

健康食品中に含有されるフェンフルラミン, N-ニトロソフェンフルラミン及びシブトラミンのLC/MSによる一斉分析法の検討

井上 智 秦野真澄 小笠原光憲 金本 昭 大瀬戸光明 井上博雄

A Study on Simultaneous Determination of Fenfluramine, N-Nitrosafenfluramine and Sibutramine in Health Food Supplements by Liquid Chromatography Mass Spectrometry

Satoshi INOUE, Masumi SHINNO, Mitsunori OGASAWARA, Akira KANAMOTO, Mitsuki OSETO, Hiroo INOUE

An analytical method for the simultaneous determination of Fenfluramine, N-Nitrosafenfluramine and Sibutramine in health food supplements by liquid chromatography mass spectrometry (LC/MS) has been developed.

By using atmospheric pressure chemical ionization, all compounds produced positive quasi-molecular ion. Each compound was able to be clearly separated on a C30 column with 0.005% formic acid-acetonitrile according to the mobile phase. After the sample was extracted with methanol, the mixture was clarified by centrifugation. Then the supernatant was analyzed by LC/MS. The recoveries of all compounds spiked to a commercially available health food supplement were more than 90%, and each coefficient of variation was less than 6.9%, respectively.

Keywords : Health food supplement, Fenfluramine, N-Nitrosafenfluramine, Sibutramine, C30 column, LC/MS, APCI

はじめに

近年の高齢化社会の到来に伴い、健康寿命の延伸及び生活の質の向上を実現するため、生活習慣病の予防に対する意識が高まっている。また、生活習慣病の発症には、栄養・食生活との関連がみられるものが多いため、食生活の改善とともに、健康食品等従来の食品以外の製品への依存も高まっており、特定保健用食品の市場規模においても、平成15年度(5,668.8億円)は、平成9年度(1,314.5億円)と比較し4.3倍と飛躍的な増加を示している¹⁾。一方、栄養対策も栄養の過剰摂取が重要な課題のひとつとなっており、特に、生活習慣病の危険因子である肥満防止への関心の高揚や女性の間での痩身願望のため、ダイエット用健康食品への関心が高まっている。

また、インターネットの普及に伴い、外国製品も個人輸入等により容易に入手可能となってきたことから、我が国においては、薬事法により無許可による製造販売が厳しく規制されている医薬品成分を含有する製品も流通

することとなり、平成14年には、欧米において肥満治療薬として使用されているフェンフルラミンの誘導体であるN-ニトロソフェンフルラミンを含有する痩身効果を標榜した中国茶により、死亡者3名を含む被害者671名という甚大な健康被害が発生している²⁾。

通常、これら医薬品成分の分析には、UV検出器を用いた高速液体クロマトグラフ(HPLC)法が繁用されているが、検出器の選択性が低いため、確認試験として赤外吸収スペクトル法や薄層クロマトグラフ法等を併用することが求められ^{3,4)}、多くの労力と日数を必要としている。

このため、高感度、高選択性に優れた液体クロマトグラフィー質量分析(LC/MS)法を用いて、ダイエット用健康食品中に含有される恐れのあるフェンフルラミン、N-ニトロソフェンフルラミン及びシブトラミンの3成分の一斉分析法を検討したので報告する。

材料と方法

1 装置

愛媛県立衛生環境研究所 松山市三番町8丁目234番地

液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC/MS)

高速液体クロマトグラフはHP1100 (ヒューレットパッカード社) を、質量分析計はイオン源にエレクトロスプレーイオン源 (ESI) 及び大気圧化学イオン源 (APCI) を装着可能な二重収束光学系を採用したJMS-LCmate (日本電子株式会社) を用いた。

2 測定条件

測定条件を表1に示した。

3 試薬

フェンフルラミン標準品 (1.0mg/mLメタノール溶液)

