

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、以前より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 が、表示有効成分オルリスタットを含有しない偽造医薬品であることを高速液体クロマトグラフ (HPLC) / 紫外吸光光度計により明らかにしていた。昨年度、本医薬品を高速液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC-MS) を用いて分析したところ、数種の未知成分の含有が確認され、そのうちの一種がシブトラミンと同定された。今年度は、シブトラミン以外の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。HPLC トリプル四重極型 MS を用いた Q3 スキャンや PDA クロマトグラムにより含有成分を探索した。候補化合物の標準品を購入し、Zenigal に含有される未知物質と保持時間が一致をするか否かを確認した。

【結果】

Zenigal には、昨年度、確認した未知物質 ~ 以外に、UV 225 nm に強い吸収を持つ未知物質が保持時間 (RT) 18.0 min に検出された。LC-MS 分析により、本未知物質は分子量 177 の (部分) 構造を持つことが示された。さらに、長鎖飽和アルコールの存在が示唆されたため、抗肥満薬セチリスタットの可能性を考えた。しかしセチリスタット標準品とは、HPLC の保持時間が一致せず、同定には至らなかった。

【考察】

Zenigal に含まれる主要な未知成分について、その部分構造の質量値は取得されたが、同定には至らなかった。今後、本未知物質、及びそのフラグメントイオンの精密質量の取得し、同定を進めていく予定である。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きている。

偽造医薬品の流通は開発途上国市場に限ったものではない。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。

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て研究を開始した。

昨年度は LC/MS 分析の Q3 スキャンで見出した未知物質ピーク ~ のうち、未知物質ピーク がシブトラミンであることを同定し、Zenigal 1 カプセルあたり、635 ng のシブトラミンを含有することを明らかにした。一方、UV 225 nm に吸収を持つ未知物

質ピーク は、分子量 151 の化合物と推定し、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示唆された。しかし、ノルエフェドリン重水素標準品と未知成分 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。そこで、今年度は、「Zenigal」に含有されている未知成分の同定を継続した。

B. 研究方法

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。セチリスタット (東京化成工業株式会社) を MeOH に溶解し、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)

インタフェイス電圧：+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

C. 研究結果

Zenigal が偽造医薬品であることを最初に報告した Khan らの論文[1]では、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により Zenigal には UV 225 nm に強い吸収を持つ未知物質が保持時間 (RT) 6.5 min に検出されたと報告している。昨年度の我々の検討において確認した未知物質ピーク (RT 3.5 min) は UV 225 nm に吸収があるものの、強い吸収ではなかった。また Khan らの HPLC-UV 分析[1]と今回の HPLC-MS 分析では、カラムや移動相の組成が異なることから、両分析では、同じ物質であっても RT がかなり異なることも考えられる。以上より、Zenigal には、未知物質ピーク (RT 3.5 min) 以外にも UV 225 nm に強い吸収を持つ未知物質が含まれているのではないかと考えた。そこで、これまで RT 0-15 min の範囲でのみ取得していた PDA データを、今年度は RT 0-25 min まで延ばして取得し、再度、未知物質を確認することとした。

Zenigal を抽出し、LC-MS 分析の全測定範囲で PDA データを同時に取得して、PDA クロマトグラムと MS クロマトグラムを比較

した。この結果、PDA クロマトグラムにおいて、RT 3.5 min の未知物質ピーク 以外に、RT 18.0 min に UV 225 nm に強い吸収をもつピークが認められた(図1)。また、本ピークの UV 吸収スペクトルは、谷本 剛らの 2009 年度厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業) 分担研究報告書[2]に報告されている Zenigal の未知成分の UV 吸収スペクトルとほぼ一致した(図2)。一方、未知物質ピーク (RT 3.5 min) は、分担研究報告書[2]に報告されている Zenigal の未知成分の UV 吸収スペクトルとは、一致しなかった。よって Khan らの論文[1]に記載の未知物質は、本ピークに由来すると考えられた。

