

資料

健康食品に含まれるインヨウカクの検出

伊達 英代, 菅田 和子, 上田 健太*, 石部 敦子*

Inspection of Epimedium Herb in Health Food

HIDEYO DATE, WAKO SUGETA, KENTA UEDA* and ATSUKO ISHIBE*

(Received October 4, 2019)

平成30年度, 本県薬務課が実施した「無承認無許可医薬品等実態調査」において, 強壯をうたった「健康食品」2製品について分析を実施した. 当該2製品のHPLC及びLC-QTOF/MSの各スペクトルから, インヨウカクの主要成分であるマグノフロリン及びイカリインを示唆するデータが検出された. そこで, 日本薬局方インヨウカク及び2製品のLC-QTOF/MSのEICパターン及びマススペクトルを比較した結果, 「専ら医薬品として使用される成分本質」に該当するインヨウカクあるいはそのエキスが混入している蓋然性(可能性)が高いと判断された. さらに, LC-MS/MSを用いて, 製品中の微量のマグノフロリン及びイカリインを定量することができた.

Key words: 無承認無許可医薬品, インヨウカク, マグノフロリン, イカリイン, HPLC, LC-QTOF/MS, LC-MS/MS

緒言

広島県では, 「無承認無許可医薬品」の流通阻止及び健康被害の未然防止を目的に, 「無承認無許可医薬品等実態調査」(実態調査)を実施している. 県薬務課及び保健所薬事監視員が, インターネット及びドラッグストア等で強壯又は痩身をうたった「健康食品」を買い上げ, 当センターは, 不当に添加された医薬品成分の分析(成分分析)を担当している. また, 健康被害発生時には, 原因究明のための成分分析も実施している. 過去の実態調査及び原因究明のための成分分析において, 痩身をうたった「健康食品」から利尿剤, 下剤, 向精神薬及び食欲抑制剤が[1], 強壯をうたった「健康食品」から勃起不全治療薬及びその構造類似成分, 経口血糖降下薬[2

-3]が検出されている.

平成30年度の実態調査において, 強壯をうたった「健康食品」2製品から, 高速液体クロマトグラフ(HPLC)及び液体クロマトグラフ-四重極飛行時間型質量分析計(LC-QTOF/MS)を用いた確認によりマグノフロリン及びイカリインが検出され, 液体クロマトグラフ-四重極質量分析計(LC-MS/MS)を用いて定量した. その詳細を報告する.

方法

1 試料

インターネットで買い上げた2製品. 製品の概要を表1に示した.

表1 製品の概要

製品の表示		外観
名称	内容量	
製品①	トンカットアリエキス末, 酵母亜鉛, ガラナ含有食品 (430mg×30粒)	透明カプセル中に
製品②	マカ粉末, L-シトルリン, 酵母含有食品 (430mg×60粒)	褐色粉末

*広島県健康福祉局薬務課: Hiroshima Prefectural Government Health and Welfare Affairs Bureau Pharmaceutical Division

2 試薬

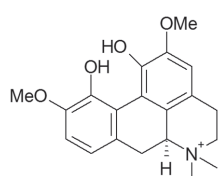
(1) 標準品

マグノフロリンは富士フィルム和光純薬(株)製生薬試験用を、イカリインはLKT Laboratories, Inc.製を使用した(図1)。

(2) その他試薬及び器材

日本薬局方インヨウカクは(株)栃本天海堂製を使用した。

HPLC移動相には、関東化学(株)製HPLC用アセトニトリル、蒸留水及びリン酸を、LC-QTOF/MS及びLC-MS/MS移動相には、関東化学(株)製LC-MS用アセトニトリル及び蒸留水、ギ酸は富士フィルム和光純薬(株)製LC-MS用を使用した。

