

中国製ダイエット用健康食品からの未承認医薬品の検出

【保健衛生室】

前田めぐみ・森田晃祥・小川美緒

山根一城・林田博通・石田茂

Analysis of unauthorized medical supplies from diet food imported from China.

Megumi MAEDA, Akiyoshi MORITA, Mio OGAWA

Kazuki YAMANE, Hiromichi HAYASHIDA, Shigeru ISHIDA

Abstract

In July of 2002, unauthorized diet food products imported from China were the source of a serious health concern in Japan. Three citizens from Tottori suffered from the deleterious side effects of the diet food. We analyzed the food specimen using HPLC and LC/MS/MS test screening. Two causative agents were detected: 1) Fenfluramine, a psychotropic agent 2) N-nitroso-Fenfluramine, a heretofore

1 はじめに

2002年7月12日、厚生労働省より、各都道府県に対し、「中国から個人輸入した未承認医薬品等の服用後に発生した健康被害事例について」の通知があった。

また、同日の読売新聞朝刊において「中国で製造された三種類のダイエット食品を服用した男女12人が肝障害を発症し、うち1人が死亡、1人が生体肝移植手術を受けていた」と報道された。その後、連日の報道で中国製ダイエット用健康食品（未承認医薬品）が全国的に問題となった。

鳥取県においても、保健所及び消費生活センターに対し、7月16日までに3件の相談があり、倦怠感・肝機能障害といった服用者の健康被害が確認された。

そこで、今回我々は、この健康被害の原因物質である未承認医薬品成分のN-ニトロソフェンフルラミンと、その製造時の不純物とされるフェンフルラミンをPDA-HPLCおよびLC/MS/MSを用いて健康食品から検出したので報告する。

2 分析方法

1) 試料

試料名：ダイエット用健康食品

剤形：青、黄、茶色のカプセル剤

カプセル内容物：約250mgの黄土色粉末

2) 標準品

フェンフルラミン塩酸塩：SIGMA製

3) 装置及び測定条件

使用した装置および測定条件についてはTable 1~4に示す。

HPLCによる定量は絶対検量線法で行った。なお、N-ニトロソフェンフルラミンは標準品が販売されていないためフェンフルラミンの検量線を用いて定量を行った。

4) 試験溶液の調整

①フェンフルラミン

カプセル中の粉末0.5gにアセトニトリル/水(1:1)を加え振とう抽出し、遠心分離後、上澄液を減圧下乾固した。これに水を加え懸濁後塩化ナトリウム飽和とし、2mol/L水酸化ナトリウム溶液で弱アルカリ性とした。これを酢酸エチルで抽出し減

Table1 HPLC conditions for determination
of Fenfluramine

Instrument : LC10A(Shimadzu)
 Column : Wakosil15C18 AR(4.6×150mm、5um)
 Column Temp. : 40°C
 Mobile Phase :
 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}:\text{CF}_3\text{COOH}$
 (510:490:6:1)
 Detector : PDA ; 210nm
 Flow rate : 1.0ml/min
 Sample size : 20 μl

Table3 HPLC conditions for determination
of N-nitroso-Fenfluramine

Instrument : LC10A(Shimadzu)
 Column : Shimpak HRS-ODS(4.6×150mm,5um)
 Column Temp. : 40°C
 Mobile Phase : $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:\text{CF}_3\text{COOH}$ (600:400:1)
 Detector : PDA ; 210nm
 Flow rate : 1.0ml/min
 Sample size : 5 μl

Table2 LC/MS/MS conditions for
determination of Fenfluramine

Instrument : API3000 (Applied Biosystems)
 Column : InertsilODS-3 (2.1×150mm、3um)
 Mobile Phase : $\text{CH}_3\text{OH}:\text{0.1\%HCOOH}:\text{H}_2\text{O}$
 (10~100%linear gradient,15min)
 Ionization : ESI(Positive)
 Flow rate : 0.2ml/min
 Sample size : 5 μl

Table4 LC/MS/MS conditions for
determination of N-nitroso-Fenfluramine

Instrument : API3000 (Applied Biosystems)
 Column : InertsilODS-3 (2.1×150mm、3um)
 Mobile Phase : $\text{CH}_3\text{OH}:\text{0.1\%HCOOH}:\text{H}_2\text{O}$
 (10~100%linear gradient,35min)
 Ionization : ESI(Positive)
 Flow rate : 0.2ml/min
 Sample size : 5 μl

