

厚生労働行政推進調査事業費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)
令和3年度 分担研究報告書

LC/MS 法を用いたメタンジエノン定量法の構築と 個人輸入製品の分析

分担研究者 前川京子 (同志社女子大学薬学部)
研究協力者 堀 愛美 (同志社女子大学薬学部)
高橋知里 (同志社女子大学薬学部)
Mohammad Sofiqur Rahman (金沢大学大学院医薬保健総合研究科)

研究要旨

【目的】

Anabolic androgenic steroid (AAS) は、処方箋医薬品として再生不良性貧血等の治療に用いられるが、筋肉増強を目的に濫用されている実態がある。個人輸入によって入手された医薬品には、偽造医薬品をはじめ、低品質医薬品等の混在や不適正使用を加速する等、保健衛生上の危険性がある。AAS 偽造品や品質不良品が個人輸入される可能性があることから、インターネット上に流通するメタンジエノン製品を試買し、品質を調査することを目的とした。

【方法】

逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーと精密質量が測定可能なフーリエ変換型質量分析計を組み合わせ、メタンジエノンの測定系を構築した。錠剤1個よりメタンジエノンを抽出し、内部標準法により定量した。15製品を対象とし、各製品につき錠剤3個の定量結果を平均して含量を求めた。

【結果】

移動相の組成が異なる溶媒を用いた2種の分析条件を比較した結果、水-アセトニトリル系の移動相にイソプロパノールを添加することでメタンジエノンのキャリアオーバーが解消され、原点を通る良好な直線性の検量線が得られた。15検体すべてに、メタンジエノンが表示含量の80%以上含まれていた。

【考察】

個人輸入で入手したメタンジエノン製剤に、メタンジエノンが含有されていることを確認した。濫用による健康被害を回避するためには、安易な個人輸入を避ける必要がある。

A. 研究目的

Anabolic androgenic steroid (AAS) は、蛋白質同化作用を有するステロイドホルモンの総称であり、テストステロンに類似した構造を有し、男性ホルモン作用を有する。日本では、AAS の 1 つであるメテノロン酢酸エステルが処方薬として承認されており、骨粗鬆症、慢性腎疾患、悪性腫瘍、外傷、熱傷、再生不良性貧血の治療のために使用される。一方で、AAS は筋肉増強剤としても使用され、ドーピング薬物として知られる。AAS 乱用(ドーピング)にかかる AAS の用量は、一般的に治療量の約 100 倍と言われており、心理的な変化や依存を引き起こすことが知られている。AAS には多くの副作用が知られており、血圧上昇、コレステロール値上昇、肝障害、心筋梗塞などが挙げられる[1]。AAS は、処方箋医薬品に指定されているので、本来は医師の処方箋によらなければ使用できないが、海外からの個人輸入により処方箋無しで入手可能である。海外では偽造薬 AAS や規格外 AAS の流通が確認されており[2-4]、本邦にも個人輸入を通して流通する可能性がある。

経口投与可能な AAS であるメタンジエノン¹は、テストステロンに類似した構造をしており、ステロイド骨格の 1 位 2 位に二重結合を、17 位にメチル基を有する点のみがテストステロンと異なる。米国では、スケジュール III 薬物に指定され、規制されている。本邦において、AAS 偽造品や品質不良品が個人輸入される可能性があることから、インターネット上に流通するメタンジエノン製品を試買し、品質を調査することを目的とした。本研究では LC-MS を用いてメタンジエノンの測定系を構築し、錠剤中に含

まれるメタンジエノンを定量した。

B. 研究方法

B-1. LC-MS による測定系の構築

東京化成工業(東京)より、メタンジエノン(#H1193, Lot H4FHF)及びメチルテストステロン(#M0435, Lot YNV3C2)を購入した。それぞれをメタノールで溶解した後、メタンジエノンを 0.1-5.0 μM 、及び内部標準溶液としてメチルテストステロンを 1.0 μM 含む標準溶液を調製した。これらを高速液体クロマトグラフィー(UltiMate 3000 HPLC システム, Thermo ScientificTM, Massachusetts, USA)で分離後、Q Exactive システム(Thermo ScientificTM)の Targeted single ion monitoring (T-SIM) モードで測定した。メタンジエノン($\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_2$)は、 m/z 301.21621、メチルテストステロン($\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$)は、 m/z 303.23186 とし、共にプロトン付加体として検出した。移動相の組成が異なる溶媒を用いた 2 種の HPLC の分離条件(HPLC 条件-1、HPLC 条件-2)を比較した。測定条件は下記の通りとした。

