

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2-令和4年度 総合分担研究報告書

インターネットで購入した痩身薬 Zenigal の 非表示含有成分の定量

分担研究者 高橋知里 (同志社女子大学薬学部)
前川京子 (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。また、偽造品は医薬品だけとは限らず、サプリメントもその対象である。我々は、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) /紫外吸光度計を用いて明らかにした。本研究では、抗肥満薬 Zenigal を対象として、高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS) によりその含有成分の同定・定量を行い、偽造医薬品流通の実態を調査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。候補化合物として、Cetilistat impurity B、2-amino-5-methyl benzoic acid 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。Cetilistat impurity B、2-amino-5-methyl benzoic acid 標準品を MeOH に溶解して標準溶液とした。標準溶液を用いて HPLC 条件の検討を行い、選択反応モニタリング法 (SRM) による LC/MS の定量系を構築した。構築した定量系を用いて、1カプセルあたりの含有量を算出した。

【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。2-amino-5-methyl benzoic acid (+)、Cetilistat Impurity B (-)、Cetilistat Impurity B (+)のそれぞれにおいて保持時間を考慮しピーク形状が良好な HPLC 条件を構築した。さらに感度が一番良い SRM トランジションを選択し、検量線を作成したところ、すべての検量線が良好な直線性を示した。1カプセル中の 2-amino-5-methyl benzoic acid、Cetilistat Impurity B 含有量を定量したところ、2-amino-5-methyl benzoic acid は平均 1.3 mg (0.9%)、Cetilistat Impurity B は、平均 18.8 mg (13%) であった。

【考察】

今回、インターネットで入手可能な抗肥満薬 Zenigal に含まれる非表示成分の LC/MS/MS を

用いた同定、定量を行った。Zenigal に含有される 2-amino-5-methyl benzoic acid、Cetilistat Impurity B は、微量であり、また、含有量にはばらつきが見られた。混入の経緯は不明であるが、含まれていた 2-amino-5-methyl benzoic acid、Cetilistat Impurity B は非常に微量であったことから、製造ライン中のコンタミネーションである可能性も考えられる。

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いないことが判明した。一方で、UV 225 nm に吸収を持つ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。

これまで我々は、UV 225 nm に吸収を持つ未知物質ピークの化合物は、分子量もしくは、部分構造が 177 であることを明らかにし、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。本研究では、「Zenigal」に含有されている未知成分の同定・定量を高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS) により行い、偽造医薬品流通の実態を調査することを目的とした。

B. 研究方法

B-1. 未知成分の同定

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

B-2. 未知成分の定量のための LC 条件の検討

標準品として、Cetilistat impurity B (LEAPChem Co.,Ltd, Hong Kong, China) と 2-amino-5-methyl benzoic acid (Combiblocks Inc., San Diego, CA. USA) を購入し、MeOH に溶解して 100 μ M 標準溶液とした。標準溶液を LCMS8040 (SHIMADZU CORPORATION, Kyoto) を用いて下記に示す HPLC 条件①～③と MS 条件を組み合わせ分析した。

<HPLC 条件①>

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：5 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

<HPLC 条件②>

移動相：(A) 0.1% ギ酸
(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：5 μ L
流量：0.3 mL/分
タイムプログラム：
0-5 分：10-95% B, 5-15 分：95% B, 15-
15.1 分：95-10% B, 15.1 -20 分：10% B
カラムオープン：40 $^{\circ}$ C
PDA 波長：190-800 nm

<HPLC 条件③>

移動相：(A) 0.1% ギ酸
(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：5 μ L
流量：0.3 mL/分
タイムプログラム：
0-2.5 分：10% B, 2.5-7.5 分：95% B, 7.5-
15 分：95-10% B, 15-15.1 分：95-10% B,
15.1-20 分：10% 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：±3.5 kV

キャピラリー温度：250 °C

SRM トランジション：

2-amino-5-methyl benzoic acid (MW : 151.16)
152.00>134.10, 152.00>106.10, 152.00>77.
10

Cetilstat Impurity B (MW : 419.61)

positive : 420.30>178.10, 420.30>160.10,
420.30>134.00

negative : 418.30>176.05, 418.30>132.05,
418.30>42.20

B-3. 未知成分の定量

B.1. 標準溶液の調製

内部標準物質としてパラオキシ安息香酸
ブチル (FUJIFILM Wako Pure Chemical
Corporation, Osaka, Japan) を購入した。
Cetilstat impurity B と 2-amino-5-methyl
benzoic acid それぞれを MeOH に溶解して
100µM 標準溶液とした。100µM Cetilstat
Impurity B 溶液、100 µM 2-amino-5-methyl
benzoic acid 溶液、各 1mL に内部標準物質
として、10µM パラオキシ安息香酸ブチル
1 mL、MeOH 8 mL をそれぞれ加え、1 µM
パラオキシ安息香酸ブチルを含む 10 µM の
Cetilstat Impurity B 溶液、10 µM の 2-amino-
5-methyl benzoic acid 溶液を調製した。10 µM
の Cetilstat Impurity B 溶液 500 µL、10 µM
の 2-amino-5-methyl benzoic acid 溶液 500 µL
を混合し、5 µM Cetilstat Impurity B、2-amino-
5-methyl benzoic acid 溶液を調製した。本溶

液を段階希釈して最終濃度 2.5, 1, 0.5, 0.25,
0.1, 0.05, 0.025 µM となるように内部標準溶
液を調製した。

B.2. 試料溶液の調製

Zenigal 10 カプセル (No. 1~No. 10) 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 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 2 倍希釈後、さらに 100 倍希釈
した。この 100 倍希釈した溶液 10 µL に IS
として 100 µM パラオキシ安息香酸ブチル
10 µL と 980 µL の MeOH を加え、試料溶液
とした。

B.3. LC/MS 測定

試料溶液及び標準溶液を、LCMS-8040
(SHIMADZU CORPORATION, Kyoto) を用
いて下記に示す HPLC 条件と MS 条件を組
み合わせて分析した。標準溶液から得た検
量線を用いて、試料溶液の 2-amino-5-methyl
benzoic acid、Cetilstat Impurity B のピーク面
積値から試料溶液に含まれる 2-amino-5-
methyl benzoic acid、Cetilstat Impurity B の濃
度を求め、1 カプセルあたりの 2-amino-5-
methyl benzoic acid、Cetilstat Impurity B 含有
量を算出した。

