

原著論文

## 甲状腺末を含有する健康食品中の 3,3',5-トリヨードチロニン及びチロキシンの HPLC 分析法

森田邦正, 毛利隆美, 中川礼子

逆相系の高速液体クロマトグラフを使って, 甲状腺末を含有する健康食品中の 3,3',5-トリヨードチロニン及びチロキシンの分析法を検討した. 健康食品はメタノール及び水/メタノール (1:1) を用いて洗浄後, Pronase を用いて加水分解した. 3,3',5-トリヨードチロニン及びチロキシンは 2 %アンモニア水メタノール溶液で抽出し, 固相抽出法(Bond Elut C18 カートリッジ)を用いてクリーンアップした. 高速液体クロマトグラフはカラムに Inertsil ODS-3 (4.6x 150mm, 5 $\mu$ m)を, 移動相に水/メタノール/リン酸 (500:500:1, v/v) を用い, 測定波長 230 nm で分析した. 本法による健康食品からの 3,3',5-トリヨードチロニン及びチロキシンの回収率は 70 ~ 80%, 定量下限値は 3,3',5-トリヨードチロニンが 0.8 $\mu$ g/g, チロキシンが 1.4 $\mu$ g/g であった.

[キーワード :甲状腺, 3,3',5-トリヨードチロニン, チロキシン, HPLC, 固相抽出法, 健康食品]

### 1 はじめに

乾燥甲状腺は食用獣の甲状腺をとり乾燥した淡黄色～灰褐色の粉末で, わずかに特異な肉臭がある. 甲状腺内の 3,3',5-トリヨードチロニン(T<sub>3</sub>)及びチロキシン(T<sub>4</sub>)はタンパク質と結合してチログロブリンの形で胞内に貯蔵されている. チログロブリンはタンパク分解酵素の作用によって分解され, T<sub>3</sub>及び T<sub>4</sub>が血中に遊離し, ホルモン作用を呈する. 乾燥甲状腺末は生体の基礎代謝を高める作用があり, 粘液水腫, クレチン症, 甲状腺機能低下症, 甲状腺腫等の治療薬として適応される. 治療開始時, 乾燥甲状腺末は15~40mg/day から投与し, 副作用のないことを確認し, 6~9週間で維持量40~200mg/day に増量する. 過量になると甲状腺機能亢進時にみられる各種の副作用が現れる. パセドウ病のような症状や精神病のような症状を伴う. 頻脈, 心悸亢進, 月経不順, 無月経, 精神不安定及び下痢等の諸症状が頻度が高い. 300mg/day 以上の連用で, なかには3ヶ月くらいの短期服用でも見られる例がある<sup>1)</sup>. 乾燥甲状腺末は1965年頃, 痩身目的で「やせ薬」として乱用されたことがある<sup>1)</sup>. 平成12~14年にダイエット用健康食品に混入され, 全国的に甲状腺機能亢進ような症状を伴う健康被害が多数発生した.

乾燥甲状腺末中の T<sub>3</sub>及び T<sub>4</sub> を測定する方法として, 甲状腺組織中のチログロブリンをタンパク分解酵素を用いて加水分解後, HPLC で定量する方法が米国薬局方

(USP: United States Pharmacopeia) に報告されている<sup>2)</sup>. さらに, 血中の T<sub>4</sub> を固相抽出し LC/MS で測定する方法<sup>3)</sup>や健康食品中の T<sub>3</sub>及び T<sub>4</sub> を LC/MS で測定する方法<sup>4)</sup>が報告されている. しかし, 甲状腺末が混入された健康食品中には, 各種の妨害成分が存在するため, これらの方法で HPLC を用いて測定することは困難である. そこで, 2種類の健康食品を用いて, 甲状腺末を含有する健康食品中の T<sub>3</sub>及び T<sub>4</sub>の HPLC 分析法を検討した.

### 2 実験方法

#### 2・1 試薬

乾燥甲状腺末は帝国臓器製薬(株)製の日本薬局方品を用いた. Tris(hydroxymethyl) aminomethane は和光純薬工業(株)製, 2-Mercapto-1-methylimidazole は Aldrich 製, Pronase は Calbiochem Novabiochem 製 No537088, メタノールは和光純薬工業(株)製の HPLC 分析用を用いた.

