

HPLC及びGC/MSによる中国茶に添加された フェンフルラミンの分析

藤田 久雄・西岡 千鶴・三好 益美・毛利 孝明・黒田 弘之

Analysis of Fenfluramine Added to chinese tea by HPLC and GC/MS

Hisao FUJITA, Chizuru NISHIOKA, Masumi MIYOSHI, Takaaki MOURI and Hiroyuki KURODA

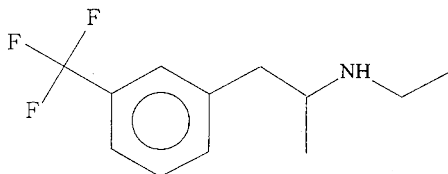
I 緒 言

平成8年8月、米国で向精神薬に指定されているフェンフルラミンが添加された中国茶が国内に流通していることが判明し薬事法上問題となった¹⁾。フェンフルラミンは欧米において、食欲抑制薬、食欲減退薬として肥満症の治療に使用されているが、日本では医薬品の許可はされていない²⁾。この試験方法は厚生省の事務連絡¹⁾にフェンフルラミンの赤外吸収スペクトルとマススペクトルが示されていただけで、お茶中のフェンフルラミンの具体的な試験方法はみあたらなかった。明らかにフェンフルラミンの白色顆粒状粒子が混じっている検体については、その粒子の赤外線スペクトル及び直接導入によるマススペクトル測定を行うことにより、フェンフルラミンに特徴的なスペクトルを確認でき、定性が可能であったが、その他の検体については、フェンフルラミン添加の有無について十分な確認ができなかった。今回我々は高速液体クロマトグラフによる定量(HPLC)及びガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)による確認方法を検討し、若干の知見を得たので報告する。

II 実験方法

1. フェンフルラミンの性状等^{2),3)}

- ①名称：フェンフルラミン (Fenfluramine)
- ②化学名：N-エチル- α -メチル-m-トリフルオロメチルフェネチルアミン
(N-Ethyl- α -methyl-m-(trifluoromethyl)phenethylamine)
- ③分子式： $C_{12}H_{16}F_3N$
- ④構造式：



- ⑤分子量：231.26
- ⑥融点(°C)：塩酸塩 $C_{12}H_{16}F_3N \cdot HCl$ mp166
- ⑦分類：日本；薬事法において医薬品の許可なし
米国；薬品(向精神薬指定)
英国；公定法(イギリス薬局方)に記載されている医薬品
- ⑧用途：欧米において、食欲抑制薬、食欲減退薬として肥満症の治療に使用されている。
(用量) 毎食前に20mg。1日3回
- ⑨作用：経口摂取により中枢神経に作用し、食欲抑制作用を呈する。
- ⑩副作用：摂取により血圧上昇、瀕脈、動悸がおり、瞳孔反射の鈍化によるウトウト状態が患者の約67%に発生する。また、悪心、下痢、便秘、気分不快、口渇、不眠症、めまい、頭痛なども起きている。大量投与により、精神障害や振せん(震え)、戦慄がおきることが報告されている。

2. 試 料

平成8年9月に収去又は提出されたフェンフルラミンの添加が疑われる中国茶8検体。

3. 試 薬

3-1 フェンフルラミン塩酸塩

標準品の入手ができなかったため、検体に含まれる白色顆粒状粒子を集め、精製して、赤外吸収スペクトル、マススペクトル、融点を測定し文献データ及びマススペクトルライブラリーと一致を確認して使用した。

精製方法は顆粒状粒子20mgを0.1N塩酸8mlに溶解した後、n-ヘキサン10mlで2回洗浄、1N水酸化ナトリウム溶液2ml加えてアルカリ性とした後、n-ヘキサン10mlで抽出する。ヘキサン層に0.5N塩酸メタノール溶液を1ml加え、エバポレーターで濃縮し、窒素気流にて乾固し、溶媒及び過剰の塩酸を除いた後、更に、デシケーターで減圧乾燥した。

