

ED (勃起不全) サプリメントに含まれる不純物分析のためのサンプル前処理

アプリケーションノート

食品試験・農業

著者

Derick Lucas
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

サプリメント業界は 5.5 % の年間成長率で急速に成長を続けており、2012 年の年間売上高は、米国だけで約 56 億ドルに達しました [1]。乾燥植物から、ビタミン、ミネラル、また天然物が添加されたエネルギードリンクまで、健康によいと言われる幅広い製品に対する消費者の関心がこの成長の主な原動力となってきました。FDA などの規制機関が消費者製品の安全性と真性を保証する目的で cGMP (current Good Manufacturing Practice) を施行しているため、サプリメントについても監視が強まっています。このような人気の高まりとともに、利ざや拡大を探るサプライヤの動きにより、不純物が含まれる原料や汚染された原料、また医薬品をスパイクした原料が含まれる製品の数が劇的に増加しています [2、3]。勃起不全 (ED) サプリメントは、シルデナフィル (バイアグラ)、タダラフィル (シアリス)、バルデナフィル (レビトラ) などの PDE-5 阻害医薬品や増え続けるこれら化合物の誘導体の添加により偽和物添加の対象になりやすい製品の 1 つです [4]。

これらのマトリックスに含まれる分析対象物の検出と測定は、マトリックスが化学的に複雑であるため困難になります。また、化学的干渉の排除、機器汚染の軽減、またマトリックス効果を考慮する必要もあります。これは、ムイラブアマ、チョウセンニンジン、シナモン、イチョウ、冬虫夏草など、1 種類の植物抽出物が含まれる、またいくつかの原料が組み合わされた ED サプリメントでますます大きな問題となります。このため、低濃度で化学的不純物を測定するには効率的で包括的なサンプル前処理が必要です。この実験では、LC/MS/MS 機器を使用した PDE-5 阻害剤および化学的不純物の微量分析のためのマトリックス除去の観点から ED サプリメントの適切なサンプル前処理の重要性を説明します。



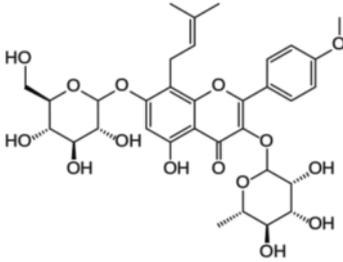
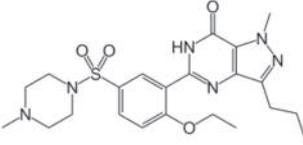
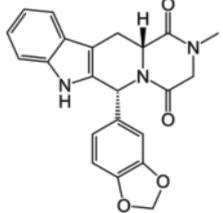
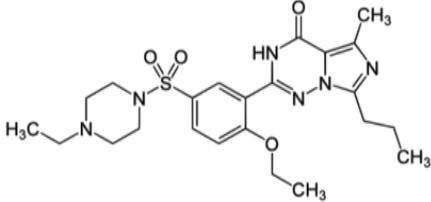
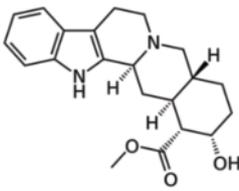
Agilent Technologies

材料とメソッド

メタノールおよびアセトニトリルは LC/MS グレードのもので、水は Milli-Q 逆浸透フィルタを使用して処理しました。水酸化アンモニウム、硫酸、ギ酸、および酢酸は分析グレードのものを使用しました。標準物質は VWR International LLC および Sigma-Aldrich Corp. から純粋な固体として入手し、10 mg を計量してメタノール

に溶解し、必要に応じて希釈することで作業用標準としました。サンプルは地元のサプリメント販売店から錠剤およびカプセルとして購入しました。製品一瓶すべてを Robot Coupe フードプロセッサでホモジナイズし、代表サンプルとしました。分析対象物の化学構造と特性を表 1 に示します。

表 1. 分析対象物の化学構造と特性

化合物名	構造	LogP*	pKa*
イカリイン		0.81	11.8
シルデナフィル		1.65	5.97
タダラフィル		1.64	15.21
バルデナフィル		1.33	6.21
ヨヒンビン		2.10	7.65

