

Original

薄層クロマトグラフィーを活用した 医薬品成分を含有する健康食品の分析

熊坂謙一*、松阪綾子、麻生順子、宮澤眞紀、土井佳代、小島尚

Practical Use of a Thin-layer Chromatography as a Screening analysis for Active Drug Ingredients in Dietary Supplements

Kenichi Kumasaka*, Ayako Matsuzaka, Yoriko Aso, Maki Miyazawa, Kayo Doi, and Takashi Kojima

Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, 1-3-1 Shimomachiya, Chigasaki, Kanagawa 253-0087, Japan

Received for review December 28, 2006. Accepted February 5, 2007

Abstract

Active drug ingredients for erectile dysfunction (ED) treatment in dietary supplements for sexual enhancement were determined. Ingredients in the products were extracted by methanol for preparation of the test solutions. The solutions were analyzed with an HPTLC plate to screen and narrow down the candidate active drug ingredients. A reversed phase HPLC equipped photodiode array detector analysis was then performed to ascertain the retention time and UV spectrum of the detected peaks from the test solutions and the tested drug ingredients. An LC/MS/MS analysis was used for final identification of drug ingredients in the test solutions. These results suggested that the examined three products contained tadalafil. In addition, one of these products also contained vardenafil. Moreover, quantitative analysis of the drug ingredients was also performed by an HPLC analysis. Our consecutive analyses showed that screening analysis with a TLC analysis had some advantages to make the analyses efficient.

Keywords : dietary supplement, tadalafil, vardenafil, erectile dysfunction

緒言

健康への意識の高まりとともに、様々な「いわゆる健康食品」がインターネットなどで流通している。しかし、その中の一部の製品では、標榜した作用を強めるために医薬品成分

が添加されている場合があり、服用による健康被害も発生している。その事例は、厚生労働省のホームページ「健康被害情報・無承認無許可医薬品情報」に詳細に報告されている[1]。最近の事例では、N-ニトロソ-フェニフルラミン、乾燥

神奈川県衛生研究所理化学部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋 1-3-1
TEL : 0467-83-4400
FAX : 0467-83-4457
E-mail : kumasaka.z3aa@pref.kanagawa.jp

***To whom correspondence should be addressed :** Chemistry Division, Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, Shimomachiya 1-3-1, Chigasaki, Kanagawa 253-0087, Japan
Tel : +81-467-83-4400
Fax : +81-467-83-4457
E-mail : kumasaka.z3aa@pref.kanagawa.jp

甲状腺等が添加されたダイエット用健康食品により、重篤な健康被害が発生して大きな社会問題となった[1,2]。また、血糖降下を謳った製品からグリベンクラミドが検出された事例[3]、強壮強精作用を謳った製品よりバイアグラの有効成分であるシルデナフィルが検出された事例[4]などがある。これらの製品は「食品」として流通しており、有効性、安全性の審査を踏まえて承認・許可を受けた「医薬品」ではない。また、外装、成分表示などには医薬品成分の含有については表示されておらず、外観からは医薬品成分の添加の有無を判断することはできない。そのため、消費者の健康被害を防止するためには、市場に流通するいわゆる健康食品について医薬品成分添加の有無を検査することが重要となる。

我々もこのような製品について試験検査を実施しているが、製品に添加される医薬品成分は製品ごとによって異なっているという実情がある。そのため、様々な医薬品成分の添加の可能性を想定しながら手探りで分析することになるが、根拠なく多種多様な医薬品成分を対象に分析することは、試験検査の効率性が問題となる。また、特定の成分を対象にした分析法では、対象外の成分を見落とす可能性があり、試験検査の信頼性が問題となる場合がある。このような問題点を解決するためには、まず、効率的に医薬品成分の有無を確認するスクリーニング試験を行うことが重要である。さらに、何らかの成分が検出された場合には、既存医薬品成分との類似性、化学構造などに関する情報を得て、効率的に検出成分を推定し、最終的な同定手段である質量分析法などに結びつける必要がある。

