

カンボジア国内で流通している痩身サプリの未知含有成分の探索

分担研究者 前川京子 (同志社女子大学薬学部)
研究協力者 高橋知里 (同志社女子大学薬学部)
徳川宗成 (同志社女子大学薬学部)
中尾彩寧 (同志社女子大学薬学部)

研究要旨

【目的】

偽造医薬品とは、同一性や起源について故意に偽表示がされた医薬品であり、本邦でもその流通及び健康被害が報告されている。当研究室では、以前にカンボジア国内で流通している天然由来成分と謳ったダイエットサプリメントについて、その含有成分の1種が、合成医薬品のシブトラミンであると同定し、偽造医薬品であることを明らかにした。本研究では、シブトラミン以外に含有される成分を液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC/MS) を用いて同定することを目的とした。

【方法】

ダイエットサプリメント内容物にメタノールを加えて攪拌後、上清を分取した。これを薄層クロマトグラフィー (TLC) で分離し、得られたスポットを削り、メタノール (MeOH) で抽出して試料溶液とした。Q Exactive 質量分析計の Full-Scan / data dependent MS² 条件により試料溶液を測定し、精密質量及び同位体組成演算に基づき、化合物を推定した。推定成分の標品を購入し、LCMS8060 の選択反応モニタリング法により同定した。

【結果】

ダイエットサプリメントの MeOH 抽出液を TLC により分離した結果、4つのスポットが認められた。質量分析計の基準ピークイオンを中心に解析し、シブトラミン以外に、*N*-デスメチルシブトラミン、パルミチン酸、(8E)-2-Amino-8-octadecene-1,3,4-triol、Bis(methylbenzylidene)sorbitol の含有が推定された。*N*-デスメチルシブトラミンは、標品を用いて同定し、ダイエットサプリメントに含有されていることを確認した。

【考察】

今回の解析では、シブトラミン、*N*-デスメチルシブトラミン以外に医薬品成分を同定することは出来なかった。推定された成分が、ダイエットサプリメントに含有されるか否かは、今後、標品を購入して同定する必要がある。

A. 研究目的

偽造医薬品とは、「同一性や起源について偽表示がされた医薬品」と定義されており、記載されている成分と異なる成分が含まれているものや、有効成分が含まれていないもの、有効成分が不足または過剰なものが存在する。かつては、外観から偽造が判断できるものもあったが、現在は、偽造技術の高度化や組織的な犯罪集団の関与により巧妙化し、容易に判別することができないようになっている。

偽造品は医薬品だけとは限らず、サプリメントもその対象となる。本研究班では、以前にカンボジア国内で流通している天然由来成分と謳ったダイエットサプリメントの含有成分について TLC 法により分析し、数種の成分の含有を確認した。そのうち、1 種は、合成医薬品のシブトラミンであると同定し、偽造医薬品であることを明らかにした。本製品の外箱には植物由来原料 6 種が配合されている旨の記載がある。残りの成分を同定するため、当該原料 6 種のうち、その由来植物が生薬・車前子と同一である *psyllium husk* に着目し、主成分のアウクビンの含有を TLC 法により確認したが明確に示すことはできなかった。偽造医薬品に含まれる成分を同定することは、偽造医薬品の流通防止対策に有用な情報となる。そこで、本研究では、シブトラミン以外に TLC 法で確認された数種の成分を LC/MS を用いて同定することを目的とした。

B. 研究方法

B-1 試料溶液の調製

ダイエットサプリメント 3 カプセル分

の内容物を取り出し、LC/MS 用 MeOH を 5 mL 加えて 5 分間 vortex した後、遠心分離 (1500 rpm, 5 min, 室温) を行い、その上澄みを試料溶液とした。

B-2 薄層クロマトグラフィー

試料溶液を薄層板 (TLC Silica gel 60, 5 × 20 cm, メルク株式会社) に 2 カ所スポットし、展開溶媒に水を飽和させた酢酸エチルを用いて展開した。

