

原著論文

健康食品中のピサコジルの 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, 健康食品中のピサコジルの分析法を検討した. 健康食品中のピサコジルの抽出は 0.1 % 酢酸メタノールを用いて抽出し, Bond Elut C18 及び Bond Elut Certify カートリッジ(固相抽出法)を用いてそれぞれ 0.1 % 酢酸メタノール及び 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 150 mm, 5 microns) を, 移動相に pH7 の 0.02 mol/L リン酸塩緩衝液 / アセトニトリル (55:45, v/v) を用い, 測定波長 260 nm で分析した. 本法による健康食品からのピサコジルの回収率は 73 - 97 %, 定量下限値は 0.02 mg/g であった.

[キーワード : ピサコジル, HPLC, 固相抽出法, 健康食品, 下剤]

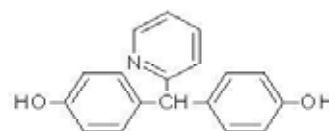
1 はじめに

平成 14 年 12 月 - 平成 17 年 9 月, タイから個人輸入により入手した「ホスピタルダイエット」などと称される製品を服用したことによる健康被害 4 例 (内 1 例が急性心不全で死亡) が厚生労働省から発表された. 該当品にはピサコジルをはじめとする 4 - 7 種類の無承認無許可医薬品が混入され, 5 種類の該当品に合計 11 成分の医薬品が検出された.

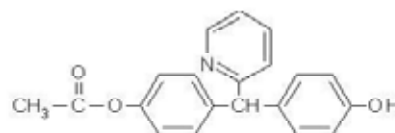
ピサコジルは白色粉末で氷酢酸に溶けやすく, アセトンにやや溶けやすく, エタノール又はエーテルに溶けにくく, 水にほとんど溶けない. 希塩酸に溶けるが速やかに分解し, 4,4'-(2-ピリジリルメチレン) ビスフェノール (desacetyl bisacodyl) 及び 4,4'-(2-ピリジリルメチレン) ビスフェノールモノアセテート (monoacetyl bisacodyl) を生成することが日本薬局方に記載されている¹⁾. 化学式はピサコジルが C₂₂H₁₉NO₄ (m.w. 361.4) である.

ピサコジルは坐剤用緩下薬である. 結腸, 直腸粘膜の副交感神経末端に作用してぜん動を高め, また腸粘膜への直接作用により排便反射を刺激する. さらに結腸腔内における水分や電解質の吸収を抑制する. 直腸坐剤とすれば 15 - 60 分以内に作用が現れる. 便秘症, 消化管検査時又は手術前後における消化管内容物の排除に適応される. ピサコジルは 1 回 10 mg, 1 日 1 - 2 回肛門内に挿入する¹⁾. ピサコジルは 1 個 2 mg 及び 10 mg 含まれる坐薬が販売されているが²⁾, 肥満の治療のために使用される医薬品ではない. ピサコジルの副作用として, 直腸刺激感, 直腸炎, またときに腹部不快感, 腹痛, 肛

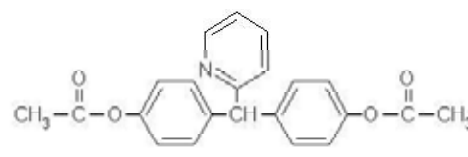
門部痛などの症状が現れることがある^{1), 2)}.



4,4'-(2-ピリジリルメチレン) ビスフェノール (desacetyl bisacodyl)



4,4'-(2-ピリジリルメチレン) ビスフェノールモノアセテート (monoacetyl bisacodyl)



ピサコジル

図 1 desacetyl bisacodyl, monoacetyl bisacodyl 及びピサコジルの化学構造式

ピサコジルの測定方法として逆相カラムと移動相に 0.01 mol/L クエン酸 / アセトニトリル / メタノール (20:10:10, v/v)^{1), 3)}, 0.05 mol/L リン酸二水素カリウム / アセトニトリル (45:55, v/v)⁴⁾ を用いた HPLC 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。

