

## 固相抽出法を用いた健康食品中の甲状腺ホルモンの分析

衰 輪 佳 子\*, 守 安 貴 子\*, 中 嶋 順 一\*, 重 岡 捨 身\*,  
岸 本 清 子\*, 上 村 尚\*\*, 安 田 一 郎\*

### Determination of Thyroid Hormone in Dietary Supplements by Solid Phase Extraction Method

Keiko MINOWA\*, Takako MORIYASU\*, Junichi NAKAJIMA\*, Sutemi SHIGEOKA\*,  
Kiyoko KISHIMOTO\*, Hisashi KAMIMURA\*\* and Ichiro YASUDA\*

A method using solid phase extract (SPE) cartridges was developed for the determination of thyroid hormone, 3,3',5-Triiodo-L-thyronine(T3) and DL-thyroxine(T4) in a dietary supplement. T3 and T4 were loaded on a Oasis HLB SPE cartridge. The cartridge was neutralized with 3 mL of 1 mol/L acetic acid and washed with 3 mL of 40 % methanol. It was then eluted with 2 mL of methanol and T3, T4 were determined by liquid chromatography-mass spectrometry(HPLC/MS).

The repeatability of this method was obtained with a CV value within 5%. After 24 h, the amounts of T3 and T4 in the HPLC/MS solution obtained by the SPE method and the ethyl acetate extract method were 95 % and 50 %, respectively. The proposed method was simple, rapid, and allowed a satisfactory clean-up.

**Keywords** : 甲状腺ホルモン Thyroid hormone , トリヨードチロニン 3,3',5-Triiodo-L-thyronine , チロキシン DL-thyroxine , 固相抽出 solid phase extraction, HLBカートリッジ HLB , 健康食品 dietary supplements , 高速液体クロマトグラフィー/質量分析計 HPLC/MS

#### 緒 言

医薬品としての甲状腺ホルモン類は、食用獣の甲状腺を乾燥、粉末とした甲状腺末で、甲状腺機能障害の治療を目的として使用されている。しかしこの甲状腺ホルモンの副作用の一つである痩身効果を利用して、ダイエットを目的とする健康食品に添加する違反事例が、平成 13 年 4 月から宮崎県、兵庫県等<sup>1-3)</sup> で相次いで報告された。その後平成 14 年夏には中国製ダイエット用健康食品による大きな健康被害が起き、東京都でもこの健康食品からフェンフルラミン、N-ニトロソフェンフルラミンと共に甲状腺末を検出した<sup>4,5)</sup>。

甲状腺末中の 3,4,3'-トリヨード-L-チロニン(以下 T3 と略す)及び L-チロキシン(以下 T4 と略す)は、タンパク質と結合したサイログロブリン型トリヨードチロニン(以下 Thyro-T3 と略す)及びサイログロブリン型チロキシン(以下 Thyro-T4 と略す)として存在し、このままでは通常の方法で直接分析することはできない。このため USP24 (The United States Pharmacopeia 24th) に記載されている試験法<sup>6)</sup> は、酵素による加水分解を行い、遊離型 T3 及び T4 とし、これを酢酸エチルで抽出後、高速液体クロマトグラフィーにより分析している。また小坂等<sup>7)</sup> は、この方法を健康食品に応用し高速液体クロマトグラフィー/質量分析計(以下 HPLC/MS と略す)で測定する方法を報告している。

これらの方法は酵素反応後、抽出、濃縮などの過程を経るため繁雑であり、試料によっては夾雑物により HPLC/MS 試料中の T3, T4 が減少する傾向がみられた。さらに HPLC/MS 試料としては、精製が不十分なため装置を必要以上に汚染する可能性があった。

そこで、酢酸エチルによる抽出に替えて、固相抽出(以下 SPE と略す)用カートリッジを用い、抽出及びクリーンアップ法を検討したところ、良好な結果が得られた。本報では、固相抽出用カートリッジを使用するために検討した抽出条件、HPLC/MS 試料溶液の安定性さらに試験法のバラツキ、回収率等についての検討結果を報告する。

