

いわゆる健康食品中の医薬品成分分析において タダラフィル類似物質が検出された事例について

生活科学部

はじめに

十数年前から、強壮や痩身を標ぼうした「いわゆる健康食品」から医薬品成分又はそれに類似する構造や作用を持つ成分が検出されている。本市でも、平成26年度から強壮系のいわゆる健康食品について、保健所による店舗販売の買上げ調査を実施しているところであり、当所において医薬品成分の分析を行っている。このたび、検体からタダラフィル類似物質が検出される事例があり、ホモタダラフィル構造をもつ物質であることが確認されたので報告する。

方 法

1 検体(図1)

品名：HSA ゴールド

剤形：白色カプセルに白色粉末を含有

内容量：1箱中2カプセル

2 試料溶液の調製

検体1カプセルを開き、この中身及びカプセル基材を50ml 褐色遠沈管に移し、70%メタノール10mlを加えて15分間超音波抽出後、3000rpmで5分間遠心分離を行った。この上澄みを0.45 μ mメンブランフィルターでろ過したものを試料溶液とした。

3 分析試料の調製

(1) HPLC 法

試料溶液を下記5(1)に示す移動相A液で定性試験では10倍希釈、定量試験では20倍希釈した。



図1 検体外観

(2) LC-MS(Scan)及びLC-MS/MS法

試料溶液を0.1%ぎ酸水溶液で100倍希釈した。

(3) GC-MS(Scan)法

試料溶液0.1mlを採り、エバポレーターを用いて溶媒留去し、アセトン-ヘキサン(1:1)10mlを加え、0.20 μ mメンブランフィルターでろ過した。

4 標準溶液の調製

タダラフィル標準品及び2'-オキシタダラフィルは、Toronto Research Chemical社製を用い、メタノールで溶解して100mg/Lの溶液を調製した。ホモタダラフィルは、国立医薬品食品衛生研究所から研究用試薬としてメタノール溶液の供与を受けた。その後TLC Pharmaceutical Standard社製の標準品を入手し、メタノールで溶解して100mg/Lの溶液を調製した。これらの溶液を希釈して用いた。

メタノール及びヘキサンは、関東化学株式会社製の残留農薬試験用を使用した。アセトニトリルは、同社製HPLC用及びLCMS用を使用した。リン酸は和光純薬工業株式会社製HPLC用を使用した。

5 機器分析条件

(1) HPLC法(定性及び定量試験)

機器：Shimadzu Prominence/SPD-M20A

検出器：フォトダイオードアレイ検出器

(測定波長200~400nm, 検出波長220nm)

カラム：InertSustain Phenyl

(4.6 ϕ ×150mm, 3 μ m)

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相A液：

(水：アセトニトリル：リン酸=900：100：1)
+1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム5mmol

移動相B液：

(水：アセトニトリル：リン酸=100：900：1)
+1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム5mmol

グラジエント条件：

B液10%(0分)→45%(25分)→90%(37~42分)→10%(43~50分)

流速：0.5ml/分

試料注入量：20 μ l

(2) LC-MS(Scan)法

機器：AB SCIEX API-4000

カラム：XTerra Phenyl
(2.1φ×150mm, 3.5μm)

カラム温度：40℃

移動相 A 液：0.1% ぎ酸水溶液

移動相 B 液：0.1% ぎ酸アセトニトリル溶液

グラジエント条件：

B 液 10% (0 分)→45% (25 分)→90% (37~42 分)→10% (43~50 分)

流速：0.2ml/分

試料注入量：10μl

イオン化法：ESI

イオン化電圧：ポジティブ 5500eV

(3) GC-MS (Scan) 法

機器：Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra

カラム：DB-5MS

(内径 0.25mm, 長さ 30m, 膜厚 0.25μm)

カラム昇温条件：

50℃ (1 分)→25℃/分-150℃→10℃/分-300℃ (30 分)

キャリアガス：He (1.0ml/分)

注入法：スプリットレス

試料注入量：1μl

注入口温度：250℃

インターフェース温度：270℃

(4) LC-MS/MS (プロダクトイオンスキャン) 法

国立医薬品食品衛生研究所よりホモタダラフィル溶液の供与を受けてから、検体とともに測定を行った。プリカーサイオン m/z404.8 を指定し、上記 (2) と同様の機器分析条件により、コリジョンエ