一方、同時に測定した MS 分析では、positive Q3 スキャン及び negative Q3 スキャンの両方において、PDA クロマトグラムとほぼ一致して RT 18.1 min に未知イオンピークを認めた(図1)。本未知イオンピークの MS スペクトルを確認したところ、positive Q3 スキャンでは、m/z 160,178 に、negative Q3 スキャンでは m/z 176 にイオンを検出した(図3)。そこで、positive Q3 スキャン及び negative Q3 スキャンにおいて、それぞれ m/z 178 及び m/z 176 の Extracted Ion Chromatogram (XIC) を作成させたところ、RT 18.1 min にピークが認められた(図4)。以上のことから、本ピークは、分子量もしくは、部分構造が 177 であることが示唆された。

PDA でピークが検出された RT 18.0 min を分取し、核磁気共鳴 (NMR) 分光法及びガスクロマトグラム質量分析計 (GCMS) により分析した。NMR 及び GCMS は、同志社

女子大学薬学部 創薬有機化学研究室 山本 康友准教授の協力を仰いだ。分取量が少なかったため、詳細な解析は不可能であったが、GCMS の結果より、長鎖飽和アルコールの存在が示唆された。そこで、長鎖飽和アルコールの部分構造をもつ抗肥満薬を検索したところ、セチリスタットが該当した。セチリスタットは、2-hydroxy-6-methyl-4H-benzo[d][1,3]oxazin-4-one(C₉H₇NO₃, MW=177.04)と hexadecanol (C₁₆H₃₃OH, 242.44) がエーテル結合をした構造をしている (図 5)。この構造は、LC/MS の分析結果より、セチリスタットがインソースフラグメンテーションにより断片化された場合、positive Q3 スキャンで negative Q3 スキャンで m/z 176 が検出されることも矛盾しない。これらより、Zenigal に含まれる主要な未知物質がセチリスタットの可能性が示唆された。

セチリスタット標準品の RT が、Zenigal の未知物質のそれと一致するかを確認した。蒸留水及びメタノールに対するセチリスタットの溶解度が非常に低く、十分な濃度で分析できなかったが、セチリスタット標準溶液は、SIM (+) クロマトグラム (m/z 402.60) において、約 17.2 分に小さなピークが確認された。一方、SIM (-) のクロマトグラム (m/z 400.60) では、ピークが確認できなかった (図 6)。一方、Zenigal の未知物質のピークは、UV 検出の結果から、RT 約 18.0 min であり、セチリスタット標準溶液には RT 18.0 min にはピークが認められなかったため、Zenigal に含まれる未知物質はセチリスタットとは考えにくいと結論した。一方で、Zenigal は、SIM (+) クロマトグラム (m/z 402.60) において、約 17.9 分にピークが確認

でき、これは、UV 検出における未知物質のピークと一致した (図 7)。よって、Zenigal の未知物質のピークはセチリスタットではないものの、 m/z 402.60 で検出される部分構造をもつ可能性が示唆された。

D. 考 察

インターネットで入手可能な抗肥満 Zenigal に含まれる未知含有成分の同定を LC-MS を用いて行ったところ、昨年度、確認した未知物質 ~ 以外に、UV 225 nm に強い吸収を持つ未知物質が保持時間 (RT) 18.0 min に検出された。昨年度は、このピークの存在に気がつかず、UV 225 nm に吸収があった未知物質ピーク (RT 3.5 min) が、Khan らの論文[1]や谷本 剛らの 2009 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書[2]に報告されている Zenigal の未知成分に相当すると考えていた。これは、昨年度は PDA クロマトグラムを RT 0-15.0 min の範囲でしか取得していなかったためである。今回、確認した Zenigal の主要な未知物質は、抗肥満薬セチリスタットではないものの、セチリスタットを検出するプリカーサーイオンの m/z 値で検出できることも明らかになった。今後、本未知物質の同定を進めるためには、精密質量の取得が有効と考える。

