

4) 医薬品成分 (メラトニン及び 5-HTP) の分析方法の検討について

島 絵里子 八木一真* 中原優子

はじめに

近年、インターネットの普及により、多くの人々が多種多様ないわゆる「健康食品」と呼ばれるものを簡単に入手できるようになった。いわゆる「健康食品」は、病気や体の不調を治療するものではないが、医薬品のような効能効果を求めて購入する人もいると思われる。しかし、いわゆる「健康食品」から、含有が認められていない医薬品成分が検出される事例があり、これらに起因する健康被害の発生が懸念されている。

このような中、当所では、国民病とも言われる身近な不眠症²⁾に着目し、海外ではサプリメントとして販売されているが、国内では医薬品に区分され、さらに、国内流通の事例がある成分である^{3),4)}、メラトニン及び 5-ヒドロキシ-L-トリプトファン (以下「5-HTP」という。) を分析対象として、分析方法を検討し、良好な結果が得られたので報告する。

分析方法

1. 試薬等

1.1 標準品

メラトニン (生化学用) は富士フィルム和光純薬 (株) 製、5-HTP は東京化成工業 (株) 製を用いた。

1.2 その他試薬等

メタノール (HPLC 用)、アセトニトリル (HPLC 用)、ギ酸 (LC/MS 用)、酢酸アンモニウム (特級) は富士フィルム和光純薬 (株) 製を用いた。

1.3 標準溶液等の調製

標準原液は、各標準品を 1000 µg/mL となるようメタノールで調製した。標準溶液は、各標準原液を 5, 10, 25, 50, 75 及び 100 µg/mL となるようメタノールで適宜希釈した。

1.4 検討用試料

乳糖水和物 (結晶) 「NikP」 (日医工)100 mg に添加量 1.5 mg となるよう、アセトン 1.5 mL に溶解させたメラトニン標準溶液を添加し、窒素気流下で乾固したものを検討用試料とした。また、5-HTP については、アセトンに溶解しなかったため、添加量 3 mg となるようメタノール 3 mL に溶解させた標準溶液を添加した。なお、添加量は、現在海外で販売されているサプリメントの表示含有量を参考に決定した。

2. LC-PDA 及び LC-MS/MS の測定条件

メラトニン及び 5-HTP を一度に分析できるよう、グラジエント条件を設定し、LC-PDA にて 210~400 nm 範囲で測定したところ、ジーエルサイエンス (株) の技術情報⁵⁾のとおり極大吸収波長が 280 nm 付近であったため、表 1 の LC 条件を決定し、波長 280 nm での定量分析を行った。

MS/MS の測定条件については、メラトニンについては 10 ng/mL、5-HTP については 10 µg/mL を使い、インフュージョン分析によって最適条件を得て (表 3)、LC-MS/MS により定性分析を行った (表 1)。

表 1 LC-MS/MS 測定条件

LC 部	ACQUITY UPLC H-Class Plus (Waters社製)
Analytical Column	Asahipak NH2P-50 4D (4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 µm, Shodex)
Temperature	50°C
Mobile Phase	A液 : 0.1%ギ酸, 10 mM酢酸アンモニウム含有95%アセトニトリル B液 : 0.1%ギ酸, 10 mM酢酸アンモニウム水溶液
Gradient	表2参照
Flow Rate	表2参照
Injection Volume	10 µL (PDA) , 2 µL (MS/MS)
MS/MS 部	Xevo TQ-XS (Waters社製)
Capillary Voltage	0.5 kV
Source Temperature	150°C
Desolvation Temperature	500°C
Cone Gas Flow	150 L/hr
Desolvation Gas Flow	1000 L/hr
Ionization	ESI (positive)
MRM	表3参照

*現県立こころの医療センター

表2 グラジエント条件

時間 (分)	流速 (mL/min)	A液 (%)	B液 (%)
0	0.5	100	0
3	0.5	100	0
3.1	1	100	0
8	1	0	100
13	1	0	100
13.1	0.5	100	0
23	0.5	100	0

表3 MS/MS条件

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone Voltage (V)	Collision Energy (V)
メラトニン	233.1	174.0	18	14
		115.1	18	34
		130.3	18	40
		143.0	18	28
		159.0	18	28
5-HTP	221.1	162.0	20	16
		106.1	20	30
		115.9	20	32
		134.0	20	24
		158.8	20	28

3. 試験溶液調製

検討用試料 100 mg にメタノール 10 mL を加え、10 分間振とうし、10 分間超音波抽出後、3,000 rpm で5分間遠心分離し、上清をガラスろうと (11G2) でろ過した。沈殿物に同じ操作を繰り返し、ろ液を、メラトニンにあつては 50 mL、5-HTP にあつては 100 mL に定容して抽出液とし、0.2 μm のシリンジフィルター (Agilent Technologies 社, 非水系) に通し、試験溶液とした。分析フローは図1のとおり。

