

HPLC/PDA によるいわゆる健康食品中の植物性自然毒スクリーニング分析法について

高橋 市長、長谷川 貴志、西條 雅明、吹譚友秀、元木裕二

Screening Analysis of phytotoxins in Dietary Supplements by HPLC/PDA

Kazunaga TAKAHASHI, Takashi HASEGAWA, Masaaki SAIJO, Tomohide FUKIWAKE and Yuji MOTOKI

要旨

いわゆる健康食品中の植物性自然毒により健康被害が発生した場合に、その原因物質を迅速に推定するため、HPLC/PDA による植物性自然毒のスクリーニング分析法を検討した。対象とする成分はアトロピン、アコニチン、メサコニチン、ストリキニーネ、コルヒチン及びアリストロキア酸 I とした。HPLC/PDA 条件及び抽出条件を検討し、その検討した条件で、対象とする植物性自然毒を含むロートコン、ブシ、ホミカ、コルヒクム根、馬兜鈴及び青木香を分析したところ、妨害するピークもなく、各植物性自然毒のピークを良好に検出することができた。また、ロートコン等の生薬を市販健康食品のカプセル剤に約 10%加えた試料を検討した条件で分析したところ、同様に、各植物性自然毒のピークを検出することが可能であった。

キーワード：健康食品、植物性自然毒、アトロピン、アコニチン、メサコニチン、ストリキニーネ、コルヒチン、アリストロキア酸 I

Keywords : dietary supplement, phytotoxin, atropine, aconitine, mesaconitine, strychnine, colchicine, aristrochic acid I

はじめに

近年、健康志向の高まりとともに、多種多様ないわゆる健康食品やサプリメントが流通しており、その中には、植物や植物に由来する成分を原料とするものが多くある。また、インターネットの普及により、個人輸入という形式で外国から、様々な生薬が含まれる漢方薬や薬草・ハーブなどの伝統薬を容易に入手できるようになった。しかし、それらの製品中には、健康被害の発生が懸念される植物由来の成分が含まれていることがあり、アトロピン、アコニチン、ストリキニーネ、アリストロキア酸等が検出された事例が報告されている¹⁾⁻⁸⁾。

今回、これら製品による健康被害が発生し、製品表示等からその原因となる植物性自然毒が推定できない場合を想定して、その原因物質を迅速に推定するためのスクリーニング分析法を検討した。装置は汎用されているフォトダイオードアレイ検出器付き高速液体クロマトグラフ (HPLC/PDA) を用いた。スクリーニング分析の対象とする植物性自然毒はいわゆる健康食品に含まれていた事例があるか、含まれていた場合に重篤な症状を引き起こすことが想定される成分のうち、標準品が確保できたアトロピン、アコニチン、メサコニチン、ストリキニーネ、コルヒチン及びアリストロキア酸 I とした。抽出等の条件の検討には、これら植物性自然毒を有する生薬であるロートコン、ブシ、ホミカ、コルヒクム根、馬兜鈴及び青木香を用いた。また、これら生薬が混入したカプセル剤を想定して、ロートコン等の生薬を市販カプセル剤に重量割合で約 10%添加したモデル

製品を作成し、当該スクリーニング分析法で検出できるか検討を行った。

材料と方法

1. 試料

ロートコン、ブシ、ホミカ、コルヒクム根、馬兜鈴及び青木香は旧千葉県薬草園から入手した生薬標本を用いた。生薬添加用の健康食品はインターネットで購入したカプセル剤の製品を用いた。

2. 試薬及び試液

1) 標準品

標準品としてアトロピンは東京化成工業社製、アコニチンは Alexis 社製、メサコニチン及びコルヒチンは和光純薬工業社製、ストリキニーネ硝酸塩は鳥居薬品社製、アリストロキア酸 I は LKT Laboratories 社製を用いた。

2) その他の試薬

アセトニトリル及びリン酸は HPLC 用、1-ヘキサンスルホン酸ナトリウムはイオンペアクロマトグラフ用、その他の試薬は全て特級品を用いた (いずれも、和光純薬工業社製)。水は日本ミリポア社製 MILLI-Q Labo 超純水製造装置により精製した超純水を用いた。

