

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

## 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 (MET) 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、MET の測定系を構築した。錠剤1個より MET を抽出し、内部標準法により定量した。試買した 15 製品とモルドバで販売されている MET 標準製剤を対象とし、各製品につき錠剤 3~6 個の定量結果を平均して含量を求めた。また、試買した 15 製品につき、類縁物質混入の有無を確認するため、MET 以外の AAS の分析を行った。

#### 【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 MET のキャリー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。ポジティブコントロールサンプル中の MET 標準品の回収率は、100.7%と算出され、標準製剤である DANABOL に含まれる MET 含量は、101.6%であった。15 検体すべてに、MET が表示含量の 80.6~95.7%の範囲で含まれていた。一方で、MET 以外の AAS を類縁物質として含有する製品はなかった。

#### 【考察】

個人輸入で入手した MET 製剤に、MET 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。AAS は骨粗鬆症や慢性腎疾患、悪性腫瘍、外傷、火傷などの重大な消耗状態、再生不良性貧血などの治療に用いられ、日本ではメテノロン酢酸エステルが処方箋医薬品として承認されている。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 であるメタンジェノン (MET) 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。チェコとスロバキアで流通している MET 製品を分析した結果、22 製品のうち、2 製品は含量が表示含量の 80% 以下であり、2 製品は MET が含まれない製品であったことが報告されている[3]。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 MET 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 MET の測定系を構築し、試買した製品中に含まれる MET を定量した。モルドバで承認されている MET 製剤である DANABOL 10 mg を MET 標準製剤とした。また、試買した製品につき、類縁物質混入の有無を確認するため、MET 以外の AAS の分析を行った。

## B. 研究方法

### B-1 試料

金沢大学において、google Japan を検索エンジンとして、MET 製品を扱う個人輸入代行サイトを検索し、2019 年 12 月 25 日から 2020 年 1 月 6 日までの間に注文可能な全ての MET 製品 (計 4 製品 15 検体) を購入し、試料とした。試料は、金沢大学より供与された。モルドバで承認されている MET 製剤である DANABOL 10 mg を MET 標準製剤とした。

東京化成工業 (東京) より、MET (#H1193, Lot H4FHF、純度 97.5%) 及びメチルテストステロン (#M0435, Lot YNV3C2) を購入し、標準品として利用した。

### B-2 LC-MS による測定系の構築

MET 標準品及びメチルテストステロン標準品をメタノールで溶解し、MET を 0.1-5.0  $\mu$ M、及び内部標準溶液としてメチルテストステロンを 1.0  $\mu$ M 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 Scientific<sup>TM</sup>, Massachusetts, USA) で分離後、Q Exactive システム (Thermo Scientific<sup>TM</sup>) の

Targeted single ion monitoring (T-SIM) モードで測定した。MET (C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>) は、m/z 301.21621、メチルテストステロン (C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>) 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, 2.0×75  
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°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 μm, 2.0×75  
mm  
注入量：2 μL  
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°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  
ベーパーライザ温度：300 °C  
キャピラリー温度：250 °C

**B-3 試料の前処理**

日局に収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、製品、及び標準製剤 1 錠から MET を抽出した。すなわち、試料溶液の調製では、各製品 1 錠の質量を精密に量り、乳鉢を用いて粉末とした。MET 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 5mL を加えて 10 分間振り混ぜた後、遠心分離し、上澄液を 5 mL 分取した。さらに MeOH 5 mL を加え、同様の操作を 2 回繰り返す、それぞれの上澄液 5 mL を合わせた。IS 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 を正確に量り、MeOH を加えて全量を 20 mL とした。さらに、この液 1 mL を正確に量り、MeOH：LCMS 用蒸留水=65：35 を加えて 10 mL とし、0.22 μm 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、MET 標準品 2 mg を精密に量り、テストサンプルと同様に 3 回の抽出操作を行い、上澄液 15 mL を合わせた。この液に、内部標準溶液を加えた後、MeOH を加えて全量を 20 mL とした。試料溶液の調製法と同様に

