

健康食品中に含有するシルデナフィルの確認試験

守安貴子,* 重岡捨身, 岸本清子, 石川ふさ子,
中嶋順一, 上村 尚, 安田一郎
東京都立衛生研究所理化学部

Identification System for Sildenafil in Health Foods

Takako MORIYASU, Sutemi SHIGEOKA, Kiyoko KISHIMOTO, Fusako ISHIKAWA,
Jyunichi NAKAJIMA, Hisashi KAMIMURA, and Ichiro YASUDA
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, 3-24-1,
Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan*

(Received May 1, 2001; Accepted August 1, 2001)

A substantially available identification system for Sildenafil in health foods was established using 3 different analytical methods; i.e. TLC, preparative TLC/MS and HPLC/photo-diode array. Sildenafil in health foods was extracted with ethyl acetate under alkaline conditions as sample solutions for TLC and preparative TLC, and also extracted with 50% methanol and then diluted with solution of HPLC mobile phase for HPLC. The sample solution for TLC was applied to Silica gel 60 F₂₅₄ plates with chloroform/methanol/28% ammonia (90 : 1 : 5, under layer) as mobile phase. Spots were located under UV radiation at 254 nm and 366 nm, and spraying dragendorff reagent. The conditions for preparative TLC were the same as these of TLC method, and samples obtained from preparative TLC were determined by MS with APCI interface, under both positive and negative modes. The HPLC analysis was carried out on a column of Cosmosil 5C18-AR (4.6 mm×150 mm, 5 μm) with 0.05 mol/l phosphate buffer pH 3.0/acetonitrile (73 : 27) as mobile phase and the eluate was monitored by a photo-diode array detector. The quantitative analysis was available, when the peak of this sample on HPLC was detected at 290 nm. When this system was applied to commercial health foods, Sildenafil was identified and their contents were 25 mg—45 mg/tablet or bottle. These contents nearly correspond to that in Viagra, 25 mg, 50 mg/tablet. Therefore, there is a fear of side effects for Sildenafil, when it is taken as health foods.

Key words—Sildenafil; health foods; preparative TLC/MS; TLC; HPLC/photo-diode array

はじめに

健康食品は摂取の手軽さや効果への期待感の高まりから大きな市場を形成している。しかし、これらの製品の中には、効果を上げるために医薬品にしか用いることができない成分が添加されていることがあり、これらは薬事法上、無承認無許可医薬品として監視する必要がある。近年では、フェンフルラミンが添加された健康茶¹⁾やカプセル剤、センナ葉を含有する健康茶²⁾などの事例があるが、今回、著者らは勃起不全治療薬バイアグラの有効成分シルデナフィル（バイアグラ中はクエン酸塩として配合）を含有する疑いのある製品を入手した。

バイアグラは副作用として、頭痛や視覚障害の他、死亡例を含む心筋梗塞が報告されており、硝酸剤や一酸化窒素供与剤（ニトログリセリン等）との

併用により過度に血圧を下降^{8,9)}させる危険もある。したがって、これらシルデナフィルを含有する疑いのある製品を摂取した場合、副作用による健康被害を引き起こす可能性があり、安易に健康食品として販売されることは危険と考えられた。そこで、早急にシルデナフィルの確認試験を中心とした試験法を検討した。

これまで報告されているシルデナフィルの分析法には、C₁₈及びC₄カラム等を用いた逆相系HPLCによる分析法³⁻⁵⁾がある。しかし、これらHPLCのみの方法では、様々な原材料が用いられている健康食品を分析する際には、夾雑物を誤認する危険性もあり確認試験として不十分と考えられた。そこで、複数の分析手法の組み合わせによる多角的な確認試験法を検討した。その結果、まず、広範囲な成分を容易に見ることが可能な一次スクリーニングと

して TLC 法が有用であった。次に TLC 法で存在が疑われたものについては分取 TLC/MS 法に加え、HPLC/フォトダイオードアレイ法によっても確認試験を行うこととした。また、検出を確認したものについては HPLC 法によりさらに定量試験を行った。

実際にシルデナフィルの含有が疑われた市販製品について本法を適用したところ、シルデナフィルを確認、定量できたので合わせて報告する。

試験方法

1. 試料 シルデナフィルを検出した試料 1—3 はいずれも中国からの輸入品であった。試料 1 は三角粒 (630 mg/粒) で、紙袋 (2 粒/袋) 又は金属ケース (6 粒/ケース) に入れられていた。試料 2 は 1 より小さな三角粒 (300 mg/粒) で、金属ケース (10 粒/ケース) に入れられ販売されていた。いずれも使用量は 1 回 1—2 粒で、原材料は牡蠣、西洋参、海馬と記載されていた。試料 3 はガラスビンに入れられた液体 (50 ml/ビン) で、使用量は 1 回 1/2—1 ビン、原材料は天然飲料素材と記載されていた。

