吸収による確認: 0.2  $\mu\text{g}$ ) をはるかに下回っていたことから精査したところ、この UV 吸収は、GLIB と原材料由来成分の夾雑によるものと考えられた。逆相系では、II 及び III は、原点から移動相の先端まで夾雑物が展開しており、GLIB の確認は困難であったが、多量の GLIB が含有する I では、確認が可能であった。

次に、ニンヒドリン・ブタノール試液の噴霧による確認を行った。I は順相系、逆相系ともに、標準と同等の呈色のスポット (順相系: 橙色、逆相系: 黄紫色) が確認できた。II 及び III については、本分析条件では試料溶液中の GLIB の濃度が低く、TLC への付加量が LOD を下回っていたことから、確認は困難であった。

**3-2. HPLC による一斉分析** 各健康食品の HPLC クロマトグラムを Fig. 2 に、HPLC による定量分析の結果を Table 6 示した。

すべての検体で、測定を妨害する夾雑物は認められず、GLIB を確認・定量することが可能であった。このうち、本法による II 及び III の定量結果は、神奈川県衛生研究所の定量結果 (II : 0.14 mg/tab.,<sup>9)</sup> III : 0.78 mg/cap.<sup>10)</sup>) と、ほぼ一致した。また、Fig. 2 の I に示したように、I では、CHLO (保持時間 4.8 min) 及び ACET (保持時間 5.3 min) の保持時間付近にピークが認められたが、UV スペクトルのパターンから、CHLO 及び ACET は含有されないと推察された。のちの分析で、このピークは、シルデナフィルであることが判明した。なお、微量のタダラフィルも検出された。

**3-3. MS/MS スペクトルによる同定** 各試料溶液について、Q1 スキャンを行ったところ、GLIB の  $[M+H]^+$  及び  $[M-H]^-$  と推察されるイオンを検出することができた。このイオンをプレ

Table 5. Recoveries and Coefficient of Variation ( $n=3$ )

	Green tea		Tea	
	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
1. METF	98	2.5	96	3.5
2. PHEN	99	0.5	96	1.4
3. CHLO	98	3.0	93	1.2
4. ACET	98	5.4	92	2.2
5. GLIP	101	1.0	95	0.9
6. TOLU	98	0.5	96	0.7
7. TOLA	98	1.9	95	0.7
8. GLIC	98	2.8	95	0.6
9. TROG	94	0.7	94	1.1
10. GLIB	95	1.1	97	1.4
11. NATE	93	1.8	94	0.7

Table 6. Detection Levels of Analytes in Health Foods by HPLC

Samples	Analytes	Detection levels (mg/g)	Contents in one preparation
I. NangenZengzhangsu	10. GLIB	300	120
	Sildenafil	30	12 mg/cap
	Tadarafil	0.13	0.05
II. ANADA THUKHA	10. GLIB	0.21	0.11 mg/tab
III. Nigauri GOLD	10. GLIB	1.68	0.87 mg/cap



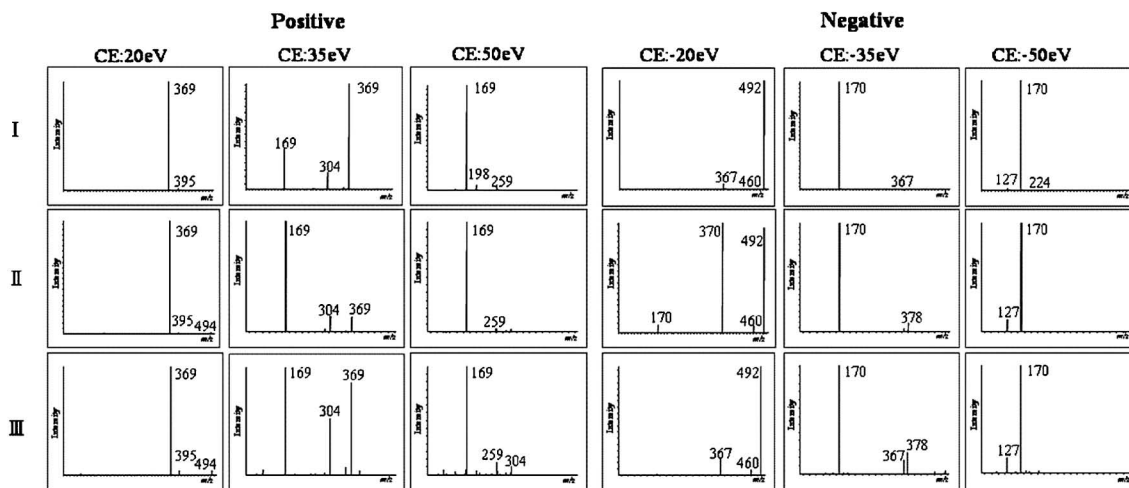


Fig. 5. MS/MS Spectra of Glibenclamide in Each Extract Solution from Health Foods  
I: NangenZengzhangsu, II: ANADA THUKHA, III: Nigauri GOLD.

