

ノート

甲状腺末中の遊離ヨウ素および甲状腺ホルモンの含有量調査

竹内 浩, 佐藤 誠, 原 有紀, 志村恭子

Determination of 3,3',5-Triiodo-L-thyronine, L-Thyroxine and Iodine in Dried Thyroid and Health Foods

Hiroshi TAKEUCHI, Makoto SATO, Yuki HARA and Kyoko SHIMURA

乾燥甲状腺は3,3',5-トリヨードチロニン (T3) とチロキシシン (T4) を含有し, 生体の基礎代謝を高める作用があるため, その粉末は甲状腺機能低下症等の治療薬として用いられる。しかし, 乾燥甲状腺末は“やせ薬”として乱用されるようになり, 甲状腺機能亢進症と似た症状の報告がなされるようになった。乾燥甲状腺は動物の甲状腺全体から調製されることからロット間で遊離ヨウ素, T3 および T4 の含有量のバラツキが想定される。そこで本研究では, 日本薬局方に記載されていない乾燥甲状腺末中の T3 および T4 についての分析法を開発し, 乾燥甲状腺中の遊離ヨウ素については日本薬局方の定量法で, T3 および T4 は開発した分析法を用いて含有量調査を実施した。供試した乾燥甲状腺の遊離ヨウ素は, 0.309%で第十五改正日本薬局方の規格基準を満たしていた。T3 は 289 $\mu\text{g/g}$, T4 は 1,280 $\mu\text{g/g}$ であり T4 は T3 の約 4.5 倍高い含量であった。いわゆる健康食品に乾燥甲状腺末を添加した添加回収実験では, ミニカラム精製の有無にかかわらず T3 と T4 は約 77%の回収率であった。

キーワード: 甲状腺末, 3,3',5-トリヨードチロニン, チロキシシン, 遊離ヨウ素, 高速液体クロマトグラフィー

はじめに

乾燥甲状腺は, 第十五改正日本薬局方では食用獣 (ウシ, ブタ, ヒツジ) の新鮮な甲状腺をとり, 脂肪等を除き, 粉末状に乾燥したもの, またはこれに適当な賦形剤を加えたものと定められている。乾燥甲状腺内の 3,3',5-トリヨードチロニン (T3) およびチロキシシン (T4) はタンパク質と結合してチログロブリンの形で胞内に貯蔵されている。チログロブリンはタンパク分解酵素の作用によって分解され, T3 および T4 が血中に遊離し, ホルモン作用を呈する。そのため, 乾燥甲状腺は生体の基礎代謝を高める作用があり, 粘液水腫, クレチン症, 甲状腺機能低下症, 甲状腺腫等の治療薬として用いられる。

乾燥甲状腺は 1965 年頃から本来の使用法ではない“やせ薬”として乱用されるようになり¹⁾,

平成 12~14 年にはダイエット用健康食品²⁾に混入され, 全国的に甲状腺機能亢進症の健康被害が多数発生し, 近年でも健康被害の疑い事例が散発的に発生している³⁻⁵⁾。

甲状腺末を過剰摂取すると, 頻脈, 心悸亢進, 肝機能障害, 無月経, 精神不安定などの甲状腺機能亢進症と似た症状が現れることから, 甲状腺末による健康被害は大きな問題となっている。

そこで本研究では, 甲状腺の遊離ヨウ素含有量を第十五改正日本薬局方医薬品各条「乾燥甲状腺」の定量法で, 甲状腺ホルモン (T3 および T4) を高速液体クロマトグラフィーでそれぞれ定量した。甲状腺末が混入された健康食品については, 妨害成分が存在するため, 固相抽出を用いて精製する方法を検討したので以下に報告する。

