

分担研究課題 グレーゾーンの植物体に関する研究
分担研究者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長 丸山卓郎

Dithiopropylcarbodenafil の LC-PDA-MS 分析について

研究要旨 強壯用健康食品への添加が危惧される ED 治療薬類縁化合物 dithiopropylcarbodenafil への対応に備え、同化合物の標準品を購入し、各種機器分析データ及び LC-PDA-MS 分析法をまとめた。

協力研究者

吉富太一 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部
派遣研究員

A. 研究目的

近年、痩身もしくは強壯用を謳った健康食品に無承認無許可医薬品が混入され、このものが原因と思われる健康被害が発生している。ED (erectile dysfunction) 治療薬及びその類縁化合物 (Fig. 1, Table 1) はその代表例であり、この製品を摂取して、頭痛、嘔吐、動悸などの症状を訴える事例や重篤な場合、死に至ったケースもある。厚生労働省では、昭和 46 年の薬務局長通知「無承認無許可医薬品の指導取り締まりについて」を順次改訂し、「医薬品の範囲に関する基準」を提示して監視業務を強化している。その結果、痩身用及び強壯用製品について、医薬品の混入はかなり少なくなっている。しかし、インターネットを通じて販売される強壯用製品からは、依然として ED 治療薬及びそれらの類縁化合物が検出されている。更に、最近では、健康食品だけでなく、正規品を装った偽造品も発見され、健康被害が発生している。

2017 年から 2018 年までに、海外における ED 治療薬の新規類縁化合物は、11 種類報告されており (Table 1)、いずれも強壯用健康食品中から発見された。過去に、海外での報告から数年後、日本国内の市場品から検出される例も認められており、今後も監視業務を継続する必要があると考えられる。

本研究では、海外において新規に流通事例が報告された化合物群を含有する健康食品が流通した場合に備え、それらの内、dithiopropylcarbodenafil (1) の標準品を購入し、各種機器分析データと LC-PDA-MS 分析法をまとめることを目的とした。

B. 研究方法

1. 実験材料

Dithiopropylcarbodenafil (1) の標準品は、TLC Pharmaceutical Standards 社より購入した。日本国内に流通する ED 治療薬及びその類縁化合物を含有する健康食品は、当研究部の試験業務により、当該化合物を含有することが既に確認されている 2 製品を用いた (Table 2)。

2. 実験方法

2-1. 試料調製

1 の標準品 1 mg を量り取り、メタノール/アセトニトリル (1/1) を 2 mL 加え、超音波照射して溶解したものを標準溶液とした。

ED 治療薬及びその類縁化合物を含有する健康食品 2 製品 (試料 A, B) について、それぞれ 100 mg ずつ量り取り、1%ギ酸水溶液/アセトニトリル (1/4) を 1 mL 加え、10 分間振とう抽出した。3000 g にて遠心分離を 5 分間行い、上清を回収した。これらの溶液をアセトニトリルで 20 倍希釈し試料溶液 A₁, B₁ とした (Table 2)。それぞれの試料溶液 180 µL に対し、標準溶液を 20 µL 添加したものを分析試料溶液 A₂, B₂ とした。

2-2. LC-PDA-MS 分析

厚生労働省の通知¹⁾を参考に以下の条件にて行った。

LC 条件

装置: LC-20AD, CTO-20A, DGU-20A₃, SIL-20AC, SPD-M20A (島津製作所); カラム: Inertsil-ODS 3 (2.1×150 mm, 5 µm; GL Sciences), 移動相 A 液: アセトニトリル/5 mM ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH 3.5), 移動相 B 液: アセトニトリル, グラジエント (A 液/B 液): 100/0 (0 min) - 100/0 (3 min) - 70/30 (13 min) - 70/30 (30 min) - 0/100 (30.01 min) - 0/100 (37 min) - 100/0 (37.01 min) - 100/0 (45 min), 流速: 0.3 mL/min, カラム恒温槽温度: 40°C, 注入量: 1 µL, 検出器: ダイオードアレイ検出器 (モニター波長 248 nm)。

MS 条件

装置: LCMS-2020 (島津製作所), イオン化法: ESI ポジティブモード, drying gas: 10 L/hr, nebulize gas: 1.5 L/hr, DL 温度: 250°C, ヒートブロック温度: 200°C, 質量電荷比範囲: 100-800. In-source CID 条件: DL 電圧 40 V, Qarray DC 電圧 120 V。

C. 研究結果

上記の LC 条件にて、標準溶液を分析した。その結果、**1** は 20 分付近に溶出し、UV スペクトルは 248, 281, 355 nm に吸収極大を持つことから、論文による報告と類似していた²⁾。また、MS スペクトルも **1** にプロトンが付加した m/z 499.2 の疑似分子イオンピークが確認された (Fig. 2)。

続いて、本分析法の有用性を確認するために、ED 治療薬及びその類縁化合物を含有する健康食品から調製した試料溶液 A₁, B₁ それぞれに、標準溶液を一定量添加した試料溶液 A₂, B₂ を調製し、分析を行った。その結果、**1** は、試料 A, B に含まれる ED 治療薬及びその誘導体といずれも良好な分離を示した (Fig. 3)。

