

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス政策研究事業）  
分担研究報告書

分担研究課題 グレーゾーンの植物体に関する研究及び食薬区分リストの整備に関する研究  
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

dimethyldithiodenafil 及び desmethylpiperazinyl propoxysildenafil 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 dimethyldithiodenafil 及び desmethylpiperazinyl propoxysildenafil の流通に備え、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

後藤佑斗 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。前者の代表例は、センナ、ハネセンナなど、瀉下作用を有する天然物やフェノールフタレインなどの化合物であり、後者の代表例は、ED (erectile dysfunction) 治療薬及びその類縁化合物 (Fig. 1, Table 1) である。特に後者の化合物の場合、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、dimethyldithiodenafil (1; no. 7 in Table 1) 及び desmethylpiperazinyl propoxysildenafil (2; no. 10 in Table 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

1 及び 2 の標準品は, TLC Pharmaceutical Standard 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体を含有する健康食品は, 糖研究部の試験業務により当該化合物を含有することが確認されている 2 製品を用いた (Table 2).

## 2. 実験方法

### 2-1. 試料調製

標準品 1, 2 について, それぞれ 1 mg 秤量して, 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 1<sub>a</sub>, 2<sub>a</sub> とした. このものをアセトニトリルでさらに 10 倍希釈したものを, 標準溶液 1<sub>b</sub>, 2<sub>b</sub> とした.

ED 治療薬及びその類縁体を含有する健康食品 (試料 A, B) について, それぞれ 100 mg 秤量して, 1%ギ酸水/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 x G で 5 分間遠心分離後, 上清を回収した. これらの溶液を試料溶液 A<sub>0</sub>, B<sub>0</sub> とした. これらの溶液をアセトニトリルで 40 倍希釈したものを試料溶液 A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub> とした.

また, それぞれ試料溶液 A<sub>0</sub>, B<sub>0</sub> 25  $\mu$ L に標準溶液 1<sub>a</sub> 100  $\mu$ L, 2<sub>a</sub> 100  $\mu$ L, アセトニトリル 775  $\mu$ L を添加したものを試料溶液 A<sub>2</sub>, B<sub>2</sub> とした.

### 2-2. LC-PDA-MS 分析

厚生労働省の通知<sup>1)</sup>を参考に以下の条件により行った.

#### LC 条件

装置 : Prominence UHPLC (LD-40 XS, CTO-40C, DGU-403, SIL-40C XS, SPD-M40) (島津製作所)

カラム : Inertsil-ODS 3 (2.1 x 150 mm, 5  $\mu$ m;

GL Sciences)

移動相 A 液 : 5 mM ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH 3.5)/アセトニトリル(75/25)

移動相 B 液 : アセトニトリル

グラジエント (A 液/B 液): 100/0 (0-3 min hold) - 70/30 (3-13 min) - 70/30 (13-30 min hold), 0/100 (30.01-37 min hold)

流速 : 0.3 mL/min

カラム恒温槽温度 : 40°C

注入量 : 1  $\mu$ L

検出器 : ダイオードアレイ検出器 (モニター波長 248, 296 nm)

#### MS 条件

(条件 1) normal 法

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/min

Nebulize gas : 1.5 L/min

DL 温度 : 250°C

ヒートブロック温度 : 200°C

キャピラリー電圧 : 1.5 kV

DL 電圧 : 0 V

Qarray DC 電圧 : 0 V

分析モード : スキャン

質量電荷比範囲 : 100-800

(条件 2) In-source collision-induced dissociation (以下, IS-CID) 法

条件 1 から以下を変更した,

DL 電圧 : 40 V, Qarray DC 電圧 : 120 V.

## C. 研究結果

条件 1 の条件で, 標準溶液標準溶液 1<sub>b</sub> を分析した結果, 約 14 分に溶出され, UV スペクト

ルパターンは 248, 283, 356 nm に吸収極大を持ち、論文報告のものと、よく一致した<sup>2)</sup>。また、マススペクトルについては、**1** の構造から予想される擬似分子イオンピーク ( $m/z$  485.1) をベースピークとして認めた (Fig. 2)。

標準溶液 **2b** では、約 10 分に溶出され、UV スペクトルパターンは 226, 296 nm に吸収極大を持ち、論文報告のものとよく一致した<sup>3)</sup>。また、MS スペクトルに関して、**2** の構造から予想される擬似分子イオンピーク ( $m/z$  407.0) をベースピークとして認めた (Fig. 3)。

