

超高速液体クロマトグラフ飛行時間型質量分析装置 (UPLC-TOFMS) による勃起不全 (ED) 治療薬及びその類似成分の測定

永田 瑞絵 笠木 祥弘 近藤 博文 浅井 紀夫

Measurement of Erectile Dysfunction (ED) Medications and their Analogous Compounds Using Ultra Performance Liquid Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry

Mizue EITA Yoshihiro KASAKI Hirofumi KONDOH Norio ASAI

「いわゆる健康食品」に含まれる ED 治療薬及びその類似体の測定法の確立を目的として、これらのうちの 10 化合物を用いて超高速液体クロマトグラフ飛行時間型質量分析計による測定条件を検討した。測定対象とした 10 化合物のピーク分離は良好であり、そのマススペクトルから検出された 1 価のプロトン付加分子イオンの m/z は、すべての化合物で理論値の精密質量と十分な質量精度を持って一致した。また、タダラフィル、アミノタダラフィル、キサントアントラフィルのマススペクトルから特徴的なフラグメントイオンが検出され、フラグメント解析により、構造が類似しているタダラフィルとアミノタダラフィルから得られたフラグメントイオンはいずれもベンゾ [d] [1,3] ジオキソールが脱離したものと推測された。今後、衝突解離条件を検討し、化合物の分子構造を特徴づけるフラグメントイオンを検出できるようになれば、精密質量情報と合わせて、より確実な化合物の推定に役立つだろう。

キーワード：無承認無許可医薬品、いわゆる健康食品、超高速液体クロマトグラフ、飛行時間型質量分析計
Keywords：Unapproval/Unpermitted drug, Dietary supplements, Ultra-performance liquid chromatograph, Time-of-flight mass spectrometer

健康に対する関心の高まり等を背景に、健康食品と称する様々な商品が流通している。これらの中には、医薬品成分を含有しているにもかかわらず、承認・許可を受けずに製造・販売されているもの（無承認無許可医薬品）も存在し、健康被害も後を絶たない¹⁾。特に、強壮効果を標榜した「いわゆる健康食品」に勃起不全 (ED) 治療に使用されるホスホジエステラーゼ 5 阻害薬であるシルデナフィル (SDF)、バルデナフィル (VDF)、タダラフィル (TDF)、あるいはそれらの類似体等が含有される事例が目立っている。京都府では「いわゆる健康食品」の買上調査を実施し、液体クロマトグラフフォトリニャー検出器等により測定を行い、含有成分の検査を行ってきた²⁾。しかし、守安ら³⁾によると、「いわゆる健康食品」に含まれる成分は、医薬品成分以外にも、未承認成分や効果は認められているが安全性の確認がされていない化合物などを含有しているケースもあり、さらに、過去に検出された化合物に化学修飾を施して、特定を回避する事例も報告されている。

このような新規の ED 治療薬類似体に対しても迅速な同定を行うため、「いわゆる健康食品」に含まれる ED 治療薬及びその類似体の網羅的・体系的な測定法の確立が求められているところである。類似化合物を網羅的に測定し、迅速な同定を行う方法として、近年、超高速液体クロマトグラフ飛行時間型質量分析装置 (UPLC-TOFMS) を用いた測定法が目ざされている。UPLC は高速液体クロマトグラフと比較して分離度が高く、短時間で高感度な分析が可能である⁴⁾。また、

TOFMS は精密質量スペクトルの測定が可能であることから、化学式の推定が可能である。これを連結させた装置である UPLC-TOFMS は、高感度・高分解能な分析が可能であることから、異常品検査における原因物質の同定や農産物中の残留農薬一斉分析等に利用されている^{5,6)}。そこで、UPLC-TOFMS を用いた ED 治療薬及びその類似体の測定法の確立を目的として、10 化合物を用いて測定条件の検討を行った。

