

資料

## 健康食品中のシルデナフィル, タダラフィルの検出事例

伊達 英代, 寺内 正裕, 松尾 健

### Detections of Sildenafil and Tadalafil in Health Foods

HIDEYO DATE, MASAHIRO TERAUCHI and TAKESHI MATSUO

(Received Oct. 1, 2009)

本県薬務課が実施している「無承認無許可医薬品実態調査」において買い上げた、強壯を謳った「健康食品」及び健康被害の発生により持ち込まれた苦情品について、勃起不全治療薬のシルデナフィル及びその類縁物質を対象に、成分分析を実施した。

順相及び逆相薄層クロマトグラフィー (TLC) による確認、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による定量、さらに、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (LC/MS/MS) を用いて分析したプロダクトイオンスペクトルの比較による成分の同定分析を行った結果、買い上げ品 2 製品及び苦情品から、シルデナフィル及びタダラフィルが検出された。

Key words : 強壯健康食品, シルデナフィル類, TLC, HPLC, プロダクトイオンスペクトル

## 緒 言

近年、「無承認無許可医薬品」に該当する、医薬品成分が添加された「健康食品」が全国で発見され、健康被害も発生している。このような健康被害事例の原因で最も多いのが、下剤、利尿剤、食欲抑制剤、向精神薬等が添加された「ダイエット用健康食品」である。その一方で、発見数が多いのは、勃起不全治療薬 (ED 治療薬) の主成分であるシルデナフィル (SLF) 及びその類似成分が添加された「健康食品」である。このような「健康食品」が、市中のアダルトショップやインターネット上で数多く販売されていることから、全国で買い上げ調査等が実施されており、厚生労働省の統計では、平成 21 年 7 月末現在、258 製品が発見されている [1]。

本県においても、薬務課が実施している「無承認無許可医薬品等実態調査」の一環として、県内で購入した「健康食品」について、SLF 及びその類似成分を対象に成分分析を行っており、平成 20 年度の調査では、2 製品(「九鞭王」及び「黒蚊神」) から SLF が検出された。

また、我々は、平成 19 年 3 月、インターネットを通して入手した、強壯を謳った「健康食品」(「男根増長素」) を服用した県民が、製品中に多量の経口血糖降下薬のグリベンクラミドが添加されていたため、低血糖による意識障害をおこし、病院に緊急搬入された事例を報告しているが [2]、成分分析の結果、この製品からも ED 治療薬の SLF 及びタダラフィル (TDF) が検出されたので、

それらについての概要を報告する。

## 方 法

### 1. 試料

「九鞭王」(製品 A) : 青い菱形の錠剤で、VGA の刻印有り。

「黒蚊神」(製品 B) : 濃い緑色のカプセル剤で、内容物は白色粉末。

「男根増長素」(製品 C) : 赤白のカプセル剤で、内容物は白色粉末。

### 2. 試薬

#### 2-1. 標準品

バルデナフィル (VDF)、シルデナフィル (SLF) 及びキサントアントラフィル (XAF) は国立医薬品食品衛生研究所より分譲されたものを用いた。タダラフィル (TDF) は Toronto Research Chemicals Inc. 製を用いた。

各 4 成分の構造を、図 1 に示した。

#### 2-2. その他試薬

メタノール及び蒸留水は SIGMA-ALDRICH Inc. 製 HPLC 用を、アセトニトリルは、関東科学 (株) 製 HPLC 用を用いた。その他試薬は、特級品を使用した。

### 3. 装置

HPLC は 1100 シリーズ (Agilent Technologies 製) を、MS/MS は、API 3000 (Applied Biosystems 製) を用いた。