<HPLC 条件>

移動相：(A) 0.1% ギ酸

(B) 100%アセトニトリル

カラム：Shim-Pack, FC-ODS 3 µm, 75×2.0
mm

注入量：5 µL

流量：0.3 mL/分

タイムプログラム：

0-2.5 分：10% B, 2.5-7.5 分：95% B, 7.5-

15分: 95-10% B, 15-15.1分: 95-10% B,
15.1-20分: 10% B
カラムオープン: 40 °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: ±3.5 kV

キャピラリー温度: 250 °C

SRM トランジション:

2-amino-5-methyl benzoic acid (MW: 151.16)
positive: 152.20>134.00

Cetilistat Impurity B (MW: 419.61)
negative: 418.30>176.05

パラオキシ安息香酸ブチル (MW: 194.23)
positive: 195.10>139.00

C. 研究結果

C-1. 未知成分の同定

これまで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、すでに確認している。

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。

C-2. 未知成分の定量のための LC 条件の検討

HPLC 条件①は溶媒 A に 10 mM ギ酸アンモニウム、溶媒 B にアセトニトリルを使用した。条件①で、標準品を測定したところ、2-amino-5-methyl benzoic acid は保持時間 2.6 分に、Cetilistat Impurity B は 17.6 分に溶出した (図 8)。2-amino-5-methyl benzoic acid の保持時間が 2.6 分と早い一方で、Cetilistat Impurity B の保持時間は 17.5 分と遅かった。また、2-amino-5-methyl benzoic acid のピー

ク形状にリーディングが見られた。2-amino-5-methyl benzoic acid のピーク形状を改善するため、移動相の pH を変更し、条件②として、溶媒 A に 0.1%ギ酸、溶媒 B に AcCN を使用した。条件②で、2-amino-5-methyl benzoic acid は 3.63 分に、Cetilistat Impurity B は 11.13 分に溶出した (図 9)。また、条件②では、2-amino-5-methyl benzoic acid のピーク形状が改善した。しかし、2-amino-5-methyl benzoic acid の保持時間が、早いため、条件②からさらにグラジエントプログラムを改良し、条件③を構築した。条件③で、2-amino-5-methyl benzoic acid は 5.73 分に、Cetilistat Impurity B は 13.6 分に溶出した (図 10)。ピーク形状も良好だったため、定量系の LC 分離条件として条件③を選択した。

C-3. 未知成分の定量

標準溶液により作成した各成分の検量線の一例を図 11 に示す。回帰直線の相関係数 (R^2) は全て 0.99 以上であり良好な直線性を示した。得られた検量線を用いて Zenigal カプセル中に含まれる Cetilistat impurity B と 2-amino-5-methyl benzoic acid を定量した。試験を実施した Zenigal 10 カプセル (No. 1 ~ No. 10) すべてに 2-amino-5-methyl benzoic acid、Cetilistat Impurity B が含まれていた。1 カプセル中に含まれる 2-amino-5-methyl benzoic acid、Cetilistat Impurity B を定量したところ、Zenigal1 カプセル中に含まれる 2-amino-5-methyl benzoic acid は平均 1.3 mg (0.9%)、Cetilistat Impurity B は、平均 18.8 mg (13%) であった (表 1)。

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。前研究班において、Zenigal には Cetilistat が含まれていないことを報告したが[3]、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。同定された非表示成分である Cetilistat impurity B および 2-amino-5-methyl benzoic acid の LC/MS/MS を用いた定量系を構築した。定量結果より、Zenigal に含有される 2-amino-5-methyl benzoic acid、Cetilistat Impurity B は、微量であり、また、含有量にはばらつきが見られた。混入の経緯は不明であるが、含まれていた 2-amino-5-methyl benzoic acid、Cetilistat Impurity B は非常に微量であったことから、製造ライン中のコンタミネーションである可能性も考えられる。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。Cetilistat 製剤であるオブリーン (国内承認済、未発売) は、1 回 120 mg を 1 日 3 回毎食直後に経口投与となっており、Cetilistat Impurity B に薬効がある報告はないが、仮にあったとしても用法用量の約 1/7 の含有量であり、肥満症の治療薬として使用される場合の用量と比べると瘦身効果が得られるほどの量ではないと考えられる。

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おり、この成分は、Cetilistat impurity B であると同定した。さらに、Cetilistat 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。非表示成分 Cetilistat impurity B、2-amino-5-methyl benzoic acid の定量を行ったところ、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。

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—」

3. 前川京子、高橋知里、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) 令和元年度 分担研究報告書「インターネットで購入した痩身薬 Zenigal の含有成分同定」

