

ノート

強壮目的健康食品中の医薬品成分の一斉分析法の検討

原 有紀, 竹内 浩, 林 克弘, 志村恭子

Determination of Medicinal Compounds in Dietary Supplements with Suggestive Expression for Sexual Enhancement

Yuki HARA, Hiroshi TAKEUCHI, Katsuhiko HAYASHI and Kyoko SHIMURA

PDA-HPLCおよびLC/MS/MSを用いた強壮目的の医薬品7成分の一斉分析法について検討した。PDA-HPLC測定により保持時間および吸収スペクトル情報が、LC/MS/MS測定により保持時間およびMSスペクトル情報が得られたことから、検出時の定性的判断が可能となった。PDA-HPLCによる検量線は、7成分いずれも0.5~20 μ g/mLの範囲で良好な直線性を示した。試料100mgに対する検出限界は0.05mg/g、定量限界は0.2mg/gであった。試買した4製品(カプセル剤, 液剤, 粉剤, 錠剤)を用いて添加回収実験を行ったところ、回収率97.8~107.5%, 相対標準偏差はいずれも5%未満で良好な結果だった。本法を用いて試買した10製品の分析を行った結果、いずれの製品からも今回対象とした医薬品成分は検出されなかった。

キーワード: いわゆる健康食品, 無承認無許可医薬品, 強壮成分

はじめに

近年, セルフメディケーションの考え方が浸透し, 健康や美容に対する関心が高まるとともに, 多種多様な「いわゆる健康食品」がインターネットやドラッグストア等で手軽に購入できるようになった。しかし, これらの「いわゆる健康食品」の中には衛生管理や安全・品質管理が徹底されていない製品もあり, なかには健康に悪影響を及ぼす危険性のある製品もある。特に医薬品成分やその類似化合物が配合されている製品(無承認無許可医薬品等)の摘発事例が後を絶たず, 医薬品に匹敵する薬効や未知の生理活性(副作用)により重篤な健康被害が発生している事例がある¹⁾。このため, 健康被害の未然防止の観点から, 迅速で正確な無承認無許可医薬品等の試験法の開発及び検査体制の整備が求められている。

そこで, 今回健康被害発生時や違反発見時等における迅速な対応, 平時における行政検査への適用を目指し, 特に検出事例の多発している強壮成分を対象とした検査法の確立および検査体制の整備について, 以下の検討を行ったので, その詳細を報告する。

実験方法

1. 対象成分

本研究における対象成分は, 強壮目的の医薬品7成分(シルденаフィル, ホモシルденаフィル, ヒドロキシホモシルденаフィル, バルденаフィル, プソイドバルденаフィル, タダラフィル, アミノタダラフィル)とした。図1にそれぞれの構造式を示した。

2. 試料

平成23年度に, 三重県内の販売店で試買した14製品を用いた。

3. 試薬

シルденаフィルクエン酸塩は国立医薬品食品衛生研究所より分与されたものを用いた。ホモシルденаフィル, ヒドロキシホモシルденаフィル, バルденаフィル, プソイドバルденаフィル, タダ

表1 強壮7成分のLC/MS/MSパラメータ

強 壮 成 分	分子量	MRMトランジション	DP(V)	CE(V)
シルденаフィル	474.2	475.0/58.0	114	61
ホモシルденаフィル	488.2	489.0/72.0	123	78
ヒドロキシホモシルденаフィル	504.2	505.0/99.0	86	79
バルденаフィル	488.2	489.0/72.0	138	65
プソイドバルденаフィル	459.2	460.0/151.0	110	57
タダラフィル	389.1	390.0/268.0	90	15
アミノタダラフィル	389.1	391.0/269.0	80	17

ラフィルおよびアミノタダラフィルは関東化学(株)製標準試薬を用いた。

メタノールは関東化学(株)製高速液体クロマトグラフ用、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用を用いた。

4. 標準溶液

各標準品を適量採り、メタノールに溶解して1000µg/mLの各原標準溶液を調製した。必要に応じてさらにこれらをメタノールで段階的に希釈して用いた。

5. 装置及び測定条件

1) PDA-HPLC

液体クロマトグラフ：(株)島津製作所製 LC-20A
 検出器：同社製 SPD-M20A
 カラム：東ソー社製 TSK-GEL ODS-80Ts (4.6mm i.d.×150mm, 5µm)
 カラム槽温度：40°C
 移動相：A 液 水/アセトニトリル/リン酸混液 (900:100:1, 5mmol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム含有), B 液 水/アセトニトリル/リン酸混液(100:900:1, 5mmol/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：0min (A:B=90:10)→25min (A:B=55:45) →45min (A:B=10:90) →48-60min (A:B=90:10)