ED 治療薬及びその類似体のうち、SDF 類として、SDF、ホモシルデナフィル (HSF)、ヒドロキシホモシルデナフィル (HHS)、ホンデナフィル (HDF) 及びウデナフィル (UDF) を、VDF 類として、VDF 及びブソイドバルデナフィル (PVF) を、TDF 類似体として、TDF、アミノタダラフィル (ATF) を、また、厚生労働省無承認無許可医薬品情報 (<http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/musyounin.html>) でこれまで違反事例が多く報告されているキサントアントラフィル (XAF) を測定対象とし、分子イオンの帰属を中心として検討を行ったので報告する。

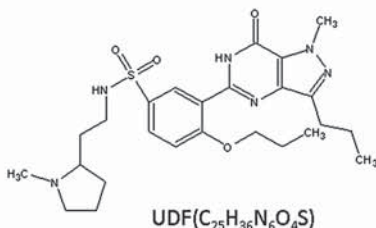
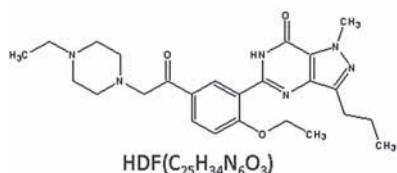
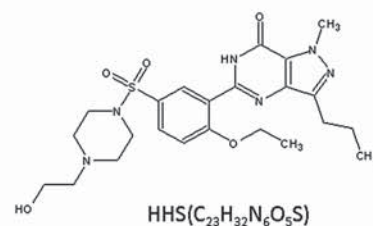
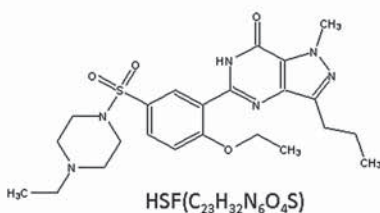
材料と方法

1. 標準品及び試薬

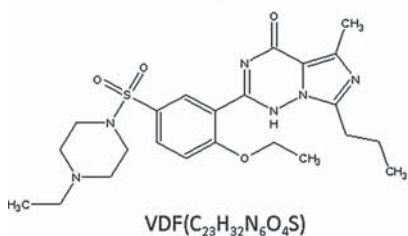
ATF、HSF、HDF、PVF、SDF、UDF 及び XAF は Toronto Research Chemicals 社製、TDF 及び VDF は Combi-Blocks 社製、HHS は abcam 社製を用いた。各化合物の化学式及び構造式を図 1 に示す。SDF 類は SDF を基本骨格とし、HSF は SDF のピペラジン環に結合しているメチル基をエチル基に置換したものであり、HHS は HSF のエチル基にさらにヒドロキシ基が結合したものである。HDF は HSF のスルホニ

(平成29年12月18日受理)

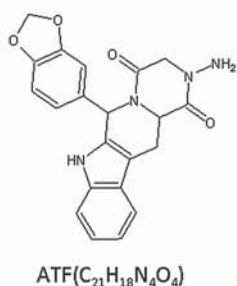
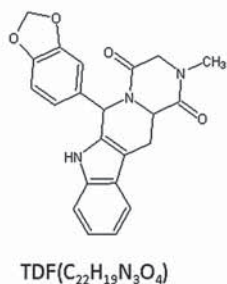
シルデナフィル類



バルデナフィル類



タダラフィル類



その他

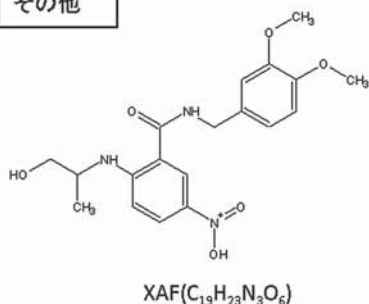


図1. 標準品として用いた10化合物(シルデナフィル類:シルデナフィル(SDF)、ホモシルデナフィル(HSF)、ヒドロキシホモシルデナフィル(HHS)、ホンデンナフィル(HDF)、ウデンナフィル(UDF) /バルデナフィル類:バルデナフィル(VDF)、プソイドバルデナフィル(PVF) /タダラフィル類:タダラフィル(TDF)、アミノタダラフィル(ATF) /その他:キサントアントラフィル(XAF))の化学式及び構造式