T<sub>3</sub>及び T<sub>4</sub>標準原液は3,3',5-トリヨードチロニンナトリウム(Sigma 製)を10.3mg, チロキシナトリウム5水和物(Sigma 製)を11.4mg 秤量し, 2%アンモニア水-メタノールを加えて100ml とし冷暗所に保存した. 用時, この液1~5ml をとり2%アンモニア水-メタノールを加えて50ml としたものを標準溶液とした.

酵素緩衝液は0.11M 塩化ナトリウム, 0.04M Tris(hydroxymethyl) aminomethane 及び0.05M 2-Mercapto-

1-methylimidazole を 6M 塩酸で、pH8.4±0.05 に調製し冷暗所に保存した。Pronase 溶液は Pronase 90mg を秤量し、酵素緩衝液を加え30ml としたものを用時調製した。

固相抽出には Varian 製の Bond Elut C18 カートリッジ (500 mg, 3 ml) を用いた。

2%アンモニア水-メタノール溶液はアンモニアを2%含むメタノール溶液を調製した。

## 2・2 装置

紫外吸光度検出器 (SPD-10AV) 及びデータ処理装置 (C-R3A) 付 HPLC は島津製作所 (株) 製の LC10A を、カラムは GL サイエンス (株) 製の InertsilODS-3 (4.6 ×150 mm, 5 μm) を使用した。

## 2・3 実験操作

### 2・3・1 乾燥甲状腺末中の T<sub>3</sub> 及び T<sub>4</sub> の分析法

乾燥甲状腺末の分析法は USP の方法<sup>2)</sup> に準じて作成したが、抽出溶剤は1%リン酸アセトニトリル溶液からメタノールに変更した。加水分解時間は小坂ら<sup>4)</sup>の実験結果から18~20時間とした。乾燥甲状腺末20mg を10ml の試験管に秤量し、Pronase 溶液3ml を加え、窒素ガスを約1分間流す。試験管を遮光し、37℃で18~20時間、時々振り混ぜながら加水分解する。試料の Pronase 溶液を遠心分離後、水層を採取し残渣にメタノール1ml を加え振とう抽出する。遠心分離後、メタノール層を採取し水層と合わせ、2%アンモニア水-メタノールを加えて5ml とする。

### 2・3・2 乾燥甲状腺末を含有する健康食品中の T<sub>3</sub> 及び T<sub>4</sub> の分析法

健康食品0.2g を10ml の試験管に秤量し、メタノール8ml 及び水/メタノール (1:1, v/v) 8ml でそれぞれ2回洗浄し (それぞれ30分間及び15分間振とう抽出)、遠心分離後上層の洗浄液は捨てる。これに Pronase 溶液3ml を加え、窒素ガスを約1分間流す。試験管を遮光し、37℃で18~20時間、時々振り混ぜながら加水分解する。試料の Pronase 溶液を遠心分離後、水層を採取し残渣に2%アンモニア水-メタノール2ml を加え2回振とう抽出する。2%アンモニア水-メタノール抽出液を窒素ガス中40~50℃で0.8ml 以下に濃縮後、水層と合わせ、メタノールを加えて4ml とする。Bond Elut C18 カートリッジはメタノール2ml, 水2ml を順次流しコンデショニングする。4ml の試料抽出液から2ml を採取し、水を加えて5ml に希釈する。これを Bond Elut C18 カートリッジに流し T<sub>3</sub> 及び T<sub>4</sub> を保持させた後、水2ml 及び水/メタノール (8:2, v/v) 4ml で洗浄する。2%アンモニア水-メタノール3ml を流し T<sub>3</sub> 及び T<sub>4</sub> を溶出する (初液5-6滴は捨てる)。溶出液は窒素ガス気流下40~50℃で1ml 以下まで濃縮後、2%アンモニア水-メタノールを加えて1ml にし試料溶液とする。