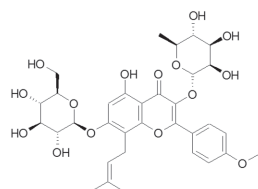


Magnoflorine

Molecular Formula : $C_{20}H_{24}NO_4^+$

Average mass : 342.408

Monoisotopic mass : 342.169983



Icarin

Molecular Formula : $C_{33}H_{40}O_{15}$

Average mass : 676.662

Monoisotopic mass : 676.236694

図1 マグノフロリン及びイカリインの構造

試料溶液精製用カラムにSep-Pak Vac C18 (1 g, 6 cc, Waters Corporation製)を、カラムのコンディショニング及び抽出溶媒は、関東化学(株)製HPLC用メタノール及びメルクミリポア(株)製Milli-Q® Gradient A10で製造した超純水を使用した。

3 装置及び条件

(1) HPLCによる確認

装置はAgilent 1200 (Agilent Technologies, Inc.製)を用いた。確認条件は表2に示した。

(2) LC-QTOF/MSによる確認

LCはAgilent 1260 Infinityを、QTOF/MSはAgilent 6540 UHD (共にAgilent Technologies, Inc.製)を用いた。確認条件は表3に示した。

(3) LC-MS/MSによる定量

LCはAgilent 1100 (Agilent Technologies, Inc.製)を、MS/MSはAPI 3000 (AB Sciex Pte. Ltd.製)を用いた。定量条件は表4に示した。

4 標準溶液の調製

(1) HPLC, LC-QTOF/MS及びLC-MS/MS用標準溶液

イカリイン及びマグノフロリンをそれぞれメタノール

表2 HPLCによる確認条件

カラム	COSMOSIL 5PBB-R (4.6×150 mm, ナカライ製)
移動相	A : 0.1 %リン酸溶液, B : アセトニトリル
グラジエント条件	B (5%) →25分→B (95%) 10分間保持
流量	1.0 mL/min
カラム温度	40 °C
注入量	20 µL
検出波長	280 nm

表3 LC-QTOF/MSによる確認条件

LC条件	
カラム	COSMOSIL 5PBB-R (2.0×150 mm, ナカライ製)
移動相	A : 0.1 %ギ酸溶液, B : 0.1 %ギ酸アセトニトリル溶液
グラジエント条件	B (20%) →25分→B (90%) 5分間保持
流量	0.4 mL/min
カラム温度	40 °C
注入量	1 µL
QTOF/MS条件	
イオン化法	ESI (ポジティブ)
スキャン範囲	$m/z = 100-1000$
乾燥ガス	N_2 , 10 L/min, 350 °C
ネブライザー	N_2 , 50 psig
フラグメンター電圧	120 V キャピラリー電圧 3500 V
リファレンスマス	$m/z = 121.050873, 922.009798$
モニターイオン	マグノフロリン : $m/z 342.16998$ ([M] ⁺) イカリイン : $m/z 677.23669$ ([M+H] ⁺)

で溶解して1000 µg/mLとし標準原液とした。更に、標準原液をメタノールで希釈し、HPLC用標準溶液 (1.0 µg/mL)、LC-QTOF/MS用標準溶液 (0.10 µg/mL) 及びLC-MS/MS定量用標準溶液 (0.005-0.20 µg/mLの範囲) を調整した。

(2) インヨウカク抽出溶液

日本薬局方インヨウカクを粉碎し、約5 gをメタノールに一晩浸した後、浮遊物を除去するため、ろ過した。

5 試料溶液の調製

(1) 製品①の試料溶液

内容物200 mgを精密に量り、メタノール5 mLを正

確に加え、10分間超音波抽出した後、遠心分離し、上澄みを試料溶液とした。

(2) 製品②の試料溶液

内容物500 mgについて製品①と同様の操作で試料溶液を作製し、HPLC及びLC-QTOF/MSで分析すると、クロマトグラムのベースラインノイズが大きく、明瞭なピーク及びスペクトルを確認することが困難であった。そこで、内容物500 mgを精密に量り、水を加えて10分間超音波抽出し、この液をメタノール及び水それぞれ10 mLでコンディショニングしたSep-Pak Vac C18に負荷し、水10 mLで洗浄後、メタノール10 mLで溶出した。この溶出液を濃縮後、メタノールで5 mLとし、HPLC