実験方法

1. 試料

乾燥甲状腺末はあすか製薬(株)製チラージン末 12 ロットを用いた。

いわゆる健康食品には、瘦身効果等を標榜する製品 A を用いた。

2. 試薬

1) 甲状腺ホルモン

3, 3', 5-トリヨードチロニンナトリウムおよびチロキシナトリウム 5 水和物は SIGMA-Aldrich 製を用いた。

2) 有機溶媒

アセトニトリルは和光純薬工業(株)製高速液体クロマトグラフィー用, メタノールは関東化学(株)製高速液体クロマトグラフィー用を用いた。

3) その他の試薬

28%アンモニア水, 臭素, 炭酸カリウム, フェノール, ヨウ化カリウム, リン酸および Tris(hydroxymethyl)aminomethane は和光純薬工業(株)製特級, でんぷんは同社製一級, 0.01mol/L チオ硫酸ナトリウム液は同社製容量分析用, PRONASE® Protase, *Streptomyces griseus* は Calbiochem 製, 2-Mercapto-1-methylimidazole は SIGMA 製を用いた。

酵素緩衝液は 0.11mol/L 塩化ナトリウム, 0.04mol/L Tris(hydroxymethyl)aminomethane および 0.05mol/L 2-Mercapto-1-methylimidazole を 6mol/L 塩酸で, pH8.4±0.05 に調整し冷暗所に保存した。

Pronase 溶液は PRONASE® Protease 90mg を秤量し, 酵素緩衝液を加え 30mL としたものを用時調製した。

臭素溶液は臭素 3mL をとり, 冷水 100mL を加えて調製した。

デンプン溶液はデンプン 1g を冷水 10mL とよく混ぜ, これを熱湯 200mL 中に絶えずかき混ぜながら徐々に注ぎ込み, 液が半透明になるまで煮沸し, 放置した後, 上澄液を採取した。

フェノール溶液はフェノール 1mL をとり, 水を加えて 20mL とした。

リン酸水溶液はリン酸と水を等量混合して調製した。

ヨウ化カリウム溶液はヨウ化カリウム 16.5g を秤量し, 水を加えて 100mL とした。

4) 固相抽出ミニカラム

Varian 製の Bond Elut C18 カートリッジ (500mg, 3mL) を用いた。

3. 標準溶液

T3 および T4 標準溶液 : 3, 3', 5-トリヨードチロニンナトリウム 10.3mg, チロキシナトリウム

5 水和物 11.4mg を正確に秤量し, 2%アンモニア水-メタノールを加えて 100mL とした (T3 および T4 として 100μg/mL)。

4. 装置および測定条件

1) マッフル炉

ヤマト科学(株) FM-31 型

2) 振とう器

(株)井内盛栄堂 SB-20 型

3) PDA-HPLC

液体クロマトグラフ : (株)島津製作所製 LC-10AD_{VP}

フォトダイオードアレイ検出器 : 同社製 SPD-M10A

カラム : GL サイエンス社製 Inertsil ODS-3 (4.6mm i.d.×150mm, 5μm)

カラム槽温度 : 40°C

移動相 : 水/メタノール/リン酸混液 (50:50:1)

流速 : 1.2mL/min

検出波長 : 230nm

試料注入量 : 10μL

4) LC/MS

液体クロマトグラフ/質量分析計 : Hewlett-Packard 社製 HP-1100MSD 型

カラム : GL サイエンス社製 Inertsil ODS-3 (2.1mm i.d.×150mm, 5μm)

カラム槽温度 : 40°C

移動相 : 水/アセトニトリル/酢酸混液 (136:64:1)

流速 : 0.2mL/min

試料注入量 : 5μL

イオン化法 : ESI

フラグメンター電圧 : 90V

モニターイオン (m/z) : T3 651.7, T4 777.7

5. 実験操作

1) 乾燥甲状腺末中の遊離ヨウ素含量

第十五改正日本薬局方医薬品各条「乾燥甲状腺」の定量法に従って実施した。

乾燥甲状腺末 1g を精密に秤量し, るつぼに入れ, 炭酸カリウム 7g を加えてよく混ぜ, るつぼを台上で静かにたたいて内容物を密にした。これを 600~700°C で, 25 分間強熱した。室温で放冷後, 水 20mL を加え, 穏やかに煮沸した後, ろ紙 (ADVANTEC 社製 No.5C) でろ過した。残留物に再び水 20mL を加えて煮沸し, 再度ろ過した。次に, るつぼおよび漏斗上の残渣をろ液の全量が 200mL となるまで熱湯で洗い込んだ。この液に臭素溶液 7mL およびリン酸水溶液 40mL を徐々に加えた後, 発生するガスが水で潤したヨウ化カリウムでんぷん紙を青変しなくなるまで煮沸した。煮