3. 試験方法

1) 標準溶液の調製

各標準品を 70%メタノールに溶解させ調製した標準原液を 70%メタノールで適宜希釈し、使用する濃度の標準溶液を用時調製した。アトロピン標準溶液、アコニチン標準溶液、メサコニチン標準溶液及びコ

ルヒチン標準溶液は 4、20、100 $\mu\text{g/mL}$ の濃度に調製した。ストリキニーネ標準溶液はストリキニーネ硝酸塩を 70%メタノールに溶解させストリキニーネとして 4、20、100 $\mu\text{g/mL}$ の濃度に調製した。アリストロキア酸 I 標準溶液は 1、4、20 $\mu\text{g/mL}$ の濃度に調製した。

2) 試料の調製

ロートコン等の生薬は粉砕機（大阪ケミカル社製、ニューパワーミル PM-2005M）で粉砕し、均一な粉末とした。また、粉末とした生薬試料 0.2 g と市販カプセル剤の内容物 1.8 g を粉砕機の容器に入れ、粉砕機で粉砕混合したものを生薬約 10%添加モデル製品とした。

3) 試験溶液の調製

分析試料約 100 mg を量り採り、70%メタノール溶液 5 mL を加え、15 分間超音波抽出を行い、1300 g で 10 分間遠心分離し、上澄液を 10 mL メスフラスコに入れた。残渣に同様の操作を繰り返し、上澄液を先の 10 mL メスフラスコに加え、70%メタノール溶液でメスアップした。その後、メンブランフィルター（日本ミリポア社製 マイレクス LH, 25 mm, 0.45 μm ）でろ過し、ろ液を試験溶液とした。

4) HPLC/PDA 分析

HPLC/PDA は、日本分光社製 PU-2089 型ポンプ、同 AS-2055 型オートサンプラー、同 CO-2065 型カラムオーブン、同 MD-2015 型 PDA 検出器から構成される装置を用いた。測定条件は次の通り行った。
カラム：TSK-GEL ODS 80-Ts (4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm、5 μm 、東ソー社製)、カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$ 、移動相 A 液：アセトニトリル/水/リン酸混液（100：900：1、5 mmol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム含有）、移動相 B 液：アセトニトリル/水/リン酸混液（900：100：1、5 mmol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム含有）、グラジエント条件：0 分（A：B=90：10） $\rightarrow$ 25 分（A：B=55：45） $\rightarrow$ 44-49 分（A：B=10：90）、流速：1.0 mL/min、注入量：20 μL 、測定波長：200-400 nm (Max Absorbance)、定量波長：215 nm（アトロピン）、230 nm（アコニチン、メサコニチン）、248 nm（アリストロキア酸 I）、251 nm（ストリキニーネ）、350 nm（コルヒチン）

結果及び考察

1. HPLC/PDA 条件の検討

当研究室では、無承認無許可医薬品取締事業に基づき、いわゆる健康食品中の医薬品成分の試験検査を一斉分析法により行っている⁹⁾。この一斉分析法の HPLC/PDA 条件により、アトロピン、アコニチン、メサコニチン、ストリキニーネ、コルヒチン、アリストロキア酸 I の各標準溶液を分析した（図-1）。最低濃度の各標準溶液の試験結果から、検出限界

（ $S/N=3$ ）は試料 1 g あたりアトロピンでは 0.02 mg、アコニチンでは 0.02 mg、メサコニチンでは 0.03 mg、ストリキニーネでは 0.06 mg、コルヒチンでは 0.005 mg、アリストロキア酸 I では 0.01 mg であった。

アトロピンのヒトにおける経口中毒量はアトロピン硫酸塩として、5～10 mg とされており¹⁰⁾、いわゆる健康食品のカプセル剤にアトロピンが含まれていたとすると、1 カプセルの内容量を 400 mg と仮定して、その 1 カプセルを摂取した場合、中毒症状が起きるアトロピンの最低量はカプセル内容物 1 g あたり、およそ 11 mg となる。本法におけるアトロピンの検出限界は試料 1 g あたり 0.02 mg であるので、中毒量のアトロピンが含まれるカプセル剤を分析するのに十分な検出感度を有していると考えられる。

