

短報

薄層クロマトグラフィーを用いた健康食品等に含有されるシルデナフィル及びその類似成分等の分析条件の検討

熊坂謙一, 羽田千香子, 外館史祥, 甲斐茂美

Studies on analytical conditions for sildenafil analogs and other undisclosed active ingredients found in tainted products using thin-layer chromatography

Kenichi KUMASAKA, Chikako HADA,
Fumiaki SOTODATE and Shigemi KAI

緒言

薄層クロマトグラフィー (TLC) は、最近の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 及びガスクロマトグラフィー (GC) からすれば分離性能及び検出感度は劣るものの、操作の簡便性、迅速性及び分析結果の視認性に優れるほか、検出方法として対象物質に応じた様々な手法を選択できるといった利点があり、汎用性の高い分析手法である。そのため、いわゆる健康食品及び危険ドラッグの検査では製品表示にない違法な医薬品成分や薬物を検査対象とすることから、TLCはガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC/MS) 及び液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC/MS) などの分析の前段階として、機器汚染の懸念や検出法に伴う検出成分の制限もなく、未知の新規成分も含めて試料抽出成分の全体像を視覚的に把握し易い重要なスクリーニング法として使用されている¹⁻⁶⁾。

健康食品から検出される医薬品成分として、勃起不全治療薬バイアグラの有効成分シルデナフィルクエン酸塩に代表される強壮強精医薬品成分やその構造類似成分が世界的に数多く報告されており⁶⁻⁹⁾、最近では危険ドラッグ形状の製品からの検出事例も公表されている⁹⁾。また、近年ではシルデナフィルなどと共に、異なる作用を持つダボキセチンやグリベンクラミドなどの医薬品成分が検出される事例も散見されている⁹⁾。しかし、このような

薬効が異なる医薬品成分まで対象に含めたTLCの分析条件を検討した事例はほとんどない。

そこで、健康食品等への意図的混入医薬品成分のスクリーニング法の改良を念頭に置き、本報告ではシルデナフィル及びその構造類似成分の化学構造依存的な R_f 値の挙動について検討を行った。また、これらの成分のほか、ダボキセチン、グリベンクラミド、既承認の勃起不全治療薬成分のバルデナフィル及びタダラフィルも対象に含めたTLCの分析条件として、展開溶媒組成と特徴的な呈色を示す発色試液等の検出条件の検討を実施した。

方法

1. 試薬

酢酸エチル、メタノール、アンモニア水 (28) 及びその他の試薬は和光純薬工業製の試薬特級を使用した。

2. 標準品及び標準溶液

シルデナフィルクエン酸塩、チオデナフィル (チオシルデナフィル)、ダボキセチン塩酸塩及びタダラフィルはToronto Research Chemicals社製、ホモシルデナフィル、ヒドロキシホモシルデナフィル、ホモチオデナフィル (チオホモシルデナフィル)、ホンデナフィル (アセチルデナフィル)、ヒドロキシホンデナフィル (ヒドロキシアセチルデナフィル) 及びバルデナフィルはSanta Cruz Biotechnology社製、メチソシルデナフィル (アイルデナフィル、ジメチルシルデナフィル)、チオアイルデナフィル (スルホアイルデナフィル、チオジメチルシルデナフィル) 及びヒドロキシチオホモシルデナフィルはTLC Pharmaceutical Standards社製、グリベンクラミドはSigma-aldrich社製及びカフェインは和光純薬工業製を使用した。なお、上記の括弧内の名称は当該成分の別名を示している。各標準品はそれぞれメタノールに溶解し、濃度1 mg/mLの溶液とした。なお、シルデナフィル及びダボキセチンは対塩を含む濃度とした。

3. 器材等

TLCプレートとしてHPTLCガラスプレート シリカゲル 60 F₂₅₄ (10×20 cm, メルク製) を用いた。なお、事前に120℃、30分間の加熱処理を行い、デシケーター内で放冷後に使用した。展開槽には二槽式展開槽 (CAM AG製) を使用した。また、紫外線照射及び撮影装置としてUVP社製 ChromaDoc-It TLC Imaging Systemを使用した。

4. 分析方法

展開溶媒は、厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知「ヒドロキシチオホモシルデナフィルの分析方法について」¹⁰⁾に示された酢酸エチル/メタノール/アンモニア水 (28) 混液 (90:10:1) を初期条件とし、