B-3 LC/MS 分析用試料溶液の調製

TLC 分析から得られたシブトラミンと考えられるスポット① (unknown 1) 及び未知成分のスポット部分②③④ (unknown 2, 3, 4) の薄層板 (図 1) を削り取り、それぞれ LC/MS 用 MeOH を 500 µL ずつ加えて遠心 (1200 rpm, 10 min) した。その上清を 0.22 µm フィルターで濾過し、濾液を量り取って窒素風乾した。50%MeOH で unknown 1 を 100 倍、unknown 2, 3, 4 を 10 倍希釈し、これらを試料溶液とした。

B-4 LC/MS による未知成分の同定

フーリエ変換型質量分析計 (Q Exactive, Thermo Scientific™, Massachusetts, USA)、及び四重極型質量分析計 (LCMS-8060NX, 島津製作所, 京都) を用いて測定を行った。分析条件は下記の通りである

<LC 条件>

移動相: (溶媒 A) 10 mM ギ酸アンモニウム (溶媒 B) 100%アセトニトリル
カラム: Shim-Pack, FC-ODS, 3 µm, 75 × 2.0 mm (島津製作所)
注入量: 2-10 µL

流量 : 0.3 mL/min
タイムプログラム : 0-15 min : 5-85% B,
15-20 min : 85% B, 20-20.10min : 85-5%
B, 20.10-25min : 5% B
カラムオープン : 40°C

<MS 条件 (Q Exactive) >
イオン化法 : 加熱エレクトロスプレー
イオン化 (H-ESI) 法
測定モード : ポジティブイオンモード
スキャン条件 : Full-Scan Mass
Spectrometry (Full MS) / data
dependent MS² (dd-MS²)
シースガス : 窒素
シースガス流量 : 50 arb unit
AUX ガス : 窒素
AUX ガス流量 : 10 arb unit

スプレー電圧 : +3.5 kV
ペーポライザ温度 : 300°C
キャピラリー温度 : 250°C

Compound Discoverer 3.1 (Thermo Fisher Scientific™) のメタボロミクス用 work flow で解析を行った。

<MS 条件 (LCMS-8060NX) >
イオン化法 : エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法
測定モード : ポジティブイオンモード
スキャン条件 : 選択反応モニタリング
(selected reaction monitoring, SRM)
シブトラミン : 280.40>125.05,
280.40>139.05, 280.40>153.05
デスメチルシブトラミン :
266.17>125.05, 266.17>139.15,

266.17>153.15

ネブライザーガス流量 : 2 L/min
ヒーティングガス流量 : 10 L/min
ドライイングガス流量 : 15 L/min
インターフェイス電圧 : +4.5 kV
インターフェース温度 : 300°C
ヒートブロック温度 : 400°C
DL 温度 : 250°C

C. 研究結果

C-1 TLC 分析による未知化合物の分画

ダイエットサプリメントの MeOH 抽出物を TLC により分離した結果を図 1 に示す。4 つのスポットが認められ、R_f 値の小さいスポットから順に、unknown 1, 2, 3, 4 とした。以前の研究より、unknown 1 にシブトラミンが含まれることが明らかになっている。また unknown 4 は、溶媒先端とほぼ一致しており、最も疎水性が高い化合物と推定された。各スポットの薄層板を削り取り、MeOH で抽出した試料を LCMS 分析に供した。

C-2 LC/MS による未知物質の推定

Q Exactive 質量分析計の Full MS/dd-MS² 条件により各試料溶液を測定し、Compound Discoverer 3.1 のメタボロミクス解析により精密質量及び同位体組成演算に基づき、化合物を推定した。フラグメント情報が得られたピークに関しては、公開されている MS/MS ライブラリー (mzCloud, Thermo Scientific™) との照合も行った。含有が推定された化合物の一部を表 1 に示す。すでに含有が明らかになっているシブトラミンの他、N-デスメチルシブトラミン、パルミチン酸、

