

原著論文

健康食品中の脱N - ジメチルシブトラミン及びシブトラミンの 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, 健康食品中の脱N - ジメチルシブトラミン及びシブトラミンの分析法を検討した. 健康食品中の脱N - ジメチルシブトラミン及びシブトラミンはメタノールを用いて抽出し, Bond Elut Certify カートリッジ(固相抽出法)を用いて2%アンモニア水-メタノール溶液で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 LiChrosorb RP18 (4.6 x 150mm, 5microns)を, 移動相に pH7 の 0.02mol/L リン酸塩緩衝液/メタノール (15:85, v/v) を用い, 測定波長 225nm で分析した. 本法による健康食品からの脱N - ジメチルシブトラミン及びシブトラミンの回収率はそれぞれ 88 - 96%及び 87 - 91%, 定量下限値はそれぞれ 0.001mg/g であった.

[キーワード: 脱N - ジメチルシブトラミン, シブトラミン, HPLC, 固相抽出法, 健康食品, 食欲抑制剤]

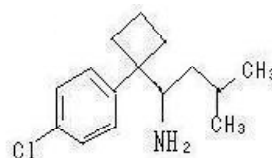
1 はじめに

平成 15 年 11 月, 福岡県内の 2 業者が納豆菌ダイエットと称してインターネット販売した, いわゆる健康食品から脱N - ジメチルシブトラミンあるいはシブトラミンのいずれかが検出された. 厚生労働省, 宮崎県, 富山県及び福岡県の調査で, 該当品は中国産原材料を輸入し国内で錠剤化したものであり, 一物多名称で多種類の製品があることが判明した.

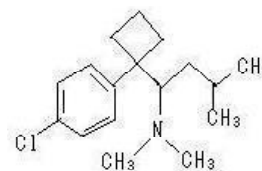
シブトラミンは肥満症の治療薬として用いられる食欲抑制剤である^{1), 2), 3), 4)}. 1997 年に米国において承認された Meridia (商品名) には, シブトラミンの塩酸塩が 1 カプセル当たり 5, 10 及び 15mg 含まれている. Meridia の投与量は初回毎朝 10mg から開始し, 数週間後に 15mg まで増量する. 日本では, エーザイ (株) とドイツのクノール AG 社が共同で臨床開発を行い, 2005 年の発売が予定されている. シブトラミンとその代謝物はノルアドレナリンとセロトニンの再吸収を阻害することにより食欲調節系の中枢に作用し, 満腹感を亢進させる. シブトラミンの副作用として血圧上昇, 心拍数増加, 頭痛, 口渇, 便秘, 鼻炎等がみられるが, 食欲抑制剤のデックスフェンフルラミンにみられるような肺高血圧症や心臓弁膜症の副作用は認められない⁵⁾. 脱N - ジメチルシブトラミンはシブトラミンの主要な代謝物の 1 つであるが, 国内外で医薬品として承認されていない.

図 1 に脱N - ジメチルシブトラミン及びシブトラミンの化学構造式を示す. 化学式は脱N - ジメチルシブトラミンが $C_{15}H_{22}ClN$ (m.w. 251.79), シブトラミンが

$C_{17}H_{26}ClN$ (m.w. 279.85) である.



脱N - ジメチルシブトラミン



シブトラミン

図 1 脱N - ジメチルシブトラミン及びシブトラミンの化学構造式

シブトラミンに関する試験法として, 血中のシブトラミン代謝物を逆相カラムと 0.1%トリフロロ酢酸・アセトニトリル / 0.1%トリフロロ酢酸(55:45, v/v)の移動相を用いて LC/MS/MS で測定する方法⁶⁾と, 健康食品中の脱N - ジメチルシブトラミン⁷⁾及びシブトラミン⁸⁾を逆相カラムと 0.1%ギ酸アセトニトリルの移動相を用いて LC/MS で測定する方法が報告されている. 近年, 国民の健康志向に伴っていわゆる健康食品に医薬品が添加されたものが, 店頭や通信販売で流通するようになった.