流速：1mL/min

測定波長：200-400nm (定量波長 220nm)

注入量：10µL

2) LC/MS/MS

装置：高速液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計

LC：(株)島津製作所製 Prominence UFLC

MS：ABSciex 社製 API4000QTRAP

カラム：(財)化学物質評価研究機構製 L-column2

ODS (2.1mm i.d.×150mm, 3µm), ガードカラム：

(財)化学物質評価研究機構製 L-column2 ODS

(2.0mm i.d.×50mm, 5µm)

カラム槽温度：40°C

移動相：A 液 0.1%ギ酸水溶液

B 液 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液

グラジエント条件：0min (A:B=80:20)→50-55min

(A:B=20:80) →58-65min (A:B=80:20)

流速：0.2mL/min

イオン化法：ESI(+)

イオンスプレー電圧：5500V

イオン源温度：400°C

注入量：5µL

なお、質量分析計の詳細なパラメータは、表1に示した。

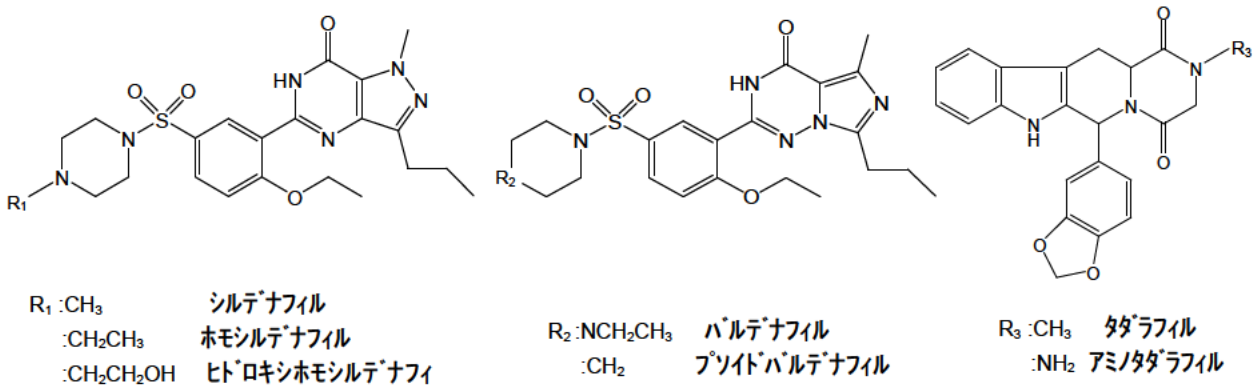


図1 強壮目的の医薬品成分の構造式

6. 試験溶液の調製法

製品の剤形が、散剤および液剤のものは混和し、そのまま供した。錠剤は、乳鉢を用いて磨砕し粉末にした。カプセル剤は、基剤と内容物に分け、内容物は混和した。

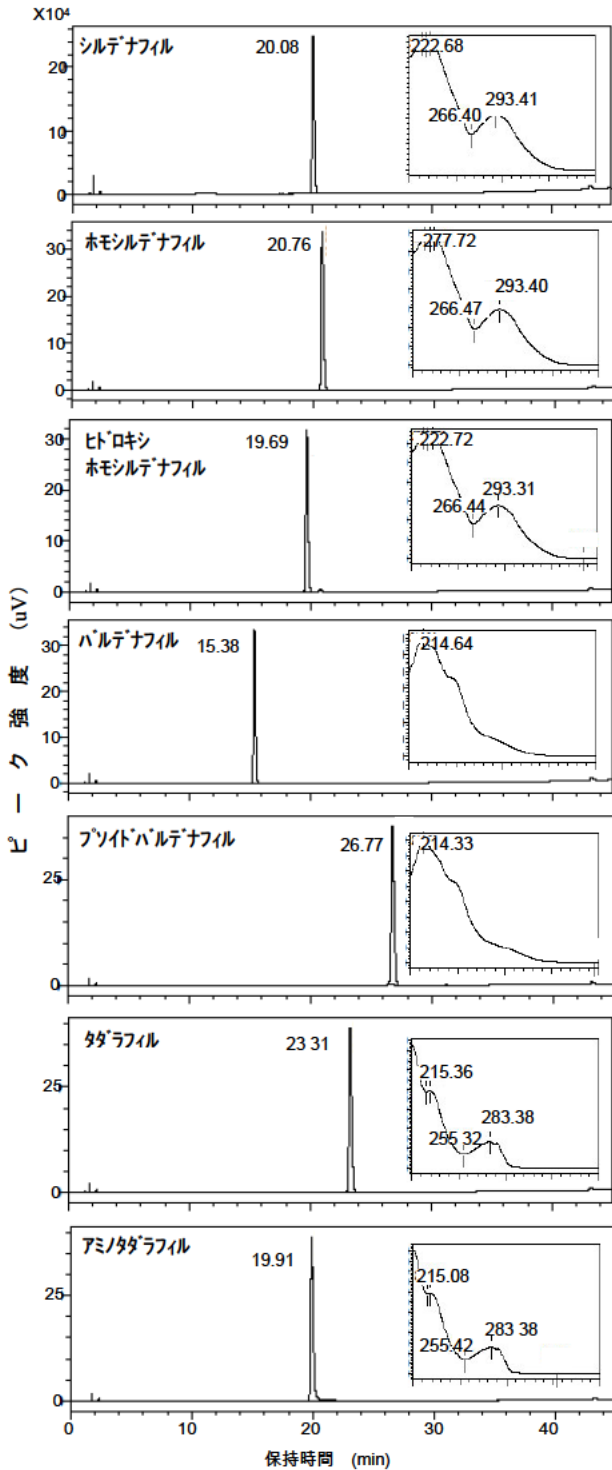


図2 強壮7成分のHPLCクロマトグラムおよび吸収スペクトルグラム

