

インターネットで購入した痩身薬 Zenigal の含有成分同定

分担研究者 前川京子 (同志社女子大学薬学部)
研究協力者 高橋知里 (同志社女子大学薬学部)
研究協力者 佐々木瑞紀 (同志社女子大学薬学部)

研究要旨

【目的】偽造医薬品とは、同一性や起源について故意に偽表示がされた医薬品であり、本邦でもその流通及び健康被害が報告されている。当研究室では、以前にインターネットの個人輸入代行サイトを介して購入した抗肥満薬 Zenigal を高速液体クロマトグラフ (HPLC) / 紫外吸光光度計により分析し、本医薬品が表示有効成分であるオルリスタットを含有しない偽造医薬品であることを明らかにした。一方で、本医薬品には強い UV225 nm に吸収をもつピークが存在し、オルリスタット以外の未知成分が含有されている可能性が示された。今回、本医薬品を質量分析計 (MS) により分析し、未知の含有成分を同定することを目的とした。

【方法】Zenigal の 1 カプセルの内容物にメタノールを加えて攪拌後、上清を分取した。一部は、さらに陽イオン交換ポリマーにより固相抽出を行った後、HPLC トリプル四重極型 MS を用いた Q3 スキャンにより含有成分を探索した。強度の高いピークのプロダクトイオンスキャンを行い、得られたフラグメントイオンのスペクトルパターンを公共データベースを用いて検索した。検索結果のうち、一致度が高い候補化合物の標準品を購入し、含有成分を同定した。また、選択反応モニタリング法による定量系を構築し、1 カプセルあたりの含有量を算出した。

【結論】Q3 スキャンにより m/z 152、280 のピークを検出し、 m/z 280 のピークは本薬には含有表示がない抗肥満作用を有するシブトラミンの可能性が示唆された。シブトラミン標準品と比較し、保持時間及びフラグメントイオンのスペクトルパターンの一致を確認した。1 カプセル中のシブトラミン含有量を定量したところ、635 ng/1 カプセルであった。 m/z 152 のピーク同定には至らなかった。

【考察】今回、インターネットで入手可能な抗肥満薬に、表示成分を含有せず、表示成分以外の有効成分を含む偽造医薬品を認めた。LC/MS は、偽造が疑われる医薬品中の未知含有成分を同定・定量する有用な手段であるといえる。

A. 研究目的

偽造医薬品とは、「同一性や起源について偽表示がされた医薬品」と定義されており、記

載されている成分と異なる成分が含まれているものや、有効成分が含まれていないもの、有効成分が不足または過剰なものが存

在する。かつては、外観から偽造が判断できるものもあったが、現在は、偽造技術の高度化や組織的な犯罪集団の関与により巧妙化し、容易に判別することができないようになっている。

偽造医薬品の流通は開発途上国市場に限ったものでなく、インターネットを利用した個人輸入により処方箋医薬品や未承認医薬品を自己責任のもとで容易に入手できるようになったことから、本邦も含め世界中に流通している。それらの多くは流通経路が不明であり、偽造医薬品や未承認薬、誤った情報も混入している。

さらに、偽造品は医薬品だけとは限らず、サプリメントもその対象である。インターネットの普及に伴ってサプリメントの流通は急速に広まり、世界各国で様々なサプリメントが流通している。

H21 年度に、個人輸入を代行しているインターネット上の web サイトから、「やせ薬」や「ダイエット薬」を標榜している製品を購入し調査した結果、インドの製造会社より購入した「Zenigal」に表示有効成分であるオルリスタットが含有されておらず、別の未知成分が含有されている可能性が示唆された[1]。そこで、本研究では、「Zenigal」に含有されている未知成分の同定を LC/MS を用いて行うことを目的とした。

B. 研究方法

B-1. 未知成分の同定

Zenigal のカプセルから、内容物の全量を取り出し、秤量後、20 mg/mL となるようにメタノール (MeOH) を加え、1 時間 vortex した。遠心(3000 rpm, 3 min)により分取した上清を適宜希釈して、試料溶液とした。