次に、in-source collision-induced dissociation (以下、IS-CID) 法によるイオン化を利用した MS による構造情報の確認を検討した。通常、MS による構造情報の確認は、MS/MS 装置を用いて行われるが、シングル四重極型の MS 装置でも、レンズ系電圧を高く設定することで、フラグメント情報を得ることが出来、構造解析に利用可能であることが報告されている³⁻⁵⁾。本研究では、DL 電圧を 40 V, Qarray DC 電圧を 130 V に設定し、MS 測定を行った。その結果、sildenafil (**2**) は、ピペラジン環の結合した硫酸基

部分, ベンゼン環に直結したエトキシ基部分の順に開裂が起こり, それぞれ m/z 311, 283 のフラグメントイオンが確認された (Fig. 4). なお, このフラグメントパターンは, sildenafil (2) の類縁化合物である hydroxyhomosildenafil (5) でも同様であった (Fig. 5).

一方, tadalafil (3) は, メチレンジオキシベンジル基部分を繋ぐ炭素部分で開裂し, m/z 268, 135 のフラグメントイオンが確認され, さらに m/z 262 も確認された (Fig. 6).

次に, dithiopropylcarbodenafil (1) はピペラジン環の結合した N-C 間, ベンゼン環に直結したエトキシ基部分の順に開裂が起こり, m/z 371, 343 のフラグメントイオンが確認された (Fig. 7).

D. 考察

Table 1 に ED 治療薬とその類縁化合物を示した。この内, No. 4-14 は, 2017 年から 2018 年の間に強壯用健康食品から発見, 報告された新規化合物である。我々は, このリストから 1 の標準品を購入し, 厚生労働省通知の条件により分析を行った。その結果, 1 は十分に担体へ保持され, 他の成分との分離も良好であった (Figs. 2, 3). しかしながら, これまで報告された強壯用製品における類縁化合物は, その構造が非常に類似しており, 質量数が同じものも存在する (Table 1). 近年, 質量分析計の発展により, 精密質量から分離することも可能であるが, 全く同一の組成式や異性体の場合, カラム分離することが必須となる。従って, 今後, 1 と同一の質量を有する 3,5-dimethylpiperazinyl dithio-desmethylcarbodenafil の標準品を入手し, これら

を同時に分析することで分離が行われるか確認する必要がある。

また, 今回, 我々は IS-CID 法により分析を行い, ED 治療薬とその類縁化合物の構造情報が得られることを確認した。フラグメントを起こすイオンを選択できないデメリットはあるものの, 比較的安価なシングル型四重極質量分析計でもフラグメントイオンを検出できるため, 構造推定などに有効である。今回, 測定した全ての化合物において, IS-CID によりフラグメントイオンが発生し, そのイオンは, 過去にタンデム型質量分析計で MS/MS 測定された結果と一致した^{2), 6)-8)}。Waters 社は MS/MS を用いた健康食品中の ED 治療薬のスクリーニングアプリケーションを公表しており, sildenafil や vardenafil 誘導体に共通するフラグメントイオンを用いて, これら誘導体の迅速な検出法を報告している⁹⁾。従って, 今回, 我々が検討した IS-CID 法によるフラグメントイオンを指標とすれば, シングル型四重極質量分析計でも新たな ED 治療薬類縁化合物の簡易的なスクリーニングが可能であると思われる。この点については, 次年度以降, さらに検討を行う予定である。

E. 結論

強壯用製品への添加が危惧される ED 治療薬類縁化合物の内, dithiopropylcarbodenafil (1) への対応に備え, 同化合物の標準品を購入し, 各種機器分析データ及びその分析法をまとめた。更に IS-CID 法は, ED 治療薬とその類縁化合物における構造推定やスクリーニングにも有効であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課長通知. ウデナフィルの分析方法について. 平成 19 年 8 月 22 日, 薬食監麻発第 0822010 号.
- 2) Yun J, Shin KJ, Choi J, Kwon K, Jo CH. *J. Chromatogra B.*, 2018, **1072**, 273-281.
- 3) 島津アプリケーションニュース, No. C71, This document is available in the URL (<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/an/c/c071.pdf>).
- 4) Parcher JF, Wang M, Chittiboyina AG, Khan IA. *Drug Test Anal.*, 2018, **10**, 28-36.
- 5) Meiyun S, Hui J, Lei Y, Yajun L, Mengyao X. *J. Chromatogra B.*, 2019, **1125**, 121716-121723.
- 6) Kwang-Youl K, Moonsuk N, Hyun-Jung K, Kwang-Hyeon K, Seung-Hyun K, Sang-Il Kim, Cheol-Woo K, Sang-Heon C. *Transl Clin Pharmacol.*, 2017, **25(1)**, 21-27.
- 7) Kern SE, Lorenz LM, Lanzarotta A, Nickum EA, Litzau JJ. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, **103**, 99-103.
- 8) Elif Ö E, Belma Ö, Sezgin B. *Measurement*, 2018, **124**, 64-71.
- 9) Salman A, Nayan S M, Michelle W. UPLC/MS/MS for the screening, confirmation, and quantification of drugs illegally added to herbal/dietary supplements for the enhancement of male sexual performance, application note from Waters. Co. Ltd., This document is available in the URL (<http://www.waters.com/webassets/cms/libray/docs/720004511en.pdf>).