これらの試料100mgを採取し、70%メタノール10mLを加えて、15分間超音波抽出を行った。この溶液をメンブランフィルター(0.45 μ m)でろ過し、試験溶液とした。

カプセル基剤については、別途以下の方法で抽出した。試料約100mg(1カプセル分)に水3mLを加え、加温して基剤を溶解した。この水溶液にアセトニトリル7mLを加え、15分間超音波抽出を行った。この溶液をメンブランフィルター(0.45 μ m)でろ過し、試験溶液とした。

結果および考察

1. 測定条件の検討

1) PDA-HPLC

最も汎用性が高く、また定量を行う際に有用なPDA-HPLCを用いた測定条件について検討を行った。測定条件は、西條らの方法²⁾を参考にした。

7種の各標準溶液を測定し、保持時間および吸収スペクトル情報を収集した。その結果を表2および図2に示す。シルデナフィルおよびその類似

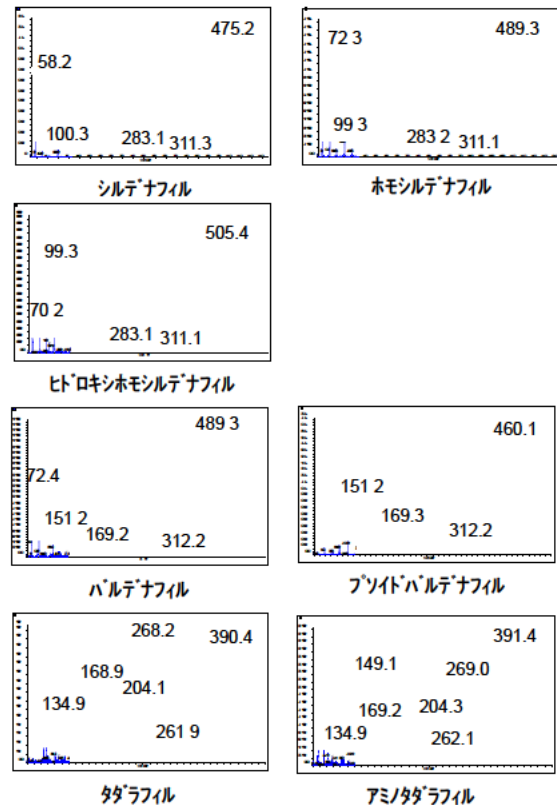


図3 強壮7成分のMSスペクトルグラム

表2 強壯7成分の保持時間, 検量線の直線性および検出限界, 定量限界

強 壯 成 分	保持時間 (min)	濃度範囲 ($\mu\text{g/mL}$)	相関係数	検出限界 (mg/g)	定量限界 (mg/g)
シルденаフィル	20.08	0.5-20	0.9999	0.05	0.2
ホモシルденаフィル	20.76	0.5-20	0.9999	0.05	0.2
ヒドロキシホモシルденаフィル	19.69	0.5-20	0.9999	0.05	0.2
バルденаフィル	15.38	0.5-20	0.9999	0.05	0.2
プソイドバルденаフィル	26.77	0.5-20	0.9999	0.05	0.2
タダラフィル	23.31	0.5-20	0.9999	0.05	0.2
アミノタダラフィル	19.91	0.5-20	0.9986	0.05	0.2