アコニチンのヒトでの致死量は 2～5 mg とされており¹¹⁾、最所ら¹²⁾と同様に中毒量を致死量の 1/100 と仮定するとヒトにおける最低中毒量は 0.02 mg となる。アトロピンと同様に計算すると、中毒症状が起きるアコニチンの量は、カプセル内容物 1 g あたり 0.05 mg となる。本法におけるアコニチンの検出限界は試料 1 g あたり 0.02 mg であるので、中毒量のアコニチンを含むカプセルからアコニチンを検出することができると考えられる。マウスを用いた毒性試験では、アコニチンのマウス経口 50%致死量（ LD_{50} ）は 1.8 mg/kg、メサコニチンの LD_{50} は 1.9 mg/kg とされており¹³⁾、メサコニチンの経口毒性はアコニチンと同程度と推定される。メサコニチンのヒトで

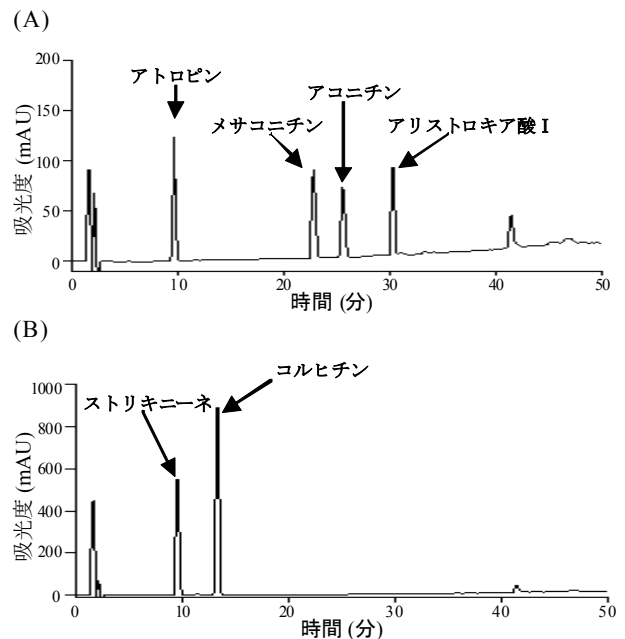


図-1 各標準溶液の HPLC クロマトグラム

(Max Absorbance)

(A) アトロピン 100 $\mu\text{g/mL}$ 、メサコニチン 100 $\mu\text{g/mL}$ 、アコニチン 100 $\mu\text{g/mL}$ 、アリストロキア酸 I 20 $\mu\text{g/mL}$

(B) ストリキニーネ 100 $\mu\text{g/mL}$ 、コルヒチン 100 $\mu\text{g/mL}$

の経口毒性もアコニチンと同程度であると仮定すると、メサコニチンの検出限界がアコニチンとほぼ同等であった本法で、中毒量のメサコニチンを含有するカプセル剤からメサコニチンを検出できると考えられる。

ストリキニーネの成人経口致死量はストリキニーネ硝酸塩として50～100 mgとされており¹⁰⁾、中毒量を致死量の1/100と仮定するとヒトにおける最低中毒量は0.5 mgとなる。アトロピンと同様に計算すると、中毒症状が起きるカプセル内容物のストリキニーネの量は、カプセル内容物1 gあたり、およそ1 mgとなる。本法におけるストリキニーネの検出限界は試料1 gあたり0.06 mgであるので、本法で、十分にストリキニーネを検出できると考えられる。

コルヒチンのヒトにおける致死量は6 mgとされており¹⁴⁾、中毒量を致死量の1/100と仮定するとヒトにおける最低中毒量は0.06 mgとなる。アトロピンと同様に計算すると、中毒症状が起きるカプセル内容物のコルヒチンの量は、カプセル内容物1 gあたり0.15 mgとなる。本法におけるコルヒチンの検出限界は試料1 gあたり0.005 mgであるので、中毒

量のコルヒチンを含むカプセル剤からコルヒチンを検出するのに十分な感度を有していると考えられる。

製品中のアリストロキア酸により腎障害が発生したと疑われている製品のアリストロキア酸の含有量は3.1～233 µg/gと報告されている^{15), 16)}。本法のアリストロキア酸 I の定量限界は製品1 g中0.01 mgであるので、製品によってはアリストロキア酸 I を検出できない場合もあることを考慮する必要があると考えられる。