次に、試料溶液 A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, それぞれに、標準溶液を添加した試料溶液 A<sub>2</sub>, B<sub>2</sub> を調製し、分析を行った。その結果、**1** 及び **2** 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. 4)。

続いて、昨年度検討した IS-CID 法によるイオン化を利用した MS による構造情報の取得のため、条件 2 において同様の分析を行った。その結果、**1** は、ピペラジン環とチオカルボニル基の N-C 結合間、ベンゼン環上のエトキシ基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. 5)。

一方、desmethyloxypropoxy-piperazine sildenafil (**2**) は、ベンゼン環上のプロポキシ基部分で開裂が起こり、 $m/z$  365 のフラグメントイオンが確認され、さらにピラゾール環上のプロピル基のベンジル位で開裂した  $m/z$  336 のイオンも確認された (Fig. 6)。

#### D. 考察

海外の健康食品市場に流通する製品から、検出事例が報告された **1** 及び **2** の標準品を購入し、各種機器分析データ及び分析法をまとめた。ウデナフィルの分析方法として厚生労働省通知された分析条件において、担体に十分に保持され、分析が可能であることが確認された。

#### E. 結論

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 dimethyldithiodenafil 及び desmethyloxypropoxy-piperazine sildenafil の流通に備え、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。

#### 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) M. Sakamoto *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **148**, 136-141 (2018).
- 3) J. H. Lee *et al.*, *Science & Justice*, **58**, 447-454 (2018).

Table 1 The list of ED therapeutic agents and their derivatives.

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	vardeafil (4)	vardeafil	488.60	224785-90-4	○
4	dithiopropylcarbodeafil (1)	sildenafil	498.22	2196244-90-1	○
5	aminosildenafil (YJ-07)	sildenafil	405.15	31949-68-4	○
6	3,5-dimethylpiperazinyl dithio-desmethylcarbodeafil	sildenafil	498.22	2086709-28-4	○
7	dimethylthiodenafil	sildenafil	484.21	2146091-79-2	○
8	dimethylthiocarbodeafil	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	isopropylhortadalafil	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	vardeafil	459.56	224788-34-5	○
21	hydroxyhongdenafil	sildenafil	482.58	147676-56-0	○
22	xanthoanthrafil	others	389.40	1020251-53-9	○
23	normeosildenafil	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

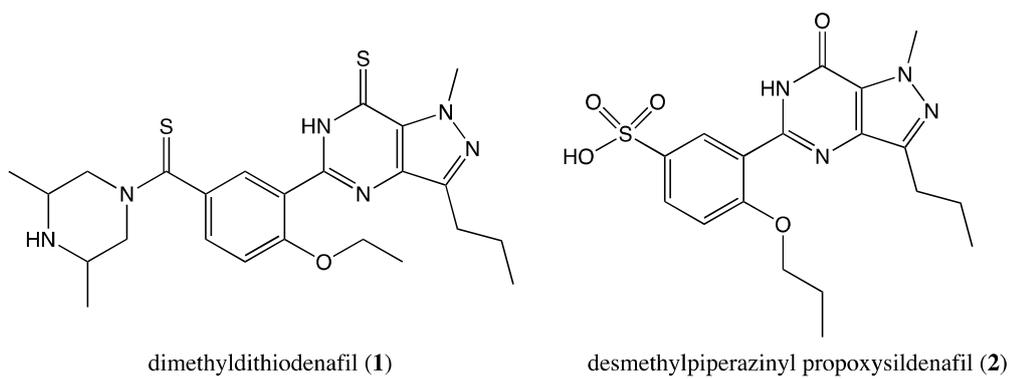


Fig. 1 Structures of ED therapeutic agent analogues (1) and (2)