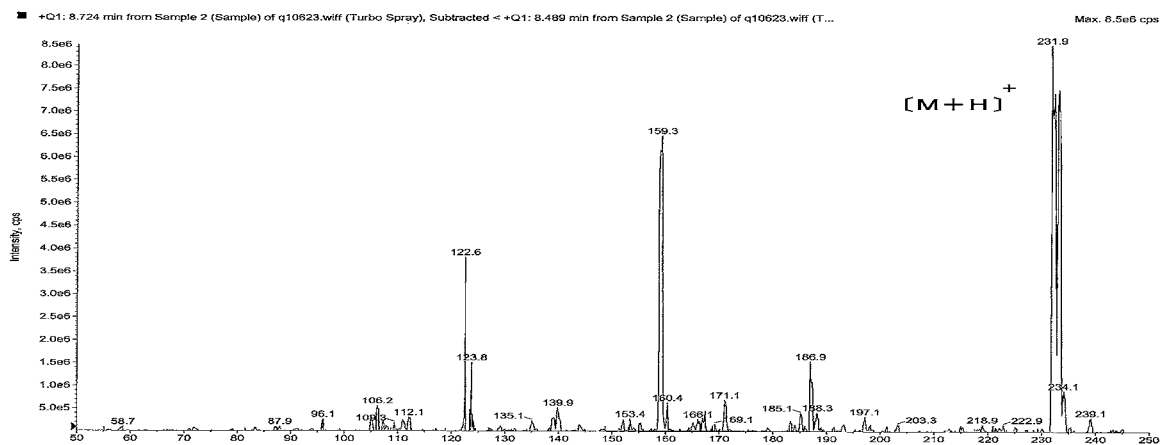


Fig. 1 Fenfluramine Mass spectrum of Sample by LC/MS (R.T 8.71min)

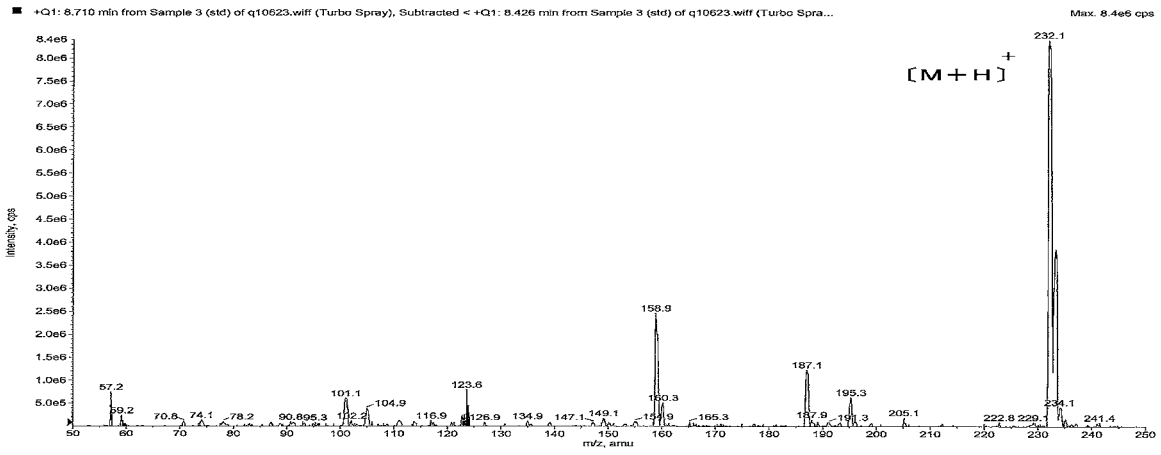


Fig. 2 Fenfluramine Mass spectrum of Standard by LC/MS (R.T 8.71min)