(8E) -2-Amino-8-octadecene-1,3,4-triol、Bis (methylbenzylidene) sorbitol の含有が推定された。各 TLC 画分サンプルの基準ピーククロマトグラムと共に、化合物が推定されたイオンについて、抽出イオンクロマトグラム、MS スペクトル、MS/MS スペクトルを図 2～図 6 に示す。シブトラミンと推定されたピーク (図 2, m/z 280.18243, $RT=12.997$) は、TLC 画分 unknown 1 の基準ピークと一致しており、含量が多いことが推定された。また、本ピークの MS/MS フラグメントは、公開されているシブトラミンの MS/MS フラグメントと一致した。*N*-デスメチルシブトラミンと推定されたピーク (図 3, m/z 266.16673, $RT=10.093$) は、シブトラミンよりも保持時間が早く、シブトラミンの MS/MS スペクトルと一部フラグメントの一致を認めたため、*N*-デスメチルシブトラミンではほぼ間違いないと考えられた。一方、パルミチン酸と推定されたピーク (図 4, m/z 274.27417, $RT=11.312$) は、TLC 画分 unknown 2 の基準ピークであったが、ピーク形状は悪く、単一化合物ではないことが示唆された。また、本ピークがパルミチン酸であれば、保持時間が 11.3 分より遅く溶出されることが予想されたため、部分構造としてパルミチン酸をもつ化合物 (エステル、アミド等) のインソースフラグメンテーションによりパルミチン酸が検出された可能性が高いと考えられた。同様に TLC 画分 unknown 2 の基準ピークの一つが、(8E) -2-Amino-8-octadecene-1,3,4-triol と推定された (図 5, m/z 316.28516, $RT=13.294$)。 (8E) -2-Amino-8-

octadecene-1,3,4-triol の別名はデヒドロフィトスフィンゴシンであり、フィトスフィンゴシン型セラミドの構成成分として知られている。一方、Bis

(methylbenzylidene) sorbitol と推定されたピーク (図 6, m/z 387.18021, $RT=9.875$) は、unknown 4 画分の基準ピークであった。Bis (methylbenzylidene) sorbitol は、親油性非イオン性界面活性剤であり、乳化剤として使用される化合物である。これらの化合物の推定が正しいか否かは、最終的に標品を購入して確認する必要がある。

C-2 *N*-デスメチルシブトラミンの同定

TLC 画分 unknown 1 に含有されることが推定された *N*-デスメチルシブトラミンを同定するため、標品を購入し、三連四重極型質量分析計 LCMS-8060NX により SRM のイベントを構築した。構築した系において、*N*-デスメチルシブトラミンの標品は、10.7 分に溶出された。図 7 に示すように、TLC 画分 unknown 1, 2, 4 に *N*-デスメチルシブトラミンのピークを検出した。ピーク面積を比較すると、TLC 画分 unknown 1 に最も多くの *N*-デスメチルシブトラミンが含まれることを確認した (表 2)。また、TLC 画分 unknown 1 の *N*-デスメチルシブトラミンのピーク面積は、シブトラミンの面積の約 3.6%であり、含量は微量であることが示唆された。

D. 考察

カンボジア国内で流通しているダイエットサプリメントに含有されるシブトラ

ミン以外の成分の同定を試みた。TLC 分析から得られたスポットを抽出して試料を調製し、精密質量及び同位体組成演算に基づき、化合物を推定した。シブトラミン以外に、*N*-デスメチルシブトラミン、パルミチン酸、(8E) -2-Amino-8-octadecene-1,3,4-triol、Bis

(methylbenzylidene) sorbitol 等の含有が推定された。精密質量及び同位体組成演算に基づき推定された化合物は、標品を用いて同定する必要がある。

N-デスメチルシブトラミンは、標品を用いて同定した。*N*-デスメチルシブトラミンはシブトラミン類似の薬理作用を有する[1]。平成 19 年 6 月 8 日厚生労働省医薬食品局の発表によると、東京都内の消費者が個人輸入により入手した健康食品 Gold Medal Ultra Slim-60 に *N*-デスメチルシブトラミンが検出されたという報告がある[2]。*N*-デスメチルシブトラミンが、もともと本サプリメントに含まれていたのか、保存期間中に、シブトラミンが分解して産生されたものかは不明であるが、含有量はシブトラミンと比較して少ないことが予想された。

E. 結論

カンボジア国内で流通しているダイエットサプリメントに含有されるシブトラミン以外の成分の同定を試みた。Q Exactive 質量分析計により精密質量及び同位体組成演算に基づき、*N*-デスメチルシブトラミン、パルミチン酸、(8E) -2-Amino-8-octadecene-1,3,4-triol、Bis (methylbenzylidene) sorbitol 等の含有が推定された。*N*-デスメチルシブトラミンは、