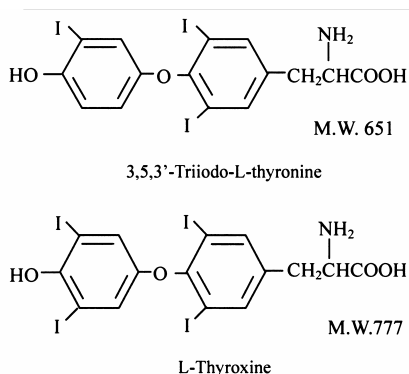


Fig.1. Chemical Structures of 3,5,3'-Triiodo-L-thyronine and L-Thyroxine

\* 東京都健康安全研究センター 医薬品部医薬品研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

\*\* 東京都健康安全研究センター環境保健部

## 実験方法

## 1. 試料

東京都内で販売されていたダイエットを標榜する中国製健康食品を試料とした<sup>5)</sup>。

## 2. 試薬

トリヨードチロニン (3,3',5'-Triiodo-L-thyronine, SIGMA 社), チロキシン(DL-thyroxine, SIGMA 社)は, アンモニア水(25%)を2%含有するメタノール溶液に溶解して使用した。サイログロブリン型 T3, T4 として日本薬局方乾燥甲状腺チラーゲン末(帝国臓器製薬(株))を用いた。

プロナーゼ 80 mg/40 mmol トリス塩酸緩衝液(pH8.4): トリスヒドロキシメチルアミノメタン 2.42 g, 塩化ナトリウム 13.21 g を水 450 mL に溶かし, 2 mol/L 塩酸または 0.1 mol/L 水酸化ナトリウムで pH8.4 ± 0.05 に調整後, 水で 500 mL とした。この緩衝液 5 mL にプロナーゼ(約 70,000 U/g, CALBIOCHEM 社) 80 mg を溶解し, 用時必要量を調製した。また 0.5 mol/L 2-メルカプト-1-メチylimidazole (ナカライテスク社) は, 571mg を水 10mL に溶かし, 用時必要量を調製した。

酵素反応停止液として, リン酸 1 mL をアセトニトリル 100 mL に混和し使用した。

SPE用カートリッジは, 塩基性のサンプルにも対応可能なポリマー充填剤を使用した Oasis HLB (3mL, Waters 社)を用いた。まずメタノール 3 mL で処理し, 次いで水 5 mL でコンディショニングした後使用した。

## 3. HPLC/MS 装置及び測定条件

HPLC 装置: Waters 2690, カラム; L-column (1.5 × 150 mm), カラム温度; 40, 流速; 0.2 mL/min, 注入量; 1 µL, 移動相; メタノール: 水: 酢酸(500:550:3)

MS 装置: Waters ZMD4000, イオン化法; ESI(positive), コーン電圧; 60 eV, ソースブロック温度; 150, デソルベーション温度; 300

検出イオンの選択は T3: [M+H]<sup>+</sup> = 652, T4: [M+H]<sup>+</sup> = 778 とした。

なお Fig.2 のクロマトグラム(SIM)に示したように HPLC から MS への導入はスイッチングバルブを利用し, T3 は 5分~8分, T4 は 12分~15分とした。

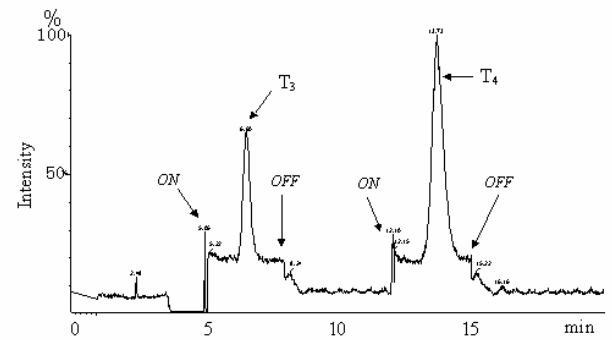


Fig.2. LC/MS Chromatogram (SIM) of T3 and T4 in Sample (On and Off indicate change in the switching valve)

## 4. 試験溶液の調製

1) 遊離型 T3, T4 として, アンモニア水(25%)を2%含有するメタノール溶液にトリヨードチロニンおよびチロキシンを溶解した。溶解後, Fig.3 に示したようにアンモニアアルカリ性で抽出した。その上澄液を SPE 用カートリッジに負荷し, 1 mol/L 酢酸 3 mL で中和後, 40% メタノール 3 mL で洗浄し, さらにメタノール 2 mL で溶出した。