沸後容器を水で洗い、さらに5分間煮沸を続けた。煮沸時に水を補い、液量が少なくとも200mLを保つようにした。室温で放冷後、フェノール溶液5mLを加え、再び容器を水で洗い込み、5分間放置した。次いで、リン酸水溶液2mLおよびヨウ化カリウム溶液5mLを加え、直ちに遊離したヨウ素を0.01mol/Lチオ硫酸ナトリウム液で滴定した（指示薬：デンプン溶液3mL）。同様の方法で空試験を行った。

(0.01mol/Lチオ硫酸ナトリウム液1mL=0.2115mg I)

2) 乾燥甲状腺末中の T3 および T4 含量

森田らの方法⁶⁾に従って実施した。

乾燥甲状腺末20mgを10mL容の試験管に秤量し、Pronase溶液3mLを加え、窒素ガスを約1分間吹き付けた。試験管を遮光し、37°Cで18~20時間、時々振り混ぜながら加水分解した。反応終了後のPronase溶液を遠心分離(3,000rpm, 10分間)後、水層を採取し、残渣にメタノール1mLを加え振とうした。遠心分離(3,000rpm, 10分間)後、メタノール層を採取し水層と合一し、2%アンモニア水-メタノールを加えて5mLとした。本溶液を高速液体クロマトグラフィーで測定し定量値を求めた。

3) 甲状腺末を含有するいわゆる健康食品中の T3 および T4 含量 (添加回収実験)

森田らの方法⁶⁾に従って実施した。

健康食品0.2gを10mL容の試験管に秤量し、まずメタノール8mLで30分間2回、次いで、水/メタノール(1:1, v/v)8mLで15分間2回振とう洗浄した。遠心分離(3,000rpm, 10分間)で各洗浄液を除去後、残渣にPronase溶液3mLを加え、窒素ガスを約1分間吹き付けた。試験管を遮光し、37°Cで18~20時間、時々振り混ぜながら加水分解した。Pronase水解物を遠心分離(3,000rpm, 10分間)後、水層を採取した。残渣は2%アンモニア水-メタノール2mLを加え2回振とう抽出した。2%アンモニア水-メタノール抽出液を窒素ガス中40~50°Cで0.8mL以下に濃縮後、水層と合一し、メタノールを加えて4mLとした。

HPLCで妨害成分がある場合は、ミニカラムによる妨害物除去のため以下の前処理を追加した。試料抽出液2mLを採取し、水を加えて5mLに希釈した。これをメタノール2mL、水2mLを順次流しコンディショニングしたBond Elut C18カートリッジに負荷し、T3およびT4を保持させた後、水2mLおよび水/メタノール(8:2, v/v)4mLで洗浄した。2%アンモニア水-メタノール3mLを流しT3およびT4を溶出した(初液5~6滴は捨てる)。溶出液は窒素ガス気流下40~50°Cで1mL以下まで濃縮後、2%アンモニア水-メタノールを

加えて1mLにし試料溶液とした。

添加回収実験では、市販されている製品AにT3およびT4が2μg/gとなるように甲状腺末を添加し、高速液体クロマトグラフィーで定量した。

さらに、HPLCでT3およびT4と思われるピークについてLC/MSで確認をした。

結果および考察

1. 実態調査および回収率

1) 乾燥甲状腺末中の遊離ヨウ素含量

乾燥甲状腺末12ロットの遊離ヨウ素含量を測定した結果、平均値0.309% (0.305~0.313%)で第十五改正日本薬局方の規格0.30~0.35%に入っており、変動係数は0.89%とバラツキが小さいことも分かった(表1)。

表1 乾燥甲状腺末中の遊離ヨウ素含量

試料No.	遊離ヨウ素含量(%)	試料No.	遊離ヨウ素含量(%)
1	0.306	7	0.309
2	0.305	8	0.310
3	0.305	9	0.311
4	0.307	10	0.311
5	0.309	11	0.313
6	0.311	12	0.312