* Chemaxon ソフトウェアを使用して得られた値

表 4 に化合物のリストとその MS/MS パラメータを示します。

LC 条件

カラム： Agilent Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 100 mm、2.7 μm (p/n 695775-902)、Agilent Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 5 mm、2.7 μm ガード (p/n 821725-911)
 溶離液： A、H₂O + 0.1 % ギ酸
 B、メタノール + 0.1 % ギ酸
 注入量： 10 μL
 流量： 0.4 mL/min
 グラジエント： 10 % B で 0~0.5 分、次に 10 % B~80 % B で 0.5~9.0 分
 機器： Agilent 1290 Infinity LC システムおよび Agilent 6410 トリプル四重極質量分析装置

MS 条件

ガス温度： 300 °C
 ガス流量： 8 L/min
 ネブライザ： 35 psi
 キャピラリー電圧： 3,500 V

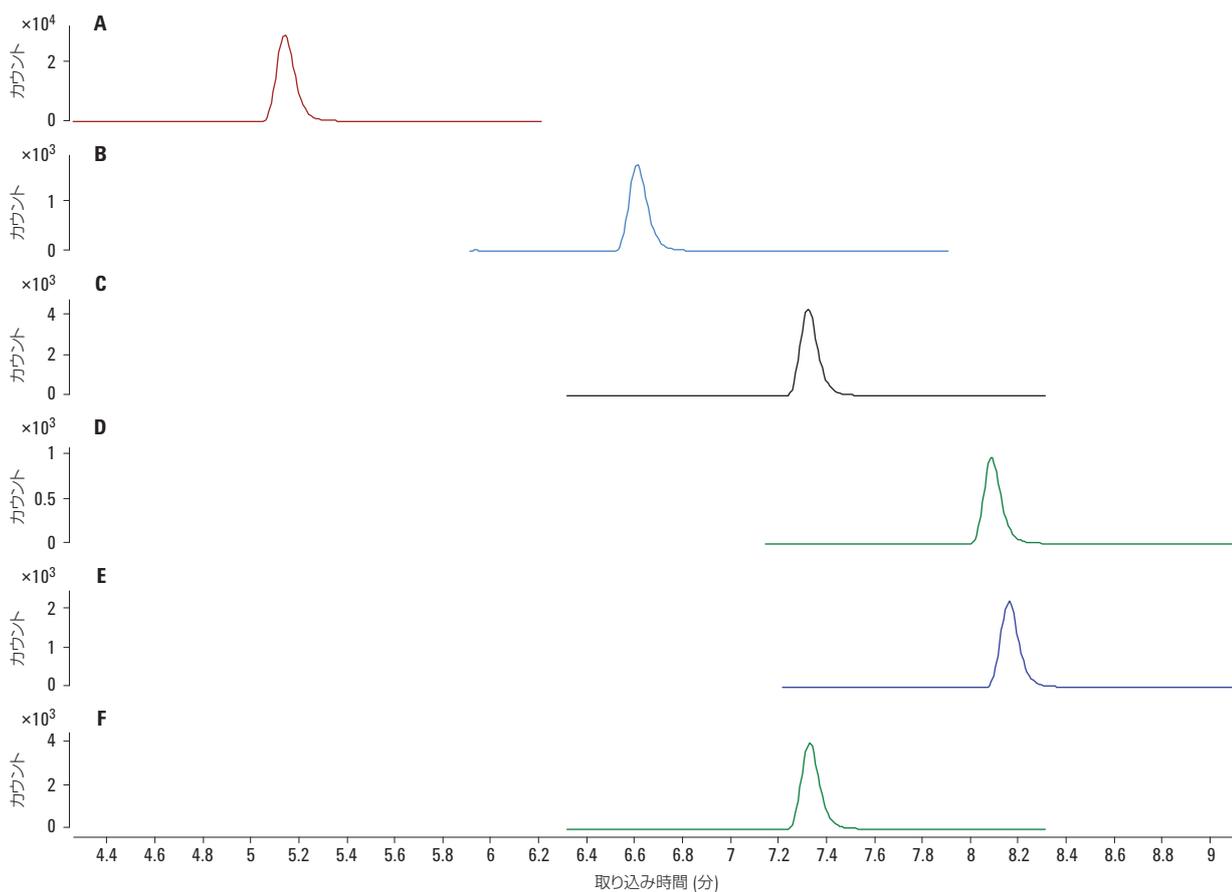


図 1. 50 ng/g の A) ヨヒンビン、B) バルデナフィル、C) シルденаフィル、D) イカリイン、E) タダラフィル、および F) シルденаフィル-d8 (IS) の 1 次トランジションの MRM クロマトグラム

