

UPLC/PDA によるいわゆる健康食品中の医薬品成分スクリーニング分析法について

吹譯友秀, 長谷川貴志, 芦澤英一, 小倉誠, 高橋市長, 西條雅明, 元木裕二

Screening Analysis of Pharmaceutical Agents in Dietary Supplements Using UPLC/PDA

Tomohide FUKIWAKE, Takashi HASEGAWA, Eiichi ASHIZAWA, Makoto OGURA,
Kazunaga TAKAHASHI, Masaaki SAIJO and Yuji MOTOKI

要旨

迅速かつ多くの医薬品成分を分析するために、UPLC/PDA によるライブラリーの登録及びスクリーニング分析法を構築し、156 成分のスクリーニング分析が可能となった。平成 17 年度から平成 22 年度に、インターネット通信販売や千葉県内の販売店で試買し、医薬品成分を検出した検体について、構築したスクリーニング分析法で試験を行った結果、同様に医薬品成分を推定することが可能であった。

キーワード：健康食品、スクリーニング分析、UPLC/PDA

Keywords: dietary supplement, screening analysis, UPLC/PDA

はじめに

近年、人々の健康に対する意識や関心が高まっており、健康の維持、増進のほかに痩身、強壮効果等を期待していわゆる健康食品が広く用いられるようになってきている。しかし、これら健康食品の中には、効果を高めようと医薬品成分を含有した製品がみられ、それらを摂取することにより健康被害を受けるといった事例が数多く報告されている^{1)~4)}。

千葉県では、健康食品によるこれらの健康被害を未然に防止するために、無承認無許可医薬品取締事業による試買検査を行っている。

検査は、平成 18 年度にスクリーニング分析法を構築し⁵⁾、その後分析対象を増やし、平成 22 年度末現在では、93 成分^{5)~7)}がスクリーニング分析可能となった。しかし、一部の成分については、保持が弱く分析が困難であり、また、分離も不十分で測定に時間を要するなど、いくつかの問題点があった。

そこで、既報^{5)~6)}の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 (HPLC/PDA) スクリーニング分析法より、迅速かつ高分離なフォトダイオードアレイ検出器付き超高速液体クロマトグラフ (UPLC/PDA) を用いたスクリーニング分析法の構築を試み、検査可能な医薬品成分 (消炎鎮痛剤、副腎皮質ホルモン等) や健康食品中に多く含まれる植物由来成分を 63 成分追加し、より多くの成分に対応したスクリーニング分析法を構築した。

このスクリーニング分析法を用いて、平成 17 年度から平成 22 年度に、インターネット通信販売や千葉県内の販売店で試買し、医薬品成分を検出した 17 製品 (以下、過去に医薬品成分を検出した検体) について試験を行った結果、HPLC/PDA の時と同様に医薬品成分を推定すること可能であったので報告する。

