

# いわゆる健康食品中から検出されたシルデナフィル構造類似体について

高橋 市長、長谷川 貴志、西條 雅明、永田 知子、若菜 大悟<sup>1)</sup>、合田 幸広<sup>1)</sup>

## Identification of Sildenafil Analogues Found in a Dietary Supplement

Kazunaga TAKAHASHI, Takashi HASEGAWA, Masaaki SAIJO, Tomoko NAGATA, Daigo WAKANA<sup>1)</sup> and Yukihiro GODA<sup>1)</sup>

### 要旨

平成 21 年度「違法ドラッグ対策事業及び無承認無許可医薬品取締事業」において、試買した 1 製品からシルデナフィル構造類似体と思われる不明成分を検出した。HPLC-PDA、LC-MS、UPLC-PDA、DART-TOF-MS 及び NMR 分析の結果から当該不明成分は国内では「いわゆる健康食品」から検出された事例のないメチソシルデナフィルであると判断した。

キーワード：健康食品、HPLC-PDA、LC-MS、NMR、シルデナフィル構造類似体、チオアイルデナフィル、メチソシルデナフィル

Keywords : dietary supplement, HPLC-PDA, LC-MS, NMR, sildenafil analogue, thioaildenafil, methisosildenafil

### はじめに

近年、「いわゆる健康食品」において、実効性のある医薬品成分に該当する成分を入れた製品が出回る例が後を絶たず、特に強壯強精作用を謳った製品では、勃起不全 (ED) 治療薬の有効成分であるシルデナフィル、タダラフィル及びバルデナフィル<sup>1-3)</sup>、あるいは、これら ED 治療薬の構造の一部を変更した構造類似体が頻繁に検出されている<sup>1,4-16)</sup>。

千葉県では「違法ドラッグ対策事業及び無承認無許可医薬品取締事業」の中で、これら違法に医薬品成分を添加した製品による健康被害の発生を防ぐため、試買検査を行っている。今回、平成 21 年度に試買した製品を検査する中で、1 製品からチオアイルデナフィルとともに国内では「いわゆる健康食品」から検出された事例がないシルデナフィル構造類似体であるメチソシルデナフィルが検出されたので報告する。

### 材料と方法

#### 1. 試料

平成 21 年度、違法ドラッグ対策事業及び無承認無許可医薬品取締事業において、インターネットで試買した製品のうち不明なピークを検出した製品で、剤形はカプセル剤、製品に記載されていた表示内容量は 250 mg であった。

#### 2. 試薬及び試液

##### 1) 標準品

ホモシルデナフィル及びホモチオデナフィルは国立医薬品食品衛生研究所からの分与品を用いた。チオアイルデナフィルは当該強壯成分が検出された製品から精製し、それを標準品として用いた。

##### 2) その他の試薬

アセトニトリルは HPLC 用及び LC-MS 用、リン酸は HPLC 用、1-ヘキサンスルホン酸ナトリウムはイオンペアクロマトグラフ用 (いずれも、和光純薬工業社製) を用いた。重炭酸アンモニウムは関東化学社製の特級品を用いた。DMSO-*d*<sub>6</sub> は ISOTEC 社製を使用した。水は日本ミリポア社製 MILLI-Q Labo 超純水製造装置により精製した超純水を用いた。その他の試薬はすべて和光純薬工業社製の特級品を用いた。

#### 3. 標準溶液の調製

各標準品をメタノールに溶解させ調製した標準原液をメタノールで 100 µg/mL に適宜希釈し調製した。

#### 4. 試験溶液の調製

カプセル内容物約 50 mg を精密に量り取り、メタノール 2 mL を加え 5 分間超音波抽出後、メンブランフィルター (日本ミリポア社製) でろ過したろ液をメタノールで 10 倍に希釈し、試験溶液とした。HPLC-フォトダイオードアレイ検出器 (PDA) 及び LC-MS 用試験溶液調製の際は 0.45 µm、Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC) -PDA 用試験溶液調製の際は 0.20 µm のメンブランフィルターを使用した。

#### 5. HPLC-PDA 分析

機器には、日本分光社製 PU-2089 型ポンプ、同 AS-2055 型オートサンプラー、同 CO-2065 型カラムオープン、同 MD-2015 型 PDA 検出器から構成される装置を用いた。測定条件は次の通りである。  
カラム：TSK-GEL ODS 80-Ts (4.6 mm i.d. × 150 mm、5 µm、東ソー社製)、カラム温度：40°C、移動相 A 液：アセトニトリル/水/リン酸混液 (100 : 900 : 1、5 mmol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム含有)、移動相 B 液：アセトニトリル/水/リン酸混液 (900 : 100 : 1、

