

いわゆる健康食品及び違法ドラッグ製品に含まれた植物由来成分の検出事例について

高橋 市長、長谷川貴志、西條 雅明、石井 俊靖、
永田 知子、川原 信夫¹⁾、合田 幸広¹⁾

Plant Components in Dietary Supplements and Illegal Drug

Kazunaga TAKAHASHI, Takashi HASEGAWA, Masaaki SAIJO, Toshiyasu ISHII,
Tomoko NAGATA, Nobuo KAWAHARA¹⁾ and Yukihiko GODA¹⁾

要 旨

不明ピークを有する健康食品及び違法ドラッグ3製品について更なる検討を行ったところ、植物由来成分であるルチン、クエルセチン、クエルシトリン、イソクエルシトリン、フォルモノネチン、パイオカニン A、ヒドロキシカビコールが検出された。

キーワード：違法ドラッグ、健康食品、HPLC/PDA、LC/MS

Keywords : illegal drugs, dietary supplement, HPLC/PDA, LC/MS

はじめに

近年、「いわゆる健康食品」のうち、効能効果を高めることを目的として医薬品成分として扱われる成分を入れた製品が出回るようになり、その製品によると思われる健康被害が多数発生している^{1)~3)}。「いわゆる健康食品」に含まれる医薬品成分の中には、現在医薬品として使用されている成分の他にそれら既存成分の構造を一部変更した成分が含まれていることや^{4)~8)}、既存成分の類似体ではないが医薬品成分と同様の作用を有すると考えられる成分が検出されることがあり^{9),10)}、「いわゆる健康食品」に関する試験検査を複雑化している。

違法ドラッグは「麻薬又は向精神薬には指定されておらず、麻薬又は向精神薬に類似の有害性を有することが疑われる物質（人為的に合成されたもの、天然物及びそれに由来するものを含む。）であって、専ら人に乱用させることを目的として製造、販売等がされるもの」とされ¹¹⁾、インターネットなどを通じて乱用が拡大している¹²⁾。違法ドラッグには、既存違法ドラッグ成分の一部の構造を変えた「デザイナードラッグ」と呼ばれる類似薬物が含まれていることがあり、毎年のように新規薬物が検出され^{13),14)}、違法ドラッグの試験検査を「いわゆる健康食品」の試験検査と同様に煩雑化させる要因となっている。

千葉県では「違法ドラッグ対策事業及び無承認無許可医薬品取締事業」として健康食品及び違法ドラッグの試買調査を行っているが^{15),16)}、試験検査を実施している中で、多くの不明ピークが検出される。今回、不明ピークを有する3製品について更なる検討を行ったところ、新規化合物ではなかったが、先のピーク成分を同定することによって、今後の試験検査に有用な情報となったので

報告する。

実験方法

1. 試料

1) 製品

違法ドラッグ対策事業及び無承認無許可医薬品取締事業として試買した製品のうち不明ピークを有した3製品。以下に剤形、表示内容量及び表示原材料を示す。

(1) 製品 1

剤形：カプセル、表示内容量：250mg×10、表示原材料：ブラックコホッシュエキス、レッドクローバーエキス、プエラリアエキス、パフィア4倍濃縮エキス、カツアバ4倍濃縮エキス、アリウムサテバ

(2) 製品 2

剤形：カプセル、表示内容量：350mg×2、表示原材料：セントジョーンズワートエキス末、ショ糖エステル

(3) 製品 3

剤形：錠剤、表示内容量：600mg×7、表示原材料：乳糖、キンマ、コーンスターチ、ペパーミントオイル、ビンロウジ、甘味料（アスパルテーム）、炭酸カルシウム、タルカム、アカシア、クスノキ、香料（*d*-ボルネオール、*L*-メントール）

2) 植物類：セントジョーンズワートは市販の物を用いた。レッドクローバーは千葉県薬草園の標本を用いた。

2. 試薬及び試液

1) 標準品：ルチン、クエルセチン及びアスパルテームは和光純薬工業(株)製、イソクエルシトリン及びクエルシトリンはSIGMA社製、パイオカニン A はMP Biomedicals社製、フォルモノネチンはLKT Laboratories社製を用いた。