## 2・3・3 T<sub>3</sub>及びT<sub>4</sub>のHPLC測定条件

|       |                                               |
|-------|-----------------------------------------------|
| カラム   | InertsilODS-3 (4.6×150 mm)                    |
| 移動相   | 水/メタノール/リン酸 (50:50:0.1, v/v)                  |
| 流量    | 1.2 ml/min                                    |
| カラム温度 | 45℃                                           |
| 注入量   | 10 μl                                         |
| 測定波長  | 230 nm                                        |
| 保持時間  | T <sub>3</sub> : 7.9分, T <sub>4</sub> : 16.1分 |

## 3 結果及び考察

### 3・1 乾燥甲状腺末から生成される T<sub>3</sub> 及び T<sub>4</sub> 量

治療薬としての乾燥甲状腺末の用量は15~40mg/day であることから、10~50mg の乾燥甲状腺末に Pronase 溶液3ml を加え、実験操作に従って乾燥甲状腺末から生成する T<sub>3</sub> 及び T<sub>4</sub> 量を測定した (n=1)。その結果、乾燥甲状腺末10~50mg の範囲内でほぼ一定の T<sub>3</sub> 及び T<sub>4</sub> の生成量がみられ、1 g の乾燥甲状腺末当たり T<sub>3</sub> が341~387 μg 及び T<sub>4</sub> が1175~1279 μg 生成した (図1)。

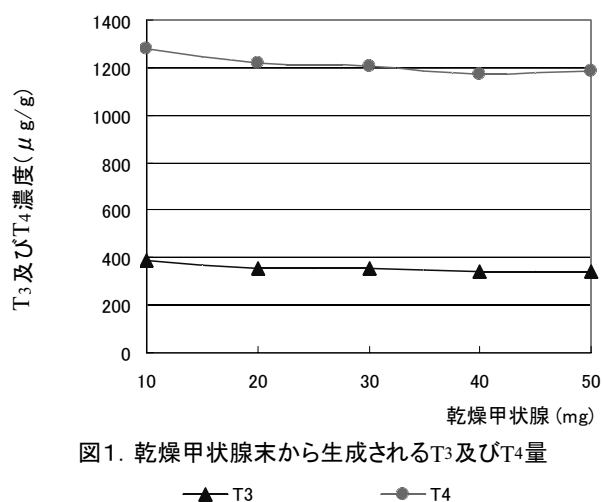


図1. 乾燥甲状腺末から生成される T<sub>3</sub> 及び T<sub>4</sub> 量

### 3・2 乾燥甲状腺末のメタノール及び水/メタノール (1:1) 洗浄が T<sub>3</sub> 及び T<sub>4</sub> の生成に及ぼす影響

健康食品には各種の植物やその抽出成分が混入され HPLC 測定 の妨害 となり やすい。また甲状腺末を含む健康食品の Pronase 処理において、チログロブリンの加水分解が妨害されることが報告されている<sup>4)</sup>。健康食品に含まれる夾雑成分をあらかじめ除去する目的で、乾燥甲状腺末20mg をメタノール8ml で2回 (それぞれ30分間及び15分間振とう抽出) 洗浄後、さらに水/メタノール (1:1, v/v) 8ml で2回 (それぞれ30分間及び15分間振とう抽出) 洗い、洗浄による T<sub>3</sub> 及び T<sub>4</sub> の生成への影響を検討した。図2(A)に T<sub>3</sub> 及び T<sub>4</sub> の標準溶液、図2(B)に乾燥甲状腺末の試料溶液の HPLC クロマトグラムを示す。

表 1 乾燥甲状腺末のメタノール及び水／メタノール（1:1）  
洗浄によるT<sub>3</sub>及びT<sub>4</sub>生成への影響

|             | T <sub>3</sub> | T <sub>4</sub> |
|-------------|----------------|----------------|
|             | μg/g ± 標準偏差    |                |
| 乾燥甲状腺末（未洗浄） | 357.4±7.6      | 1218.7±31.3    |
| 乾燥甲状腺末（洗浄）  | 357.0±8.1      | 1222.6±14.2    |