その他に混合比率を変更した混液（70：30：1）及び（90：10：3）について検討を行った。各標準溶液はHP TLCプレートの底辺から2 cm及び左端から2 cmの位置より10 mm間隔にて直径3 mm程度になるよう、マイクロシリッジにより1 μ Lをスポットした。その後、HPT LCプレートは展開溶媒及びろ紙を入れた展開槽内で30分間飽和したのち、約7 cm展開した。展開後、HPTLCプレートを十分に風乾したのち、各スポットの検出を次の①～③の条件により行った。検出条件①；紫外線照射（主波長254 nm）、検出条件②；10% 硫酸噴霧及び105℃10分間加熱後紫外線照射（主波長365 nm）、検出条件③；ドラージェンドルフ試液及び10% 硫酸の噴霧。なお、ドラージェンドルフ試液は第16改正日本薬局方の一般試験法の試薬試液、噴霧用ドラージェンドルフ試液¹¹⁾により調製した。

5. 検出限界の確認

検出限界は目視により十分にスポットを確認できる量とし、各標準溶液1 mg/mLをメタノールで希釈して100 μ g/mLとした液につき、スポット量を0.5 μ L、0.75 μ L、1.0 μ L及び2.5 μ Lとして上記の方法により検討した。なお、シルデナフィル及びダボキセチンには対塩があることから、希釈溶液中のシルデナフィル及びダボキセチン濃度は、それぞれ71 μ g/mL及び89 μ g/mLとなる。また、ダボキセチン塩酸塩及びグリベンクラミドは低濃度では検出できない可能性があったことから、各標準溶液1 mg/mLにつき、スポット量0.25 μ L、0.50 μ L、0.75 μ L及び1.0 μ Lを追加して検討を行った。

結果及び考察

1. 分離挙動の確認

シルデナフィルはホスホジエステラーゼ-5（PDE-5）阻害剤の一種であり、そのクエン酸塩は勃起不全治療薬パイアグラ錠として承認された医薬品成分である。また、図1に示した通り、分析対象とした構造類似成分の化学構造の違いはわずかであるが、TLCにて各スポットを十分に分離し、化学構造依存的なスポット挙動を把握できれば、新規の構造類似成分であってもその構造推定に役立つものと考えられる。

表1に示したとおり、シルデナフィルのスポットの R_f 値に対する構造類似成分の挙動を比較した場合、 R_f 値の増大要因として、チオデナフィルに代表されるピラゾロピリミジン環のケトンのチオケトンへの変換、及びホモシルデナフィル等におけるピペラジン環部位へのメチル基の結合等の影響が考えられた。なお、いずれもメチル基の付加体であるホモシルデナフィル及びメチソシルデナフィルを比較した場合、N-メチル基が延伸してN-エチル基となったホモシルデナフィルがより大きな R_f 値を示した。一方、 R_f 値の低下要因として、ヒドロキシホモシルデナフィル等に代表されるピペラジン環のアルキル鎖への水酸基の結合、及びホンデナフィル等におけるスルホニル基のアセチル基への変換が考えられた。

展開溶媒の初期条件とした酢酸エチル/メタノール/アンモニア水（28）混液（90：10：1）では、シルデナフィル及びチオデナフィルに対する各ヒドロキシホモ体との分離、及びホンデナフィル及びヒドロキシホンデナフィルの原点からの移動距離と分離が不十分であったことから、展開溶媒の混合比の検討を行った。