表1 LC/MSの測定条件

分離カラム: Develosil C30-UG-5 (野村化学株式会社)
2.0mm i.d×150mm
カラム温度: 40℃
移動相: 0.005% ギ酸・アセトニトリル (95:5) → (20min) → (0:100)
流速: 0.2ml/min
試料注入量: 5μl
イオン化モード: 大気圧化学イオン化法
スイッチングモード: 加速スイッチング
スイッチングスピード: 0.5sec/channel
分解能: 750
測定モード及びモニターイオン
ポジティブモード
フェンフルラミン: 232
N-ニトロソフェンフルラミン: 302
シブトラミン: 280
リングレンズ電圧: 35V
オリフィス電圧: 0V
ヴェーボライザー温度: 500℃
オリフィス温度: 150℃
ネブライジングガス: 窒素ガス
ネブライジングガス流量: 1.0L/min

はCerilliant社製を使用した。また、N-ニトロソフェンフルラミン、シブトラミンは国立医薬品食品衛生研究所から分与されたものを使用した。なお、シブトラミンは塩酸塩1水和物を使用した。

アセトニトリル、メタノール、2-プロパノール、エタノールは和光純薬工業株式会社製高速液体クロマトグラフ用を、ギ酸は和光純薬工業株式会社製試薬特級を使用した。

標準液は、N-ニトロソフェンフルラミン及びシブトラミンを精秤し、メタノールでほぼ100mg/Lの標準原液を調製した。さらに、フェンフルラミン標準品をメタノールで希釈し10mg/Lの標準原液を調製後、それぞれの標準原液をメタノールに混合し標準液を調製した。

なお、各成分の構造式及び分子量を図1に示した。

4 実験試料

分析方法の実試料への適用を検討するために使用した市販健康食品の概要を表2に示した。

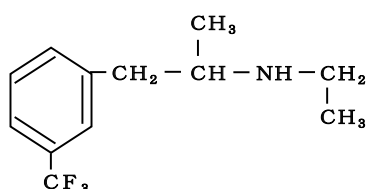
形態は、1包当たり3gの顆粒をラミネート紙でスティック状に包装していた。

5 実験操作

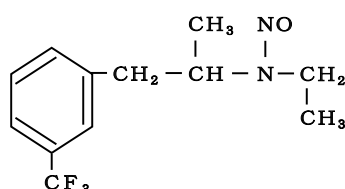
試料をめのう乳鉢で粉碎混和し、200mgを精密に試験管に量り取り、これに、メタノール10mLを加え10分間超音波抽出した。その後、1500rpmで5分間遠心分離し、抽出液を分取した。同様の抽出操作をメタノール5mLで2回繰り返した後、全ての抽出液を合わせメタノール

表2 実験試料の概要

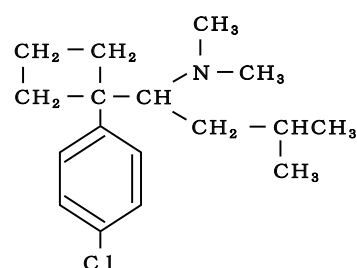
名称	デキストリン含有食品
原材料名	難消化性デキストリン, イソマルトオリゴ糖, プルーンエキス末, 乳酸菌 (殺菌), ウラジロガシエキス末, ハトムギエキス末, 酒石酸カリウム, エリスリトール, ビタミンC, 増粘剤 (プルラン), 甘味料 (スクラロース), ナイアシン, ビタミンB ₆ , ビタミンB ₂ , ビタミンB ₁ , 葉酸, ビタミンB ₁₂
内容量	約90g (3g×30袋)



フェンフルラミン
分子式: C₁₂H₁₆NF₃
分子量: 231.3



N-ニトロソフェンフルラミン
分子式: C₁₂H₁₅N₂O F₃
分子量: 260.3



シブトラミン
分子式: C₁₇H₂₆NCI
分子量: 279.9

図1 検討対象成分の構造式及び分子量

で全量を25mLとし試験溶液とした。

結果及び考察

1 LC/MS測定条件の検討

(1) LC/MSにおけるイオン源の選定

3成分のLC/MSでのイオン化法としては、ESIを用いた方法が報告されているが^{5~9)}、同じ大気圧イオン化法であるAPCIはESIに比較し、比較的分子量の大きい成分はイオン化されないため¹⁰⁾、高分子量共存物質の影響を受けないことから両方法で検討した。3成分の最適イオン化法を選択するため、それぞれのイオン化法について、各成分標準液1mg/Lを用い、フローインジェクション法により、イオン化状況を確認した。