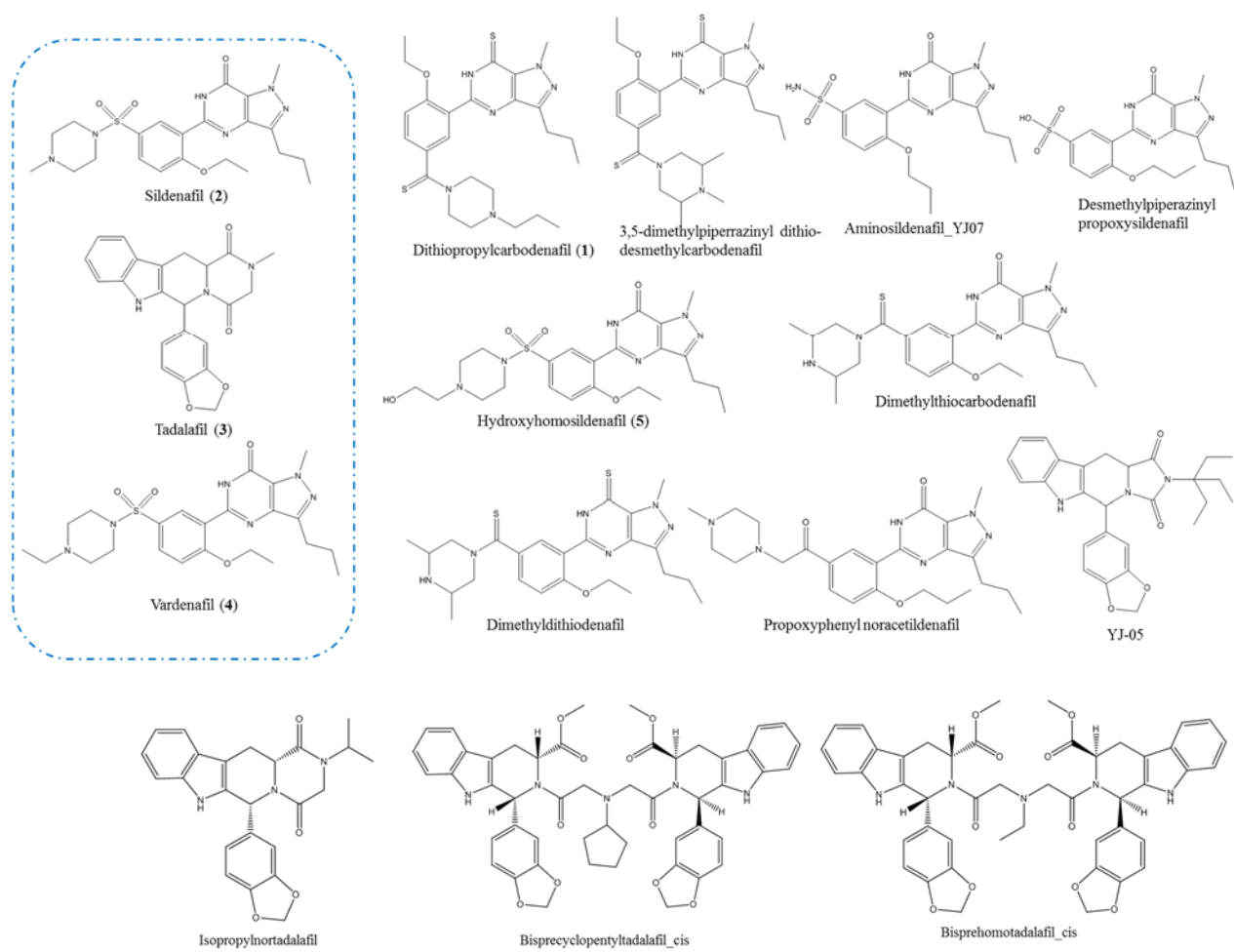


Fig. 1 Structures of ED therapeutic agents 2-4 (inside the blue dashed line) and their analogues.