標品を用いた同定により、本ダイエットサプリメントに含有されることを確認した。

F. 引用文献

1. G P Luscombe, R H Hopcroft, P C Thomas, W R Buckett, The contribution of metabolites to the rapid and potent down-regulation of rat cortical beta-adrenoceptors by the putative antidepressant sibutramine hydrochloride, *Neuropharmacology*. 1989 Feb;28(2):129-34.
2. 平成 19 年 6 月 8 日厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課 報道資料 <https://www.mhlw.go.jp/houdou/2007/06/h0608-3.html>

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

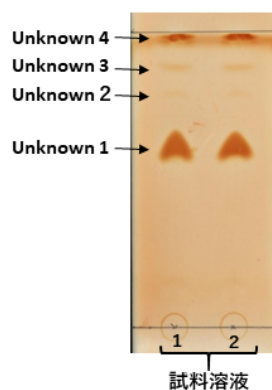


図1 薄層クロマトグラフィー分析
同一の試料溶液を2か所にスポットした。

表1 精密質量及び同位体組成演算に基づく化合物の推定 (一部)

推定化合物	質量電荷比 (m/z)	保持時間 (min)	イオン形 (positive)	計算分子量	MS/MSライブラリーとの一致度 ¹⁾	理論m/z値からのずれ (ppm)	主要なTLL分画
Sibutramine	280.18243	12.997	[M+H] ⁺	279.17516	○	-0.79	Unknown 001
N-Desmethylsibutramine	266.16673	10.093	[M+H] ⁺	265.15945	△	-1.05	Unknown 001
Palmitic Acid	274.27417	11.312	[M+NH ₄] ⁺	273.26689	×	0.038873	Unknown002
(8E)-2-Amino-8-octadecene-1,3,4-triol	316.28516	13.294	[M+H] ⁺	315.27788	×	1.7	Unknown002
Bis(methylbenzylidene)sorbitol	387.18021	9.875	[M+H] ⁺	386.17296	○	0.05	Unknown004

¹⁾mzCloud ライブラリー(Thermo Scientific™)との一致度を示す。

○はFull match、△は一部のフラグメント構造が一致しているもの、×はライブラリーへの登録がない化合物を示す

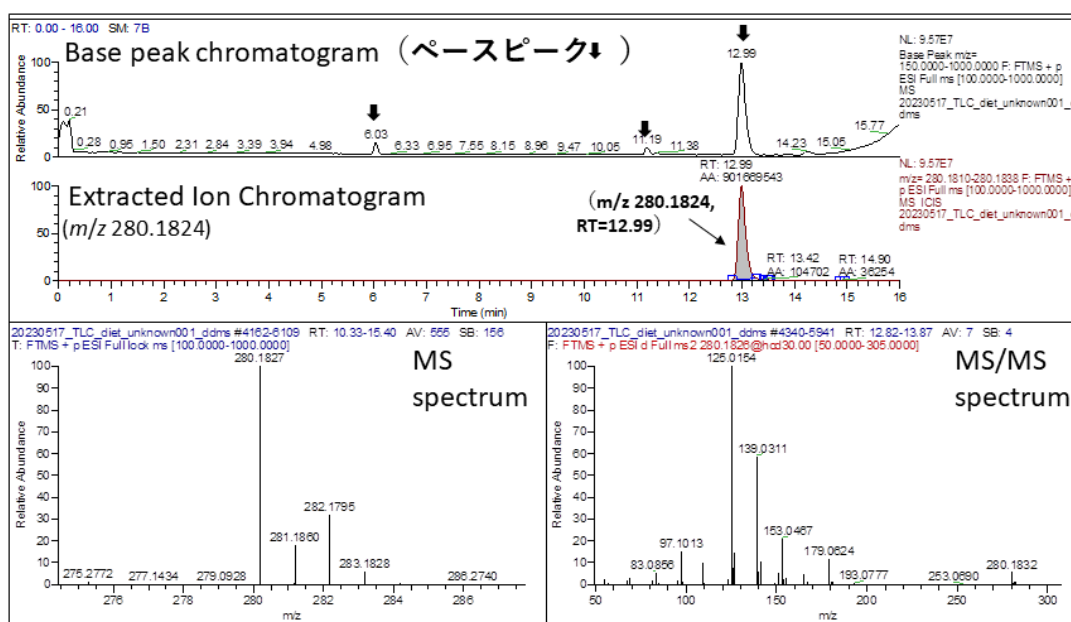


図2 TLC画分 (unknown 1) のLC/MS分析 (m/z 280.18243, RT=12.997)