サンプル前処理、修正版 QuEChERS

最初のサンプル前処理メソッドでは、食肉中残留薬物用 Agilent Bond Elut QuEChERS 分散 SPE (p/n 5982-4956) およびバルクカーボン (p/n 5982-4482) を使用しました (図 2)。

サンプル前処理、Bond Elut Plexa PC および Captiva

2 番目のサンプル前処理メソッドでは、Agilent Bond Elut Plexa PCX、1 mL、60 mg (p/n 12108601) および Captiva ND 3 mL (p/n A5300063) を使用しました (図 3)。

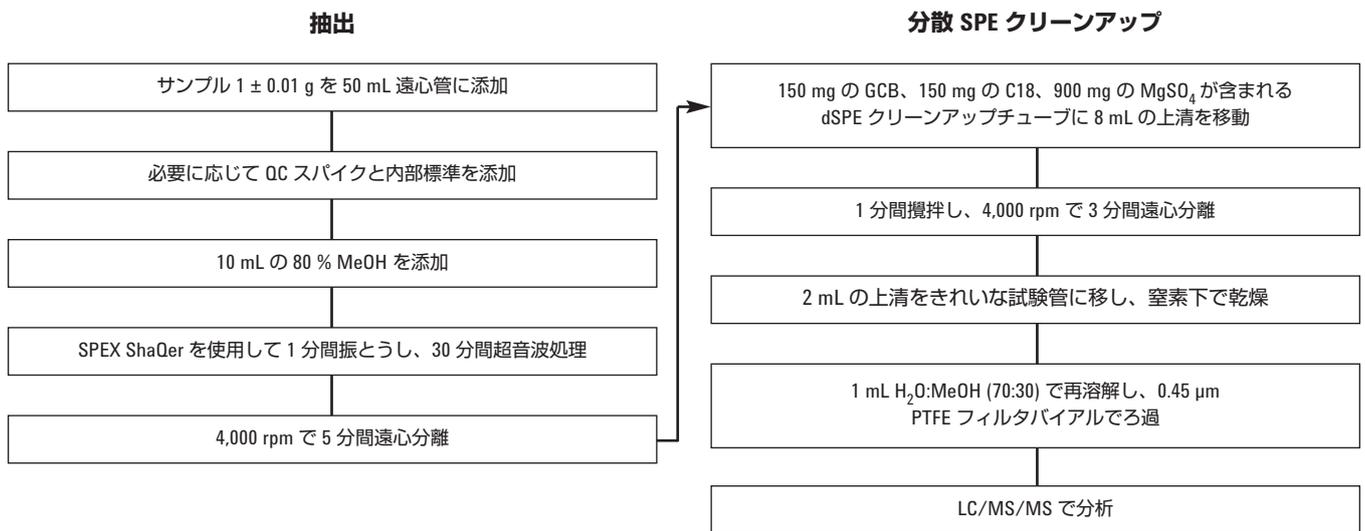


図 2. QuEChERS によるサンプル前処理ワークフロー

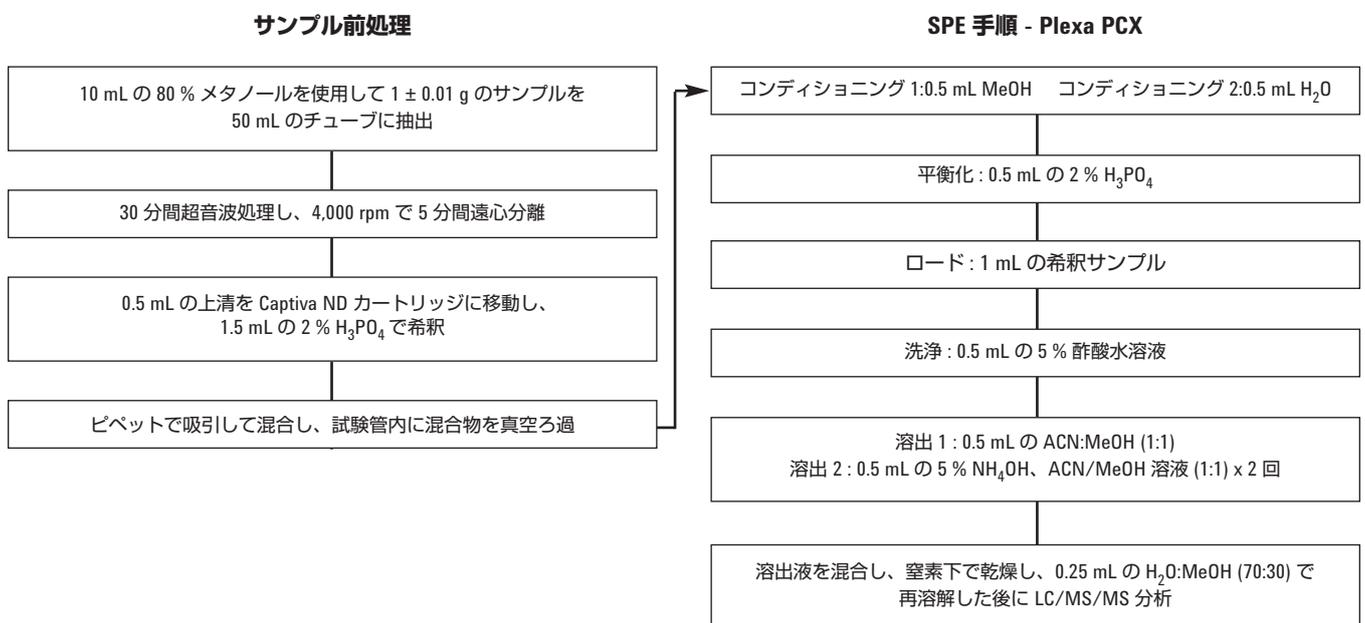


図 3. Agilent Bond Elut Plexa PCX のサンプル前処理ワークフロー

結果と考察

植物サプリメントは、化学的に複雑であることから汚れたサンプルとしてよく知られています。QuEChERS はチョウセンニンジンについて優れた性能を示しましたが、最高の性能を発揮できるサンプル前処理技術ではないため、タンデム質量分析装置の高い感度と選択性を使用しても複数の原料が含まれるマトリックスの検出下限を満たすことはできませんでした。このようなマトリックスに対応するために、分析対象物について優れた特異性を持ち、クリーンアップ能力が高く、多原料 ED サプリメントについて優れた性能を発揮する Bond Elut Plexa PCX を選択しました。分析回収率と再現性の観点からサンプル前処理の性能を示すために定量を行いました。