これまでに報告されたピサコジルの HPLC 分析法^{1), 3), 4)}は腸溶性錠剤及び坐薬の試験法であり、健康食品の試験法ではない。多種類の妨害成分が存在する健康食品に適用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

ピサコジル標準原液はピサコジル(Sigma 製)を 20 mg 秤量し、0.1 % 酢酸メタノールを加えて 100 ml とし冷暗所に保存した。用時、標準原液 5 ml をとり 0.1 % 酢酸メタノールを加えて 50 ml としたものを標準溶液とした。

固相抽出には Varian 製の Bond Elut C18 カートリッジ(LRC, 500 mg, 10 ml) 及び陽イオン交換体ミニカラムの Bond Elut Certify カートリッジ(LRC, 300 mg, 10 ml) 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 (4.6×150 mm, 5 μ m) を使用した。

2・3 実験操作

2・3・1 ピサコジルの分析法

Bond Elut C18 カートリッジ法) 健康食品 0.2 g を 10 ml の試験管に秤量し、0.1 % 酢酸メタノール 2 ml を加え振とう抽出した。2500 rpm で遠心分離した後、0.1 % 酢酸メタノール層を採取した。残渣は 0.1 % 酢酸メタノール 2 ml でさらに 1 回抽出した。抽出液を合わせ、窒素ガス気流下 40 - 50 で約 1 ml まで濃縮し、0.1 % 酢酸を加えて 5 ml とした。Bond Elut C18 カートリッジはメタノール 2 ml、水 2 ml を順次流しコンデショニングした。5 ml の試料液を Bond Elut C18 カートリッジに流し込み、ピサコジルを保持させた後、0.1 % 酢酸 2 ml 及び 50 % メタノール 3ml で洗浄した。0.1 % 酢酸メタノール 5 ml でピサコジルを溶出し試料溶液とした。

Bond Elut Certify カートリッジ法) 健康食品 0.2 g を 10 ml の試験管に秤量し、0.1 % 酢酸メタノール 2 ml を加え振とう抽出した。2500 rpm で遠心分離した後、0.1

% 酢酸メタノール層を採取した。残渣は 0.1 % 酢酸メタノール 2 ml でさらに 1 回抽出した。抽出液を合わせ、0.1 % 酢酸を加えて 10ml とした。Bond Elut Certify カートリッジはメタノール 2 ml、水 2 ml、0.1 % 酢酸 2 ml を順次流しコンデショニングした。10 ml の試料液を Bond Elut Certify カートリッジに流し込みピサコジルを保持させた後、水 2 ml 及びメタノール 2 ml で洗浄した。受器に 50 % 酢酸メタノール 1 ml を入れ、2 % アンモニア水-メタノール溶液 3 ml でピサコジルを溶出し試料溶液とした。

2・3・2 ピサコジルの HPLC 測定条件

カラム	LiChrosorb RP18 (4.6×150 mm, 5 μ m)
移動相	pH7 の 0.02 mol/L リン酸塩緩衝液 / アセトニトリル (55 : 45, v/v)
流量	1.0 ml/min
カラム温度	45
注入量	10 μ l
測定波長	260 nm
保持時間	ピサコジル : 9.5 分

3 結果及び考察

3・1 ピサコジルの分解性

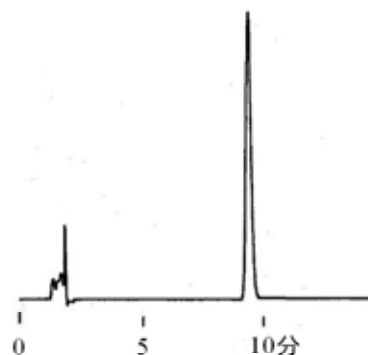


図2 ピサコジル標準溶液の HPLC クロマトグラム

図2に2・3・2の条件で測定した 20 μ g/ml のピサコジル標準溶液の HPLC クロマトグラムを示す。ピサコジルは希塩酸に溶けるが速やかに分解すると日本薬局方に報告されている¹⁾。ピサコジルの標準溶液の調製及び試料からの抽出に適した溶剤を選択するため、数種類の溶剤を用いてピサコジル濃度 20 μ g/ml におけるその分解性について検討した。

