

原著論文

健康食品中の塩酸ヨヒンピンの HPLC 分析法

森田邦正, 毛利隆美, 中川礼子

逆相系的高速液体クロマトグラフを使って, 健康食品中の塩酸ヨヒンピンの分析法を検討した. 健康食品中の塩酸ヨヒンピンは 0.1%酢酸メタノールで抽出し, Bond Elut Certify カートリッジ(固相抽出法)を用いて 2 %アンモニア水-メタノール溶液でクリーンアップした. 高速液体クロマトグラフはカラムに Cosmosil 5C18-MS- (4.6 x 150 mm, 5 μ m) を, 移動相に pH7 の 0.02 mol/L リン酸塩緩衝液 / アセトニトリル (65:35, v/v) を用い, 測定波長 276nm で分析した. 本法による健康食品からの塩酸ヨヒンピンの回収率は 99.5%, 定量下限値は 0.03 mg/g であった.

[キーワード : 塩酸ヨヒンピン, HPLC, 固相抽出法, 健康食品, 強壮剤]

1 はじめに

平成17年12月, いわゆる健康食品から薬草に含まれる医薬品成分が検出された. 厚生労働省は健康被害の発生のおそれが否定できないため, 「インヨウカク等強壮目的で使用される生薬が検出されたいわゆる健康食品について」注意喚起し, 商品名と検出された医薬品成分名を公表した. その成分名はヨヒンピン, インヨウカク及びダミアナで, 滋養・強精・強壮効果のある生薬として医薬品や薬用酒等に配合されている成分であった. 塩酸ヨヒンピンについては, 東京都の調査で市販の健康食品 6 製品から 0.10 - 5.56 mg / 錠, 検出したと報告されている¹⁾.

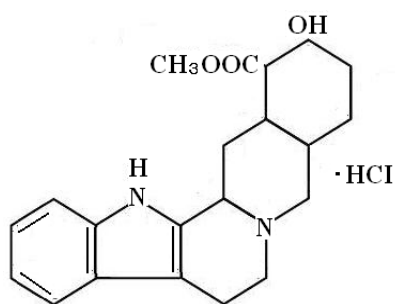


図 1 塩酸ヨヒンピンの化学構造式

ヨヒンピンはアフリカ西部地方のヨヒンベという植物の葉や樹皮に含まれるアルカロイドから抽出される成

分であり, 塩酸ヨヒンピンはその化学合成品である. 強精・強壮剤として神経衰弱性陰萎, 衰弱性射精, 老人性陰萎に適應される. 副作用として皮膚の発疹・かゆみ, めまい・発汗, 吐き気・嘔吐の消化器症状が現れることがある. 日本では塩酸ヨヒンピンは医薬品に該当し, 大東製薬工業(株)の添付文書によると, 1錠当たり 5 mg を, 1日3回服用する.

図 1 に塩酸ヨヒンピンの化学構造式を示す. 塩酸ヨヒンピンの化学式は $C_{21}H_{26}N_2O_3 \cdot HCl$ (m.w. 390.9) である.

塩酸ヨヒンピンに関する試験法として, 血中の塩酸ヨヒンピンを ODS カラムと pH3.5 の 0.025 mol/L リン酸塩緩衝液 / メタノール (55:45, v/v) に 0.01 mol/L のヘプタンスルホン酸ナトリウムを溶かした移動相を用いて測定する方法²⁾と健康食品中の塩酸ヨヒンピンを ODS カラムとアセトニトリル / 水 / リン酸 (450:550:0.7, v/v) に 6 g/L のラウリル硫酸ナトリウムを溶かした移動相を用いて測定する方法¹⁾, いずれもイオンペアー試薬を用いた試験法が報告されている.

近年, 国民の健康志向に伴っていわゆる健康食品に医薬品が違法に添加されたものが, 店頭や通信販売で流通するようになった. このような無承認無許可医薬品あるいは健康被害が発生するおそれがある製品について, 著者らは健康被害を未然に防ぐため, 医薬品等の成分検査を実施している. しかし, 市販の健康食品には多種類の妨害成分が存在するため, HPLC を用いて分析するには精製が必要である. そこで, 固相抽出法でクリーンアップし, HPLC で分析する方法を検討した.

