

LC/MS/MS を用いた痩身及び強壯用医薬品の一斉分析法の検討

西川 徹・馬場 強三・村上 正文

Study of Simultaneous Analytical Method of Drugs Using for Slimming and Tonic by
Liquid Chromatography / Tandem Mass Spectrometry

Toru NISHIKAWA, Tsuyomi BABA, Masafumi MURAKAMI

A simple method using liquid chromatography/tandem mass spectrometry for simultaneous determination of 8 drugs using for slimming and tonic in health foods was studied. Mass spectral acquisition was done by applying multiple reaction monitoring (MRM).

The slimming and tonic drugs were extracted by acetonitrile-methanol (50:50, v/v) using ultrasound, and the extracts were clarified for centrifugation. The supernatant was analyzed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. The slimming and tonic drugs were separated by reversed-phase LC using Super ODS column and determined by electrospray ionization tandem mass spectrometry.

The recoveries of 8 drugs spiked to commercially available health foods using for slimming and tonic were more than 90 %, and each coefficient of variation was less than 10 %, respectively.

We investigated commercially 10 health foods by this analytical method, no drugs was detected in any samples.

Key words: liquid chromatography / tandem mass spectrometry (LC/MS/MS), Simultaneous analytical method, Health food, Slimming drugs, Tonic drugs

キーワード: 高速液体クロマトグラフータンデム質量分析、一斉分析法、健康食品、痩身用医薬品、強壯用医薬品

はじめに

近年の健康ブーム・健康志向の高まりから、国民の健康に対する関心は高くなっている。なかでも健康食品は手軽に購入できることから、店頭販売だけでなく、新聞やインターネット、テレビ等を介した通信販売により広く流通している。

健康食品には国が安全性や有効性等を設定した規格基準を満たした食品である「保健機能食品」と、一般的に普通の食品よりも健康に良いと称されている「いわゆる健康食品」があるが、痩身及び強壯効果を標榜した「いわゆる健康食品」に医薬品成分が混入されているケースがしばしば報告され、その医薬品成分の副作用による重大な健康被害が問題となっている。特に中国製ダイエット用健康食品による健康被害事例では、死者が 4 人を含み約 800 名に健康被害が報告されている。また平成 17 年 5 月に発生した「天天素」という健康食品に医薬品(シブトラミン、マジンドール)が含まれており、「天天素」の服用により 33 都道府県で死亡 1 人を含み 100 人以上に健康被害が生じた例も報告されている。

また一方で、滋養強壯効果を目的とした健康食品に医薬品及び医薬品類似物質が混入されているパターンも最近増加しており、平成 17 年だけで 36 件の事例が報告されている。今のところ重大な健康被害は発生していないものの、今後も注意が必要である。

そこで、いわゆる健康食品に混入された医薬品等による健康被害に対応するために、代表的な痩身用医薬品 4 種及び強壯用医薬品 4 種について、LC/MS/MS を用いた簡易で高感度・高選択性のある分析法の検討を行なったので報告する。

調査方法

1 試料及び試薬

① 試料

長崎県内で流通している痩身用医薬品 5 検体及び、強壯用医薬品 5 検体を用いた。

② 標準品及び標準原液

痩身用医薬品はシブトラミン、マジンドール、フェンブ

ルラミン、N-ニトロソフェンフルラミンを、強壯用医薬品としてはシルデナフィル、ホンデナフィル、タダラフィル、バルデナフィルを検査対象物質とした。強壯用医薬品4種については国立医薬品食品衛生研究所より分与していただいた。これらの各標準品10mgをメタノールに溶解して20mlとし、標準原液とした。さらに各標準原液をアセトニトリル-水(10:90)で希釈して、混合標準溶液を調整した。

③ 試薬

蒸留水、メタノール、アセトニトリルは関東化学社(株)製の高速液体クロマトグラフ用を用いた。

2 分析装置及び条件

(1) 高速液体クロマトグラフ

高速液体クロマトグラフには島津製作所製LC-VPシステムを使用し、分析カラムは東ソー(株)社製 TSK-gel Super ODS(2.0mm i.d.×100mm、粒子径 2 μ m)を用いた。

カラム温度は室温とし、移動相はA液に 0.1%ギ酸溶液、B液にアセトニトリルのグラジエント分析を以下の条件で行った。また、流速は 0.2 ml/min、試料注入量は 5 μ l とした。