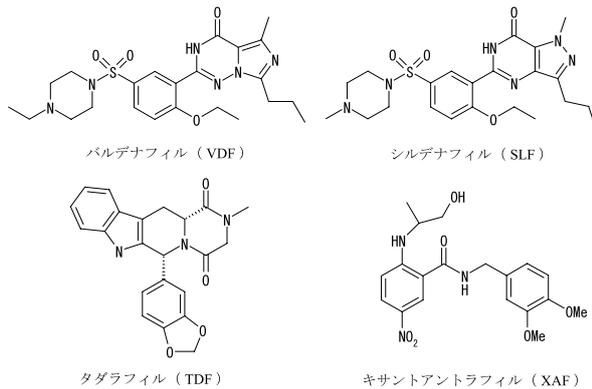


図1 構造式

#### 4. 標準溶液の調製

4-1. 標準原液 各標準品をメタノールで希釈して1 mg/mlとした。これを、TLC用及びプロダクトイオンスペクトル測定用標準溶液に用いた。

4-2. HPLC用標準溶液 4-1で調製した標準原液をメタノールでさらに希釈して10 µg/mlとした。

#### 5. 試料溶液の調製

各試料を1錠または1カプセルとり、錠剤については乳鉢で粉碎したものを、カプセル剤については内容物を約100 mg精密に量り取り、メタノール/水(1:1)溶液を正確に5 ml加え、超音波で10分間抽出した後、遠心分離(3000 rpm, 3 min)し、上澄みを試料溶液とした。

#### 6. 分析条件

##### 6-1. TLC条件

薄層板は、順相系はKieselgel 60 F<sub>254</sub> (MERCK製)、逆相系はRP-18 F<sub>254</sub> (MERCK製)を用い、スポット量は、TLC用標準溶液は1 µl、試料溶液は10 µlとした。展開溶媒は、順相系では酢酸エチル/メタノール/アンモニア水(20:10:1)、逆相系ではメタノール/水/アンモニア水(24:8:1)を用い、約10 cm展開した。各成分の検出は、紫外線(UV)254 nmの照射により行った。

##### 6-2. HPLC条件

カラムはYMC-Pack ODS-AM(4.6 × 150 mm, 5 µm, YMC製)を用いた。分析は0.1%リン酸溶液(A液)とアセトニトリル(B液)によるグラジエント条件で行った。まず、A液/B液(80:20)から20分で(30:70)とし、さらに5分間保持した。検出波長は254 nm、注入量は10 µl、カラム温度は40℃とした。

##### 6-3. プロダクトイオンスペクトル測定条件

プロダクトイオンスペクトルの測定は、豊田ら[3]の方法を用いた。まず、プロダクトイオンスペクトル測定用標準溶液及び試料溶液についてQ1スキャンを行い、[M+H]<sup>+</sup>及び[M-H]<sup>-</sup>と推察されるイオンを確認した。

次に、そのイオンをプレカーサーイオンとし、表1に示したLC/MS/MS条件を用いて、プロダクトイオンスペクトル測定を実施した。得られたプロダクトイオンスペクトルの比較により、各成分の同定を行った。

表1 LC/MS/MS分析条件

##### ○ HPLC conditions

Device	: 1100 series (Agilent Technologies)
Column	: Phenomenex Mercury MS Luna® C18 (2.0 × 10 mm, 3 µm)
Flow rate	: 0.2 ml/min
Column temp.	: 40℃
Inj. volume	: 1 µl
Mobile phase	: Sol.A : H <sub>2</sub> O containing 5 mmol/l CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> Sol.B : CH <sub>3</sub> OH/CH <sub>3</sub> CN (1:1) containing 5 mmol/l CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>
Gradient profile	: A/B (80:20) → 5 min → A/B (5:95) (Hold 3 min)

##### ○ MS/MS conditions

Device	: API 3000 (Applied Biosystems)
Ionization mode	: ESI (Negative and Positive)
Scan type	: Product ion scan
Ion spray voltage	: -4500 eV (Negative) and 5500 eV (Positive)
CE voltage	: ± 20 eV, ± 35 eV, ± 50 eV
Ion source temp.	: 400℃

(The other conditions were default values of each device.)

## 結果及び考察

### 1. TLCによる確認

まず、順相系及び逆相系のそれぞれについて展開溶媒を検討したところ、表2に示した条件で各4成分は良好に分離した。検出は、各4成分ともにUV(254 nm)での確認が可能であり、さらに、XAFについては、直視で黄色スポットを確認することが可能であった。

次に、標準溶液及び試料溶液をスポットして展開したところ、すべての試料溶液に、SLFの標準溶液と同じRf値付近にUVの吸収が認められたことから、製品A、B及びC中には、SLFが含有されていると推察された。なお、製品Cは、順相系でRf値0.50付近、逆相系ではRf値0.80付近にスポットが認められたが、これは、経口血糖降下薬のグリベンクラミドであった。