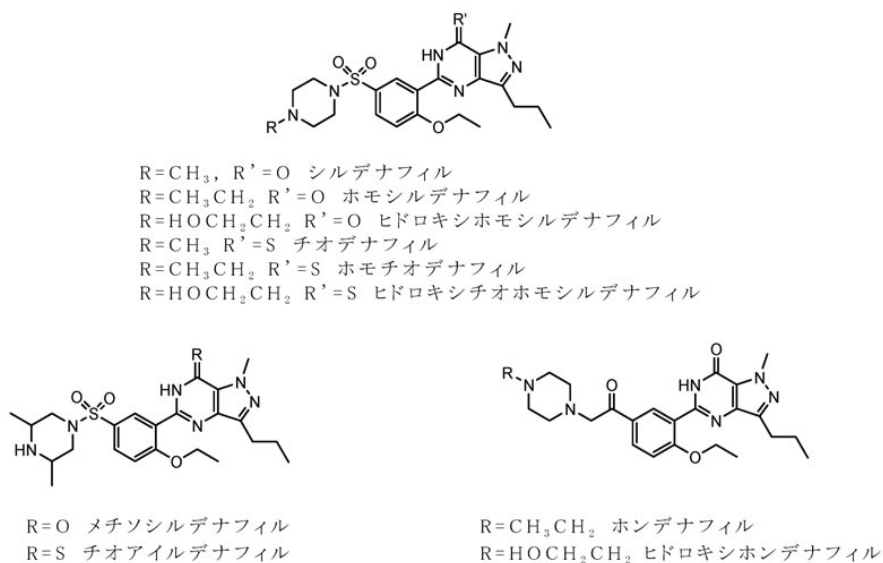


図1 シルデナフィル及びその類似成分の化学構造

メタノールの比率を高めて酢酸エチル/メタノール/アンモニア水 (28) 混液 (70 : 30 : 1) としたところ, 分析対象成分のスポットの R_f 値が増大して全体的に分離が悪化した。そのため, メタノールの比率は変更せずにアンモニア水 (28) の比率を高め, 酢酸エチル/メタノール/アンモニア水 (28) 混液 (90 : 10 : 3) を展開溶媒として分析を行った。グリベンクラミド以外の分析対象成分のスポットの R_f 値は増大し, シルデナフィル及びその類似成分の分離がより明瞭となった。特に, ヒドロキシホモシルデナフィル及びヒドロキシチオホモシルデナフィルの R_f 値は, それぞれシルデナフィル及びチオデナフィルよりも低下し, 水酸基の結合の影響がより明瞭に確認された。また, ホンデナフィル及びヒドロキシホンデナフィルの R_f 値も増大し, 併せて水酸基の結合による R_f 値の低下も明確に確認された。

なお, ダボキセチン及びグリベンクラミド, 加えて勃起不全治療薬として承認のあるバルデナフィル及びタダラフィルの各スポットの R_f 値の挙動についても検討を行った。その結果, ダボキセチンは分析対象成分の中では最も大きな R_f 値を示した。バルデナフィルとタダラフィルもシルデナフィルに対して大きな R_f 値を示したが, 一部のシルデナフィル類似成分と近似した R_f 値を示したこと

から, スポットの呈色による識別が必要と考えられた。一方, グリベンクラミドのスポットの R_f 値は小さく, その pK_a は 6.8 ± 0.15 とされることから¹²⁾, 展開溶媒組成として, わずかなアンモニア水の増加のみでは R_f 値に影響しないものと考えられた。

2. 検出条件の検討

今回検討を行った検出条件①～③について, 対象成分のスポットの呈色を確認した結果を表1に示した。検出条件①である紫外線254 nm照射では, 使用したHPTLCプレートには蛍光指示薬マンガニン活性化ケイ酸亜鉛が含まれているため, 一般的に共役二重結合や芳香族化合物などを持つ有機化合物は黄緑色蛍光の背景に黒紫色のスポット (吸収) として検出される。今回の分析対象成分ではバルデナフィルが特徴的な水色のスポットを示したほか, その他の対象成分については, ダボキセチンの検出感度に難があるものの, 黒紫色のスポットとして検出された。

次に検出の選択性を高めるため, 10%硫酸噴霧及び105℃10分加熱後紫外線365 nm照射 (検出条件②) による検出を検討した。従来の検出方法^{3,10)}では主波長254 nmの紫外線を照射していたが, 10%硫酸の噴霧状態と加熱により生じる黒色のバックグラウンドがスポッ

表1 HPTLCにおける各成分スポットの R_f 値及び各種検出方法における呈色

成分名	R_f 値 — 展開溶媒 ^{a)}			呈色 — 検出方法 ^{b)}		
	A	B	C	①	②	③
シルデナフィル	0.17	0.41	0.35	吸収	青色	黄赤色
ホモシルデナフィル	0.31	0.51	0.48	吸収	青色	黄赤色
メチソシルデナフィル	0.26	0.49	0.43	吸収	青色	黄赤色
ヒドロキシホモシルデナフィル	0.17	0.44	0.25	吸収	青色	黄赤色
チオデナフィル	0.34	0.49	0.50	吸収	青色	黄赤色
ホモチオデナフィル	0.47	0.58	0.60	吸収	青色	黄赤色
チオアイルデナフィル	0.42	0.55	0.55	吸収	青色	黄赤色
ヒドロキシチオホモシルデナフィル	0.31	0.52	0.39	吸収	青色	黄赤色
ホンデナフィル	0.09	0.30	0.28	吸収	青色	鮮やかな 黄赤色
ヒドロキシホンデナフィル	0.05	0.24	0.11	吸収	青色	鮮やかな 黄赤色
バルデナフィル	0.28	0.51	0.43	水色	nd. ^{c)}	鮮やかな 黄赤色
タダラフィル	0.48	0.59	0.57	吸収	くすんだ 青色	nd.
ダボキセチン	0.52	0.58	0.67	吸収 (淡黒紫色)	くすんだ 黄色	鮮やかな 黄赤色
グリベンクラミド	0.06	0.41	0.06	吸収	淡い青色	nd.
カフェイン	0.35	0.49	0.45	吸収	nd.	淡い赤みの 黄赤色