また、ロートコン、ブシ、ホミカ、コルヒクム根、馬兜鈴及び青木香を材料と方法3. 2) の条件で粉碎し、3) の条件で調製した試験溶液を同様のHPLC/PDA条件で分析したところ、ロートコンのアトロピン、ブシのアコニチン及びメサコニチン、ホミカのストリキニーネ、コルヒクム根のコルヒチン、馬兜鈴及び青木香のアリストロキア酸 I について、特に妨害するピークは存在せず、各成分とも良好に分離した結果が得られた(図-2)。そのため、植物性自然毒のスクリーニング分析法におけるHPLC/PDA条件は、材料と方法3. 4) に示すとおりとした。

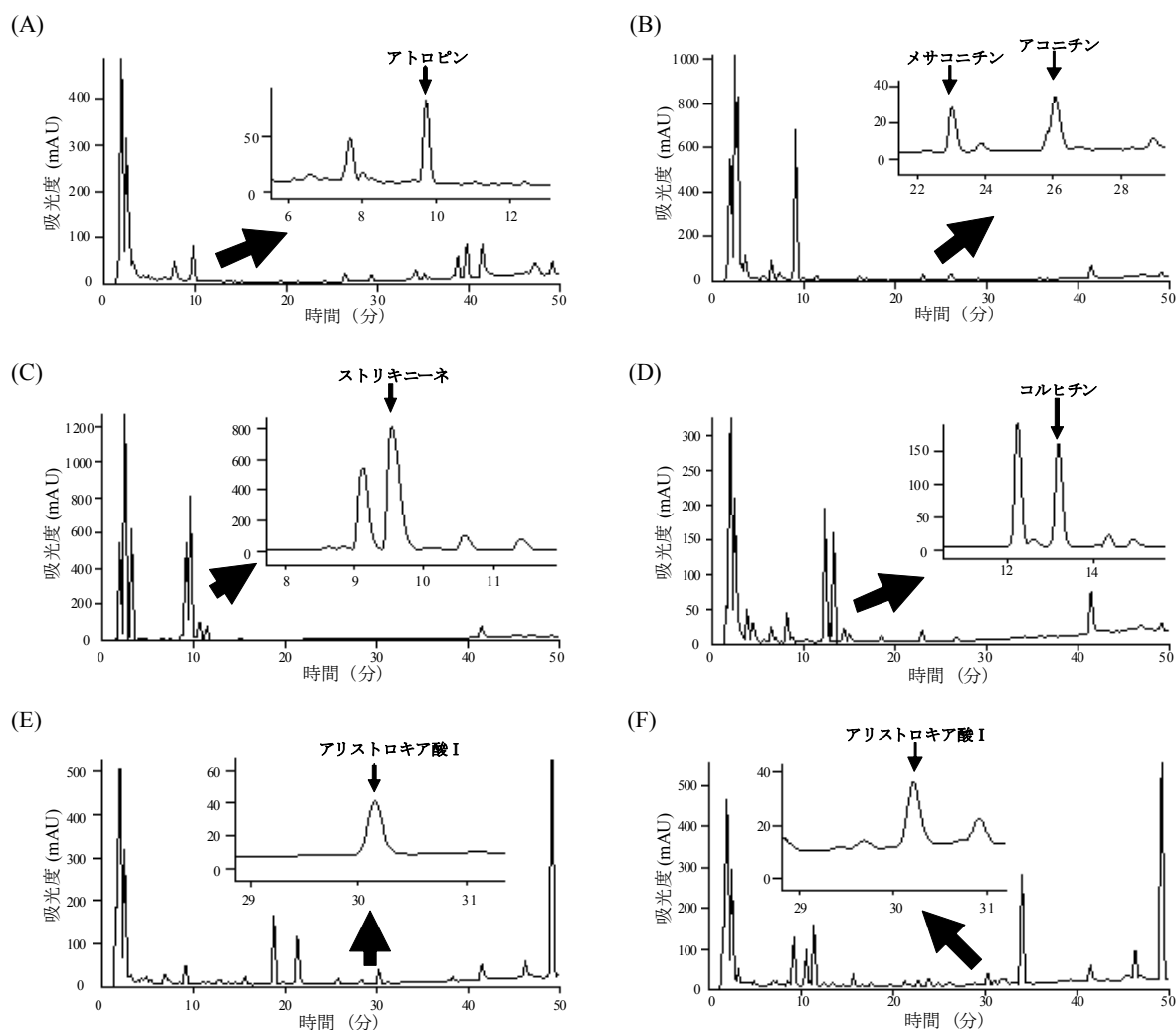


図-2 各生薬における HPLC クロマトグラム (Max Absorbance)

(A) ロートコン、(B) ブシ、(C) ホミカ、(D) コルヒクム根、(E) 馬兜鈴、(F) 青木香

2. 抽出条件の検討

当室が行っているいわゆる健康食品中の医薬品成分の一斉分析法⁹⁾と同様の抽出液である70%メタノールを抽出溶媒として、抽出条件の検討を行った。ロートコン等の粉碎した生薬約100 mgを量り採り、70%メタノール5 mLを加え、15分間超音波抽出を行い、1300 gで10分間遠心分離し得た上澄液をメンブランフィルターでろ過した液を1回目抽出液とした。残渣に同様の操作を繰返し、2回目抽出液、3回目抽出液、4回目抽出液を調製し、各抽出液をHPLC/PDAで測定した。