調査・資料

GC-MS/MS によるダイエット健康食品中の医薬品成分分析法の検討

(平成 23 年 4 月 15 日受理)

山本新也^{*1,3} 墨岡成治¹ 藤岡正信¹ 三上栄一² 宮本謙一³

A Study on Detection of Drugs in Slimming Health Foods Using GC-MS/MS

Shinya YAMAMOTO^{*1,3}, Shigeharu SUMIOKA¹, Masanobu FUJIOKA¹,
Eiichi MIKAMI² and Ken-ichi MIYAMOTO³¹Toyohashi City Public Health Center (Institute of Public Health):
100 Nakahara, Nakano-cho, Toyohashi 441-8539, Japan;²Aichi Prefectural Institute of Public Health:

7-6 Nagare, Tsuji-machi, Kita-ku, Nagoya 462-8576, Japan;

³Department of Medicinal Informatics, Graduate School of Medicine, Kanazawa University:
13-1 Takara-machi, Kanazawa 920-8641, Japan;^{*}Corresponding author

The determination of five drugs, fenfluramine (FEN), *N*-nitrosafenfluramine (NFE), sibutramine (SIB), mazindol (MAZ) and phenolphthalein (PHP), was studied in slimming health foods using GC-MS/MS. These drugs have been detected at high rates, especially in slimming health foods. Prolonged or excessive consumption of non-approved or unauthorized pharmaceuticals may cause serious adverse health consequences. In this study, samples were extracted with methanol and ultrasonication. Analyses were performed by GC-MS/MS, using established MS/MS parameters in the electron ionization (EI) mode and chemical ionization (CI) mode. In the EI mode, the recoveries of five drugs from several types of slimming health foods such as tablets, capsules and tea-bags spiked at 1 µg/mg (except PHP, spiked at 4 µg/mg) were in the range of 85.0–110.7% and 100 µg/mg (except PHP, spiked at 200 µg/mg) were 94.9–102.9%, respectively. In the CI mode, good recoveries of 80.3–102.2% (spiked at low concentration) and 92.8–103.2% (spiked at high concentration) were also obtained. We evaluated the present method using four slimming health foods, in which drugs had previously been detected. The results were similar to the previous results. These findings indicate that the present procedure for evaluating five drugs in slimming health foods by means of GC-MS/MS is useful.

(Received April 15, 2011)

Key words: ダイエット健康食品 slimming health food; 無承認無許可医薬品 non-approved or unauthorized pharmaceuticals; ガスクロマトグラフィー / タンデム質量分析法 GC-MS/MS; 電子イオン化法 electron ionization mode; 化学イオン化法 chemical ionization mode

緒言

近年、健康食品における補完代替医療の考え方が普及し、多くの健康食品が流通するようになってきた。しかし、これら健康食品の中には、効果を高めるため本来医薬品に該当する成分を製品の中に混入させ、薬事法違反（無承認無許可医薬品）であるにもかかわらず健康食品として

製造、輸入、販売されている例が少なくない^{1)~5)}。医薬品成分が添加された健康食品は、消費者の健康に予期せぬ影響を及ぼす危険があり^{6), 7)}、健康被害が報告された場合、衛生行政機関は迅速かつ正確に原因物質の特定を行う必要がある^{*1}。現在、健康食品中の医薬品成分の同定、確認手法として、質量に関する情報が得られる LC-MS や GC-MS が汎用される^{*2}。一方 MS/MS は、MS の選択性

^{*} 連絡先: E-mail: yamamoto-shinya@city.toyohashi.lg.jp

¹ 豊橋市保健所 (衛生試験所): 〒441-8539 愛知県豊橋市中野町字中原 100

² 愛知県衛生研究所: 〒462-8576 名古屋市北区辻町字流 7-6

³ 金沢大学大学院医学系研究科: 〒920-8641 石川県金沢市宝町 13-1

^{*1} 厚生労働省医薬局長通知 “健康食品・無承認無許可医薬品健康被害防止対応要領について” 平成 14 年 10 月 4 日, 医薬発第 1004001 号