ナジー30 及び 60eV の 2 種類でプロダクトイオンスキャンを行った。

結 果

1 HPLC (定性) 試験結果

図 2 に HPLC による定性試験の結果を示す。左側がクロマトで、右側が UV スペクトルである。

検体でタダラフィル標準溶液の保持時間に一致するピークは見られなかったが、その付近に 4 本の大きなピークが見られた。そのうち、タダラフィルの保持時間から約 2 分遅いピークの UV スペクトルがタダラフィルの UV スペクトルと一致した。検体にタダラフィル標準液を添加して測定した結果、同一の UV スペクトルを示すが、保持時間の異なる 2 本のピークが別々に出現したため、検体で見られたピークがタダラフィルではないことが確認された。

また、確認のため、カラムの種類を関東化学株式会社製 MightySil RP-18 に替えてその他の試験条件を変えずに測定を行ったところ、タダラフィル標準溶液の保持時間 27.3 分に対し、UV スペクトルがタダラフィルと完全に一致するピークが保持時間 30.4 分に見られた。

後日、国立医薬品食品衛生研究所よりホモタダラフィル溶液の供与を受けて測定したところ、UV スペクトルはタダラフィルに一致するものの、保持時間が異なった分析試料中のピークがこれに一致した。

2 LC-MS (Scan) 試験結果

図 3 に LC-MS (Scan) による試験の結果を示す。それぞれ上段がクロマトで、下段がマスパターンである。検体については、RT25.1 のマスパターンを示している。

タダラフィル標準溶液は保持時間 23.1 分にピークを認めた。RT23.1 のマスパターンではタダラフィルの分子量 389.4 に対し、m/z390.9 を示すピークとフラグメントと見られる m/z268.4 のピークが見られた。

一方、検体ではタダラフィル標準溶液と同一の保持時間を示すピークは見られなかったが、分子量 459 前後の化合物の存在を示唆するピークが 2 本と、分子量 492 前後及び分子量 403 前後の化合物の存在を示唆するピークが 1 本ずつ見られた。このうち、RT25.1 のマスパターンは m/z404.7 と 283.1 を示すピークが見られ、これはタダラフィルで見られたピークからそれぞれ分子量で約 14