実験方法

1. 試料

過去に医薬品成分を検出した検体

2. 試薬及び標準品

1) 標準品：医薬品成分等 93 成分については既報^{5)~7)}のとおり。オイゲノール、グリピジド、クロザピンは ALEXIS 製、レボドパは Alfa Aesar 製、トリクロサンは CALBIOCHEM 製、トルフェナム酸は CAYMAN CHEMICAL 製、アムシノニド、イソクエルシトリン、ヒドロコルチゾン吉草酸エステルは Fluka 製、グリメピリド、テトラヒドロパルマチン塩酸塩、フォルモノネチン、フルオロシロロンアセトニド、ヘスペリジンは LKT Laboratories 製、アポモルフィン、バイオカニン A、ブメタニドは MP BioMedicals 製、クロルプロチキセン塩酸塩、クエルシトリン、シタロプラム臭素酸塩、スキシブゾン、ニフルミン酸、ニメスリド、ノスカピン、パペベリン、ハルシノニド、フェンフォルミン、フルメタゾン、ミノキシジル、メステロロン、リモナバンドは SIGMA 製、アミノピリンは三晃製薬工業製、シクロバルビタールカルシウムは塩野義製薬製、フェノバルビタールは第一三共製、クロルフェニラミンマレイン酸塩は東京化成工業製、アモバルビタールは日本新薬製、アセスルファミカリウム、cis-アンドロステロン、L-フェニルアラニン、 α -リポ酸、カルバマゼピン、ベタメタゾン吉草酸エステル、クエルセチン、コルチゾン酢酸エステル、ヒドロコルチゾン酢酸エステル、プレドニゾン酢酸エステル、ジアゼパム、ステビオシド、タモキシフェン、チモール、テオブロミン、トリアゾラム、トリアムシノロンアセトニド、ニトラゼパム、ベタメタゾンジプロピオン酸エステル、バルビタール、フルオキセチン塩酸塩、プロチゾラム、ペペリデン、ルチン、レバウジオシド A は和光純薬工業製、ホモチオデナフィルは国立医薬品食品衛生研究所からの分与品を用いた。ヒドロキシホンデナフィル、メチソシルデナフィルは各強壮成分が検出された製品から精製したものをを用いた。