カーサイオンとし、ESIのPositive, Negativeの両モードでプロダクトイオンスキャンを行い、得られたMS/MSスペクトルは、標準溶液のMS/MSスペクトルと一致した。(Fig. 5).

### ま と め

経口血糖降下薬 11 成分について、TLC, HPLC 及び MS/MS スペクトルによる同定を用いた系統的分析法を確立した。

TLC による確認法の検討では、順相系で BG 剤及び NATE 以外の 8 成分が良好に分離した。逆相系では、NATE 以外の 10 成分のうち ACET と TOLU 及び GLIP と TOLA の  $R_f$  値が同じ値となるが、その他は良好に分離する展開溶媒を見出した。各成分の確認は、NATE 以外の 10 成分は UV 照射により、また、TROG 及び NATE 以外の 9 成分については、ニンヒドリン・ブタノール試液の噴霧による方法によった。

HPLC による一斉分析法では、同一条件による 11 成分の一斉分析は困難であった。そこで、極性の高い BG 剤 2 成分と他 9 成分の 2 群に分けて、分析条件を検討したところ、各 11 成分はベースライン分離し、分離分析が可能であった。定量は、BG 剤で 235 nm, NATE で 210 nm, 他の 8 成分は 230 nm の波長を用い、LOD は 0.2-1.4 ng, LOQ は 0.6-4.1 ng の範囲の値であった。また、本法の添加回収試験は、回収率 (92-101%), CV (0.4-5.4%) とともに良好であった。

MS/MS スペクトルによる同定について検討の結果、BG 剤の 2 成分は Positive モードで (CE = +20, +35, +50 eV), その他の 9 成分は Positive, Negative の両モードで (CE = ±20, ±35, ±50 eV) 良好な MS/MS スペクトルが得られ、迅速に 11 成分のすべてを同定することが可能となった。

経口血糖降下薬 (GLIB) 等が添加された健康食品 3 検体について本法を用いて分析したところ、GLIB を迅速に確認・定量することが可能であった。

以上のことから、本法は、経口血糖降下薬が添加された「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。

なお、生体試料中の経口血糖降下薬 7 成分について、LC/MS/MS を用いた一斉分析法が報告されている。<sup>11)</sup> 既報では、プロダクトイオンの 1 つが定量イオンとして設定されているが、今後われわれは、本報文の対象 11 成分について、定量及び確認イオンとして複数のプロダクトイオンを設定した、LC/MS/MS による迅速一斉分析法を検討したい。

謝辞 試料を提供して頂きました、神奈川県保健福祉部薬務課並びに神奈川県衛生研究所理化学部熊坂謙一氏、小島 尚氏に感謝申し上げます。

### REFERENCES

- 1) Date H., Toyota A., Terauchi M., Sugimura M., Matsuo T., Mochiike C., *YAKUGAKU ZASSHI*, **128**, 811-817 (2008).

- 2) ([http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/musyo\\_unin.html](http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/musyo_unin.html)), Ministry of Health, Labour and Welfare.
- 3) (<http://hfnet.nih.go.jp>), Information system on safety and effectiveness for health foods, National Institute of Health and Nutrition.
- 4) Kumasaka K., Kojima T., Honda H., Doi K., *J. Health Sci.*, **51**, (4), 453–460 (2005).
- 5) AbuRuz S., Millership J., McElnay J., *J. Chromatogr. B*, **817**, 277–286 (2005).
- 6) Ministry of Health, Labour and Welfare, “The Japanese Pharmacopoeia Fifteenth Edition,” 207 (2006).
- 7) Sugimura M., Matsuo T., Terauchi M., Toyota A., Date H., Morita A., Yamabe S., Tachino K., Abstract of papers, the 94th Annual Meeting of the Food Hygienics Society of Japan, Shizuoka, Oct. 2007.
- 8) Ministry of Health, Labour and Welfare, “The Japanese Pharmacopoeia Fifteenth Edition,” 1141–1142 (2006).
- 9) Kumasaka K., Aso Y., Doi K., Abstract of papers, the 18th Annual Meeting of Division of Physical and Chemical Research, Kanto-Kou-Shin-Sei Affiliate of Japan Association of Prefectural and Municipal Public Health Institute, Kofu, Feb. 2006.
- 10) Kumasaka K., Kojima T., Doi K., Satoh S., *YAKUGAKU ZASSHI*, **123**, 1049–1054 (2003).
- 11) Wang M., Miksa I. R., *J. Chromatogr. B*, **856**, 318–327 (2007).