乾燥甲状腺末量 20mg, 実験回数 (n=5)

未洗浄の乾燥甲状腺末の T<sub>3</sub>及び T<sub>4</sub>量はそれぞれ 357.4 μg/g 及び 1218.7 μg/g, 変動係数 2.6% 以内であった (表1)。一方, 洗浄した乾燥甲状腺末の場合, T<sub>3</sub>及び T<sub>4</sub>量はそれぞれ 357.0 μg/g 及び 1222.6 μg/g, 変動係数 2.3% 以内であった。洗浄による乾燥甲状腺末の損失及び加水分解への影響は認められなかった。

市販されている健康食品 A (納豆菌を含有するダイエット用健康食品) 0.2g に乾燥甲状腺末 20mg を添加後, 2・3・2の実験操作に従って試料溶液を調整した。図 2 (C) にメタノール及び水／メタノールで洗浄した健康食品 A の HPLC クロマトグラムを示す。図 2 (B) の乾燥甲状腺末のクロマトグラムと比べて T<sub>3</sub>の前のピークが洗浄の効果により除去されている。図 2 (E) のメタノール及び水／メタノール未洗浄の健康食品 A のクロマトグラムでは T<sub>3</sub>及び T<sub>4</sub>のピークが多くの妨害成分と重なり定量することはできない。この洗浄方法を用いた場合, Pronase による加水分解時の乾燥甲状腺末から生じる成分及び健康食品に存在する HPLC 測定の妨害成分をかなり除けるものと考えられた。

### 3・3 酵素処理後の共存物質の除去

乾燥甲状腺末の用量 (維持量) は約 50mg/day である。健康食品には 1日当たりの用量が 15錠以上と多いものがある。用量が多い健康食品 (乾燥甲状腺末 50mg/4.5g/15錠) の場合, 試料 0.2 g を秤量すると乾燥甲状腺末として 2.2mg, 表 1 から T<sub>3</sub>及び T<sub>4</sub>量としてそれぞれ約 0.8 μg 及び 2.7 μg となり, HPLC で定量するためには試料溶液を濃縮する必要がある。このことから, Bond Elut C18 カートリッジを用いてクリーンアップし, 溶出液を濃縮する方法を検討した。乾燥甲状腺末 20mg を用いて, 乾燥甲状腺末の実験操作に従って調製した T<sub>3</sub>及び T<sub>4</sub>の試験溶液を用いて, 2%アンモニア水-メタノールの溶出量を検討した。その結果, T<sub>3</sub>及び T<sub>4</sub>は 0~3ml に 100% 溶出したことから, 2%アンモニア水-メタノール溶液量は 23 ml とした。実試料の測定時には溶出液を