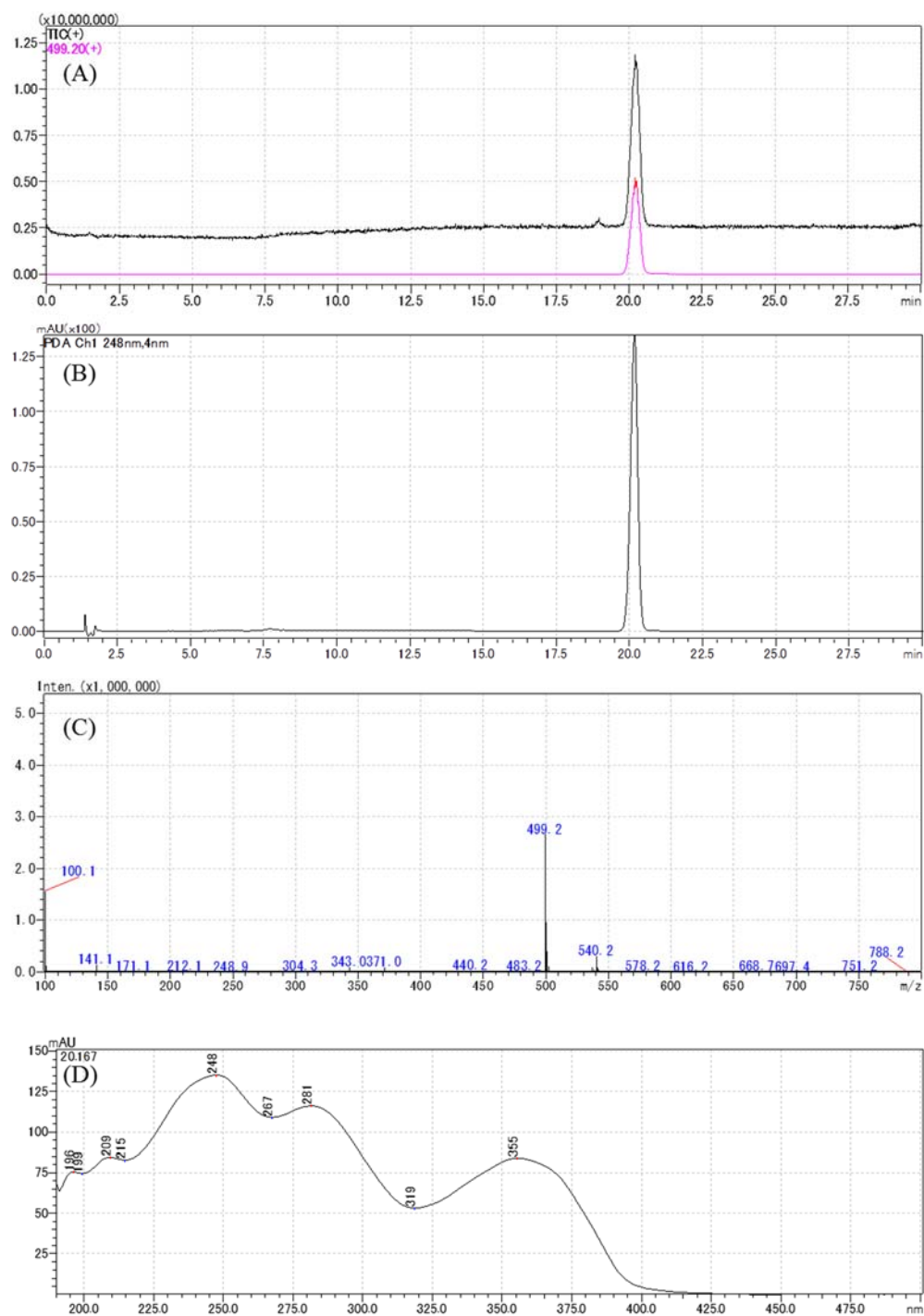


Fig. 2 Chromatograms and spectroscopic data of dithiopropylcarbodenafil (**1**). (A) TIC and mass chromatogram at m/z 499.2, (B) UV chromatogram at 248 nm, (C) MS spectrum of **1**, (D) UV spectrum of **1**.