<HPLC 条件-1>

移動相：(溶媒 A) 0.1%酢酸(溶媒 B) 0.1%
酢酸含有 AcCN

カラム： Shim-pack FC-ODS 3 μm , 2.0 \times 75
mm

注入量：2 μL

流量：0.3 mL/min

タイムプログラム： 0-11 min: 5-95% B,
11-14 min: 95% B, 14-14.10 min: 95-5% B,
14.10 -18 min: 5% B

カラムオープン：40 $^{\circ}\text{C}$

<HPLC 条件-2>

移動相：(溶媒 A) 0.1%酢酸 含有 AcCN：

Water=3：7 (溶媒 B) AcCN：IPA =
9：1

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

注入量：2 μ L

流量：0.3 mL/min

タイムプログラム： 0-7 min: 5-50%B, 7-
7.1 min: 50-95%B, 7.1-10 min: 95% B, 10-
10.1 min: 95-5%B, 10.1-14min: 95-5% B

カラムオープン：40 $^{\circ}$ C

<MS 条件>

イオン化法：加熱エレクトロスプレーイ
オン化 (H-ESI) 法

測定モード：ポジティブイオンモード

シースガス：窒素

シースガス流量：50 arb unit

AUX ガス：窒素

AUX ガス流量：10 arb unit

スプレー電圧：+3.5 kV

ペーポライザ温度：300 $^{\circ}$ C

キャピラリー温度：250 $^{\circ}$ C

B-2 試料の前処理

個人輸入により得られたメタンジエノン
15 製品を検体とした。検体は金沢大学より
供与いただいた。各検体につき、3 個の錠剤
を定量試験に用いた。日局に記載されてい
るエストリオール錠、プレドニゾロン錠の
前処理に準じ、メタノールを用いて、錠剤 1
個からメタンジエノン抽出した。すなわ
ち、テストサンプルの調製では、各錠剤 1 錠
の質量を精密に量り、乳鉢を用いて粉末と

した。メタンジエノン約 2 mg に対応する量
を精密に量り、蒸留水 1 mL を加え、超音波
を用いて粒子を小さく分散させた。MeOH
5 mL を加えて 10 分間振り混ぜた後、遠心分
離し、上澄み液を分取した。さらに MeOH
5 mL を加え、同様の操作を 2 回繰り返し、
上澄み液を合わせた。内部標準物質として、
4 mM メチルテストステロンの MeOH 溶液
1 mL を加えた後、MeOH を加えて全量を 20
mL とした。この液 1 mL に MeOH を加え
て全量を 20 mL とした。さらに、この液 1
mL に MeOH：LCMS 用蒸留水=65：35 を
加えて 10 mL とし、0.22 μ m のフィルターで
ろ過し、試料溶液とした。

ポジティブコントロールサンプルは、メ
タンジエノン標準品 1.25 μ M、メチルテスト
ステロン 1.0 μ M が含まれるようにテストサ
ンプルと同様に調製した。さらに、錠剤の添
加物の影響を確認するため、粉碎したプレ
ドニゾロン錠を加えてポジティブコントロ
ールサンプルを抽出し、テストサンプルと
同様に調製した。日本薬局方プレドニゾロ
ン錠は、プレドニゾロン錠「タケダ」5 mg
(武田デバ薬品株式会社) を購入した。

内部標準法による検量線の調製は、段階
希釈したメタンジエノン標準品 (10, 5, 2, 1,
0.5, 0.2 mM) 2 mL に蒸留水 1 mL、及び 4
mM メチルテストステロンの MeOH 溶液 1
mL を加え、メタノールを加えて全量を 20
mL とした。この液 1 mL に MeOH を加え
て 20 mL とした。さらにこの液 1 mL に
MeOH：LCMS 用蒸留水=65：35 を加えて
10 mL とし、0.22 μ m のフィルターでろ過し、
検量線溶液 (5.0, 2.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.1 μ M メ
タンジエノン+ 1.0 μ M メチルテストステ
ロン in MeOH) とした。

C. 研究結果

C-1. LC-MS による測定系の構築

HPLC 条件-1 を用いた LC-MS 測定で得られた MS クロマトグラムを図 1 に示す。標準溶液ではメタンジエノン¹は 7.15 分に、メチルテストステロン²は 7.77 分に溶出された。ブランクサンプル (MeOH) において、メチルテストステロンのキャリーオーバーは認められなかったが、メタンジエノンのキャリーオーバーが認められた。