赤外吸収スペクトル・・・図1

マススペクトル (直接導入) . . . 図2

融点: 実測値 165.9°C

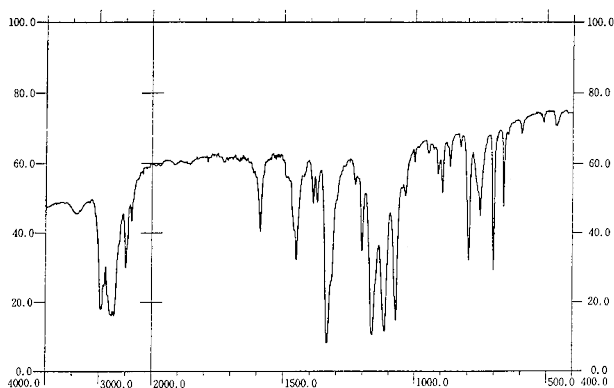


図1 フェンフルラミン塩酸塩赤外吸収スペクトル

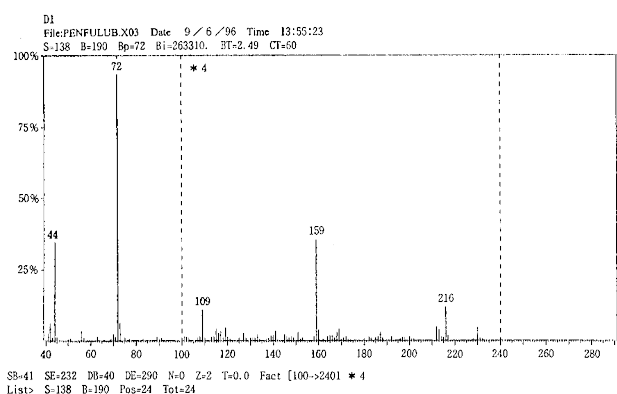


図2 フェンフルラミン塩酸塩マススペクトル (QP-1000EX 直接導入)

3-2 HPLC用標準原液・標準液

フェンフルラミン塩酸塩10mgを量り、メチルアルコールを加えて溶解し、正確に20mlとして標準原液 (500 μg/ml) とした。

これをメチルアルコールで段階希釈 (0.5~50 μg/ml) して標準液を作成する。

3-3 GC/MS用標準液

HPLC用標準原液 (500 μg/ml) 2.0mlを10mlの共証試験管に量りとり、窒素気流で溶媒を気散させ乾固させた後、0.1N塩酸2mlに溶解させる。次に1N水酸化ナトリウム溶液0.5ml加えてアルカリ性とした後、n-ヘキサン5mlで2回振とう抽出し、ヘキサン層を合わせてヘキサンで正確に100mlとする。

この溶液 (10 μg/ml) をヘキサンで段階希釈 (0.5~5 μg/ml) して標準液を作成する。

3-4 リン酸緩衝液 (pH=2.2)

りん酸2水素カリウム6.80g (0.05モル) を蒸留水1000mlに溶解し、りん酸約5mlを加えてpHを2.2に調製する。

3-5 HPLC移動相

リン酸緩衝液700mlにn-オクタンスルホン酸ナトリウム1.08g (0.005モル) を溶解し、アセトニトリル300mlを加えて混和する。

3-6 その他試薬

n-オクタンスルホン酸ナトリウムは和光製イオンペアクロマトグラフ用を、メタノール、アセトニトリルは和光製高速液体クロマトグラフ用を使用した。n-ヘキサン、酢酸エチルは和光残留農薬試験用を使用した。りん酸、りん酸2水素カリウム、その他の試薬は和光特級を使用した。

4. 装置

高速液体クロマトグラフは島津製作所製LC-10Aシステム (LC-10AD, SPD-10AV, CTO-10A, SPD-M10AV, CLASS10-LC) を使用した。

