

39. 健康被害の防止を目的とした健康食品中の 違法添加医薬品の簡易迅速分析法の開発

○赤松 成基¹、三橋 隆夫¹、三村 昌司¹、中原 武志²

(¹兵庫県立健康生活科学研究所、²兵庫県健康福祉部健康局薬務課)

【緒言】

近年、人々の健康に対する関心が高まっており、健康食品は、その効率的な栄養補給や疾病予防効果等を期待して幅広い年代に利用されている。しかし、国内においても違法に医薬品成分が添加された製品（無承認無許可医薬品）による健康被害も報告されている。特に、痩身目的で個人輸入された「ホスピタルダイエット」等では、死亡に至ったケースもある。また、違法添加の医薬品成分は多岐にわたり、痩身目的のものでは下剤のほか、向精神薬や利尿剤等の検出例がある。

これら無承認無許可医薬品による健康被害を未然に防ぐためには、市販健康食品のモニタリング監視体制を強化し、違反製品を流通させないことが重要であり、医薬品成分の簡易迅速分析法が求められている。さらに、健康被害が発生した場合においても、迅速分析法は原因成分の特定および治療法の選択に有効である。

迅速分析法のうち、キャピラリー電気泳動（CE）は、高分解能を有し、試料や試薬消費量が少ないという特長から、スクリーニング分析法として有用で、法科学分野においても注目されている。本研究では、キャピラリー電気泳動質量分析計（CE/MS）を用いて、違法添加のおそれのある利尿剤や下剤、向精神薬等を含む 20 種の医薬品成分の一斉分析法を開発した。また、この分析法を用いて 12 種の痩身用健康食品を分析した。

【実験方法】

1) 試料

錠剤やカプセルを含む様々な形状の 12 種の痩身用健康食品を用いた。2 製品は、県内において服用後健康被害を生じたため、健康福祉事務所（保健所）に持ち込まれたものを用いた。残りの 10 製品は県内の店舗で販売されているものを用いた。

2) 試薬

標準品のうち、トリクロルメチアジド、トリアムテレン、スピロラクソン、フェノールフタレイン、フェンテルミン塩酸塩、(±)-フェンフルラミン塩酸塩、マジンドール、ジアゼパムは、Sigma-Aldrich 製を用いた。フロセミド、スルホコハク酸ビス(2-エチルヘキシル)ナトリウム（ジオクチルスルホサキシネート）、フルオキセチン塩酸塩は、東京化成工業製を用いた。また、センノシド A、センノシド B、脱 N-ジ

メチルシブトラミンクエン酸塩、N-ニトロソフェンフルラミンは、和光純薬工業製を用いた。ヒドロクロロチアジド、アセタゾラミド、ピサコジル、ピコスルファートナトリウム、シブトラミン塩酸塩は、それぞれ医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団（旧 日本公定書協会）製、Alfa Aesar 製、Fluka 製、U.S.Pharmacopeial Convention 製、Enzo Life Sciences 製を用いた。その他の試薬は、和光純薬工業製を用いた。

メタノール、アセトニトリルは、和光純薬工業製 LC 用を用いた。

3) 装置

CE/MS は、Agilent 製 7100CE、6410 トリプル四重極質量分析計を用いた。キャピラリーは、内径 50 μm 、長さ 90 cm のフューズドシリカを使用し、泳動液には 20 mM ギ酸アンモニウム溶液（20 %アセトニトリル含有、pH 8.0）を用いた。注入は 50 mbar \times 30 s 加圧注入、印可電圧は+30 kV、キャピラリー温度は 40 $^{\circ}\text{C}$ とした。シース液は、5 mM ギ酸アンモニウムと 0.1 %ギ酸の 50 %メタノール溶液とし、8 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流量とした。

MS 部は、MRM（多重反応モニタリング）モードで測定し、詳細なパラメータは表 1 に示した。キャピラリー電圧は、4000 V (pos)/ 3500 V (neg)、ネブライザーガスは 10 psi N_2 ガス、乾燥ガスは 300 $^{\circ}\text{C}$ 、10 L/min N_2 ガスを用いた。

4) 試料前処理

試料が錠剤の場合は粉碎したもの、またカプセルの場合は外して中身を取り出したものを約 20 mg 正確に量り、70 %メタノール 1.0 mL を加えて超音波抽出を行った。次に遠心分離を行い、得られた上澄液 0.1 mL に水 0.4 mL、内部標準液（0.5 mg/mL 4-アミノピリジン）を 10 μL 加えたものをフィルターろ過して試験溶液とした。