2 実験方法

2・1 試薬

塩酸ヨヒンビン標準品は和光純薬工業（株）製のヨヒンビン塩酸塩を用いた。塩酸ヨヒンビンを 20.0 mg 秤量し、pH7 の 0.02 mol/L リン酸塩緩衝液 / アセトニトリル（65:35, v/v）を加えて 100 ml とし冷暗所に保存した。使用時、pH7 の 0.02 mol/L リン酸塩緩衝液 / アセトニトリル（65:35, v/v）を加えて希釈し 10 - 20 ppm の標準溶液を調製した。

陽イオン交換体ミニカラムは Varian 製の Bond Elut Certify カートリッジ（LRC, 300 mg, 10 ml）を用いた。メタノール及びアセトニトリルは和光純薬工業（株）製の HPLC 分析用を用いた。2 % アンモニア水-メタノール溶液はアンモニアを 2 % 含むアンモニア水-メタノール溶液を調製した。

2・2 装置

紫外吸光度検出器（SPD-10AV）及びデータ処理装置（C-R3A）付 HPLC は島津製作所（株）製の LC10A を、カラムはナカライテスク（株）製の Cosmosil 5C18-MS-（4.6×150mm, 5 μm）を使用した。

2・3 実験操作

2・3・1 塩酸ヨヒンビンの分析法

健康食品 0.1 g を 10 ml の試験管に秤量し、0.1 % 酢酸メタノール 2 ml で 2 回、10 分間振とう抽出した。遠心分離（2500 rpm）した後 0.1 % 酢酸メタノール層を採取した。抽出液は窒素ガス気流下 40 - 50 °C で約 1 ml まで濃縮後、0.1 % 酢酸溶液を加えて 5 ml とした。Bond Elut Certify カートリッジにメタノール 2 ml、水 2 ml、0.1 % 酢酸溶液 2 ml を順次流しコンデショニングした。これに抽出液 5 ml を流し込み、塩酸ヨヒンビンを保持させた後、水 2 ml 及びメタノール 2.5 ml で洗浄した。2 % アンモニア水-メタノール溶液 2 ml を流し塩酸ヨヒンビンを溶出した。溶出液は窒素ガス気流下 40 - 50 °C で乾固後、移動相を加えて 4 ml にした後、0.45 μm のフィルターでろ過し HPLC 用試験溶液を調製した。

2・3・2 塩酸ヨヒンビンの HPLC 測定条件

カラム	Cosmosil 5C18-MS-（4.6×150mm, 5 μm）
カラム温度	45
移動相	pH7 の 0.02 mol/L リン酸塩緩衝液 / アセトニトリル（65:35, v/v）
流量	0.8 ml / 分
注入量	10 μl
測定波長	276nm

保持時間 塩酸ヨヒンビン：12.4分

3 結果及び考察

3・1 塩酸ヨヒンビンの HPLC 測定条件の検討

Cosmosil 5C18-MS- のカラムを用いて 10 ppm の塩酸ヨヒンビン標準溶液を 2 種類の移動相：0.02 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 / アセトニトリル（70:30, v/v）及び pH7 の 0.02 mol/L リン酸塩緩衝液 / アセトニトリル（65:35, v/v）で測定した。生体試料及び医薬品製剤の塩酸ヨヒンビンの分析法として、ODS カラムを用いてイオンペアークロマトグラフィーが報告されているが^{1,2)}、図 2 の HPLC クロマトグラムに示すように 2 種類の移動相いずれも良好な形状のピークが得られたため、本法ではイオンペアー試薬を使用しないことにした。

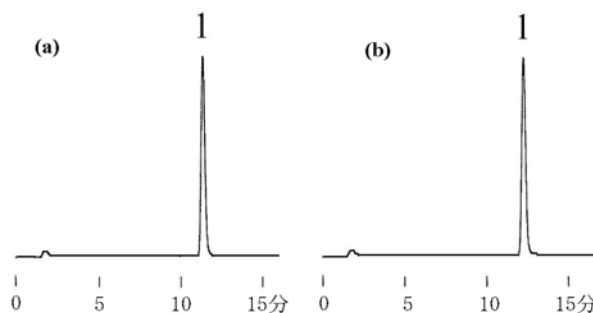


図 2 2 種類の移動相；0.02 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 / アセトニトリル（70:30, v/v）(a), pH7 の 0.02 mol/L リン酸塩緩衝液 / アセトニトリル（65:35, v/v）(b) で測定した各々 10ppm の塩酸ヨヒンビン標準溶液の HPLC クロマトグラム

1, 塩酸ヨヒンビン

3・2 標準溶液の溶剤が保持時間、ピーク高さ及びピーク面積に及ぼす影響

9 種類の溶剤を用いて各々 20 ppm 標準溶液を調製した後、塩酸ヨヒンビンを 2 種類の移動相で測定し、標準溶液の溶剤が保持時間、ピーク高さ及びピーク面積に及ぼす影響を比較検討した。その結果を表 1 に示した。