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

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

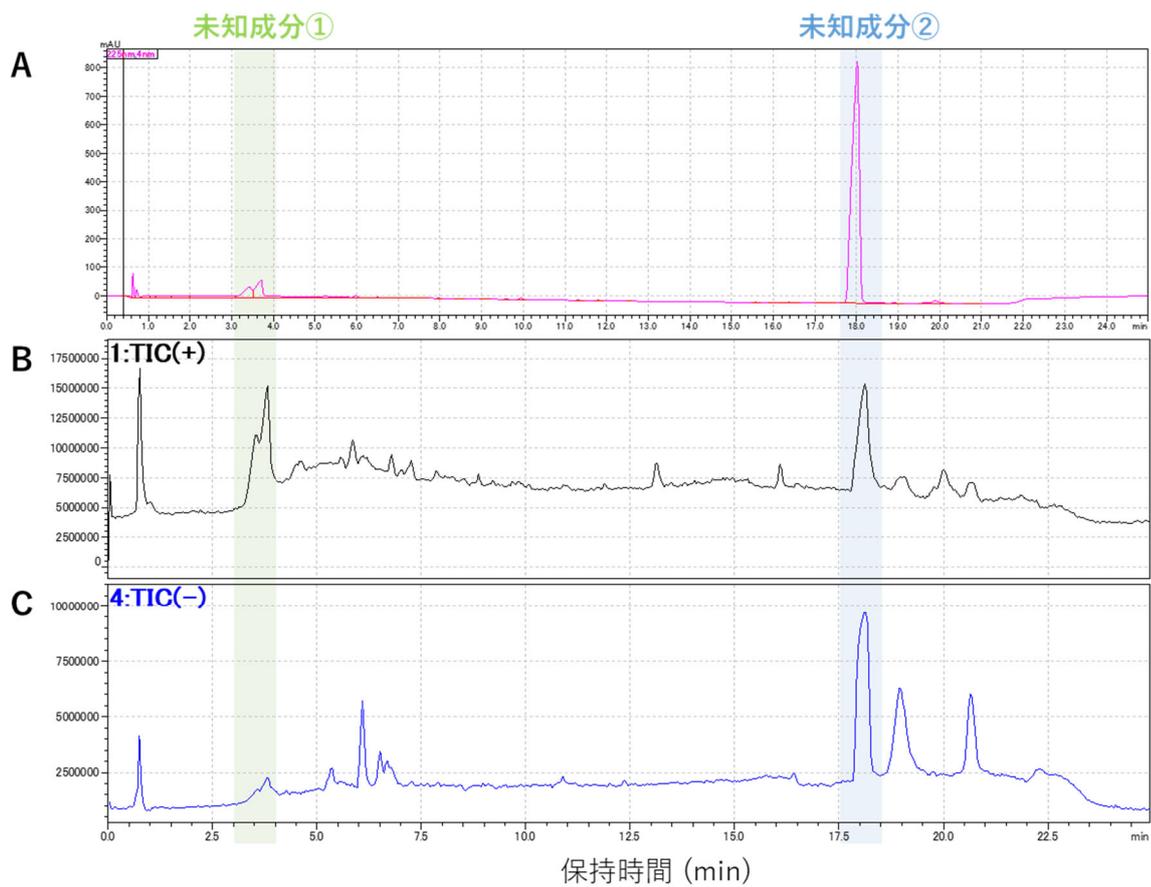


図1 Zenigalに含まれる未知成分のLC/PDAおよびLC/MS/MSによる解析

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)