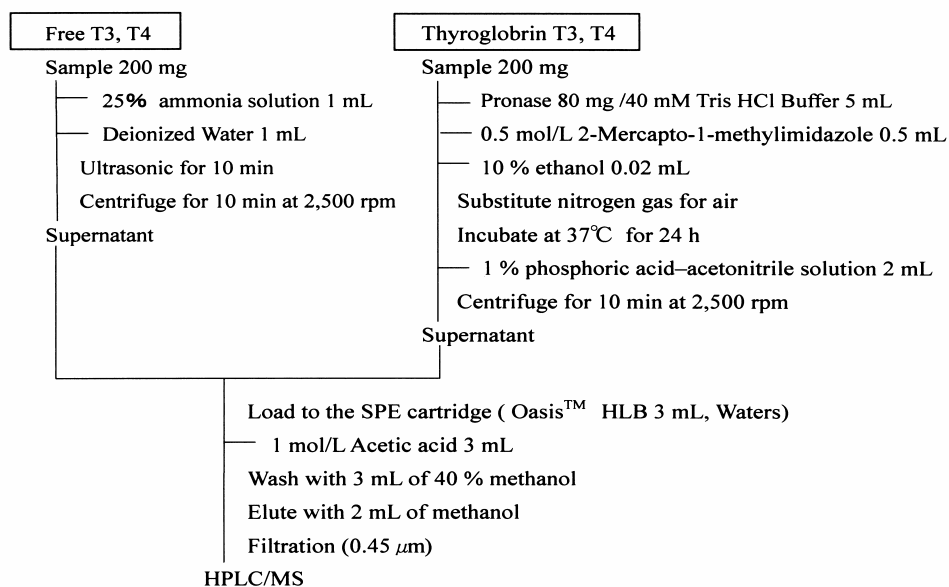


Fig.3. Preparation Method for Free T3, Free T4, Thyroglobin T3 and Thyroglobin T4 using SPE (solid-phase extraction) Cartridge

2) サイログロブリン型 T3, T4 として, 乾燥甲状腺チラーゼ末を使用し, Fig.3 に示したように酵素反応による加水分解を行い, 遊離型 T3, T4 を測定した.

3) 酢酸エチル抽出法は, 小坂等の方法<sup>1)</sup>に準じた. 酢酸緩衝液 20 mL を加えた後, 酢酸エチル 20 mL, 10 mL で 2 回抽出, 酢酸エチル層を留去後, アンモニア水(25%)を 2%含有するメタノール溶液 1 mL に溶解後, 0.45  $\mu$ m メンブランフィルターでろ過を行い HPLC/MS 試料溶液とした.

### 結果及び考察

#### 1. 洗浄溶媒メタノールの濃度及び液量の検討

T3, T4 はアルカリ可溶性のため試料となる中国製ダイエット用健康食品からの抽出には, Fig.3 に記載したようにアンモニア水(25%)を使用した. アルカリ性では, 洗浄液中に T3, T4 が溶出するため, カートリッジに負荷後, 1 mol/L 酢酸で中和した. Thyro-T3, T4 は酵素反応後カートリッジに負荷するため中和の必要はないが, 統一した操作を行うため, ここでは同様に 1 mol/L 酢酸を加えた. なお, この酢酸添加の有無が, 洗浄及び溶出に影響しないことは添加実験により確認した.

次に, 洗浄液のメタノール濃度を 30~80% に変えて保持に及ぼす影響を検討した. その結果 Fig.4 に示したように, 40%メタノール 5 mL で洗浄した場合には, 2.2%とわずかに T3 が溶出したが, 3 mL ではほぼ全量保持したため, 洗浄は 40%メタノールで行った. また液量は, 洗浄効果と操作の利便性を考え併せてカートリッジ容量の 3 mL とした.

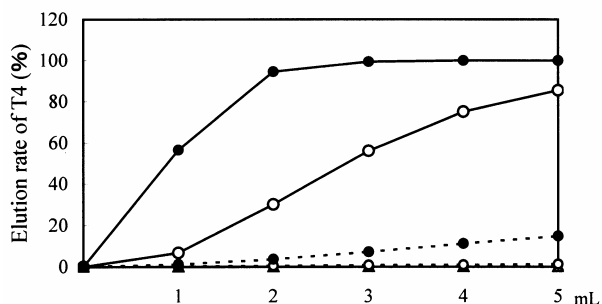
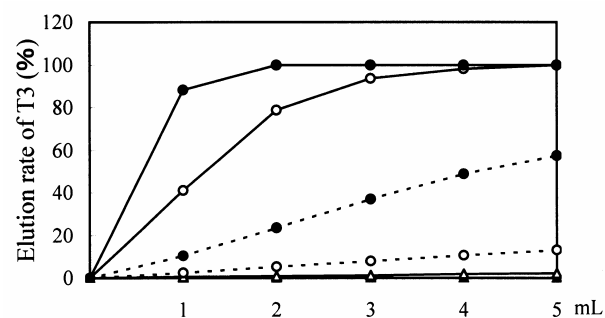