希釈しポジティブコントロール溶液とした。

内部標準法による検量線の調製は、段階希釈した MET 標準品 (10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2 mM) 2 mL に蒸留水 1 mL、MeOH 3 mL を加えて 10 分間振り混ぜた後、遠心分離し、上澄液を 5 mL 分取した。同様の操作を 2 回繰り返す、それぞれの上澄液 5 mL を合わせて 15 mL とした。この液に、内部標準溶液を加えた後、MeOH を加えて全量を 20 mL とした。試料溶液の調製法と同様に希釈し、IS とし、1.0  $\mu$ M メチルテストステロンを含む MET 検量線用標準溶液 (5.0, 2.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.1  $\mu$ M) を作製した。

#### B-4 LC-MS による定量

B-2. LC-MS による測定系の構築に記載した条件で測定した。<HPLC 条件-2>を用いた。

検量線用標準溶液における測定対象化合物と IS のピーク面積比を求め、検量線用標準溶液の調製濃度を X、ピーク面積比を Y とし、重み付け  $1/Y^2$  を用いて  $Y=aX+b$  にあてはめ、線形最小二乗法により傾き a 及び Y 切片 b を算出した。作成した検量線により、測定試料中に含まれる MET 濃度を定量した。

1錠あたりに含まれる MET の含量 (mg) は、下記の数式を用いて求めた。

1錠あたりに含まれる MET の含量 (mg) = 検量線から求めた MET 濃度 ( $\mu$ M)  $\times$  200 (希釈倍数)  $\times$  0.02 (L)  $\times$  300.2089 (g/mol)  $\times$  (1錠の質量 (mg)) / (秤取量 (mg))  $\times$  1/1000 (mg/ $\mu$ g)

さらに算出された MET の含量 (mg) を表示含量 (10mg、もしくは 5mg) で除して含量 (%) を求めた。

#### B-5 類縁物質の検出

試料溶液は、高速液体クロマトグラフィーで分離後、Q Exactive システムの Full-Scan Mass Spectrometry (Full MS) / data dependent MS2 モードで測定した。測定条件は下記の通りとした。

<HPLC 条件>

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  $\mu$ m, 2.0 $\times$ 75 mm

注入量：2  $\mu$ L

流量：0.3 mL/min

タイムプログラム：0-0.5 min: 0%B, 0.5-7min: 0-95%B, 7.1-10 min: 95% B, 10-10.1 min: 95-0%B, 10.1-14min: 0% B

カラムオーブン：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

Scan range：(Full MS) m/z 100 to 1000 (dd-ms2 / dd-SIM) m/z 200 to 2000

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

ベーポライザ温度：300  $^{\circ}$ C

キャピラリー温度：250  $^{\circ}$ C

Compound Discoverer 3.1 (Thermo Fisher SCIENTIFIC) のメタボロミクス用 workflow で解析を行った。

## 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 MET は 7.15 分に、メチルテストステロンは 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、MET 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、MET 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 MET 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。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 MET の定量分析

MET 標準製剤、及び試買した製品の MS クロマトグラムの一例を図 3 に示す。定量に用いた検量線の一例を図 4 に示す。相関係数は、 $R^2=0.9914$  であり、良好な直線性を示した。

定量結果を図 5 に示す。ポジティブコントロール溶液の MET 標準品の回収率は、 $100.7 \pm 5.4\%$  (N=9) と算出された。標準製剤である DANABOL の含量は、 $101.6 \pm 2.5\%$  (N=3) であった。15 製品のうち、1 錠あたりの含量 (%) が最も低い製品は、7-5-D1-TH-100 であり、 $80.6 \pm 3.3\%$  (N=6) であった。一方、最も高い含量 (%) を示した製品は、2-10-C3-TH-100 であり、 $95.7 \pm 9.1\%$