その結果、ロートコン中のアトロピン、ブシ中のアコニチン及びメサコニチン、ホミカ中のストリキニーネ、コルヒクム根中のコルヒチン、馬兜鈴及び青木香中のアリストロキア酸Iのいずれも2回目の抽出液までで、全量に近い量が抽出された(図-3)。そのため、抽出条件は材料と方法の項3. 2)のとおりに、70%メタノール溶液5 mLでの2回抽出とした。

3. 各生薬中の植物性自然毒測定結果

ロートコン、ブシ、ホミカ、コルヒクム根、馬兜

鈴及び青木香を検討したスクリーニング分析法を用いて材料と方法3. 4)に示した定量波長で定量した結果、表-1のとおりととなった。

4. モデル製品での検討

ロートコン等の生薬を市販カプセル剤内容物に重量割合で約10%分加えて混ぜ合わせたモデル製品について、検討したスクリーニング分析法を適用したところ、各植物性自然毒は良好に検出することができた。また、モデル製品を定量した結果、表-2のとおりであり、各成分とも添加量に相当する含有量を示した。

以上の結果より、本法はいわゆる健康食品中にロートコン、ブシ、ホミカ、コルヒクム根、馬兜鈴及び青木香が含まれていた場合に、その植物性自然毒を一斉かつ迅速に検出する方法として有用であると考えられる。本法を用いて植物性自然毒の推定ができた場合は、既に報告されているアトロピン等の各成分に焦点を当てた試験方法¹⁷⁾⁻²⁶⁾を用いてより正確な定量を行う。今後、今回検討した6生薬6成分以外にも対象となる成分を増やし、より充実したスクリーニング分析法にする予定である。