0.02 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 / アセトニトリル（70:30）で測定した場合、移動相に溶かした標準溶液の保持時間は 11.5 分であったが、塩基性のアンモニア水-メタノール溶液の保持時間は移動相溶液と比べて 1.0 - 3.5 分長くなり、逆に酸性のリン酸及び酢酸系溶液の保持時間は 0.4 - 0.5 分短くなった。ピーク高さは移動相溶液と比べて酸性のリン酸及び酢酸系溶液が 33 - 40 % 低く、かなりの低下を示したが、一方、ピーク面積は 1 - 4 % の低下で大きな変動は認められなかった。

pH7の0.02 mol/L リン酸塩緩衝液 / アセトニトリル (65:35, v/v) で測定した場合、移動相に溶かした標準溶液の保持時間が12.4分であったのに対して、その他の溶剤が12.3 - 12.5分の範囲で大きな変動は認められなかった。ピーク高さ及びピーク面積は0.2%アンモニア水-メタノール溶液が移動相溶液と比べて13 - 15%低下したが、その他の溶剤には大きな変動はみられなかった。本法では保持時間とピーク高さ及びピーク面積の変動が少なかった pH7の0.02 mol/L リン酸塩緩衝液 / アセトニトリル (65:35, v/v) を移動相に使用することにした。

表 1 標準溶液の溶剤が保持時間、ピーク高さ及びピーク面積に及ぼす影響

溶剤	保持時間	ピーク	
		高さ	面積
移動相：0.02 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 / アセトニトリル			
メタノール	11.5	81	84
0.1%リン酸メタノール	11.0	58	98
0.1%リン酸溶液	11.0	64	101
0.1%酢酸メタノール	11.1	63	100
0.1%酢酸溶液	11.1	65	100
2%アンモニア水-メタノール溶液	15.0	111	98
0.2%アンモニア水-メタノール溶液	12.5	93	85
0.02 mol/L 酢酸アンモニウム / アセトニトリル	11.5	97	102
リン酸塩緩衝液 / アセトニトリル *	11.5	100	100
移動相：pH7の0.02 mol/L リン酸塩緩衝液 / アセトニトリル			
メタノール	12.4	90	91
0.1%リン酸メタノール	12.3	88	90
0.1%リン酸溶液	12.4	99	98
0.1%酢酸メタノール	12.3	98	98
0.1%酢酸溶液	12.4	93	93
2%アンモニア水-メタノール溶液	12.5	102	97
0.2%アンモニア水-メタノール溶液	12.4	87	85
0.02 mol/L 酢酸アンモニウム / アセトニトリル	12.4	93	92
リン酸塩緩衝液 / アセトニトリル *	12.4	100	100

*pH7の0.02 mol/L リン酸塩緩衝液 / アセトニトリル

**各々の溶剤で20ppm塩酸ヨヒンビン標準溶液を調製した。

**ピーク高さ及びピーク面積はpH7の0.02 mol/L リン酸塩緩衝液 / アセトニトリル移動相溶液を100として示した。

3・3 抽出溶剤の検討

HPLC クロマトグラム上で、塩酸ヨヒンビンの保持時間付近に共存する成分が認められなかった健康食品 A を用いて、抽出溶剤の検討を行った。塩酸ヨヒンビン40 µg

を添加した0.2 gの健康食品 A に、表2に示す9種類の溶剤を各々2 ml 加え5分間振とうした後、30秒間超音波処理した。遠心分離後、上清を採取し 0.45 µm のフィルターで過し試料溶液とした。HPLC の移動相には pH7 の0.02 mol/L リン酸塩緩衝液 / アセトニトリル (65:35, v/v) を使用し、塩酸ヨヒンビンをピーク面積で定量した。その結果、9種類の溶剤の抽出率は77%以上と良好であった (表2)。メタノールを使用した0.1%リン酸メタノール及び0.1%酢酸メタノールが0.1%リン酸溶液及び0.1%酢酸溶液に比べて抽出率が向上した。本法では9種類の溶剤の中で最も抽出率が高かった0.1%酢酸メタノールを抽出溶剤に用いた。

表2 塩酸ヨヒンビンの抽出溶剤の検討

溶剤	抽出率
メタノール	93.8
0.1%リン酸メタノール	88.0
0.1%リン酸溶液	78.9
0.1%酢酸メタノール	98.0
0.1%酢酸溶液	77.3
2%アンモニア水-メタノール溶液	84.6
0.2%アンモニア水-メタノール溶液	87.9
0.02 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 / アセトニトリル	87.0
pH7の0.02 mol/L リン酸塩緩衝液 / アセトニトリル	88.5

*健康食品 A において塩酸ヨヒンビンは不検出であった。

**0.2g の健康食品 A に塩酸ヨヒンビンをそれぞれ40 µg 添加した。実験回数1回

3・4 共存物質の除去

試料抽出液中の共存物質を Bond Elut Certify カートリッジを用いてクリーンアップする方法を検討した。塩酸ヨヒンビン200 µg を Bond Elut Certify カートリッジに保持させ、2 %アンモニア水-メタノール溶液の溶出量を検討した。その結果、2 %アンモニア水-メタノール溶液 0 - 1 ml では塩酸ヨヒンビン溶出量は添加量の97.3%、1 - 2 ml の溶出量は添加量の2.3%、2 - 3 ml の溶出量は添加量の0%であった。このことからクリーンアップ操作時において、2 %アンモニア水-メタノール溶液量は2 ml とした。実試料の測定時には溶出液を窒素ガス気流下で乾固後、移動相を加えて4 ml にした。