Time (min)	A 液(%)	B 液(%)
0	90	10
3	90	10
10	30	70
15	30	70
15.1	90	10
20	90	10

(2) 質量分析装置

Applide Biosystems 社製 API2000 を用いた。イオン化はエレクトロスプレー (ESI) によるポジティブイオン化法により行った。イオンスプレー電圧は 3.5kv、イオン源温度は 500°Cに設定した。

各医薬品の条件については Table1に示した。

3 分析方法

錠剤及び散剤については乳鉢で粉末にしたものを、カプセル剤についてはその中身を 200mg 採取し、これにアセトニトリル-メタノール(50:50)10mlを加え、超音波により10分間抽出した。これを 3000rpm、5分間遠心分離した後、上清をとりアセトニトリルで 20mlにメスアップし、0.2 μ mのフィルターでろ過して試験液とした。

また、回収試験は各医薬品 10 μ g をそれぞれの健康食品に添加し、溶媒を窒素パーージにより留去してから上記方法により行った。

定量は各医薬品 0.1、0.25、0.5、1.0 μ g/ml の濃度で検量線を作成し、絶対検量線法により行った。

結果と考察

1 分析条件の検討

① 液体クロマトグラフ条件の検討

カラムについては幅広い極性に対応できる ODS 系のカラムである東ソー(株)社製 TSK-gel Super ODS(2.0mm i.d.×100mm、粒子径 2 μ m)を用い、0.1%ギ酸-アセトニトリル系でグラジエント分析したところ、ピーク形状は良好であった。1回の分析時間は 15分としたが、機器を安定させるため、5分間安定化した。

② 質量分析計の条件の検討

イオン化はESIによるポジティブイオン化によって行い、イオンスプレー電圧やイオン源温度等のイオンソースの

Table1. Retention time and compound-specific ESI-MS/MS parameters.

Compound	RT (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Declustering Potential(V)	Collision Energy(V)
vardeafil	8.4	489.3	72.4	66	63
hongdenafil	8.5	467.3	111.1	31	43
mazindol	8.6	285.1	242	11	29
fenfluramine	8.6	232.2	159	26	33
sildenafil	8.9	475.0	58.1	46	63
tadarafil	9.9	390.1	268.1	26	19
sibutramine	10.3	280.3	125.1	21	21
N-nitrosofenfluramine	11.7	261.2	159.0	21	27

パラメーターは、比較的感度の低いソバルデナフィルやホンデンナフィルの感度が最大になるようフローインジェクションアナリシス(FIA)により最適な条件を決定した。また化合物ごとの最適条件については、インフュージョンポンプを用いたMRM法により決定した。Table1に化合物ごとの条件を示す。

Fig1に本条件で得られた痩身用医薬品のマススペクトルを、Fig2に強壯用医薬品のマススペクトルを示す。

各医薬品 0.1、0.25、0.5、1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で検量線を作成したところ、すべて相関係数 0.999 以上と良好な検量線を得た。

本条件による各医薬品の検出下限値(S/N=3)及び定量下限値(S/N=10)は Table2 のとおりであり、検出下限値は 2ppb 以下と高感度であった。

Table2 Detection limit and Quantitation limit of drugs.

Drugs	Detection Limit(ng/g)	Quantitation limit (ng/g)
vardeafil	1.5	5.0
hongdenafil	2.0	6.7
mazindol	0.2	0.7
fenfluramine	0.02	0.07
sildenafil	0.05	0.17
tadalafil	0.4	1.4
sibutramine	0.06	0.2
N-nitrosfenfluramine	0.15	0.50

2 前処理法の検討

痩身及び強壯用の各医薬品の分析において、通知法ではアセトニトリル-水(50:50)溶液による抽出、メタノール溶液による抽出、0.1%ギ酸-アセトニトリル(1:4)溶液による抽出、28%アンモニア水混和後の酢酸エチル抽出、他にも 0.1%リン酸-メタノール(50:50)溶液による抽出などが報告されているが¹⁴⁾、各医薬品によって抽出法が大きく異なっている。そこで、各医薬品を同時に抽出するために、水、メタノール、アセトニトリル溶液又はこれら 2 種類若しくは 3 種類の混合液での各医薬品の抽出状況を検討したところ、アセトニトリル-メタノール(50:50)により各医薬品とも良好な回収を得たので、抽出溶媒はアセトニトリル-メタノール(50:50)とした。

また、本法では精製を省略しているが、試料 200mg を 20ml にメスアップしているため、マトリクス成分のイオン化に及ぼす影響はほとんどみられなかった。よって絶対

検量線法により定量を行なった。

3 回収試験

各医薬品 10 μg をそれぞれの健康食品に添加し、回収試験を行なったところ、本法における各医薬品の回収率は 90~116%であり、変動係数も 10%未満と良好であった(Table3)。

Table3 The recoveries of 8 drugs from health foods.