このような無承認無許可医薬品あるいは健康被害が発生するおそれがある製品について、著者らは健康被害を未然に防ぐため、医薬品等の成分検査を実施している。しかし、健康食品中の脱N-ジメチルシブトラミン及びシブトラミンを HPLC で測定する方法は報告されていない。市販の健康食品には多種類の妨害成分が存在するため、HPLC を用いて分析するには精製が必要である。そこで、固相抽出法でクリーンアップし、HPLC で分析する方法を検討した。

2 実験方法

2・1 試薬

シブトラミン標準品は Alexis 製のシブトラミン塩酸塩（一水和物）を用いた。脱N-ジメチルシブトラミンの標準品は市販されていないため、納豆菌ダイエットの該当品（商品名：美的身源）から精製した。脱N-ジメチルシブトラミンは図1に示したシブトラミンの脱N-ジメチル体の化学構造で塩基性物質である。このことから、美的身源を粉碎し、その8gに10%アンモニア水25mlを加えて塩基性とし、エーテル10mlで3回超音波抽出を行った。64gの美的身源から抽出したエーテル溶液を合わせ濃縮乾固した後、乾固物中の脱N-ジメチルシブトラミンを20mlのメタノールで2回抽出した。抽出液を濃縮乾固後、10mlのエーテルに溶かし、2N水酸化ナトリウム溶液30mlで軽く洗浄した。エーテル層を分取後、水層はエーテル10mlで2回抽出した。抽出液を濃縮乾固後、メタノール6mlを加えて溶かし、0.1%酢酸12mlを加えた。この溶液をそれぞれ10mlのメタノール、水及び0.1%酢酸を流してコンデショニングした Varian 製の Mega Bond Elut SCX カートリッジ（5g, 20ml）に流し込み脱N-ジメチルシブトラミンを保持させた。カートリッジを水10ml、メタノール30mlで洗った後、4%アンモニア水-メタノール溶液30mlで脱N-ジメチルシブトラミンを溶出した。溶出液は濃縮乾固後、少量のエーテルに溶かしろ紙を用いてろ過した。そのろ液を濃縮乾燥して美的身源64gから29.2mgを得た。HPLCで測定した結果、クロマトグラム上に単一ピークが得られたことから、以後、二次標準品として本標準品を用いた。

脱N-ジメチルシブトラミンを10.0mg、シブトラミン塩酸塩を11.9mg秤量し、メタノールを加えて50mlとし冷暗所に保存した。用時、メタノールを加えて希釈し20-50µg/mlの標準溶液を調製した。

陽イオン交換体ミニカラムは Varian 製の Bond Elut Certify カートリッジ（LRC, 300mg, 10ml）及び Mega Bond Elut SCX カートリッジ（5g, 20ml）を用いた。メ

タノールは和光純薬工業（株）製の HPLC 分析用を用いた。

2%アンモニア水-メタノール溶液はアンモニアを2%含むアンモニア水-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 LiChrosorb RP18（4.6×150mm, 5µm）を使用した。

2・3 実験操作

2・3・1 脱N-ジメチルシブトラミン及びシブトラミンの分析法

健康食品0.2gを10mlの試験管に秤量し、メタノール2mlで2回、10分間振とう抽出した。遠心分離（2500rpm）した後メタノール層を採取し、0.1%酢酸を加えて10mlとした。Bond Elut Certify カートリッジにメタノール2ml、水2ml、0.1%酢酸2mlを順次流しコンデショニングした。これに抽出溶液10mlを流し込み、脱N-ジメチルシブトラミン及びシブトラミンを保持させた後、水2ml及びメタノール2mlで洗浄した。2%アンモニア水-メタノール溶液4mlを流し脱N-ジメチルシブトラミン及びシブトラミンを溶出した。溶出液は窒素ガス気流下40-50で2ml以下まで濃縮後、メタノールを加えて HPLC 用溶液を調製した。