ル基をメチルカルボニル基に置換したものである。UDFはSDFのスルホニル基に結合しているメチルピペラジンを、1-メチル2-アミノエチルピロリジンに置換したものである。VDF類はVDFを基本骨格とし、PVFはVDFのエチルピペラジンをピペリジン環に置換し、さらにトリアジノンの二重結合の位置を変えたものである。TDF類はTDFを基本骨格とし、ATFはTDFのピペラジンを結合しているメチル基をアミノ基に置換したものである。なお、アセトニトリル、メタノール及びギ酸はLC/MS用(和光純薬工業製)を用いた。

2. 標準溶液の調製

ATF、HSF、HDF、HHS、PVF、SDF、TDF、UDF、VDF及びXAFをそれぞれメタノールで溶解し、500 µg/mLの各個別標準原液を調製した。これらをそれぞれメタノールで希釈して50 µg/mL溶液とし、さらにアセトニトリル・超純水混液(50/50% (v/v))で希釈し、個別標準溶液(5 µg/mL)を調製した。ついで、500 µg/mLの各個別標準原液を等量混合し、(各50 µg/mL)、これをアセトニトリル・超純水混液(50/50% (v/v))で希釈したものを10化合物混合標準溶液(各5 µg/mL)とした。

3. 装置及び測定条件

UPLCはACQUITY UPLC H-Classシステム(Waters社製)を用い、TOFMSはXevo G2-XS QToFシステム(Waters社製)を用いた。

UPLC及びTOFMSの測定条件は、Tagamiら⁷⁾の報告を参考に表1のとおりとした。今回は、解析を簡素化するため、コリジョンエネルギーを加えず衝突誘起解離を起こさない条件で測定を行った。

検出されたフラグメントイオンについては、フラグメントパターン解析ソフトMassFragment(Waters社製)を用いて解析を行った。

結果

図2に10化合物混合標準溶液及び各個別標準溶液の全イオン電流クロマトグラム(TICC)を示す。10化合物混合標準溶液では保持時間7~13分の間に11本のピークが検出され、このうち10本のピークの保持時間は、各個別標準溶液の保持時間と誤差±0.01分の範囲で一致した。保持時間12.44分付近のピークは、10化合物のいずれにも帰属が認められなかった。また、ブランク試料としたメタノールからも同様のピークとマススペクトルが得られた。構造の類似したSDF、HSF及びHHSは保持時間が近く、ピペラジンの置換基の極性が高い順に早くピークが検出された。

図3に10化合物のマススペクトルを示す。すべての化合物において、1価のプロトン付加分子イオン([M+H]⁺)が検出された以外に、SDF類及びVDF類からは、2価のプロトン付加分子イオン([M+2H]²⁺)も検出された。TDF及びATFからは、それぞれm/z=269.1043、268.1086にフラグメントイオンが検出された。また、XAFからは[M+H]⁺以外に、m/z=412.1482に1価のナトリウム付加分子イオン([M+Na]⁺)が検出された他、m/z=151.0761にフラグメントイオンが検出された。

図4に、ATF、TDF及びXAFのマススペクトルにおいて観察されたフラグメントイオンについて、フラグメントパターン解析を行った結果を示す。ATF及びTDFについて、検出されたフラグメントイオンはいずれもベンゾ[d][1,3]ジオキソールがニュートラルロスしたものと解析された。

表2に、10化合物混合標準溶液中の各化合物の[M+H]⁺の測定値(m/z)、[M+H]⁺のモノアイソトピック質量(理論値)及び質量精度(ppm)を示す。質量精度は、理論値と測定値の差の絶対値を理論値で除して求めた。10化合物の質量精度は、HSFを除く化合物で2 ppm以下となり、HSFでは3.07 ppmとなった。