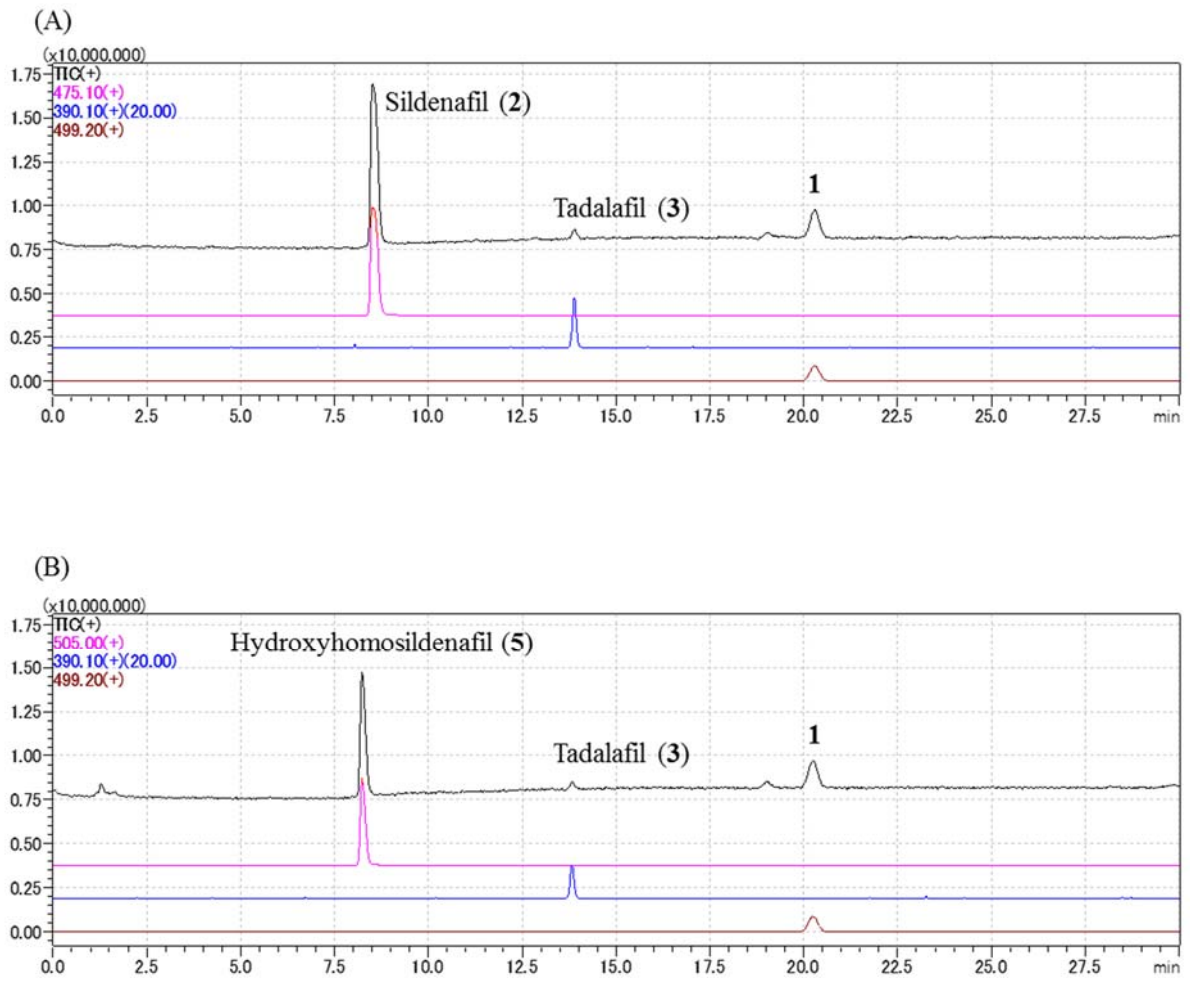


Fig. 3 TIC and mass Chromatograms of food supplements for tonicity spiked with authentic dithiopropylcarbodenafil (1). (A) 陰莖增大丸, (B) 三便宝.

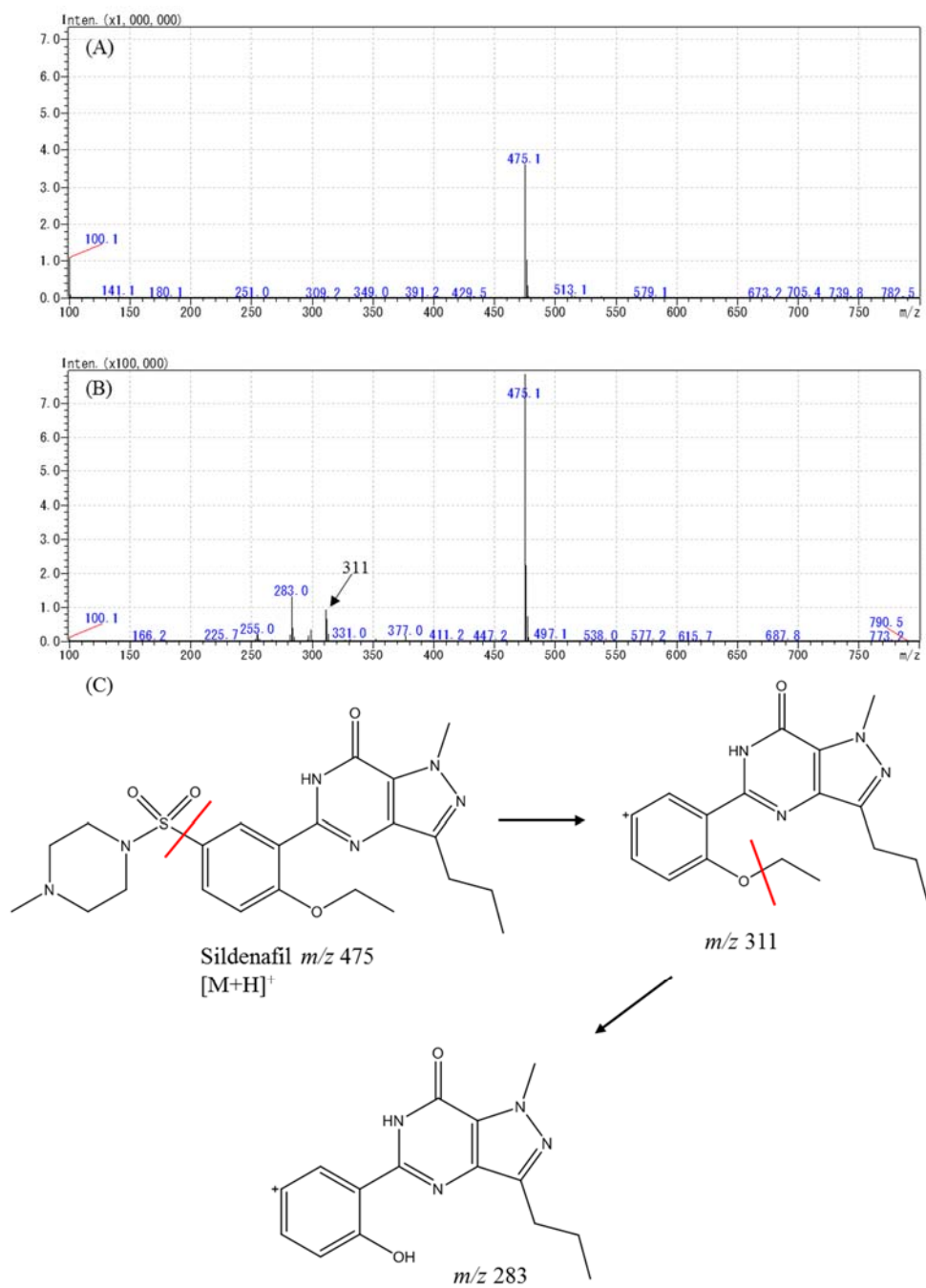


Fig. 4 Mass spectra obtained for sildenafil (**2**). (A) scan mode, (B) in-source collision-induced dissociation, (C) proposed fragmentations of sildenafil (**2**).