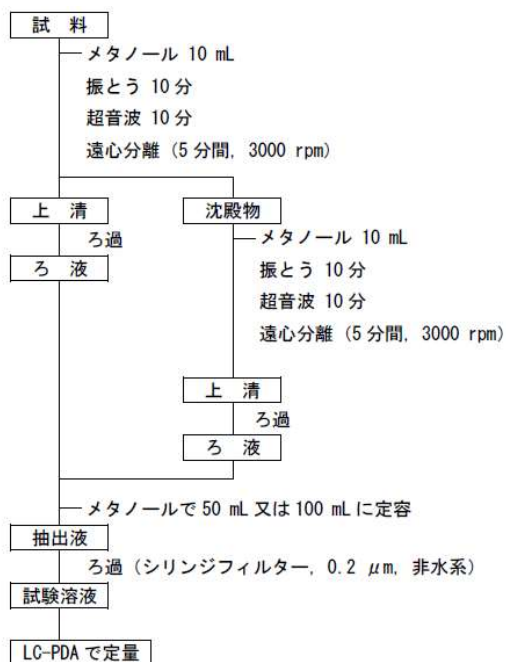


図1 分析フロー

結果

定量分析では、メラトニンは 3.3 分に、5-HTP は 7.4 分にピークを確認できた (図2)。また、5~100 μg/mL の濃度範囲で測定を行い、検量線を作成したところ、相関係数 0.9999 以上と良好な直線性を示した (図3)。

添加回収試験では、両成分とも回収率 97%以上の良好な回収率が得られた。

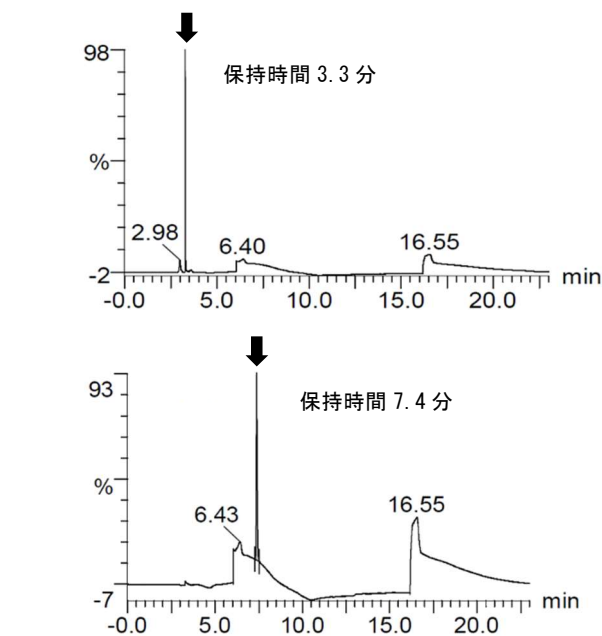


図2 クロマトグラム
(上段:メラトニン, 下段:5-HTP)

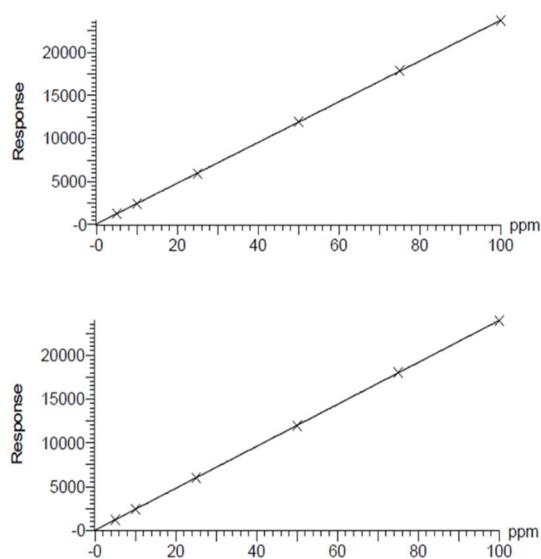


図3 検量線
(上段:メラトニン, 下段:5-HTP)

ま と め

これらの結果から、メラトニン及び 5-HTP の分析方法を確立するという当初の目標は達成できた。両成分は、海外において、カプセル、タブレット又はグミなど様々な形状で販売されているため、これら製品の均質化後に、本分析法で定量することは十分可能だと考えられる。

文 献

- 1) 厚生労働省：「無承認無許可医薬品等買上調査」の結果について。
https://www.mhlw.go.jp/stf/kinkyu/diet/musyounin_00007.html (2023 年 8 月閲覧)。
- 2) 厚生労働省：e-ヘルスネット，不眠症。
<https://www.e-healthnet.mhlw.go.jp/information/heart/k-02-001.html> (2023 年 8 月閲覧)。
- 3) 長谷川貴志，石井俊靖，西條雅明，高橋市長，永田知子：千葉県衛研年報，56，52-54 (2007)。
- 4) 西條雅明，石井俊靖，長谷川貴志，高橋市長，永田知子：千葉県衛研年報，56，55-59 (2007)。
- 5) GL Sciences：技術情報，トリプトファン代謝物の分析。
https://www.gls.co.jp/technique/app/detail.php?data_number=LB493 (2023 年 8 月閲覧)。