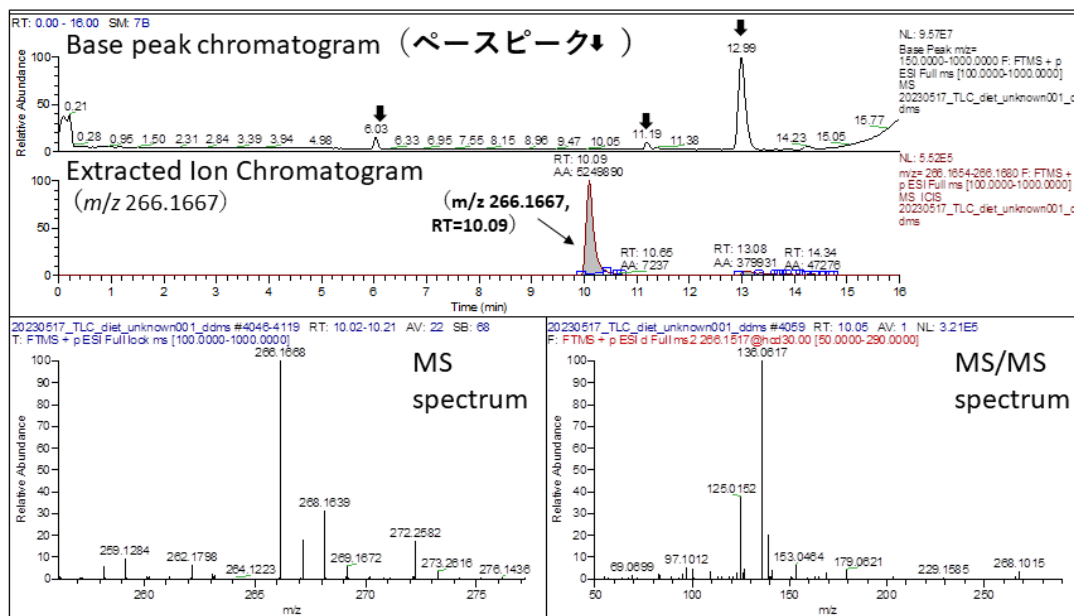


図3 TLC画分 (unknown 1) のLC/MS分析 (m/z 266.16673, RT=10.093)