### 2. HPLCによる定量

各4成分について、移動相に0.1%リン酸溶液とアセトニトリルを用いたグラジエント条件を検討したが、TDF及びXAFのピークのベースライン分離は困難であった。そこで、VDF、SLF及びTDFについては3

表2 TLC 条件及び ED 治療薬の Rf 値

成分名	順相 Rf 値	逆相 Rf 値
シルデナフィル (SLF)	0.58	0.43
タダラフィル (TDF)	0.67	0.37
キサントアントラフィル (XAF)	0.71	0.49

順相 TLC 条件

薄層板: Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (MERCK 製), 展開溶媒: 酢酸エチル/メタノール/アンモニア水 (20:10:1)

逆相 TLC 条件

薄層板: RP-18 F<sub>254</sub> (MERCK 製), 展開溶媒: メタノール/水/アンモニア水 (24:8:1)

スポット量: 標準溶液は 1 µl, 試料溶液は 10 µl

検出: UV254 nm 照射 展開距離: 約 10 cm

成分混合標準溶液を, XAF については単成分で標準溶液を作成し, 分析を実施した. その結果, 図 2 に示した条件で, 各 4 成分の保持時間 (R.T.) は, VDF は約 4.7 分, SLF は約 7.6 分, TDF は約 11.6 分, XAF は約 11.9 分となった (図 2-①, ②).

続いて, 製品 A, B 及び C の試料溶液について図 2 に示した条件で分析したところ, SLF と同じ R.T. のピークが認められ, UV スペクトルも一致した. さらに, 製品 C については, TLC では検出されなかった TDL と同じ R.T. 及び UV スペクトルのピークが認められた (図 2-③).

検出された SLF 及び TDF について, 標準原液をメタノールで希釈して 1.0 - 20 µg/ml の範囲の検量線を作成し, ピーク面積による絶対検量線法で定量を行ったところ, 製品 A からは SLF が 1 錠 (約 570 mg) あ