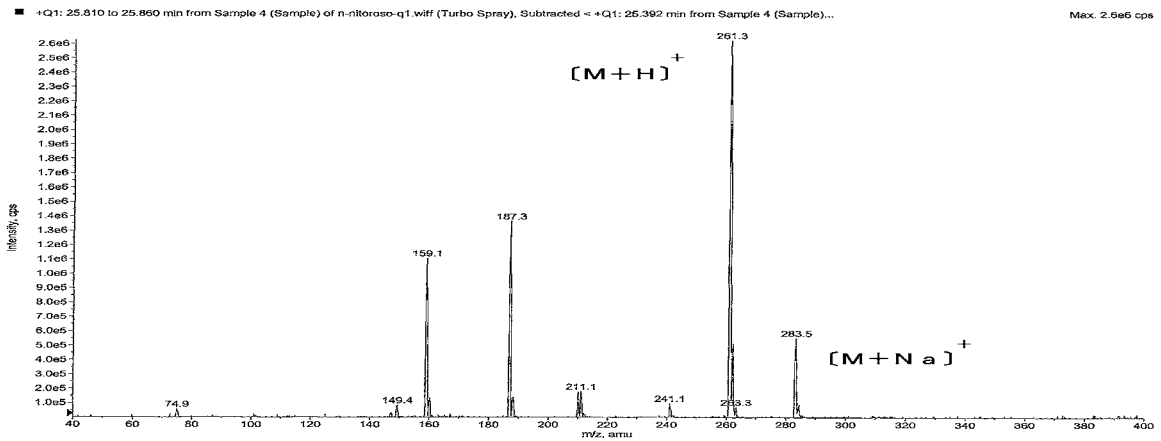


Fig. 3 N-Nitroso-Fenfluramine Mass spectrum of Sample by LC/MS (R.T 25.8min)

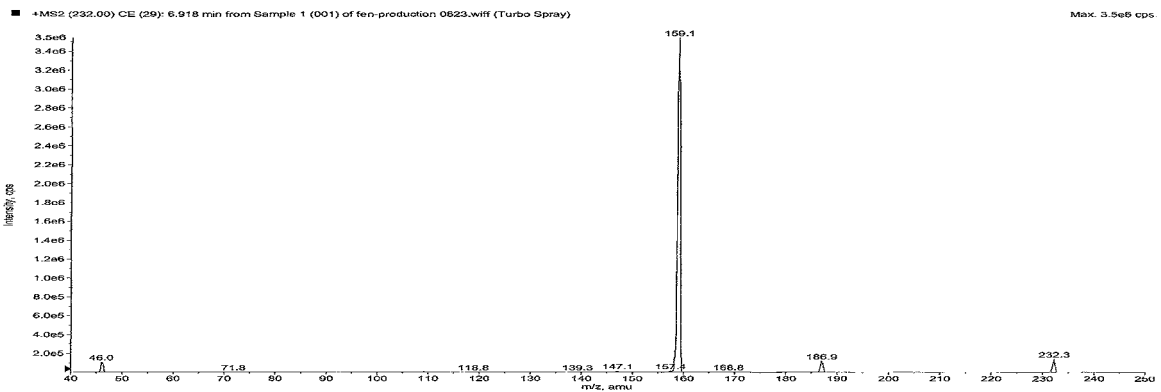


Fig. 4 Fenfluramine Product ion Mass spectrum from Precursor ion (m/z232) of Sample by LC/MS

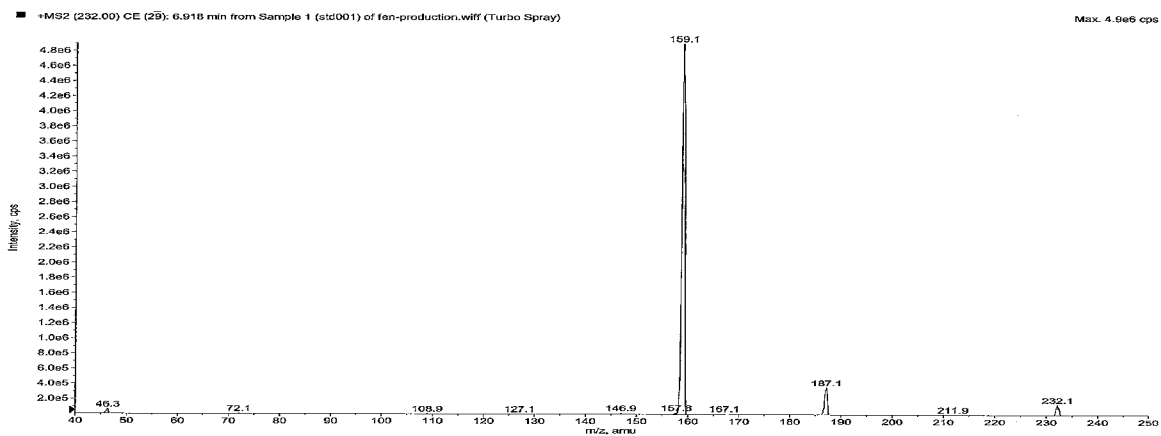


Fig. 5 Fenfluramine Product ion Mass spectrum from Precursor ion (m/z 232) of Standard by LC/MS