Fig.4. Effect of Methanol Concentration for Wash on the Elution of T3 and T4 from SPE cartridge

—●— 30% methanol —▲— 40% methanol - - ○ - - 50% methanol  
- - ● - - 60% methanol —○— 70% methanol —●— 80% methanol

#### 2. 溶出溶媒メタノールの液量の検討

T3, T4 はメタノールに可溶であることから, メタノールを溶出溶媒に選択し, T3, T4 を完全に溶出させる最小量を求めた. メタノール量を 3 mL まで, 1 mL ずつ分取したところ, T3 では最初の 1 mL で 97.5% 続いて 2.2%, 0.3% が溶出した. T4 の溶出も同様に, 97.0%, 2.7%, 0.4% であった. 以上より検出感度も考慮し, 溶出液量を 2 mL とした.

#### 3. 固相抽出用カートリッジにおける回収率

T3 5.3  $\mu$ g, T4 5.1  $\mu$ g を Fig.3 の遊離型 T3 と T4 の試験法に準じて操作し, 回収率を求めたところ, T3 で 97%, T4 で 98% と良好であった. しかし, 中国製ダイエット用健康食品 5 種に, T3 5.3  $\mu$ g, T4 5.1  $\mu$ g を添加した場合の回収率は Table 1 に示したように, T3 は 51~88%, T4 は 55~86% と回収率は低く, そのバラツキも大きかった. T3, T4 は, ろ紙あるいは脱水に用いる無水硫酸ナトリウムなどへも吸着することから, このバラツキの一因として試料中の夾雑物等への吸着が考えられた.

Table 1. Recovery (%) in Samples Spiked with T3 and T4 Processed by SPE method

Sample	T3	T4
T3:5.3 $\mu$ g, T4:5.1 $\mu$ g	97	98
Sample 1 + T3:5.3 $\mu$ g, T4:5.1 $\mu$ g	51	55
Sample 2 + "	88	86
Sample 3 + "	82	84
Sample 4 + "	82	83
Sample 5 + "	74	60

#### 4. SPE 法と酢酸エチル抽出法における再現性の比較

SPE 法と酢酸エチル抽出法の再現性を比較するために, 中国製ダイエット用健康食品 1.6 g で酵素反応を行った後, 上澄液を 8 本に分け, SPE 及び酢酸エチル抽出を行った. その結果 Table 2 に示したように, SPE の変動係数は, Thyro-T3: 3.0%, Thyro-T4: 1.9% とバラツキが小さく

Table 2. Reproducibility of Peak Area of T3 and T4 in Sample Processed by SPE or Ethyl Acetate Extract

Sample	T3		T4	
	SPE	Ethyl acetate extract	SPE	Ethyl acetate extract
1	25500	26700	95600	70000
2	27300	24500	97500	67800
3	26300	23300	93300	64600
4	25800	20900	94200	59100
Mean	26230	23850	95200	65380
SD	790	2420	1830	4730
CV(%)	3.0	10.1	1.9	7.2

再現性は良好であった。一方、酢酸エチルによる抽出の変動係数は、Thyro-T3: 10.1%, Thyro-T4: 7.2%とバラツキが大きかった。さらに Thyro-T4 における両法の Peak Area の平均値を比較すると 酢酸エチル抽出の Peak Area は SPE 法の 70%程度であり、酢酸エチル抽出過程における T4 の損失が認められた。

#### 5. HPLC/MS 試料溶液中 T3, T4 の安定性

前節で使用した HPLC/MS 試料溶液を、室温で7日間保存した時の T3, T4 の残存率を Fig.5 に示した。抽出直後の測定値を 100%とすると、SPE 法では 24 時間後 T3, T4 とともに 95%であり、2 日目は 70%を示し、以後 7 日目までほとんど変化は認められなかった。酢酸エチル抽出法では、24 時間後の残存率が 50%程度となり、7 日目では T3 及び T4 を検出することはできなかった。経時的に分解あるいは夾雑物により吸着されること等が推測されるが、酢酸エチル抽出法に比べ、SPE 法ではクリーンアップが十分に行われ、夾雑物の影響は少ないと思われた。