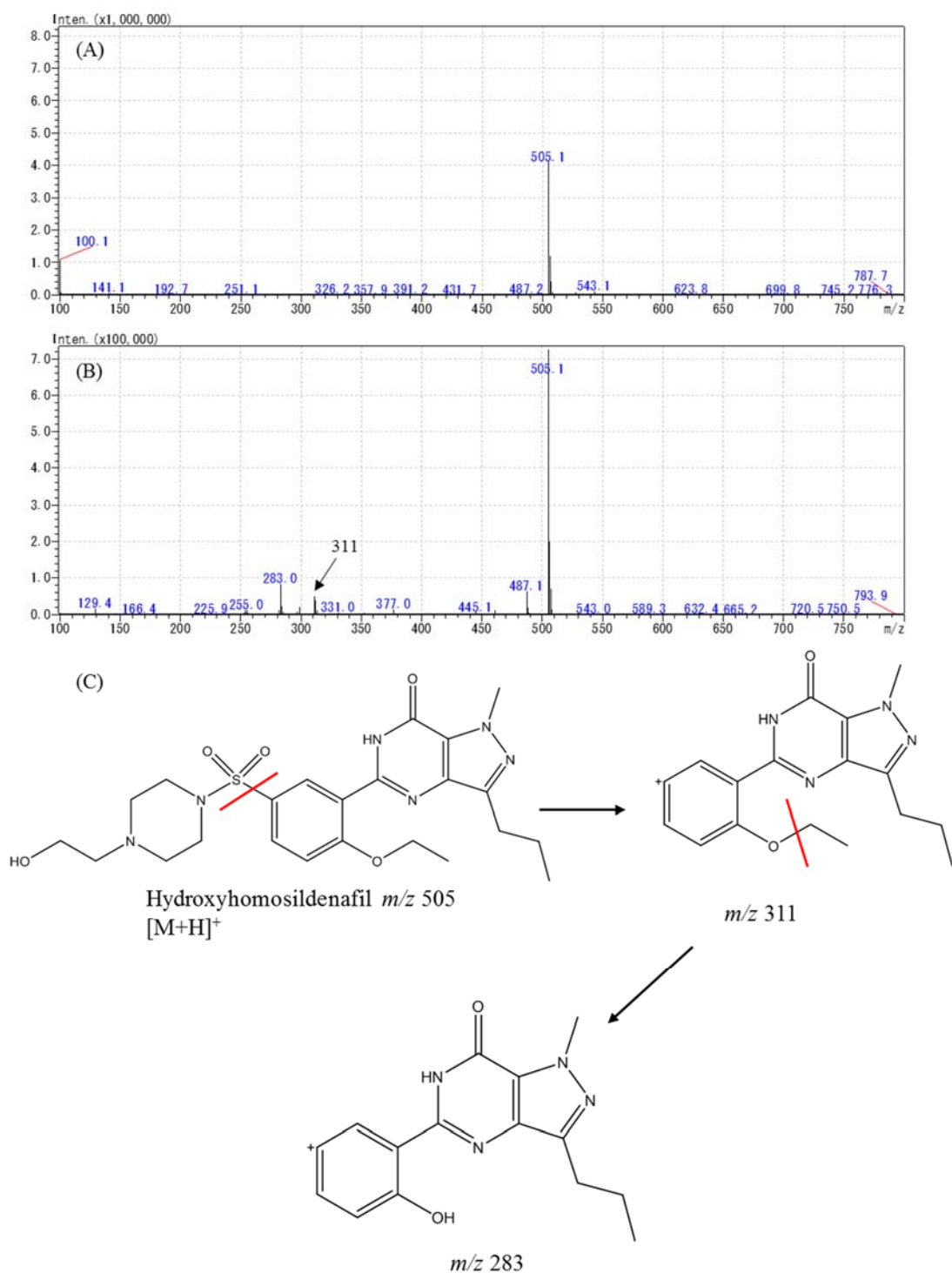


Fig. 5 Mass spectra obtained for hydroxyhomosildenafil (**5**). (A) scan mode, (B) in-source collision-induced dissociation, (C) proposed fragmentations of hydroxyhomosildenafil (**5**).