^{*2} 厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課長通知 “いわゆる健康食品と称する無承認無許可医薬品の監視指導について” 平成 14 年 7 月 29 日, 医薬監麻発第 0729009 号

が高められ、複雑な組成成分中の微量成分の定性、定量における精度、感度の改善が図られている⁸⁾ことより、近年急速に普及してきている装置である。GC-MS/MSは、GC-MSと比較して高選択性かつ定性能力も高い^{9), 10)}ため、複雑な原料からなる食品中の成分分析に向いていると考えた。著者らは、健康被害事例に迅速かつ正確に対応するため、これまでにダイエット健康食品中で検出された経緯のある^{11), 12)}フェンフルラミン (FEN), *N*-ニトロソフェンフルラミン (NFE), シブトラミン (SIB), マジンドール (MAZ), およびフェノールフタレイン (PHP) の5成分について、電子イオン化 (EI) 法と化学イオン化 (CI) 法の2種のイオン化法を使用した GC-MS/MS 一斉分析法を検討したので報告する。

実験方法

1. 試料

過去に医薬品成分が検出された市販健康食品4検体

(カプセル型3検体、ティーバッグ型1検体)と愛知県内で平成20年11月に購入した10検体(錠型5検体、カプセル型2検体、ティーバッグ型3検体)を用いた。

2. 試薬

標準品: FEN 塩酸塩, NFE, PHP は和光純薬工業(株)製, SIB 塩酸塩は LKT Laboratories 社製, MAZ はシグマアルドリッチ社製を用いた。これらの構造を Fig. 1 に示す。

メタノール: 和光純薬工業(株)製メタノール 5000 を用いた。

標準溶液: FEN 標準溶液と SIB 標準溶液は塩酸塩として, NFE 標準溶液, MAZ 標準溶液, PHP 標準溶液は各標準品を秤量後, メタノールで標準原液 (1 mg/mL) を調製した。各標準原液の一定量を採り混合した後, メタノールで希釈し, 検量線作成用溶液を調製した。添加用標準溶液は, 50 mg/mL の標準原液をメタノールで希釈し添加した。

Fig. 1. Chemical structures of drugs in this study.

Scheme 1. Analytical procedure for non-approved or unauthorized pharmaceuticals.

Table 1. Monitor ions and collision energies for GC-MS/MS

Drug	Monitor ion (<i>m/z</i>)						Collision energy (V)	
	Precursor		Quantitation		Qualifier			
	EI	CI	EI	CI	EI	CI	EI	CI
FEN	159	212 (Positive)	109	127	83	169	20	10
NFE	186	159 (Negative)	116	99	91	119	20	25
SIB	114	114 (Positive)	72	72	98	58	5	10
MAZ	266	267 (Positive)	204	204	238	231	20	25
PHP	274	318 (Negative)	181	180	257	273	15	25

Electron energy: 70 eV (EI), 150 eV (CI)

Fig. 2. Typical GC-MS/MS chromatograms of drugs

A: EI mode chromatograms of standard solution. B: CI mode chromatograms of standard solution.

Table 2. Detection limits of drugs in slimming health foods

Drug	Limit of detection (LOD, $\mu\text{g}/\text{mg}$, $S/N = 3$)					
	Tablet		Capsule		Tea-bag	
	EI	CI	EI	CI	EI	CI
FEN	0.005	0.001	0.005	0.0004	0.004	0.0005
NFE	0.03	0.002	0.02	0.002	0.03	0.001
SIB	0.001	0.0001	0.001	0.00004	0.0004	0.00004
MAZ	0.002	0.0005	0.002	0.001	0.002	0.0004
PHP	0.03	0.00005	0.02	0.00006	0.06	0.00004

3. 装 置

粉碎機: TESCOM 社製ミル&ミキサー, TML160 を用いた.