E. 結 論

偽造医薬品 Zenigal には、UV 225 nm に強い吸収がある未知成分が含まれていることを確認した。この成分は、分子量 177 の部分構造を持つことが示された。さらに、長鎖飽和アルコールの存在が示唆されたため、抗肥満薬セチリスタットの可能性を考えた。しかしセチリスタット標準品とは、

HPLC の保持時間が一致せず、同定には至らなかった。今後、本未知物質、及びフラグメントイオンの精密質量の取得し、同定を進めていく予定である。

F. 引用文献

1. Kimura et al., BMJ Open. 2012;2(3).
e000854
2. 谷本 剛、河野伊保、長坂葉子、沼野緑、厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）分担研究報告書「医薬品等の個人輸入における保健衛生上の危害に関する研究 - 個人輸入ダイエット薬の品質評価と Counterfeit Drug の検出

- 1

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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

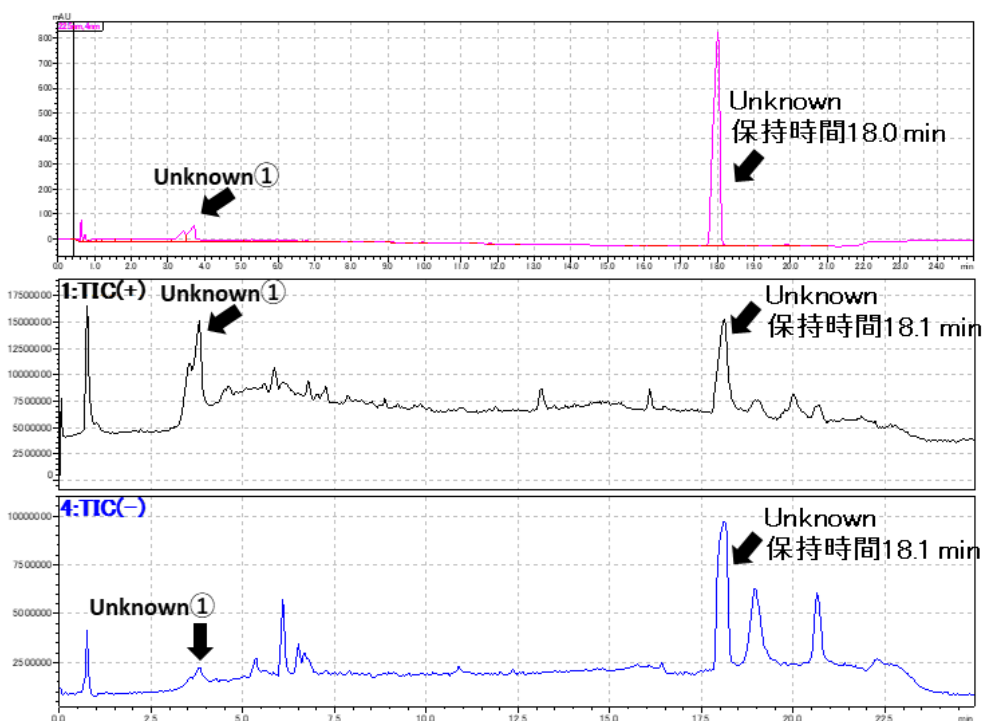


図1 Zenigalに含まれる未知成分ピークの検出

上から順に、PDAクロマトグラム (225 nm)、TICクロマトグラム (positive Q3スキャン)、TICクロマトグラム(negative Q3スキャン)を示す