Drugs	Recovery (%)	CV (%)
vardeafil	96.0	4.0
hongdenafil	99.9	9.4
mazindol	90.1	3.3
fenfluramine	108.0	2.7
sildenafil	96.6	2.6
tadalafil	115.9	2.4
sibutramine	102.4	2.8
N-nitrosfenfluramine	102.6	2.8

4 市販の健康食品調査

県内で流通している痩身用健康食品 5 検体及び強壯用健康食品 5 検体について、本法を用いて検査したところ、今回検討した医薬品は含まれていなかった。

また、妨害ピークもみられなかった。

まとめ

今回、LC/MS/MS を用いて、いわゆる健康食品に混入されるおそれのある痩身及び強壯用医薬品 8 種類の一斉分析法を検討した。

前処理法では、アセトニトリル-メタノールの(50:50)混合液により抽出し、遠心分離後上清を LC/MS/MS で測定した。測定条件は ESI ポジティブモードを採用し、移動相には 0.1%ギ酸-アセトニトリル系を用いてグラジエント分析により行なった。また、カラムは TSK-gel Super ODS を用いた。

本法による検出下限値(S/N=3)は 0.02~2 ng/g、定量下限値(S/N=10)は 0.07~6.7 ng/g と高感度であり、添加回収率も 90%~116%と良好であった。また、マトリクス成分のイオン化に及ぼす影響はほとんどみられなかった。