a) 展開溶媒の組成は酢酸エチル/メタノール/アンモニア水 (28) 混液とし, その混合比は展開溶媒Aは (90 : 10 : 1), 展開溶媒Bは (70 : 30 : 1), 展開溶媒Cは (90 : 10 : 3) とした。

b) 検出方法として, ①は紫外線254 nm照射, ②は10%硫酸噴霧及び105℃10分間加熱後紫外線365 nm照射, ③はドラージェンドルフ試液噴霧及び10%硫酸噴霧とした。

c) 「nd」: 不検出

トの検出を阻害したことから、加熱時間を5分から10分に延長して十分に加熱し、併せて主波長365 nmの紫外線を照射することとした。その結果、シルデナフィル及びその類似成分のスポットでは、視覚的に特徴的な青色の発光が認められたほか、ダボキセチンではくすんだ黄色の発光が確認され、検出条件①よりも明瞭なスポットとして確認された。また、グリベンクラミドについては、過去の報告⁵⁾では検出条件②に類似した30%硫酸噴霧及び加熱後の紫外線254 nm照射によって水色の発光が明瞭に確認されているが、今回、紫外線照射の主波長を365 nmに変更したところ発光が弱く、微量の検出確認は困難と考えられた。なお、結果には示していないが、タダラフィルのスポットは10%硫酸噴霧後の加熱時に可視光下に特徴的な紫色を呈した。この呈色は過去の報告^{3,6)}と一致した。

検出条件③にて使用したドラーゲンドルフ試液はアミン及びアルカロイド等の検出に有効とされる発色試液であり、塩基性物質が多い医薬品成分の検出方法として選択性と有用性が高い。シルデナフィル、チオデナフィル及びそれらの構造類似成分のスポットは黄赤色を呈したが、ホンデナフィル、ヒドロキシホンデナフィル、ダボキセチン及びバルデナフィルのスポットはより鮮やかな黄赤色を呈し、呈色の状況にわずかな差異が見られた。また、カフェインは検出条件①のスポットとは異なり必ずしも明瞭ではないが、淡い赤みを帯びた黄赤色の呈色が観察された。一方、タダラフィルのスポットは明瞭な

スポットとしては検出されなかった。

なお、桑山らの報告¹³⁾によれば、ドラーゲンドルフ試液噴霧後の硫酸噴霧の効果については感度の向上等への影響はないとされている。しかし、我々の検討では分析対象成分のうちドラーゲンドルフ試液のみでスポットが呈色したのはダボキセチンのみであり、その他の成分は10%硫酸噴霧により初めてスポットの呈色が確認されたことから、検出の高感度化とスポットの色調の安定化に10%硫酸噴霧が有用であると考えられた。この要因として、ドラーゲンドルフ試液の調製方法の違いによる可能性がある。日本薬局方のドラーゲンドルフ試液の調製では酸として薄めた酢酸を用いているが、桑山らが最適化を行ったドラーゲンドルフ試液の調製では塩酸を使用しており、もともと試液としての酸性度が高いことも一因として考えられる。

以上の通り3種類の検出条件を検討したが、検出条件①はその簡便性及び汎用性の高さ故に、検出方法として第一選択となりうると考えられた。また、検出条件②及び③におけるスポットの呈色挙動は、シルデナフィル類似成分と R_f 値が近似したバルデナフィル及びタダラフィルとの識別などに有用であると考えられた。

検出限界については上記の検出条件のうち、検出条件①及び特徴的な青色の発光を示した検出条件②について検討を行った。その結果は表2のとおりであり、小数点以下第二位までの値とし、シルデナフィル及びダボキセチン是对塩を含まない値として示した。TLCによるスクリーニング用途としては、分析対象としたシルデナフィル及びその類似成分についてはいずれの検出方法でも十分な検出感度を有すると考えられた。また、前述のとおり、ダボキセチンについては検出条件②におけるくすんだ黄色のスポットが特徴的かつ高感度であり、検出条件①による感度不足を補うことができると考えられた。