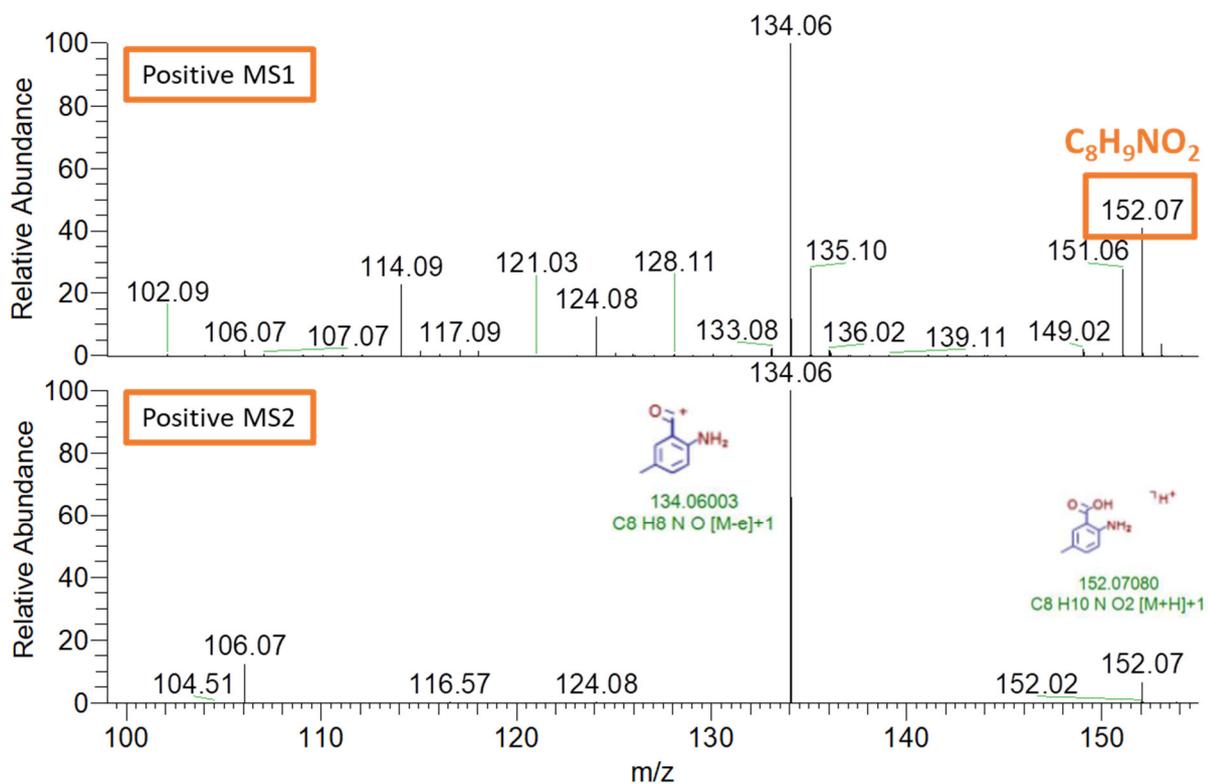


図2 未知成分①のマススペクトルおよびプロダクトイオンスペクトル

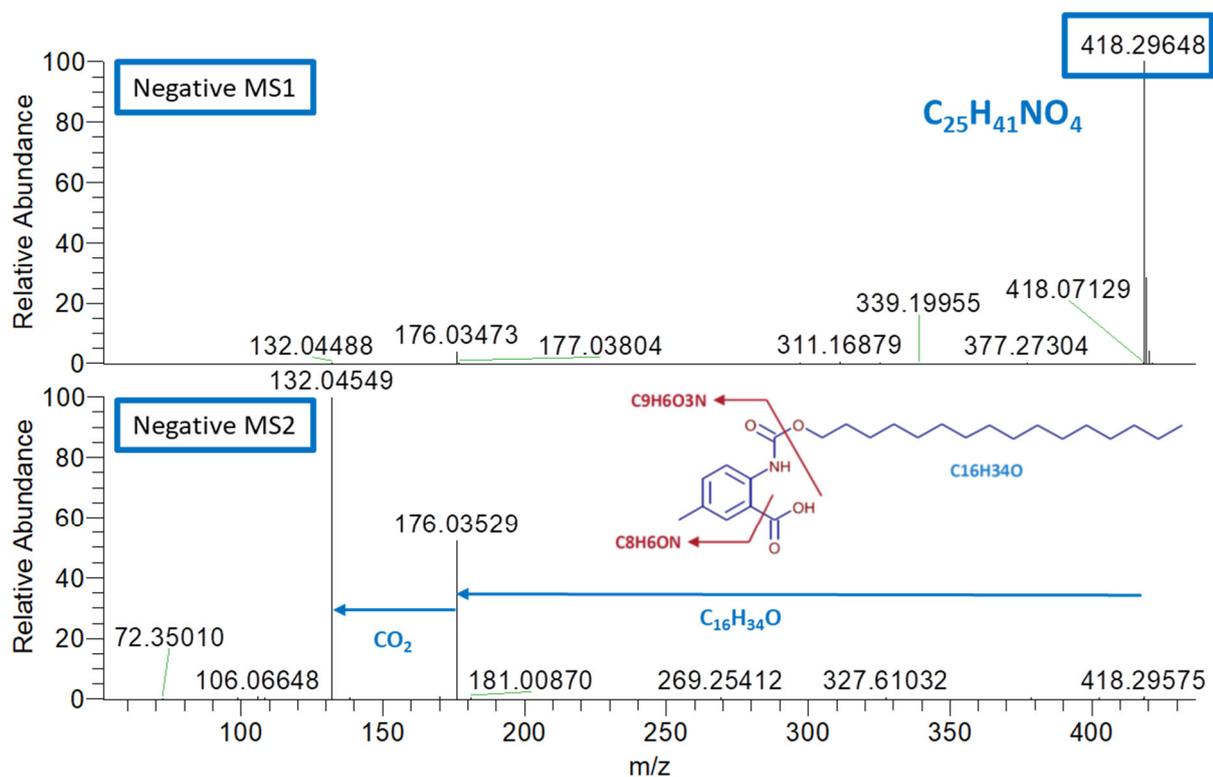


図3 未知成分②のマススペクトルおよびプロダクトイオンスペクトル

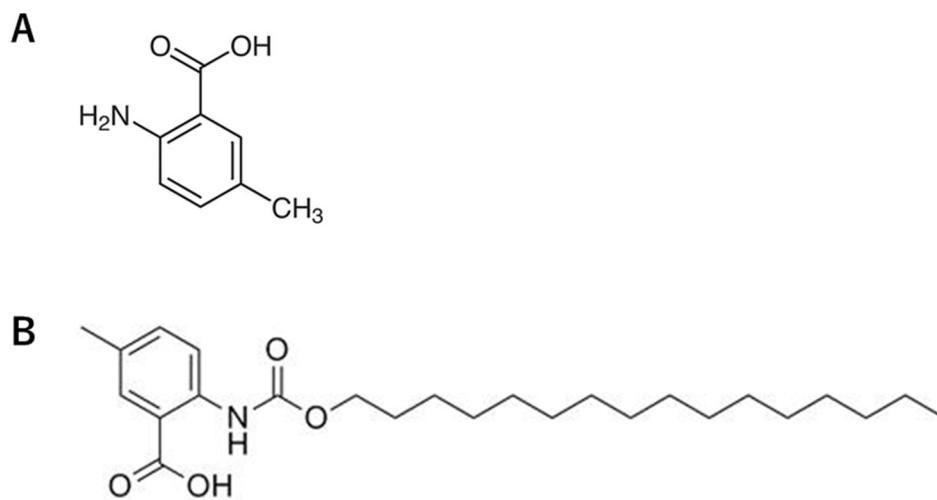


図4 候補化合物の構造

