

健康食品中の副腎皮質ホルモンについて

曾根美紀子^{*}、安田 敏子^{*}

I 緒 言

「自然食品」の名目で販売されていた健康食品が、椎間板障害患者に対し著しい消炎鎮痛効果を持つということから、県業務課はこの健康食品中に副腎皮質ホルモンが含有されているのではないかという疑問を持ち、当研究室に検索依頼があった。既に五郎丸らにより、漢方製剤中から副腎皮質ホルモン剤及び合成消炎剤が検出されたという報告¹⁾があるので、これを参考として検索に当った。試験の結果、重篤な副作用を有する合成副腎皮質ホルモン剤(デキサメタゾン又はベタメタゾン)及び合成抗炎症剤(フェニルブタゾン)を検出したので報告する。

II 実験方法

1. 検 体

茶色の直径8mm程の丸剤様の物質であり、生薬臭を伴う。

2. 標準比較品

デキサメタゾンは武田薬品製コルソン錠、ベタメタゾンは塩野義製薬製リンデロン錠を各々粉碎後、メタノールで抽出して標準比較品とした。標準比較溶液の濃度は1mg/mlとした。またフェニルブタゾンの標準品は局方品を用い、その溶液の濃度は0.1mg/mlとした。デキサメタゾン、ベタメタゾンはC-17位のメチル基の立体配置の異なる立体異性体である。以下に紫外吸収及び赤外線吸収の結果を示す。

デキサメタゾン及びベタメタゾン 標準比較品

UV: $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$: 239 nm, IR: ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} :

1705, 1663, 1620, 1605, 1053, 893

フェニルブタゾン

UV: $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$: 245 nm

3. 抽出操作

検体20ヶを乳鉢中で精製水100mlを加えてすりつぶし泥状とし、一夜放置後遠心分離し上澄液を得る。沈澱物は再度50mlの精製水を加え、1時間振とう後遠心分離し、上澄液を先の上澄液と合する。この上澄液を等量のクロロホルムで2回抽出する。クロロホルム抽出液は0.1規定塩酸溶液で洗浄し、次に0.1規定水酸化ナトリウム溶液で洗液が無色となるまで洗浄する。最後に精製水で洗液が中性となるまで洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧下で溶媒を留去し残留物1を得、以下の試験に供する。

4. 試料の調製 (図1)

検体 (A)

残留物1)を検体(A)とする。これをメタノールに溶解し、高速液体クロマトグラフィー(以下HLCと略す)及びガスクロマトグラフィー(以下GCと略す)の試料とする。

検体 (B)

検体(A)を薄層クロマトグラフィー(以下TLCと略す)により精製する。検体(A)をメタノールに溶解し、シリカゲル薄層板に带状に塗布し、両端にデキサメタゾンをスポットして、クロロホルム・アセトン混液(3:2)で10cm展開する。紫外線ランプ照射下で標準に相当する部分をかき取り、メタノール20mlを加え時々加温し、振とうした後、ガラスフィルター(G-4)で吸引ろ過する。ろ液を合せ減圧下で溶媒を留去し、検体(B)を得る。これをメタノールに溶解しHLC及びGCの試料とする。

検体 (C)

検体(B)1mgを採血ビンに秤取し、酢酸ナトリウム10mg、及びビス(トリメチルシリル)アセトアミド(以下BSAと略す)0.2mlを加えて密栓し、60℃の恒温槽で3時間以上トリメチルシリル化(以下TMS化と略す)反応を行う。反応液を検体(C)とし、GCの試料とする。

検体 (D)

(3. 抽出操作)におけるアルカリ洗液を塩酸酸性と

^{*} 千葉県衛生研究所
(1978年2月18日受理)

し、クロロホルムで抽出する。その抽出液を減圧下で溶媒留去し、検体(D)を得る。これをメタノールに溶解してHLC及びGCの試料とする。

なお検体(A)(B)および(C)はデキサメタゾン及びベタメタゾンの検討に、又、検体(D)をフェニルブタゾンの検討に用いた。

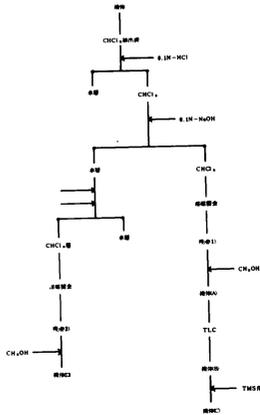


図1 試料の調製

5. 薄層クロマトグラフィー

検体(A)を表1に示す条件によりTLCを行う。

表1 TLC条件

担体	厚さ	展開溶媒	展開距離	呈色試液
メルクキーズルゲル 60F254	0.25mm	クロロホルム : アセトン (3 : 2)	10cm	アルカリ性ブルーテトラゾリウム試液(局方)

6. 高速液体クロマトグラフィー

装置 ヤترون製ユビグラフLC-1

検出器 紫外外部吸収検出器(波長254nm)