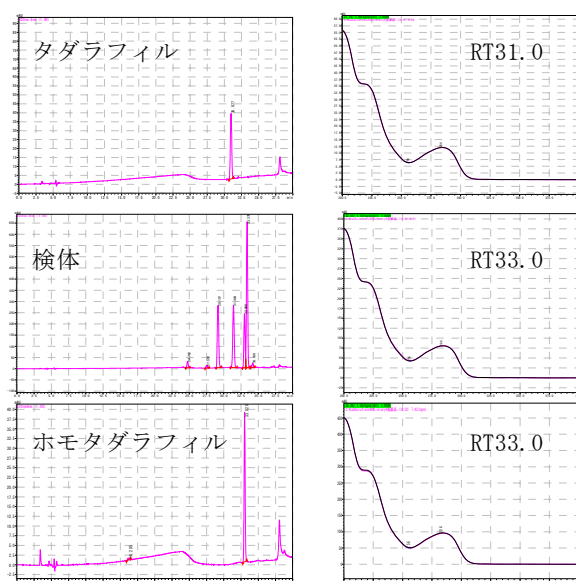


図 2 HPLC (定性) 試験結果

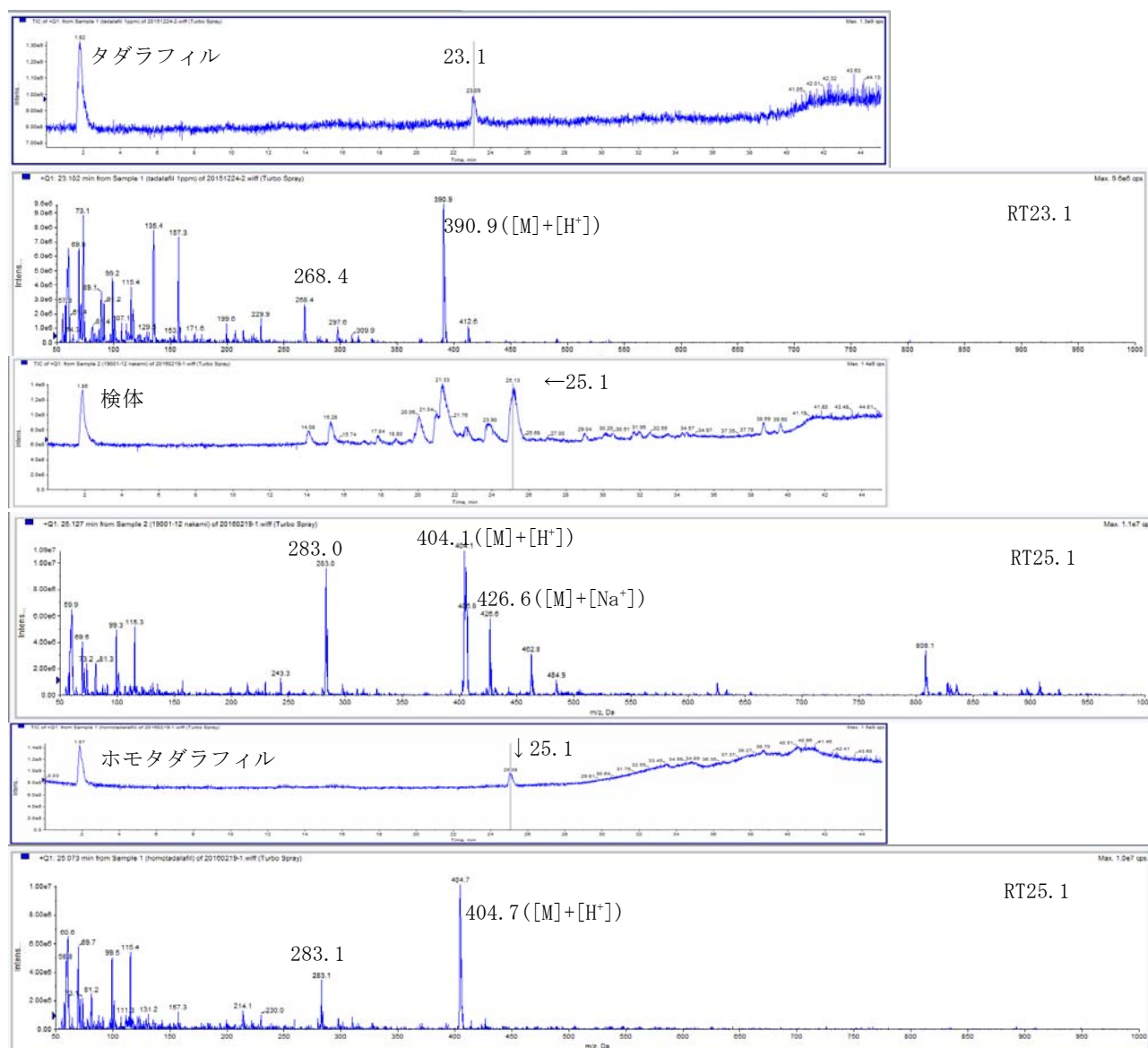


図3 LC-MS(Scan)試験結果

ずつ大きいものであるため、タダラフィルより分子量が14大きい類似物質の存在が示唆された。

後日、ホモタダラフィル溶液を測定したところ、検体と保持時間が一致し、マスパターンにおいても検体と同様にm/z404.7と283.1を示すピークが確認された。

3 GC-MS(Scan) 試験結果

図4にGC-MS(Scan)による試験の結果を示す。それぞれ左側がクロマトで、右側がマスパターンである。検体については、RT43.8のマスパターンを示しているが、更に大きいピークであるRT46.4のマスパターンもRT43.8とほぼ同様であった。

タダラフィル標準溶液は保持時間40.7分にピークが認められ、そのマスパターンはライブラリ検索によりタダラフィルであることを確認した。

一方検体では、保持時間43.8分で、マスパターンがタダラフィルと類似しているが分子量は389ではなく403を示唆するピークが見られた。

後日、ホモタダラフィル溶液を測定したところ、検体と保持時間が一致し、マスパターンにおいても検体と同様にm/z403と262を示すピークが見られた。

4 LC-MS/MS 試験結果

図5にLC-MS/MS試験の結果を示す。LC-MSによりホモタダラフィル溶液を測定した結果から、プリカーサイオンをm/z404.8に指定し、コリジョンエネルギーを30及び60eVにしてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、試料溶液の保持時間とフラグメント開裂状況(マスパターン)がほぼ一致する結果が得られた。