表1 UPLC/PDAによる標準品の保持時間

| 成分名 | 保持時間 (分) | 成分名 | 保持時間 (分) |
|------------------------|----------|-----------------------|----------|
| ○ レボドバ | 0.43 | オリスタット (OST) | 4.94 |
| □ アセスルファミカリウム | 0.63 | □ α-リボ酸 | 4.98 |
| □ L-フェニルアラニン | 1.24 | ○ トリアムシノロンアセトニド | 5.01 |
| アセトアミノフェン | 1.26 | ○ p-ヒドロキシ安息香酸イソプロピル | 5.02 |
| □ テオブロミン | 1.43 | ○ メチソシルデナフィル (MSF) | 5.02 |
| ノルエフェドリン | 1.55 | ○ p-ヒドロキシ安息香酸プロピル | 5.09 |
| サッカリン | 1.75 | ○ フルオロシノロンアセトニド | 5.10 |
| ヒドロクロロチアジド | 1.92 | ○ フォルモノネチン | 5.12 |
| ○ フェンフォルミン | 2.25 | ○ プレドニゾロン酢酸エステル | 5.12 |
| プロカイン | 2.36 | ○ タダラフィル (TLF) | 5.14 |
| テオフィリン | 2.42 | ○ ジアゼパム | 5.14 |
| エフェドリン | 2.48 | ○ トリアゾラム | 5.14 |
| プソイドエフェドリン | 2.69 | □ オイゲノール | 5.15 |
| ○ アミノピリン | 2.77 | ○ キサントアントラフィル (XAF) | 5.16 |
| メチルエフェドリン | 2.78 | ○ ヒドロコルチゾン酢酸エステル | 5.17 |
| カフェイン | 3.06 | ○ トルブタミド | 5.20 |
| ○ バルビタール | 3.14 | ○ グリビジド | 5.23 |
| スコポラミン | 3.17 | ○ プロチゾラム | 5.24 |
| ○ アポモルフィン | 3.41 | ○ β-エストラジオール | 5.28 |
| トリアムテレン | 3.44 | ○ シクロペンチナフィル (CPF) | 5.29 |
| リドカイン | 3.47 | ○ ビペリデン | 5.29 |
| ○ ミノキシジル | 3.48 | ○ コルチゾン酢酸エステル | 5.30 |
| アスパルテーム | 3.55 | ○ ジブカイン | 5.33 |
| アトロピン | 3.58 | ○ グリチルリチン酸 | 5.35 |
| □ ルチン | 3.64 | ○ テストステロン | 5.38 |
| センノシドB | 3.66 | □ カワイン | 5.38 |
| ○ クロルフェニラミン | 3.70 | ○ ケトプロフェン | 5.39 |
| □ イソクエルシトリン | 3.70 | ○ ナプロキセン | 5.41 |
| 安息香酸 | 3.82 | ○ フルオキセチン | 5.41 |
| ソルビン酸 | 3.83 | ○ オキシフェンブタゾン | 5.45 |
| アスピリン | 3.85 | ○ プソイドバルデナフィル (PVF) | 5.52 |
| センノシドA | 3.87 | ○ エチニルエストラジオール | 5.53 |
| □ クエルシトリン | 3.89 | ○ グリクラジド | 5.54 |
| チオキナピペリフィル (TXPF) | 3.91 | ○ p-ヒドロキシ安息香酸イソブチル | 5.55 |
| ○ p-ヒドロキシ安息香酸メチル | 3.93 | ○ エストロン | 5.57 |
| ○ クロザピン | 3.93 | ○ メチルテストステロン | 5.58 |
| メラトニン | 3.96 | ○ p-ヒドロキシ安息香酸ブチル | 5.59 |
| エテンザミド | 3.98 | ○ デヒドロイソアンドロステロン | 5.60 |
| デヒドロ酢酸 | 3.99 | ○ 脱N-メチルシブトラミン (DSIB) | 5.61 |
| □ ヘスペリジン | 4.01 | ○ シブトラミン (SIB) | 5.62 |
| ○ サリチル酸 | 4.02 | ○ ブメタニド | 5.62 |
| ○ p-アミノ安息香酸エチル | 4.07 | ○ クロルプロチキセン | 5.63 |
| ○ ヨヒンビン (YHB) | 4.07 | □ パイオカニンA | 5.66 |
| ○ フェノバルビタール | 4.10 | ○ ニメスリド | 5.71 |
| ○ バルデナフィル (VDF) | 4.13 | ○ スピロノラクトン | 5.78 |
| ○ エストリオール | 4.19 | ○ ニフルミン酸 | 5.83 |
| ○ テトラヒドロパルマチン | 4.29 | ○ チモール | 5.87 |
| ○ マジンドール (MD) | 4.32 | ○ ヒドロコルチゾン吉草酸エステル | 5.91 |
| ○ ヒドロキシホンデナフィル (HHDF) | 4.32 | ○ ホモチオデナフィル (HTF) | 5.95 |
| ○ シクロバルビタール | 4.33 | ○ チオデナフィル (TDF) | 5.96 |
| ○ パパベリン | 4.33 | ○ カルプロフェン | 5.97 |
| □ クエルセチン | 4.39 | ○ フルビプロフェン | 5.98 |
| ○ ノスカピン | 4.40 | ○ メステロン | 6.01 |
| ○ ホンデナフィル (HDF) | 4.42 | ○ スキシブゾン | 6.11 |
| ○ フェンフルラミン | 4.43 | ○ クロプロレタダラフィル (CPT) | 6.12 |
| ○ プレドニゾロン | 4.49 | ○ チオアイルデナフィル (TAD) | 6.13 |
| ○ ヒドロコルチゾン | 4.52 | ○ ジクロフェナクナトリウム | 6.14 |
| ○ p-ヒドロキシ安息香酸エチル | 4.53 | ○ アン드로ステロン | 6.15 |
| ○ コルチゾン | 4.54 | ○ グリベングラミド | 6.16 |
| ○ ニトラゼパム | 4.60 | ○ ベタメタゾン吉草酸エステル | 6.16 |
| ○ イカリイン (ICA) | 4.60 | ○ インドメタシン | 6.17 |
| ○ ピロキシカム | 4.68 | ○ N-ニトロソフェンフルラミン | 6.17 |
| ○ フロセミド | 4.69 | ○ イブプロフェン | 6.24 |
| ○ テトラカイン | 4.69 | ○ ハルシノニド | 6.26 |
| □ レバウジオシドA | 4.70 | ○ グリメピリド | 6.32 |
| ○ ステビオシド | 4.71 | ○ フェニルブタゾン | 6.33 |
| ○ アモバルビタール | 4.73 | ○ アムシノニド | 6.36 |
| ○ カルバマゼピン | 4.75 | ○ 酢酸シプロテロン | 6.37 |
| ○ シルデナフィル (SDF) | 4.75 | ○ プロピオン酸クロベタゾール | 6.40 |
| ○ ヒドロキシホモシルデナフィル (HHS) | 4.78 | ○ 酢酸メドロキシプロゲステロン | 6.50 |
| ○ ビサコジル | 4.79 | ○ メフェナム酸 | 6.54 |
| ○ シタロプラム | 4.83 | ○ ベタメタゾンジプロピオン酸エステル | 6.56 |
| ○ ベタメタゾン | 4.84 | ○ リモナバンド | 6.62 |
| ○ デキサメタゾン | 4.87 | ○ トルフェナム酸 | 6.70 |
| ○ フルメタゾン | 4.88 | ○ タモキシフェン | 6.89 |
| ○ アミノタダラフィル (ATF) | 4.88 | ○ トリクロサン | 6.93 |
| ○ ホモシルデナフィル (HSF) | 4.91 | ○ N-オクチルタダラフィル (NOT) | 7.29 |
| ○ フェノールフタレイン (PF) | 4.94 | ○ プロピオン酸テストステロン | 7.29 |