2. 試薬及び装置 (1)試薬；バイアグラはファイザー社製を用いた。クロロホルム、メタノール、アンモニア水 (28) 及びアセトンは和光純薬工業㈱製試薬特級品、アセトニトリルは和光純薬工業㈱製液体クロマトグラフィー用、その他の試薬はすべて市販の試薬特級品を用いた。(2)NMR；日本電子データム㈱製 JNM- α 500 型を用いた。(3)MS；㈱日立製作所製 M-1200H システムを用いた。(4)HPLC；日本分光㈱製 PU-980 型ポンプ、同 MD-915 型フォトダイオードアレイ検出器、同 DG-980-50 型デガッサー、同 AS-950 型オートサンプラー、同 CO-965 型恒温槽、JASCO-BORWIN データ処理システムにより構成した。

3. 標準品及び試料溶液の調製 (1)シルデナフィル標準品；標準品は市販のバイアグラから抽出した。シルデナフィルの構造式は Fig. 1 に示すように塩基性物質であることから、抽出はアルカロイドの抽出法^{6,7)}に準じた。すなわち、粉碎し均一としたバイアグラ 127 mg (シルデナフィル 20.6 mg に相当) にアンモニア水 (28) 2 ml を加え、酢酸エチル 30 ml で 3 回、振とう及び超音波抽出を行った。

この抽出液を合わせ、溶媒を留去してアセトンに溶解後、濃縮ゾーンつきの薄層に帯状にスポットした。次にこれを以下に示す TLC 条件で展開後、紫外線 254 nm を照射し、暗紫色吸収スポット部分のシリカゲルを掻き取り、乳鉢ですりつぶしたものを、クロロホルム/メタノール/アンモニア水 (28) (90 : 1 : 0.2) 30 ml で 3 回抽出し、ろ過した。この溶媒を減圧濃縮し、室温、一晚減圧下で乾燥してシルデナフィル 12.9 mg を得た。

標準品の確認、同定は NMR 及び高分解質量分析計により行った。¹³C-NMR、³H-NMR 及び高分解質量分析データは以下の通りである。

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ : 14.0, 14.5, 22.2, 27.7, 38.2, 45.7, 45.9, 54.0, 66.0, 113.0, 121.0, 124.4, 128.9, 131.1, 131.6, 138.3, 146.4, 147.0, 153.6, 159.2.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 1.02 (3H, t, $J=7.3$ Hz), 1.65 (3H, t, $J=7.1$ Hz), 1.86 (2H, m), 2.28 (3H, s), 2.50 (4H, m), 2.93 (2H, t, $J=7.7$ Hz), 3.11 (4H, m), 4.27 (3H, s), 4.38 (2H, q, $J=7.1$ Hz), 7.15 (1H, d, $J=8.5$ Hz), 7.84 (1H, dd, $J=8.5, 2.4$ Hz), 8.82 (1H, d, $J=2.4$ Hz), 10.81 (1H, s).

HR EI-MS : m/z 474.20587 (calcd for C₂₂H₃₀N₆O₄ S : 474.204926).

なお、本標準品の純度は、一次標準品にファイザー社製シルデナフィル標準品を用いて HPLC により定量した結果、98.2%であった。以後、二次標準品として本標準品を用いた。(2)TLC 用試料溶液；固体試料である試料 1 及び 2 は、粉碎した試料 100 mg をとり、水 10 ml、アンモニア水 (28) 2 ml を加え、酢酸エチル 20 ml で抽出後溶媒を留去、アセトン 1 ml に溶解した。液体試料である試料 3 は、10 ml をとりアンモニア水 (28) 2 ml を加え、以下試料 1 及び 2 と同様に操作した。(3)MS 用試料溶液；

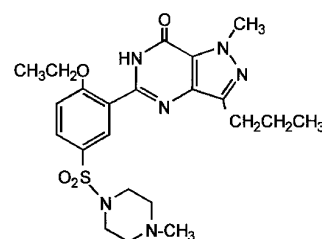


Fig. 1. Chemical Structure of Sildenafil
sildenafil; 1-[[3-(4,7-dihydro-methyl-7-oxo3-propyl-1H-pyrazolo [4,3-d]pyrimidin-5-yl)-4ethoxyphenyl]sulfonyl]-4-methyl-piperazine.