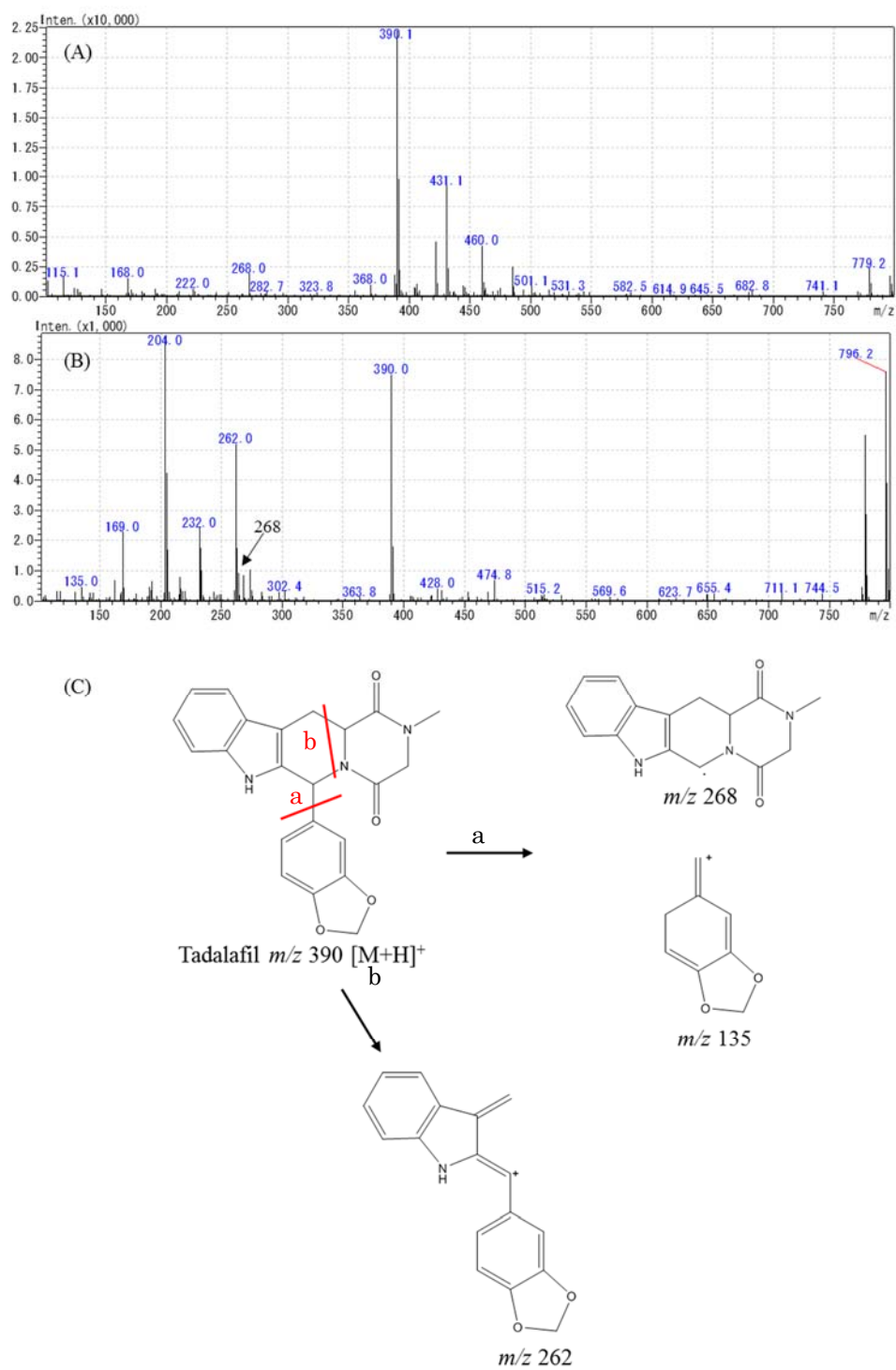


Fig. 6 Mass spectra obtained for tadalafil (3). (A) scan mode, (B) in-source collision-induced dissociation, (C) proposed fragmentations of tadalafil (3).

