

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、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) /紫外吸光光度計を用いて明らかにした。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。LC/MS/MS 分析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比較を行った。

【結果】

LC/MS/MS 分析により、Zenigal に含まれる主要な未知成分について、2-amino-5-methyl benzoic acid、および Cetilistat Impurity B であると同定した。

【考察】

2-amino-5-methyl benzoic acid は Cetilistat 合成原料、Cetilistat Impurity B は Cetilistat の合成中間体である。昨年度、Zenigal に含まれる未知成分は Cetilistat ではないことを報告したが、今回その原料および合成中間体が含有されていることが判明した。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、UV 225 nm に吸収を持つ未知物質ピークの化合物が分子量もしくは、部分構造が 177 であることが示唆された。ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) の測定結果より、分子構造に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、Cetilistat が該当した。しかし、Cetilistat 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 Cetilistat ではないことが判明した。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 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 時間ボルテックスした。遠心 (3000 rpm, 3 分) 後、上清を分取し、適宜希釈して試料溶液とした。標準品として、Cetilistat impurity B (Leap Labchem Co.,Ltd) と 2-amino-5-methyl benzoic acid (Combi blocks) を購入し、MeOH に溶解して標準溶液とした。試料溶液及び標準溶液を Q Exactive (Thermo Fisher Scientific) または、LCMS8040 (島津製作所) を用いて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/分

タイムプログラム：

0-15 分：5-85% B, 15-20 分：85% B, 20-

20.1 分：85-5% B, 20.1 -25 分：5% B

カラムオープン： 40 $^{\circ}$ C

PDA 波長： 190-800 nm

<MS 条件>

イオン化法： エレクトロスプレーイオン化法

測定モード： positive または negative ion mode

インタフェース電圧： \pm 3.5 kV

キャピラリー温度： 250 $^{\circ}$ C

C. 研究結果

昨年度の我々の検討において、保持時間 3.5 分（未知成分①）と 18.0 分（未知成分②）に UV 225 nm に吸収をもつピークが認められた（図 1）。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、HPLC により保持時間 6.5 分に UV 225 nm に強い吸収を持つ未知物質が検出されたと報告しており、未知成分②が Khan らの報告した未知成分であることは、昨年度確認済である。

Zenigal 内容物から抽出した試料溶液の LC/MS/MS 測定により、未知成分①および②のマススペクトルを取得し、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。未知成分①のマススペクトルでは、positive ion mode で m/z 152.07 にピークがみられた。組成解析の結果、 $C_8H_9NO_2$ の分子であると考えられ、フラグメントイオンスペクトルより、2-amino-5-methyl benzoic acid であると推定された（図 2）。未知成分②は、negative ion mode で m/z 418.29 にピークがみられた。組成解析の結果 $C_{25}H_{41}NO_4$ の分子であると考えられ、フラグメントイオンスペクトルより、2-(((hexadecyloxy)carbonyl)amino)-5-methylbenzoic acid (Cetilistat Impurity B) であると推定された（図 3）。これらの候補化合物の標準品を用いて、未知成分の同定を試みた（図 4）。未知成分①および②とそれぞれの候補化合物の UV スペクトルを比較したところ、ほぼ一致した（図 5）。さらに、標準溶液の LC/MS/MS 測定を行い、保持時間、マススペクトルおよびフラグメントイオンスペクトルを未知成分と比較したところ、ほぼ一致した結果が得られた（図 6、7）。以上の結果から、未知成分①

は、2-amino-5-methyl benzoic acid、未知成分②は Cetilistat Impurity B であると同定した。

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/MS を用いて行った。その結果、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] で報告されている Zenigal の未知成分が Cetilistat impurity B であると同定した。Cetilistat Impurity B は Cetelostat の合成中間体であり、Cetelostat の不純物の一種である。また、未知成分①として同定された 2-amino-5-methyl benzoic acid も Cetelostat 合成原料である。昨年度、Zenigal には Cetelostat が含まれていないことを報告したが、今回その原料および合成中間体が含有されていることが判明した。LC/MS は、偽造が疑われる医薬品中の未知の微量含有成分を同定・定量する有用な手段であると考えられる。

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、Cetilistat impurity B であると同定した。さらに、Cetelostat の合成原料である 2-amino-5-methyl benzoic acid も含まれていることを確認した。

今後、Zenigal カプセル中の Cetilistat impurity B の定量を進めていく予定である。

F. 引用文献

1. Khan, M. H. et al. Public health concerns for anti-obesity medicines imported for personal use through the internet: a cross-sectional

study. BMJ Open 2, e000854 (2012).