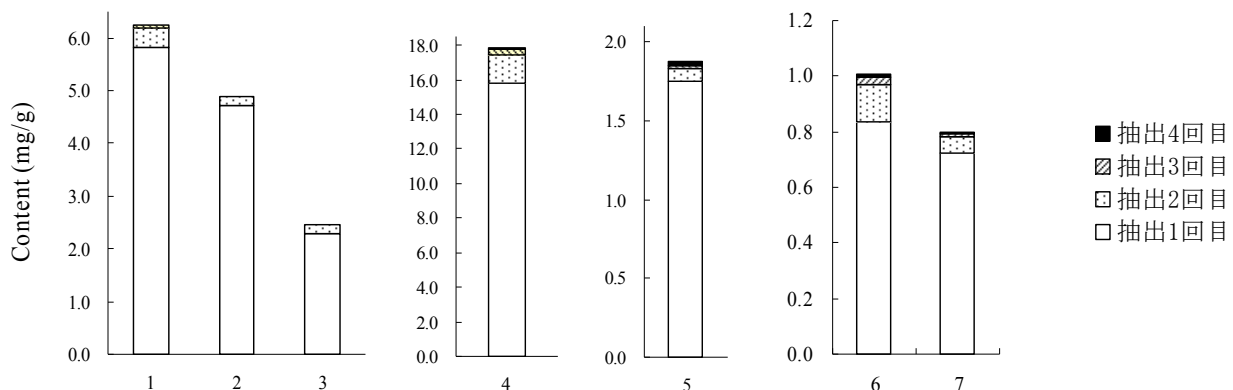


図-3 各成分の抽出回数の検討 (試料 100 mg、抽出液 70%メタノール 5 mL)

- 1 アトロピン (ロートコン)、2 アコニチン (ブシ)、3 メサコニチン (ブシ)、4 ストリキニーネ (ホミカ)、
5 コルヒチン (コルヒクム根)、6 アリストロキア酸I (馬兜鈴)、7 アリストロキア酸I (青木香)

表-1 生薬中の各植物性自然毒含有量

試料	成分	含有量 ^{a)} (mg/g)
ロートコン	アトロピン	5.91 ± 0.179
ブシ	アコニチン	4.74 ± 0.089
	メサコニチン	2.63 ± 0.016
ホミカ	ストリキニーネ	15.9 ± 0.25
コルヒクム根	コルヒチン	1.80 ± 0.039
馬兜鈴	アリストロキア酸I	0.847 ± 0.0217
青木香		0.690 ± 0.0098

a) 平均値±標準偏差 (n=3)

表-2 モデル製品中の各植物性自然毒含有量

試料	成分	含有量 ^{a)} (mg/g)
約10%ロートコン添加カプセル剤	アトロピン	0.623 ± 0.0171
約10%ブシ添加カプセル剤	アコニチン	0.417 ± 0.0089
	メサコニチン	0.284 ± 0.0101
約10%ホミカ添加カプセル剤	ストリキニーネ	1.83 ± 0.126
約10%コルヒクム根添加カプセル剤	コルヒチン	0.178 ± 0.0068
約10%馬兜鈴添加カプセル剤	アリストロキア酸I	0.0867 ± 0.00163
約10%青木香添加カプセル剤		0.0639 ± 0.00619

a) 平均値±標準偏差 (n=3)