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

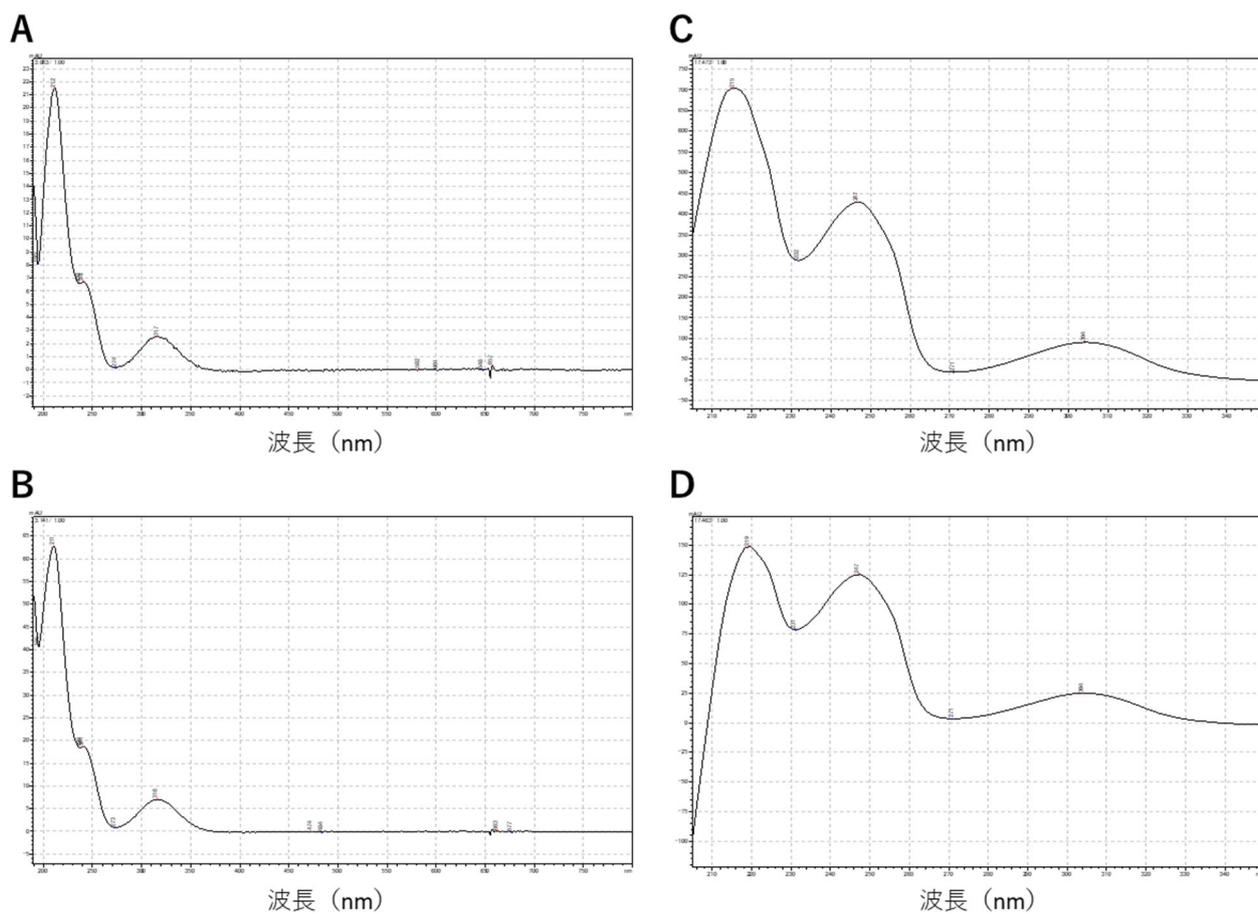


図5 未知成分と標準品の UV スペクトル

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

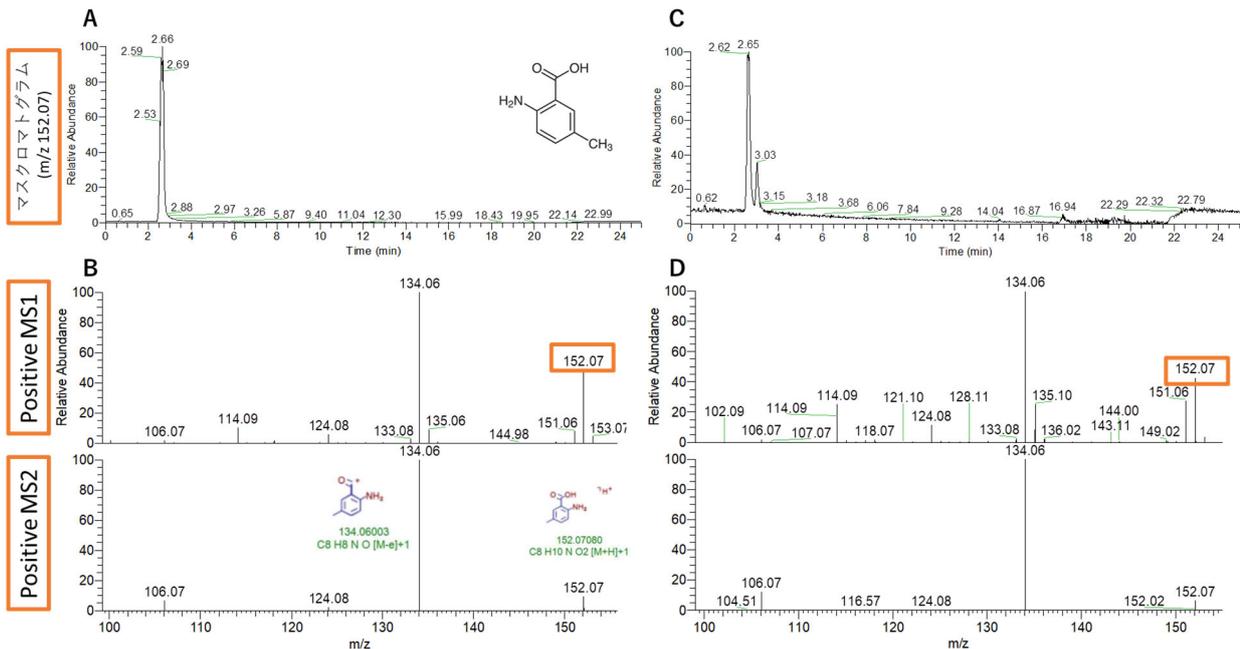