○印：今回追加した医薬品成分、□印：今回追加した甘味料・植物由来成分等、()内は略称

2) 標準溶液の調製

(1)標準原液は、各標準品を 1000 µg/mL となるよう各々メタノールで調製した。ただし、センノシド A、B 標準原液は、1000 µg/mL となるよう 1%炭酸水素ナトリウム溶液、トリアムテレン標準原液は、1000 µg/mL となるよう 1%酢酸含有メタノール溶液及びテオプロミン標準原液は 500 µg/mL となるよう水で調製した。

(2)標準溶液は、これら標準原液を水・メタノール混液 (1:1) でそれぞれ 100 µg/mL に適宜調整した。

3) その他の試薬

アセトニトリルは HPLC 用 (SIGMA 製) 及び LC/MS 用 (和光純薬工業製) を用いた。水はミリポア製 MILLI-Q Labo により精製して用いた。その他試薬は市販特級品を用いた。

3. 装置

1) UPLC/PDA : Waters 製 ACQUITY UPLC シリーズ、ポンプ、デガッサー、恒温槽、オートサンプラー、フォトダイオードアレイ検出器及びデータ処理装置から構成されるシステムを用いた (スクリーニング分析用)。

2) 高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) : 既報⁵⁾⁻⁶⁾のとおり (確認試験用)

4. 測定条件

1) UPLC/PDA 測定条件

カラム : ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm i.d.×50 mm、1.7 µm)、流速 : 0.6 mL/min、注入量 : 2 µL、カラム温度 : 40°C、測定波長 210-400 nm、移動相 A 液 : 0.1%リン酸溶液、B 液 : 0.1%リン酸含有アセトニトリル、グラジエント条件 : 0.0-2.0 分 (A : B=98 : 2) →8.0-10.0 分 (A : B=20 : 80) →10.2-12.0 分 (A : B=98 : 2)

2) LC/MS 測定条件

既報のとおり⁶⁾

5. 試験溶液の調製

試料は粉末とし、約 0.10 g (液体試料は 0.5 mL) を精密に量り取り、70%メタノール 10 mL を加え 10 分間超音波抽出後、0.20 µm のメンブランフィルターでろ過し、試験原液とした。試験原液をさらに水・メタノール混液 (1:1) で 10 倍希釈し、試験溶液とした。