QuEChERS は、従来は果物および野菜中の残留農薬分析用サンプルに適用されていましたが、この手法は数多くの新しい分析対象物やマトリックスでの使用が広がっています。使いやすさ、速度、またモジュール式の手順により、QuEChERS は、PDE-5 阻害剤分析のための価値あるサンプル前処理アプローチとなりました。この実験では、80%メタノール抽出溶媒を使用し、塩の添加を省くことで QuEChERS を変更しました。クリーンアップでは、

グラファイトカーボンブラック (GCB) を食肉中残留農薬用 Bond Elut QuEChERS 分散キットに加え、色素やその他の干渉化合物を容易に除去できるようにしました。チョウセンニンジンサプリメントでは、表 2 に示すように QuEChERS は優れた回収率と再現性を示しました。ただし、このメソッドでは、複数の原料が含まれるサンプルの場合に分析対象の化合物のほとんどを検出できなかったため、QuEChERS 使用時の性能は劇的に低下しました。

QuEChERS には不適切であることがわかったマトリックスに合わせて最適化した Bond Elut Plexa PCX を、分析対象物の pKa に基づいて選択しました。リン酸による処理で分析対象物のカチオン種が形成され、その結果、SPE カートリッジの固定相との間に強い相互作用が発生しました。溶出ステップで水酸化アンモニウムを適用することにより分析対象物の脱プロトン化が発生し、固定相に対するその親和性が変化しました。イオン交換技術の選択性の拡張により、さらにクリーンなサンプルが得られました。表 3 に示すように、イカリインを除き性能は良好でした。図 4 では、ブランクマトリックスと、20 ppb でスパイクしたクリーンなサンプル抽出物のクロマトグラムの比較によりサンプルのクリーン性が向上したことがわかります。

表 2. チョウセンニンジンに添加した分析対象物の QuEChERS での回収率、再現性、および直線性 (n = 3)