その結果、APCI法ポジティブモードでは3成分とも擬分子イオンピークを生成したが、ESI法ポジティブモードではシブトラミンがフラグメンテーションを起こし、擬分子イオンピークを生成しなかった。このため、今回の測定には、3成分の擬分子イオンピークを生成するAPCI法を用いた。

(2) 質量スペクトル測定条件の検討

APCI法において、質量スペクトルに影響を及ぼすと考えられるリングレンズ電圧とオリフィス電圧をそれぞれ0~50V、0~20Vの範囲で変化させ、標準液1mg/Lを用い、フローインジェクション法により最適イオン化条件を検討した。その結果を表3に示した。

フェンフルラミンに比較し、他の成分の相対感度が低

表3 リングレンズ及びオリフィス電圧の最適条件

成分名	リングレンズ電圧 (V)	オリフィス電圧 (V)
フェンフルラミン	45	10
N-ニトロソフェンフルラミン	35	0
シブトラミン	35	0

いため、これらの成分の最適条件であるリングレンズ電圧35V、オリフィス電圧0Vを用いることにした。

この条件で得られた各成分のマススペクトルを図2に示した。フェンフルラミンでは、 $m/z = 232$ に $[M+H]^+$

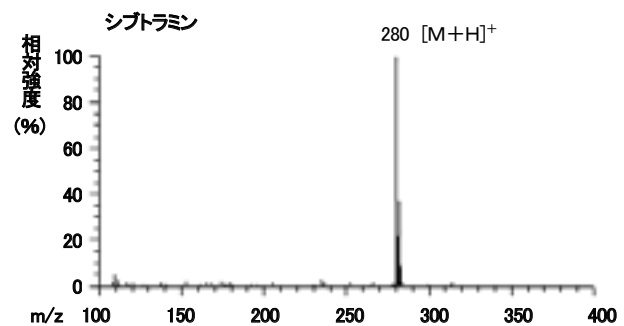
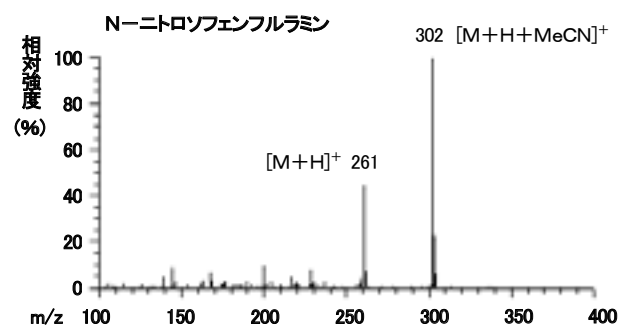
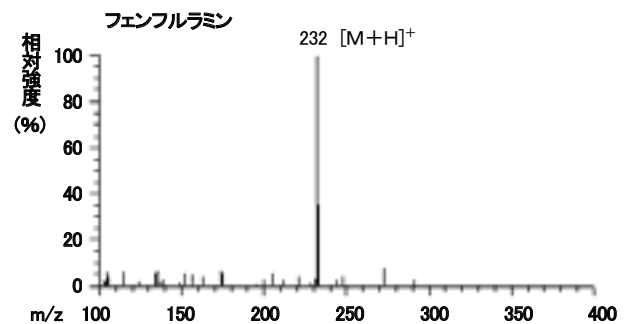