表4 LC-MS/MSによる定量条件

		LC条件					
	カラム	COSMOSIL 5PBB-R (2.0×150 mm, ナカライ製)					
	移動相	A : 0.1 %ギ酸溶液, B : 0.1 %ギ酸アセトニトリル溶液					
	グラジエント条件	B (20 %) →25分→B (90 %) 5分間保持					
	流量	0.2 mL/min					
	カラム温度	40 °C					
	注入量	5 µL					
		MS/MS条件					
	イオン化法 : ESI (ポジティブ)			測定モード : MRM			
	CUR : 14	MEB : 14		CAD : 12			
	IS (V) : 4500	TEM (°C) : 500					
		Q1	Q3	DP (V)	FP (V)	CE (V)	CXP (V)
マグノフロリン	定量イオン	m/z 342 >	m/z 297	76	140	27	20
	定性イオン	m/z 342 >	m/z 265				
イカリイン	定量イオン	m/z 677 >	m/z 531	86	370	21	14
	定性イオン	m/z 677 >	m/z 369				

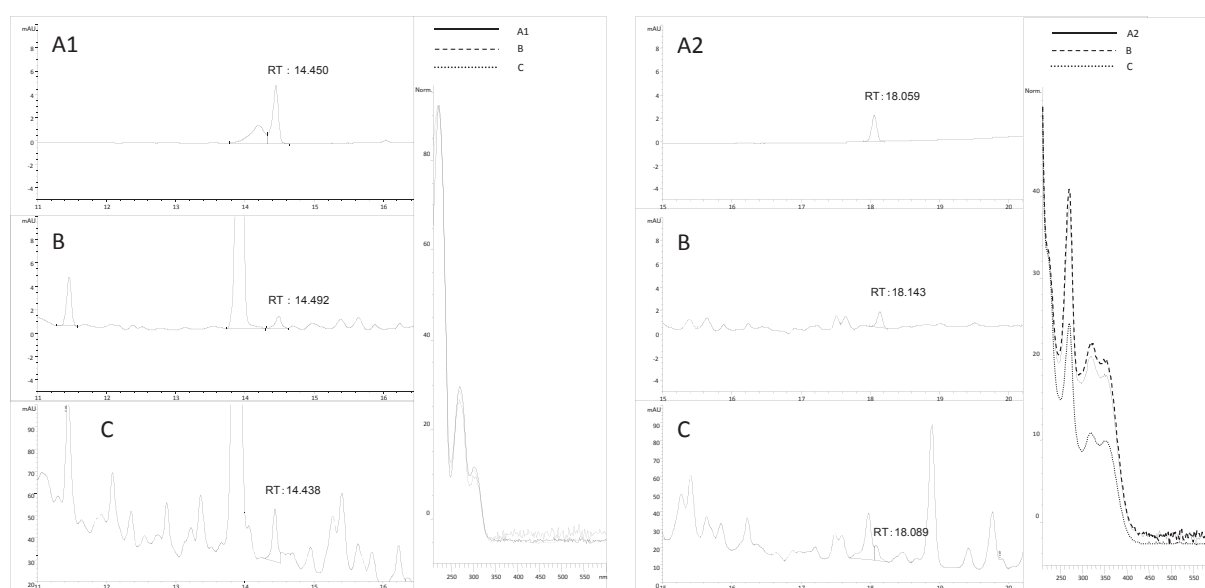


図2 HPLCによるマグノフロリン及びイカリインの確認

A1 : マグノフロリン標準溶液 (1 µg/mL), A2 : イカリイン標準溶液 (1 µg/mL)
B : 製品①, C : 製品②

及びLC-QTOF/MSによる確認用試料溶液とした。なお、内容物200 mgを製品①の試料溶液の調製と同様に操作して得た試料溶液をLC-MS/MSによる定量用試料溶液とした。

結果及び考察

1 マグノフロリン及びイカリインの確認の結果

(1) HPLCによる確認の結果

標準溶液のクロマトグラムは、保持時間 (RT) 約14.5分付近にマグノフロリンが、RT約18.1分付近にイカリインのピークが認められた。2製品の試料溶液のクロマトグラムについても、同じRT付近にそれぞれのピークが認められ、いずれも標準溶液と同様のUVスペクトルを示した (図2)。