表 2 過去に医薬品成分を検出した検体の UPLC/PDA スクリーニング分析におけるライブラリー検索結果

| UPLC/PDAスクリーニング分析 | | | | |
|-------------------|----------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| 製品No. | 保持時間 (分) | ライブラリー検索結果※ (保持時間幅±3%) | ライブラリー検索結果※ (保持時間幅±5%) | 実際に検出した成分 |
| 1 | 4.11 | VDF *** | VDF | VDF |
| | 4.77 | HHS or HSF or SDF | HHS or HSF or SDF | SDF |
| | 4.85 | HHS or HSF or SDF | HHS or HSF or SDF | HSF |
| 2 | 4.64 | 該当なし | HDF | HDF |
| | 4.30 | MD | MD | MD |
| 3 | 4.95 | PP or OST | PP or OST | PP |
| | 5.62 | SIB or DSIB | SIB or DSIB | SIB |
| 4 | 4.74 | HHS or SDF | HHS or HSF or SDF | HHS |
| | 4.71 | HHS or SDF | HHS or SDF or HSF | HHS |
| 5 | 4.88 | ATF | ATF | ATF |
| | 6.12 | CPT | CPT | CPT |
| 6 | 5.45 | PVF | PVF | PVF |
| | 5.18 | XAF | XAF | XAF |
| 8 | 5.16 | TLF | TLF | TLF |
| | 4.62 | ICA | ICA | ICA |
| 10 | 5.44 | 該当なし | DSIB or SIB | DSIB |
| | 3.86 | TXPF | TXPF | TXPF |
| 12 | 5.08 | MSF | CPF or MSF or HSF | CPF |
| | 7.27 | NOT | NOT | NOT |
| 13 | 4.79 | HHS or HSF or SDF | HHS or HSF or SDF | SDF |
| | 5.72 | 該当なし | TDF or HTF | TDF |
| 14 | 4.06 | YHB | YHB | YHB |
| | 5.92 | HTF or TDF | TAD or HTF or TDF | TAD |
| 16 | 4.93 | MSF or HSF | MSF or HHS or HSF | MSF |
| | 5.89 | HTF or TDF | TAD or HTF or TDF | TAD |
| 17 | 4.28 | HHDF | HHDF or HDF | HHDF |

※複数の候補成分がある場合には左側より一致率の高い成分を記載

※※太字は実際に検出した成分と合致する成分

結果及び考察

1. UPLC/PDA によるスクリーニング分析の検討

既報⁷⁾の 93 成分に加え、過去に健康食品中から消炎鎮痛、副腎皮質ホルモン、植物由来成分等の検出事例が報告されている⁸⁾⁻⁹⁾ことから、これらの医薬品成分を含む 156 成分の標準溶液をそれぞれ測定し、保持時間(表 1)と吸収スペクトルをライブラリー登録した。既報⁵⁾⁻⁶⁾の HPLC/PDA によるスクリーニング分析では、保持されないレボドパや不純物が多い検体ではピークの認識が困難であったテオフィリン、アセトアミノフェンを良好に保持することが可能となった。多成分を測定対象としたことで一部成分の保持時間が近接することになったが、ライブラリーに登録した吸収スペクトルから、それぞれの成分を推測することが可能と考えられた。

2. UPLC/PDA によるスクリーニング分析

このライブラリー情報を基に、過去に医薬品成分を検出した検体についてスクリーニング分析を行った(表 2)。

ライブラリーに登録された吸収スペクトルと一致率が高い物質について、保持時間幅を $\pm 3\%$ としライブラリー検索を行った結果、製品 No. 2、No. 10 及び No. 13 では該当物質がなくなり、製品 No. 12、No. 15 及び No. 16 では実際に検出した成分とは異なる成分が推定される結果となった。そのため、保持時間幅を $\pm 5\%$ としライブラリー検索を実施したところ、各々の製品から実際に検出した全ての成分を推定することが可能であった。

UPLC/PDA によるスクリーニング分析を、HPLC/PDA によるスクリーニング分析と比較すると、製品 No. 1 に含まれているシルデナフィルとホモシルデナフィルのように保持時間の近い物質が含まれている場合でもピークが重なることがなく分離し、各ピークの吸収スペクトルを基にライブラリー検索を実施することが可能なことから、UPLC/PDA によるスクリーニング分析の方が物質の推定には有用と考えられる。なお、推定された医薬品成分は LC/MS を用いて確認した。