1) 国立医薬品食品衛生研究所

5mmol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム含有)、グラジエント条件: 0分 (A : B=90 : 10) → 25分 (A : B=55 : 45) → 44-49分 (A : B=10 : 90)、流速: 1.0 mL/min、注入量: 20  $\mu$ L、測定波長: 200-400 nm (Max Absorbance)

#### 6. LC-MS 分析

装置として Waters 社製 2695 型セパレーションモジュール及び同 ZQ4000 型質量分析計を用いた。測定条件は次の通りである。

カラム: Atlantis T3 (2.1 mm i.d.  $\times$  150 mm, 5  $\mu$ m, Waters 社製)、カラム温度: 40 $^{\circ}$ C、移動相 A 液: 0.01 mol/L ギ酸アンモニウム (pH3.0)、移動相 B 液: アセトニトリル、グラジエント条件: 0分 (A : B=90 : 10) → 50分 (A : B = 80 : 20) → 60-70分 (A : B=30 : 70)、流速: 0.3 mL/min、注入量: 1  $\mu$ L、イオン化法: エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 ポジティブモード、脱溶媒ガス流量: N<sub>2</sub> 800 L/hr、脱溶媒温度: 350 $^{\circ}$ C、コーン電圧: 30 V、測定質量範囲:  $m/z$  100-800

#### 7. UPLC-PDA 分析

装置として Waters 社製 AQUITY UPLC シリーズを用いた。測定条件は次の通りである。

カラム: ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm i.d.  $\times$  50 mm, 1.7  $\mu$ m, Waters 社製)、カラム温度: 40 $^{\circ}$ C、移動相 A 液: 10 mmol/L 重炭酸アンモニウム溶液 (pH10.0)、移動相 B 液: アセトニトリル、アイソクラティック条件: A : B=70 : 30、流速: 0.6 mL/min、注入量: 1  $\mu$ L、測定波長: 200-400 nm (Max Absorbance)、検出波長: 296 nm (メチルシルデナフィル)、347 nm (チオアイルデナフィル)

#### 8. 単離・精製

カプセル内容物約 50 mg にメタノール 2 mL を加え 5 分間超音波抽出後、0.45  $\mu$ m メンブランフィルターでろ過し、抽出した液を分取 TLC に供した。分取 TLC は次の条件で行い、R<sub>f</sub> 値 0.49 部分を掻き取った後、酢酸エチル 4 mL で抽出し、0.20  $\mu$ m のメンブランフィルターでろ過を行った。

薄層板: Silicagel 60 F<sub>254</sub> 1 mm (Merck 社製)、展開溶媒: アセトン/イソプロパノール (4 : 1)、展開距離: 約 8 cm、検出法: 紫外線照射 (365 nm)

上記操作を複数回行い、集めたる液を減圧乾燥して不明成分 (4.6 mg)を得た。

#### 9. Direct Analysis in Real Time (DART) -Time of Fly (TOF)-MS 分析

DART-TOF-MS 測定装置としてイオン源 DART (日本電子社製) に、質量分析計 JMS-T100 (日本電子社製) を連結したものを使用した。測定条件は次の通りである。

##### 1) DART 条件

ポジティブモード、ガス流量: He 2.5 L/min、ガス温度: 250 $^{\circ}$ C、ニードル電圧: 2500 V、電極 1: 100 V、電極 2: 250 V

##### 2) TOF-MS 条件

ポジティブモード、イオンガイド電圧: 500 V、リフレクトロン電圧: 950 V、オリフィス 1 電圧: 15 V、オリフィス 2 電圧: 5 V、リングレンズ電圧: 5 V、オリフィス 1 温度: 100 $^{\circ}$ C、測定範囲:  $m/z$  200-700、質量校正: PEG600、内部標準物質: PEG600