(2) LC-QTOF/MSによる確認の結果

標準溶液及び2製品の試料溶液について、表3に示した条件で分析し、マグノフロリンは、分子イオン ($[M]^+$) m/z 342.16998, イカリインはプロトン付加イオン ($[M+H]^+$) m/z 677.23669をモニターイオンとした抽出イ

オンクロマトグラム (EIC) で成分の確認を実施した。

① マグノフロリン

図3に示すとおり、標準溶液及び2製品の試料溶液の m/z 342.16998におけるEICすべて、RT約7.4分付近にマグノフロリンのピークが認められ、いずれのピークのマススペクトルからも、 $[M]^+$ 及びプロトンが脱離してナトリウムが付加した $[M-H+Na]^+$ が観測された。

② イカリイン

図4に示すとおり、イカリイン標準溶液の m/z 677.23669におけるEICでは、RT約13.2分付近にイカリインのピークが認められ、当該ピークのマススペクトルから、 $[M+H]^+$ 及びナトリウム付加イオン $[M+Na]^+$ が観測された。一方、2製品の試料溶液のEICでは、標準溶液と同様のRTのピーク (主ピーク) の他に、RT12-13分の間に複数のサブピークが認められた。主ピークのマススペクトルは、標準溶液と同様の $[M+H]^+$ 及び $[M+Na]^+$ が観測された。