2・3・2 脱N-ジメチルシブトラミン及びシブトラミンの HPLC 測定条件

カラム	LiChrosorb RP18 (4.6×150mm, 5 µ m)
カラム温度	45
移動相	pH7 の 0.02mol/L リン酸塩緩衝液 / メタノール (15:85, v/v)
流量	1.2ml / 分
注入量	10 µ l
測定波長	225nm
保持時間	脱N-ジメチルシブトラミン：5.6分 シブトラミン：12.5分

3 結果及び考察

3・1 脱N-ジメチルシブトラミン及びシブトラミンの HPLC 測定条件の検討

LiChrosorb RP18 のカラムを用いて脱N-ジメチルシブトラミン及びシブトラミンの HPLC の移動相を2・3・2の測定条件で同様に検討した（図2）。0.6%ギ酸・0.5%トリエチルアミン溶液 / アセトニトリル(20:80, v/v),

pH7 の 0.02mol/L リン酸塩緩衝液 / メタノール (15:85, v/v) 及び 0.04mol/L 酢酸アンモニウム / メタノール / トリエチルアミン (20:80:0.05, v/v) の 3 種類の移動相いずれも, 良好な分離が得られた。トリエチルアミンを使用した移動相はカラムの平衡化に時間がかかるため, 本試験法では, 図 2b に示した HPLC クロマトグラムの pH7 の 0.02mol/L リン酸塩緩衝液 / メタノールを用いた。

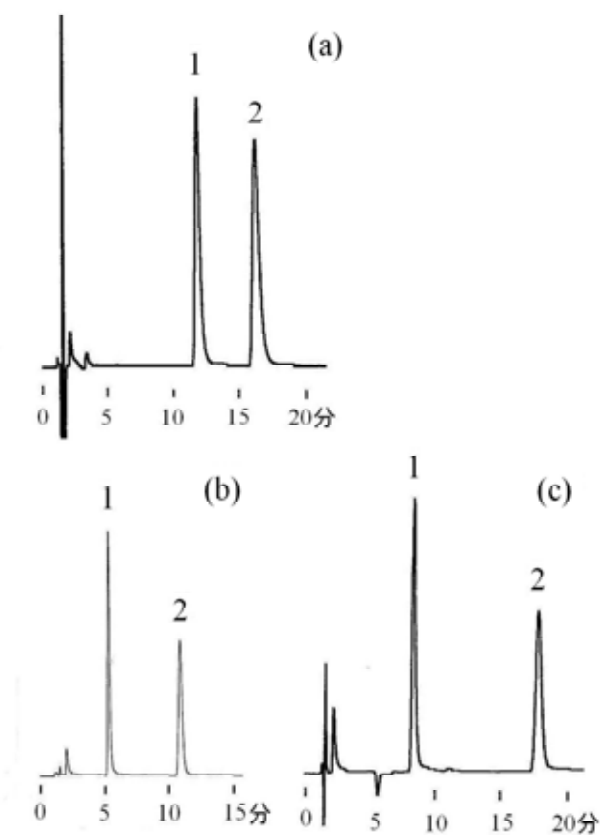


図 2 3 種類の移動相 ; 0.6 %ギ酸・0.5 %トリエチルアミン溶液 / アセトニトリル (20:80) (a), pH7 の 0.02mol/L リン酸塩緩衝液 / メタノール (15:85) (b), 0.04mol/L 酢酸アンモニウム / メタノール / トリエチルアミン (20:80:0.05) (c) で測定した標準溶液 (各々 250ng) の HPLC クロマトグラム
1, 脱N-ジメチルシブトラミン; 2, シブトラミン

3・2 共存物質の除去

試料抽出液中の共存物質を Bond Elut Certify カートリッジを用いてクリーンアップする方法を検討した。脱N-ジメチルシブトラミン及びシブトラミンそれぞれ 40 µg を Bond Elut Certify カートリッジに保持させ, 2% アンモニア水-メタノール溶液の溶出量を検討した。その結果, 2% アンモニア水-メタノール溶液 0 - 1ml で脱N-ジメチルシブトラミン及びシブトラミン溶出量