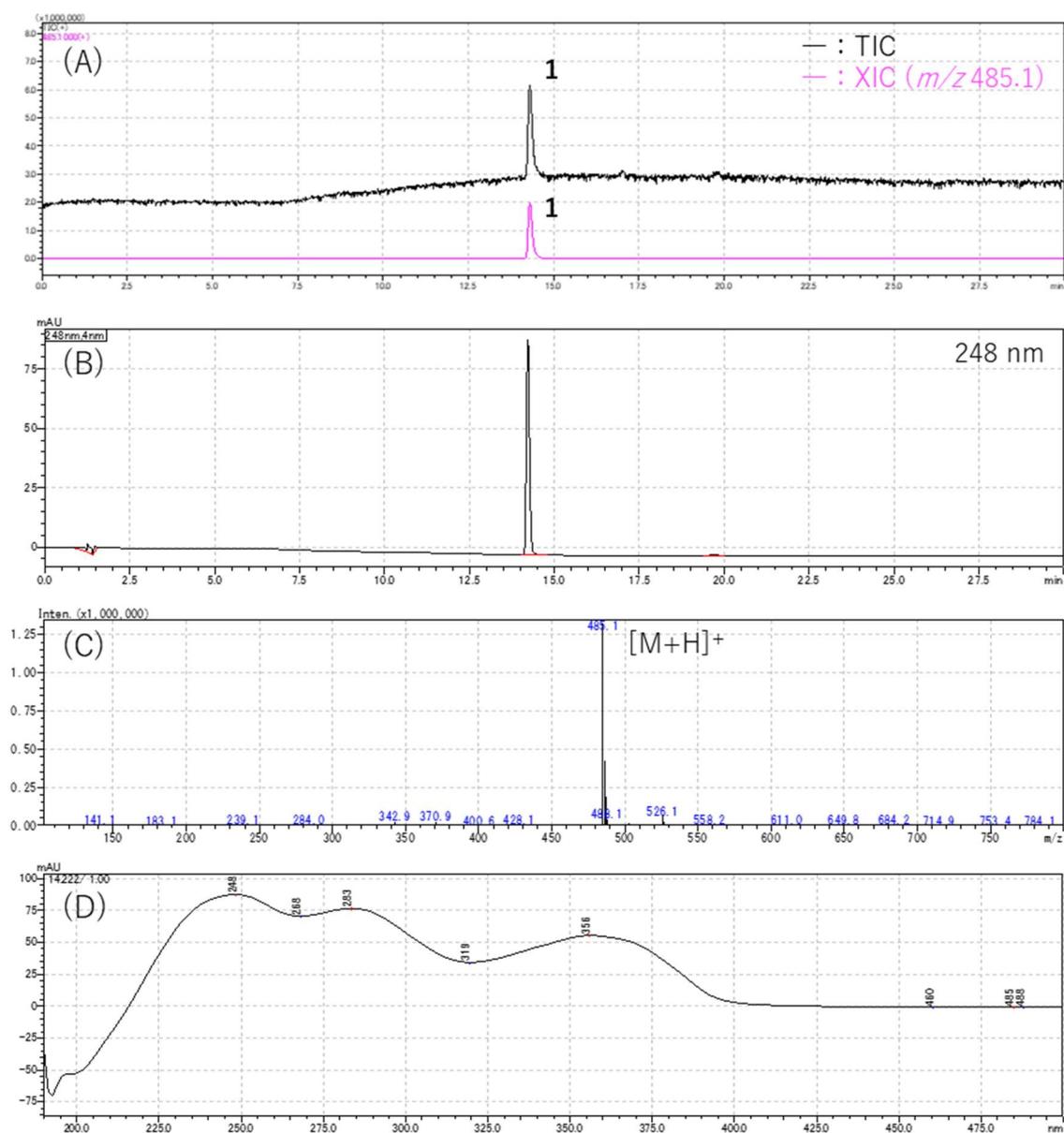


Fig. 2 LC chromatograms and spectroscopic data of dimethyldithiodenafil (1)