##### 10. NMR 分析

装置として、日本電子社製 ECA-800 を用いた。測定条件は次の通りである。

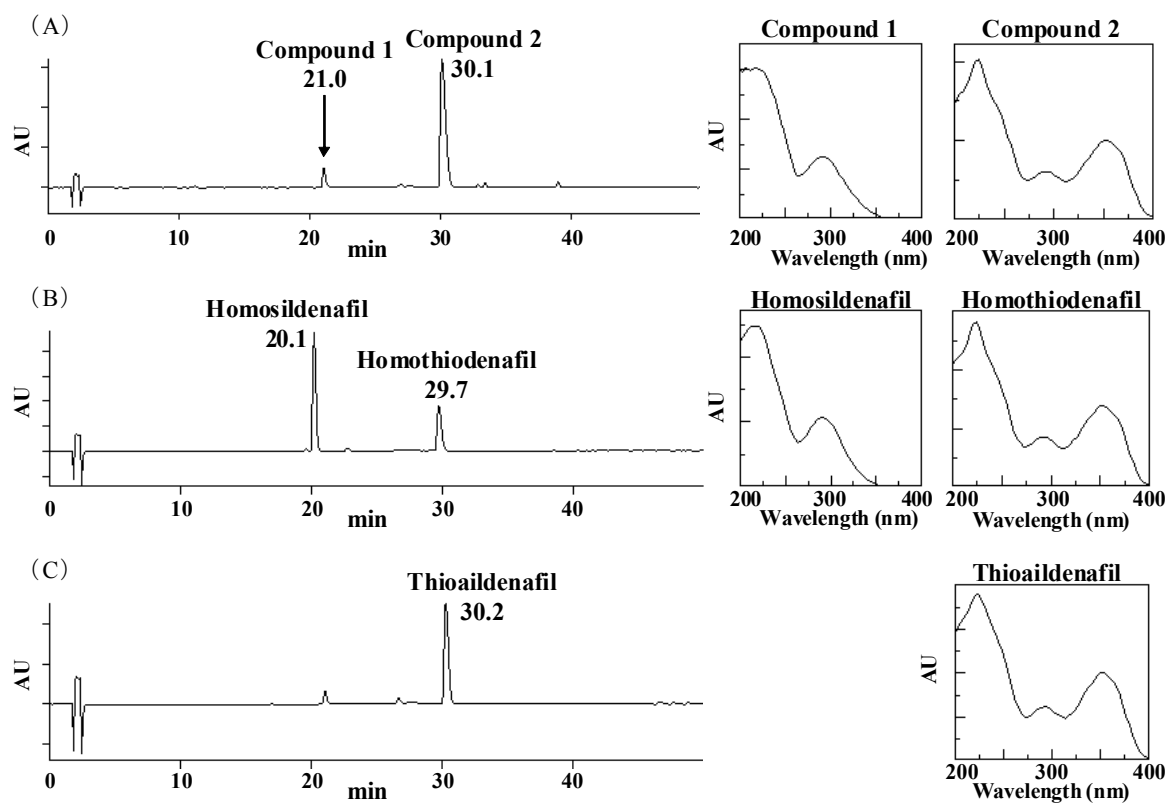
測定核種: <sup>1</sup>H 及び <sup>13</sup>C、NMR 測定溶媒: DMSO-*d*<sub>6</sub>、内部標準物質: テトラメチルシラン、測定法: <sup>1</sup>H-NMR (800 MHz)、<sup>13</sup>C-NMR (200 MHz)、<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H correlation spectroscopy (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY)、heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC)、heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC)、nuclear overhauser effect spectroscopy (NOESY)