2) その他の試薬

1) 国立医薬品食品衛生研究所

受理年月日 2008年9月30日

メタノールは残留農薬・PCB試験用、アセトニトリルはHPLC用及びLC/MS用、1-ヘキサンスルホン酸ナトリウムはイオンペアクロマトグラフ用（いずれも、和光純薬工業（株）製）を用いた。重メタノールはAcros organics社製を用いた。水は日本ミリポア社製MILLI-Q Labo超純水製造装置により精製した超純水を用いた。その他の試薬はすべて市販の試薬特級品を用いた。

3. 標準溶液の調製

各標準品を1000 μ g/mLとなるようメタノールに溶解させ調製した（標準原液）。標準溶液はこれら標準原液をメタノールで100 μ g/mLに適宜希釈し調製した。

4. 試験溶液の調製

試料は粉末とし、約0.10gを精密に量り取り、70%メタノール10mLを加え15分間超音波抽出後、0.45 μ mのメンブランフィルターでろ過し、試験溶液とした。

5. 装置

1) フォトダイオードアレイ検出器付き高速液体クロマトグラフ（以下HPLC/PDAと略す）

日本分光（株）製PU-2089型ポンプ、同AS-2055型オートサンプラー、同CO-2065型カラムオープン、同MD-2015型フォトダイオードアレイ検出器を用いた。

2) 高速液体クロマトグラフ質量分析計（以下LC/MSと略す）

Waters社製2695型セパレーションモジュール、同ZQ4000型質量分析計を用いた。

3) NMR装置

JEOL製ECA-800を用いた。

6. 測定条件

1) HPLC/PDA測定条件

既報¹⁵⁾の一斉分析法に従い行った。

カラム：TSK-GEL ODS-80 Ts (4.6mm i.d.×150mm、5 μ m)、カラム温度：40℃、移動相A液：アセトニトリル/水/リン酸混液（100：900：1、5mmol/Lヘキサンスルホン酸ナトリウム含有）、移動相B液：アセトニトリル/水/リン酸混液（900：100：1、5mmol/Lヘキサンスルホン酸ナトリウム含有）、グラジエント条件：0分(A:B=90:10)→25分(A:B=55:45)→44-49分(A:B=10:90)、流速：1.0mL/min、注入量：20 μ L、測定波長：200-400nm (Max Plot)

2) LC/MS測定条件

以下のイオン化法及びコーン電圧条件以外は既報¹⁵⁾のグラジエント条件2に従い行った。

カラム：Atlantis dC18 (2.1mm i.d.×150mm、3 μ m)、カラム温度：40℃、移動相A液：0.1%ギ酸溶液、B液：0.1%ギ酸含有アセトニトリル、グラジエント条件：0分(A:B=95:5)→15分(A:B=80:20)→30-35分(A:B=20:80)、流速：0.2mL/min、注入量：10 μ L、イオン化法：ESI ポジティブ又はESI ネガティブ、コーン電圧：ESI ポジティブ 10、20、30、60及び90V、ESI ネガティブ 10、20、40、50、90V、測定質量電荷比範囲： m/z 100-800

3) NMR測定条件

NMR測定溶媒には重メタノールを用い、¹H-及び¹³C-NMR測定等1-D測定、¹H-¹H COSY、HMQC及びHMBC等の2-D測定を行った。

結果及び考察

1. 製品1の分析

製品1をHPLC/PDAで分析した結果、保持時間20.2分（ピーク1）と25.8分（ピーク2）に比較的大きなピークが観察され、それぞれのピークをフォトダイオードアレイ検出器でモニターすると、ピーク1は242nmと299nmに極大吸収を、218nmと287nmに極小吸収を持つ吸収スペクトルを、ピーク2は257nmに極大吸収、227nmに極小吸収を持つ吸収スペクトルを示した（図1A）。この製品の原材料表示はブラックコホシエキス、レッドクローバーエキス、プエラリアエキス等とされており、当研究室において標本として保有していたレッドクローバーを70%メタノールで超音波抽出しHPLC/PDAで分析を行った。その結果、レッドクローバーのクロマトグラムにおいて製品1と同様の保持時間及び吸収スペクトルを有するピークが確認された。レッドクローバーはマメ科の植物で、更年期症状を軽減するサプリメント等によく用いられているハーブの一種であり¹⁷⁾、主な成分はフォルモノネチン及びバイオカニンAである^{18),19)}。そこで、フォルモノネチン及びバイオカニンA標準溶液をHPLC/PDAで分析した結果、フォルモノネチンは製品1のピーク1と、バイオカニンAは製品1のピーク2と保持時間及び吸収スペクトルが一致した（図2）。また、製品1をLC/MSのESI ポジティブモードによりコーン電圧30Vで分析した結果、保持時間29.3分及び31.3分にピークが確認された。マススペクトルでは保持時間29.3分のピークは m/z 269に $[M+H]^+$ イオンが観察され、これはフォルモノネチン標準溶液から得られたマススペクトルと同様であった（表1）。また、保持時間31.3分のピークは m/z 285に $[M+H]^+$ イオンが観察され、これはバイオカニンA標準溶液から得られたマススペクトルと同様であった（表1）。以上のことから、製品1の2つの不明成分はフォルモノネチンとバイオカニンAであると判断した。