HPLC 条件-2 を用いた LC-MS 測定で得られた MS クロマトグラムを図 2 に示す。この条件では、メタンジエノン標準品は 4.08 分に、メチルテストステロンは 5.14 分に溶出された。HPLC 条件-1 とは異なりブランクサンプル (MeOH) においてメタンジエノン及びメチルテストステロン共にキャリーオーバーは認められなかった。

HPLC 条件-1 及び HPLC 条件-2 で得られた検量線をそれぞれ図 3、及び図 4 に示す。両検量線の直線性は良好であったが、HPLC 条件-1 は検量線の y 軸切片が原点から大きく外れた。HPLC 条件-1 で原点からずれた検量線が得られた原因としてメタンジエノンのキャリーオーバーが考えられた。よって移動相にイソプロパノールを含む HPLC 条件-2 を以後の測定に用いることにした。

C-2. サンプル調製法に関する検討

予備検討において、ポジティブコントロールサンプルのメタンジエノンの回収率は、92.83%であった。また、粉碎したプレドニゾロン錠を加えて抽出したポジティブコントロールサンプルのメタンジエノンの回収率は、97.04%であり、両者には、大きな差はなかった。よってプレドニゾロン錠に含ま

れる添加物 (乳糖水和物、アルファー化デンプン、ヒドロキシプロピルセルロース、ステアリン酸マグネシウム、トウモロコシデンプン) は、メタンジエノンの回収率には大きな影響を与えないと考えられた。入手したメタンジエノン錠剤中に含まれる添加物の種類は不明であり、これ以上の検討はできなかった。

予備検討においてポジティブコントロールサンプルの回収率が 92.83%であったことから、テストサンプルの定量分析では、ポジティブコントロールサンプルの回収率が 100%になるように補正した。すなわち、テストサンプル 1 錠に含まれるメタンジエノンの含量 (mg) は下記の数式より求めることとした。

1 錠あたりに含まれるメタンジエノンの含量 (mg) = $1.25 (\mu\text{M}) \times \text{Qt}/\text{Qs} \times 200 \times 0.02 (\text{L}) \times 300.2089 (\text{g/mol}) \times (1 \text{ 錠の質量 (mg)}) / (\text{秤取量 (mg)}) \times 1/1000 (\text{mg}/\mu\text{g})$

1.25 (μM) = ポジティブコントロールにおけるメタンジエノンの濃度

Qt = テストサンプルにおける内標準物質のピーク面積に対するメタンジエノンのピーク面積の比

Qs = ポジティブコントロールサンプルにおける内標準物質のピーク面積に対するメタンジエノンのピーク面積の比

C-3. 定量分析

ポジティブコントロールサンプルの回収率 (N=3) は、93.64%、89.8%、95.0%であり、これらを 100%に補正して、各検体 1 錠あたりのメタンジエノンの含量 (mg) を求めた。さらに算出されたメタンジエノンの含量 (mg) を表示含量 (10mg、もしくは 5

mg) で除して含量 (%) を求めた (図 5)。15 検体のうち、1 錠あたりの含量 (%) が最も低い検体は、7-5-D1-TH-100 であり、 $82.5 \pm 5.4\%$ であった。一方、最も高い含量 (%) を示した検体は、4-10-C1-TW-60 であり、 $100.4 \pm 6.3\%$ であった。

D. 考 察

精密質量が測定可能なフーリエ変換型質量分析計を用いて、メタンジェノンの定量系を構築した。フーリエ変換型質量分析計は、三連四重極型質量分析計と異なり、フラグメントイオンの探索やコリジョンエネルギーの最適化が不要であり、メソッドの構築が容易であった。また、逆相カラムを用いて水-アセトニトリル系の移動相によりメタンジェノンを分離する場合、移動相にイソプロパノールを添加することでキャリーオーバーを解消できることが示された。さらに、構造が類似したメチルテストステロンがメタンジェノン検量線の内部標準物質として使用できることが明らかになった。

錠剤からメタンジェノンの抽出では、メタンジェノンは構造が類似しているエストリオール錠、プレドニゾロン錠の日本薬局方の定量法に準じて、メタノール抽出で実施した。メタンジェノン標準品のみを抽出したポジティブコントロールサンプルの回収率が 100% にならなかった原因は不明であるが、標準品の回収率で補正をすることで、錠剤中に含まれるメタンジェノンを定量可能と考える。