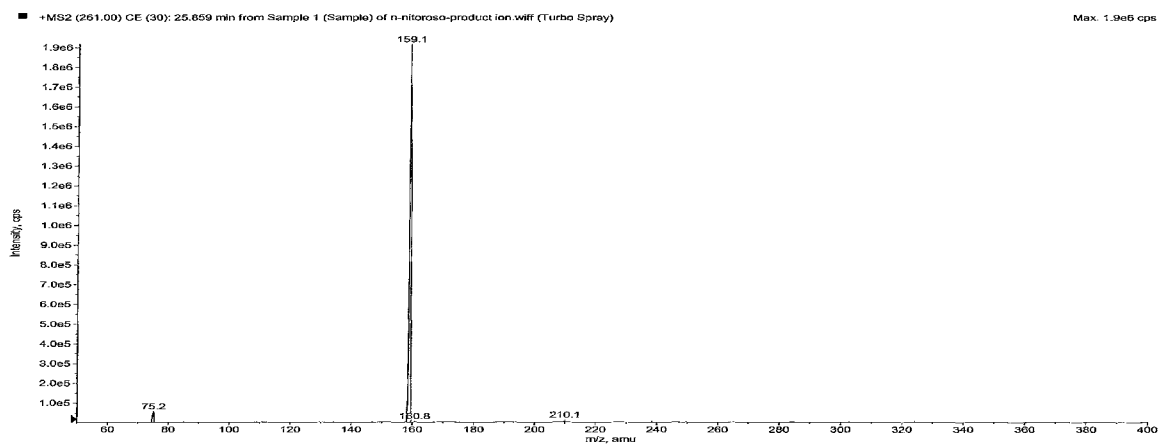


Fig. 6 N-Nitroso-Fenfluramine Product ion Mass spectrum from Precursor ion (m/z 261) of Sample by LC/MS