2. 製品2の分析

製品2をHPLC/PDAで分析した結果、保持時間6.6分（ピーク1）、6.9分（ピーク2）、7.2分（ピーク3）、8.9分（ピーク4）及び13.5分（ピーク5）に大きなピークが観察され、各ピークをフォトダイオードアレイ検出器でモニターすると、ピーク1～4は254nmと350nm付近に極大吸収を、235nmと280nm付近に極小吸収を持つ吸収スペクトルを、ピーク5は251nmと368nmに極大吸収を、236nmと280nmに極小吸収を持つ吸収スペクトルを示した（図1B）。この製品の表示にはセントジョーンズワート加工食品と記載されていたので、市販のセントジョーンズワートをHPLC/PDAで分析したところ、製品1とほぼ同様のクロマトグラムを示し、各ピークの吸収スペ

クトルも同様であった。セントジョーンズワートの成分としてフラボノイドのルチン、イソクエルシトリン、クエルシトリン、クエルセチンが知られている^{20)~22)}。そこで、ルチン、イソクエルシトリン、クエルシトリン、クエルセチン標準溶液を HPLC/PDA で分析したところ、ルチンは製品 2 のピーク 1 と、イソクエルシトリンはピーク 3 と、クエルシトリンはピーク 4 と、クエルセチンはピーク 5 とそれぞれ保持時間及び吸収スペクトルが一致した (図 2)。また、製品 1 と同様に LC/MS の ESI ポジティブモードで製品 2 及びルチン、イソクエルシトリン、クエルシトリン、クエルセチン標準溶液を分析したところ、製品 2 から 22.3 分に $[M+H]^+$ イオンが m/z 611 を示しフラグメントイオンが m/z 303 及び 465 を示すピークが、22.8 分に $[M+H]^+$ イオンが m/z 465 を示しフラグメ

ントイオンが m/z 303 を示すピークが、24.0 分に $[M+H]^+$ イオンが m/z 449 を示しフラグメントイオンが m/z 303 を示すピークが、26.5 分に $[M+H]^+$ イオンが m/z 303 を示すピークが確認され、各ピークはそれぞれ、ルチン、イソクエルシトリン、クエルシトリン、クエルセチン標準溶液から得られた LC/MS 分析結果と保持時間及びマススペクトルが一致した (表 1)。以上のことから製品 1 の不明ピーク成分の中の 4 つはルチン、イソクエルシトリン、クエルシトリン、クエルセチンであると判断した。製品 2 で検出されたピーク 2 については、吸収スペクトルがルチンやイソクエルシトリン、クエルシトリンとほぼ同様の吸収スペクトルを示したことから、セントジョーンズワートに含まれているとされる他のヒペロシド^{21),22)}などのフラボノイドではないかと推測された。