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と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－」

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- ・高橋知里、佐々木瑞紀、吉田直子、谷本剛、木村和子、前川京子、インターネットを介して個人輸入した抗肥満薬に含まれる未知成分の同定、第6回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム（2020年11月7日、オンライン）

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

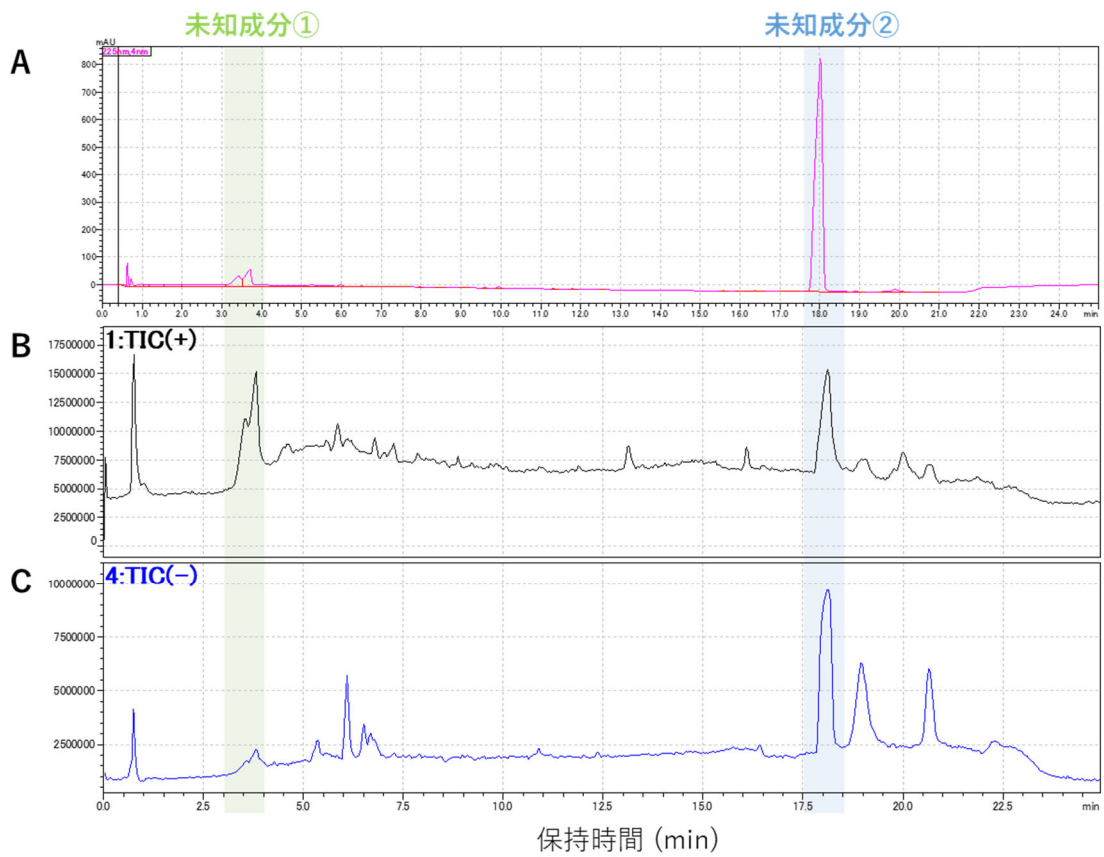


図1 Zenigalに含まれる未知成分のLC/PDAおよびLC/MS/MSによる解析

A) PDAクロマトグラム (255 nm)、B) TICクロマトグラム (positive mode)、C) TICクロマトグラム (negative mode)