そこで本稿では、勃起不全(ED)治療薬成分が検出された強壮強精用の健康食品の分析事例において、高速液体クロマトグラフ(HPLC)法、液体クロマトグラフ-質量分析(LC/MS/MS)法による確認・同定分析に先立ち、添加医薬品成分のスクリーニング法として薄層クロマトグラフ(TLC)法を活用した事例報告する。本事例においてTLC法を活用した結果、HPLC法およびLC/MS/MS法分析における対象成分を絞り込む際に有効であると考えられた。

実験

1. 試薬

タダラフィルおよびバルデナフィル標準品として、厚生労働省より分与されたタダラフィルおよびバルデナフィル塩酸塩3水和物標準品を使用した。シルデナフィル標準品はファイザー株式会社より分与されたクエン酸シルデナフィル標準品を使用した。メチルテストステロンおよび塩酸ヨヒンビン は和光純薬製を標準品として使用した。また、アセトニトリルはHPLC用アセトニトリル(和光純薬、大阪)を用い、その他の試薬、試液は和光純薬製の特級を使用した。

2. 標準溶液の調製

TLC法、HPLC法、およびLC/MS/MS法による分析のため、各標準品を試験法に応じてメタノールに溶解して標準溶液を

調製した。その濃度は、TLC法では1.0 mg/mL、HPLC法では0.01 mg/mL、また、LC/MS/MS法では1.0 µg/mLとした。なお、定量に使用した標準溶液は別に調製した。

3. 試料溶液の調製

分析を行った3製品A、B、Cのうち、A、Cはカプセルであり、Bは錠剤であった。そのため、カプセル製品からは内容物を取り出し、また、錠剤は乳鉢で粉末とした。それぞれ1カプセルまたは錠剤相当量の各粉末を遠沈管に量り、メタノール30 mLを加えて30分間振とうした後、遠心分離する。これらの上澄液を回収し、残渣にはさらにメタノールを18 mL加えて10分間振とうした後、遠心分離し上澄液を得る。上澄液は全て合わせてメタノールでそれぞれ正確に50 mLとし、よく混和した後、その5 mLをHPLC用およびLC/MS/MS用試料溶液とした。また、残りの45 mLは乾固したのち、メタノール4 mLに再溶解してTLC用試料溶液とした。

4. TLC法

試料溶液には、「2. 試料溶液の調製」にて作成したTLC用試料溶液を用いた。薄層板は蛍光剤入りHPTLC pre-coated silica gel 60 F₂₅₄(メルク株式会社、東京)を使用した。また、展開溶媒にはクロロホルム/メタノール混液(9:1)を用いて、標準溶液および試料溶液とも各2 µL(バルデナフィル標準溶液のみ1 µL)を薄層板原点にのせ、展開溶媒を満たしたチャンバー内で十分に飽和させた後に、展開を開始した。約6 cm展開した後に薄層板を風乾し、成分スポットの検出は以下の～の条件で行った。検出条件:紫外線照射(主波長254 nm) 検出条件:薄層板に50%硫酸を噴霧し、105℃で5分間加熱して可視光下で確認する、検出条件:～に加えてさらに紫外線(主波長366 nm)を照射する、とした。

5. HPLC法

試料溶液には「2. 試料溶液の調製」にて調製した液をメタノールで希釈して使用した。分析には、フォトダイオードアレイ(PDA)検出器を接続したHPLC(アライアンス2695-PDA検出器2996、日本ウォーターズ株式会社、東京)を使用した。PDA検出器の波長範囲は200-400 nmとし、モニター波長は220 nmとした。カラムにはODSカラム(Unison US C-18、4.6 mm ID × 150 mm、粒径5 µm、インタクト株式会社、京都)を使用し、移動相にはリン酸2水素ナトリウム二水和物7.75 gを水約950 mLに溶解し、薄めたリン酸でpH 3.0に調整し、水で1000 mLとした液(A)およびアセトニトリル(B)を用いて、A/B = 75/25混液を、直線勾配でアセトニトリルの濃度を増加させ、30分後にA/B = 50/50とするグラジエント送液を行った。なお、カラム温度は40℃、流量は1.0 mL/分とし、注入量は20 µLとした。