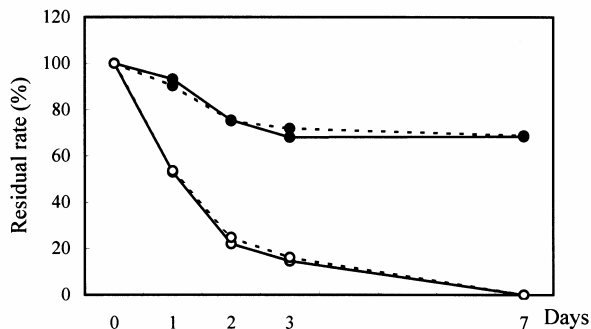


Fig.5. Stability of T3, T4 in LC/MS solution

Prepared by SPE or Ethyl Acetate Extract

●—● T3:SPE      ○—○ T3:Ethyl Acetate extract  
 ●- - ● T4:SPE      ○- - ○ T4:Ethyl Acetate extract

Samanidou 等の報告<sup>7)</sup>によると、ヒト生体液中の甲状腺ホルモンを SPE でクリーンアップ後、分析した場合の回収率は 95%である。しかし、健康食品では夾雑物が多く、また試料ごとにマトリクスが異なるため、固相抽出過程での回収率が低い場合がある。さらに、酵素反応において完全にサイログロブリン型 T3, T4 の加水分解が行われ、遊離型になっているという確証が得られていない。よって我々は本法により、健康食品中の甲状腺ホルモンの定性試験のみを実施するのが適切であると考え。加えて判定を確かなものとするために甲状腺組織の顕微鏡による確認試験<sup>8)</sup>を同時に実施している。

これまで我々は、種々のダイエット用健康食品約 100 検

体における甲状腺ホルモンの定性試験に、本法を使用してきた。SPE 用カートリッジに負荷後試料が詰まり、洗浄、溶出ができなかった幾つかの試料では、酢酸エチル抽出法で実施した。このように一部の試料には適用できないが、本法は HPLC/MS 試料溶液中の T3, T4 の安定性の保持、作業時間の短縮、さらに充分なクリーンアップによる HPLC/MS への負荷の軽減と共に測定感度を向上させていると考えている。

#### ま と め

健康食品中の甲状腺ホルモンである 3,4,3'-トリヨード-L-チロニンおよび L-チロキシンは、タンパク質と結合しているものが大半であり、その分析法は酵素反応、抽出、濃縮などの過程を経るため複雑であり、また HPLC/MS 試料溶液が不安定であるなど、いくつかの問題点を伴っているのが現状である。

そこで今回、固相抽出用カートリッジを用いたクリーンアップ法を検討した。本法により分析した際の T3, T4 の変動係数は 5%以内であり、その再現性は良好であった。また、酵素処理後酢酸エチルで抽出する方法では、試料によっては HPLC/MS 試料溶液の測定値が 1 日後で半減したが、固相抽出を行った試料溶液では 1 週間後でも 70%前後であった。固相抽出用カートリッジによる前処理を行うことで、HPLC/MS 試料溶液の安定性を保つことができた。さらに、クリーンアップ効果を高め機器への負荷を軽減することから、本法は簡便かつ有用な方法であると考えている。

#### 文 献

- 1) 小坂妙子, 浜田洋彦: 食衛誌, **43**, 225-229, 2002
- 2) 吉岡直樹, 市橋啓子, 寺西 清: 兵庫県立健康環境科学研究所年報, **1**, 124-129, 2002
- 3) 石橋 博: 佐賀県衛生薬業センター所報, **27**, 73-78, 2002
- 4) 守安貴子: 都薬雑誌, **24**, 44-48, 2002
- 5) 守安貴子, 岸本清子, 中嶋順一, 他: 東京健安研七 年 報, **54**, 69-73, 2003
- 6) *The United States Pharmacopeia* 24<sup>th</sup>, 1655-1656, 2000, United States Pharmacopeial Convention Inc.
- 7) Samanidou V F, Gika H G, Papadoyannis IN: *J. Liq. Chromatogrelat Technol.*, **23**, 681-692, 2000
- 8) 坂本義光, 他: 東京健安研七 年 報, **54**, 78-80, 2003