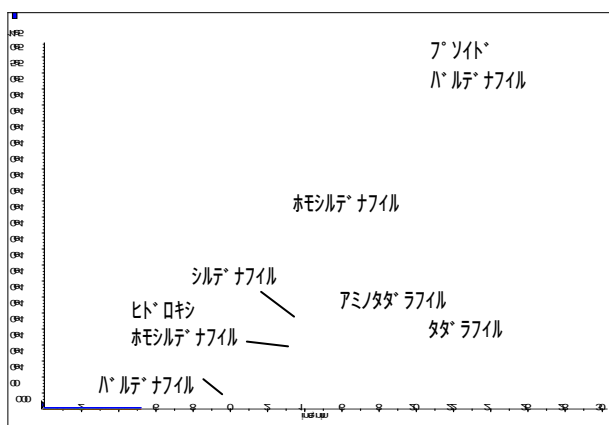


図4 7種強壯成分のLC/MS/MSクロマトグラム

成分は、保持時間が非常に近かった。また吸収スペクトルのパターンも非常に類似していて、どの成分かを特定するには、他の測定機器のデータと併せて判断する必要があると考えられた。同様に、タダラフィルとその類似成分、バルденаフィルとその類似成分も、吸収スペクトルはそれぞれ非常に類似していたが、保持時間は十分離れていて、良好に分離された。

2) LC/MS/MS

製品から検出のあった場合、PDA-HPLCとは異なる測定機器で確認を行う必要がある。そこで、選択性に優れ、確認試験に有用と考えられるLC/MS/MSを用いた測定条件について検討を行った。測定条件は、大嶋らの方法³⁾を参考にした。

最初にQ3スキャンモードで、各成分のMSスペクトル情報を収集した。その結果を図3に示す。いずれも[M+H]⁺で示される、Q1イオンからのフラグメンテーションパターンが観察された。ただしアミノタダラフィルについては、プロトンが2つ付加した[M+2H]²⁺の方が感度が高かったため、これをQ1イオンに設定した。

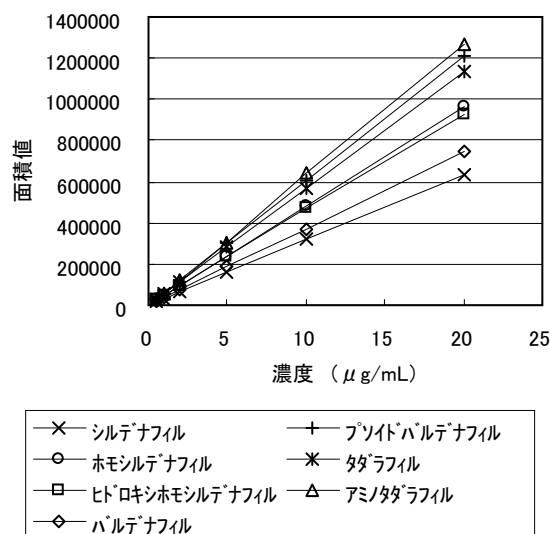


図5 強壯7成分の検量線

図1に示した測定対象成分の構造式からもわかるように、シルденаフィル、タダラフィル、バルденаフィルとそれぞれの類似成分は化学構造が非常に類似していることから、フラグメンテーションのパターンも各々類似していた。このMSスペクトル情報は、疑わしいピークが検出された際に定性的に判断する材料として非常に有用と考えられる。

次に、MSスペクトル情報を参考に強度の強いイオンをQ3イオンに選択し、各々MRMトランジションを設定した(表1参照)。測定条件に従って7種混合標準溶液を測定した結果を図4に示す。いずれの成分も良好に分離されていることが確認できた。LC/MS/MSは選択性が高く、夾雑ピークの影響が小さいことから、医薬品成分の有無を確認するスクリーニング検査として、非常に有用であると考えられた。

2. 検量線および検出限界, 定量限界の検討

製品からの検出の有無は、PDA-HPLC測定で

表3 各種製品への標準添加回収率

強 壯 成 分	回収率 (%)			
	カプセル剤	液 剤	粉 剤	錠 剤
シルデナフィル	113.9 ± 0.89	104.6 ± 0.26	106.7 ± 0.40	107.5 ± 0.83
ホモシルデナフィル	101.1 ± 1.65	101.8 ± 0.20	103.2 ± 0.53	103.9 ± 1.01
ヒドロキシホモシルデナフィル	103.1 ± 1.02	101.3 ± 0.32	103.1 ± 0.58	103.5 ± 1.18
バルデナフィル	101.3 ± 2.21	102.4 ± 0.58	105.2 ± 0.72	105.5 ± 0.96
プソイドバルデナフィル	102.4 ± 0.88	101.8 ± 0.49	99.0 ± 3.85	105.1 ± 0.39
タダラフィル	106.3 ± 0.26	101.0 ± 0.38	102.3 ± 0.74	104.4 ± 0.89
アミノタダラフィル	99.7 ± 1.03	100.9 ± 0.14	97.8 ± 3.22	103.6 ± 0.71