(N=6) であった。

### C-3 類縁物質の検出

チェコとスロバキアにおける MET 偽造品の調査に用いられた 25 種の AAS[3]を Full MS によりスクリーニングした(表 1)。MET 以外は検出されなかった。

MET の面積値の 1%以上の面積をもつピークの化合物が 17 種類検出された。このうち 4 種類は、その構造が推定された。構造推定では、試料溶液から取得された MS2 スペクトルとプリカーサーイオンからの分子量情報を用いて、mzCloud スペクトルライブラリ (Thermo Scientific™) に登録されている標準品を検索した。含有が推定された物質のうち、3 種は、 $\alpha$ -Lactose、Bis (4-ethylbenzylidene) sorbitol、D- (+) -Maltose であり、添加剤と考えられた。残り 1 種は、3-methoxy-1,13-dimethyl-9,11,12,13,14,15,16,17-octahydro-8H-cyclopenta[a]phenanthren-17-ol と推定され、テストステロンの European Pharmacopoeia (EP) impurity J として知られる Androstenedione Methylenolether と類似した構造を有していた (図 6)。

## 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、MET 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 MET を分離する場合、移動相にイソプロパノールを添加

することでキャリア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 MET 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。また、ポジティブコントロール溶液と検量線溶液の調製においても試料溶液の調製と同様に抽出操作を行い、抽出時に採取する上澄液の量を全サンプルで一定とすることで、ポジティブコントロール溶液の MET 回収率が 100.7%となることが示された。

錠剤に含まれる MET 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 MET が表示含量の 80.6~95.9%の範囲で含まれていた。標準製剤 DANABOL に含まれる MET 含量 (101.6%) と比較すると、インターネットを介して試買した製品に含まれる MET の含量は、わずかに低値であった。また、Full MS によるスクリーニングでは表示成分 (MET) 以外の AAS を類縁物質として含有する製品はなかった。その他含有が推定される化合物が見出されたが、これらを同定するには、標準品を用いる必要があると考える。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べきである。

## E. 結論

LC-MS を用いて個人輸入により入手した錠剤中に含まれる MET を定量した。15 製品すべてに表示含量の 80%以上の MET 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
  1. 堀 愛美、高橋 知里、Rahman Mohammad、朱 飛宇、朱 姝、Robin Schreiber、吉田 直子、木村和子、前川 京子、LC/MS 法を用いたメタンジェノン測定法の構築と個人輸入製品の分析、日本薬学会第 143 年会 (札幌、2023 年 3 月 27 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

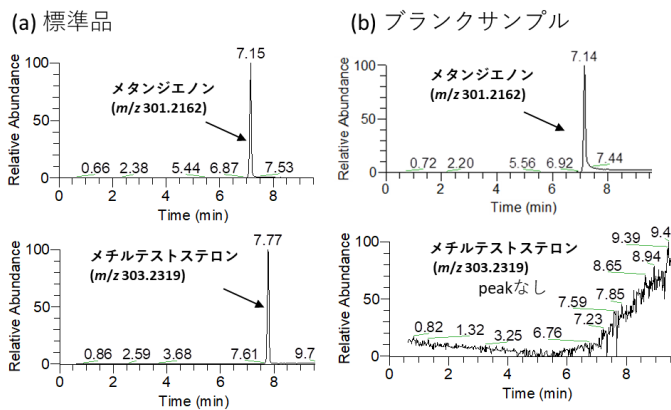


図1 HPLC条件-1による標準品(a)、及びブランクサンプル(b)のマスキロマトグラム  
 (a)2.5 μMメタンジエノン標準品 + 1.0 μMメチルテストステロン標準品  
 (b)ブランクサンプル (MeOH)