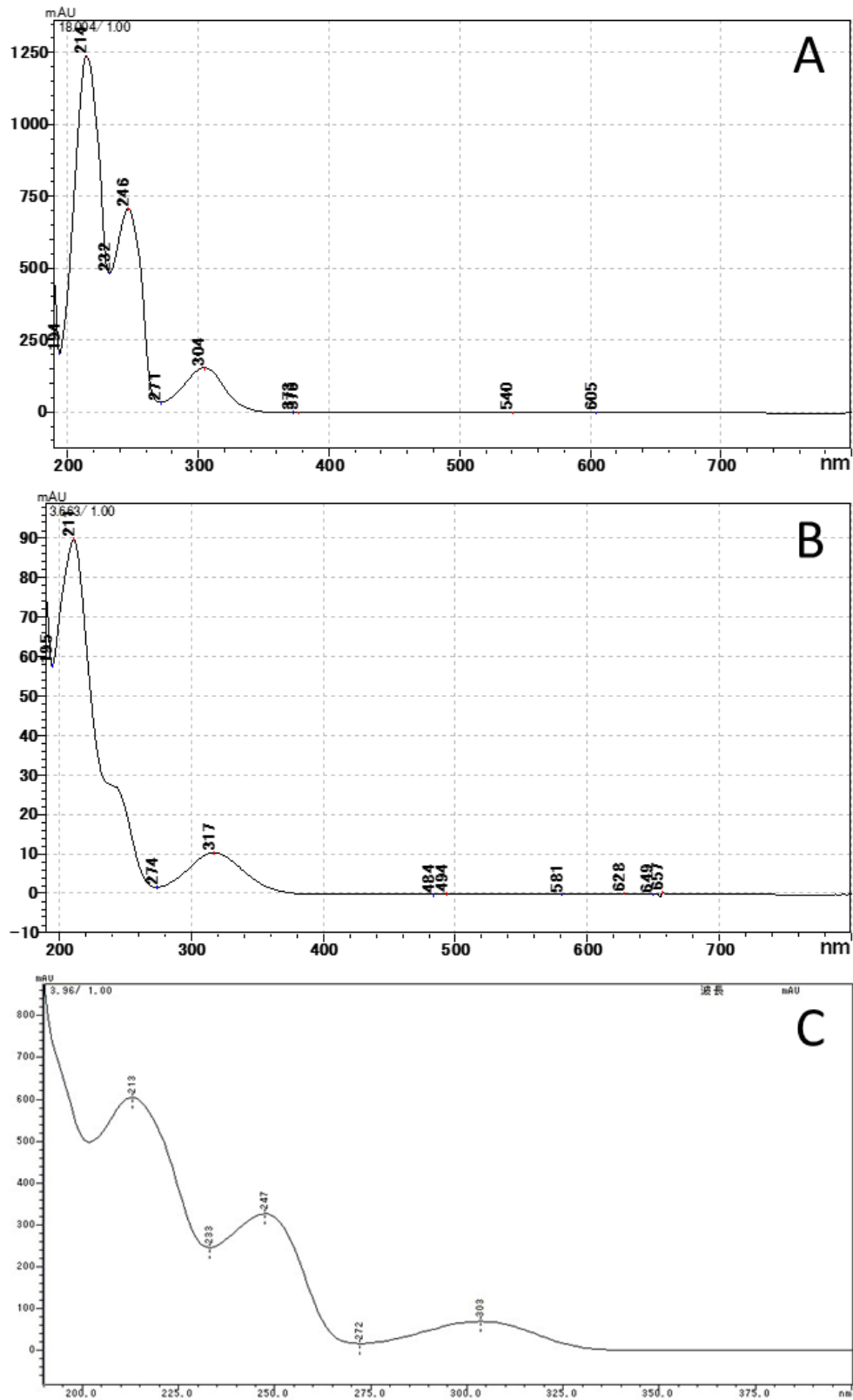


図2 未知物質のUVスペクトル

スペクトルA, B, Cは、それぞれ未知物質ピーク (RT=18.0 min)、未知物質ピーク① (RT=3.5 min)、谷本 剛らの2009年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書[2]の未知物質ピークを示す。