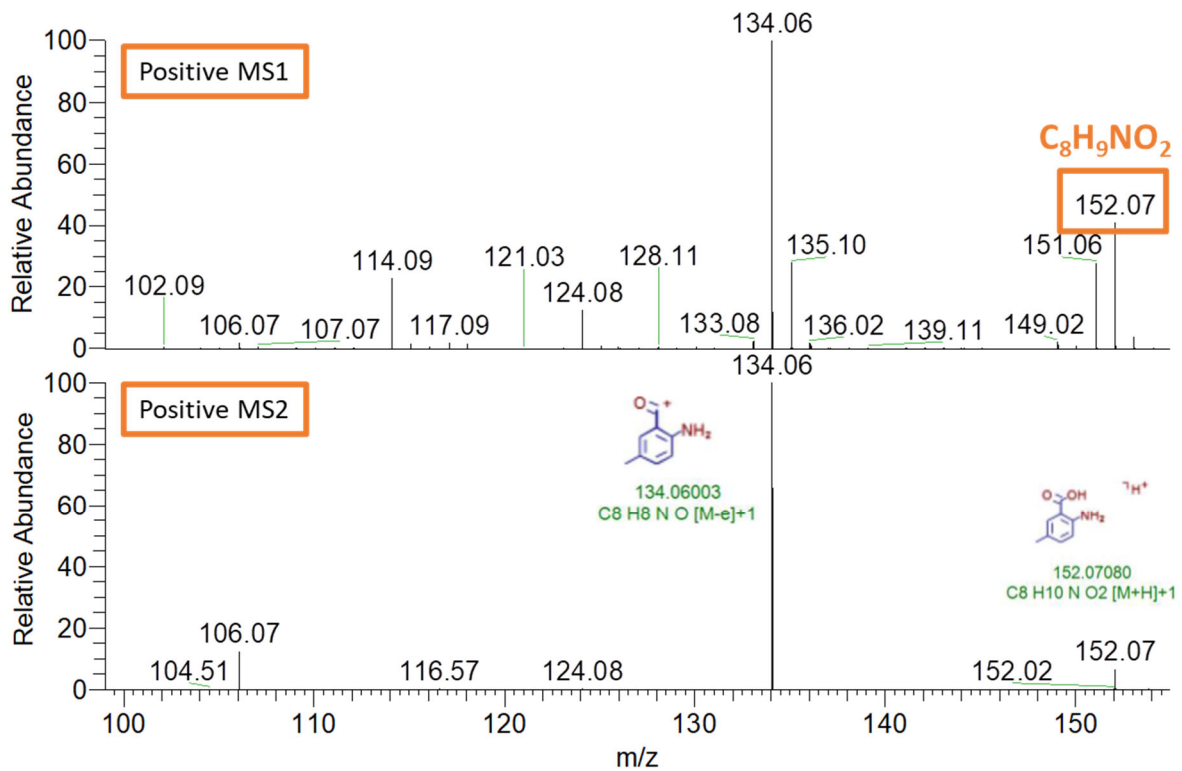


図2 未知成分①のマススペクトルおよびプロダクトイオンスペクトル

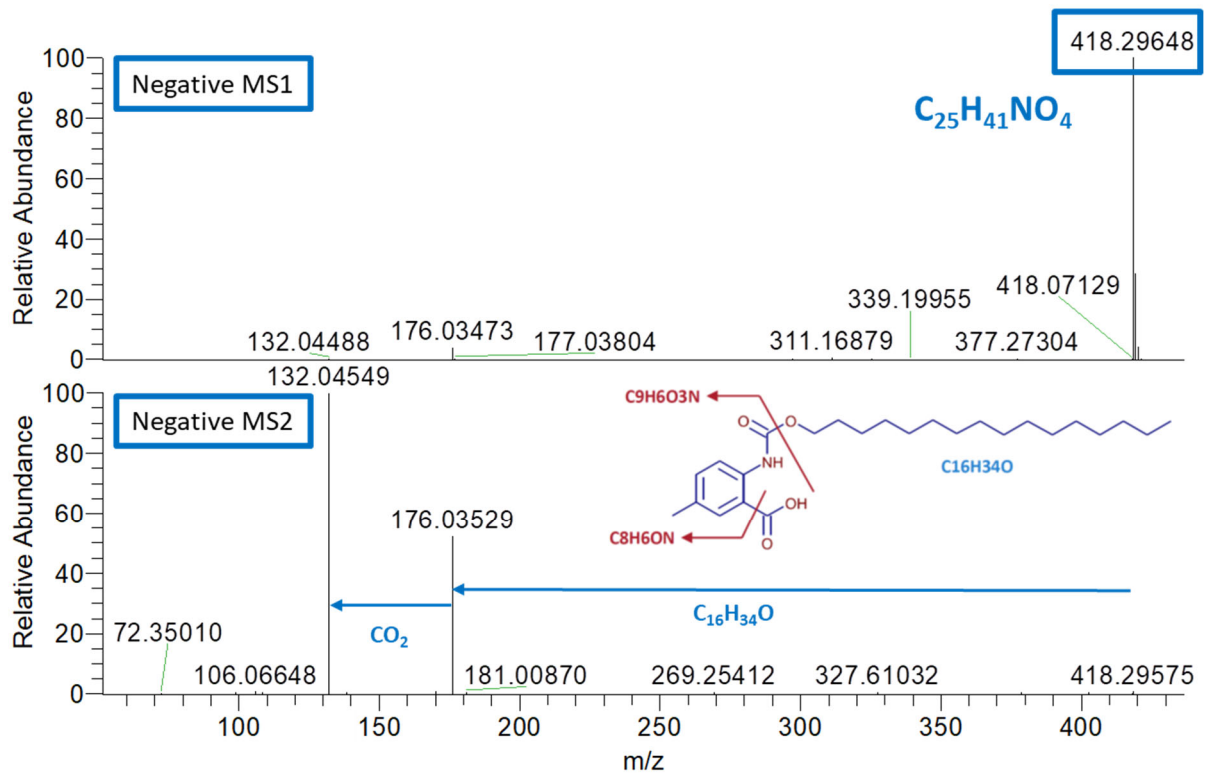


図3 未知成分②のマススペクトルおよびプロダクトイオンスペクトル

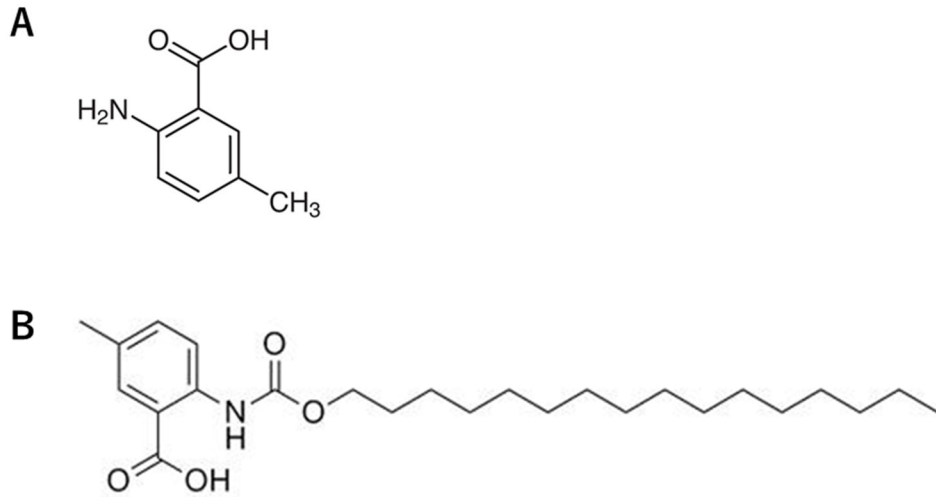


図4 候補化合物の構造