6. LC/MS/MS法

試料溶液は、「2. 試料溶液の調製」にて作製した液をメタノールで希釈して使用した。分析にはアジレント製1100シリーズHPLC(バイナリーポンプ)を接続した液体クロマト

グラフ・ハイブリッド型リニアイオントラップ質量分析計（Qtrap LC/MS/MSシステム、アプライドバイオシステムズジャパン、東京）を使用した。なお、HPLCによる分離は逆相分離条件で行った。カラムにはODSカラム（Cadenza CD-C 18、2.0 mm ID×150 mm、粒径3 µm、インタクト）を使用し、移動相には0.1%ギ酸水溶液（A）及び0.1%ギ酸アセトニトリル溶液（B）を使用し、そのA/B=70/30混液を5分間保持した後、0.1%ギ酸アセトニトリル溶液を直線勾配で15分間増加してA/B=40/60とし、さらに5分間保持するグラジェント送液を行った。なお、カラム温度は40℃、流量は0.2 mL/分とし、注入量は5 µLとした。イオンソースはESIとし、スキャンモードはEPI、極性はポジティブとした。また、タダラフィルのプリカーサーイオンはm/z：390、Q3の測定範囲はm/z：100-450、バルデナフィルのプリカーサーイオンはm/z：489、Q3の測定範囲はm/z：100-550、また、CE電圧は30 V（スプレッド15 V）とした。

7. 定量

定量は以下のHPLC条件により実施した。タダラフィルおよびバルデナフィル標準溶液はメタノールに溶解し、タダラフィルは2-20 µg/mL、バルデナフィルは0.5-2 µg/mLの範囲で希釈液を調製した。試料溶液は、製品A、Bでは1カプセル内容物または1錠の10分の1-20量の各粉末を精密に量り、Cは1個相当量の粉末を遠沈管にとり、「3. 試料溶液の調製」の項に準じて調製し、メタノールで希釈して測定した。HPLC分析条件は「5. HPLC法」に記載した条件を準用し、移動相をA/B=70/30混液のアイソクラティック条件で送液した。

結果

1. TLC法による探索的スクリーニング

本法は、同時に展開した標準溶液と試料溶液中の成分について、スポットのRf値、呈色反応などから、その類似性を一度に視覚的に確認することができる優れたスクリーニング法である。そこで、本分析においても第一スクリーニング法として使用した。なお、分析対象物質は、製品に含有する可能性がある医薬品成分を事前に特定することができないことから、ED治療薬成分であり、検出事例が多いシルデナフィル、バルデナフィル、タダラフィルのほか、メチルテストステロン、ヨヒンビンに对照とし、各標準溶液を調製した。

各標準溶液および試料溶液について分析したクロマトグラムを、Figure 1に示す。また、各標準溶液における検出条件～での検出状況をTable 1に示す。なお、検出条件は構造に共役系を有する成分の検出を目的としており、蛍光剤入りの薄層板を使用することにより、選択性は弱い多くの医薬品成分をスクリーニング的に検出することが可能である。また、検出条件、は主にステロイド系の医薬品成分、およびUV吸収が無い有機化合物の検出を目的としているが、過去の経験では医薬品成分によって特異的な色調、蛍