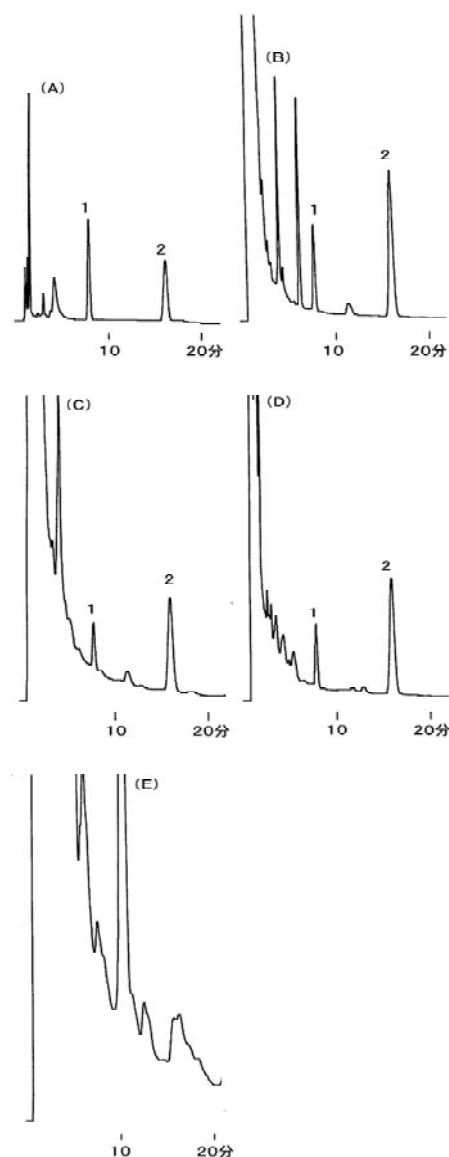


図 2 標準溶液 (A, T<sub>3</sub>及びT<sub>4</sub>各々 19 ng), 乾燥甲状腺末 20 mg (B), メタノール及び水／メタノールで洗浄した健康食品 (C), Bond Elut C18 カートリッジ処理した健康食品 (D) 及びメタノール及び水／メタノール未洗浄の健康食品 (E) の HPLC クロマトグラム  
1, T<sub>3</sub>; 2, T<sub>4</sub>

窒素ガス気流下で濃縮後, 2%アンモニア水-メタノールを加え 1ml にした。図 2 (D) に Bond Elut C18 カートリッジで処理した健康食品 A の HPLC クロマトグラムを示す。図 2 (C) のメタノール及び水／メタノールで洗浄後のクロマトグラムと比べて (D) のクロマトグラムは T<sub>3</sub>の前の成分が効果的に除去されている。しかし, 1日当りの用量が 3錠あるいは 3カプセル以下の健康食品や共存物質が少ないと考えられる健康食品の場合は, Bond Elut C18 の操作を省いて T<sub>3</sub>及び T<sub>4</sub>を定量することが十分可能である。

### 3・4 回収率と再現性

健康食品 A 及び B (納豆菌を含有するダイエット用健

健康食品)を用いて添加回収実験を行った。健康食品0.2gに乾燥甲状腺末20mgを添加後、実験操作に従って回収率を求めた。繰り返し実験は5回行い、その結果を表2に示した。

表2 健康食品からのT<sub>3</sub>及びT<sub>4</sub>の添加回収試験結果

|                   | T <sub>3</sub> | T <sub>4</sub> |
|-------------------|----------------|----------------|
|                   | 回収率 ± 標準偏差     |                |
| 健康食品 A            |                |                |
| Bond Elut C18 処理前 | 70.7±2.5       | 69.8±0.6       |
| Bond Elut C18 処理後 | 71.1±0.9       | 68.0±1.0       |
| 健康食品 B            |                |                |
| Bond Elut C18 処理前 | 77.2±1.7       | 79.8±1.9       |
| Bond Elut C18 処理後 | 81.5±2.7       | 78.2±2.8       |

健康食品A及びBにおいてT<sub>3</sub>及びT<sub>4</sub>は未検出であった。健康食品0.2gに乾燥甲状腺末20mgを添加した。実験回数 (n=5)。

健康食品 A の場合、Bond Elut C18処理前の回収率は T<sub>3</sub>が70.7% (68.7～74.8%) 及び T<sub>4</sub>が69.8% (68.8～70.1%) であり、Bond Elut C18処理後の回収率は T<sub>3</sub>が71.1% (70.3～72.6%) 及び T<sub>4</sub>が68.0% (66.9～69.3%) であった。健康食品 B の場合、Bond Elut C18処理前の回収率は T<sub>3</sub>が77.2% (74.7～79.1%) 及び T<sub>4</sub>が79.8% (76.8～82.0%) であり、Bond Elut C18処理後の回収率は T<sub>3</sub>が81.5% (77.0～83.4%) 及び T<sub>4</sub>が78.2% (73.9～80.9%) であった。変動係数はいずれも3.5%以内でありほぼ満足する結果がえられた。しかし、回収率は若干低い傾向にあった。小坂らは T<sub>3</sub>及び T<sub>4</sub>は吸着性が高く、酢酸エチル抽出液をろ紙でろ過するところ紙に吸着し極端に回収率が低下すると報告している<sup>4)</sup>。