超音波洗浄機: シャープマニファクチャリングシステム(株)製, UT-205HS を用いた.

遠心分離機: Kubota 社製 8400 を用いた.

GC-MS/MS: Varian 社製 1200 シリーズ GC-MS/MS システム (1200 Quadrupole MS/MS, CP-3800 Gas Chromatograph, CP-8400 Autosampler) を用いた.

4. GC-MS/MS 測定条件

カラム: Varian 社製キャピラリーカラム VF-5MS+5 m EZ-Guard (30 m×0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μm, ガードカラム 5 m), カラム温度: 50℃で 2 分間保持した後, 20℃/min で 170℃まで昇温し, 直ちに 50℃/min で 320℃まで昇温, 5 分間保持, 注入口温度: 260℃, トランスファーライン温度: 280℃, イオンソース温度: 220℃, キャリヤーガス: ヘリウム (流量 1.5 mL/min), コリジョンガス: アルゴン, 注入量: 2 μL (スプリットレス注入), CI ガス: メタン

5. 試験溶液の調製

試験溶液の調製法を Scheme 1 に示す. 錠型のものは粉碎機にて粉末とし, カプセル型およびティーバッグ型の内容物を取り出した後粉末とし, それらの 50 mg を秤取, 10 mL 遠沈管に移した後メタノール 3 mL を加えた. その液を 10 分間超音波抽出した後, 遠心分離 (3,000 回転で 5 分間) を行った. 上清を採り, 残渣にメタノール 3 mL を加え, 同様の操作を行った. 上清を合わせ, メタノールにて正確に 10 mL としたものを試験溶液とした.

6. 定 量

検量線作成用溶液を GC-MS/MS に注入し, 3 回繰り返し測定することによって得られたクロマトグラムのピーク面積と標準成分量から EI, CI の各イオン化法ごとに検量線を作成した. 試験溶液は適宜希釈し, 検量線法により各医薬品成分濃度を求めた.

結果および考察

1. MS/MS 測定条件の検討

三上ら¹³⁾は, EI と CI の両法を用いて GC-MS にて中国

Table 3. Recoveries of drugs from several types of slimming health foods using GC-MS/MS

Drug	Initial single dosage (mg)	Spiked level (μg/mg)	Recovery (%)					
			Tablet		Capsule		Tea-bag	
			EI	CI	EI	CI	EI	CI
FEN	20	1	85.0±2.1	80.3±6.2	90.8±4.2	82.8±8.9	95.1±4.1	90.3±5.2
		100	99.1±2.9	99.0±1.6	97.6±2.8	98.9±1.3	97.1±1.8	96.8±1.5
NFE	*	1	100.8±2.9	87.6±8.4	95.9±6.4	99.9±7.1	96.7±3.0	89.0±5.1
		100	98.0±2.6	92.8±2.6	99.7±4.0	101.7±3.4	99.9±3.7	95.9±4.9
SIB	10	1	101.0±3.1	94.9±8.1	98.9±3.8	94.8±6.2	96.5±1.6	93.3±7.6
		100	94.9±3.6	97.2±3.6	97.3±2.9	95.0±3.7	100.3±2.3	96.0±3.3
MAZ	1	1	93.7±4.3	86.7±7.1	99.7±2.6	85.2±3.9	100.5±3.3	91.6±4.2
		100	98.0±3.0	98.2±5.2	98.6±3.5	95.4±2.6	100.5±1.4	95.4±3.0
PHP	60	4	110.7±3.8	93.0±7.7	102.3±3.1	102.2±8.6	100.9±5.2	82.9±1.9
		200	101.7±2.6	98.2±2.2	101.7±2.5	97.6±1.7	102.9±0.8	103.2±2.6

Data are represented the means ± S.D. (n=5).