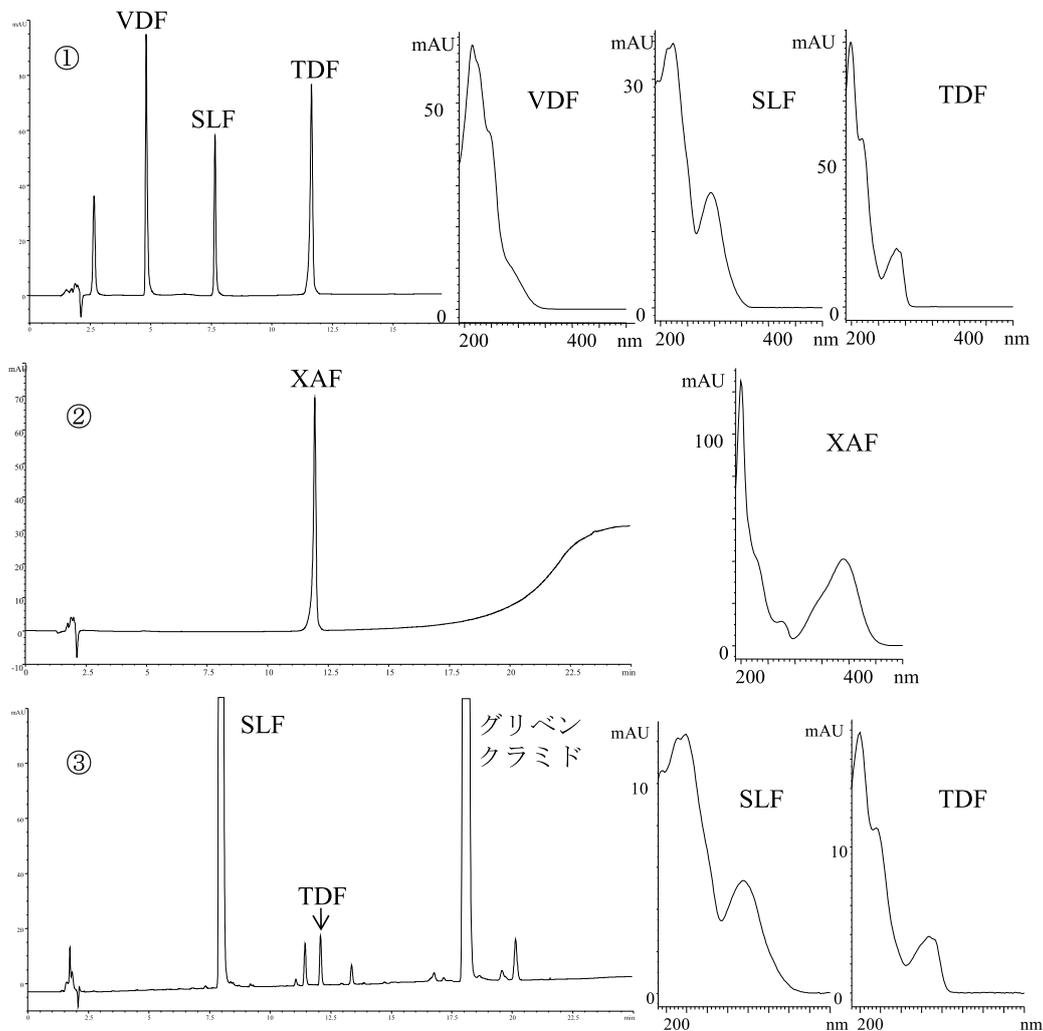


図 2 各標準溶液及び製品 C の試料溶液の HPLC クロマトグラムと各ピークの UV スペクトル  
①: バルデナフィル (VDF), シルデナフィル (SLF) 及びタダラフィル (TDF) の標準溶液 (10 µg/ml) ②: キサントアントラフィル (XAF) の標準溶液 (10 µg/ml) ③: 製品 C (男根増長素) の試料溶液

HPLC 分析条件

装置: 1100 series (Agilent Technologies 製) カラム: YMC-Pack ODS-AM (4.6 × 150 mm, 5 µm, YMC 製), 移動相 A: 0.1% リン酸溶液, 移動相 B: アセトニトリル, グラジエント条件: 移動相 A/移動相 B (80:20) → 20分 → (30:70) (5分間保持), 流量: 1 ml/min, カラム温度: 40°C, 注入量: 10 µl

たり 50 mg, 製品 B からは SLF が 1 カプセル (内容物約 250 mg) あたり 50 mg, 製品 C からは 1 カプセル (内容物約 390 mg) あたり SLF が 12 mg, TDF が 0.05 mg 検出された (表 3)。したがって, 製品 A 及び B は, SLF の 1 回の最大使用量 (用量は, 1 回 25 - 50 mg) と同量の SLF が添加されており, これら製品を服用した場合, 心血管系に障害のある患者や, 硝酸剤や一酸化炭素供与剤等を服用中の高血圧症の患者は, 重篤な有害事象を起こす可能性 [4] が高いと考えられた。製品 C の TDF については, TDF の用量 (1 回 5 - 20 mg) と比較して微量であることから, 故意に添加された成分ではないと推察された。

なお, SLF 及び TDF の検量線は,  $r = 0.999$  以上と良好であった。

表 3 健康食品から検出された成分と定量結果

製品名	成分名	含量*
(A)丸鞭王	シルデナフィル (SLF)	50 mg/1 錠
(B)黒蚊神	シルデナフィル (SLF)	50 mg/1 カプセル
(C)男根 増長素	シルデナフィル (SLF)	12 mg
	タダラフィル (TDF)	0.05 mg/1 カプセル
	グリベンクラミド	120 mg

\* HPLC による定量値

### 3. プロダクトイオンスペクトルによる同定

まず, 表 1 に示した条件で, 標準溶液のプロダクトイオンスペクトルを測定したところ, 4 成分とも Positive, Negative の両モードでプロダクトイオンスペクトルを測定することが可能であった (図 3)。

Positive モードで, VDF は  $m/z:489$  [M+H]<sup>+</sup> が, SLF は  $m/z:475$  [M+H]<sup>+</sup> が確認され, さらに, 守安ら [5] の報告にあるように, VDF は  $m/z:113, 312$ , SLF は  $m/z:99, 311$  の, SLF 類が持つ SO<sub>2</sub> 基の両側で開裂したイオンが確認された。さらに, VDF は, コリジョンエネルギー (CE) 50 eV において, SO<sub>2</sub> 基で開裂したイオン  $m/z:312$  がさらに開裂したと推察されるイオン  $m/z:151$  が観測された。これは Hei-Young Ku [6] らの報告と一致していた。TDF は,  $m/z:390$  [M+H]<sup>+</sup> は CE 20 eV でわずかに確認でき, 主に TDL からベンゾジオキソールが脱離したと推測されるイオン  $m/z:268$  が観測された。XAF は, [M+H]<sup>+</sup> に該当するイオンはほとんど観測されず, XAF から脱離した 1, 2 - ジメトキシ - 4 - メチルと推察されるイオン  $m/z:151$  が確認できた。これは熊坂らの報告と一致した [7]。