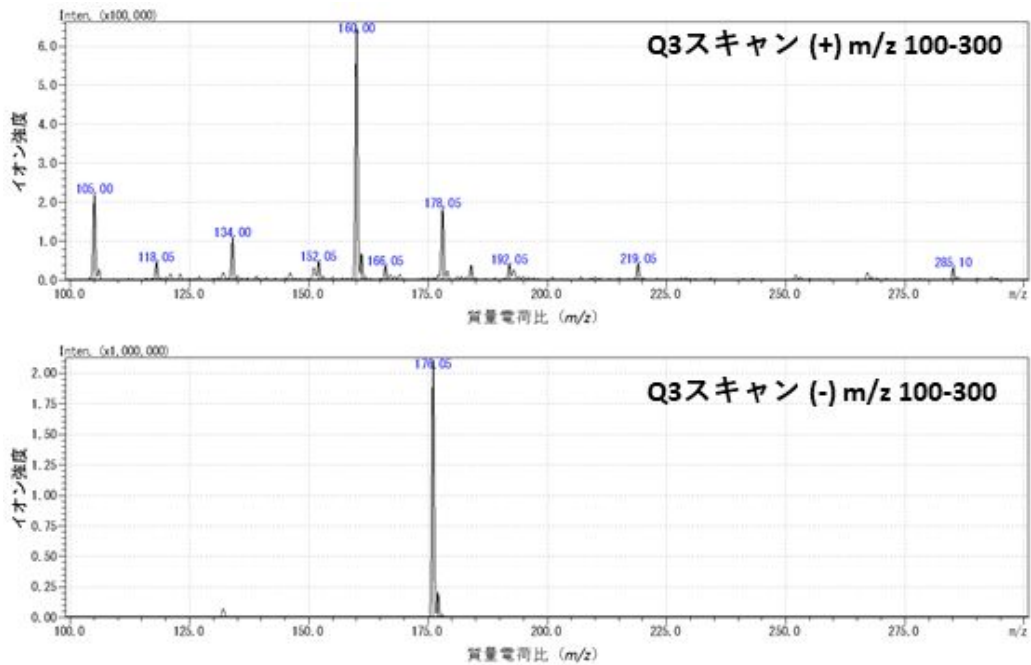


図3 未知ピーク（保持時間18分）のマススペクトル

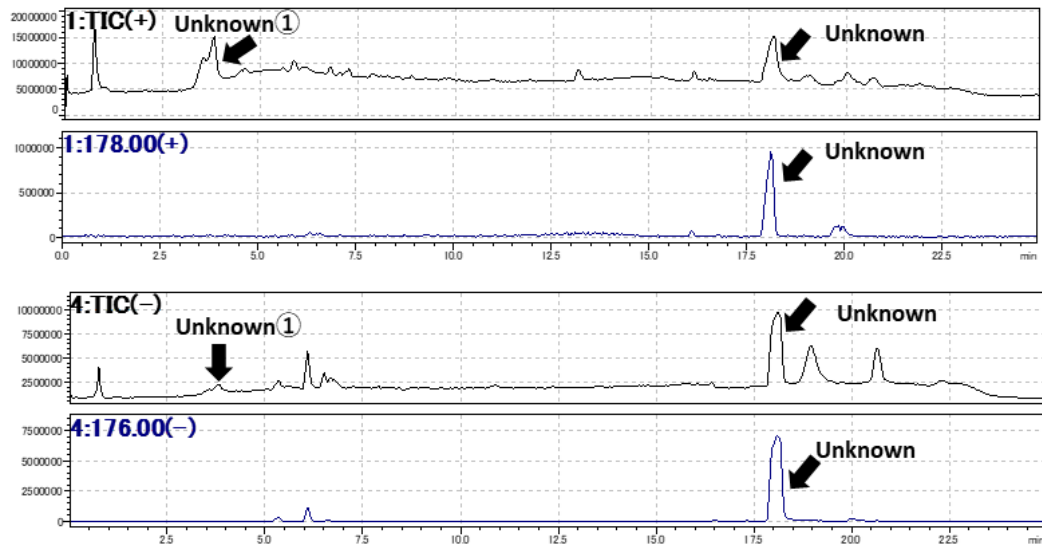


図4 Zenigal抽出物のMSクロマトグラム

上から順に、TICクロマトグラム (positive Q3スキャン)、XICクロマトグラム(m/z 178, positive Q3スキャン)、TICクロマトグラム (negative Q3スキャン)、XICクロマトグラム(m/z 176, negative Q3スキャン)を示す