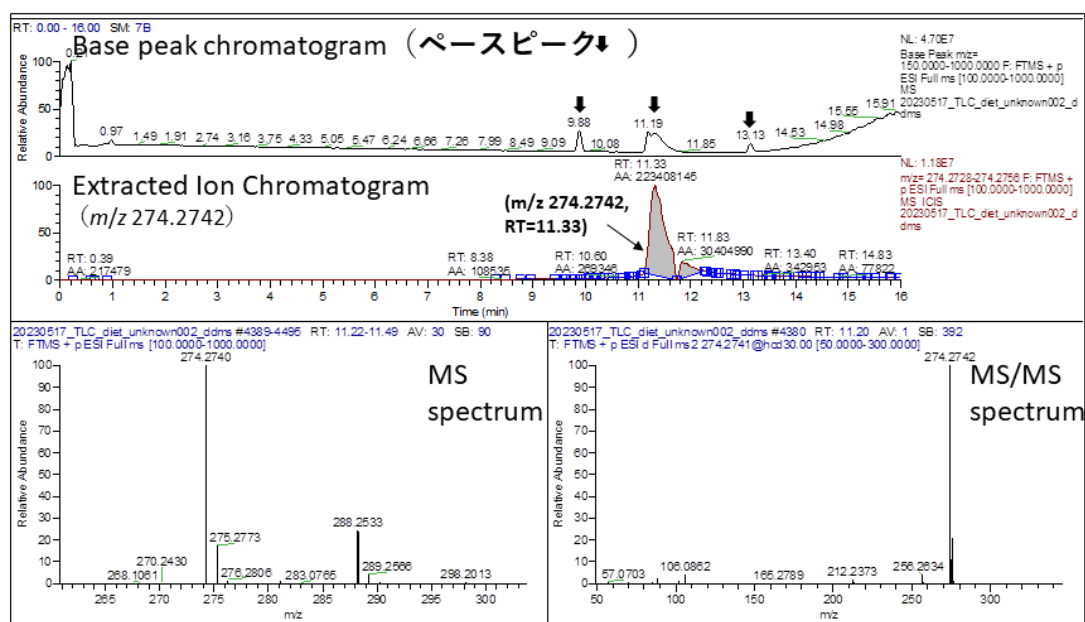


図4 TLC画分 (unknown 2) のLC/MS分析 (m/z 274.27417, RT=11.312)

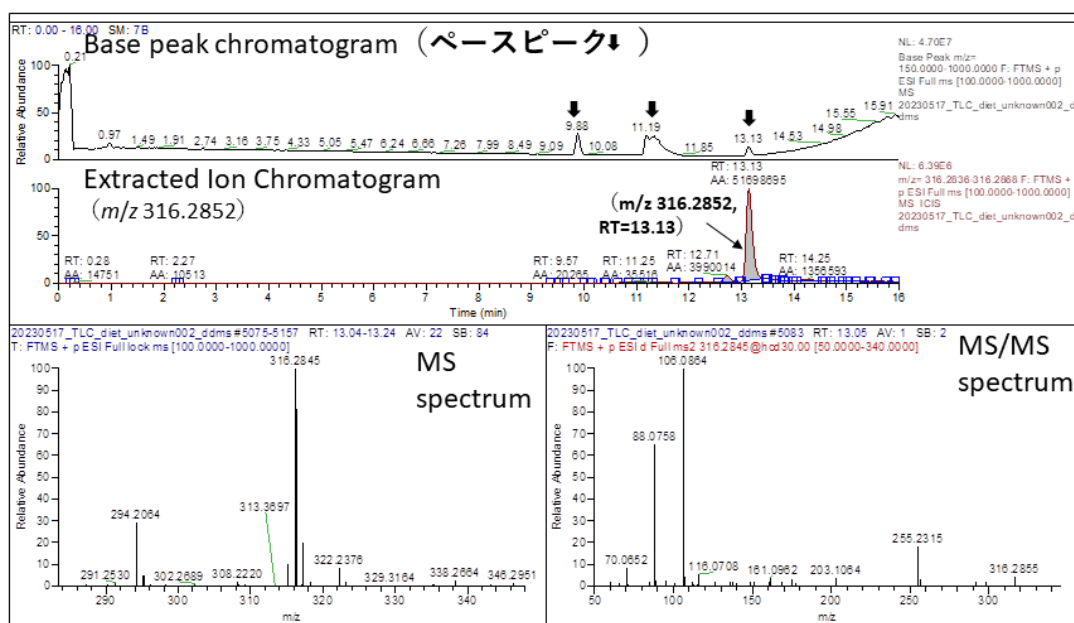


図5 TLC試料 (unknown 2) のLC/MS分析 (m/z 316.28516, RT=13.294)