以上により、2製品中にマグノフロリン及びイカリインが含有されていることが確認された。

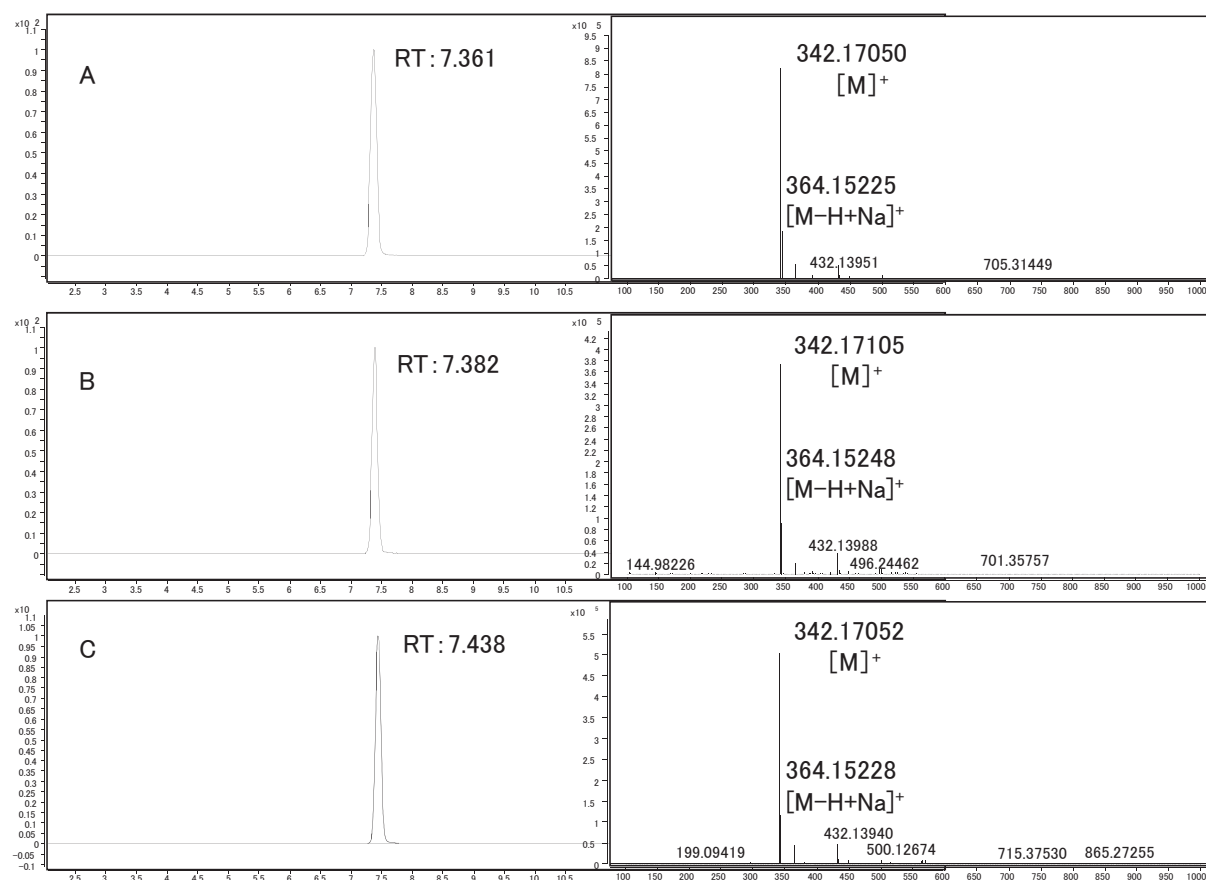


図3 LC-QTOF/MSによるマグノフロリンの確認

モニターイオン m/z 342.16998のEIC及びRT7.4分付近のピークのマススペクトル

A: 標準溶液 (100 ng/mL), B: 製品①, C: 製品②

2 LC-QTOF/MSによる医薬品成分（インヨウカク）の確認の結果

マグノフロリン及びイカリインが確認されたことにより、2製品には、昭和46年6月1日付け薬発第476号厚生省薬務局長通知「無承認無許可医薬品の指導取締りについて」の成分本質の分類上、「専ら医薬品として使用される成分本質」〔4〕に該当するインヨウカクが添加されていることが疑われた。このような天然物の確認は、顕微鏡観察又はDNA抽出による遺伝子の同定法が用いられるが〔5〕、今回の製品は、内容物が微粉末状であり、かつ、多数の材料を混合した製品であることから、天然物としてインヨウカクを確認することは困難と考えられた。

そこで、平成23年5月11日付け厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課薬事監視第一係事務連絡〔6〕を参考に、インヨウカク抽出溶液及び2製品の試料溶液をLC-QTOF/MSを用いて同時に分析し、その類似性を確認することとした。

インヨウカク抽出溶液の m/z 677.23669におけるEICには、2製品の試料溶液のEICと同様、主ピークの他にRT12-13分の間にサブピークが認められ、そのパターン

はよく一致した。各溶液のサブピークについて、同様のRTのピーク同士のマススペクトルを比較すると、イカリインの $[M+H]^+$ 及び複数の共通するイオンが認められる、類似したマススペクトルであった（図5）。この結果、インヨウカクと2製品の類似性が示唆され、製品中にインヨウカクあるいは、そのエキスが混入している可能性が高いと考えられた。

3 LC-MS/MSによる定量結果

2製品のイカリインの定量イオン（ m/z 677>531）のEICは、LC-QTOF/MSのイカリインの m/z 677.23669のEICと同様に複数のピークが確認されたことから（図6）、RT約12分の最も大きなピークで定量することとした。マグノフロリンは、約7.7分付近にピークを認めた。ピーク面積による絶対検量線法で検量線を作製したところ、相関係数 $r = 0.99$ 以上の検量線が得られた。