ガスクロマトグラフ質量分析計は島津製作所製QP-5000を使用し、直接導入は質量分析計: 島津製作所製QP-1000EXを使用した。

赤外分光光度計は島津製作所製IR-435を、自記分光光度計は島津製作所製UV-2200, 超音波洗浄器はYAMATO 3210を、試験管振とう機はヤヨイ製YS-8D, エバポレーター, バキュームシステムは柴田科学器機工業製RE121, B-179を使用した。

5. 測定条件

5-1 高速液体クロマトグラフ

カラム: Inertsil ODS-2 (150×4.6mmi.d)

移動相: リン酸緩衝液 (pH=2.2) / アセトニトリル / n-オクタンスルホン酸ナトリウム = 700 / 300 / 0.005モル混液

流速: 1.0ml/min

検出波長: 210nm

カラム槽温度: 40°C

注入量: 10 μL

5-2 ガスクロマトグラフ質量分析計

カラム: J & W DB-1 (0.25mm, 30m, 0.25 μm)

イオン化法: EI

カラム温度: 60°C (2 min) - (10°C/min) - 150°C - (20°C/min) - 280°C (5 min)

注入口: 250°C

インターフェース: 230°C

イオン化電圧: 1.8

スキャン範囲: 40-360m/z

注入量: 1 μL (スプリットレス)

6. 測定溶液の調製

6-1 抽出操作

試料0.5gを10mlのネジ付きガラス遠沈管に量りとり、0.1N塩酸メチルアルコールを5ml加えて15分間振とう

抽出した後、3000回転/分で10分間遠心分離して、上澄液をデカンションで分取する。残査に再び0.1N塩酸メチルアルコールを5ml加えて振とう、遠心分離操作を繰り返す。得られた抽出液を合わせてメチルアルコールで10ml定容にする。

試料の均一性が問題となる場合は、ティーパック1袋の検体(約3g)を50mlのネジ付きガラス遠沈管に量りとり、10倍量の0.1N塩酸メチルアルコール30mlで2回同様に抽出操作を行い60ml定容とする。

6-2 転溶精製操作・HPLC用測定溶液の調整

抽出溶液1ml(試料0.05g相当)を25mlの共栓試験管に量りとり、試験管をロータリーエバポレーターの先に取り付けて40℃、150hPaで減圧乾固した後、0.1N塩酸溶液8mlを加えて5分間超音波溶解する。次にヘキサン10mlを加えて試験管振とう機で5分間振とう洗浄し静置後、上層のヘキサン層と界面の懸濁物をピペットで取り除く。次に、1N水酸化ナトリウム溶液2ml加えてアルカリ性とした後、ヘキサン10mlを加えて同様に5分間振とう抽出し静置後、ヘキサン層をピペットで100mlのナス型フラスコに分取する。再び水層にヘキサン10mlを加えて同様に操作し、ヘキサン層を合わせる。抽出したヘキサン層に0.5N塩酸メタノール溶液を0.5ml加えて振り混ぜた後、エバポレーターで減圧乾固し、さらに窒素気流で残存する塩酸を完全に乾固した後、メチルアルコール2mlに溶解してHPLC用測定溶液とする。

6-3 GC/MS確認用測定溶液の調整

HPLC用測定溶液1.0mlを10mlの共栓試験管に量りとり、ロータリーエバポレーターの先に取り付けて40℃、150hPaで減圧乾固した後、0.1N塩酸1mlに溶解する。次に1N水酸化ナトリウム溶液0.25ml加えてアルカリ性とした後、ヘキサン2mlを加えて振とう抽出し、ヘキサン層を測定溶液とする。なお、濃度が1~5μg/mlになるように、ヘキサンで希釈する。