図3に添加回収試験で得られた健康食品 B のクリーンアップ前 (a) とクリーンアップ後 (b) の HPLC クロマトグラムを示した。Bond Elut Certify カートリッジを用いることにより、クリーンアップ前の健康食品 B のク

ロマトグラム上で、塩酸ヨヒンビンと重なるピークと塩酸ヨヒンビンの保持時間付近に出現するピークを効果的に除去することができた。

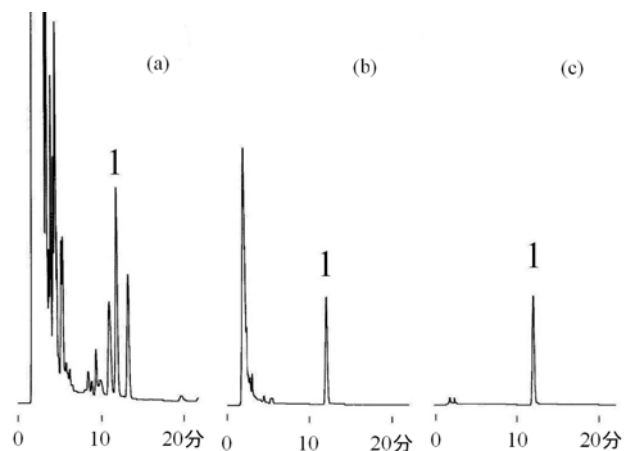


図3 健康食品Bのクリーンアップ前(a)とクリーンアップ後(b)及び医薬品(c)のHPLCクロマトグラム

1, 塩酸ヨヒンビン

3・5 塩酸ヨヒンビンの回収率と再現性

市販されている健康食品B(納豆菌を含有するダイエット用健康食品)を用いて添加回収実験を行った。健康食品0.1gに塩酸ヨヒンビンをそれぞれ40μg添加し実験操作に従って回収率を求めた。繰り返し実験は4回行い、その結果を表3に示した。

塩酸ヨヒンビンの回収率は99.5%(96.4-102.5%)で、変動係数は5%以内でありほぼ満足する結果を得た。本法による塩酸ヨヒンビン定量下限値は0.03mg/gであ

った(S/N 5)。

本法を医薬品として販売されている大東製薬工業(株)製のガラナポーンに応用した(図3c)。その結果、塩酸ヨヒンビンが47mg/g検出された。図3cに示すように、本法は医薬品試験にも十分応用できることが分かった。

表3 健康食品からの塩酸ヨヒンビンの添加回収試験結果

	塩酸ヨヒンビン	
	回収率	標準偏差**
健康食品B	99.5	3.1

*健康食品Bにおいて塩酸ヨヒンビンは不検出であった。

**健康食品0.1gに塩酸ヨヒンビンをそれぞれ40μg添加した。実験回数(n=4)

4. まとめ

健康食品中の塩酸ヨヒンビンのHPLC分析法を検討した。その結果、ODSカラムにpH7の0.02mol/Lリン酸塩緩衝液の移動相を使用し良好な分離が得られた、またBond Elut Certifyカートリッジを用いることにより共存物質を効果的に除去することができた。回収率、再現性ともにほぼ満足する結果を得た。

文献

- 1) 宮武ノリエ他：東京衛研年報，51，29-33，2000.
- 2) R. Chiba et. al. : Anal. Sci., 14，975-978，1998.

Analysis of Yohimbine Hydrochloride in Health Foods by HPLC

Kunimasa MORITA, Takami MOHRI, Reiko NAKAGAWA

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,
Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan*

A reverse-phase HPLC method for determining yohimbine hydrochloride in health foods is described. Yohimbine hydrochloride in health foods was extracted with 0.1% acetic acid in methanol. The sample solution for HPLC was applied to Bond Elut Certify (solid phase extractions) with 2% ammonium hydroxide in methanol as the mobile phase. HPLC analysis was carried out on a column of Cosmosil 5C18-MS- (4.6 x 150 mm, 5 microns) with 0.02 mol/L phosphate buffer pH 7.0 /acetonitrile (65:35, v/v) as the mobile phase and the eluate was monitored by UV detection at 276 nm. The average recovery of yohimbine hydrochloride from health food was 99.5%. The quantitation limit of this method was 0.03mg/g.

[Key words; Yohimbine hydrochloride, HPLC, Solid phase extractions, Health Food]