本検量線を用いて、製品中のマグノフロリン及びイカリインを定量したところ、表5に示したとおり、極微量であった。

HPLC及びLC-QTOF/MSによる確認の結果及び本定量結果については、県薬務課を通じ、当該製品の製造会

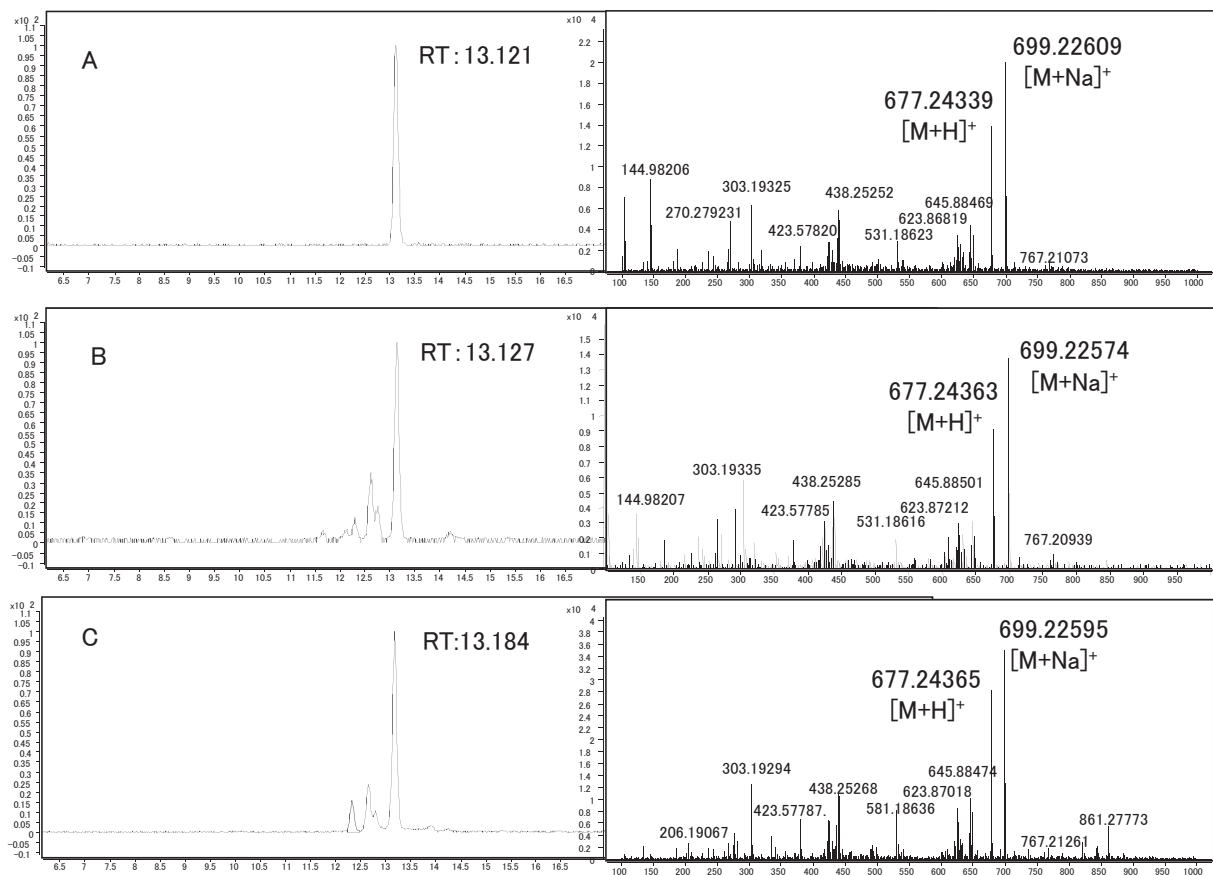


図4 LC-QTOF/MSによるイカリインの確認

モニターイオン m/z 677.23669のEIC及びRT13.2分付近のピークのマススペクトル

A：標準溶液（100 ng/mL）、B：製品①、C：製品②

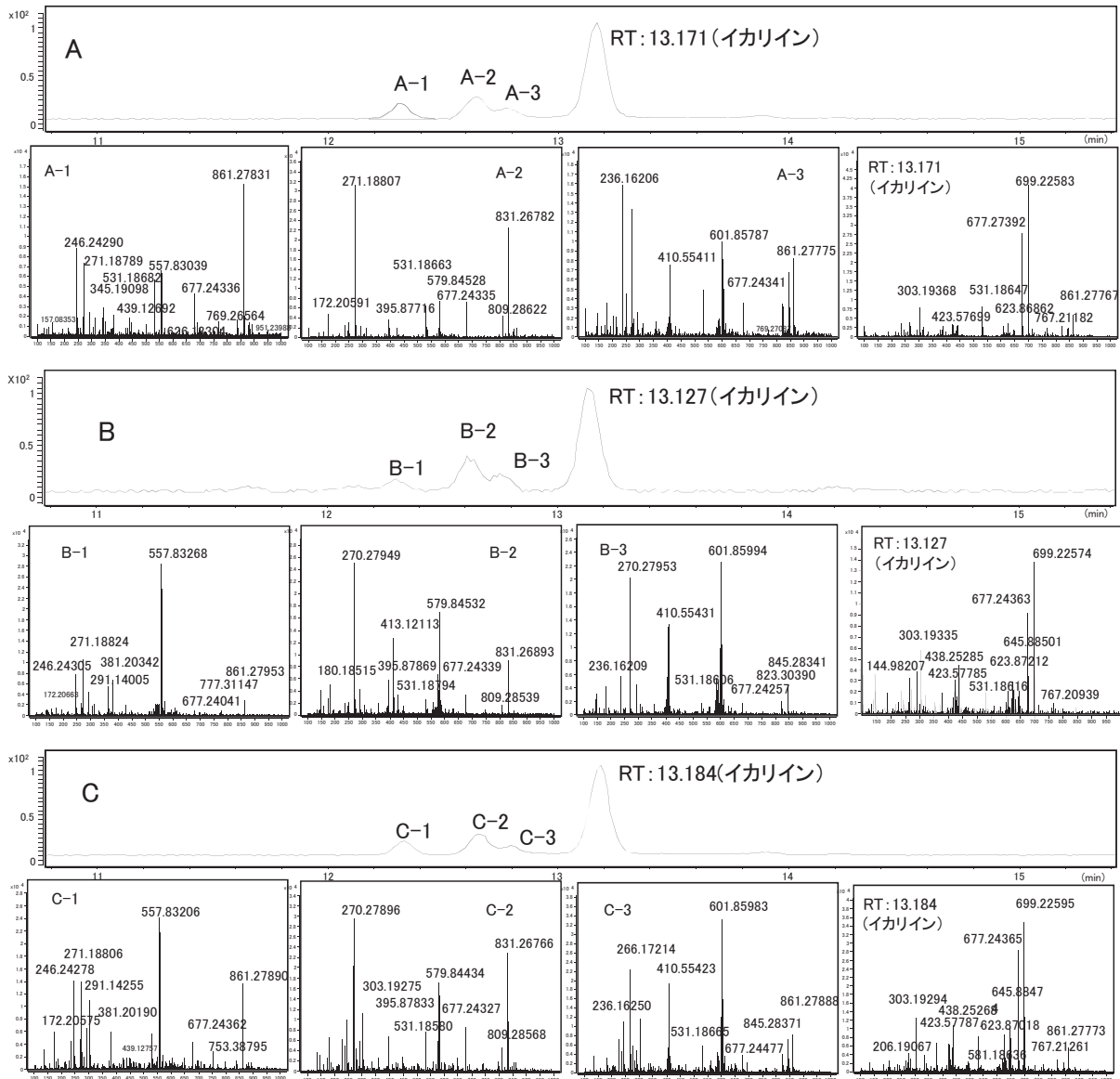


図5 LC-QTOF/MSによるインヨウカクの確認
 モニターイオン m/z 677.23669のEIC及びRT12-13.2分のピークのスเปクトル
 A: インヨウカク抽出溶液, B: 製品①, C: 製品②

表5 LC-MS/MSによる定量の結果 (n = 3)

	マグノフロリン	イカリイン
製品①	1.0 $\mu\text{g/lcap}$	3.6 $\mu\text{g/lcap}$
製品②	0.076 $\mu\text{g/lcap}$	0.47 $\mu\text{g/lcap}$

社の所在地を管轄する自治体に情報提供した。

また、同時期に、千葉県において、今回の2製品を製造した会社の別製品中からインヨウカクが検出された[7]。

まとめ

平成30年度に実施した「無承認無許可医薬品等実態調

査」において、強壮をうたった「健康食品」2製品から、インヨウカクの主要成分であるマグノフロリン及びイカリインを検出した。製品中のマグノフロリン及びイカリイン含量は極微量であったが、HPLC及びLC-QTOF/MSによる各スペクトルの比較により成分を確認し、LC-MS/MSを用いることにより、定量を実施することができた。さらに、LC-QTOF/MSから得られたEICパターンの比較により、「専ら医薬品として使用される成分本質」に該当するインヨウカクあるいはそのエキスの混入の可能性を見出すことができた。