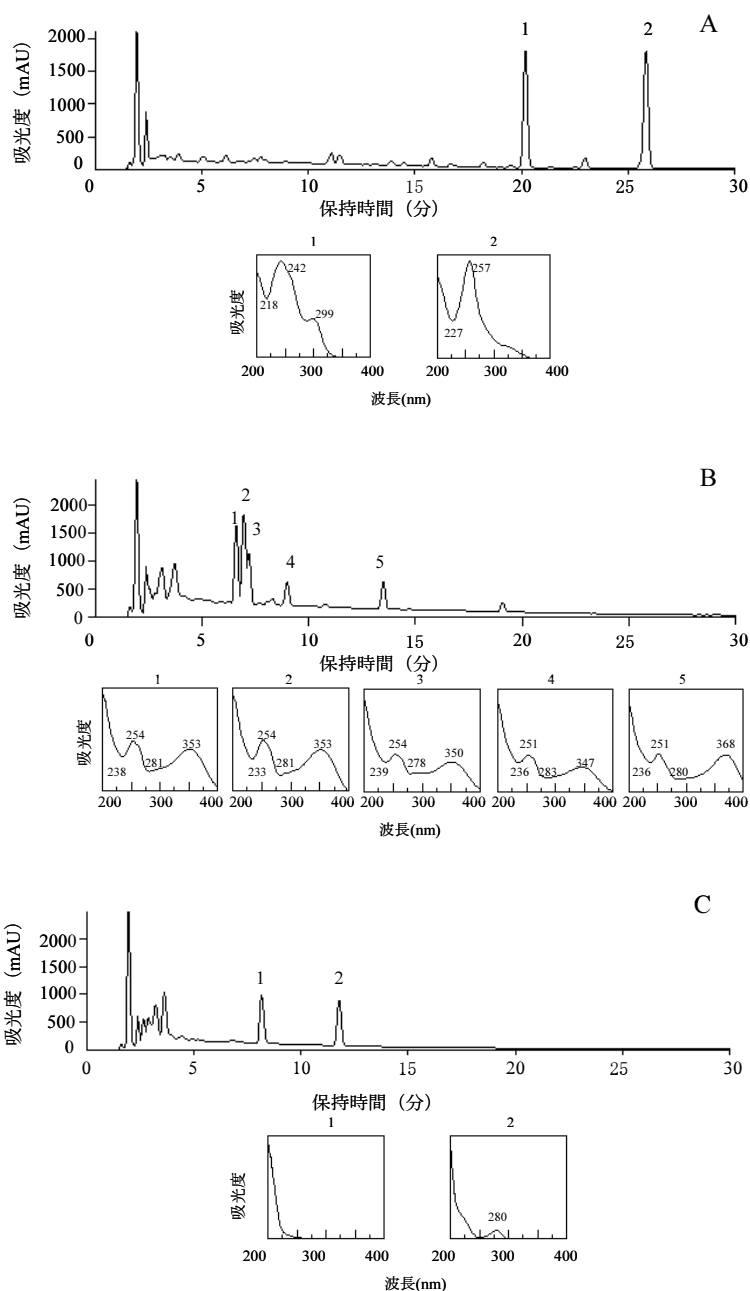


図 1 各製品の最大吸光度による HPLC クロマトグラム及び検出されたピークの吸収スペクトル
A : 製品 1、B : 製品 2、C : 製品 3

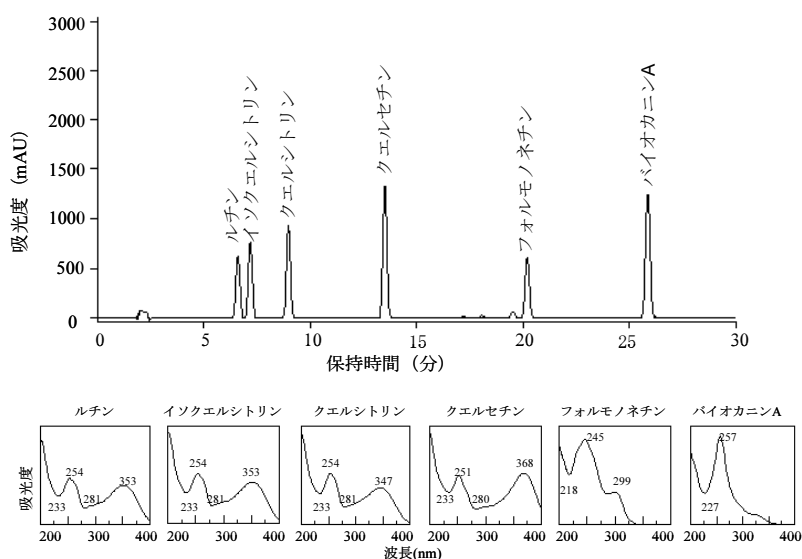


図2 各標準溶液の最大吸光度による HPLC クロマトグラム及び吸収スペクトル

表1 LC/MS における各標準溶液の分析結果

成分	極性	コーン電圧(V)	保持時間 (分)	[M+H] ⁺ イオン (<i>m/z</i>)	フラグメントイオン (<i>m/z</i>)
フォルモノネチン	ポジティブ	30	29.3	269	
バイオカニン A	ポジティブ	30	31.3	285	
ルチン	ポジティブ	30	22.3	611	465, 303
イソクエルシトリン	ポジティブ	20	22.8	465	303
クエルシトリン	ポジティブ	20	24.0	449	303
クエルセチン	ポジティブ	60	26.5	303	