図 6 LC/MS/MS による 2-amino-5-methyl benzoic acid 標準品と未知成分①の比較

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

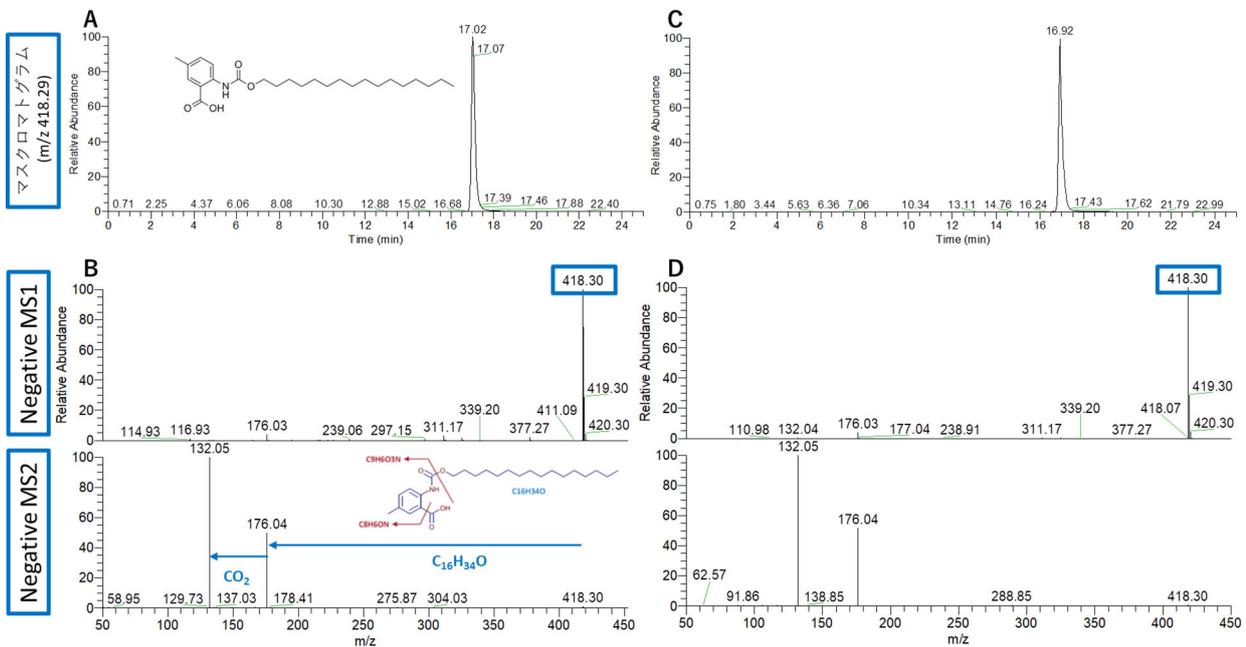
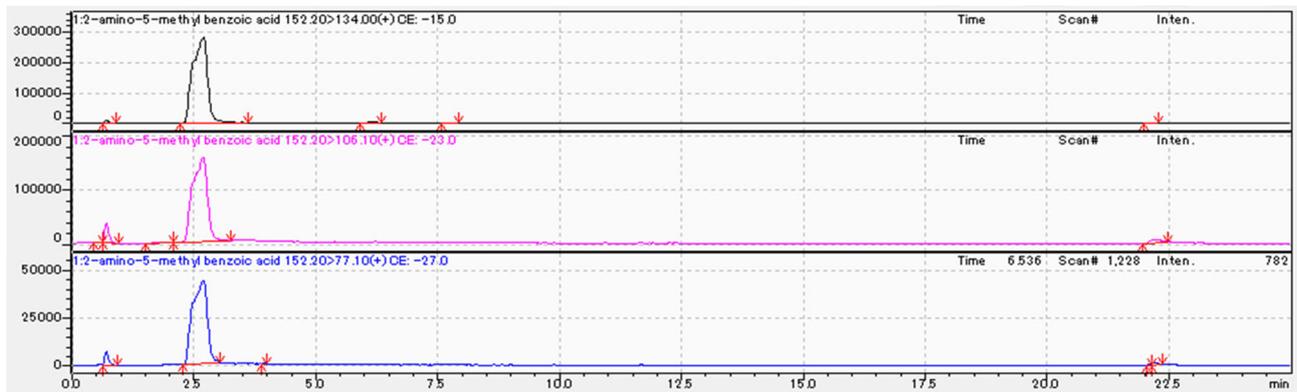