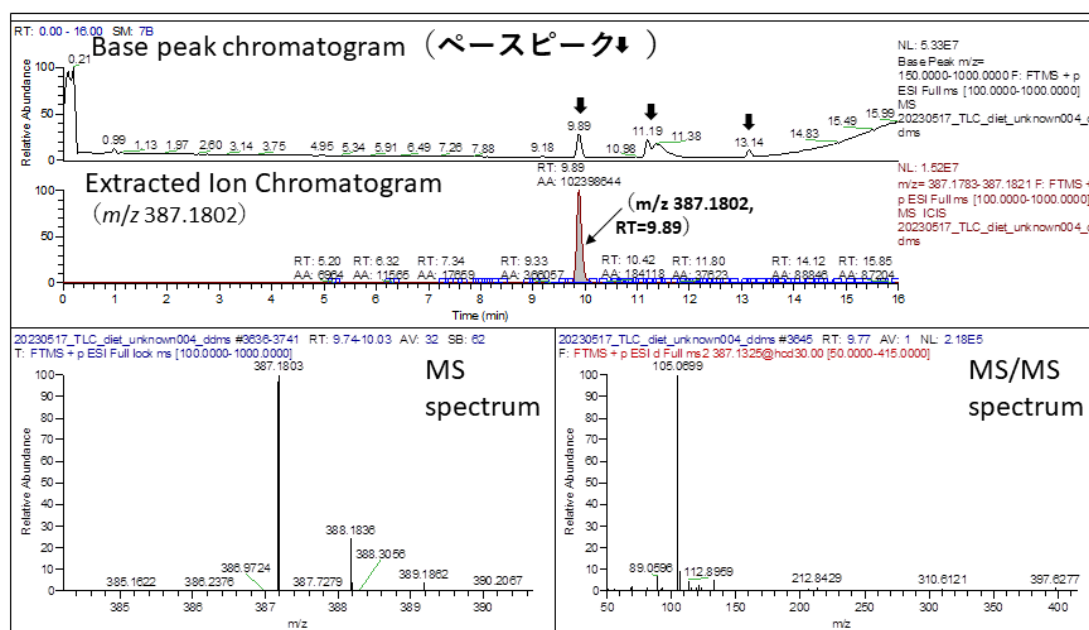


図6 TLC画分 (unknown 4) のLC/MS分析 (m/z 387.18021, RT=9.875)

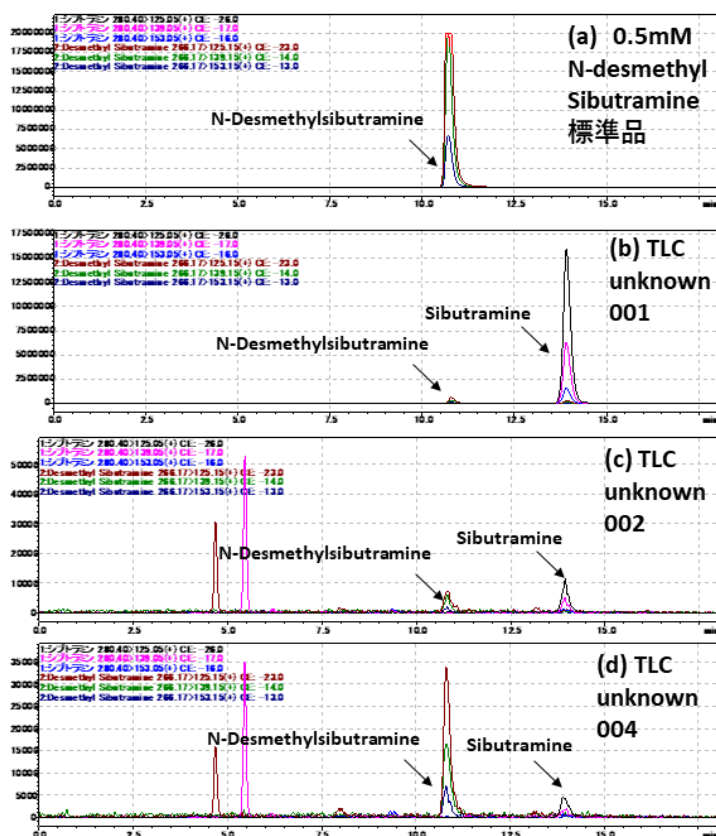


図7 *N*-Desmethyisibutramineの同定

表2 各TLC画分に検出されたシブトラミン、及び*N*-デスメチルシブトラミン

サンプル	化合物名			
	sibutramine (m/z 280.40>125.05)		<i>N</i> -desmethyisibutramine (m/z 266.17>125.15)	
	保持時間 (分)	面積	保持時間 (分)	面積
0.5mM <i>N</i> -desmethyisibutramine 標準品	-	-	10.771	351101868 (saturated)
TLC画分 unknown 001	13.907	213085050	10.781	7709689
TLC画分 unknown 002	13.946	121403	10.845	98020
TLC画分 unknown 004	13.904	68887	10.807	432385