6-4 添加回収用試料の調整

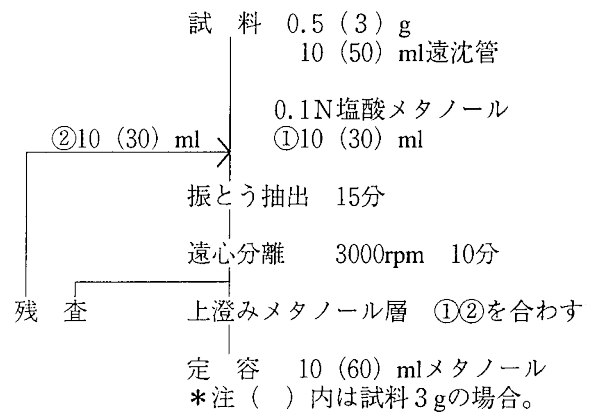
フェンフルラミンを含まないお茶0.5gを10mlの共栓試験管に量りとり、各濃度(500, 100, 20μg/ml)のフェンフルラミン塩酸塩メチルアルコール溶液を0.5ml加えて、室温で24時間放置して溶媒を除いたものを添加回収及び抽出溶媒の検討用試料とした。

III 結果及び考察

1. 検量線

フェンフルラミン塩酸塩標準液(0.5~50μg/ml)10μLをHPLCに注入しピーク面積から検量線を作成する。0.5μg/mlから50μg/mlの範囲で直線性が認められ、相関係数は0.9999であった。(図4)

<抽出操作>



<転溶・精製操作>

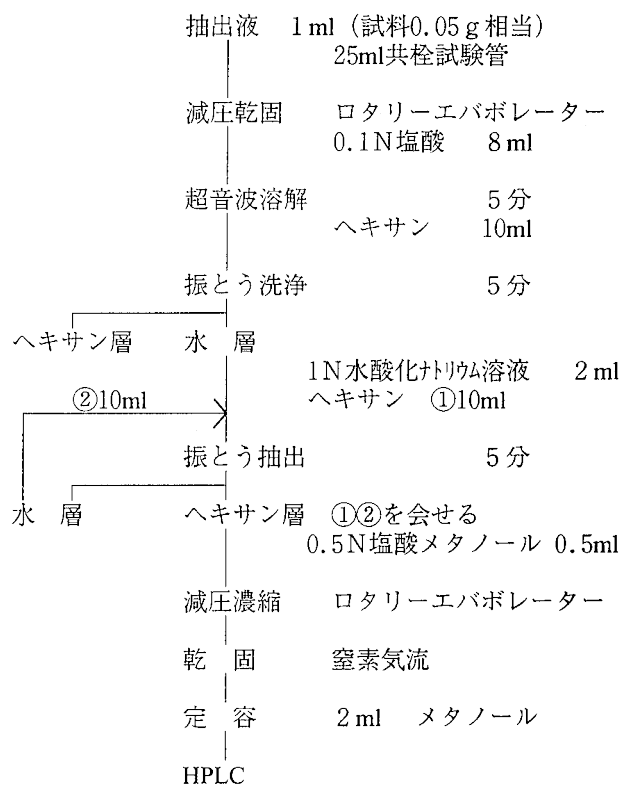


図3 フェンフルラミン分析法フローシート

2. クロマトグラム

本分析法で得られたフェンフルラミン標準、500mg/Kg添加中国茶、無添加中国茶試料のクロマトグラフを図5に示す。

3. HPLC測定条件の検討

含窒素医薬品の分析法を参考に4種類の移動相を検討した。測定波長はフェンフルラミン塩酸塩メチルアルコール溶液の極大吸収が207nm及び263nmにありその強度比は約207nm/263nm=14/1であることから、妨害を考慮して210nm及び263nmを使用した。カラムはイナトーシルODS-2を使用して移動相は保持時間が8分前後になるよう溶媒/水の比率を調整した。

- ①アセトニトリル/0.23%リン酸水素ナトリウムアンモニウム4水塩 (pH8.2)
 $=400/600$ $\lambda=263$
- ②メチルアルコール/水/酢酸/n-オクタンスルホン