表1. 超高速液体クロマトグラフー飛行時間型質量分析装置の測定条件

カラム	ACQUITY UPLC HSS C18 1.8 µm, 2.1×150 mm
カラム温度	40°C
移動相	A) 0.1% (v/v) ギ酸/水溶液 B) 0.1% (v/v) ギ酸/アセトニトリル
グラジエント条件	0-1 min(A/B=95/5)-21 min(A/B=5/95)-36 min(A/B=5/95) -36 min(A/B=95/5)-51min(A/B=95/5)
流速	0.3 mL/min
注入量	1.0 µL
イオン化法	ESI (Positive mode)
スキャンモード走査範囲	m/z 50~1200
キャピラリー電圧	0.8 kV
サンプルコーン電圧	40 V
ソースオフセット電圧	80 V
ソース温度	150°C
脱溶媒温度	450°C
コーンガス流量	20 L/hr
脱溶媒ガス流量	800 L/hr

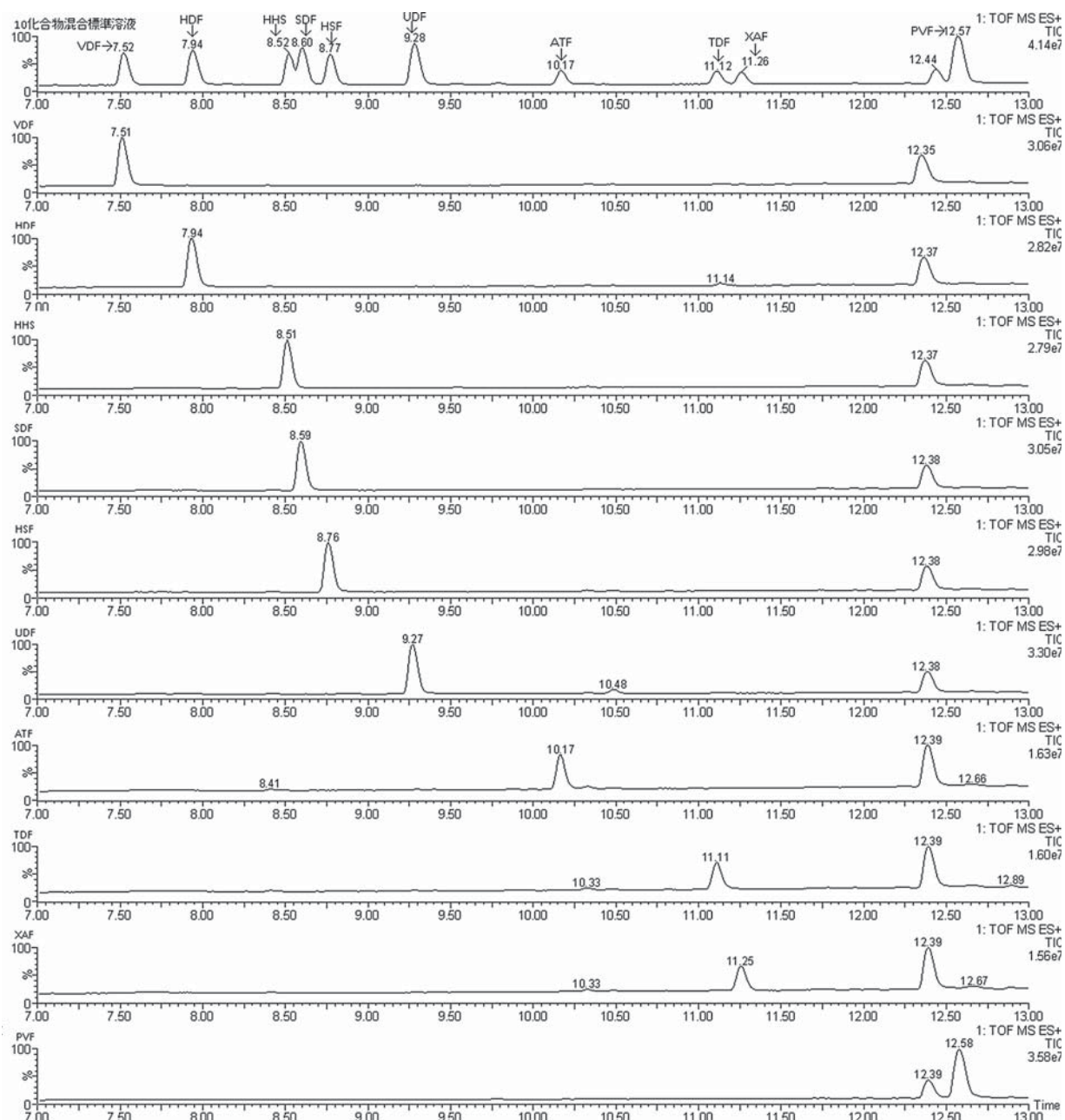


図 2. 10 化合物混合標準溶液並びに VDF、HDF、HHS、SDF、HSF、UDF、ATF、TDF、XAF 及び PVF の各個別標準溶液の全イオン電流クロマトグラム (TIC)