3. 製品3の分析

製品3をHPLC/PDAで分析した結果、保持時間8.1分(ピーク1)と11.8分(ピーク2)に比較的大きなピークが観察された(図1C)。ピーク1の保持時間と吸収スペクトルはアスパルテム標準溶液をHPLC/PDAで分析して得られた保持時間及び吸収スペクトルと一致した。また、LC/MSのESIポジティブモードによる分析では製品3から15.7分に[M+H]⁺イオンが*m/z* 295を示すピークがみられ、そのピークはアスパルテム標準溶液から得られた保持時間及びマススペクトルと一致した。そのため、ピーク1はアスパルテムであると判断した。ピーク2をフォトダイオードアレイ検出器でモニターすると280nm付近に極大吸収を持つ吸収スペクトルを示した(図1C)。また、製品3をLC/MSのESIネガティブモードによりコーン電圧40Vで分析するとピーク2に該当すると思われるピークが保持時間25.7分にみられ、[M-H]⁻イオンと思われるピークが*m/z* 149に観察され、分子量150が推定された(図3)。本ピークはアスパルテムと同程度のピーク強度を有しており、医薬品成分あるいは何らかの薬理作用を有する物質である可能性が考えられ

た。そこで、この不明な化合物を単離精製し、NMR測定を行った。¹³C-NMRデータにおける9本のシグナルより、LC/MSの結果と合わせて、本化合物は分子式C₉H₁₀O₂が推定された。本化合物の¹H-NMRにおいてδ 6.65 (1H, d, *J*=7.8Hz)、δ 6.59 (1H, d, *J*=1.8Hz)及びδ 6.47 (1H, dd, *J*=7.8, 1.8Hz)より1, 2, 4置換ベンゼン環の存在が示唆された。さらに、δ 3.20 (2H, d, *J*=6.4Hz)、δ 4.97 (1H, dd, *J*=10.1, 0.9Hz)、δ 5.01 (1H, dd, *J*=17.0, 0.9Hz)、δ 5.90 (1H, ddt, *J*=17.0, 10.1, 6.4 Hz)よりベンゼン環に結合した2-プロペニル基(アリル基)に特徴的なシグナルパターンが観測された。一方、¹³C-NMRにおいて観測された2つの芳香族炭素(δ 146.2及びδ 144.5)のシグナルより、本化合物は2つの水酸基を有するアリルベンゼン誘導体と推定された。さらにHMBCスペクトル解析の結果、本未知化合物の構造を最終的にヒドロキシカビコールと決定した(図4, 5)。ヒドロキシカビコールはキンマに含まれる植物成分で^{23,24)}、スーパーオキシドスカベンジャーとしての作用やシクロオキシゲナーゼ阻害作用が知られている^{25,26)}。製品3の原材料名としてキンマが記載されており、検出

されたヒドロキシカビコールはそのキンマに由来しているのではないかと推察された。ビンロウの種子（ビンロウジ）を石灰にまぶしキンマ葉で包んだものをベテルチューイングといい、咀嚼嗜好品としてインドや東南アジアな

どで供されているが^{17),18)}、本製品の原材料名にキンマの他にビンロウジが記載されていることから、本製品はそのベテルチューイングを模したものではないかと思われる。

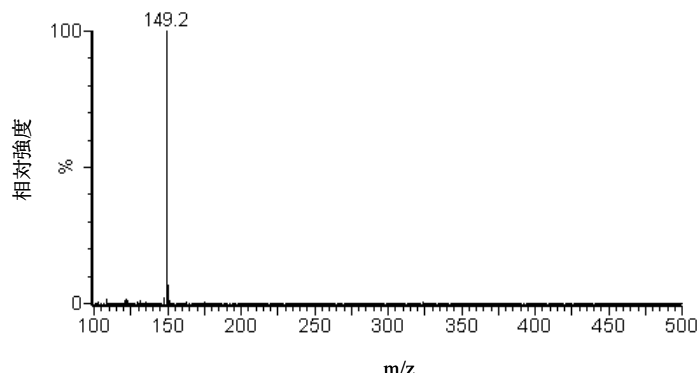


図3 製品3 未知成分のマスペクトル (LC/MS ESI ネガティブモード コーン電圧: 40V)