A: TIC and mass chromatogram at  $m/z$  485.1 on LC-PDA-MS analysis

B: Chromatogram at 248 nm on LC-PDA-MS analysis

C: Mass spectrum of 1, D: UV spectrum of 1

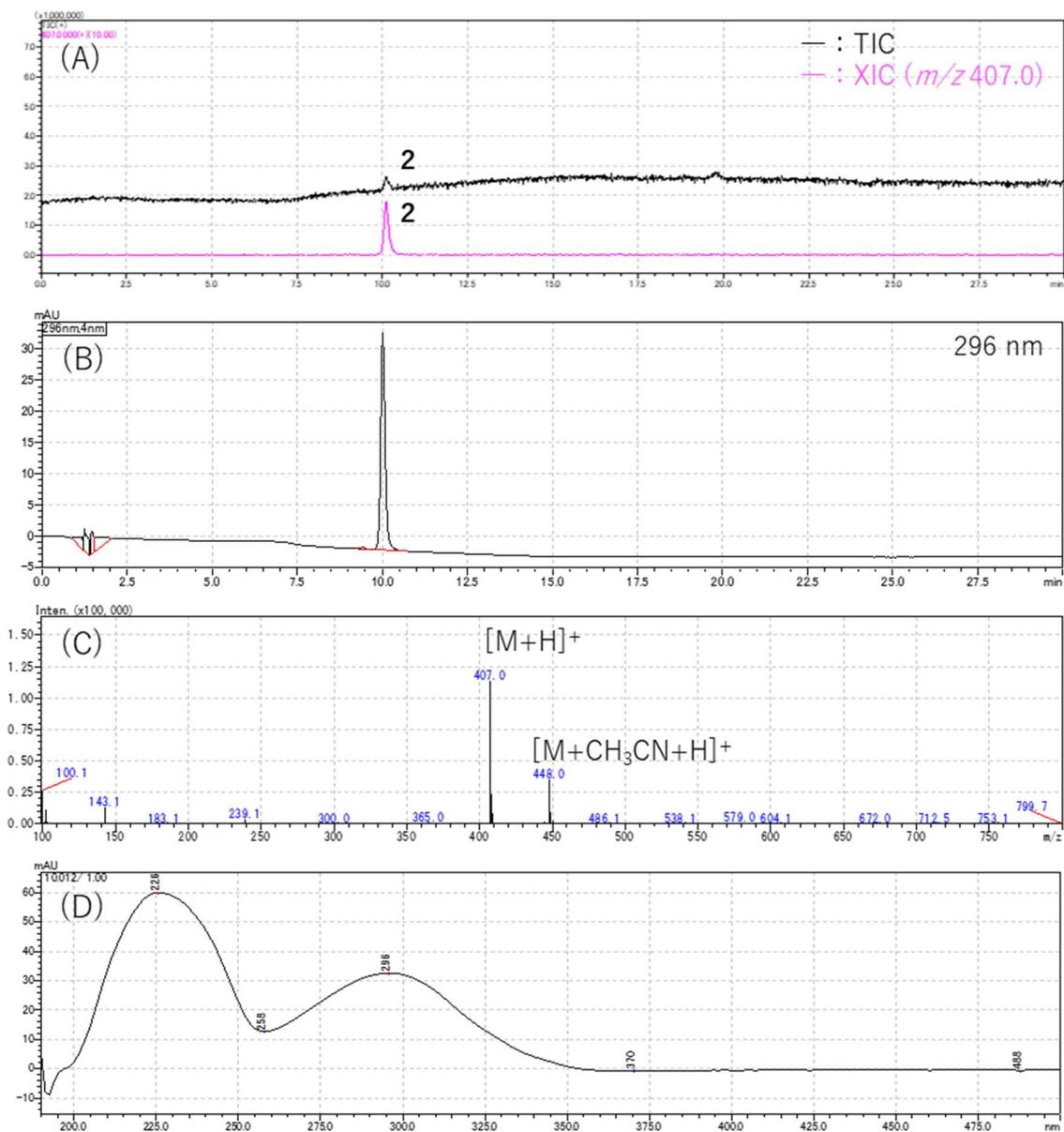


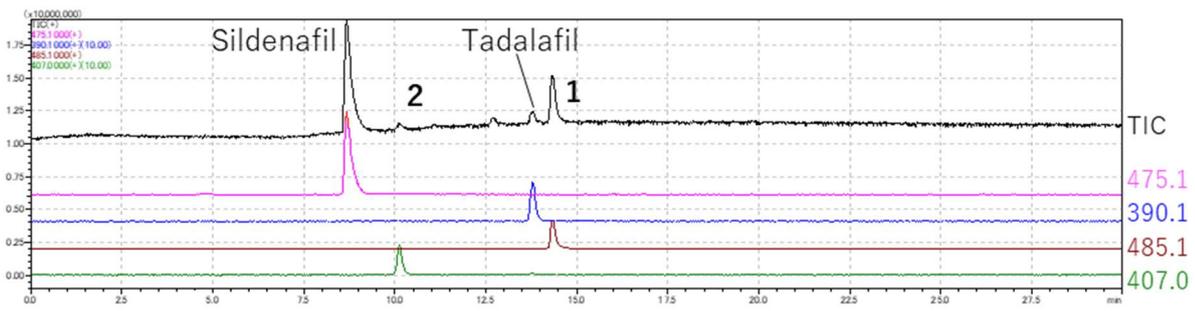
Fig. 3 LC chromatograms and spectroscopic data of desmethylpiperazinyl propoxysildenafil (2)