ピサコジル 20 μ g/ml の 0.01 N 塩酸メタノール溶液では、標準溶液調製 10 分後、図3に示すピーク3(保持時間 9.5 分)のピサコジルと monoacetyl bisacodyl と考えられる小さなピーク2(保持時間 4.7 分)の2つのピ

ークが検出された。さらに 24 時間後 (図 3a), desacetyl bisacodyl と考えられるピーク 1 (保持時間 2.8 分) が検出された。ピサコジル 20 μ g/ml のメタノール及びアセトニトリル溶液では, 標準溶液調製 6 時間後ピサコジルのみが検出されたが, メタノール溶液では 24 時間後 (図 3b) 小さなピーク 2 が検出され, その後ピーク 2 は日々高くなった。0.1 % 酢酸メタノール溶液では, 図 2 に示したように調製後 1 ヶ月までピーク 1 及び 2 の分解ピークは全く検出されなかった。

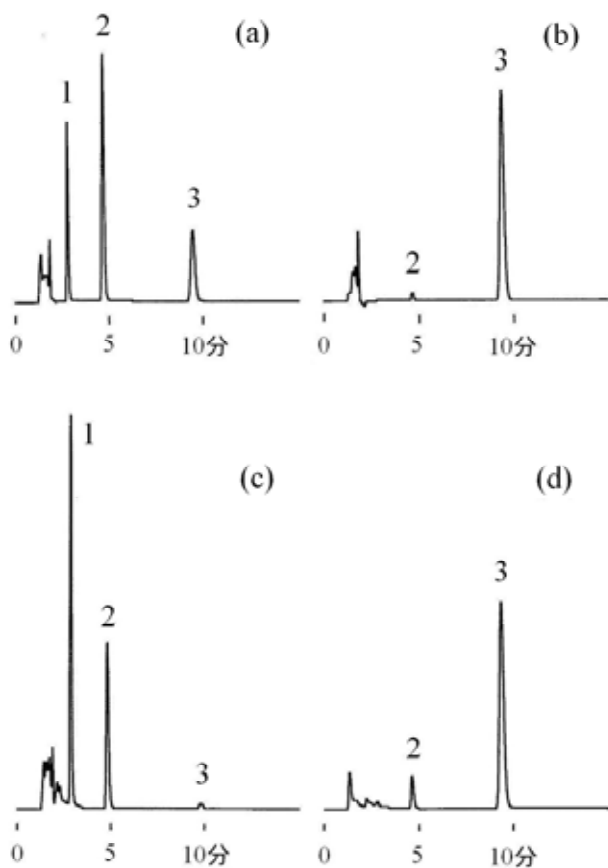


図3 ピサコジル 20 μ g/ml の 0.01 N 塩酸メタノール溶液 (a), メタノール溶液 (b), 2 % アンモニア水-メタノール溶液 (c) 及び 2 % アンモニア水-アセトニトリル溶液 (d) の HPLC クロマトグラム

*(a)及び(b); 標準溶液調製24時間後測定。(c)及び(d); 標準溶液調製 10 分後測定。ピーク1; desacetyl bisacodyl, ピーク2; monoacetyl bisacodyl, ピーク3; ピサコジル。

塩基性溶液中での分解性について検討した結果, ピサコジル 20 μ g/ml の 2 % アンモニア水-メタノール溶液では, 標準溶液調製 10 分後, ピーク 1 及び 2 が検出された (図 3c)。2 % アンモニア水-アセトニトリル溶液では, 10 分経過後小さなピーク 2 が検出され (図 3d), さらに 24 時間後図 3c と類似した HPLC クロマトグラムが得ら