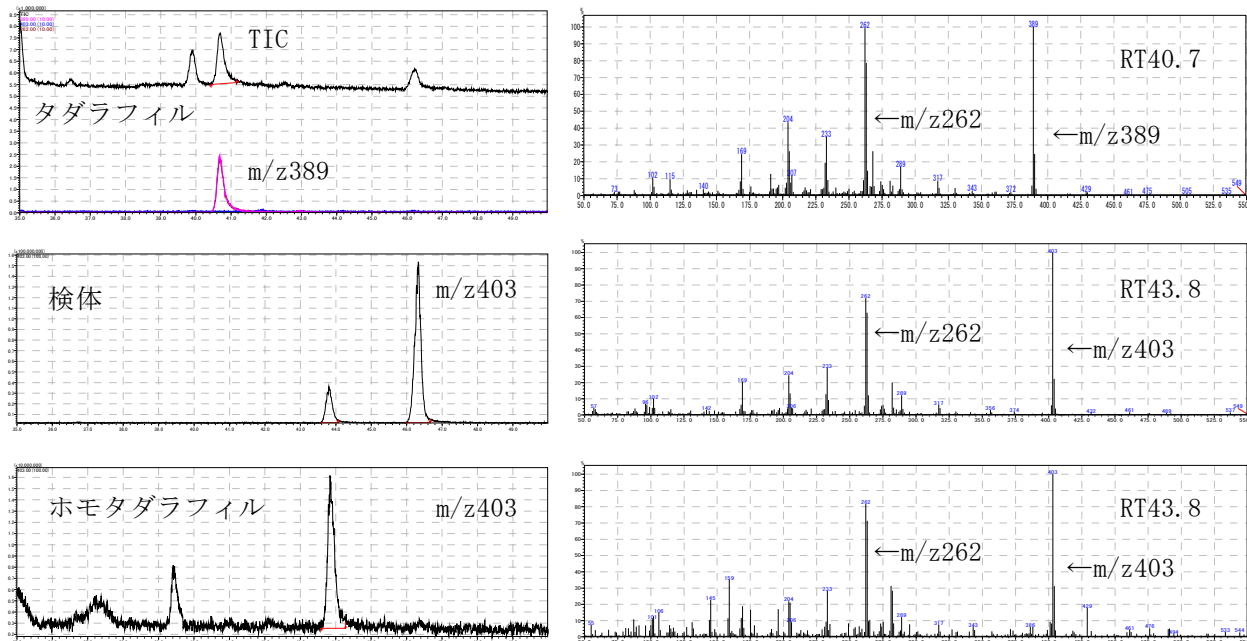


図 4 GC-MS (Scan) 試験結果

5 HPLC (定量) 試験結果

検体の未知物質について、ホモタダラフィルとして定量したところ、1 カプセル当たり 1.7mg であった。

考 察

当所の HPLC スクリーニング条件により、「タダラフィルとは保持時間が異なるがタダラフィルと同一の UV スペクトル」を示すピークが検出された。そのため、LC-MS 法により Scan 測定したところ、

タダラフィルとは保持時間も分子量も異なる化合物の存在が示唆された。これらのことから、タダラフィルとは異なるが、タダラフィルと類似した構造をもつ化合物の存在が考えられた。

これらの結果を受けて、GC-MS 法により Scan 測定を行ったところ、HPLC 測定時と同じく、標準溶液のタダラフィルよりやや遅れて、タダラフィルと類似したマススペクトルをもつ化合物のピークが検出された。