【結果及び考察】

1) 泳動液の検討

質量が測定できる MS を用いた分析法においても、物質の同定に関して、CE 分離における泳動時間の情報は重要である。そのため、CE 条件の最適化を行った。CE による分離は、電場中での溶質の移動速度の差に基づいており、移動速度は溶質のイオン半径（大きさ）と電荷に影響される。

泳動液の pH を 3.0 から 10.0 まで 0.5 刻みで変化させ、またアセトニトリル含量を 10 %から 50 %まで 10 %刻みで変化させた時の分離を比較した。20 種の分析対象化合物のうち、分子量が同じであるマジンドールとジアゼパム、センノシド A とセンノシド B の 2 組 4 化合物の分離に重点をおいて比較した結果、pH 8.0、20 %アセ

表 1. 20 化合物の MRM パラメータ

Therapeutic	Compound	ESI	Transition	Fragmentor	Collision
Diuretic	Furosemide (1)	Neg	329.0 → 285.0 ^{a)}	- 130	- 5
			329.0 → 205.0		- 21
	Trichloromethiazide (2)	Neg	377.9 → 242.0 ^{a)}	- 170	- 17
			377.9 → 305.9		- 5
	Hydrochlorothiazide (3)	Neg	295.9 → 269.0 ^{a)}	- 170	- 17
			295.9 → 205.0		- 21
Triamterene (4)	Pos	254.1 → 237.1 ^{a)}	170	25	
		254.1 → 104.0		45	
Spironolactone (5)	Pos	341.3 → 107.1 ^{a)}	170	33	
		341.3 → 91.0		55	
Acetazolamide (6)	Pos	223.0 → 181.0 ^{a)}	90	9	
		223.0 → 163.9		21	
Cathartic	Dioctyl sulfosuccinate (7)	Pos	440.3 → 181.0 ^{a)}	50	17
			440.3 → 71.1		13
	Bisacodyl (8)	Pos	362.1 → 184.1 ^{a)}	130	25
			362.1 → 167.1		55
	Sennoside A,B (9,10)	Pos	270.0 → 196.1 ^{a)}	210	33
			270.0 → 151.1		55
Picosulfate (11)	Pos	438.0 → 184.1 ^{a)}	50	33	
		438.0 → 358.0		13	
Phenolphthalein (12)	Pos	319.1 → 225.1 ^{a)}	130	17	
		319.1 → 141.1		45	
Appetite depressant	Phentermine (13)	Pos	150.1 → 91.0 ^{a)}	50	21
			150.1 → 133.1		5
	Sibutramine (14)	Pos	280.2 → 125.0 ^{a)}	50	29
			280.2 → 139.0		9
	N-didemethylsibutramine (15)	Pos	252.1 → 125.0 ^{a)}	50	25
			252.1 → 139.0		5
Fenfluramine (16)	Pos	232.1 → 159.0 ^{a)}	90	21	
		232.1 → 109.0		49	
N-nitrosofenfluramine (17)	Pos	261.1 → 159.0 ^{a)}	50	21	
		261.1 → 109.0		53	
Mazindol (18)	Pos	285.1 → 130.0 ^{a)}	50	37	
		285.1 → 102.0		55	
Antidepressant	Fluoxetine (19)	Pos	310.1 → 148.1 ^{a)}	50	5
			310.1 → 91.1		55
	Diazepam (20)	Pos	285.1 → 193.1 ^{a)}	170	33
			285.1 → 222.1		25
IS	4-aminopyridine	Pos	95.1 → 78.0 ^{a)}	50	25
			95.1 → 52.1		45

^{a)} The quantification ion transition.