Norephedrine-d3 標準品 (シグマアルドリッチジャパン合同会社) 及びシブトラミン標準品 (富士フィルム和光純薬株式会社) を MeOH に溶解し、0.5 ~ 1.0 mg/mL の標準溶液とした。試料溶液及び標準溶液を、LCMS-8040 (SHIMADZU) を用い、下記に示す条件で分析した。

<HPLC 条件>

移動相 : (A) 10 mM ギ酸アンモニウム

(B) 100% アセトニトリル

カラム : Shim-Pack, FC-ODS 3 μ m, 75 \times 2.0 mm

注入量 : 10 μ L

流量 : 0.3 mL/min

タイムプログラム : 0-15 min : 5-85% B, 15-20 min : 85% B, 20-20.1 min : 85-5% B, 20.1 -25 min : 5% B

カラムオープン : 40

PDA : 190-800 nm

<MS 条件>

イオン化法 : エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法

測定モード : positive ion mode Q3 scan, negative ion mode Q3 scan, single ion monitoring (SIM), product ion scan, multiple reaction monitoring (MRM)

インタフェース電圧 : +4.5 kV (チューニングファイル値)

DL 温度 : 250

ブロックヒーター温度 : 400

B-2 シブトラミンの定量

シブトラミン標準品 (富士フィルム和光純薬株式会社) を MeOH に溶解し、5, 10, 20, 50, 100, 200 ng/mL 溶液を調製し、検量線作成用標準溶液とした。Quality Control (QC)

溶液として、シブトラミン 75 ng/mL MeOH 溶液を調整した。Zenigal のカプセル 10 個それぞれから、内容物の全量を取り出し、秤量後、20 mg/mL となるように MeOH を加え、1 時間 vortex した。遠心 (3000 rpm, 3 min) により分取した上清を 2 倍希釈して、試料溶液とした。逆相-強陽イオン交換ポリマーである OASIS MCX カートリッジ (60 mg, waters) に MeOH 2 mL、精製水 2 mL、HCl (1 1000) 2 mL を順次通して、コンディショニングを行った。上記の標準溶液、QC 溶液、及び試料溶液を HCl (1 1000) で 2 倍希釈した後、2 mL ずつ負荷した。次に HCl (1 1000) 2 mL、MeOH 2 mL で MCX カートリッジを洗浄し、2% アンモニア MeOH 溶液 2 mL で溶出した。試料溶液及び標準溶液を、LCMS-8040 (SHIMADZU) を用い、MRM 法 (280.0>125.05) により分析した。HPLC 条件、及び MS 条件は B-1 に示す条件と同様とした。標準溶液から得た検量線を用いて、試料溶液のシブトラミンのピーク面積値から試料溶液に含まれるシブトラミンの濃度を求め、1 カプセルあたりのシブトラミン含有量を算出した。真度は、QC 溶液を試料溶液と同様に処理した試料から算出した。回収率は、固相抽出の有無で、QC 試料の area 値を比較して算出した。

C. 研究結果

C-1. 未知成分の同定

Zenigal の MeOH 抽出サンプルを positive ion mode により Q3 scan を行った結果、主要な 4 種の未知成分のピーク (m/z 152, 212, 228, 280) を認めた (図 1)。Zenigal の MeOH 抽出サンプルを negative ion mode により Q3 scan を行った結果、主要な 4 種の未知成分

のピーク (m/z 150, 208, 222, 283) を認めた (図 2)。positive ion mode における m/z 152 のピークと negative ion mode における m/z 150 のピークの保持時間は一致しており、分子量 151 の化合物 (未知成分) の存在が示唆された。m/z 152 の product ion scan におけるフラグメントイオンパターンを公共データベースで検索した結果、ノルエフェドリンの可能性が推定された。しかし、ノルエフェドリン標準品と未知成分のピークを比較した結果、保持時間が異なり、未知成分はノルエフェドリンではないことが判明した (図 3)。

m/z 280 (未知成分) のマスペクトルおよび product ion scan のフラグメントイオンパターンを公共データベースで検索した結果、シブトラミンの可能性が推定された。シブトラミン標準品と未知成分のピークを比較した結果、未知成分はシブトラミンであることが判明した (図 4)。