Negative モードでは, VDF は  $m/z:487$  [M-H]<sup>-</sup>, SLF は  $m/z:473$  [M-H]<sup>-</sup>, TDF 及び XAF は  $m/z:388$  [M-H]<sup>-</sup> と 4 成分すべて, [M-H]<sup>-</sup> が確認できた。さらに, VDF は  $m/z:459$ , SLF は  $m/z:445$  のエチル基の脱離したイオン [8] が観測された。また, XAF は, CE -35 eV に

おいて, XAF が開裂したものと推察されるイオン  $m/z:137, 150, 195$  等が観測された。

続いて, 試料溶液について, 同様にプロダクトイオンスペクトルの測定を実施したところ, 製品 A, B 及び C について, SLF の  $m/z:475$  [M+H]<sup>+</sup> 及び  $m/z:473$  [M-H]<sup>-</sup> が確認され, さらに, 製品 C は TDF の  $m/z:390$  [M+H]<sup>+</sup> 及び  $m/z:388$  [M-H]<sup>-</sup> が認められた。これらのイオンをプレカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行い, 得られたスペクトルを比較したところ, SLF 及び TDF の標準溶液のスペクトルと一致したことから, 製品 A 及び B 中の SLF, 製品 C 中の SLF 及び TDF が同定された (図 4)。

## まとめ

SLF 及びその類似成分を対象にした「無承認無許可医薬品等実態調査」において, 2 製品 (A 及び B) から SLF を検出した。また, 健康被害発生の原因となった「健康食品」からも, SLF 及び微量の TDF を検出した。これら製品について, 県ホームページを通じて広く県民に注意喚起すると共に, 他県にも情報提供を行った。また, 製品 C については, 他県でも同様の健康被害が発生したが, 本県がおこなった情報提供により, 迅速な行政対応が可能であった。

現在, インターネット, 通信販売等様々な方法で, 世界中の「健康食品」が一般の人の手に入る状況であり, このような「健康食品」による健康被害の発生が増加する傾向にあることから, 今後も, 継続的に監視をする必要があると考えられる。

## 文献

- [1] 厚生労働省: 健康被害情報・無承認無許可医薬品情報, <http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet.html>
- [2] 伊達英代, 寺内正裕, 杉村光永, 豊田安基江, 松尾 健: 健康食品中に含まれる経口血糖降下薬の系統的分析法, *YAKUGAKU ZASSHI*, 129 (1), 163-172, (2009)
- [3] 豊田安基江, 杉村光永, 松尾 健, 寺内正裕, 伊達英代, 井原紗弥香, 森田晃祥, 山辺真一, 肥塚加奈江, 藤原美智子, 立野幸治: 相互利用可能な LC/MS/MS スペクトルライブラリ作成のための研究 (第 1 報) - プロダクトイオンスキャンによる MS/MS スペクトル取得条件の検討 -, 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告, 16, 1-4, (2008)
- [4] 日本医薬品集 DB 2007 年 9 月版, 東京, (株) じほう