図2 各成分のマススペクトル

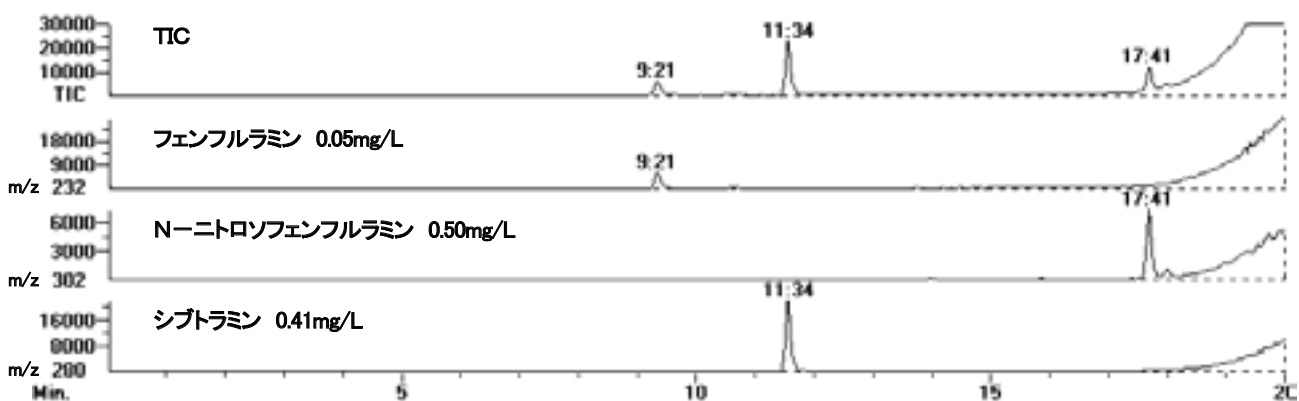


図3 全イオンクロマトグラム及び各成分のマスクロマトグラム

の擬分子イオンの強いピークが見られベースピークとなっていたので、選択イオンモニタリング（SIM）で用いることにした。なお、同位体比パターンもフェンフルラミンのものとは一致していた。N-ニトロソフェンフルラミンでは、 $m/z = 261$ に $[M+H]^+$ 、 $m/z = 302$ に移動相中のアセトニトリルが付加した擬分子イオンのピークがそれぞれ見られたが、ベースピークとなっている302をSIMで用いた。また、同位体比パターンもN-ニトロソフェンフルラミンのものとは一致していた。シブトラミンでは、 $m/z = 280$ に $[M+H]^+$ の擬分子イオンの強いピークが見られベースピークとなっていたのでSIMで用いることにした。なお、同位体比パターンもシブトラミンのものとは一致していた。

(3) HPLC分離条件の検討

医薬品の分析では、カラムはODS系、移動相はリン酸緩衝液が常用されるが、LC/MSでは、不揮発性の塩を含む溶液は長時間使用すると試料導入部が塩で汚染されたり、詰まってしまうため使用できない¹¹⁾。このため、揮発性の塩である酢酸アンモニウムが用いられている。一方、検出感度を上げるためには、溶媒の電気伝導度を下げる必要がある。そこで、塩基性低分子化合物に通常使用されるギ酸・アセトニトリル混液¹²⁾を用いることにし、ギ酸の濃度は、0.005%と通常用いられる濃度より低濃度とした。また、カラムは、水100%の移動相でも良好な分離能力を発揮するC30カラムを使用した。その結果、表1に示した条件で最も良好な結果が得られ、保持時間による各成分の定性が可能となった。