TLC 用試料溶液を TLC で展開後、紫外線 254 nm を照射して得た暗紫色吸収スポット部分のシリカゲルを掻き取り、乳鉢ですりつぶした後、クロロホルム/メタノール/アンモニア水 (28) (90 : 1 : 0.2) 30 ml で抽出した。これをメンブランフィルターでろ過後溶媒を留去し、メタノール 10 ml に溶解した。

(4)HPLC 用試料溶液；試料 1 及び 2 は粉碎した試料約 100 mg を精密にはかり、50%メタノールで抽出し、正確に 20 ml としたものを遠心分離した後 2.0 ml とり、移動相で正確に 20 ml とした。試料 3 は 1.0 ml をとり移動相で希釈して 100 ml とした。

4. 測定条件 (1)TLC 条件；薄層板：Merck 社製 0.25 mm Kieselgel 60 F₂₅₄，展開溶媒：クロロホルム/メタノール/アンモニア水 (28) (90 : 1 : 5) の下層を用いた。検出：暗所にて紫外線 254 nm, 366 nm を照射した。またドラーゲンドルフ試薬を噴霧し、呈色スポットを確認した。スポット量：1 μ l。 (2)MS 条件；システム：LC/APCI-MS フローインジェクション，モード及びドリフト電圧：ポジティブ 110 eV，ネガティブ 100 eV，マルチプライアー電圧 1800 eV，ネブライザー温度：200°C，移動相：メタノール，流速：1.0 ml/min。 (3)HPLC 条件；カラム：Cosmosil 5C18-AR (4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m)，カラム温度：40°C，移動相：0.05 mol/l リン酸塩緩衝液 (pH 3.0)/アセトニトリル (73 : 27)，流速：1.0 ml/min，検出：フォトダイオードアレイ (確認；200 nm—400 nm，定量；290 nm)，注入量：10 μ l。

5. 検量線 シルデナフィルを 6.3—155.2 μ g/ml の範囲で移動相に溶解し、試料溶液とした。この 10 μ l を HPLC に注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積を求め、絶対検量線法により検量線を作成した。また、6.3, 12.6, 51.8, 103.5, 155.2 μ g/ml の各濃度につき 5 回繰り返し測定した際の再現性を検討した。

結果及び考察

1. TLC 法による確認試験 TLC 法は多検体を同時に処理できる点や、試料成分の全体像がとらえやすい点、夾雑物による機器の汚染がない点が他の手法に比べて優れており、夾雑物を多く含む健康食品の一次スクリーニングに適していた。また、TLC 条件が順相系であり、1 試料が液体であった

ため、抽出溶媒には液体と混和しない酢酸エチルを用い、アンモニア水 (28) を加えて遊離塩基の形で抽出することとした。結果を Fig. 2 に示したが、Rf 値 0.6 付近にシルデナフィルのスポットが得られた。検出は、紫外線 254 nm 照射下で暗紫色のスポットとして、紫外線 366 nm 照射下で青色の蛍光スポットとして、ドラーゲンドルフ試薬噴霧後の橙色のスポットとして確認した。3 種の検出法の中で、紫外線 254 nm 照射下での検出が最も感度良く、その検出限度は 100 ng/spot であった。また食品成分中、ドラーゲンドルフ試薬での呈色は特徴的であり、確認に有効であった。

2. MS 法による確認試験 TLC 法による確認試験の結果をより確実にするために、TLC 法で陽性と判断されたものや疑義の持たれたものについて、質量分析を行った。シルデナフィルは分子量が大きく、その構造から GC/MS より LC/MS の方が適切と考えられた。そこで、分子ピークの得やすい APCI を備えた LC/MS により質量分析を行うこととしたが、本法で設定した HPLC 条件は移動相に塩を含んでいるため、LC/MS に適用することは困難であった。したがって、前処理によりシルデナフィルを精製し、フローインジェクション分析を行うこととした。前処理法としては、固相抽出法やカラムクロマト等種々の方法が考えられたが、標準品の精製に用いた簡便な分取 TLC 法により行った。