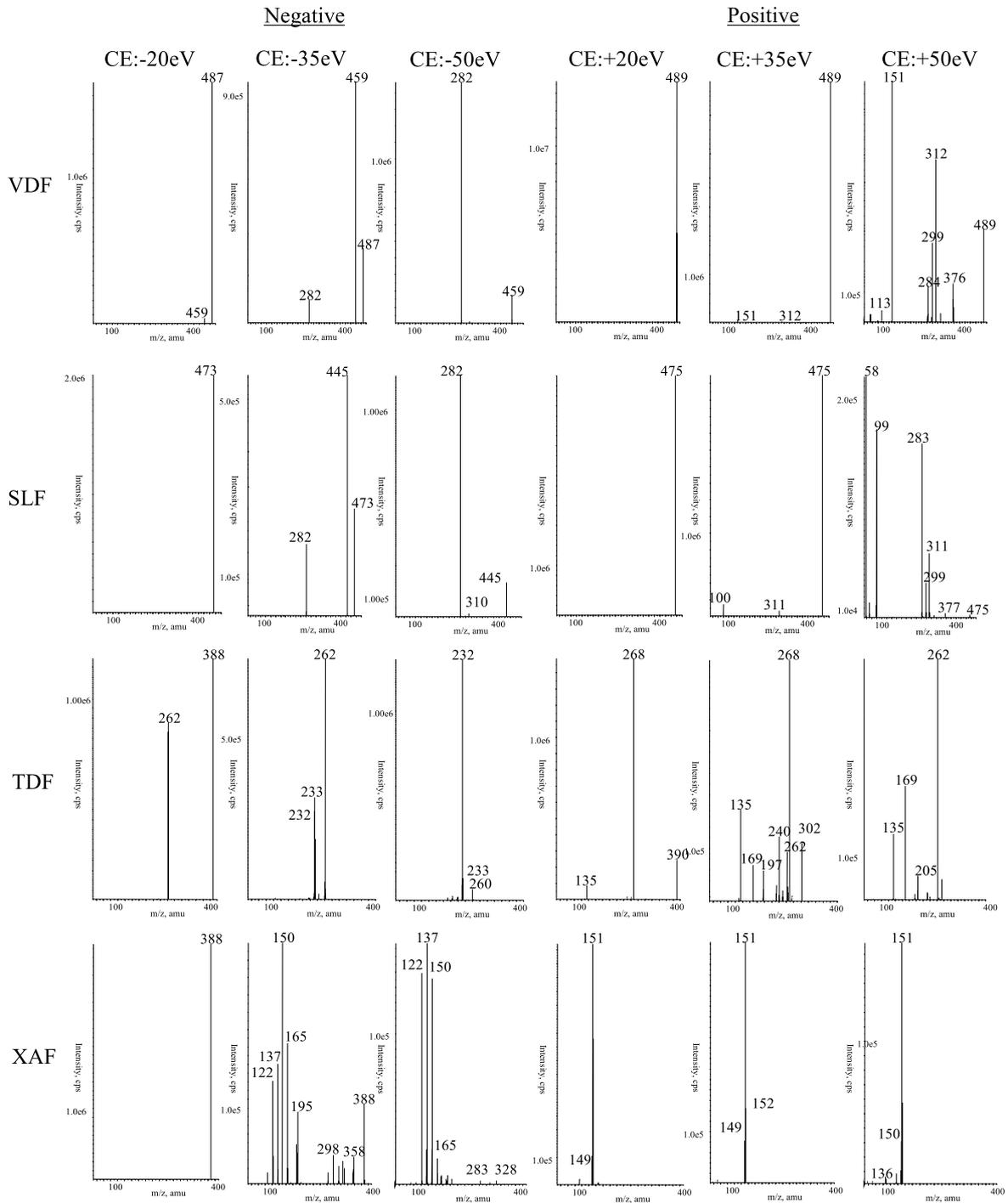


図3 標準溶液のプロダクトイオンスペクトル (10 µg/ml)  
 VDF: バルデナフィル, SLF: シルденаフィル, TDF: タダラフィル, XAF: キサントアントラフィル

[5] 守安貴子, 重岡捨身, 蓑輪佳子, 岸本清子, 安田一郎: 健康食品中に含有されていた新規シルденаフィル類似体について, 東京健安研セ年報, 55, 73-77, (2004)

[6] Hei-Young Ku, Ji-Hong Shon, Kwang-Hyeon Liu, Jae-Gook Shin, Soo Kyung Bae: Liquid chromatography/tandem mass spectrometry

method for the simultaneous determination of vardenafil and its major metabolite, N-desethylvardenafil, in human plasma: Application to a pharmacokinetic study, *J. Chromatogr. B.*, 877, 95-100, (2009)

[7] Kenichi Kumasaka, Nobuo Kawahara, Kayo Doi, Takashi Kojima, Yukihiro Goda: Determination