錠剤に含まれるメタンジェノンの含量には多少のばらつきが認められたが、個人輸入サイトで購入した 15 検体すべてにメタ

ンジェノンが表示含量の 82.5~100.4% の範囲で含まれていた。濫用による健康被害を回避するためには、安易な個人輸入を避ける必要がある。

E. 結 論

LC-MS を用いてメタンジェノンの測定系を構築し、個人輸入により入手した錠剤中に含まれるメタンジェノンを定量した。15 検体すべてに表示含量の 80% 以上のメタンジェノンが含有されていることを確認した。

F. 引用文献

1. Liu JD, Wu YQ: Anabolic-androgenic steroids and cardiovascular risk. *Chin Med J (Engl)*. 2019; 132(18):2229-2236.
2. Coopman V, Cordonnier J: Counterfeit drugs and pharmaceutical preparations seized from the black market among bodybuilders. *Ann Toxicol Anal*. 2012; 24(2):73-80.
3. Tircova B, Bosakova Z, Kozlik P: Development of an ultra - high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of anabolic steroids currently available on the black market in the Czech Republic and Slovakia. *Drug Test Anal*. 2019; 11(2): 355-360.
4. Fabresse N, Gheddar L, Kintz P, Knapp A, Larabi IA, Alvarez JC: Analysis of pharmaceutical products and dietary supplements seized from the black market among bodybuilders. *Forensic Science International*, 2021; 322, 110771.

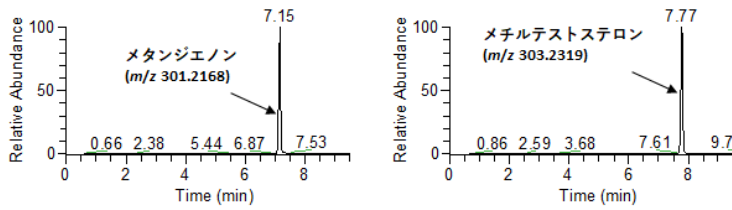
G. 研究発表

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

(a) 2.5 μMメタンジエノン標準品 + 1.0 μMメチルテストステロン標準品



(b) ブランクサンプル (MeOH)

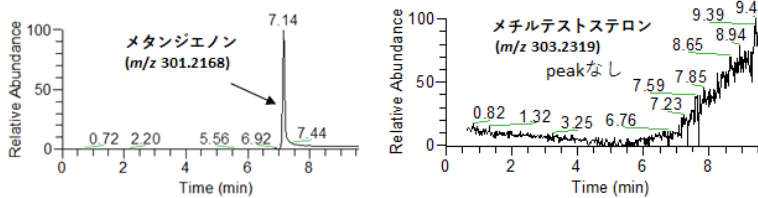
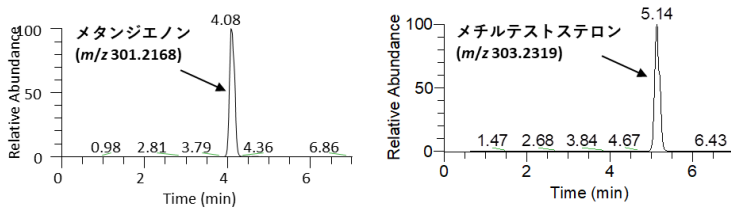


図1 HPLC条件-1による標準品(a)、及びブランクサンプル(b)のマスクロマトグラム

(a) 2.5 μMメタンジエノン標準品 + 1.0 μMメチルテストステロン標準品



(b) ブランクサンプル (MeOH)