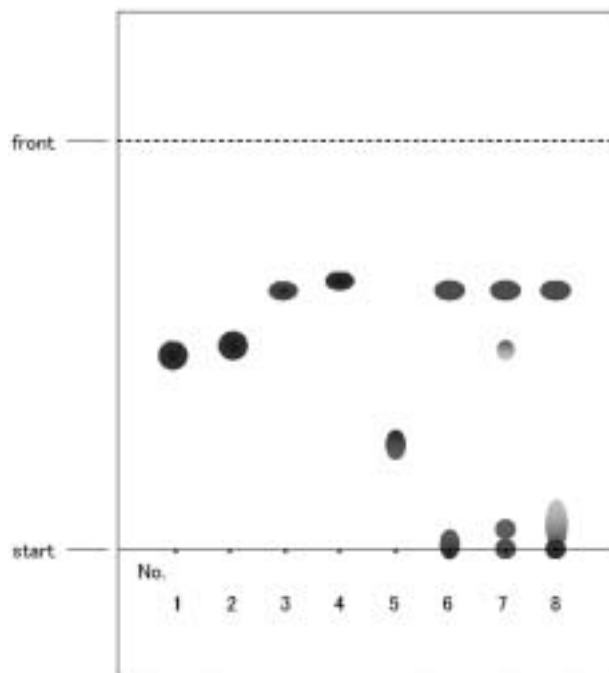


Figure 1. Thin-layer Chromatograms of Tested Drug Ingredients and Products

These spots were detected by UV irradiation at 254 nm. Spot No.1 : sildenafil, No.2 : vardenafil, No.3 : tadalafil, No.4 : methyltestosterone, No.5 : yohimbine, No.6 : product A, No.7 : product B, No.8 : product C.

Table 1 Each Rf value and Color of Detected Spots by the TLC Analysis

drug ingredients	Rf	detection		
sildenafil	0.50	○	nd.	blue
vardenafil	0.52	○	nd.	nd.
tadalafil	0.63	○	violet	○
methyltestosterone	0.65	○	yellow	yellow-green
yohimbine	0.27	○	nd.	blue

The HPTLC silica gel plate containing fluorescent indicator at 254 nm was developed by a mixture of chloroform and methanol (9 : 1). Detection : UV irradiation at 254 nm, : spraying 50% sulfuric acid following heated at 105℃, : spraying 50% sulfuric acid following heated at 105℃ and UV irradiation at 366 nm. [○] : spot detected (black or pale black spot), [nd.] : not detected. Colors in the table showed the color of the detected spot.

光を呈することがあり、検出の選択性を高めることが可能であった[3]。試料溶液では、検出条件により製品AではRf値0.63にスポットを検出し、このスポットは、各検出条件においてタダラフィルのスポットと同様の呈色を示した。製品Bでは、検出条件によりRf値0.63および0.51にスポットを検出した。このうち、Rf値0.63のスポットはタダラフィルのスポットと、また、Rf値0.51のスポットはバルデナフィルのスポットと、各検出条件においてそれぞれ同様の呈色を示し

た。製品Cでは検出条件によりRf値0.63にスポットを検出し、このスポットはタダラフィルと同様の呈色を示した。以上の結果は、製品A、B、Cにはタダラフィルを含有し、製品Bでは併せてバルデナフィルを含有する可能性を示唆しており、試料溶液中の医薬品成分を効率的に推定するために有効であった。

2. HPLC法による確認

TLC法により含有が推定されたタダラフィル、バルデナフィル、および検出事例が多いシルデナフィルを対象に、成分のピークの保持時間およびそのUVスペクトルを確認した。UVスペクトルは質量分析に比べ特異性が弱い、成分の構造に由来するものであり、検出された成分の確認手段の一つとして有効である。Figure 2(A)に示すとおり、標準溶液では、バルデナフィル、タダラフィルおよびシルデナフィルのピークは、それぞれ保持時間8.5分、16.1分、9.5分に検出された。また、各成分ピークのUVスペクトルは、バルデナフィルは215 nm付近に、タダラフィルでは284 nm付近に、シルデナフィルでは224 nmおよび295 nm付近に極大を持つ特徴的なUVスペクトルであった。一方、Figure 2(B)に示すとおり、製品Aにおいては、保持時間16.0分にピークを検出し、そのUVスペクトルはタダラフィルに一致した。製品Bでは保持時間8.5分にごく小さなピークを、また、16.0分にピークを検出した。各ピークのUVスペクトルは、それぞれバルデナフィル、タダラフィルに一致した。また、製品Cでは保持時間16.0分にピークを検出し、そのUVスペクトルはタダラフィルと一致した。以上の結果は、製品Aではタダラフィルを、製品Bではバルデナフィルおよびタダラフィルを、製品Cではタダラフィルをそれぞれ含有する可能性を示唆しており、TLC法を用いたスクリーニング試験の分析結果の妥当性を示すものと考えられる。