図 7 LC/MS/MS による Cetilistat impurity B 標準品と未知成分②の比較

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

A



B



C

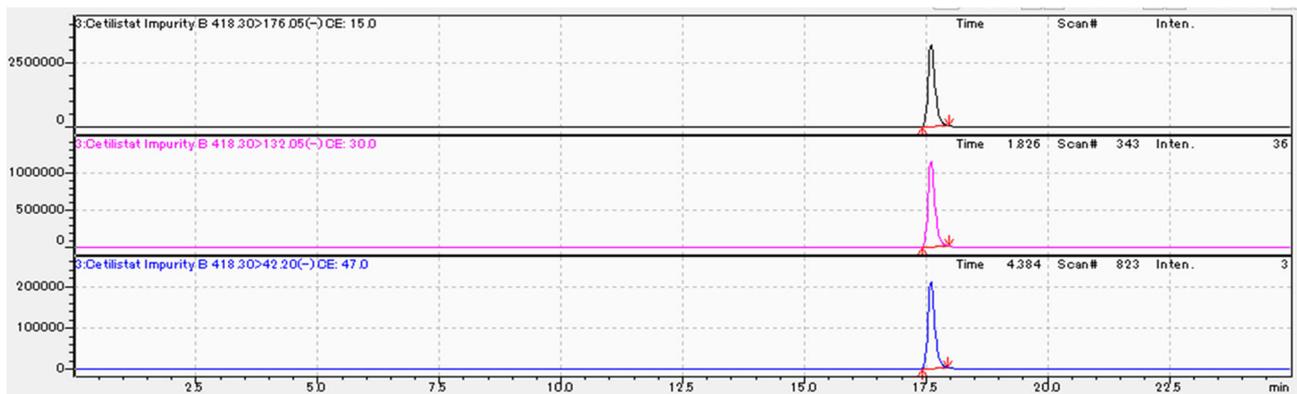


図 8 HPLC 条件①での Zenigal に含まれる非表示成分のマスキロマトグラム

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

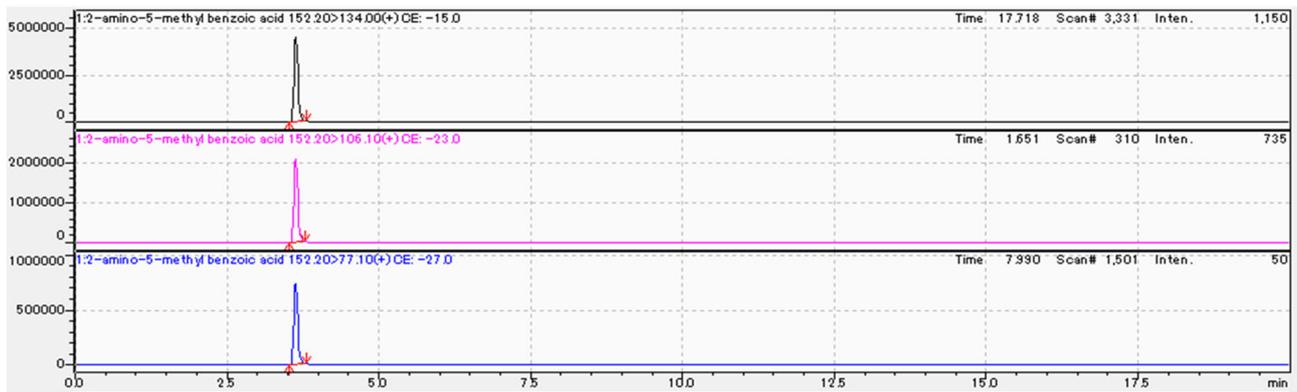
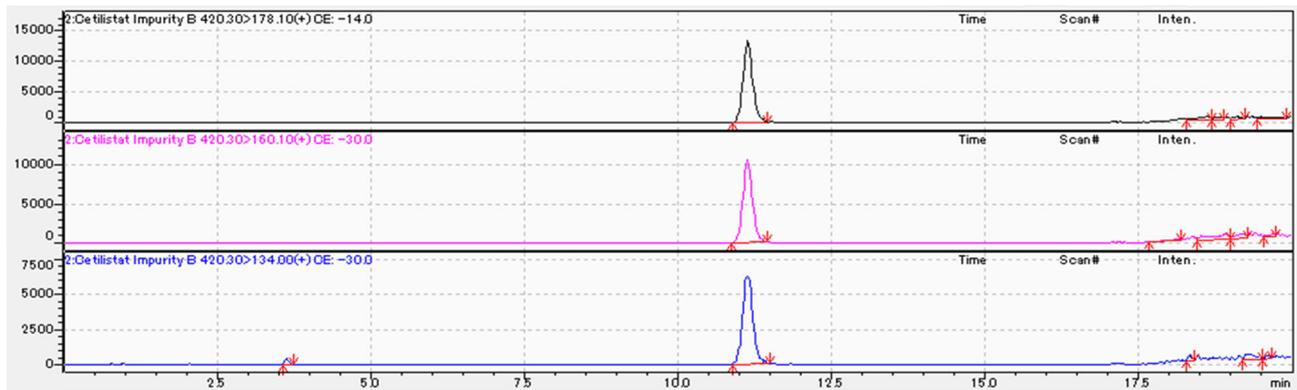
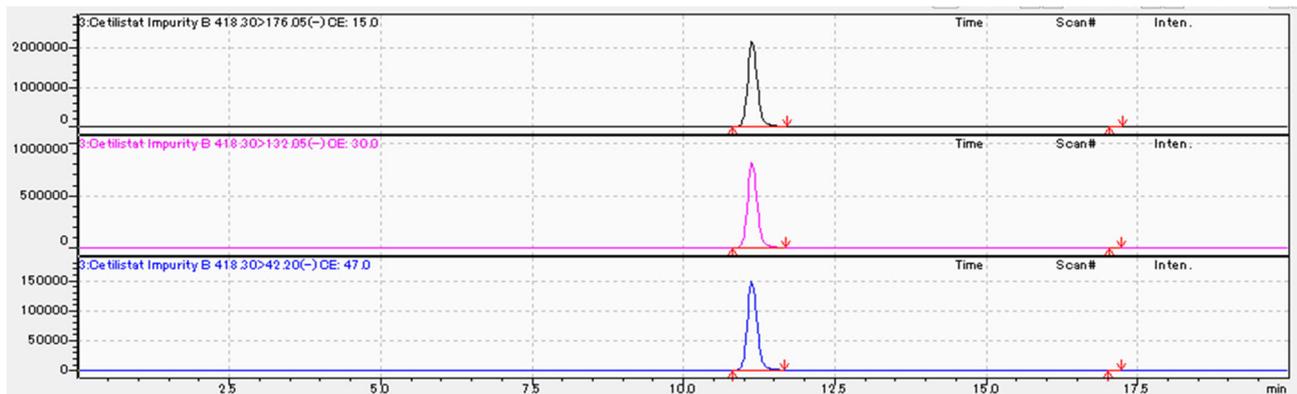
A**B****C**

図9 HPLC 条件②での Zenigal に含まれる非表示成分のマスキングクロマトグラム

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

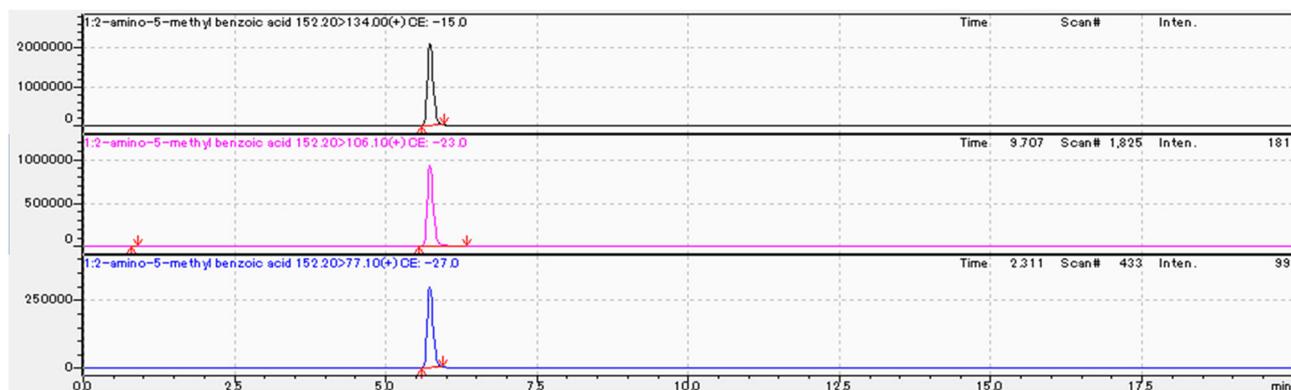
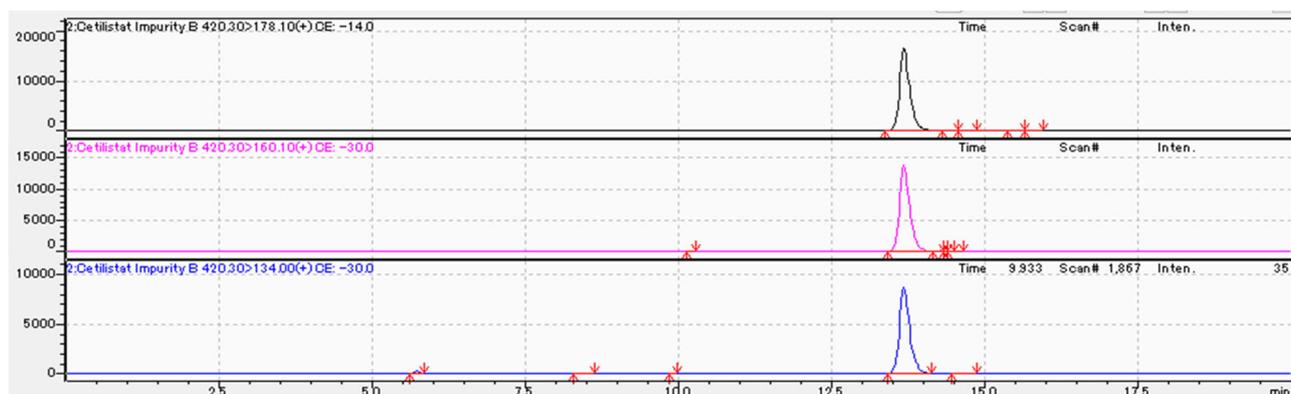
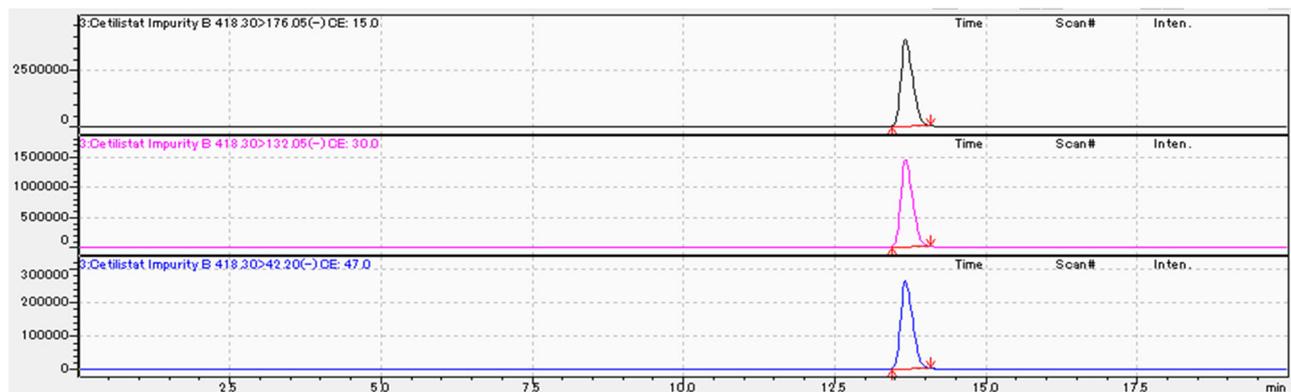
A**B****C**