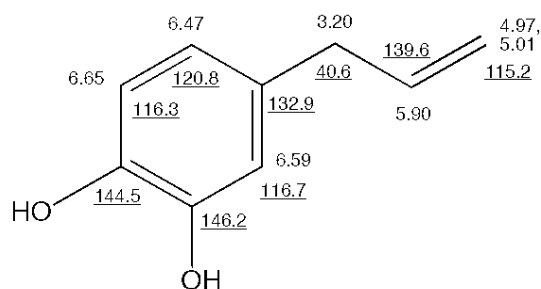


図4 製品3 不明化合物における重メタノール中の¹H 及び¹³C-NMR データ

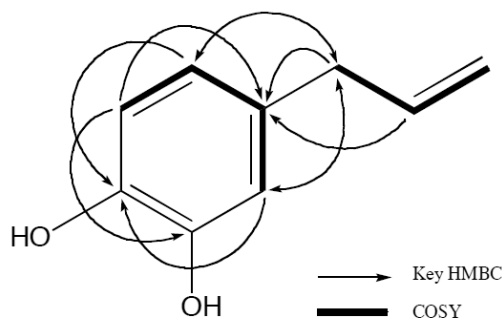


図5 製品3 不明化合物における¹H-¹H COSY 及び¹H-¹³C HMBC 測定結果

まとめ

いわゆる健康食品及び違法ドラッグ製品からフォルモノネチン、バイオカニンA、ルチン、クエルセチン、クエルシトリン、イソクエルシトリン及びヒドロキシカビコールが検出された。今回検出された成分は、全て製品原材料に表示されていた植物に含まれる成分であり、その植物由来であったと考えられる。これら検出された成分の保持時間及び吸収スペクトルをライブラリーに登録後、他の「いわゆる健康食品」及び違法ドラッグ製品を試験検査したところ、いくつかの製品からこれら植物由来成分が検出された。

いわゆる健康食品及び違法ドラッグ製品から新規医薬品成分が次々と検出される現状においては、試験検査を行っていく中で、検出されたピークが既存の医薬品成分に該当しない不明なピークであったとしても、そのピーク成分が新規医薬品成分に該当するかどうか調べるための検査を行わなければならないことがあり、更なる時間と労力がかかってしまう。今回検出された植物由来成分のような医薬品成分に該当しない成分もスペクトルライブラリーに登録しておけば、不明ピークを減らすことにつながり、有用であると思われる。

文献

- 1) 健康被害情報・無承認無許可医薬品情報 厚生労働省 <http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/musyounin.html>。
- 2) 守安貴子、重岡捨身、岸本清子、石川ふさ子、中嶋順一、上村尚、安田一郎 (2001): 健康食品中に含有するシルデナフィルの確認試験、薬学雑誌、121、765-9。
- 3) 守安貴子、岸本清子、中嶋順一、重岡捨身、蓑輪佳子、上村尚、安田一郎 (2003): 健康被害を起こした中国製ダイエット健康食品における検査結果、東京健安研年報、54、69-73。
- 4) Shin MH, Hong MK, Kim WS, Lee YJ, Jeoung YC. Identification of a new analogue of sildenafil added illegally to a functional food marketed for penile erectile dysfunction. Food Addit Contam. 2003 Sep; 20(9):793-6.
- 5) Blok-Tip L, Zomer B, Bakker F, Hartog KD, Hamzink M, Ten Hove J, Vredenburg M, De Kaste D. Structure elucidation of sildenafil analogues in herbal products. Food Addit Contam. 2004 Aug; 21(8): 737-48.
- 6) Zou P, Hou P, Low MY, Koh HL. Structural