文献

- 1) 香港衛生署が有害な不純物及び処方箋医薬品を混入した中国伝統薬に関して警告 (20060817), 独立行政法人 国立健康・栄養研究所 「健康食品の安全性・有効性情報 (URL: <http://hfnet.nih.go.jp/hfnet/contents/detail.php?no=821>)
- 2) 香港衛生署が不純物を含む漢方薬注意喚起 (100727), 独立行政法人 国立健康・栄養研究所 「健康食品の安全性・有効性情報 (URL: <http://hfnet.nih.go.jp/hfnet/contents/detail.php?no=1478>)
- 3) 香港衛生署がアトロピンを含むいわゆる漢方薬に注意喚起 (100730), 独立行政法人 国立健康・栄養研究所 「健康食品の安全性・有効性情報 (URL: <http://hfnet.nih.go.jp/hfnet/contents/detail.php?no=1492>)
- 4) Dickens, P., Tai, Y.T., But, P.P.H., Tomlinson, B., Ng, H.K., Yan, K.W. : Fatal accidental aconitine poisoning following ingestion of Chinese herbal medicine : a report of two cases., *Forensic Science International*, 67,55-58 (1994).
- 5) Liu, Q., Zhuo, L., Liu, L., Zhu, S., Sunnassee, A., Liang, M. et al.: Seven cases of fatal aconite poisonig: Forensic experience in China., *Forensic Science International*, 212, e5-e9 (2011).
- 6) 中国衛生部が医薬品成分を含むダイエット食品について警告 (20060120), 独立行政法人 国立健康・栄養研究所 「健康食品の安全性・有効性情報 (URL: <http://hfnet.nih.go.jp/hfnet/contents/detail.php?no=690>)
- 7) 有害なアリストロキア酸を含むハーブによる健康被害, 独立行政法人 国立健康・栄養研究所 「健康食品の安全性・有効性情報 (URL: <http://hfnet.nih.go.jp/hfnet/contents/detail.php?no=684>)
- 8) Uejima, E., Takahashi, K., Ohishi, M., Arakawa, I., Kurokawa, N., Izumi, M. et al.: The Risks of Using Personally Imported Traditional Chinese Drugs (Decoction), *臨床薬理*, 31, 693-699 (2000).
- 9) 西條 雅明, 石井 俊靖, 長谷川 貴志, 永田 知子: 「いわゆる健康食品」中の医薬品成分分析について, *千葉県衛研年報*, 55, 74-78 (2006)
- 10) 吉村 正一郎, 早田 道治, 山崎 太, 森 博美: 急性中毒情報ファイル-第3版-, 484, 551 (1998)
- 11) 藤原 喜久夫, 栗原 景昭: 食品衛生ハンドブック, 190 (1992)
- 12) 最所 和宏, 豊田 正武, 高木 加代子, 佐竹 元吉, 高橋 悟, 山本 裕昭, 他: はちみつによる食中毒の病因物質について, *食衛誌*, 35, 46-50 (1994)
- 13) 水柿 道直, 鈴木 康男: トリカブト中毒, 中毒研究, 2, 225~228 (1989)
- 14) 西 玲子, 渡辺 せい子, 福永 栄子, : 薬・毒物中毒救急マニュアル 改訂7版, 318 (2003)
- 15) Atsuo, T., Ritsuo, N., Toshiyuki, Y., Masao, K., Masahisa, G., Takashi, K.: Outbreak of Chinese Herb Nephropathy in Japan: Are There Any Differences from Belgium?., *Internal Medicine*, 40, 296-300 (2001).
- 16) 藤村 敏子, 玉置 清志, 飯田 修司, 田中 英晴, 池堂 博文, 高宮 良美, 他: 民間療法によって末期腎不全に至ったアリストロキア酸腎症の1例, *日腎会誌*, 47, 474-480 (2005)
- 17) 志村 恭子, 佐藤 誠, 橋爪 清, 中山 治: ロートコン配合製剤中のアルカロイドの定量法について, *三重保健研年報*, 50, 48-53 (2005)
- 18) 山辺 真一, 肥塚 加奈江, 田邊 英子, 北村 雅美, 今中 雅章: LC/MS/MSによる食品中のアトロピン, スコポラミンの迅速定量, *岡山県環境保健センター年報*, 31, 127-132 (2007)
- 19) Sawabe, Y., Yamasaki, K., Tagami, T., Kaguchi, M., Taguchi, S.: Rapid determination of atropine and scopolamine content in scopolia extract powder by HPLC., *J Nat Med*, 65, 395-399 (2011).
- 20) 中野 道晴, 山岸 喬: 高速液体クロマトグラフによる附子及び烏頭中のアコニチン系アルカロイドの定量, *道衛研所報*, 32, 21-26 (1982)
- 21) 笠原 義正, 久間木 國男, 片桐 進: トリカブト食中毒の原因物質の同定・定量及びマウスに対する毒性, *食衛誌*, 37, 202-209 (1996)
- 22) 緒方 操, 伊藤 健, 辻 浩子, 笠原 義正: トリカブト属植物中のアコニチン系アルカロイドの定性・定量, *山形衛研所報*, 36, 54-57 (2003)
- 23) Choi, Y. H., Sohn, Y. M., Kim, C. Y., Oh, K. Y., Kim, J.: Analysis of strychnine from detoxified *Strychnos nux-vomica* seeds using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry., *J Ethnopharmacol*, 93, 109-112 (2004).
- 24) 宅間 範雄, 荒尾 真砂, 吉田 和美, 麻岡 文代, 川田 常人, 福永 和俊: グロリオサによる食中毒事例-LC/MS/MSによるコルヒチンの分析-, *高知衛研報*, 54, 41-45 (2008)
- 25) Seto, T., Hamano, T., Shioda, H., Kamimura, H.: Analysis of Aristolochic Acid I and II in Kampo Medicine Preparations., *Journal of Health Science*, 48, 412-417 (2002).
- 26) 厚生労働省: 第十六改正日本薬局方, 1502 (2011)