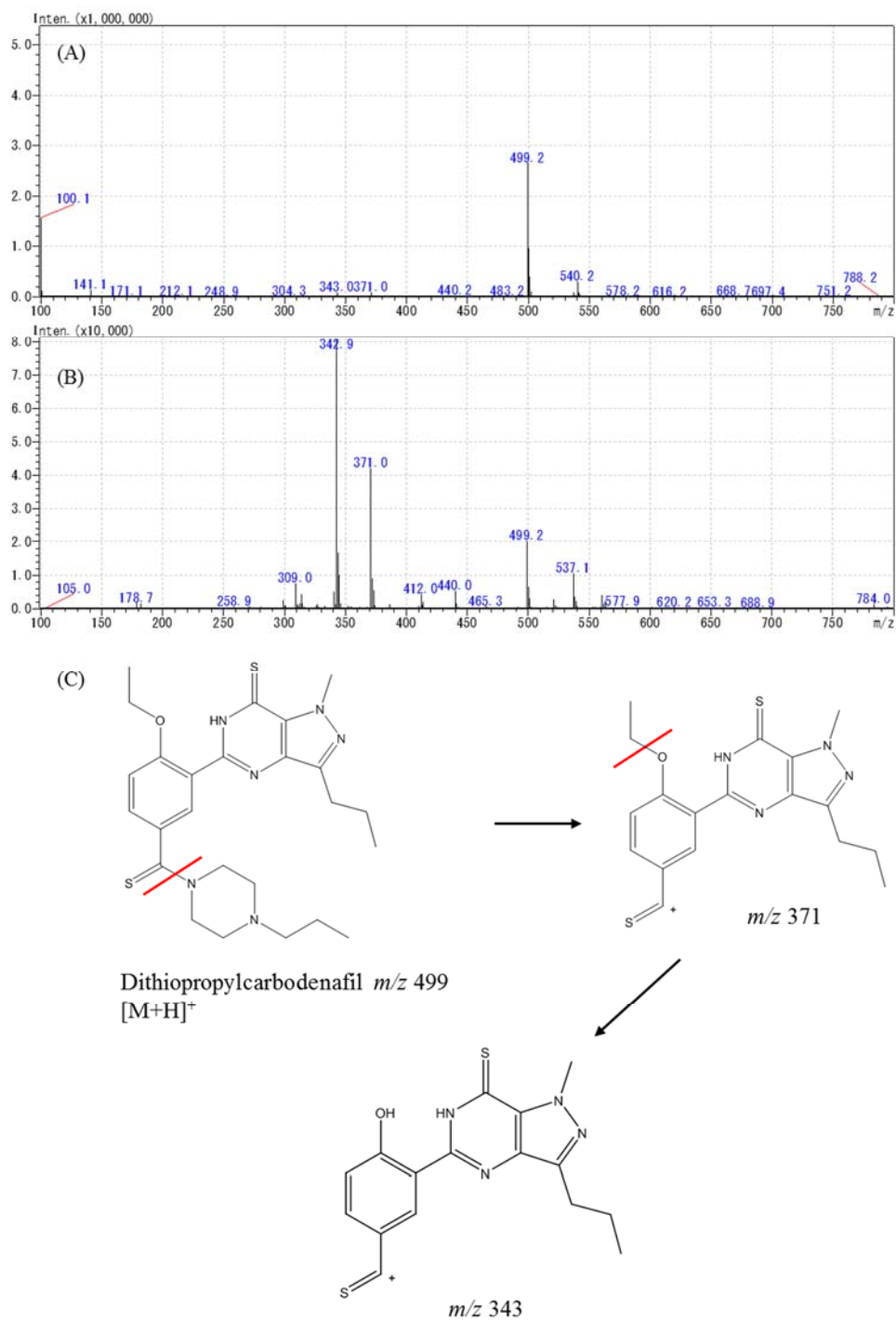


Fig. 7 Mass spectra obtained for dithiopropylcarbodenafil (**1**). (A) scan mode, (B) in-source collision-induced dissociation, (C) proposed fragmentations of dithiopropylcarbodenafil (**1**).

Table 1 The list of ED therapeutic agents and their derivatives. No. 4-14 were newly reported as ED treatment drug analogue in 2017-2018.

No.	Compound name	Compound type	Exact mass	Cas.no	Commercially available
1	sildenafil (2)	sildenafil	474.58	171599-83-0	○
2	tadalafil (3)	tadalafil	389.40	171596-29-5	○
3	vardenafil (4)	vardenafil	488.60	224785-90-4	○
4	dithiopropylcarbodenafil (1)	sildenafil	498.22	2196244-90-1	○
5	aminosildenafil (YJ-07)	sildenafil	405.15	31949-68-4	○
6	3,5-dimethylpiperazinyl dithio-desmethylcarbodenafil	sildenafil	498.22	2086709-28-4	○
7	dimethyldithiodenafil	sildenafil	484.21	2146091-79-2	○
8	dimethylthiocarbodenafil	sildenafil	468.23	2146091-30-5	-
9	propoxyphenyl noracetildenafil	sildenafil	466.27	147676-64-0	-
10	desmethylpiperazinyl propoxysildenafil	sildenafil	406.13	-	○
11	YJ-05	sildenafil	459.21	-	○
12	isopropylnotadalafil	tadalafil	417.17	171596-30-8	○
13	Bisprehomotadalafil (isomer)	tadalafil	825.30	1803592-02-0	○
	Bisprehomotadalafil (isomer)			2170575-39-8	○
14	Bisprecyclopentyltadalafil	tadalafil	865.33	-	-
15	hydroxyhomosildenafil (5)	sildenafil	504.60	139755-85-4	○
16	homosildenafil	sildenafil	488.60	642928-07-2	○
17	hongdenafil	sildenafil	466.58	831217-01-7	○
18	udenafil	sildenafil	516.66	268203-93-6	○
19	aminotadalafil	tadalafil	390.39	385769-84-6	○
20	pseudovardenafil	vardenafil	459.56	224788-34-5	○
21	hydroxyhongdenafil	sildenafil	482.58	147676-56-0	○
22	xanthoanthrafil	others	389.40	1020251-53-9	○
23	norneosildenafil	sildenafil	459.56	371959-09-0	○
24	nitrodenafil	sildenafil	357.36	147676-99-1	○
25	thiodenafil	sildenafil	490.64	479073-79-5	○
26	thioquinapiperifil	others	448.58	220060-39-9	○
27	homothiodenafil	sildenafil	504.67	479073-80-8	○
28	norhongdenafil	sildenafil	452.55	949091-38-7	○
29	acetyl acid	sildenafil	356.38	147676-78-6	○
30	imidazosagatriazinone	sildenafil	312.37	139756-21-1	○
31	mutaprodenafil	sildenafil	629.75	1387577-30-1	○

Table 2 The list of health supplement including therapeutic agents for ED and their derivatives.

検体名	品名	含有成分
試料A	陰莖増大丸	sildenafil, tadalafil
試料B	三便宝	hydroxyhomosildenafil, tadalafil