* FEN derivative

Table 4. Analytical results of drugs in slimming health foods

No. of sample	Type	Weight (mg/unit)	Mode	Concentration (mg/unit)				
				FEN	NFE	SIB	MAZ	PHP
1	Tea-bag	2,912.0	EI	8.7	ND	ND	ND	ND
			CI	8.5	ND	ND	ND	ND
2	Capsule	220.0	EI	ND	4.5	ND	ND	ND
			CI	ND	5.2	ND	ND	ND
3	Capsule	396.2	EI	ND	ND	6.3	1.0	124.1
			CI	ND	ND	6.3	1.0	124.5
4	Capsule	216.5	EI	ND	ND	8.4	ND	15.8
			CI	ND	ND	8.2	ND	16.2

ND: < LOD, see Table 2.

Retention time

Fig. 3. Typical GC-MS/MS chromatograms of drugs in slimming health foods
A: Sample 1, B: Sample 2, C: Sample 3, D: Sample 4

製ダイエット茶葉中のFENの確認を行っている。本研究では、高感度かつ高い選択性を有したMultiple Reaction Monitoring (MRM)法でEIおよびCI法それぞれの測定条件を作成した(Table 1)。各成分の標準溶液を装置に注入し、フルスキャンにて高分子側で強度の強いイオンを選択し、ブリーカーイオンとした後、特徴的な2種のプロダクトイオンを選択し、感度の高いものを定量イオン、他方を確認イオンとした。そして、各成分のプロダクトイオンを最も効率的に生成させるコリジョンエネルギーを検討した。なおCI法では、FEN, SIB, MAZがポジティブ、NFE, PHPがネガティブモードによって取り込むことで高い感度が得られた。本条件により分析した標準溶液の代表的なクロマトグラムをFig. 2に示す。これより、EIおよびCI法ともに13.5分以内にすべての成分を検出することができた。

2. 検量線および検出限界

作成した条件を用いて5成分を同時検出したときに、クロマトグラム上で5つのピークを同時に観察しやすい濃度範囲で検量線を作成したところ、EIおよびCI両法においてFEN, NFE, MAZはそれぞれ0.5~5 µg/mL, SIBは0.25~2.5 µg/mL, PHPは12.5~100 µg/mLの濃度範囲で相関係数0.999以上の良好な直線性を示した。また、S/N比が3となる値をクロマトグラム上から検出限界として算出し、試料中濃度に換算した値をTable 2に示す。

3. 添加回収実験

添加回収実験の結果をTable 3に示す。対象成分を含有していないことをあらかじめ確認した錠剤型、カプセル型、ティーバッグ型の各1試料を粉碎後50 mg秤取した。各医薬品成分の初期薬用量を参考に2濃度の添加用標準溶液を調製、添加した後Scheme 1に従って試験溶液を作製した。なお、PHPは1998年に医薬品としての製造が中止されているため、過去の薬用量を参考とした¹⁾。1 µg/mg (PHPについては4 µg/mg)を添加した場合、EI法で85.0~110.7%, CI法で80.3~102.2%の回収率が得られた。一方、100 µg/mg (PHPについては200 µg/mg)を添加した場合、EI法で94.9~102.9%, CI法で92.8~103.2%の回収率が得られた。以上の結果は、5成分がわずかに添加された濃度から効果を発揮する量を添加した濃度まで分析できる方法であることを示唆するものである。また本法は、高速液体クロマトグラフィーで健康食品分析を行った際に疑わしい成分が検出された場合でも有効な確認手段になりえらる。

4. 市販品への応用

本法を用いて市販健康食品14検体の分析を行った。過去に医薬品成分が検出された検体1 (ティーバッグ型) からFENとして8.7 mg/unit (EI法), 8.5 mg/unit (CI法), 検体2 (カプセル型) からNFEとして4.5 mg/unit (EI法), 5.2 mg/unit (CI法), 検体3 (カプセル型) からSIBとして6.3 mg/unit (EI法), 6.3 mg/unit (CI法), MAZとして1.0 mg/unit (EI法), 1.0 mg/unit