まとめ

HPTLCシリカゲルプレートによるシルデナフィル及びその類似成分等の分離挙動について検討を行い、その化学構造への修飾によるスポットの R_f 値への影響を確認した。また、展開溶媒として、酢酸エチル/メタノール/アンモニア水(28)混液(90:10:3)の組成が分離に最適であった。さらに、スポットの検出方法として紫外線254 nm照射のほか、発色試液の使用により特徴的な検出が可能であった。

本検討にて得られた展開溶媒組成及び検出条件については、今後、分析対象とする医薬品成分を拡大してデータを蓄積していく上で基本条件とし、いわゆる健康食品及び危険ドラッグの検査におけるスクリーニング法とし

表2 分析対象成分の検出限界

成分名	検出方法 ^{a)} (μ g)	
	①	②
シルデナフィル	0.05	0.05
ホモシルデナフィル	0.08	0.05
メチソシルデナフィル	0.08	0.08
ヒドロキシホモシルデナフィル	0.08	0.08
チオデナフィル	0.05	0.05
ホモチオデナフィル	0.05	0.05
チオアイルデナフィル	0.08	0.08
ヒドロキシチオホモシルデナフィル	0.08	0.05
ホンデナフィル	0.05	0.08
ヒドロキシホンデナフィル	0.05	0.08
バルデナフィル	0.08	— ^{b)}
タダラフィル	0.10	0.05
ダボキセチン	0.45	0.05
グリベンクラミド	0.25	0.25
カフェイン	0.08	—

a) 検出方法①は紫外線254 nm照射、②は10%硫酸噴霧及び105℃10分間加熱後紫外線365 nm照射とした。いずれの値も小数点以下第三位を四捨五入して小数点以下第二位まで示した。

b) 「—」：検討対象外

て活用できると考えている。

謝 辞

実験にあたりご協力をいただきました当所理化学部の鈴木麻希氏に深謝いたします。

参考文献

- 1) 守安貴子, 重岡捨身, 岸本清子, 石川ふさ子, 中嶋順一, 上村尚ほか: 健康食品中に含有するシルデナフィルの確認試験, 薬学雑誌, **121**, 765-769 (2001)
- 2) Mikami, E., Ohno, T. and Matsumoto, H.: Simultaneous identification/determination system for phentolamine and sildenafil as adulterants in soft drinks advertising roborant nutrition, Forensic Science International, **130**, 140-146 (2002)
- 3) 熊坂謙一, 松阪綾子, 麻生順子, 宮澤真紀, 小島尚: 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, Chromatography, **28**, 37-42 (2007)
- 4) Do, T.T.K., Theocharis, G. and Reich, E.: Simultaneous detection of three phosphodiesterase type 5 inhibitors and eight of their analogs in lifestyle products and screening for adulterants by high-performance thin-layer chromatography, Journal of AOAC International, **98**, 1226-1233 (2015)
- 5) Kumasaka, K., Kojima, T., Honda H. and Doi, K.: Screening and quantitative analysis for sulfonylurea-type oral antidiabetic agents in adulterated health food using thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography, Journal of Health Science, **51**, 453-460 (2005)
- 6) 守安貴子, 蓑輪佳子, 岸本清子, 坂本美穂, 門井秀郎, 中嶋順一ほか: 健康食品に含有される医薬品成分の分析, 東京都健康安全研究センター研究年報, **62**, 25-39 (2011)
- 7) 合田幸広: 国立医薬品食品衛生研究所における痩身や強壯を標榜する健康食品中の医薬品成分の分析と同定, 薬学雑誌, **134**, 197-202 (2014)
- 8) 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/musyounin.html>>
- 9) 国立健康・栄養研究所:「健康食品」の安全性・有効性情報－安全情報・被害関連情報 <<https://hfnet.nih.go.jp/contents/index1.html>>
- 10) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知: ヒドロキシチオホモシルデナフィルの分析方法について, 薬食監麻発0301第8号 (平成22年3月1日)
- 11) 厚生労働省告示第65号: 第十六改正日本薬局方 (平成23年3月24日)
- 12) 医薬品インタビューフォーム 経口血糖降下剤オイグルコン錠 中外製薬株式会社
- 13) 桑山健次, 辻川健治, 宮口 一, 金森達之, 岩田祐子, 井上博之ほか: 薄層クロマトグラフィーにおけるドラージェンドルフ試液調製法の違いによる検出感度への影響, 法科学技術, **10**, 127-133 (2005)