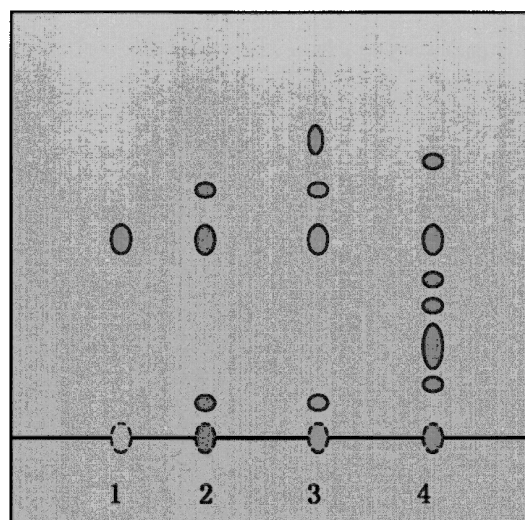


Fig. 2. TLC Chromatograms of Sildenafil in Health Foods
1: sildenafil standard, 2: sample 1, 3: sample 2, 4: sample 3.
TLC conditions: plate, Kieselgel 60 F₂₅₄, solvent system, chloroform/methanol/ammonia (90/1/5, under layer), detection; UV at 254 nm.

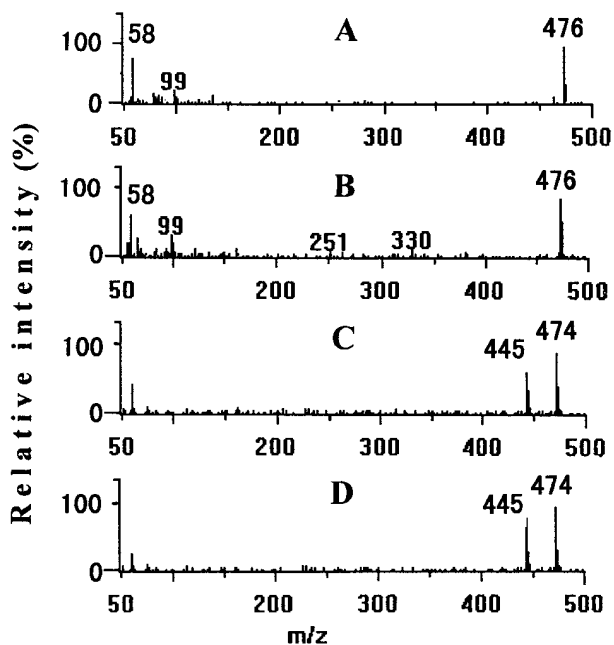


Fig. 3. Mass Spectra of Sildenafil by Preparative TLC/MS
A: sildenafil standard at positive mode, B: sample 1 at positive mode, C: sildenafil standard at negative mode, D: sample 1 at negative mode.

陽性と判断された試料 1—3 のいずれについても、ポジティブモードで m/z 476 ($M+H$)⁺ の分子イオンピーク、脱離したメチルピペラジンのフラグメントピーク m/z 99 及び 58 のフラグメントピークが得られた。また、ネガティブモードで m/z 474 ($M-H$)⁻ の分子イオンピークとエチル基の脱離した m/z 445 のフラグメントピークを認め、両モードから分子量 475 を確認することができた。なお、これらのマスプロトグラムを Fig. 3 に示した。

3. HPLC/フォトダイオードアレイ法による確認試験及び定量試験 試料溶液の調製では、HPLC 条件が逆相系であり、シルデナフィル（クエン酸塩）が水及びメタノールに溶解することから、固体試料の試料 1, 2 は 50%メタノールで抽出後移動相で希釈、液体試料の試料 3 はそのまま移動相で希釈することとした。試料 3 は特に抽出操作を行わないため夾雑物の影響が懸念されたが、シルデナフィルのピークの紫外外部吸収スペクトルやピーク純度を測定しても夾雑物の影響は認められなかった。

HPLC 法で得られるクロマトグラムを Fig. 4 に示した。シルデナフィルの保持時間は 5.8 分付近であり、このピークをフォトダイオードアレイ検出器によりモニターすると、Fig. 5 に示すような紫外外部吸収スペクトルが得られた。試料 1—3 のスペクトル

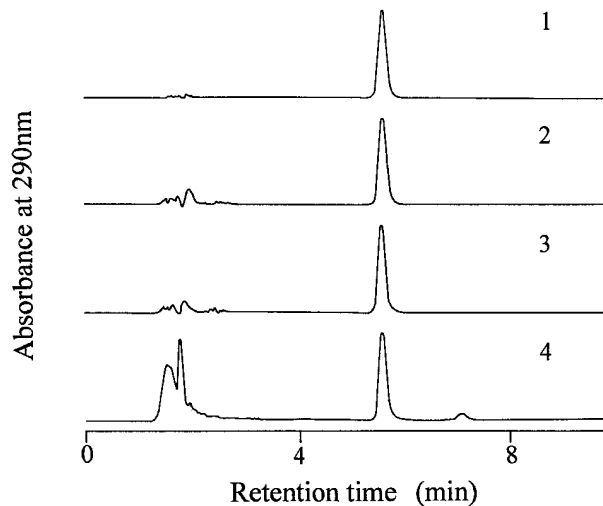


Fig. 4. HPLC Chromatograms of Sildenafil in Health Foods
1: sildenafil standard, 2: sample 1, 3: sample 2, 4: sample 3.