(CI法), PHPとして124.1 mg/unit (EI法), 124.5 mg/unit (CI法), 検体4 (カプセル型) からSIBとして8.4 mg/unit (EI法), 8.2 mg/unit (CI法), PHPとして15.8 mg/unit (EI法), 16.2 mg/unit (CI法)を検出し、EIおよびCI両法の定量値は互いに近似するものであった。以上4検体の結果をTable 4に、その際のクロマトグラムをFig. 3に示す。一方、平成20年11月に購入した10検体中に対象医薬品成分が検出されたものはなかった。

ま と め

ダイエット効果を標榜した健康食品中の医薬品5成分についてGC-MS/MSによる一斉分析法を検討した。各成分について適切なプロダクトイオンとコリジョンエネルギーを設定することができた。そして、EIとCIの2種のイオン化法を用いて分析を行ったところ、各法ともに良好な回収率と定量結果を得ることができた。また、定量までの一連の操作は1検体当たり約80分で完結し、迅速性を求められる健康危機管理対策上の行政検査に対しても本法は十分な有効性を示すものと考えられる。

文 献

- 1) 内藤裕史. “第I部 痩せ薬”. 健康食品中毒百科. 東京, 丸善, 2007, p. 3-71. (ISBN 978-4-621-07840-2)
- 2) Flurer, C. L., Lin, L. A., Satzger, R. D., Wolnik, K. A. Determination of ephedrine compounds in nutritional supplements by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B*, **669**, 133-139 (1995).
- 3) Takagi, T., Kimoto, S., Makino, Y., Nasu, M. Components of herbal ecstasies. *Eisei Kagaku (Jpn. J. Toxicol. Environ. Health)*, **43**, 197-201 (1997).
- 4) Seto, T., Shioda, H., Satoh, K., Hamano, T., Onishi, K. Detection of senna and rhubarb used only as drugs from herbal teas advertising effect of weight reduction. *Eisei Kagaku (Jpn. J. Toxicol. Environ. Health)*, **44**, 195-203 (1998).
- 5) Yasuda, I. The medical supplies resemblance ingredient in health foods. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **51**, 402-407 (2010).
- 6) Nelson, L., Shih, R., Hoffman, R. Aplastic anemia induced by an adulterated herbal medication. *Clin. Toxicol.*, **33**, 467-470 (1995).
- 7) Kojima, T., Kishi, M., Sekita, S., Satake, M. Origin of sennosides in dietary supplements containing senna stem. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **41**, 303-306 (2000).
- 8) 熊谷浩樹. “機器分析—その測定と実際—18. 液体クロマトグラフィー / 質量分析法”. 分析化学実験の単位操作法. 社団法人日本分析化学会編, 東京, 朝倉書店, 2004, p. 182-186. (ISBN 4-254-14063-0)
- 9) Takeda, K., Ishiguro, Y., Tanaka, R., Maruyama, J., Kasamatsu, T., Okawa, S., Hori, S. Study on the determination of pesticide residues in crops by ion-trap GC/MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg.*

- Soc. Japan), **43**, 280-288 (2002).
- 10) Inoue, T., Sasaki, S., Uchikawa, S., Hirahara, Y., Shiomi, Y., Tonogai, Y. Determination of low-level pesticides residues in agricultural products by ion-trap GC/MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **44**, 310-315 (2003).
- 11) 三上栄一, 大野 勉, 岡 尚男, 石原廣男. 個人輸入したダイエット食品に検出された医薬品成分に関する検討, *医療薬学*, **31**(1), 52-57 (2005).
- 12) 三上栄一, 池田清栄, 大野 勉. ダイエット用健康食品(美秀堂, 加强型)に添加された医薬品成分の検索. *愛知県衛生研究所年報*, **58**, 29-35 (2008).
- 13) 三上栄一, 後藤智美, 大野 勉, 早川順子, 加賀美忠明. 中国産減肥茶に添加された食欲抑制剤(フェンフルラミン)の分析. *愛知県衛生研究所年報*, **48**, 9-13 (1998).