C-2. シブトラミンの定量

Q3 スキャンの結果 (図 1、図 2) から、Zenigal の MeOH 溶液には、多種類の成分が含まれることが示唆されたため、シブトラミンを定量するにあたり、MS 分析の前処理として固相抽出によりシブトラミンを特異的に抽出することとした。平間らの論文[2]を参照し、逆相-強陽イオン交換ポリマーを用いた固相抽出により、塩基性医薬品であるシブトラミンが効果的に抽出された。QC 試料を本法により抽出し、回収率を求めたところ、89.7%であった。また、5-200 ng/mL の希釈系列のシブトラミン標準溶液を抽出し、LC-MS により分析したところ $r^2 = 0.9998$ の検量線を得た (図 5)。また、QC

試料から得た真度は95.1%であった。

試験を実施した Zenigal 10 カプセル (No. 1 ~ No. 10) すべてにシブトラミンが含まれていた。1 カプセル中に含まれるシブトラミンを定量したところ、含有量は、1 カプセルあたり、499 ng から 942 ng の範囲にあり、平均で1カプセルあたり、635 ng のシブトラミンを含有していた (表 1)。

D. 考察

インターネットで入手可能な抗肥満薬 Zenigal に含まれる未知含有成分の同定を行ったところ、Zenigal 1 カプセルには、表示有効成分のオルリスタットが含まれておらず、シブトラミンが含まれていることが判明した。定量結果より、Zenigal に含有されるシブトラミンは肥満症の治療薬として使用される場合の用量 (10-15 mg/day) と比べると、微量であり、瘦身効果が得られるほどの量ではないと考えられる。また、シブトラミン含有量にはばらつきが見られた。混入の経緯は不明であるが、非常に微量なシブトラミンが含まれていたことから、製造ライン中のコンタミネーションである可能性も考えられる。一方、UV 225 nm に強い吸収を持つ未知物質、及び LC/MS の Q3 スキャンで見出した未知物質ピーク、
、
~ の同定には至らなかった。これらの未知物質の同定には、精密質量の取得や、ピークの分取後の NMR スペクトルの解析が有効と考える。

E. 結論

今回、インターネットで入手可能な抗肥満薬に、表示成分を含まず、表示成分以外の有効成分を含む偽造医薬品を認めた。

LC/MS は、偽造が疑われる医薬品中の未知含有成分を同定・定量する有用な手段であるといえる。

F. 引用文献

1. Kimura et al., BMJ Open. 2012;2(3). e000854
2. 平間祐志、兼俊明夫. 道衛研所報 Rep. Hokkaido Inst. Pub. Health, 57, 57-60 (2007)

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
1) 佐々木 瑞紀, 高橋 知里, 吉田 直子, 谷本 剛, 木村 和子, 前川 京子. 個人輸入した抗肥満薬の非表示有効成分の分析, 日本薬学会第 139 年会 (2019.3, 千葉)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

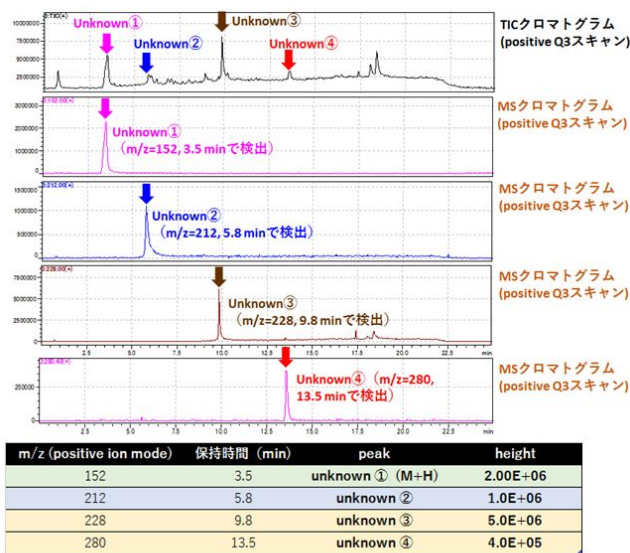


図1、Zenigalに含まれる未知成分ピークの検出 (Positive Q3 scan)