A: TIC and mass chromatogram at  $m/z$  407.0 on LC-PDA-MS analysis

B: Chromatogram at 296 nm on LC-PDA-MS analysis

C: Mass spectrum of **2**, D: UV spectrum of **2**.

(A)



(B)

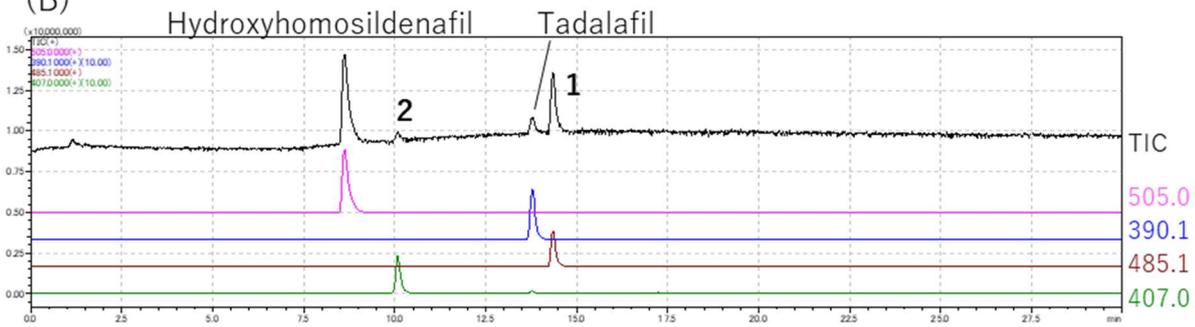


Fig. 4 TIC and mass chromatograms of food supplements for tonicity spiked with authentic dimethyldithiodenafil (1) and desmethylpiperazinyl propoxysildenafil (2)