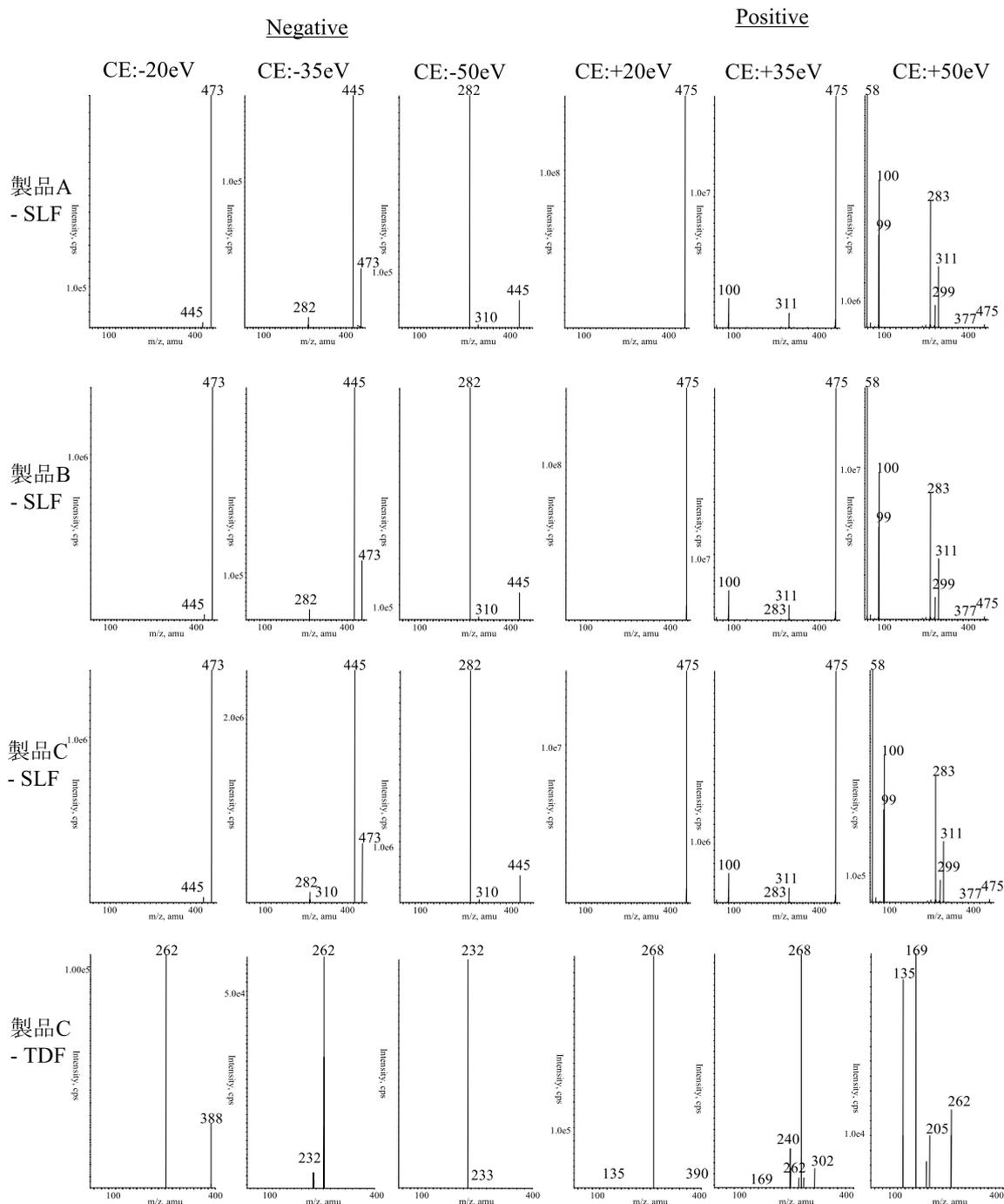


図4 試料溶液のプロダクトイオンスペクトル  
製品A：九鞭王，製品B：黒蚊神，製品C：男根増長素，SLF：シルデナフィル，TDF：タダラフィル

of (R)-Xanthoanthrafil, a Phosphodiesterase-5 Inhibitor, in a Dietary Supplement Promoted for Sexual Enhancement, *Chem. Pharm. Bull.*, 56 (2), 227-230, (2008)

- [8] 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: 健康食品中に含有するシルデナフィルの確認試験, *YAKUGAKU ZASSHI*, 121 (10), 765-769, (2001)