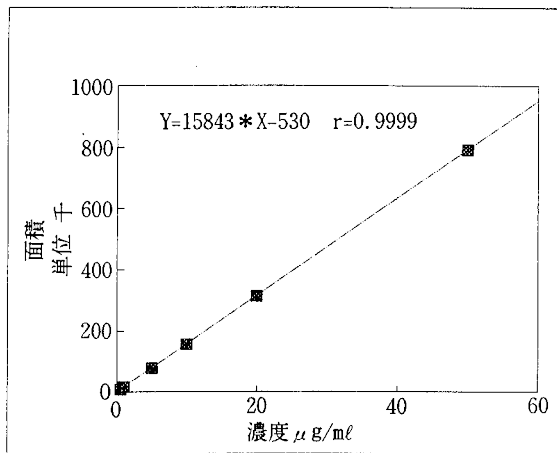


図4 フェンフルラミンの検量線

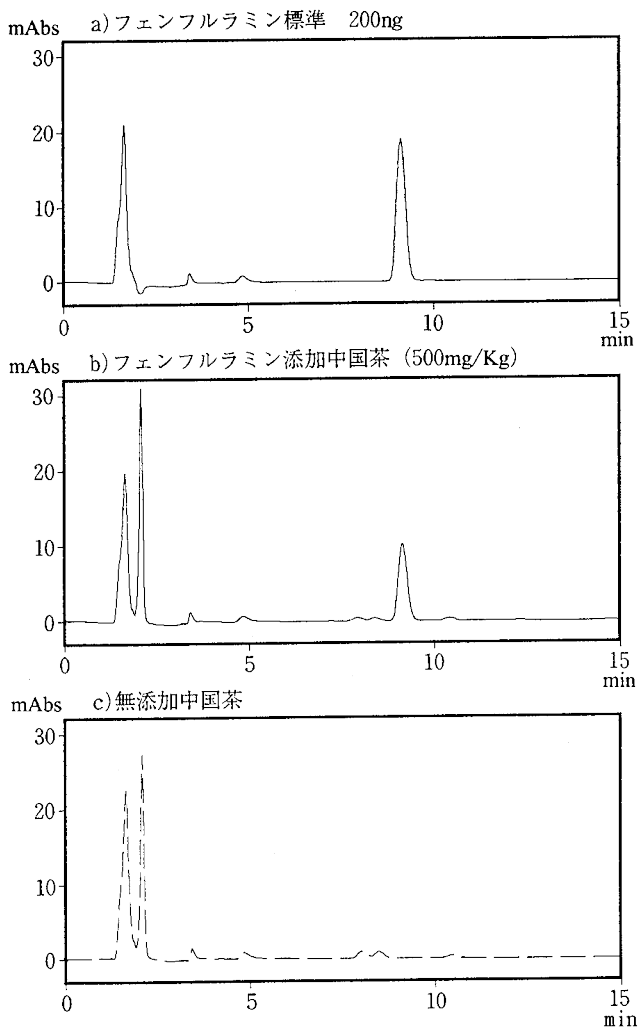


図5 高速液体クロマトグラム

(移動相: アセトニトリル/リン酸緩衝液 (pH=2.2) /オクタンスルホン酸ナトリウム=300/700/0.005モル 測定波長: 210nm, 流速: 1 ml/min)

- 酸ナトリウム
 $=400/590/10/0.005$ モル $\lambda=263$
- ③アセトニトリル/水/酢酸/n-オクタンスルホン酸ナトリウム
 $=300/690/10/0.005$ モル $\lambda=263$
- ④アセトニトリル/リン酸緩衝液 (pH2.2)/n-オクタンスルホン酸ナトリウム
 $=300/700/0.005$ モル $\lambda=210$

①の移動相は、弱アルカリ性りん酸緩衝液でODSカラムに保持させようとしたが、ピークがブロードでピークテーリングを示した。

②及び③の移動相は医薬品のイオンペアークロマトグラフィー¹⁾を適用したものであるが、②の移動相では、標準はシャープなピーク形状を示したが、試料の測定ではピークが前に流れるリーディングするものがあり不適であった。また、③の移動相はピーク形状が良好で分析