は添加量のそれぞれ 0%, 1 - 2ml の溶出量は添加量の 1.1 及び 0%, 2 - 3ml の溶出量は添加量の 90.8 及び 91.3%, 3 - 4ml の溶出量は添加量の 6.0 及び 5.6%, 4 - 5ml の溶出量は添加量の 0% であった。このことからクリーンアップ操作時において, 2% アンモニア水-メタノール溶液量は 4ml とした。実試料の測定時には溶出液を窒素ガス気流下で 2ml 以下まで濃縮後, メタノールを加え 2ml にした。添加回収試験で得られた健康食品 A 及び B のクリーンアップ前のクロマトグラムを図 3a 及び図 3c に示す。図 3b 及び図 3d にクリーンアップ後のクロマトグラムを示す。このクリーンアップ操作によって健康食品中の共存物質を効果的に除去することができた。

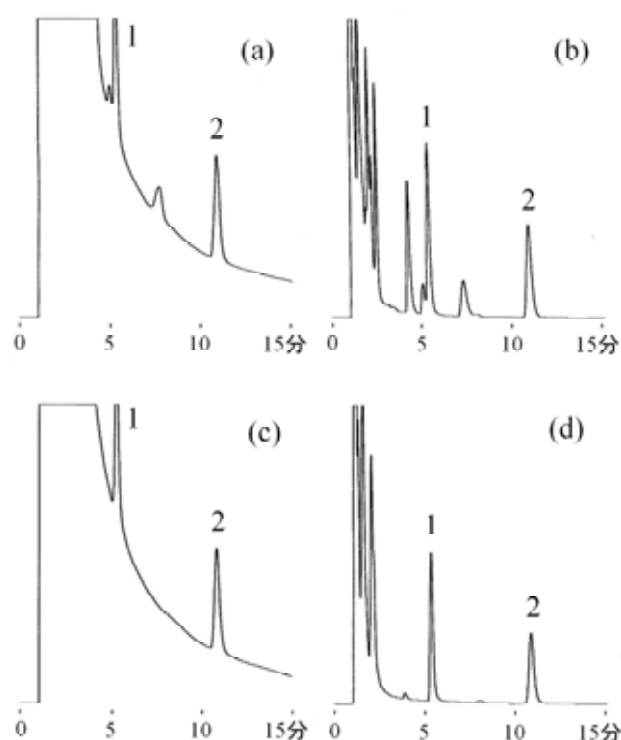


図 3 健康食品 A のクリーンアップ前 (a) とクリーンアップ後 (b) 及び健康食品 B のクリーンアップ前 (c) とクリーンアップ後 (d) の HPLC クロマトグラム
1, 脱N-ジメチルシブトラミン; 2, シブトラミン

3・3 脱N-ジメチルシブトラミン及びシブトラミンの回収率と再現性

市販されている健康食品 A 及び B (納豆菌を含有するダイエット用健康食品) を用いて添加回収実験を行った。健康食品 0.2g に脱N-ジメチルシブトラミン及びシブトラミンをそれぞれ 50 µg 添加し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 1

に示す。

健康食品Aの回収率は脱N - ジメチルシブトラミンが96.4 % (89.8 - 99.5 %) , シブトラミンが91.4 % (84.2 - 95.7 %) であった。健康食品Bの回収率は脱N - ジメチルシブトラミンが88.4 % (83.1 - 91.1 %) , シブトラミンが87.4 % (83.7 - 94.0 %) であった。変動係数はいずれも5 %以内でありほぼ満足する結果を得た。本法による脱N - ジメチルシブトラミン及びシブトラミン定量下限値はそれぞれ0.001mg/gであった。

表1 健康食品からの脱N - ジメチルシブトラミン及びシブトラミンの添加回収試験結果

	脱N - ジメチルシブトラミン	シブトラミン
	回収率 ± 標準偏差**	
健康食品A*	96.4 ± 3.9	91.4 ± 4.5
健康食品B*	88.4 ± 4.8	87.4 ± 4.2