以上により、今回検討した分析法は簡易で高感度であり、健康食品中の痩身及び強壯用医薬品の分析法として有用であると考えられる。

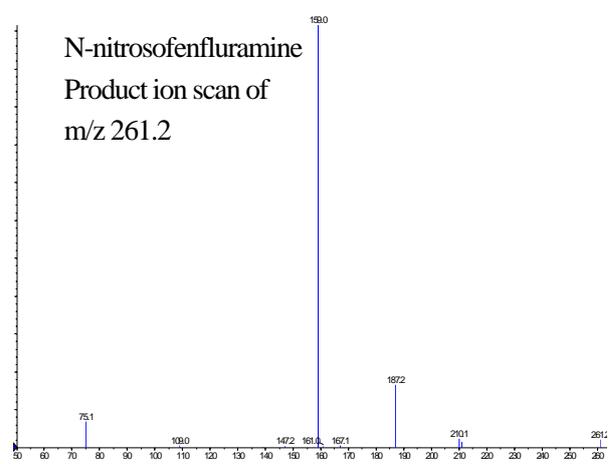
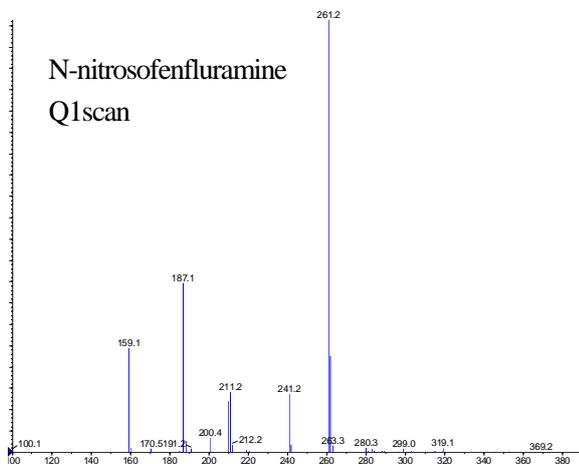
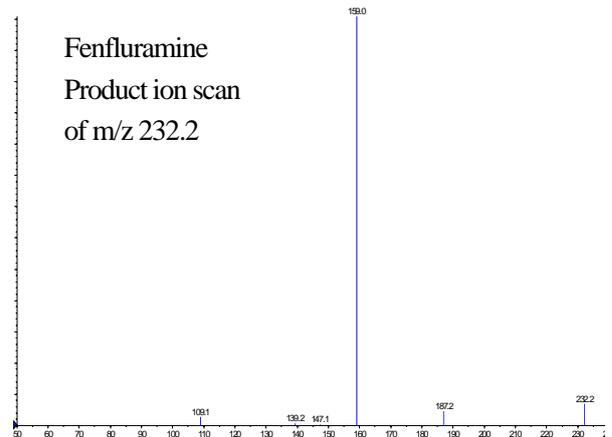
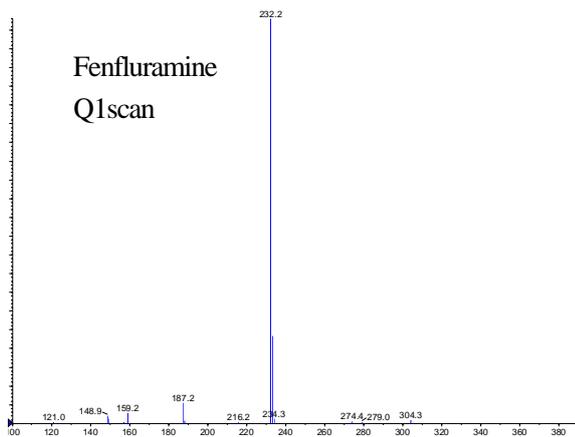
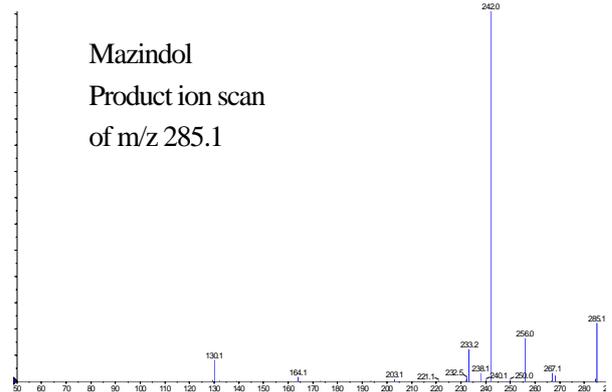
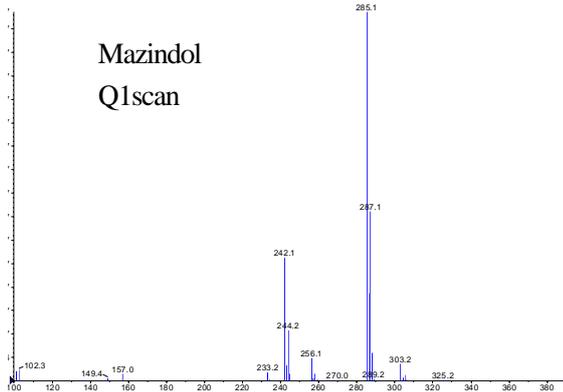
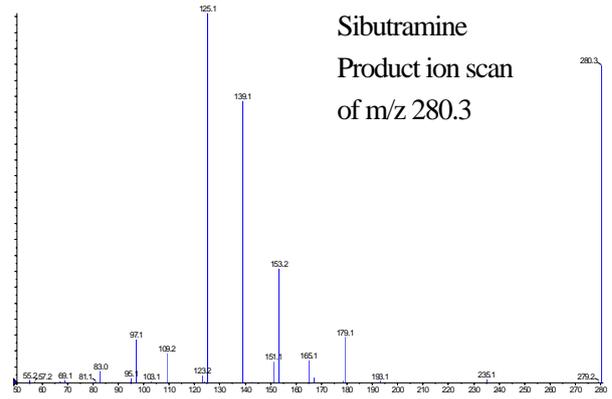
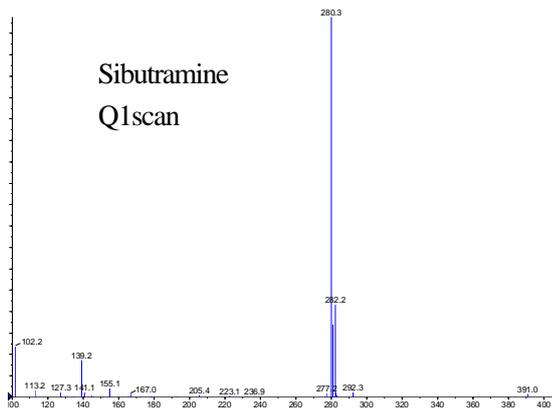


Fig1: Full scan mass spectra and product ion spectra of slimming drugs.