れた。このことからピサコジルは塩酸酸性及びアンモニア塩基性では徐々に分解され, 日本薬局方に記載されている monoacetyl bisacodyl 及び desacetyl bisacodyl が生成されることが分かった。本試験法では, 標準溶液の溶剤及び抽出溶剤には標準溶液調製後 1 ヶ月まで分解ピークが全く検出されなかった。0.1 % 酢酸メタノールを用いた。

3・2 共存物質の除去

Bond Elut C18 及び Bond Elut Certify カートリッジを用いて試料抽出液中の共存物質を除去する方法を検討した。ピサコジル 200 μ g を Bond Elut C18 カートリッジに保持させ, 2・3・1 の操作に従って 0.1 % 酢酸メタノールの溶出液量を検討した。0 - 4 ml の溶出量は添加量の約 100 % であったことから, クリーンアップ操作時における 0.1 % 酢酸メタノールの溶出液量は 5 ml とした。

さらに, ピサコジル 200 μ g を Bond Elut Certify カートリッジに保持させ, 2・3・1 の操作に従って 2 % アンモニア水-メタノール溶液の溶出液量を検討した。0 - 2 ml の溶出量は添加量の約 100 % であったことから, クリーンアップ操作時における 2 % アンモニア水-メタノール溶液の溶出液量は 3 ml とした。

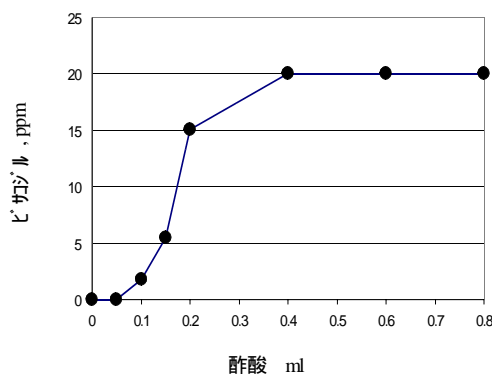


図4 ピサコジルの分解性

*2 % アンモニア水-メタノール溶液 3 ml に酢酸 0 - 0.8 ml を加えた液に, ピサコジルをそれぞれ 200 μ g を添加しメタノールで 10 ml とした溶液を調製した。6 時間経過後, ピサコジル濃度を測定した。実験回数 1 回

しかし, 2 % アンモニア水-メタノール溶液を溶出液に用いることにより, HPLC クロマトグラムに図 3 に示したピーク 1 及び 2 の分解生成物が出現した。そこで, ピサコジルの分解を抑制するため受器にあらかじめ入れて置く酢酸量について検討した。2 % アンモニア水-メタノール溶液 3 ml と酢酸 0 - 0.8 ml の混合溶液にピサコジルをそれぞれ 200 μ g 添加し, メタノールを加えて