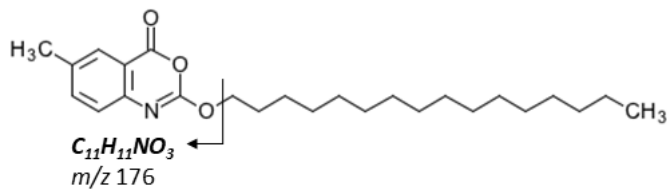


図5 セチリスタット ($C_{25}H_{39}NO_3$, MW=401.582) の構造

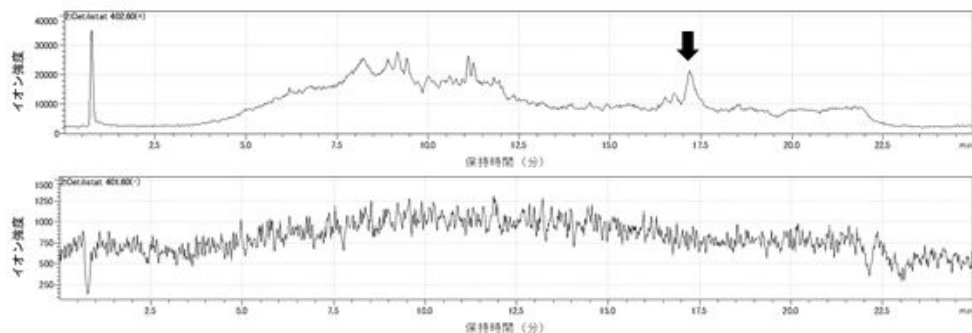


図6 セチリスタット標準溶液におけるSIMクロマトグラム
 上段がSIM (+) クロマトグラム (m/z 402.60)、下段がSIM (-)
 クロマトグラム (m/z 400.60) を示す

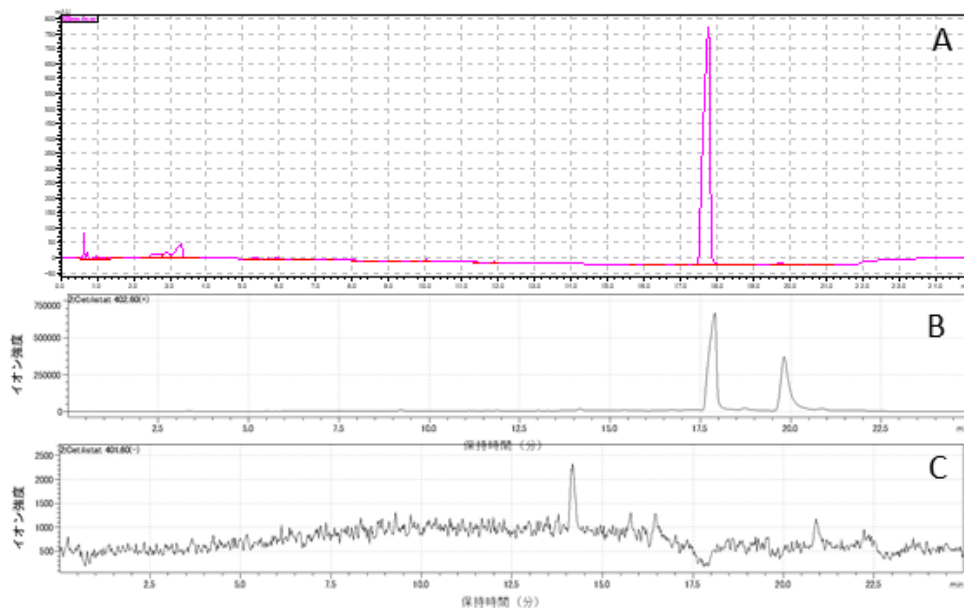


図7 ZenigalにおけるSIMクロマトグラム
 A, B, Cは、それぞれ、UVクロマトグラム、SIM (+) クロマトグラ
 ム (m/z 402.60)、SIM (-) クロマトグラム (m/z 400.60) を示す