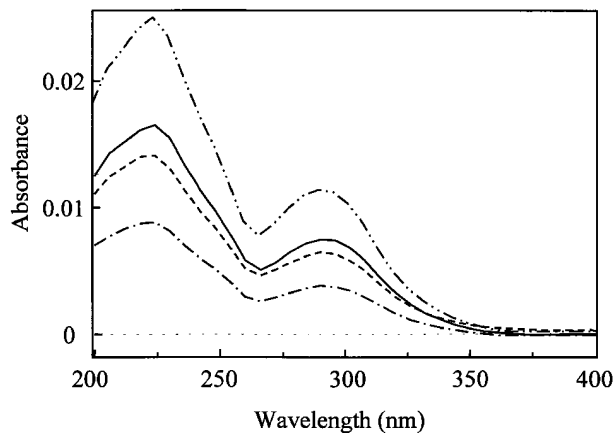


Fig. 5. UV Spectra of Sildenafil
—: sildenafil standard, - - -: sample 1, - · - ·: sample 2, ·····: sample 3.

ルは 224 nm 及び 290 nm 付近に極大吸収が、266 nm 付近に極小吸収が現れ、標準品のスペクトルと一致した。また、本 HPLC 条件で検出波長を 290 nm に設定した場合、定量を妨害するピークは検出されず、定量試験も可能であると判断された。

以上述べたように TLC 法、分取 TLC/MS 法及び HPLC/フォトダイオードアレイ法と 3 つの測定原理の異なる分析法を組み合わせることにより、シルデナフィルの確認試験としての精度を上げることができた。

4. 検量線及び測定の再現性 作成した検量線は、測定した 6.3—155.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で良好な直線性を示し、その相関係数は 0.9998 であった。また、各濃度の繰り返し測定では、いずれも CV 値が

0.6%以下となり良好であった。検出限度は0.1 µg/ml (S/N>5) であり、バイアグラの用量を考えると十分な感度であった。

5. 市販製品中の分析結果 TLC法、分取TLC/MS法及びHPLC/フォトダイオードアレイ法のいずれも陽性であった試料1-3について、HPLC法により定量試験を行ったところ、試料1からシルデナフィルを45±0.76 mg/粒、試料2から25±0.79 mg/粒、試料3から43±0.72 mg/50 ml (いずれもn=5)を検出した。以上の結果のように市販製品のSD値は1 mg以下と小さく、検量線の直線性や標準溶液のCV値、検出限度を考えると、本試験法は市販健康食品の定量に十分対応できるものとする。

また今回の事例では、医薬品であるバイアグラの25 mg, 50 mg錠に近い含有量であったことから、こうした製品が安易に健康食品として販売されることは危険であり、本試験法を活用して、引き続き監視する必要が高いと思われた。

謝辞 本研究を遂行するにあたり、高分解能質量分析の測定に際しご協力いただきました、東京薬科大学中央分析センター、志田保夫助教授に深謝いたします。

REFERENCES

- 1) Yasuda I., Shioda H., Hamano T., *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.*, **48**, 71-75 (1997).
- 2) Seto T., Shioda H., Satoh K., Hamano T., *Jpn. J. Toxicol. Environ Health*, **44**, 195-203 (1998).
- 3) Cooper J., Muirhead D., Taylor J., Baker P., *J. Chromat. Biomed. Appl.*, **701**, 87-95 (1997).
- 4) Segall A., Vitale M., Perez V., Palacios M., Pizzorno M., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **23**, 1377-1386 (2000).
- 5) Bhoir I., Bhoir S., Bari V., Bhagwat A., Sundaresan M., *Indian Drugs*, **37**, 319-322 (2000).
- 6) Itenov K., Moelgaard P., Nyman U., *Phytochemistry*, **52**, 1229-1234 (1999).
- 7) Kodzhaev B. U., Shakirov R., *Chem. Nat. Compd.*, **36**, 100-101 (2000).
- 8) Webb D. J., Muirhead G. J., Wulff M., Sutton J. A., Levi R., Dinsmore W. W., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **36**, 25-31 (2000).
- 9) Klone R. A., Zusman R. M., *Am. J. Cardiol.*, **84**, 11-17 (1999).