ライブラリー検索においては、保持時間幅を $\pm 5\%$ で設定すれば、含まれている医薬品を推定することが可能と思われるが、近年では、既存の医薬品成分を添加するだけでなく、それらの医薬品成分の構造の一部を変えて健康食品等に添加する事例も増えている¹⁰⁾⁻¹²⁾。そのため、新規物質等の検索のためには、類似の吸収スペクトルを持つ未知の成分が確認された場合については、保持時間幅 $\pm 5\%$ での検索だけでなく、保持時間幅の設定にこだわらないライブラリー検索を実施することが重要であると考えられる。

まとめ

健康食品中の医薬品成分分析において、UPLC/PDA によるライブラリーの登録及びスクリーニング分析法の構築により、従来のスクリーニング分析法よりおよそ 1/5 の時間で分析が可能となり、156 成分のスクリーニング分析が可能となった。今回、過去に医薬品成分を検出した検体について新たに構築したスクリーニング分析法を適用した結果、含まれている医薬品成分を推定できた。

数多くの医薬品成分に対応するために、今後も標準物質情報の充実及び様々な試験法を組み合わせた分析が必要であると考えられる。

文献

- 1) 健康被害情報・無承認無許可医薬品情報、厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課 (<http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet.html>)
- 2) 守安 貴子, 岸本 清子, 中嶋 順一, 重岡 捨身, 蓑輪 佳子, 上村 尚, 他: 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, 東京都健康安全研究センター研究年報, 54, 69-73 (2003)
- 3) 長谷川 貴志, 石井 俊靖, 宮本 文夫, 伊藤 浩三: 健康被害を起こした中国製ダイエット用健康食品から検出された医薬品成分について, 千葉県衛生研究所研究報告, 29, 37-40 (2005)
- 4) 伊達 英代, 寺内 正裕, 杉村 光永, 豊田 安基江, 松尾 健: 健康食品中に含まれる経口血糖降下薬の系統的分析法, 薬学雑誌, 129, 163-172 (2009)
- 5) 西條 雅明, 石井 俊靖, 長谷川 貴志, 高橋 市長, 永田 知子: 「いわゆる健康食品」中の医薬品成分分析について, 千葉県衛生研究所年報, 55, 74-78 (2006)
- 6) 西條 雅明, 石井 俊靖, 長谷川 貴志, 高橋 市長, 永田 知子: 「いわゆる健康食品」中の医薬品成分分析について(第 2 報), 千葉県衛生研究所年報, 56, 55-59 (2007)
- 7) 西條 雅明, 石井 俊靖, 長谷川 貴志, 永田 知子: 「いわゆる健康食品」から検出された医薬品成分について(平成 16 年度から平成 20 年度), 千葉県衛生研究所年報, 57, 44-47 (2008)
- 8) 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, 他: 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, 千葉県衛生研究所年報, 56, 60-65 (2007)
- 9) 浜田 洋彦, 小坂 妙子, 田中 重雄: 健康食品中の未承認医薬品等の分析について, 宮崎県衛研年報, 14, 57-61 (2002)

- 10) 横田 洋一, 津野 敏紀, 寺崎 さち子, 鈴木 英世
: いわゆる健康食品中の脱 N-ジメチルシブトラ
ミンの検出について, 富山県薬事研究所年報,
31, 33-37 (2005)
- 11) Hasegawa,T., Saijo,M., Ishii,T., Nagata,T. :
Structural elucidation of a tadalafil analogue found
in a dietary supplement. ,J.Food Hyg.Soc.Jpn, 49,
311-315 (2008) .
- 12) 高橋 市長, 長谷川 貴志, 西條 雅明, 永田 知子,
若菜 大悟, 合田 幸広: いわゆる健康食品中か
ら検出されたシルデナフィル構造類似体につ
いて, 千葉県衛生研究所年報, 58, 55-60 (2009)