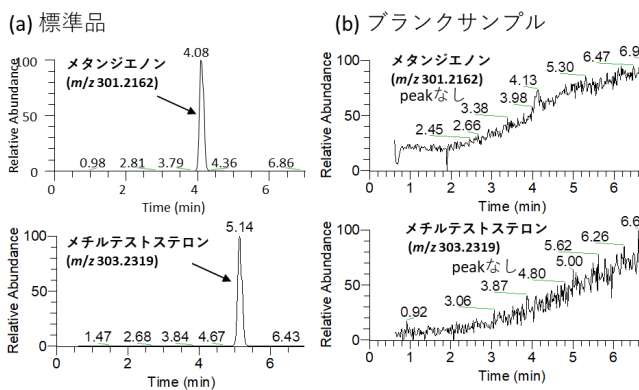


図2 HPLC条件-2による標準品(a)、及びブランクサンプル(b)のマスキロマトグラム  
 (a)2.5 μMメタンジエノン標準品 + 1.0 μMメチルテストステロン標準品  
 (b)ブランクサンプル (MeOH)

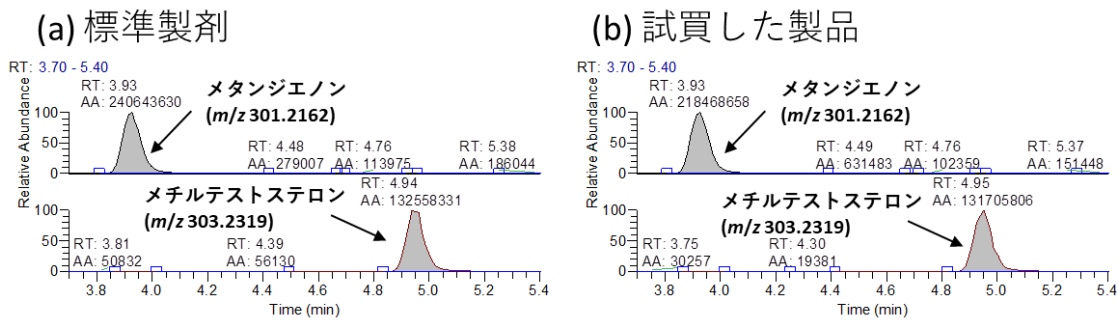


図3 標準製剤(a)、及び試買した製品(b)のマスキロマトグラム

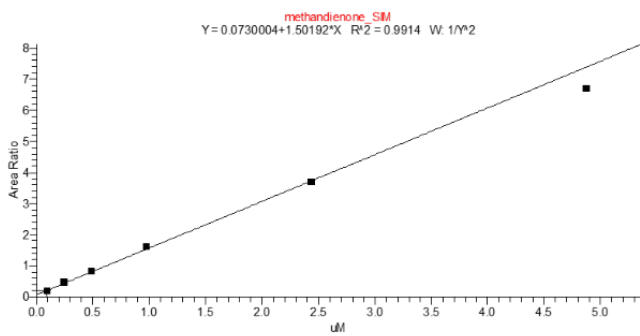


図4 メタンジエノン標準品の検量線

表1 チェコとスロバキアにおけるMET偽造品調査に用いられた25種のAAS

AAS名	組成式	m/z (positive ion mode)
Boldenone cypionate	C <sub>27</sub> H <sub>38</sub> O <sub>3</sub>	411.2894
Boldenone undecylenate	C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>3</sub>	453.3363
Clenbuterol	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	277.0869
Drastonolone propionate	C <sub>23</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>	361.2737
Fluoxymesterone	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> FO <sub>3</sub>	337.2173
Chlorodehydromethyltestosterone	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> ClO <sub>2</sub>	335.1772
Mesterolone	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	305.2475
Methandienone	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	301.2162
Methenolone enanthate	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>3</sub>	415.3207
Nandrolone decanoate	C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> O <sub>3</sub>	429.3363
Nandrolone phenylpropionate	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	407.2581
Nandrolone undecanoate	C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	443.352
Oxandrolone	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	307.2268
Oxymetholone	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	333.2424
Stanozolol	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O	329.2587
Testosterone cypionate	C <sub>27</sub> H <sub>40</sub> O <sub>3</sub>	413.305
Testosterone decanoate	C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	443.352
Testosterone enanthate	C <sub>26</sub> H <sub>40</sub> O <sub>3</sub>	401.305
Testosterone isocaproate	C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> O <sub>3</sub>	387.2894
Testosterone phenylpropionate	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>	421.2737
Testosterone propionate	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	345.2424
Testosterone undecanoate	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	457.3676
Trenbolone acetate	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	313.1798
Trenbolone enanthate	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	383.2581
Trenbolone hexahydrobenzylcarbonate	C <sub>26</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	411.253