- elucidation of a tadalafil analogue found as an adulterant of a herbal product. *Food Addit Contam.* 2006 May; 23(5): 446-51.
- 7) Hou P, Zou P, Low MY, Chan E, Koh HL. Structural identification of a new acetildenafil analogue from pre-mixed bulk powder intended as a dietary supplement. *Food Addit Contam.* 2006 Sep; 23(9): 870-5.
- 8) Hasegawa T, Saijo M, Ishii T, Nagata T, Haishima Y, Kawahara N, Goda Y. Structural elucidation of tadalafil analogue found in a dietary supplement. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.* 2008 Aug; 49(4): 311-5.
- 9) Kumasaka K, Kawahara N, Doi K, Kojima T, Goda Y. Determination of (R)-xanthoanthrafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, in a dietary supplement promoted for sexual enhancement. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2008 Feb; 56(2): 227-30
- 10) Uchiyama N, Saisho K, Kikura-Hanajiri R, Haishima Y, Goda Y. Determination of a new type of phosphodiesterase-5 inhibitor, thioquinapiperfil, in a dietary supplement promoted for sexual enhancement. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2008 Sep; 56(9): 1331-4.
- 11) 違法ドラッグ（いわゆる脱法ドラッグ）対策のあり方について（提言）厚生労働省 平成17年11月25日 <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2005/11/s1125-21.html>.
- 12) 光岡俊成、飯村康夫（2006）：違法ドラッグ対策の今後の展開について、*医薬品研究*、37(11)、758-68。
- 13) 高橋美佐子、鈴木仁、長嶋真知子、瀬戸隆子、安田一郎（2007）：平成18年度都内における違法ドラッグ中の新規検出薬物、*東京健安研セ年報*、58、83-7。
- 14) 沼田竜市、宮元礼生奈、黒澤英俊、阿部猛、高橋美佐子、鈴木仁、他（2008）：都内における違法ドラッグの分析—その4、*日本薬学会第128年会要旨集*、27 PW-pm174、2008。
- 15) 西條雅明、石井俊靖、長谷川貴志、永田知子（2006）：「いわゆる健康食品」中の医薬品成分分析について、*千葉県衛研年報*、55、74-8。
- 16) 長谷川貴志、石井俊靖、西條雅明、永田知子（2006）：千葉県における違法ドラッグ試験検査について（平成18年度）、*千葉県衛研年報*、55、79-83。
- 17) キヤサリン・E. ウルブリヒト、イーサン・パッシュ編（2007）：ハーブ&サプリメント NATURAL STANDARDによる有効性評価、711-720、883-892、産調出版。
- 18) 岡田 稔監修（2002）：新訂原色牧野和漢薬草大圖鑑、3、232、600、北隆館。
- 19) Wu Q, Wang M, Simon JE. Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A.* 2003 Oct 24; 1016(2): 195-209.
- 20) 井上博之監修（1999）：カラーグラフィック西洋生薬、273-275、広川書店。
- 21) Pietta P, Gardana C, Pietta A. Comparative evaluation of St. John's wort from different Italian regions. *Farmaco.* 2001 May-Jul; 56(5-7): 491-6.
- 22) Li W, Fitzloff JF. High performance liquid chromatographic analysis of St. John's wort with photodiode array detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001 Dec; 765(1): 99-105.
- 23) Amonkar AJ, Nagabhushan M, D'Souza AV, Bhide SV. Hydroxychavicol: a new phenolic antimutagen from betel leaf. *Food Chem Toxicol.* 1986 Dec; 24(12): 1321-4.
- 24) Lee-Chen SF, Chen CL, Ho LY, Hsu PC, Chang JT, Sun CM, Chi CW, Liu TY. Role of oxidative DNA damage in hydroxychavicol-induced genotoxicity. *Mutagenesis.* 1996 Sep; 11(5): 519-23.
- 25) Chang MC, Uang BJ, Wu HL, Lee JJ, Hahn LJ, Jeng JH. Inducing the cell cycle arrest and apoptosis of oral KB carcinoma cells by hydroxychavicol: roles of glutathione and reactive oxygen species. *Br J Pharmacol.* 2002 Feb; 135(3): 619-30.
- 26) Chang MC, Uang BJ, Tsai CY, Wu HL, Lin BR, Lee CS, Chen YJ, Chang CH, Tsai YL, Kao CJ, Jeng JH. Hydroxychavicol, a novel betel leaf component, inhibits platelet aggregation by suppression of cyclooxygenase, thromboxane production and calcium mobilization. *Br J Pharmacol.* 2007 Sep; 152(1): 73-82.