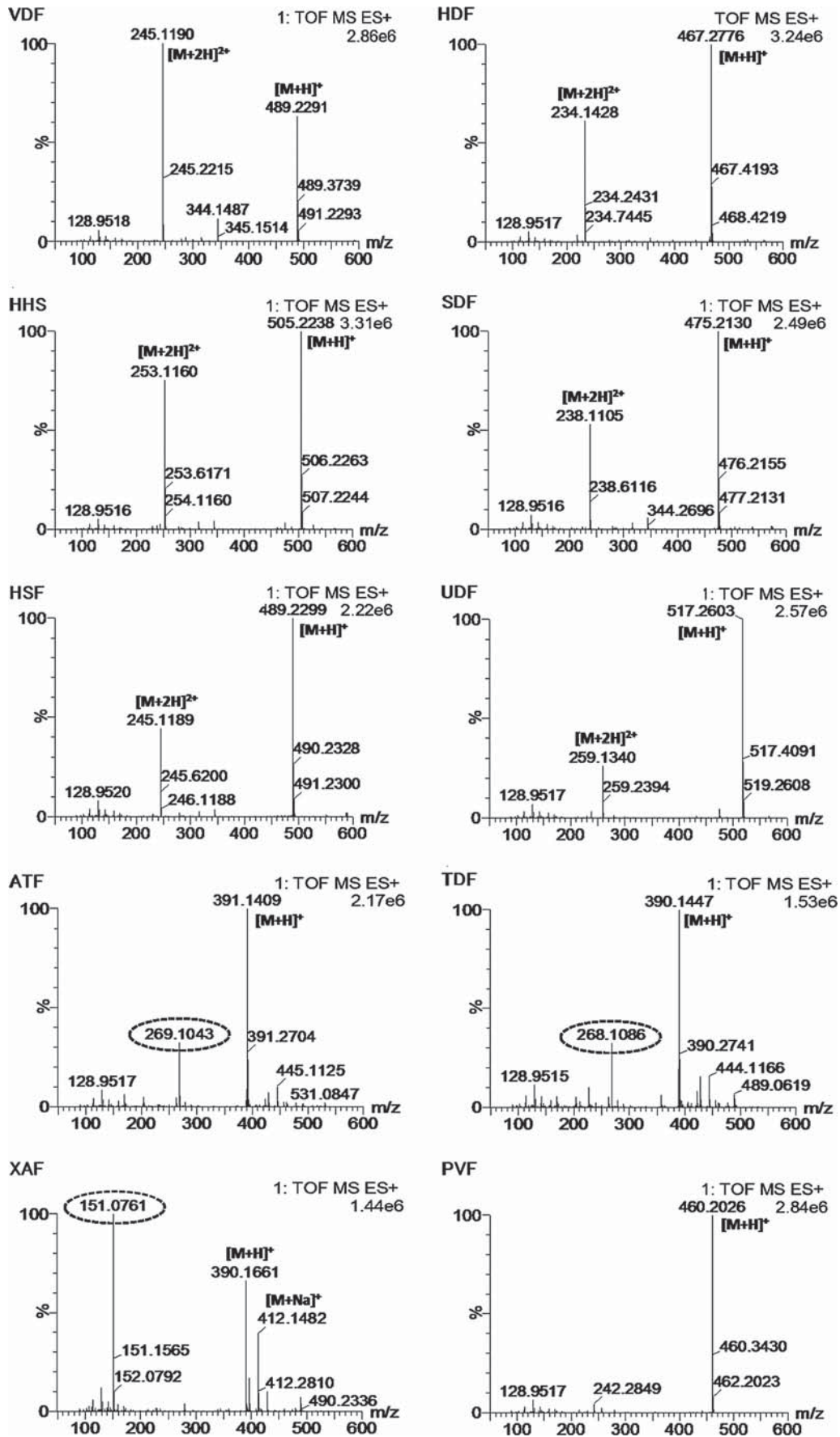


図3. 10化合物のマススペクトル ($[M+H]^+$: 1 価のプロトン付加分子イオンのモノアイソトピック質量に相当する m/z のピーク, $[M+2H]^{2+}$: 2 価のプロトン付加分子イオンのモノアイソトピック質量に相当する m/z のピーク, $[M+Na]^+$: 1 価のナトリウム付加分子イオンのモノアイソトピック質量に相当する m/z のピーク, ○: フラグメントイオンのピーク)

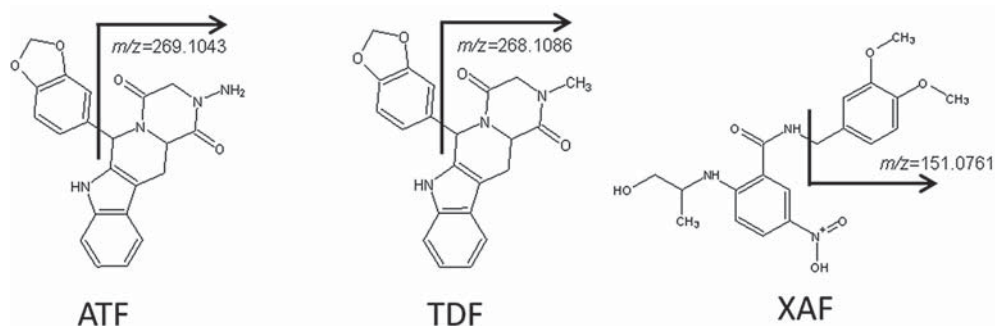


図4. ATF、TDF 及び XAF についてフラグメンテーションが起こったと考えられる位置

表2. 10 化合物混合標準溶液中の各化合物の1 価のプロトン付加分子イオン $[M+H]^+$ の測定値 (m/z)、 $[M+H]^+$ のモノアイソトピック質量 (理論値) 及び質量精度 (ppm)

対象物質	$[M+H]^+$ の測定値 (m/z)	$[M+H]^+$ のモノアイソトピック質量	質量精度 (ppm)
バルデナフィル (VDF)	489.2291	489.2284	1.43
ホンデナフィル (HDF)	467.2776	467.2771	1.07
ヒドロキシホモシルデナフィル (HHS)	505.2238	505.2233	0.99
シルデナフィル (SDF)	475.2130	475.2127	0.63
ホモシルデナフィル (HSF)	489.2299	489.2284	3.07
ウデナフィル (UDF)	517.2603	517.2597	1.16
アミノタダラフィル (ATF)	391.1409	391.1406	0.77
タダラフィル (TDF)	390.1447	390.1454	1.79
キサントアントラフィル (XAF)	390.1661	390.1665	1.03
プソイドバルデナフィル (PVF)	460.2026	460.2019	1.52

考察

「いわゆる健康食品」に含まれる ED 治療薬及びその類似体の UPLC-TOFMS を用いた測定法を確立するため、10 化合物を用いて、測定法の検討を行った。10 化合物のクロマトグラムは良好な分離を示し、10 のピークは、各個別標準溶液のクロマトグラムのピーク保持時間とほぼ一致した。また、12.44 分に見られたいずれの化合物にも帰属しないピークは、ブランク試料にも同様のピークとマススペクトルが得られたことから、溶媒もしくは器具由来と考えられた。