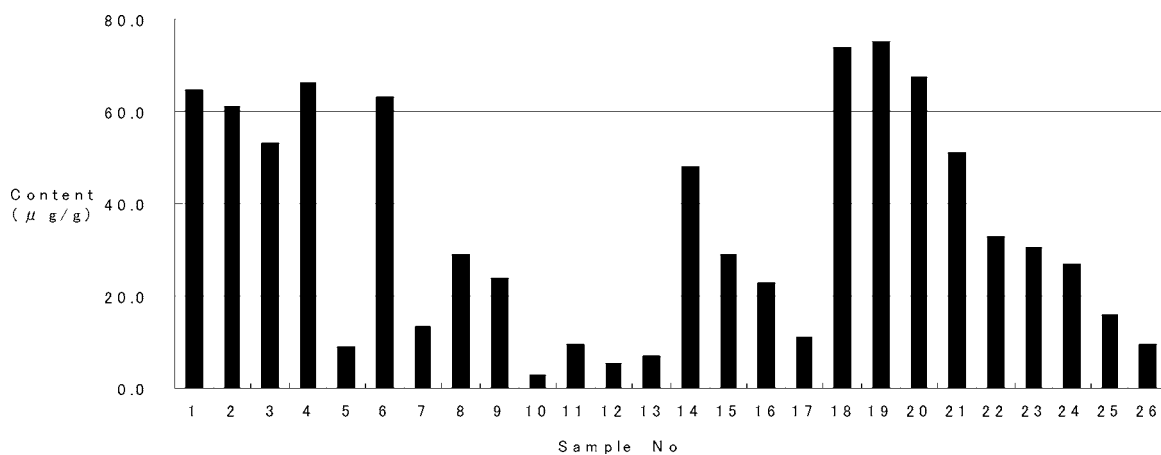


Fig. 7 Content of Fenfluramine in Diet food

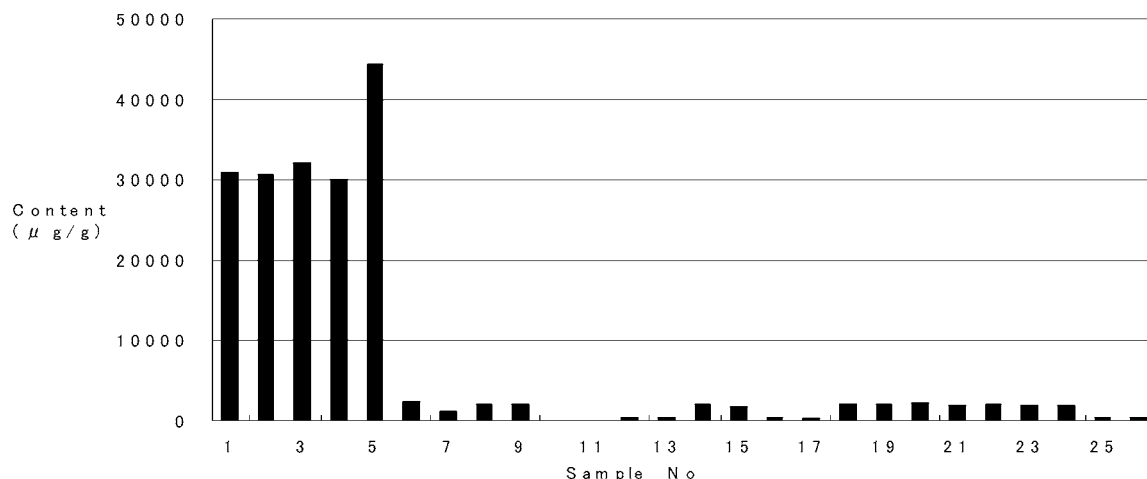


Fig. 8 Content of N-nitroso-fenfluramine in Diet food

圧乾固後、メタノール 200 μ l を加えて試験溶液とした。

②N-ニトロソーフェンフルラミン

カプセル中の粉末 0.05g をメタノールを加え振とう抽出し、遠心分離後上澄液を分取する。これにメタノールを加えて全量を 25mL とし、これを試験溶液とした。

3 結果

1) フェンフルラミンの同定・定量

フェンフルラミン標準溶液を LC/MS による Q1 スキャン測定したところ、得られたマススペクトルでは、 m/z 232 にフェンフルラミンのプロトン化分子と m/z 159 にそのフラグメントイオンが強く観察された。この 2 つのピークは試験溶液を測定して得られたマススペクトルでも検出され、当該物質の同定を行った (Fig.1,2)。

PDA-HPLC による標準溶液のクロマトグラムは、保持時間 8.5 分前後にピークを示し、その UV スペクトルは λ max210nm であった。試験溶液も同じ保持時間に、標準と同じ UV スペクトルを示した。

LC/MS と HPLC による結果から健康食品中にフェンフルラミンが含有されていると判定した。

また、その定量を HPLC を用いて行ったところ、2.7~67 μ g/g であった (Fig.7)

2) N-ニトロソーフェンフルラミンの同定・定量

試験溶液を LC/MS による Q1 スキャン測定したところ、得られたマススペクトルでは、 m/z 261 に N-ニトロソーフェンフルラミンのプロトン化分子と m/z 283 にナトリウム付加イオンが確認された (Fig.3)。

PDA-HPLC でのクロマトグラムは保持時間 12.5 分前後にピークが認められた。このピークの UV スペクトルは 210nm 及び 230nm 付近に極大吸収を示した。このスペクトルは国立医薬品食品衛生研究所で測定された UV スペクトルと同一であった。

LC/MS と HPLC の結果より N-ニトロソーフェンフルラミンと同定した。

また、その含有量は ND~44mg/g であり、分析を行った 26 検体のうち 24 検体で検出された (Fig.8)。

4 考察

1) フェンフルラミン

フェンフルラミン (Fig.9) は、中枢神経に作用し食欲抑制作用を示す薬物である。アメリカでは向精神薬として規制されている医薬品だが、日本においては未承認の医薬品である。副作用として不眠、抑うつが指摘されている。過去にもダイエット効果をねらって中国製のお茶に添加されていた事例があった。今回の事例におけるフェンフルラミンについては、N-ニトロソーフェンフルラミン合成時の不純