この条件で得られた各成分の全イオンクロマトグラム及びマスクロマトグラムを図3に示した。

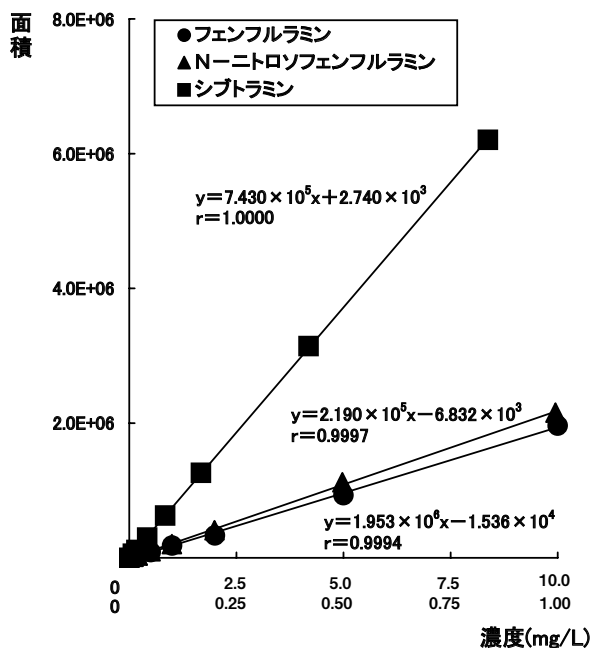


図4 各成分の検量線

(横軸は、フェンフルラミンは下段、その他の成分は上段を用いて作図)

(4) 検量線

混合標準液を用い、表1の条件で検量線を作成した。その結果を図4に示した。

フェンフルラミンは、0.01~1.00mg/L、その他の成分は、ほぼ0.1~10.0mg/Lと全ての成分とも 10^2 レベルで相関係数0.999以上の良好な直線関係を示した。

2 抽出条件の検討

(1) 抽出溶媒の検討

安田ら³⁾によると、フェンフルラミンは、エフェドリン類アルカロイドと同様HPLC移動相と同じ組成のラウリル硫酸ナトリウム溶液が、最も高い抽出効率を示し、アセトニトリルのみでは、不十分である旨報告され

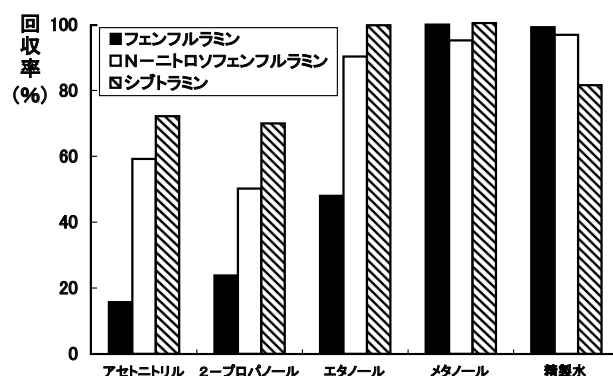


図5 抽出溶媒と回収率の関係

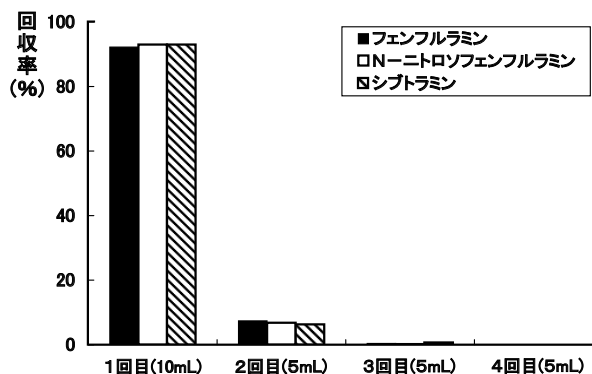


図6 抽出回数と回収率の関係

表4 市販健康食品での回収率

成分名	濃度 (ng/mg)	回収率 (%)
フェンフルラミン	5	95.9 (4.7)
N-ニトロソフェンフルラミン	50	98.8 (6.9)
シブトラミン	41	91.4 (3.1)

(n = 5, () 内は変動係数)

ている。そこで、比較的極性の高い、アセトニトリル、2-プロパノール、エタノール、メタノール、精製水の5溶媒を用い、抽出効率を検討した。

粉碎した実験試料にフェンフルラミン $1\mu\text{g}$ 、N-ニトロソフェンフルラミン及びシブトラミンはほぼ $10\mu\text{g}$ となるよう標準液を添加し、窒素を噴きつけ溶媒を留去後、それぞれの溶媒による抽出効率を測定した。その結果を図5に示した。