(A) 陰荃增大丸, (B) 三便宝

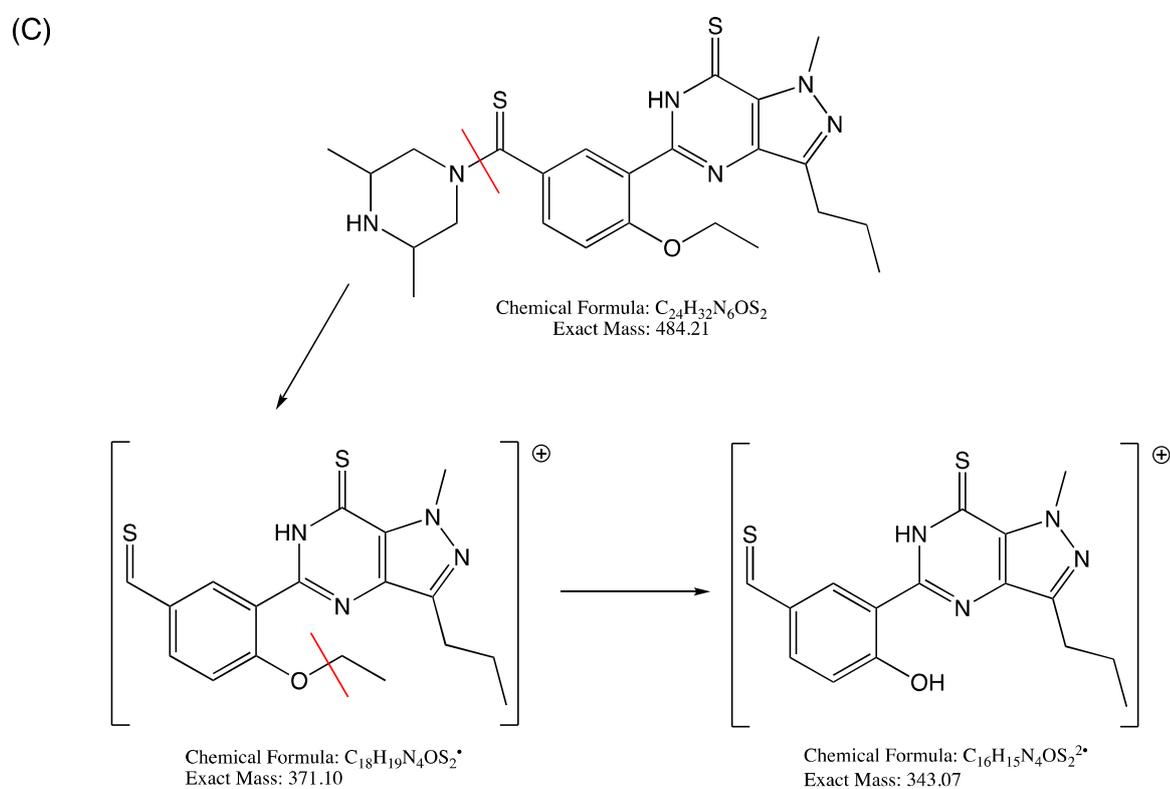
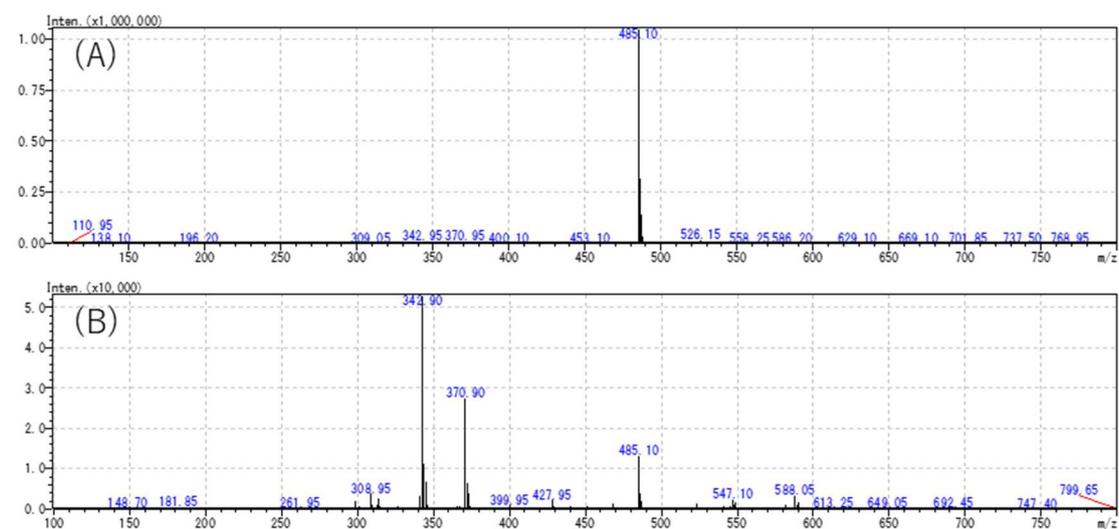


Fig. 5 Mass spectra obtained for dimethyldithiodenafil (1)  
 (A) scan mode (condition 1)  
 (B) in-source collision-induced dissociation (condition 2)  
 (C) proposed fragmentations of dimethyldithiodenafil (1)