A) 2-amino-5-methyl benzoic acid、B) Cetilistat impurity B

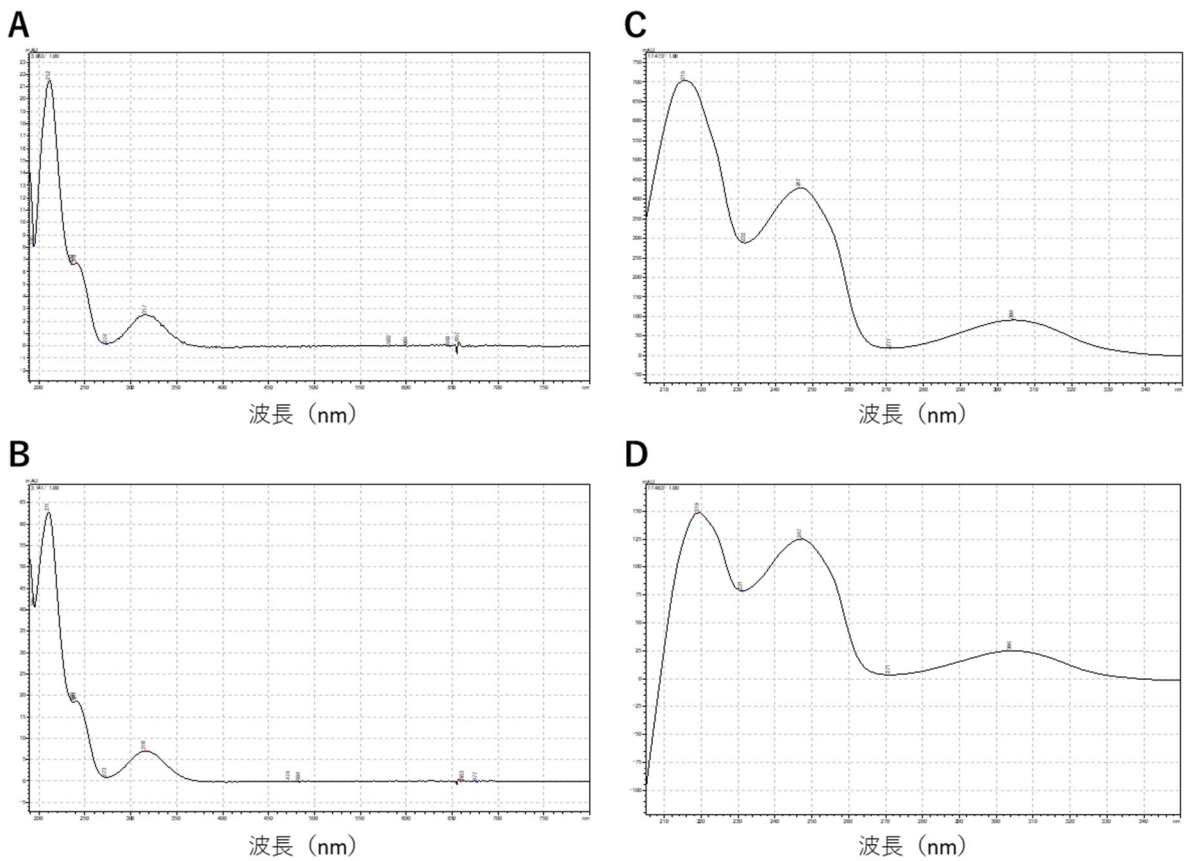


図5 未知成分と標準品の UV スペクトル

A) 未知成分①、B) 2-amino-5-methyl benzoic acid、C) 未知成分②、D) Cetilistat impurity B

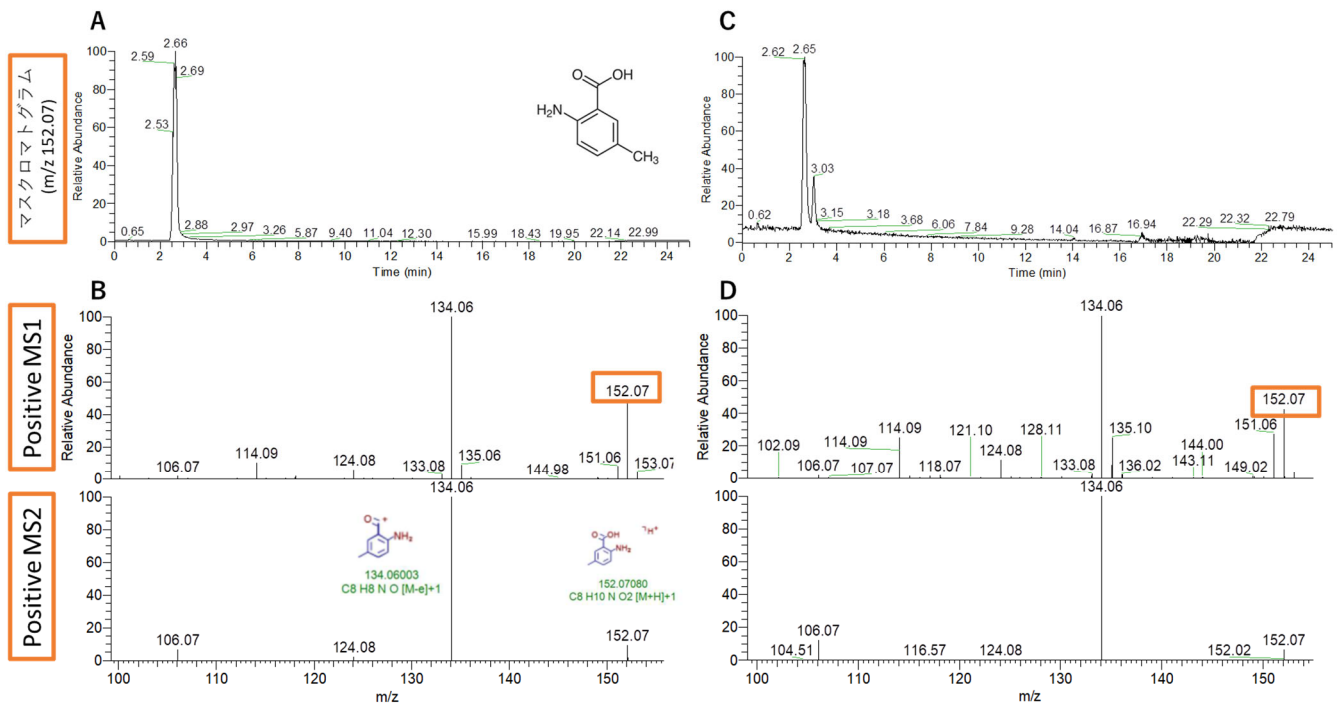