3. LC/MS/MS法による同定

TLC法およびHPLC法により、製品への添加が推定されたタダラフィルおよびバルデナフィルの標準溶液について、EPIスキャンにより分析した。標準溶液ではタダラフィルのピークは保持時間16.5分に検出され、バルデナフィルのピークは保持時間4.6分に検出され、それぞれ特徴的なマススペクトルを示した。一方、製品A、B、Cではプリカーサーイオン m/z : 390において保持時間16.5~16.6分付近にピークが検出され、その保持時間およびマススペクトルはタダラフィルと一致した。また、製品Bでは、プリカーサーイオン m/z : 489において保持時間4.6分にピークが検出され、その保持時間およびマススペクトルはバルデナフィルと一致した (Figure 3)。

以上の質量分析による結果は、TLC法、HPLC法により推定された結果と一致していた。即ち、製品A、B、Cには、ED治療薬として使用されている医薬品成分であるタダラフィルが添加されており、また、製品Bではバルデナフィルも添加されていることが判明した。

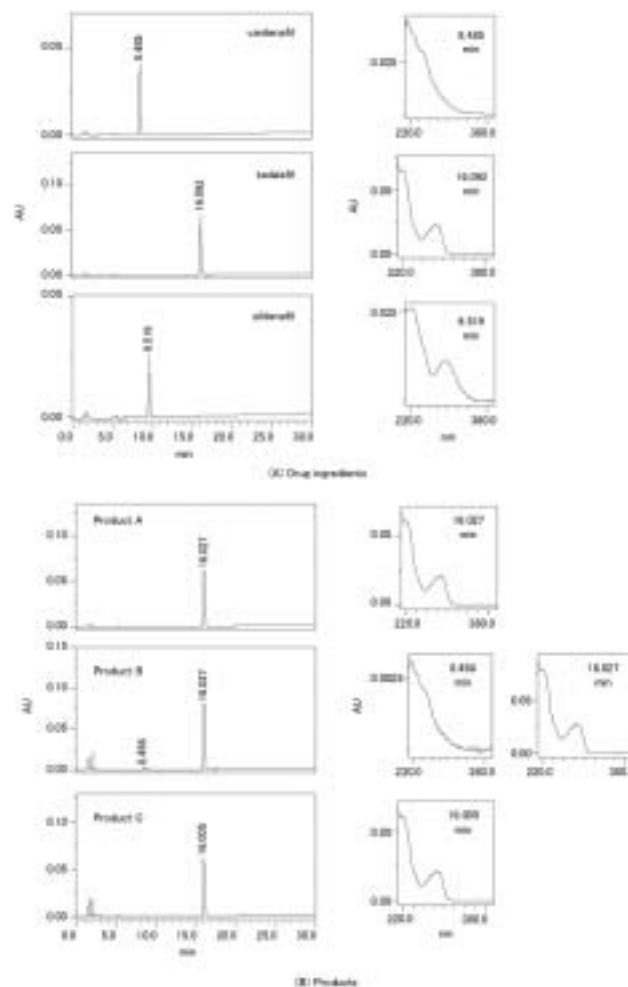


Figure 2. UV Chromatograms (left) and UV spectra (right) of tested Drug Ingredients (A) and Products (B)

4. 検出成分の定量

各製品につき3回試料溶液を調製して測定した結果、製品Aのタダラフィル含有量は35 mg/カプセル、製品Bのバルデナフィル、タダラフィル含有量はそれぞれ0.36 mg/錠、9.3 mg/錠、製品Cのタダラフィル含有量は7.0 mg/カプセルであった。なお、タダラフィルは国内未承認薬であるが、1回量が10~20 mgとされている。そのため、これら全ての製品において相当量のタダラフィルが添加されており、服用によって医薬品的な効果が発現する危険性がある。また、服用に伴う様々な副作用、他の医薬品との飲み合わせによる健康被害が発生する恐れもある。また、バルデナフィルの医薬品としての薬用量は、国内で承認されているレビトラ錠の添付文書によると1回量が5~10 mgとされている[5]。製品Bより検出されたバルデナフィルは薬用量と比較して含量が少ないことから、薬効を期待して添加されたものではなく、他製品の製造によるコンタミネーションが発生した可能性が考えられる。