各化合物のマススペクトルにおいて、SDF 類及び VDF 類のうち、PVF からは $[M+2H]^+$ が検出されなかったが、これは、PVF がペペリジン環を有するのに対し、SDF、HSF、HHS、HDF 及び VDF はペペラジン環を有し、UDF は窒素を2つ含む脂肪族アミン構造を有することに起因すると考えられた。

マススペクトルで検出された $[M+H]^+$ の m/z の実測値は、10 化合物すべてにおいて理論値と質量誤差 4 ppm の範囲で一致し、良好な質量精度を示した。この質量精度は、検出された $[M+H]^+$ の m/z の実測値から化合物の化学式を推定する

のに十分な正確性を有していると考えられた。今回、解析を簡素化するために、衝突誘起解離によるフラグメントイオンが発生しない条件で測定したが、ATF、TDF 及び XAF の3 化合物から、それぞれ一つずつ特徴的なフラグメントイオンを得た。構造が類似している ATF 及び TDF から得られたフラグメントイオンは、化合物の分子構造に関する情報をもたらすものであり、より詳細な分子構造の解析が可能となり、化合物特定の重要な手がかりとなる。今後、化合物の分子構造を特徴づけるフラグメントイオンが得られるよう、衝突解離条件の検討を行っていきたい。

厚生労働省が公開している無承認無許可医薬品情報 (<http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/musyounin.html>) によると、構造式が分かっている ED 治療薬の類似体だけで 20 種を超え、今後も新たな化合物が出現する中で、個別に標準品を揃えて分析することには限界がある。今回検出された $[M+H]^+$ の m/z の実測値から化合物の化学式をほぼ正確に推定できた。この測定条件は、10 化合物以外の ED 治療薬の類似体にも適用できるだろう。さらに、衝突解離条件等を検討することにより、化合物の分子構造を特徴付けるフラグメントイオンを検出できるようになれば、より確実な化合物の構造推定に役立つだろう。

引用文献

- 1) 梅垣敬三, 山田浩, 千葉剛, 中西朋子, 佐藤陽子, 福山哲. 2013. 健康食品に関する健康被害事例の情報源およびその有用性評価. 食品衛生学雑誌, 54 (4), 282-289.
- 2) 松本洋亘, 中村昌子, 塩崎秀彰. 2008. 無承認無許可医薬品中の医薬品成分の検出事例. 京都府保健環境研究所年報, 53, 32-37.
- 3) 守安貴子, 蓑輪佳子, 岸本清子, 坂本美穂, 門井秀郎, 中嶋順一, 濱野朋子, 中江大. 2011. 健康食品に含まれる医薬品成分の分析. 東京都健康安全研究センター研究年報, 62, 25-39.
- 4) Wilson I.D., Nicholson J.K., Castro-Perez J., Granger J.H., Johnson K.A., Smith B.W., Plumb R.S. 2005. High resolution "ultra performance" liquid chromatography coupled to oa-TOF mass spectrometry as a tool for differential metabolic pathway profiling in functional genomic studies. *Journal of Proteome Research*, 4 (2), 591-598.
- 5) 宮本靖久, 鷺田和人, 宇山敦生, 望月直樹. 2014. 高速液体クロマトグラフ-四重極飛行時間型質量分析計を用いた飲料中混入物の同定. 食品衛生学雑誌, 55 (6), 261-268.
- 6) Saito S., Nemoto S., Matsuda R. 2012. Multi-residue analysis of pesticides in agricultural products by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Food hygiene and safety science*, 53 (6), 255-263.
- 7) Tagami T., Aoyama A., Takeda A., Asada A., Doi T., Kajimura K., Sawabe Y. 2014. Simultaneous identification of 18 illegal adulterants in dietary supplements by using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Food hygiene and safety science*, 55 (1), 34-40.