分析対象物	20 ppb		50 ppb		100 ppb		R ²
	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)	
シルデナフィル	84.1	4.4	91.4	7.4	103.6	3.7	0.9998
バルデナフィル	58.5	15.6	80.5	16.6	95.9	11.1	0.9996
タダラフィル	80.2	10.4	85.5	10.6	103.5	4.5	0.9982
イカリイン	103.5	5.5	111.8	8.9	127.5	6.4	0.9971
ヨヒンビン	99.1	5.5	105.8	6.0	115.2	3.4	0.9995

表 3. 複雑な ED サプリメントでの Plexa PCX の回収率、再現性、および直線性 (n = 3)

分析対象物	20 ppb		50 ppb		100 ppb		R ²
	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)	
シルデナフィル	87.1	1.0	85.9	2.8	84.1	1.4	0.9999
バルデナフィル	83.8	6.4	83.3	6.1	84.0	4.7	0.9999
タダラフィル	76.0	6.0	80.1	5.6	87.4	3.6	0.9974
イカリイン	43.6	7.8	51.7	20.1	110.8	28.1	0.9994
ヨヒンビン	84.6	1.8	81.7	3.0	82.7	2.1	0.9967

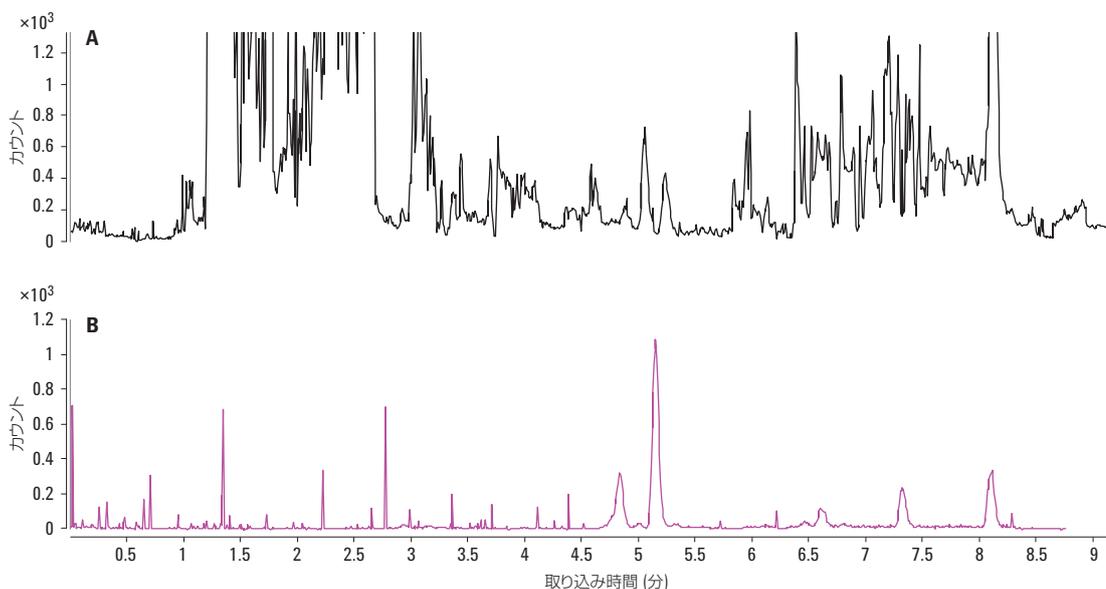


図 4. クリーンアップなしの ED サプリメントブランク (A) および Agilent Bond Elut Plexa PCX を使用したクリーンアップ後の 20 ppb スパイク (B) の MRM TIC クロマトグラム

結論

LC/MS/MS を使用し、勃起不全サプリメント中のシルデナフィル、バルデナフィル、タダラフィル、イカリイン、およびヨヒンビンの分析について 2 つのサンプル前処理手法を確認しました。1 つのカプセルまたは錠剤に 1 種類または複数の成分が含まれることがあるため、これらのマトリックスは複雑さの程度が大幅に異なります。QuEChERS は中程度のメソッド開発しか必要としませんが、複雑なマトリックスに低い濃度で含まれるこのような分析対象物を有効に測定するにはクリーンアップが不十分でした。このような複雑なサンプルでは、カートリッジベースの SPE の選択性を利用した方がクリーンな抽出物が得られ、その結果、このように低濃度で優れた結果が得られました。選択した分析対象物は、拡大を続ける PDE-5 医薬品誘導体ライブラリの代表的な親化合物にすぎませんが、この実験は、直接適用することも、拡張された分析対象物リストに対応するために必要に応じて変更することもできる前処理の方法を提供します。このサンプル前処理選択プロセスは、複雑さの程度が異なる他のマトリックスに適用することも、異なる分析対象物に合わせて調整することでサンプルをさらにクリーンにし、メソッド性能を向上することもできます。