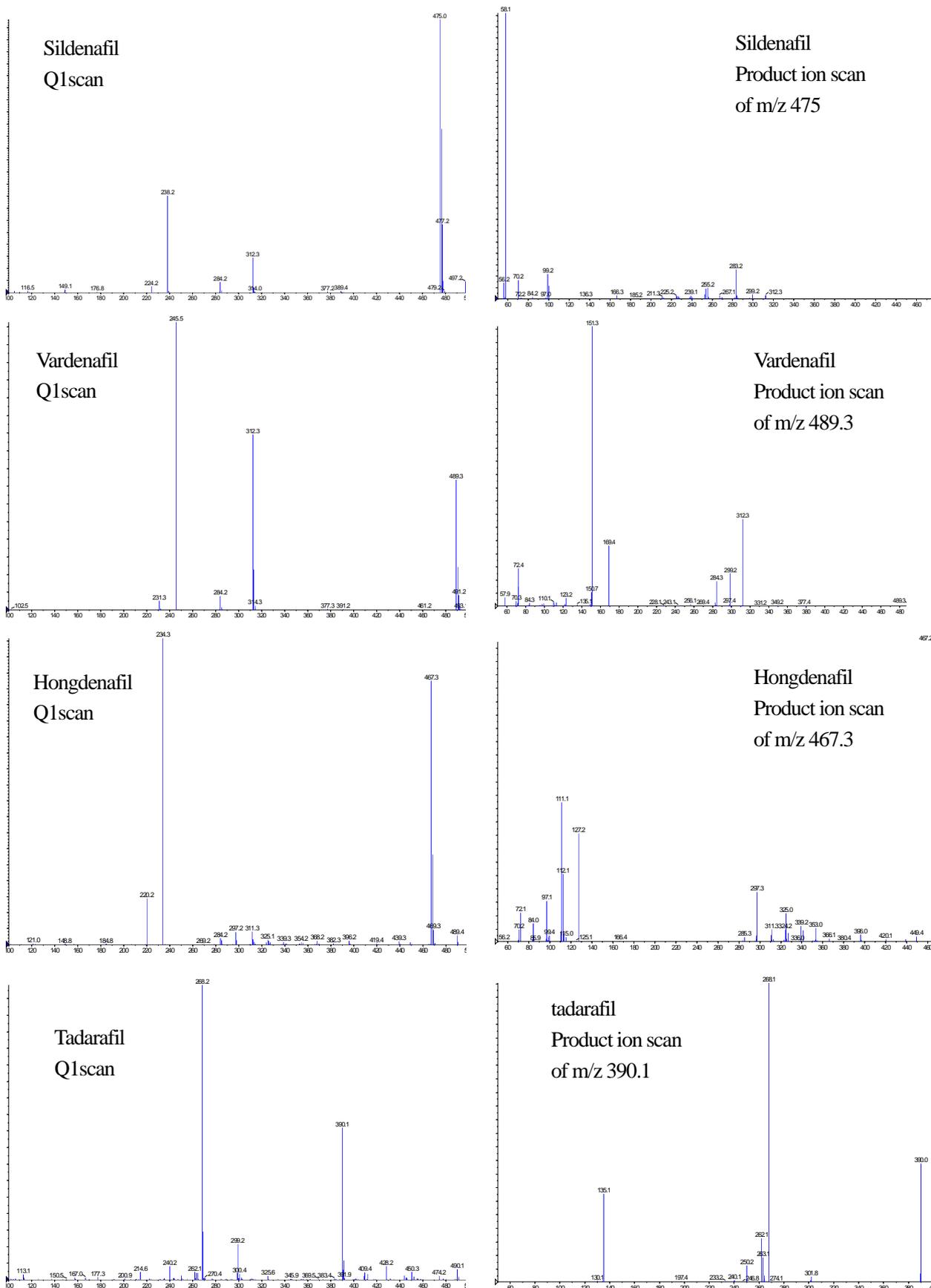


Fig2: Full scan mass spectra and product ion spectra of tonic drugs.

参 考 文 献

- 1) 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
- 2) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知「シルデナフィル、バルデナフィル及びタダラフィルの迅速分析法について」平成 17年8月25日、薬食監麻発第0825002号
- 3) 岐阜県保健環境研究所報「健康食品中のフェンフルラミン等 12 物質の固相抽出法による分析について」第 12 号、25～33,(2004)
- 4) Liang Q, et al: Rapid and reliable determination of illegal adulterant in herbal medicines and dietary supplements by LC/MS/MS. J Pharm Biomed Anal, 40(2),305～311,(2006)