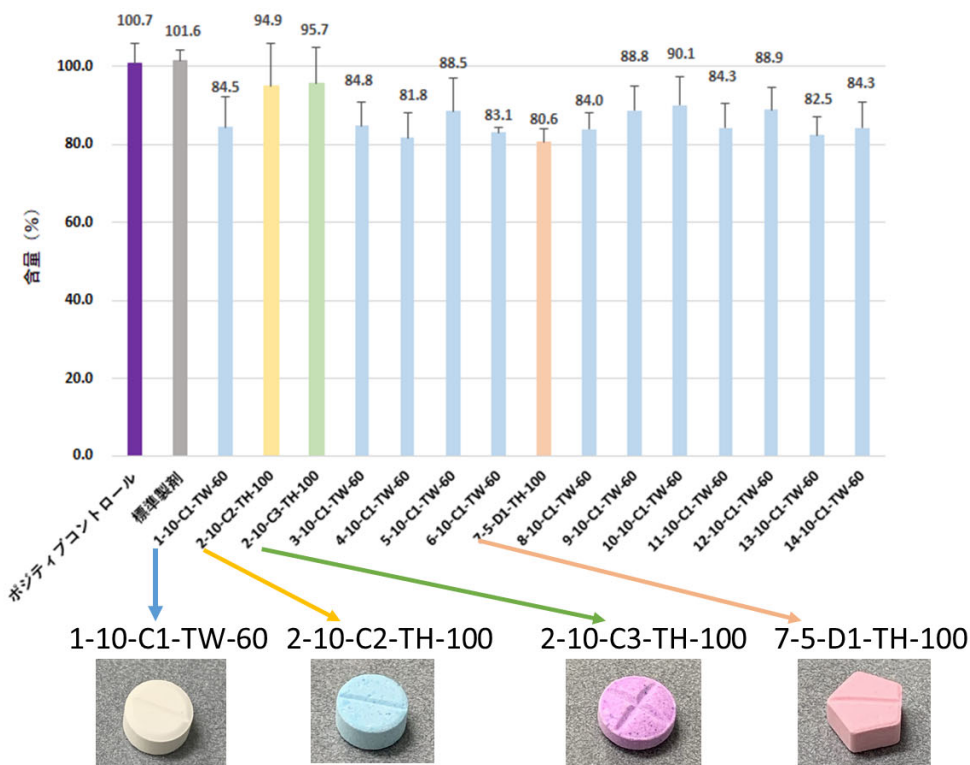
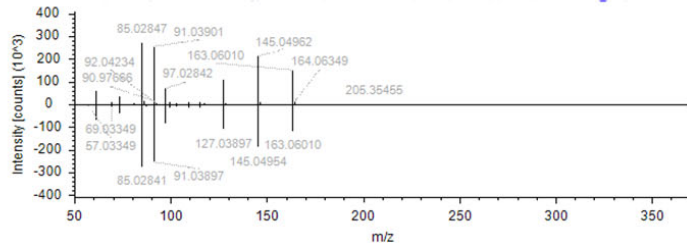
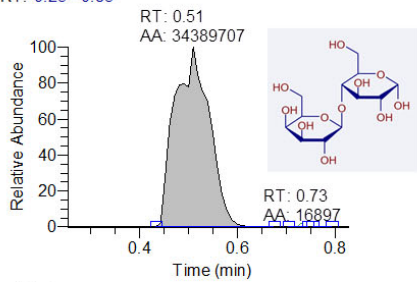