スペクトル

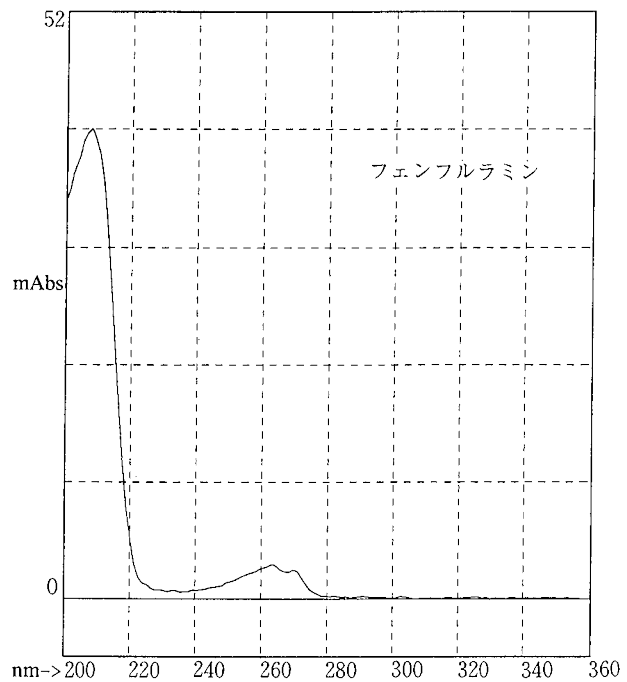


図6 フォトダイオードアレイ検出器を用いた紫外吸収スペクトルによる確認

が可能であったが、酢酸が低波長に吸収があるため、感度の高い210nmの検出波長が使用できなかった。

④の移動相は酢酸に変えて、りん酸緩衝液 (pH2.2) を使用した。最も優れたピーク形状を示し、良好な保持時間及び挟雑物の相互分離ができた。また、フォトダイオードアレイ検出器を用いた波長200nmから360nmの定性確認が可能であった(図6)。

4. 転溶精製操作の検討

水層から有機溶媒への転溶はpH及び溶媒の極性等に

表1 転溶・精製操作における収率

n	回収率 (%)	
	ヘキサン	酢酸エチル
1	98.7	68.6
2	99.0	58.6
3	101.0	55.1
平均	99.6	60.8
変動係数 (%)	1.0	9.4

標準：250 μg添加

表2 抽出溶媒の検討

(n = 1)

抽出溶媒	試料量		
	中国茶 (g)	添加量 (μg)	回収率 (%)
アセトニトリル	0.5	250	4.8(58.1)
メチルアルコール	0.5	250	58.5(78.8)
0.1N塩酸メチルアルコール	0.5	250	89.0(97.9)

注 () 内の数値は添加後、直ちに抽出操作を行ったもの。

より回収率が変化する。そこで、フェンフルラミン塩酸塩標準原液 (500 μg/ml) 0.5mlを用いて6-2の転溶精製操作の回収率調べた。洗浄・転溶溶媒はヘキサンと酢酸エチルについて検討した。フェンフルラミンは塩基性であため、水層のpHを0.1N塩酸酸性として転溶溶媒で洗浄し挟雑物を除いた後、0.12N水酸化ナトリウムアルカリ性で転溶した。その結果を表1に示す。

転溶溶媒ヘキサンは、回収率99.6%、変動係数1.1%で良好であった。しかし、極性溶媒である酢酸エチルは洗浄操作で約1割程度酢酸エチル層に移行し、また、回収率 (60.8%) が悪く、且つ、変動が大きかった。これは、洗浄及び転溶振とう操作後の水層のpHを調べると、ほぼ中性近くに変化しており、酢酸エチルが加水分解しているものと思われる。このために、洗浄・転溶操作が不完全になると考えられる。

試料の転溶操作では、抽出溶媒のメチルアルコールが残存するとエマルジョンにより、遠心分離しても分離が困難であった。そこで、抽出液の溶媒は完全に減圧乾固した後、0.1N塩酸に溶解して操作を行うこととした。