そこで、健康食品を酵素処理し2%アンモニア水-メタノール2ml で2回抽出した後、その残渣に2%アンモニア水-メタノール2ml を加え1回抽出した結果、T<sub>3</sub>及び T<sub>4</sub>が健康食品 A の場合約4%、健康食品 B の場合約3%回収され、少量が抽出残渣に残留していることが分かった。回収率の低下の原因は加水分解処理後の試料に T<sub>3</sub>及び T<sub>4</sub>

が吸着し、抽出が非常に困難なことによるものと考えられた。実験操作 2・3・2 で2%アンモニア水-メタノール抽出液の代わりに乾燥甲状腺末の分析法に示したメタノールを用いた場合、健康食品 A の T<sub>3</sub>及び T<sub>4</sub>の回収率が17.2～17.8%低下した。それゆえ実試料の抽出液には2%アンモニア水-メタノール溶液を用いた。本法による T<sub>3</sub>及び T<sub>4</sub>の定量下限値は T<sub>3</sub>が0.8 µg/g 及び T<sub>4</sub>が1.4 µg/g であった。

健康被害の発生するおそれが否定できない中国製ダイエット用健康食品として厚生労働省のホームページ上に公表されている健康食品9品目を入手し測定した。その結果、その含有量は T<sub>3</sub>が17.5 µg/g (7.6～23.6 µg/g)、T<sub>4</sub>が54.6 µg/g (15.1～76.3 µg/g) であった。乾燥甲状腺末量に換算すると、約45.7mg/g (14.4～63.4mg/g) に相当する。この9品目の測定値は試料をメタノール及び水/メタノールで洗浄したものあるいは未洗浄のものであり、いずれも Bond Elut C18未処理の検体である。なお、本法を応用する際の注意点として、T<sub>3</sub>及び T<sub>4</sub>は洗剤で落ちにくいため、試験に使用したガラス器具は1～2 N の硫酸等ですすぎ洗いの必要がある。

#### 4 まとめ

甲状腺末を含有する健康食品中の T<sub>3</sub>及び T<sub>4</sub>の HPLC 分析法を検討した。その結果、試料を Pronase を用いて加水分解する前にメタノール及び水/メタノールを用いて洗浄することにより共存物質を効果的に除去することができた。また、Pronase で加水分解後の抽出液を Bond Elut C18 カートリッジ処理することにより、さらに共存物質を除去することができた。また、回収率、再現性ともにほぼ満足する結果が得られた。

#### 文献

- 1) 日本薬局方解説書編集委員会：第13改正日本薬局方解説書、(pp. D332-33)；東京：廣川書店、1998。
- 2) The United States Pharmacopeia 24th : United States Pharmacopeial Convention Inc. , 1655-1656, 2000.
- 3) Tai S et al. : Clin. Chem. , 48, 637-642, 2002.
- 4) 小坂妙子・浜田洋彦：食衛誌, 43, 225-229, 2002.

## **Analysis of 3,3',5-Triiodo-L-thyronine and L-thyroxine in Health Foods containing the Thyroid by HPLC**

**Kunimasa MORITA, Takami MOHRI and Reiko NAKAGAWA**

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,  
Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan*

A reverse-phase HPLC method for determining 3,3',5-triiodo-L-thyronine (T<sub>3</sub>) and L-thyroxine (T<sub>4</sub>) in health foods is described. A sample was washed with methanol and methanol/water (1:1, v/v), before hydrolyzing using a Pronase at 37 °C for 18 h. T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> was extracted with 2% ammonium hydroxide in methanol. The sample solution for HPLC was applied to solid phase extractions (Bond Elut C18) with 2% ammonium hydroxide in methanol as mobile phase. The HPLC analysis was carried out on a column of InertsilODS-3 (4.6 x 150 mm, 5 µm) with H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (650:350:5, v/v) as mobile phase and the eluate was monitored by UV detection at 230 nm. The average recovery of T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> from the health food sample was 70-80%. The quantitation limits of this method of T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> were 0.8 and 1.4 µg/g, respectively.

[Key words; Thyroid, 3,3',5-triiodo-L-thyronine, L-thyroxine, HPLC, Solid phase extractions, Health Food]