大きな社会問題となった危険ドラッグが、薬機法改正及び税関体制の厳格化等の対策により、国内での流通が激減している状況に反し、「無承認無許可医薬品」の発

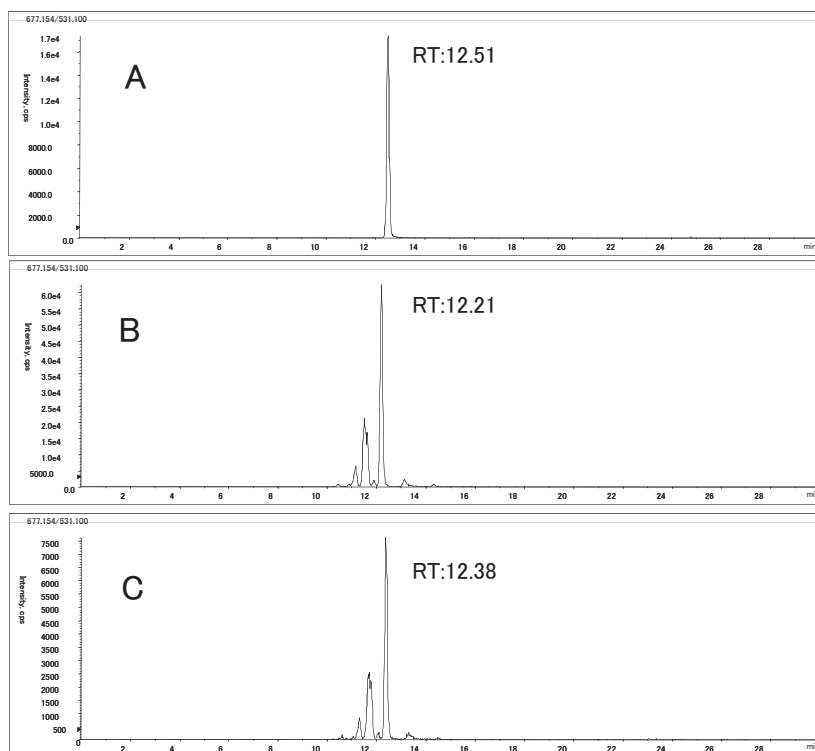


図6 LC-MS/MSによるイカリイン定量イオンのEIC

A: 標準溶液, B: 製品①, C: 製品②

見が増加傾向にある。今後も、「無承認無許可医薬品」の監視・指導取締りに注力していく必要がある。

謝 辞

インヨウカクの検出について、御助言いただいた神奈川県衛生研究所 熊坂謙一先生に、感謝申し上げます。

文 献

- [1] 伊達英代, 豊田安基江, 寺内正裕, 杉村光永, 松尾 健, 齋池千恵子: ダイエットを目的とした健康食品中に含まれる医薬品成分の液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) による迅速分析法, YAKUGAKU ZASSHI, 128 (5), 811-817 (2008).
- [2] 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, YAKUGAKU ZASSHI, 149 (1),

163-172 (2009).

- [3] 伊達英代, 井原紗弥香, 寺内正裕, 新井 清, 松尾 健: 健康食品中のムタプロデナフィルの検出事例, 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告, 19, 21-25 (2011).
- [4] 厚生省薬務局長通知薬発第476号, 無承認無許可医薬品の指導取締りについて, 昭和46年6月1日 (最終改正 平成30年4月18日)
- [5] 合田幸広: 国立医薬品食品衛生研究所における瘦身や強壯を標榜する健康食品中の医薬品成分の分析と同定, YAKUGAKU ZASSHI, 134 (2), 197-202 (2014).
- [6] 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課事務連絡, 医薬品の該当性について, 平成23年5月11日.
- [7] 千葉県ホームページ: 医薬品成分を含有する健康食品の発見について (平成31年2月14日), <https://www.pref.chiba.lg.jp/yakumu/press/2018/20190212iyakuhin.html> (参照2019-03-01)