この操作により定量妨害物質はほぼ完全に除去できた。

5. 抽出溶媒の検討

中国茶0.5gにフェンフルラミン塩酸塩標準原液 (500 μg/ml) 0.5mlを添加して、24時間室温に放置した試料について、抽出溶媒アセトニトリル、メチルアルコール、0.1N塩酸メチルアルコールを用いて操作を行い、回収

表3 低濃度添加回収結果による検出限界の算定

お茶	フェンフルラミン塩酸塩 n = 7
検出限界推定値 (mg/Kg)	4.0
試料濃度 (mg/Kg)	20.0
分析値平均 (mg/Kg)	17.1
標準偏差 (Sc)	1.11
検出限界 (DL)	3.48
95%信頼区間	2.22~7.66

表4 フェンフルラミン塩酸塩の添加回収実験結果

試料	添加濃度 (mg/Kg)	試料量 (g)	試料数 (n)	回収率 (%)	変動係数 (%)
中国茶1	500	0.5	4	87.3	3.18
	100	0.5	4	83.4	3.61
	20	0.5	7	85.4	6.00
中国茶2	500	0.5	3	89.1	2.06
	500	0.5	1	86.6	—
日本茶	100	0.5	1	87.2	—
	20	0.5	1	97.7	—

率を求めた結果を表2に示す。回収率はアセトニトリル (4.8%) <メチルアルコール (58.5%) <0.1N塩酸メチルアルコール (89.0%) の順に良い結果であった。

6. 検出限界と定量限界

7回の低濃度添加回収結果より検出限界を算定⁵⁾した結果を表3に示す。本分析法におけるフェンフルラミンの検出限界は3.5mg/Kgであった。

検量線の直線下限が0.5 μg/mlであることから試料中の定量限界は20mg/kgであった。

7. 添加回収結果

本分析法における添加回収実験結果を表4に示す。回収率は83%~97.7%、変動係数2.18から6.00ではば良好な結果であった。

8. ガスクロマトグラム質量分析計 (GC/MS) による確認

液体クロマトグラフ用測定溶液をアルカリ性でヘキサン層に転溶して、フェンフルラミン塩酸塩を遊離体 (フリー体) にしすることにより、一般的なメチルシリコンキャピラリーカラム (J & W DB-1) で分離でき、GC/MSで容易にフェンフルラミンのマススペクトルを確認できた。

フェンフルラミンを検出した中国茶のクロマトグラム及びマススペクトルを図7に示す。

なお、フェンフルラミンは1回の転溶（ヘキサン/水層=1/1）操作で98%がヘキサン層に移動する。

9. フェンフルラミンが添加された疑いのある中国茶の調査結果

平成8年9月に収去又は提出されたフェンフルラミン

の添加が疑われる中国茶4銘柄8検体を本法で分析した結果2銘柄6検体からフェンフルラミンが検出された。ティーパック一袋（約3g）に含まれるフェンフルラミンは塩酸塩として16.7mg~19.9mgであり、これは用量（毎食前に20mg 1日3回）に相当する量であった。

表5 中国茶におけるフェンフルラミンの調査結果

No.	試料	ティーパックの内容量 (g)	白色顆粒状粒子の有無	試料濃度 (mg/Kg)	ティーパック1袋当りの量 (mg)
1	減肥茶A-1	2.84	有り	6130	17.4
2	減肥茶A-2	2.96	有り	6330	18.7
3	減肥茶A-3	3.02	有り	6580	19.9
4	減肥茶A-4	2.85	有り	6500	18.5
5	減肥茶A-5	3.06	有り	6450	19.7
6	減肥茶B	3.01	有り	5550	16.7
7	減肥茶C	2.89	無し	<20	-
8	減肥茶D	2.95	無し	<20	-