参考文献

1. M. Blumenthal, A. Lindstrom, C. Ooyen, M. E. Lynch. *HerbalGram*, **99**, 60 (2013).
2. M. Nicoletti. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **63**, 2 (2012).
3. P. A. Cohen, J. C. Travis, B. J. Venhuls. *Drug Test Anal.* (2013).
4. F. Song, A. El-Demerdash, S-J. S. H. Lee. *J. Pharma. Biomed. Anal.* **70**, 40 (2012).

詳細

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

付録

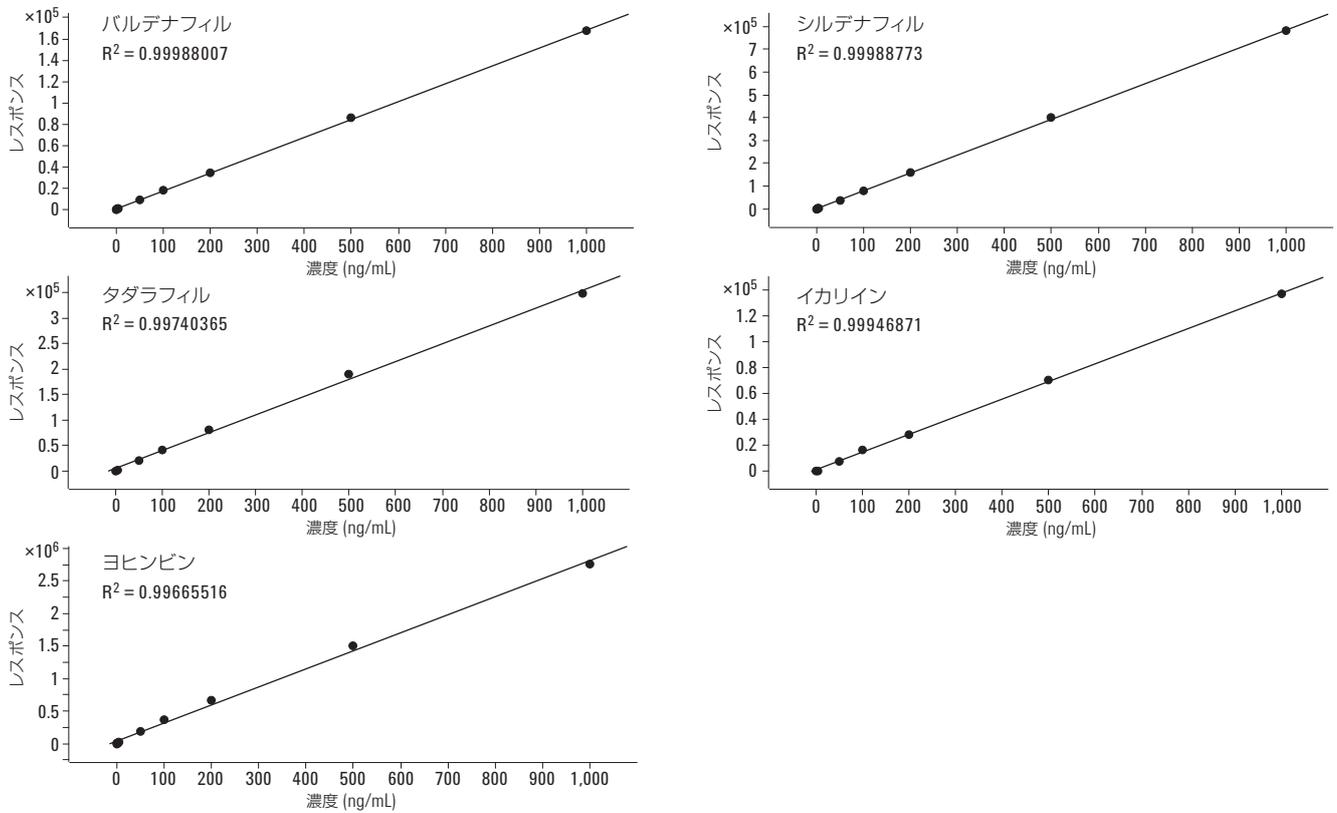


図 5. 1~1,000 ppb の範囲で作成したバルデナフィル、シルデナフィル、タダラフィル、イカリイン、およびヨヒンビンの検量線

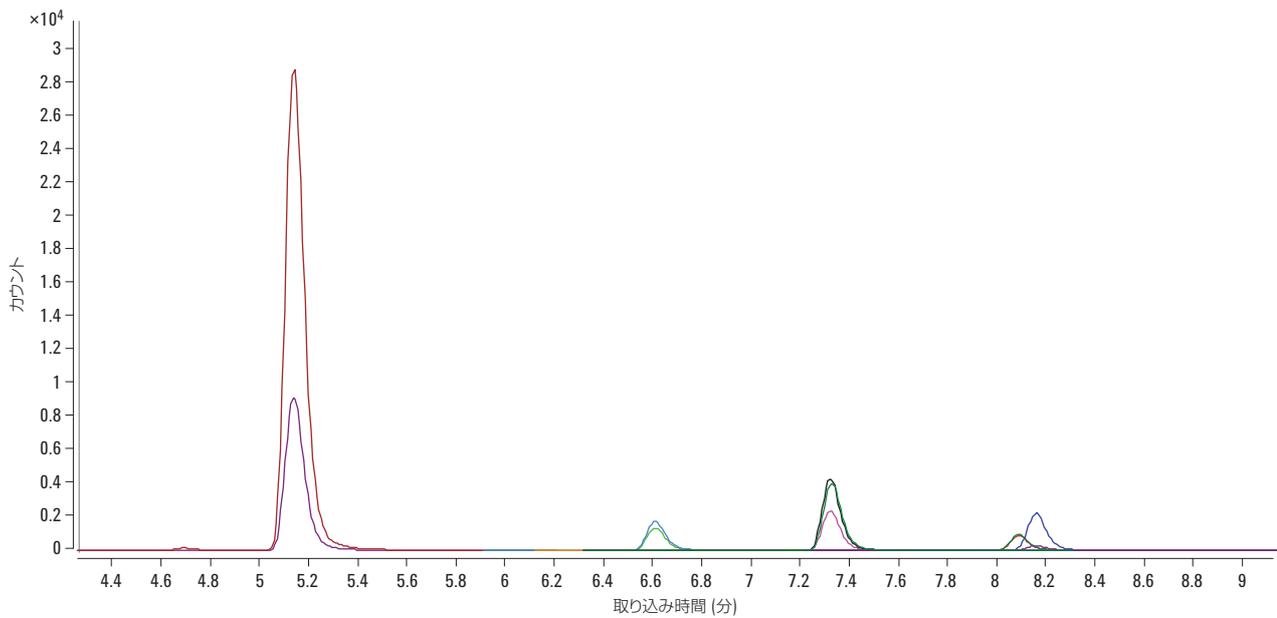


図 6. 分析対象物 (50 ppb) の 1 次および 2 次トランジションの MRM クロマトグラムの重ね表示

表 4. 分析対象物の MS パラメータおよびリテンションタイム

分析対象物	MRM 1、コリジョンエネルギー (V)	MRM 2、コリジョンエネルギー (V)	フラグメントエネルギー (V)	T _R (min)
ヨヒンビン	354.9 > 143.9 (25)	354.9 > 211.9 (20)	175	5.138
バルデナフィル	489.0 > 151.0 (30)	489.0 > 311.8 (40)	135	6.610
シルデナフィル	475.0 > 57.7 (50)	475.0 > 100.0 (30)	135	7.317
シルデナフィル-d8	483.4 > 108.0 (30)	—	135	7.324
イカリイン	676.9 > 368.6 (20)	676.9 > 530.6 (10)	125	8.082
タダラフィル	390.0 > 268.0 (5)	390.0 > 135.0 (10)	135	8.154

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2014

Printed in Japan

February 3, 2014

5991-3638JAJP



Agilent Technologies