図6 LC/MS/MSによる2-amino-5-methyl benzoic acid標準品と未知成分①の比較

A) 2-amino-5-methyl benzoic acidのマスククロマトグラム、B) 2-amino-5-methyl benzoic acidのマススペクトルおよびプロダクトイオンスペクトル、C) 未知成分①のマスククロマトグラム、D) 未知成分①のマススペクトルおよびプロダクトイオンスペクトル

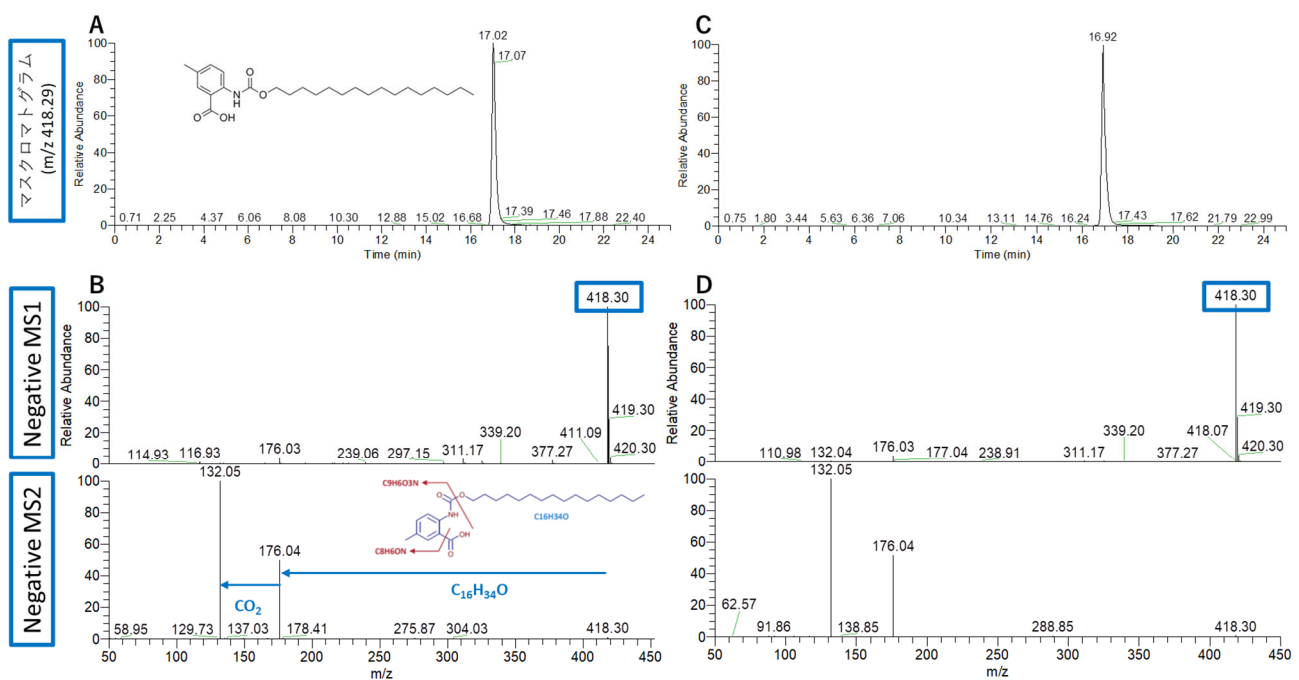


図7 LC/MS/MSによるCetilistat impurity B標準品と未知成分②の比較

A) Cetilistat impurity Bのマスククロマトグラム、B) Cetilistat impurity Bのマススペクトルおよびプロダクトイオンスペクトル、C) 未知成分②のマスククロマトグラム、D) 未知成分②のマススペクトルおよびプロダクトイオンスペクトル