分離器 内径5mm, 長さ500mm, ガラス管

レンジ 0.16A UFS

分離管の充てん剤, 溶出液, 及び流速は表2に示した。

表2 HLC操作条件

条件	充てん剤	溶出液	流速
6-a	イアトロビーズ 6RS-8020	水・メタノール混液 (3 : 7)	3.3ml/min
6-b	イアトロビーズ 6ES-8041	エタノール・n-ヘキサン混液 (3 : 7)	2.0ml/min

7. ガスクロマトグラフィー

装置 島津製作所製GC-4CM

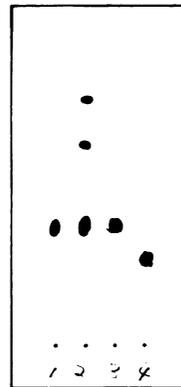
検出器 水素炎イオン化検出器

分離器 内径3mm, 長さ200cmのガラス管
 充てん剤クロモソルブW(AW)にOV-17, OV-1, SE-30, DC-11, を2%コーティングしたもの。
 分離管温度 250~270℃の一定温度
 検出器及び注入口温度 280~330℃の一定温度
 キャリヤガス 窒素40ml/min
 燃料ガス 空気1kg/cm², 水素0.6kg/cm²
 レンジ 8~16, 感度 10³

III 実験結果

1. 薄層クロマトグラフィー

結果を図2に示した。デキサメタゾンとベタメタゾンは、Rf値0.41を示し分離できなかった。試料は3ヶの紫色のスポットを与え、そのうち1ヶはRf値0.41に標準比較品と一致するスポットを確認した。他の2ヶは色の薄い小スポットで、Rf値は各々0.74, 0.88であった。



- ①デキサメタゾン
- ②検体(残査1)
- ③ベタメタゾン
- ④プレドニゾン

図2 標準比較品及び検体のTLC

2. 高速液体クロマトグラフィー

(1) デキサメタゾン及びベタメタゾンの結果を表3に示した。条件(6-a), (6-b)ではデキサメタゾン及びベタメタゾンを分離することはできなかった。検体(A), (B)では共に両条件において、デキサメタゾン又はベタメタゾンと一致するRtにピークを認めた。また他に2ヶの未知ピークを得た。

(2) 検体(D)において条件(6-a), (6-b)共にフェニルブタゾンのRt 2.9分及び3.2分に一致するピークが認められた。条件(6-a)では他に3ヶの未知のピークを, 条件(6-b)では他に1ヶの未知のピークを得た。

表3 HLCにおけるデキサメタゾン又はベタメタゾンの検討

条件	試料	検体ピークのR _t (分)	標準ピークのR _t (分)
6-a	検体(A), 検体(B)	4.3, 3.6,	4.3
6-b	検体(A), 検体(B)	3.0, 4.0, 4.4,	3.0

3. ガスクロマトグラフィー

(1) 直接法

検体(A), (B)を用いて検討したところ、検体(A)ではピーク数が多いので、主として検体(B)を用いて検討した。

(OV-17) : 検体(B)において表4に示す様に温度条件を変化させて、デキサメタゾンを確認した。

(OV-1), (SE-30) : 表5に示す様に検体(B)よりデキサメタゾンを確認した。

(2) TMS化法

検体(C)の調製に準じてデキサメタゾンのTMS化を行った。OV-17, SE-30, OV-1における結果を表6に示す。また検体(C)より標準のピークの一部に一致するピークを確認した。

(3) 表7に示す様に、SE-30, DC-11において、検体(D)よりフェニルブタゾンを確認した。

表4 GCによる検体(B)の温度による変化

カラム温度(℃)	検出器温度(℃)	検体ピークのR _t (分)	標準ピークのR _t (分)
260	290	11.0	11.0
270	300	7.2	7.2
280	330	5.8	5.8

表5 GCによるデキサメタゾンの検討

カラム充てん剤	カラム温度(℃)	検出器温度(℃)	検体ピークのR _t (分)	標準ピークのR _t (分)
OV-1	260	285	7.8	7.8
SE-30	260	290	6.0	6.0

IV 考 察

1. 薄層クロマトグラフィー

副腎皮質ホルモンの確認に関しては、テトラゾリウムを用いる方法、紫外部吸収法、イソニコチン酸ヒドラジド法、及びジブチル-P-クレゾール法などがある。そのうちテトラゾリウムを用いる方法は特異性に勝れている。

ブルーテトラゾリウムはデキサメタゾン及びベタメタゾンにより還元されて紫色のスポット(フォルマザン)

を与えた。検体よりデキサメタゾン又はベタメタゾンを確認されたスポットの他に2ヶの小スポットを得たが、これらはC-17位にα-ケトールを有する他の副腎皮質ホルモンの可能性もある。しかし著者らは他に副腎皮質ホルモンの標準の入手に困難をきたし、幸うじてプレドニゾロンのみ入手できたので、これを検討したところ、R_f値0.30で検体中のスポットとは一致せず、2ヶのスポットについては同定できなかった。