図5 各錠剤の外観とLC-MS法で得られた各錠剤に含まれるメタンジエノンの含量 (%)



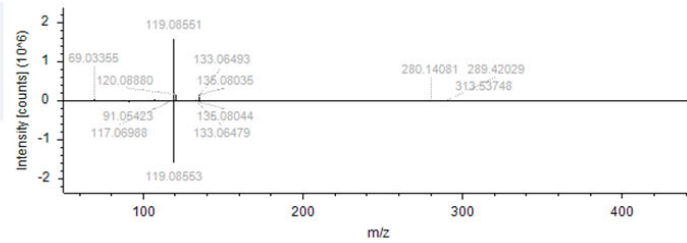
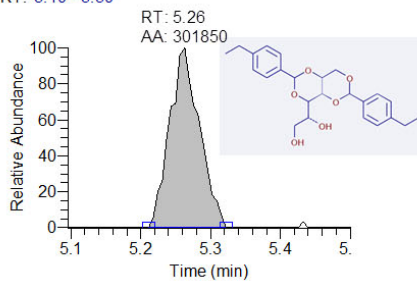
(a)

RT: 0.25 - 0.85



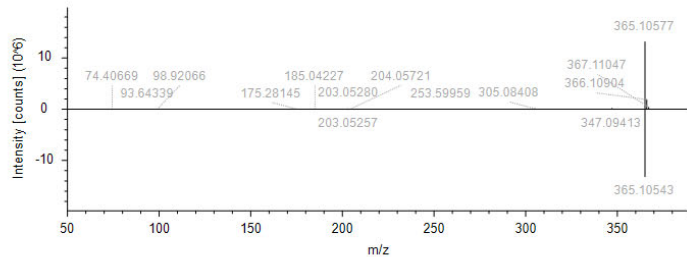
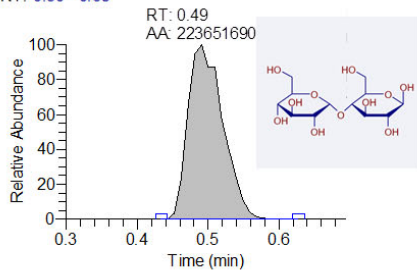
(b)

RT: 5.10 - 5.50



(c)

RT: 0.30 - 0.69



(d)

RT: 3.75 - 4.30

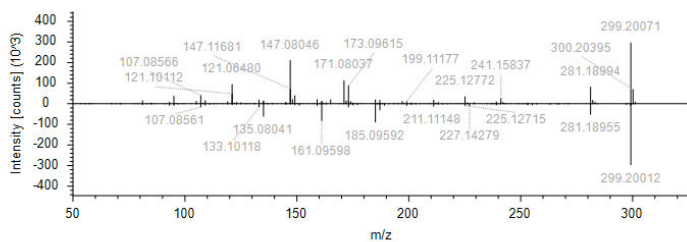
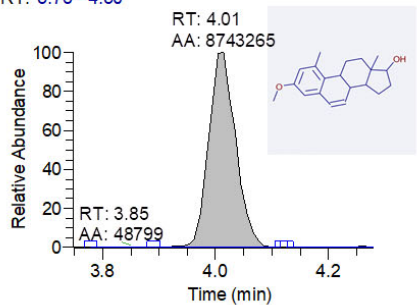


図6 含有が推定される化合物のMSクロマトグラム (左) とMS2スペクトル (右)

MS2スペクトル (ミラープロット) は、上側に試料溶液のMS2スペクトルを、下側にmzCloudの参照MS2スペクトルを表示している。(a)  $\alpha$ -Lactose, (b) Bis(4-ethylbenzylidene)sorbitol, (c) D-(+)-Maltose, (d) 3-methoxy-1,13-dimethyl-9,11,12,13,14,15,16,17-octahydro-8H-cyclopenta[a]phenanthren-17-olと推定された。