トトリル溶液が最適であった。

次に、ギ酸アンモニウム濃度を検討し、分析時間や電流安定性の観点から 20 mM とした。

2) シース液の検討

シース液はキャピラリーのアウト側で泳動液と混合され、インターフェースでスプレーされる。シース液は、イオン化効率や検出感度にも影響を与えるため、メタノール含量について検討した。メタノール含量が増えると、感度が上がる傾向が見られたが、50 %を超えるとほぼ一定となった。そのため、メタノール含量は 50 %とした。また、シース液の流速を変化させたところ、顕著な違いは見られなかったため、8 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流量とした。

3) 添加回収試験

ブランク試料に 20 種の標準試料を添加したものを分析した。図 1 にエレクトロフェログラムを示した。添加濃度は、それぞれのピーク強度を考慮して、フェンテルミン、フェンフルラミンは 0.125 mg/g、スピロノラクトン、ジオクチルスルホサクシネート、ピコスルファート、フルオキセチンは 2.5 mg/g、アセタゾラミド、センノシド A、センノシド B、マジンドールは 6.25 mg/g、フロセミド、トリクロルメチア

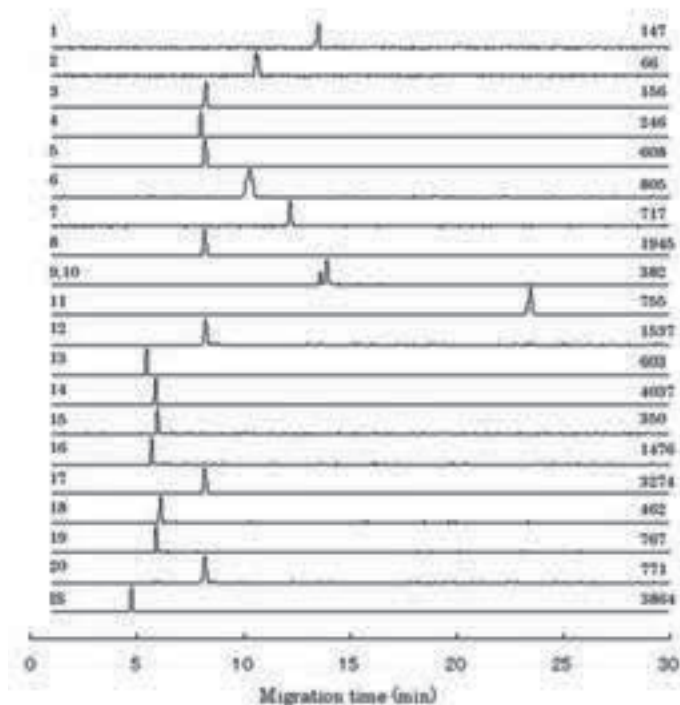


図 1. 添加回収試験で用いたサンプルの MRM エレクトロフェログラム。左側の数値：化合物番号（表 1）、右側の数値：各エレクトロフェログラムの最大ピーク強度。

ジド、ヒドロクロロチアジドは 12.5 mg/g、その他は 0.5 mg/g とした。5 試行の平均回収率は、80.4 %から 101.1 %であり、ルーチン分析に有用であることがわかった。

4) 実試料への適用

12 製品のうち、県内の店舗で販売されていた 10 製品については、これらの医薬品成分は検出されなかった。しかし、服用後健康被害を訴えた 2 製品からは医薬品が検出された。

白色錠剤 1 製品からは、国内未承認の食欲抑制剤フェンテルミンが 111mg/g (約 14 mg/錠) 検出された。米国 FDA の成人服用量は 30 mg/日であることから、健康被害の原因物質と考えられた。また、もう 1 製品のコーヒー粉末からも国内未承認の食欲抑制剤シブトラミンが検出された。シブトラミンの服用量は 10 mg/日であるが、1 回分の粉末からは服用量を超える約 14 mg が検出された。

【結論】

痩身用健康食品に混入しうる 20 種の医薬品成分について CE/MS を用いた分析法を開発した。本分析法は、LC/MS 法と比べ、試薬消費量も少なく、機器のコンディショニングにかかる時間が短縮できるため、スクリーニングとして有用であると思われる。

【謝辞】

本研究を実施するにあたり、協力していただきました各健康福祉事務所の関係者の方々に深謝いたします。

【経費使途明細】

内容	金額 (円)
標準品・サンプル購入費	40,358
分析器具購入費 (デジタルシリンジ、メンブランフィルター等)	102,018
消耗品購入費 (プリンターインク、USB メモリ、機器メンテナンス部品等)	103,429
書籍購入費・文献複写代	39,879
旅費 (受贈式出席、サンプル購入)	2,180
水道光熱費	17,136
合計 (受贈金 300,000 円、受贈式出席旅費 5,000 円)	305,000