図 10 HPLC 条件③での Zenigal に含まれる非表示成分のマスキロマトグラム

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

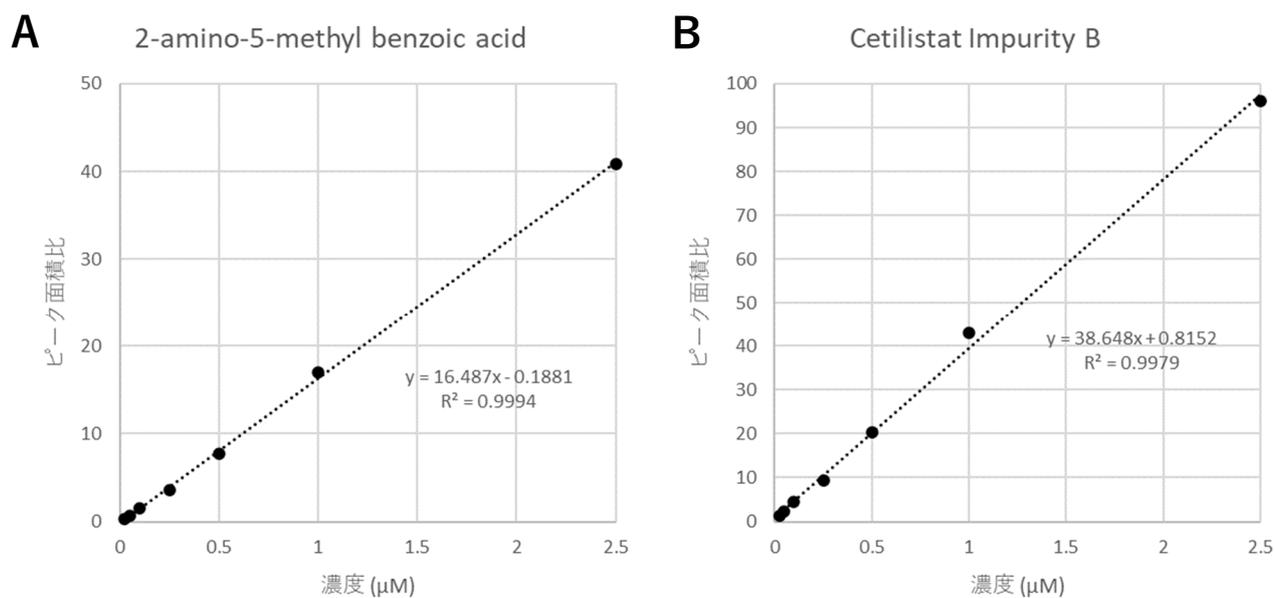


図 11 LC/MS/MS による Zenigal に含まれる非表示成分標準品の検量線

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

表 1 Zenigal1 カプセル中に含まれる 2-amino-5-methyl benzoic acid の定量結果

カプセル	内容量 (mg)	2-amino-5-methyl benzoic acid 含有量 (mg)	2-amino-5-methyl benzoic acid 含量 (%)	Cetilistat Impurity B 含有量 (mg)	Cetilistat Impurity B 含量 (%)
1	138.72	1.17	0.84	18.00	12.98
2	142.68	1.22	0.86	17.83	12.50
3	146.28	1.32	0.90	20.64	14.11
4	146.22	1.18	0.80	17.58	12.02
5	139.1	1.20	0.86	17.00	12.22
6	145.7	1.19	0.82	17.81	12.22
7	154.47	1.34	0.87	18.72	12.12
8	149.45	1.61	1.08	22.15	14.82
9	145.03	1.40	0.96	19.47	13.43
10	146.29	1.46	1.00	19.26	13.17
平均	145.394	1.31	0.90	18.84	12.96