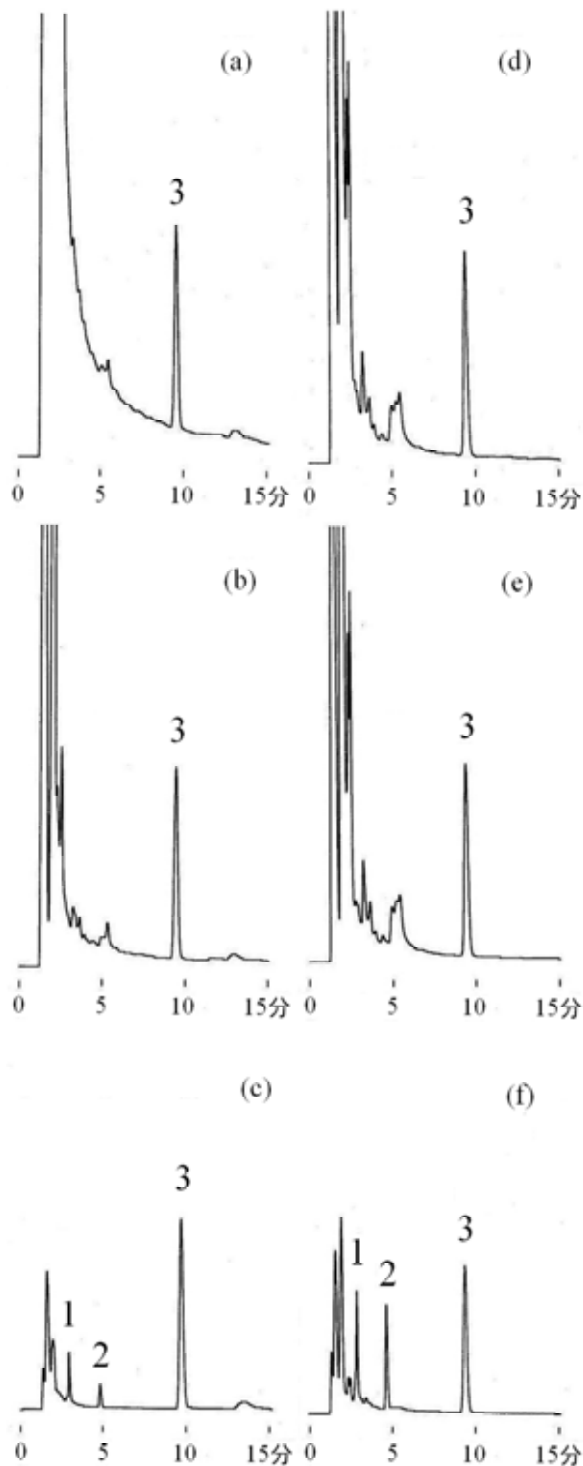


図5 健康食品A及びBのクリーンアップ前後の HPLC クロマトグラム

*健康食品Aのクリーンアップ前 (a), Bond Elut C18カートリッジ処理後 (b) 及び Bond Elut Certify カートリッジ処理後 (c).

**健康食品Bのクリーンアップ前 (d), Bond Elut C18カートリッジ処理後 (e) 及び Bond Elut Certify カートリッジ処理後 (f).

ピーク1; desacetyl bisacodyl, ピーク2; monoacetyl bisacodyl, ピーク3; ビサコジル.

10 mlとした20 μ g/mlのビスコジル溶液を調製した。標準溶液調製 6 時間経過後 HPLC でビスコジル濃度を測定した結果 (図 4), 2 %アンモニア水-メタノール溶液 3 ml に対して酢酸 0 - 0.05 ml の混合溶液では, ビサコジルは 0 μ g/ml で図 3 に示したピーク 1 のみが検出され, ビサコジルはすべて分解されていた。酢酸 0.1 - 0.2 ml の混合溶液では, ビサコジル濃度は 1.8 - 15.1 μ g/ml で図 3 に示したピーク 1 及び 2 の分解生成物が検出された。酢酸 0.4 - 0.8 ml の混合溶液では, ビサコジル濃度は 20 μ g/ml で, ビサコジルは全く分解されなかった。本試験法では, 受器に入れる酢酸量は 0.5 ml, すなわち 50 %酢酸メタノール 1 ml とした。

図 5 に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後の HPLC クロマトグラムを示す。健康食品 A の場合, クリーンアップ前のクロマトグラム (図 5a) は共存物質の影響を受けビスコジルのピークにテーリングが認められたが, Bond Elut C18 カートリッジで処理した後 (図 5b) かなり改善された。Bond Elut Certify カートリッジで処理した場合 (図 5c) Bond Elut C18 カートリッジよりさらに効果的に共存物質を除去することができたが, クロマトグラムにピーク 1 及び 2 の分解生成物が認められた。これらのピークは 2 %アンモニア水-メタノール溶出液が Bond Elut Certify カートリッジを通過する際, ビサコジルが分解し生成したものと考えられた。健康食品 B の場合, クリーンアップ前のクロマトグラム (図 5d) は保持時間 1 - 6 分に大きなピークがあるが, ビサコジルのピークに極端なテーリングがみられないため, カートリッジ未処理で定量できる試料と考えられた。Bond Elut C18 カートリッジ処理後 (図 5e) においても保持時間 1 - 6 分の共存物質は除去できなかったが, Bond Elut Certify カートリッジで処理した場合 (図 5f) 共存物質を効果的に除去することができた。しかし, 健康食品 A の場合と同様にピーク 1 及び 2 の分解生成物が認められた。共存物質の除去を検討するために用いた健康食品 A 及び B のクロマトグラム上に, ビサコジルの分析を妨害するような成分は認められなかったが, もしビスコジルの保持時間前後に共存物質が存在する健康食品があれば, 図 5a 及び図 5d に示したように共存物質をほとんど除去できた Bond Elut Certify カートリッジを用いた方が良いと思われた。また Bond Elut Certify カートリッジで処理した後の分解生成物のピークの有無はビスコジルの確認試験として使用できると思われた。