フェンフルラミンは、極性の低い溶媒では回収率が低く、極性の増加に伴い回収率が増加し、メタノール、精製水では90%以上を示した。N-ニトロソフェンフルラミンは、極性の増加と共に回収率が増加し、エタノール以上で90%以上を示した。シブトラミンは、極性の増加に伴い、回収率の増加を示し、エタノール、メタノールでは90%以上を示したが、精製水では低下を示した。

以上のことから、抽出溶媒は、3成分とも90%以上の回収率を示すメタノールとした。

(2) 抽出回数の検討

抽出回数の抽出効率への影響を検討するため、実験試料に溶出溶媒の検討と同様な方法で標準液を添加後、溶出溶媒メタノールの容量を1回目10mLとし、2回目以降は5mLとして4回抽出操作を行い、それぞれの回収率を測定した。その結果を図6に示した。

3成分とも1回目の抽出操作で90%以上の回収率を示し、4回目以降では検出されなかった。

以上のことから抽出操作は10mLで1回、5mLで2回とした。

3 添加回収実験

本法の実試料への適用と再現性を検討するため、フェンフルラミンは $5\text{ng}/\text{mg}$ 、その他の成分はほぼ $50\text{ng}/\text{mg}$ となるように、実験試料に抽出条件の検討と同様な方法で標準液を添加後、回収率を測定した。その結果を表4に示した。

3成分とも回収率は90%以上、変動係数は6.9%以下と良好な結果を示し、本法が実試料での測定でも有用であることが明らかとなった。

まとめ

ダイエット用健康食品に含有される恐れのある医薬品成分のフェンフルラミン、N-ニトロソフェンフルラミン、シブトラミンのLC/MSによる一斉分析法を検討した結果、次のことが明らかとなった。

- 1) APC I法によりフェンフルラミン、N-ニトロソフェンフルラミン、シブトラミンはポジティブモードで強い擬分子イオンを生成した。
- 2) C30カラムと0.005%ギ酸・アセトニトリル混液移動相を用い3成分を分離することが可能であり、フェンフルラミンは $0.01\sim 1.00\text{mg}/\text{L}$ 、その他の成分はほぼ $0.1\sim 10.0\text{mg}/\text{L}$ の範囲で良好な直線性を示した。
- 3) 溶媒にメタノールを使用することにより、3成分とも良好な抽出効率を示した。
- 4) 市販健康食品への添加試験では、3成分の回収率は90%以上であり、変動係数も6.9%以下と良好な結果を示した。

謝 辞

今回の分析法の検討に当たって、試料や情報の提供をいただきました愛媛県業務衛生課の皆様にご感謝します。

文 献

- 1) 財団法人日本健康・栄養食品協会：JHNFANews
- 2) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課：中国製ダイエット用健康食品（未承認医薬品）による健康被害事例等。報道発表資料，平成15年8月27日
- 3) 安田一郎ほか：東京衛研年報，48，71～75（1997）
- 4) 吉岡直樹ほか：兵庫県立健康環境科学研究所センター年報，1，124～129（2002）
- 5) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課：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。医薬監麻発第0729009号，平成14年7月29日
- 6) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課：シブトラミンの分析方法について。医薬監麻発第0411004号，平成15年4月11日
- 7) 高橋紀世子ほか：第40回全国衛生化学技術協議会年会講演集，150～151（2003）
- 8) 前田めぐみほか：第40回全国衛生化学技術協議会年会講演集，154～155（2003）
- 9) 鎌倉浩之ほか：第40回全国衛生化学技術協議会年会講演集，156～157（2003）
- 10) 丹羽利充ほか：最新のマススペクトロメトリー，43～44，化学同人（1995）
- 11) 金井みち子：質量分析，45，225～232（1997）
- 12) 宮城大：質量分析，45，101～111（1997）