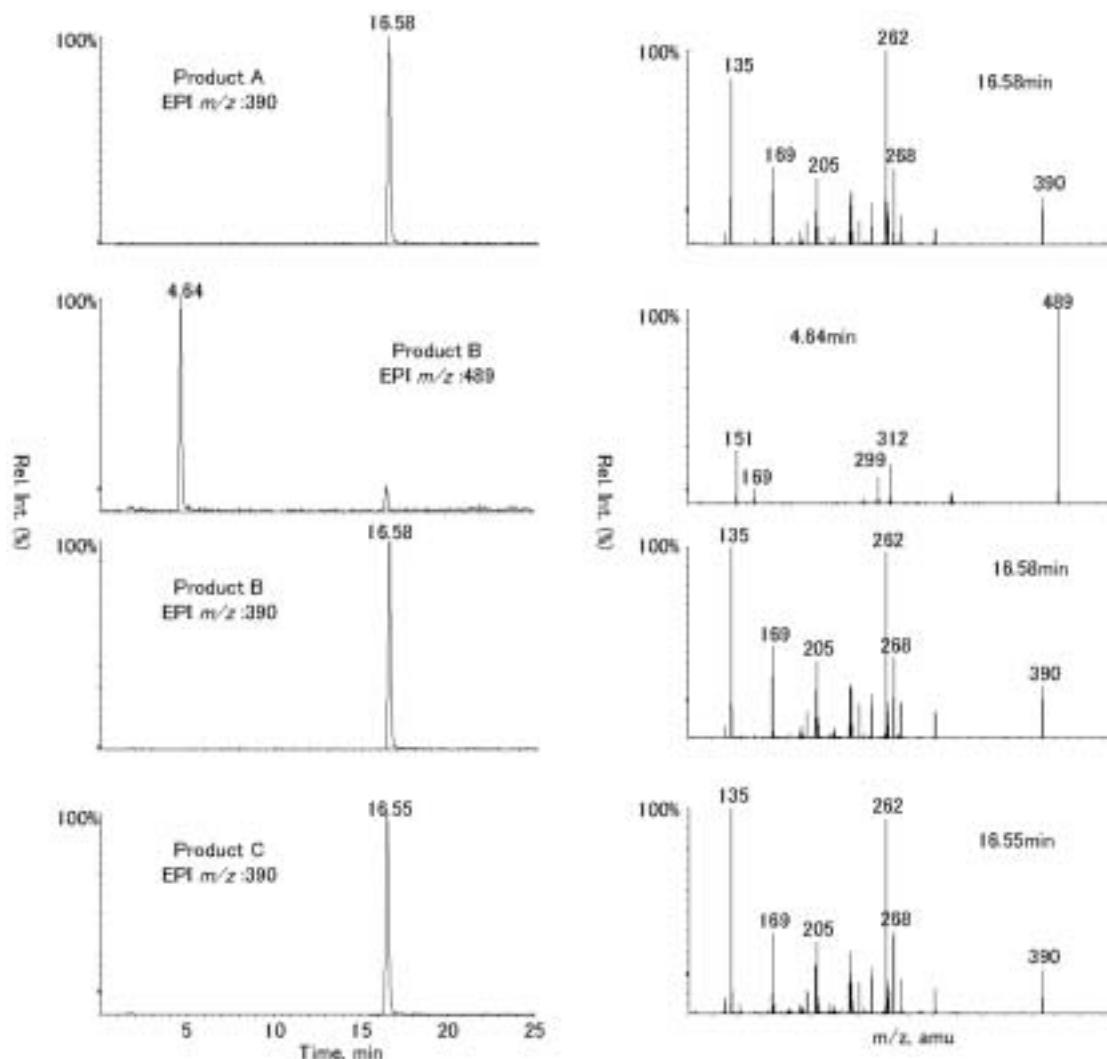


Figure 3. Total Ion Chromatograms of Each Tested Product (left) and the Mass Spectra of the Peaks detected from the products (right)