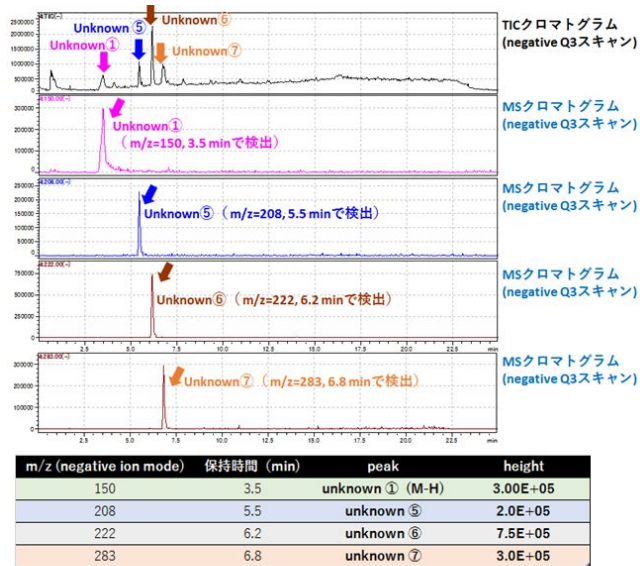


図2、Zenigalに含まれる未知成分ピークの検出 (Negative Q3 scan)

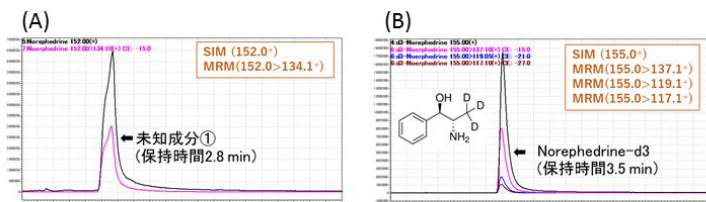


図3、Zenigalに含まれる未知成分① (A)とnorephedrine標準品(B)のMRMクロマトグラムの比較

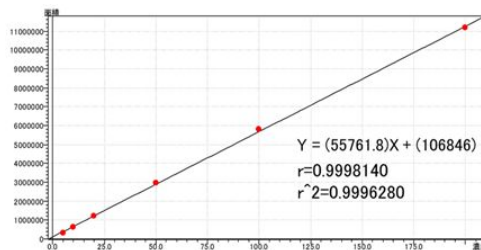


図5、Sibutramine標準品の検量線

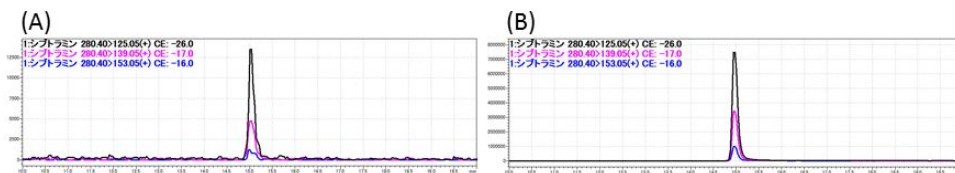


図4、Zenigalに含まれる未知成分④ (A)とsibutramine標準品(B)のMRMクロマトグラムの比較

表1、Zenigalに含まれるsibutramineの定量

Sample	カプセルの含量(mg)	シブトラミン含有量(ng)
Zenigal No.1	138.72	564.28
Zenigal No.2	142.68	590.71
Zenigal No.3	146.28	554.38
Zenigal No.4	146.22	499.12
Zenigal No.5	139.10	942.07
Zenigal No.6	145.70	619.17
Zenigal No.7	154.47	551.16
Zenigal No.8	149.45	712.47
Zenigal No.9	145.03	662.17
Zenigal No.10	146.29	656.59
平均	145.39	635.21
標準偏差	4.63	125.04