備考：フェンフルラミンの塩酸塩で濃度及び量を示す。

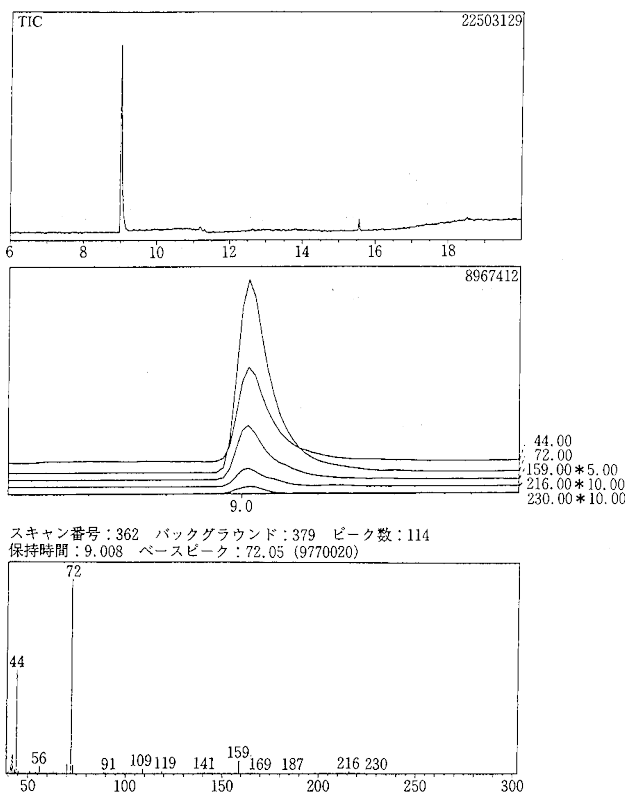


図7 中国茶から検出されたフェンフルラミンのクロマトグラム及びマススペクトル

IV まとめ

中国茶に添加されたフェンフルラミンの分析法を検討し、調査を行った結果は次のとおりであった。

- 抽出溶媒を検討した結果、回収率はアセトニトリル 4.7% < メチルアルコール 58.5% < 0.1N HClメチルアルコール 89.0%であった。
- 精製法については、抽出液を分取減圧乾固後、0.1 N塩酸に溶解して、ヘキサンで振とう洗浄する。次に0.125 N水酸化ナトリウムアルカリ性としてヘキサン相に転溶後、0.5 N塩酸メチルアルコールを加えて減圧乾固し、メチルアルコールで定容とする。この操作で定量妨害物質はほぼ完全に除去できた。
- HPLCの条件については、イオンペアクロマトグラフィー（検出波長：210nm、移動相：アセトニトリル/リン酸緩衝液 (pH2.2)/オクタンスルホン酸ナトリウム=300/700/0.005モル、カラム：イナートシルOD S-2 (150×4.6mmi. d)により、分離定量が可能であった。
- 添加回収率実験の結果、回収率は83%~97.7%、変動係数2.18から6.00であった。検出限界は3.5mg/Kgであった。
- GC/MSによる確認法については、HPLC用測定溶液をアルカリ性でヘキサン相に転溶し、フェンフルラミンの塩酸塩をフリー体にするにより、一般的な無極性カラム (DB-1, 0.25mm, 30m) で分離でき、フェンフルラミンのGC/MSスペクトルの確認が可能であった。
- フェンフルラミンの添加が疑われる中国茶4銘柄8検体を本法で分析した結果2銘柄6検体からフェンフルラミンが検出された。ティーパック一袋（約3g）に

含まれるフェンフルラミンは塩酸塩として16.7mg～19.9mgであり、これは用量（毎食前に20mg 1日3回）に相当する量であった。

文 献

1) 厚生省薬務局監視指導課事務連絡：“フェンフルラミンが

添加されたお茶等の取り扱いについて”，平成8年8月19日

2) 厚生省薬務局監視指導課：“フェンフルラミンが添加された中国茶の件について”，平成8年9月6日

3) MERCK INDEX p450 (1968)

4) 武藤義一編：カラム充填剤の選択と使い方，P106, (1983), 講談社

5) 環境庁環境保健調査室：検出限界及び定量限界の算出方法，P186-191, 化学分析法開発マニュアル (1987)