考察

本分析事例では、HPLC法、LC/MS/MS法に先立ち、添加された医薬品成分のスクリーニング法としてTLC法による分析を実施した。製品より検出された成分の同定のためには、HPLC法によるUVスペクトルの確認、LC/MS等によるマススペクトルの確認などの特異性が高い手法が必要となる。しかし、このような製品では、添加医薬品成分の有無、また、その成分が事前に特定されているわけではないことから、第一段階として効率的にスクリーニング分析を行うことが重要となる。TLC法は検出の感度、特異性、分離、定量性の面では他の手法に劣るが、試料溶液から検出された未知成分の挙動、および対照とした標準溶液との類似性について、1枚のTLC上で視覚的に捕らえることが可能であり、効率的に分析対象成分を推定することが可能であった。また、HPLCのように接続した検出器によって検出法を縛られることはなく、様々な検出試薬を使用することが可能である。今回の分析事例では、製品中のタダラフィルの含有について、TLC法によ

リスポットの特異的な呈色が見られたことから、その存在を容易に推定することが可能であった。また、製品Bでは、HPLCクロマトグラムではタダラフィルのピークと比較してバルデナフィルのピークがきわめて小さく、抽出された成分の概要をTLC法によって把握していなければ、ごく微量のバルデナフィルの含有は見落としていた可能性も考えられる。また、HPLC法のみをスクリーニング法として使用した場合は、カラムに保持しない成分、および溶出しにくい成分については検出が困難となるが、TLC法では、原点から展開先端までの成分を確認することができる。以上のことから、TLC法の活用が、いわゆる健康食品に添加された医薬品成分を分析する上で、その試験検査の効率性を確保し、信頼性を高めるために重要であると考えられた。

また、強壮強精を目的としたいわゆる健康食品では、最近、既存のED治療薬成分の構造を若干修飾した類似成分の検出事例が相次いでいる[6-8]。そのため、検出成分の最終的な同定のためには、質量分析計等の同定能力が高い分析が

不可欠である。しかし、このような類似成分では、骨格となった医薬品成分とは疎水性が大きく変化している可能性が懸念される。そのため、原点から展開溶媒先端まで一度に観察が可能であるTLC法を活用することは、その化学的性質の確な推定につながるものと考えられる。

市場に流通するいわゆる健康食品の製品数は膨大であり、添加された医薬品成分による健康被害を防止するためには、より効率的な試験検査の実施が重要である。今後の試験検査において、効率化のためにはTLC法の活用が有効になると考えられた。

謝辞

クエン酸シルデナフィルをご提供いただいた、ファイザー株式会社に深謝いたします。

文献

- [1] 健康被害情報・無承認無許可医薬品情報 厚生労働省
<http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet.html>
- [2] Moriyasu, T.; Kishimoto, K.; Nakajima, J.; Shigeoka,

- S.; Minowa, K.; Kamimura, H.; Yasuda, I. *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. P. H.* **2003**, 54, 69–73
- [3] Kumasaka, K.; Kijima, T.; Doi, K.; Satoh, S. *YAKUGAKU ZASSHI* **2003**, 123, 1049–1054
- [4] Moriyasu, T.; Shigeoka, S.; Kishimoto, K.; Ishikawa, F.; Nakajima, J.; Kamimura, H.; Yasuda, I. *YAKUGAKU ZASSHI* **2001**, 121, 765–769
- [5] 勃起不全治療剤「レビトラ錠 5 mg、10 mg」添付文書
バイエル薬品株式会社
- [6] Shin, M.-H.; Hong, M.-K.; Kim, W.-S.; Lee, Y.-J.; Jeoung, Y.-C. *Food Additives & Contaminants* **2003**, 20, 793–796
- [7] Blok-Tip, L.; Zomer, B.; Bakker, F.; Hartog, K. D.; Hamzink, M.; ten Hove, J.; Vredenburg, M.; de Kaste D. *Food Additives & Contaminants* **2004**, 21, 737–748
- [8] Moriyasu, T.; Shigeoka, S.; Minowa, K.; Kishimoto, K.; Yasuda, I. *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. P. H.* **2004**, 55, 73–77