物と考えられ、その含有量もいずれの検体においても微量であった (Fig.7)。

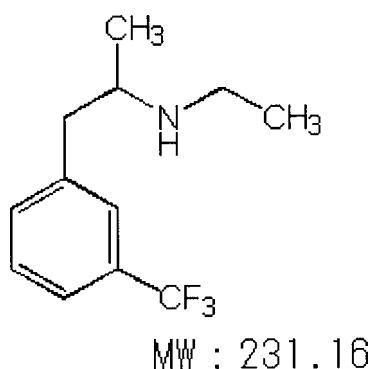


Fig. 9 Structure of Fenfluramine

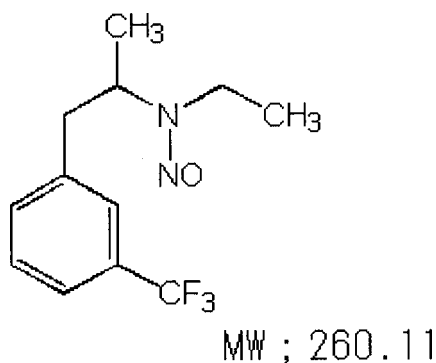


Fig. 10 Structure of N-Nitroso-Fenfluramine

2) N-ニトロソフェンフルラミン

今回の健康被害症状 (肝機能障害) の原因物質であるN-ニトロソフェンフルラミン (Fig.10) は、製造年月日により濃度変動が認められたとの情報があり、当所の分析結果においても濃度にばらつきが見られた。

健康被害者が服用していた No. 1～5 の検体は、他の検体と比べ約 10 倍も高い濃度のN-ニトロソフェンフルラミンを含有していた (Fig.8)。

N-ニトロソフェンフルラミンは、事件発生当初その薬理作用や毒性についての情報は全くなかった。しかし、「人為的に添加された有害物質と推定すべきであること」「薬効を期待して添加されたと推定されること」という理由により医薬品成分として扱うこととされた。

3) LC/MS/MS

フェンフルラミンとN-ニトロソフェンフルラミンは、LC/MS の Q1 スキャン測定において、開裂しやすい C-N 結合があるため、ESI のようなソフトなイオン化法でも分子量関連イオン以外にもいくつかのフラグメントピークが観察できた。このような物質は GC/MS の EI によるイオン化では、分子量関連イオンはほとんど観察されず、フラグメントピークも強度の強いものは m/z 100 以下にわずかに確認できるだけなので、EI-GC/MS では定性は難しいと考えられる。

ESI-LC/MS の場合は、分子量関連イオンと、そこから生成したフラグメントイオンが観察でき、定性するのに必要な情報が得られ、今回の分析においては非常に有用であった (Fig.1～3)。

また、LC/MS/MS によるプロダクトイオンスキャンによる測定において、フェンフルラミンは、最初の MS で m/z 232 のプロトン化分子だけ選択的に通過させ、次の衝突室でプロトン化分子をさらにフラグメンテーションを起こさせ、 m/z 232 のプロトン化分子由来のプロダクトイオン m/z 159 を観察することができた (Fig.4,5)。

同様にN-ニトロソフェンフルラミンは、 m/z 261 のプロトン化分子だけ選択的に通過させ、プロダクトイオン m/z 159 を強く観察することができた (Fig.6)。

この測定方法では、最初の MS で目的物質の分子量関連イオンを選択的に通過させているため、ここで試料中のマトリックスの影響を排除することができ、プロトン化分子から直接生成したフラグメントイオンを観察することができる。このように MS/MS による測定を行うことにより詳しい化合物の構造情報を得ることができた。

5 まとめ

1) 中国製ダイエット用健康食品における健康被害事例は、平成 15 年 4 月 14 日現在、全国で 874 人 (うち死亡者 4 人)、鳥取県内の健康被害事例は 3 人 (うち死亡者 0 人) であった。

2) ダイエット用健康食品から日本で許可されてい

ない向精神薬であるフェンフルラミンと、肝障害の原因となったN-ニトロソフェンフルラミンを検出した。

3) LC/MS/MSによる測定は、選択性に優れ、化合物の構造情報を得ることができた。

4) N-ニトロソフェンフルラミンはフェンフルラミンのニトロソ化合物であり、今まで未知の物質であった為、原因物質の解明に時間を要した。

5) 日本で許可されていないフェンフルラミンの標準品の入手および未知物質の検査方法については、関係機関相互の連携により可能となった。

6) 従来の販売店を通しての購入方法に加え、通信販売や個人輸入といった購入方法であった為、通常の見守り、検査体制では発見が難しく健康被害が拡大した。

今後、ますますこのような事例の増加が懸念されるため、見守り体制のあり方および未知物質の分析方法等において、関係各機関との情報交換並びに試験技術の充実が重要と思われる。

参考文献

- 1) 安田一郎 他: 薄層クロマトグラフィー及び高速液体クロマトグラフィーによる寧紅茶及び類似中国茶中のフェンフルラミンの分析. 東京都衛研年報 48, 71-75, 1997