データは平均値±SDを表す (n=5)

の保持時間および吸収スペクトル, LC/MS/MS 測定での保持時間および各Q1 イオンのQ3 スキャンによる MS スペクトルから総合的に判断することとなる。その結果, 強壯成分の検出と判断された場合には PDA-HPLC で定量を行うため, 検量線および検出限界, 定量限界については PDA-HPLC を用いて検討することとした。

7 種の医薬品成分の検量線の直線性を確認した。0.5~20µg/mL の濃度範囲で測定を行い, 検量線を作成したところ, 表 2 および図 5 に示すとおり良好な直線性を示した。

検出限界をクロマトグラム上の S/N 比 3 とすると標準溶液濃度 0.5µg/mL であり, 試料中濃度に換算すると 0.05mg/g であった。同様に定量限界をクロマトグラム上の S/N 比 10 とすると標準溶液濃度 2µg/mL で, 試料中濃度に換算すると 0.2mg/g であった。

3. 添加回収実験

いわゆる健康食品には, 様々な剤形のもの製造販売されている。今回, より多様な剤形に対応できるように, カプセル剤, 液剤, 粉剤, 錠剤の 4 種類の試買した製品を用いた。

添加濃度については, 次のように考察した。シルデナフィルの用法用量は, 1 日 1 回 50~100mg で, 25mg に減量しても可とされている。そこで 25mg の 10 分の 1 量にあたる, 2.5mg を定量することを目指し, 添加濃度は 1mg/g (試験溶液あたり 10µg/mL) とした。(今回使用する上記の 4 種類の製品の摂取量は, それぞれ 1 回 2 カプセル (720mg), 1 本 (30mL), 1 回 2 さじ (2g), 1 回 7 粒 (270mg/粒×7 粒=1.89g))

添加回収実験は, 100µg/mL の各標準溶液 1mL を添加して抽出を行い, PDA-HPLC 測定を行った。その結果を表 3 に示す。回収率は, カプセル剤で 99.7~113.9%, 液剤で 100.9~104.6%, 粉剤で 97.8~106.7%, 錠剤で 103.5~107.5% であった。相対標準偏差はいずれも 5% 未満で, 安定したデータが得られた。

この結果から, 様々な剤形の製品でこの方法が適用可能であると判断された。

4. 市販品の実態調査

本法を用いて, 試買した 10 製品の分析を行った (カプセル剤 2 製品, 液剤 4 製品, 錠剤 3 製品, ゼリータイプ 1 製品)。その結果, いずれの製品からも今回対象とした医薬品成分は検出されなかった。

まとめ

いわゆる健康食品中医薬品成分 (強壯目的 7 成分) の分析法を検討し, 以下の結果を得た。

1. PDA-HPLC を用いて強壯目的 7 成分を測定し, 保持時間, 吸収スペクトル情報を, LC/MS/MS を用いて Q3 スキャンによる MS スペクトル情報, MRM による保持時間情報を得た。
2. PDA-HPLC による検量線は, 医薬品 7 成分のいずれも 0.5~20µg/mL の範囲で良好な直線性を示した。
3. 試料 100mg に対する検出限界は 0.05mg/g, 定量限界は 0.2mg/g であった。
4. 試買した 4 製品 (カプセル剤, 液剤, 粉剤, 錠剤) を用いて添加回収実験を行ったところ, 回収率 97.8~113.9%, 相対標準偏差はいずれも 5% 未満で良好な結果だった。
5. 本法を用いて試買した 10 製品の分析を行った結果, いずれの製品からも今回対象とした医薬品成分は検出されなかった。

今回, 強壯目的の医薬品 7 成分についての分析法を確立することができた。本法は健康危機発生時のみならず, 平時の行政検査として有効なものと考えられる。

文 献

- 1) 厚生労働省ホームページ, 健康被害情報・無承認無許可医薬品情報, <http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/musyouni.html>.

- 2) 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, 千葉県衛生研究所年報, No.55, 74-78(2006) .
- 3) 大嶋智子, 宮本伊織, 山口之彦: 健康食品

中の強壯, ダイエット, 催眠および血糖降下薬に関連する医薬品 15 成分の液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計 (LC/MS/MS)による一斉分析法の検討, 日本食品化学学会誌, **17**, 171-178(2010).