2) 乾燥甲状腺末中の T3 および T4 含量

乾燥甲状腺末12ロットのT3およびT4含量を測定した結果、T3は平均値289μg/g(275~305μg/g)、T4は平均値1,280μg/g(1,120~1,410μg/g)であった(表2)。チラージン末の医薬品インタビューフォームではT4/T3含有比が3~5と一定でないと記載されているが、今回の調査ではT4/T3含有比は平均値4.43(4.00~4.69)変動係数は3.95%と大きなバラツキは確認できなかった。

表2 乾燥甲状腺末中の T3 および T4 含量

試料No.	T3 (μg/g)	T4 (μg/g)	T4/T3
1	280	1,120	4.00
2	275	1,290	4.69
3	295	1,320	4.47
4	290	1,290	4.45
5	285	1,260	4.42
6	298	1,330	4.46
7	298	1,290	4.33
8	283	1,240	4.38
9	275	1,210	4.40
10	278	1,210	4.35
11	305	1,410	4.62
12	303	1,390	4.59

3) 乾燥甲状腺末を含有するいわゆる健康食品中の T3 および T4 添加回収実験

T3 および T4 添加回収実験では、今回用いた試料では、T3 と T4 は妨害成分と良好に分離でき HPLC での定量が可能であった。この時の回収率は T3 77.2%、T4 78.2%であった。今回は、ミニカラム精製が必要でなかったが、ミニカラムでの損失を評価するためにミニカラムの追加精製を行った。この時の回収率は T3 77.6%、T4 76.2%でありミニカラム精製による損失はなかった。また、HPLC で T3 および T4 と疑われるピークが検出された場合の確認方法として LC/MS の分析条件を整備した。

HPLC 法と LC/MS 法の定量限界値は T3、T4 ともに 2.0 μ g/g であった。

まとめ

乾燥甲状腺末中の遊離ヨウ素含量を測定した結果、0.305～0.313%で変動係数は 0.89%とロットによるバラツキが小さいことが分かった。また乾燥甲状腺末中の T3 と T4 の含量を測定した結果、T3 が 275～305 μ g/g、T4 が 1120～1410 μ g/g で T4 は T3 の約 4.5 倍多く含有されることがわかった。今回測定したサンプルの T4/T3 含有比は平均 4.43、変動係数は 3.95%であり、想定していたほどロット間で大きなバラツキは認められなかった。いわゆる健康食品に乾燥甲状腺末を添加した T3 および T4 の添加回収実験では、T3 および T4 は妨害成分と良好に分離でき HPLC での定量が可能であった。この時の回収率は T3 77.2%、T4 78.2%であった。今回は、ミニカラム精製が必要でなかったが、ミニカラムでの損失を評価するためにミ

ニカラムの追加精製を行った。この時の回収率は T3 77.6%、T4 76.2%でありミニカラム精製による損失はなかった。また、HPLC で T3 および T4 と疑われるピークが検出された場合の確認方法として LC/MS の分析条件を整備した。

HPLC 法と LC/MS 法の定量限界値は T3、T4 ともに 2.0 μ g/g であった。

文献

- 1) 日本薬局方解説書編集委員：第 15 改正日本薬局方解説書、(pp. C-1409)；東京：廣川書店、2006。
- 2) 厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課長通知“甲状腺末を含有する痩身用健康食品の監視指導について”平成 13 年 6 月 20 日、医薬監麻第 785 号(2001)
- 3) 熊本県健康福祉部健康局薬務衛生課報道資料：医薬品成分を含有する「ダイエット健康食品」について～販売授与が禁止された無承認無許可医薬品の発見～、平成 22 年 3 月 1 日
- 4) 東京都福祉保健局報道発表資料：「MD クリニックダイエット」と称される製品による死亡事例（疑い）の発生について、平成 23 年 7 月 7 日
- 5) 岡山市保健所衛生課医薬安全係発表資料：タイ製やせ薬による健康被害にご注意ください、平成 24 年 12 月 6 日
- 6) 森田邦正，毛利隆美，中川礼子：甲状腺末を含有する健康食品中の 3,3',5-トリヨードチロニン及びチロキシンの HPLC 分析法,福岡県保健環境研究所年報 **31**, 61-65(2004).