これらのピークはタダラフィルの分子量 389 で

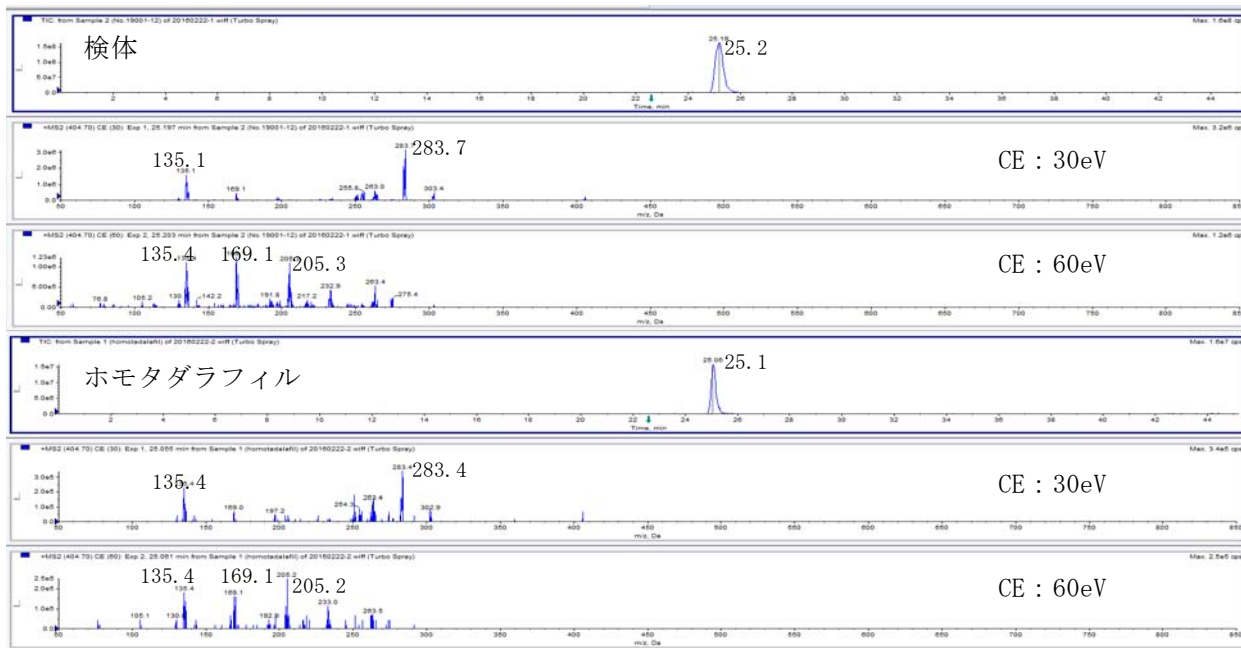


図 5 LC-MS/MS 試験結果

はなく $m/z403$ にピークがあり, LC-MS 試験結果の一部と一致する結果となった。なお, LC-MS 法でピークが見られた $m/z459$ 前後や $m/z492$ 前後には GC-MS 法ではピークが見られなかった。

分子量 403 前後のタダラフィル類似物質を調査したところ, 2'-オキシタダラフィル及びホモタダラフィルが該当した。そこで 2'-オキシタダラフィルを入手して HPLC により測定した結果, 今回の未知物質がこれでないことが判明した。

広島県保健環境センターに相談したところ, スペクトル等から成分を推定する方法等について助言をいただいた¹⁾。また, 国立医薬品食品衛生研究所からは, 助言とホモタダラフィル溶液の供与をいただき, 改めて検体とともに測定を行った。

HPLC により, 標準溶液のホモタダラフィルと保持時間及び UV スペクトルが一致するピークが検出された。また, LC-MS 法及び GC-MS 法により Scan 測定を行ったところ, いずれの方法でもホモタダラフィル標準溶液と保持時間及びそのマスパターンがほぼ一致するピークが検出された。更に LC-MS/MS 法によりプリカーサイオンを指定してのプロダクトイオンスキャンにおいても保持時間とフラグメント開裂状況とが一致した。図 6 にタダラフィルとホモタダラフィルの構造を示すが, ほぼ同じ構造であるため, HPLC による UV スペクトルはほぼ同一である。

今回検出された未知物質は, ホモタダラフィル

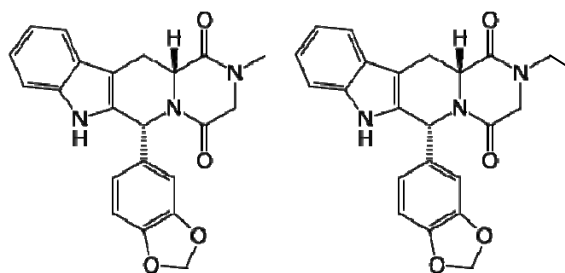


図 6 タダラフィル(左)とホモタダラフィル(右)

と推測されたが, ホモタダラフィルには光学異性体が他に 3 種存在し, 今回の試験条件では, 光学異性体を分離できるかどうかは不明であるため, これらの光学異性体である可能性を否定することはできなかった。

謝 辞

検査の実施に当たり, 多くの助言を戴きました広島県保健環境センター並びに国立医薬品食品衛生研究所の各先生方に深く感謝します。

文 献

- 1) 伊達英代 他:プロダクトイオンスペクトルを用いた ED 治療薬及びその類似成分の構造解析, 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告, 21, 1~7(2013)