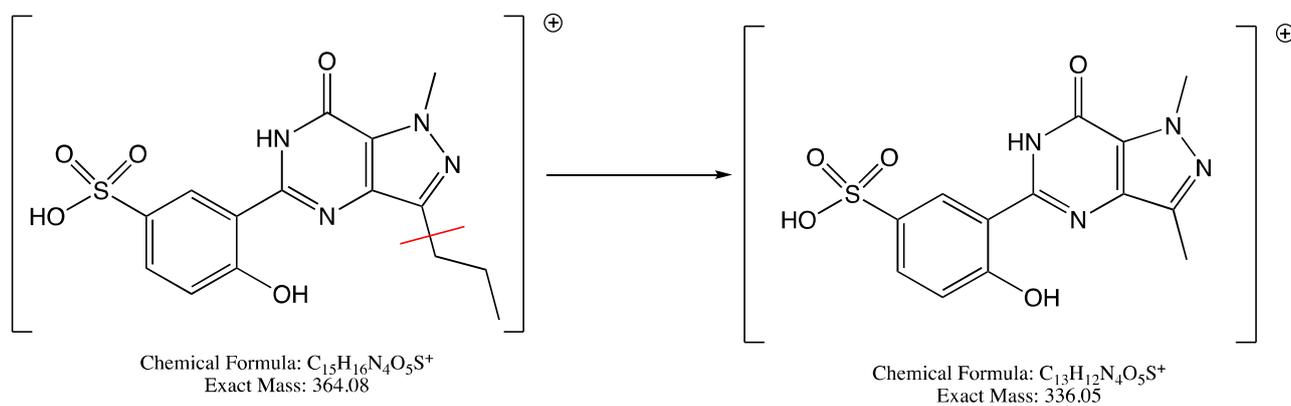
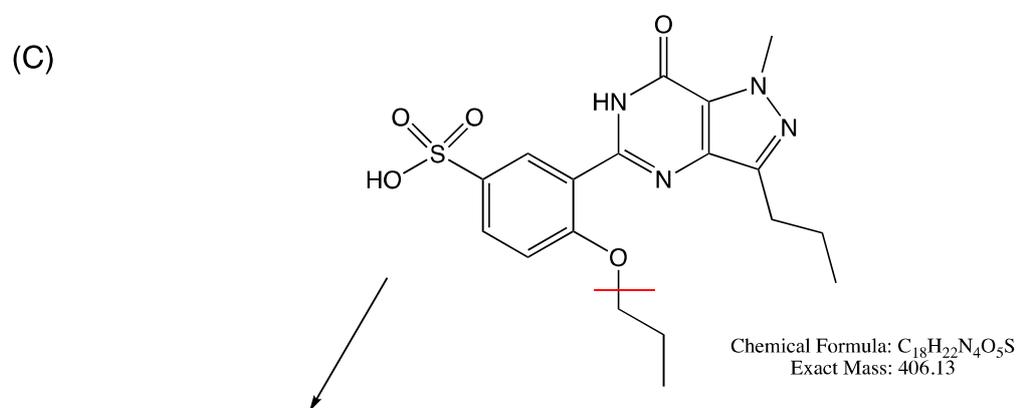
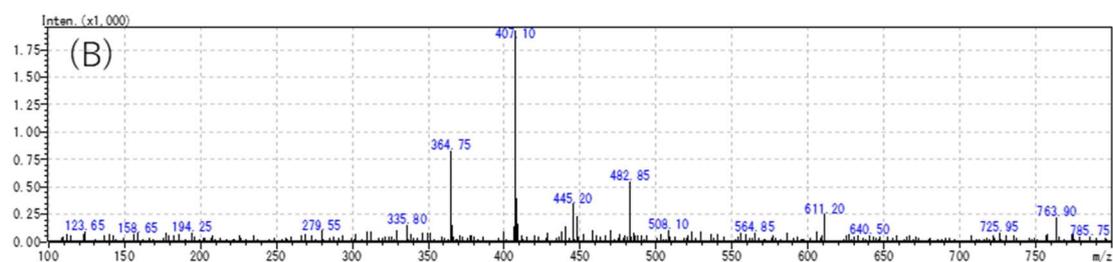
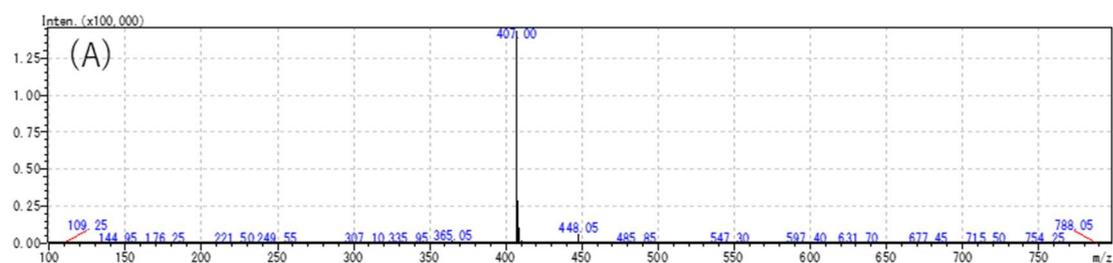


Fig. 6 Mass spectra obtained for desmethylpiperazinyl propoxysildenafil (**2**)

(A) scan mode (condition 1)

(B) in-source collision-induced dissociation (condition 2)

(C) proposed fragmentations of desmethylpiperazinyl propoxysildenafil (**2**)