3・3 ビサコジルの回収率と再現性

市販されている健康食品 A 及び B を用いて添加回収試験を行った。健康食品 0.2 g にビスコジルをそれぞれ 200

μ g を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。

表 1 健康食品からのピサコジルの添加回収試験結果

ピサコジル	
回収率 ± 標準偏差**	
クリーンアップ処理前	
健康食品 A *	99.5 ± 0.9
健康食品 B *	99.9 ± 0.6
Bond Elut C18 カートリッジ処理後	
健康食品 A	96.9 ± 0.4
健康食品 B	97.4 ± 0.7
Bond Elut Certify カートリッジ処理後	
健康食品 A	92.3 ± 3.3
健康食品 B	73.0 ± 2.3

*健康食品 A 及び B においてピサコジルの検出はなかった。

**健康食品 0.2 g を採り、ピサコジルの添加量をそれぞれ 200 μ g 添加した。実験回数 (n=5)。

健康食品 A の場合、クリーンアップ処理前のピサコジルの回収率は 99.5 % (98.8 - 100.7 %), Bond Elut C18 カートリッジ処理後の回収率は 96.9 % (96.4 - 97.5 %), Bond Elut Certify カートリッジ処理後の回収率は 92.3 % (89.7 - 97.8 %) であった。健康食品 B の場合、ク

リーンアップ処理前のピサコジルの回収率は 99.9 % (99.0 - 100.6 %), Bond Elut C18 カートリッジ処理後の回収率は 97.4 % (96.7 - 98.6 %), Bond Elut Certify カートリッジ処理後の回収率は 73.0 % (70.7 - 76.5 %) 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。本法によるピサコジルの定量下限値は 0.02 mg/g であった。

4 まとめ

健康食品中のピサコジルの HPLC 分析法を検討した。その結果、Bond Elut C18 及び Bond Elut Certify カートリッジを用い効果的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を得た。

文献

- 1) 鈴木郁生ら：第 13 改正日本薬局方解説書、(日本薬局方解説書編集委員会編)、C2000-2005、東京、廣川書店、1998。
- 2) 長尾清ら：日本医薬品集 (日本医薬情報センター編) 1293-1295、東京都、薬業時報社、2000。
- 3) L. Valenti & C. Lau-Cam : J. Assoc. Off. Anal. Chem., 68, 529-532, 1985.
- 4) K. Bradshaw et al. : J. Pharm. Biomed. Anal., 13, 1355-1362, 1995.

Analysis of Bisacodyl 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 bisacodyl in health foods is described. Bisacodyl in health foods was extracted with 0.1% acetic acid in methanol. The sample solution for HPLC was applied to Bond Elut C18 and Bond Elut Certify (solid phase extractions) with 0.1% acetic acid in methanol and 2% ammonium hydroxide in methanol as the mobile phase, respectively. 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 / acetonitrile (55:45, v/v) as the mobile phase and the eluate was monitored by UV detection at 260 nm. The average recovery of bisacodyl from health food was 73 - 97%. The quantitation limit of this method was 0.02 mg/g.

[Key words; Bisacodyl, HPLC, Solid phase extractions, Health Food, Cathartics]