表6 TMS化法によるデキサメタゾンの検討

カラム充てん剤	カラム温度(℃)	検出器温度(℃)	検体(C)のピークのR _t (分)	標準ピークのR _t (分)
OV-17	270	300		1.4, 1.8 10.8, 17.5
SE-30	270	290		2.7, 3.9, 22.9
OV-1	265	285	2.8 5.4	2.4, 2.8 3.2, 18

表7 GCによるフェニルブタゾンの検討

カラム充てん剤	カラム温度(℃)	検出器温度(℃)	検体(D)のピークのR _t (分)	標準ピークのR _t (分)
SE-30	270	300	2.7	2.7
DC-11	270	290	3.5	3.5

2. 高速液体クロマトグラフィー

デキサメタゾン及びベタメタゾンはメタノール溶液中で239nmに吸収極大を持ち、又フェニルブタゾンは245nmである為、検出器の固定波長254nmに対して有利であった。検体(A), (B)においてデキサメタゾン又はベタメタゾンを確認したが、他の2ヶのピークについては不明である。また検体(D)においてもフェニルブタゾン以外に2ヶの未知のピークの存在を確認した。

3. ガスクロマトグラフィー

副腎皮質ホルモンは側鎖が熱分解され易く、GCによる分析では試料を直接GCで分析せずに、熱的に安定な誘導体としてからGC分析の試料に供することが多い。この為、誘導体に関する種々の研究がある。著者らは、副腎皮質ホルモンを直接GC分析する直接法、及び側鎖をTMS化してGC分析する方法について検討した。また検体(A)では夾雑物によるピークが多く、TLCによる精製の操作が必要であり検体(B)を用いた。

直接法においては熱分解により、幾つかのピークが現われることが予想されたが、標準比較品より単一のピークが得られた。このピークは未分解の標準比較品のピークであるが、又は分解物のピークであるかは不明である。いずれにせよ、ピークの再現性が良いことが明

らかとなったので、これを標準ピークとして検体の検索を行った。

一方、副腎皮質ホルモンのTMS化法に用いるシリル化剤として、BSA、ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド、ヘキサメチルジシラザン、トリメチルクロロシラン等が検討されている³⁾が、今回はBSAによるTMS化反応を行ない、反応温度は、室温放置では反応が遅いので、60℃とした。

反応物のガスクロマトグラムは反応時間によりピークの型が異なった。これは反応時間の不足の為か、或は反応生成物の分解の為かは不明である。そこでOV-1に関してTMS化物の経時変化を検討したところ、Rt 2.4分、3.2分のピークは時間を経るにつれて大きくなり、Rt 2.8分の小ピークは変化しない傾向を認めた。

また一般にトリメチルシリルエーテル(TMSE)は加水分解を受け易い。そこでTMS化反応液に精製水5 μ lを入れ、1時間後にガスクロマトグラムを検討すると、分解物と思われる新たなピークが幾つか現われた。従って反応により生成したTMSEが水分により分解を受けない様に、試料及び反応過程中の水分には十分な注意が必要である。

以上の様に健康食品中より合成副腎皮質ホルモン剤及び合成抗炎症剤を検出した。これらは副作用^{註)}が強く、治療として用いる場合にも十分な注意を必要とされている。

V ま と め

健康食品中より合成副腎皮質ホルモン剤であるデキサメタゾン又はベタメタゾンの含有が薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、及びガスクロマトグラフィーにより確認された。更に合成抗炎症剤のフェニルブタゾンの含有も高速液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィーにより確認された。尚、これらは医薬品の中でも取扱いに十分な注意を要する物で、健康食品中に存在することは危険というほかはない。今後とも十分な監視が必要であろう。

参 考 文 献

- 1) 五郎丸毅, 三原真理ら: 外国製漢方製剤より合成消炎鎮痛剤およびステロイド剤の検出(II), 医薬品研究, 8巻, (2号), 212~217, 1977
- 2) M. A. Kirschner, H. M. Fales. : Gas Chromatographic Analysis of 17-Hydroxy corticosteroids by Means of Their Bismethylene-dioxy Derivatives, Analytical Chemistry, Vol.

34, No.12, 1548~1551, 1962

- 3) Helmut Gleispach : The use of different silylating agents for structure analyses of steroids, Journal of Chromatography, Vol. 91, 407~412, 1974

註)

- 1) デキサメタゾンは強力な抗炎症作用を持ち、リウマチ性疾患、アレルギー性疾患、重症皮膚疾患等に用いられる。しかし副作用もかなりあり、消化管潰瘍、感染症誘発、精神障害、満月様顔貌が起こる。また治療に際しては、患者の薬剤の摂取状況その他を考慮した上で用い、投薬方法にも注意が必要であると言われている。従って医師の指示により使用すべき薬剤であり、日本薬局方では、指定医薬品、要指示医薬品としてその取扱い方を規定している。
- 2) フェニルブタゾンは日本では抗リウマチ・消炎剤として発売されている。これは常用量においてさえ、強い副作用の現われることもあり、嘔吐、発疹、めまい等の症状がしばしば起こる。更に、治療の目的で用いる際には、患者の検査を反復しながら投薬する、等の注意が必要とされる。