*健康食品A及びBにおいて脱N - ジメチルシブトラミン及びシブトラミンは不検出であった。

**健康食品0.2gに脱N - ジメチルシブトラミン及びシブトラミンをそれぞれ50 µg添加した。実験回数(n=5)

本法を納豆菌ダイエットと称してインターネット販売された6種類の健康食品に応用した結果、脱N - ジメチルシブトラミンあるいはシブトラミンのいずれかが検出された。6種類のHPLCクロマトグラムは図4a及び図4bに示す爽健美人あるいは軽身美人のクロマトグラムと類似していた。脱N - ジメチルシブトラミンの含有量は爽健美人、美的身源、美姿宝及びスリムデルプロがそれぞれ1.1, 0.7, 1.1及び1.3mg/gであった。シブトラミンの含有量は軽身美人及び貴宝美健がそれぞれ1.7及び2.0mg/gであった。

4. まとめ

健康食品中の脱N - ジメチルシブトラミン及びシブトラミンのHPLC分析法を検討した。その結果、Bond Elut

Certify カートリッジを用い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、回収率、再現性ともにほぼ満足する結果を得た。

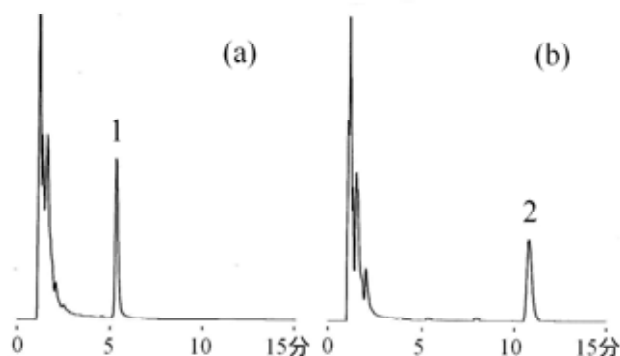


図4 脱N - ジメチルシブトラミン及びシブトラミンが検出された爽健美人(a)及び軽身美人(b)のHPLCクロマトグラム

1, 脱N - ジメチルシブトラミン; 2, シブトラミン

文献

- 1) C. Gundlach et al. : J. Pharmacol. Exp. Ther., 283, 581-591, 1997.
- 2) F. McMahon et al. : Arch. Intern. Med., 160, 2185-2191, 2000.
- 3) A. Ruiz et al. : Obes. Res., 8, 71-82, 2000.
- 4) R. Berkowitz et al. : JAMA, 289, 1805-1812, 2003.
- 5) 深川光司・坂田利家: 日薬理誌, 118, 303-308, 2001.
- 6) J. Chen et al. : J. Chromatogr. B, 785, 197-203, 2003.
- 7) 厚生労働省医薬食品局, 薬食監麻発第1203002号脱N - ジメチルシブトラミン
- 8) 厚生労働省医薬食品局, 医薬監麻発第0411004号, 第041101号シブトラミン

Analysis of Des-N-dimethylsibutramine and Sibutramine in Health Foods by HPLC

Kunimasa MORITA, Takami MOHRI, Reiko NAKAGAWA

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

A reverse-phase HPLC method for determining des-N-dimethylsibutramine and sibutramine in health foods is described. Des-N-dimethylsibutramine and sibutramine in health foods was extracted with methanol. The sample solution for HPLC was applied to Bond Elut Certify (solid phase extractions) with 2% ammonium hydroxide in methanol as the mobile phase. The HPLC analysis was carried out on a column of LiChrosorb RP18 (4.6 x 150 mm, 5 microns) with 0.02 mol/L phosphate buffer pH 7.0 /methanol (15:85, v/v) as the mobile phase and the eluate was monitored by UV detection at 225 nm. The average recovery of des-N-dimethylsibutramine and sibutramine from health food was 88 - 96 and 87 - 91%, respectively. The quantitation limit of this method was 0.001mg/g, respectively.

[Key words; des-N-dimethylsibutramine, Sibutramine, HPLC , Solid phase extractions, Health Food]