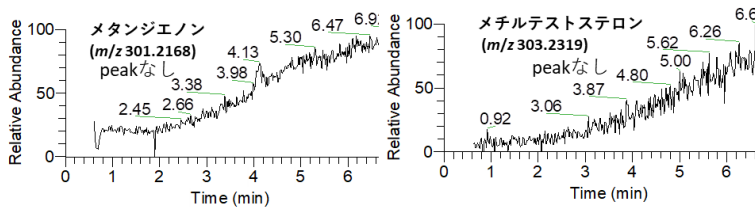


図2 HPLC条件-2による標準品(a)、及びブランクサンプル(b)のマスクロマトグラム

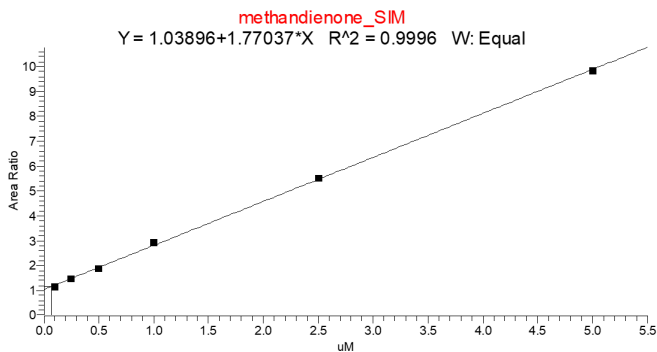


図3 HPLC条件-1によるメタンジエノン標準品の検量線

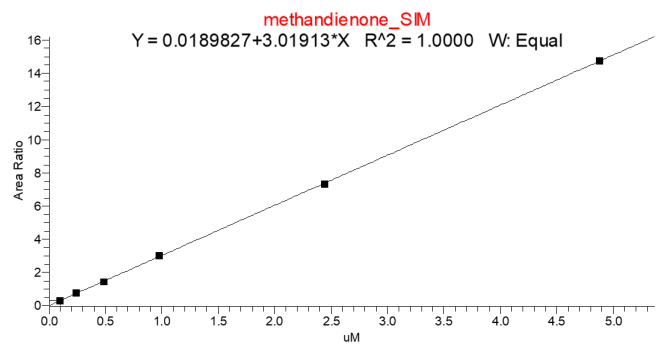


図4 HPLC条件-2によるメタンジエノン標準品の検量線

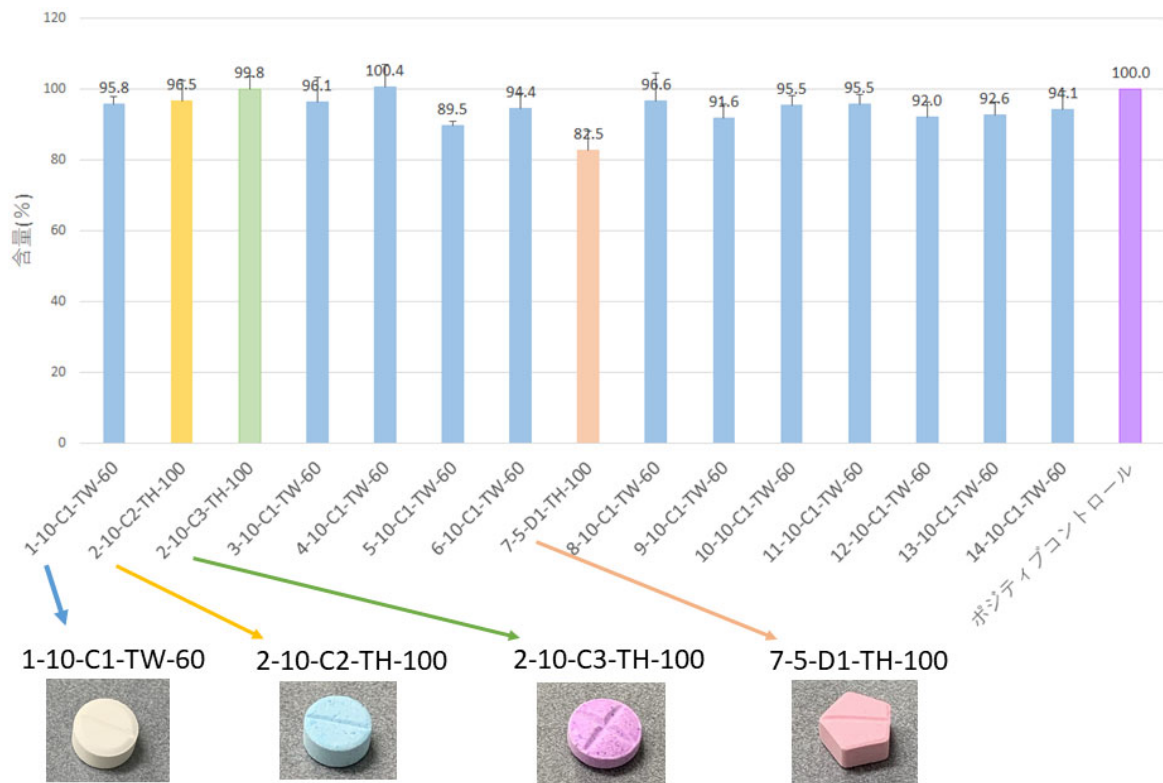


図5 各錠剤の外観とLC-MS法で得られた各錠剤に含まれるメタンジエンの含量 (%)
 ポジティブコントロールサンプルの回収率が100%になるように補正後、各錠剤に含まれるメタンジエ
 ノンの含量 (%) を求めた。