### 結果及び考察

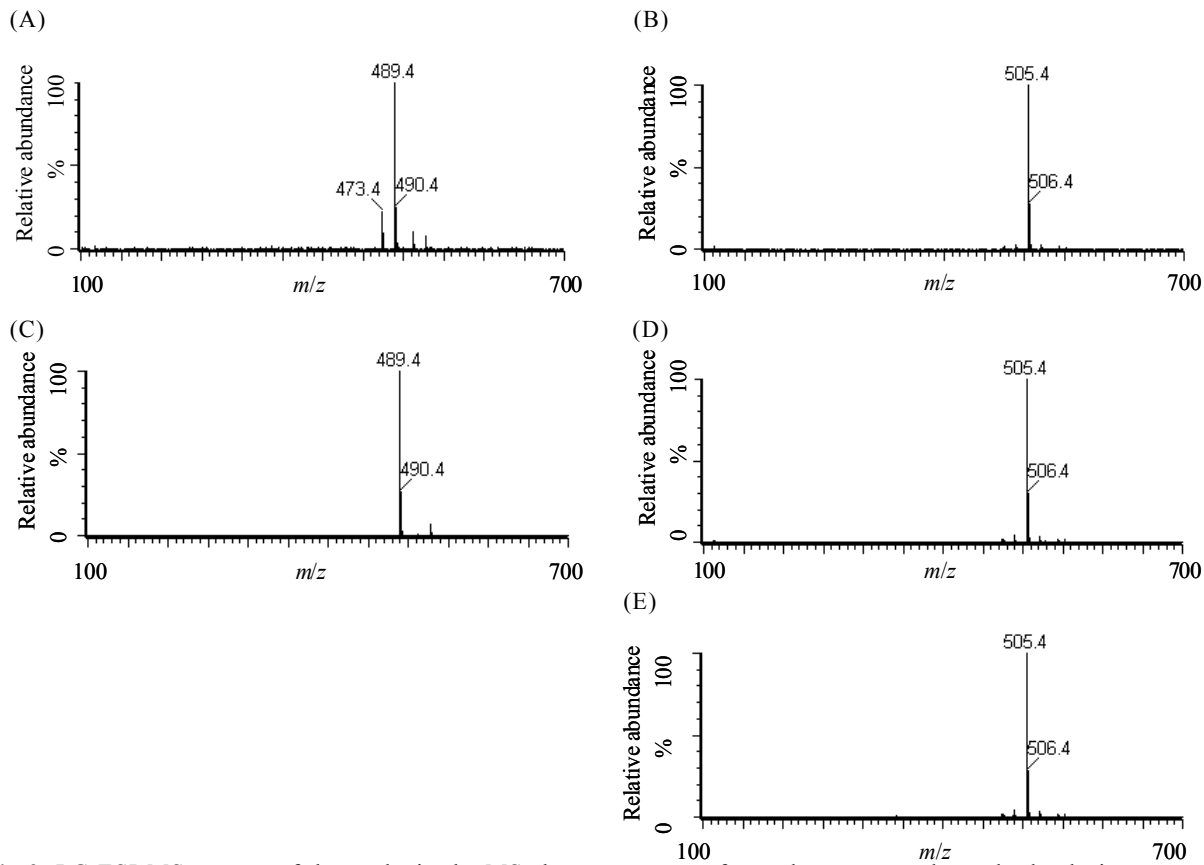
不明成分が検出された製品の試験溶液、ホモシルデナフィルとホモチオデナフィル混合標準溶液及びチオアイルデナフィル標準溶液の HPLC クロマトグラムと対応する UV スペクトルを Fig.1 に示した。当該製品のクロマトグラム上からはいくつかのピークが検出され、その中で 21.0 分のピーク (成分 1) はホモシルデナフィルとほぼ同様の UV スペクトルを示し、保持時間もホモシルデナフィルの保持時間 20.1 分とほぼ同様であった。また、30.1 分のピーク (成分 2) はホモチオデナフィル及びチオアイルデナフィルと同様の UV スペクトルを示し、保持時間もホモチオデナフィル (29.7 分) 及びチオアイルデナフィル (30.2 分) とほぼ同様であった。

LC-MS 分析では、成分 1 はマススペクトル上で  $m/z$  489 に [M+H]<sup>+</sup> イオンと思われるピークを示し、ホモシルデナフィルとほぼ同様のマススペクトルを示した (Fig.2A、C)。また、成分 2 はマススペクトル上で  $m/z$  505 に [M+H]<sup>+</sup> イオンと思われるピークを示し、そのマススペクトルはホモチオデナフィル及びチオアイルデナフィルと同様であった (Fig.2B、D、E)。

成分 1 がホモシルデナフィルであるか及び成分 2 がホモチオデナフィルまたはチオアイルデナフィルであるか判断するため、UPLC-PDA を用いたアイソクラティック分析を行った。UPLC-PDA 分析の結果、UV クロマトグラム上で、成分 2 は保持時間 2.3 分に検出され、チオアイルデナフィルと同様の保持時間を示し、ホモチオデナフィルの保持時間 3.3 分とは異なる保持時間を示した (Fig.3)。このことから、HPLC-PDA 分析及び LC-MS 分析の結果と併せて成分 2 はチオアイルデナフィルであると判断された。



**Fig.1.** HPLC chromatograms and spectra of sample extract and standard solution  $\lambda = 290 \text{ nm}$ , (A) Sample extract, (B) Standard solution of homosildenafil (100  $\mu\text{g/mL}$ ) and homothiodenafil (100  $\mu\text{g/mL}$ ), (C) Standard solution of thioaildenafil (100  $\mu\text{g/mL}$ )



**Fig.2.** LC-ESI-MS spectra of the peaks in the MS chromatograms of sample extract and standard solution (A) compound 1, (B) compound 2, (C) homosildenafil, (D) homothiodenafil, (E) thioaildenafil

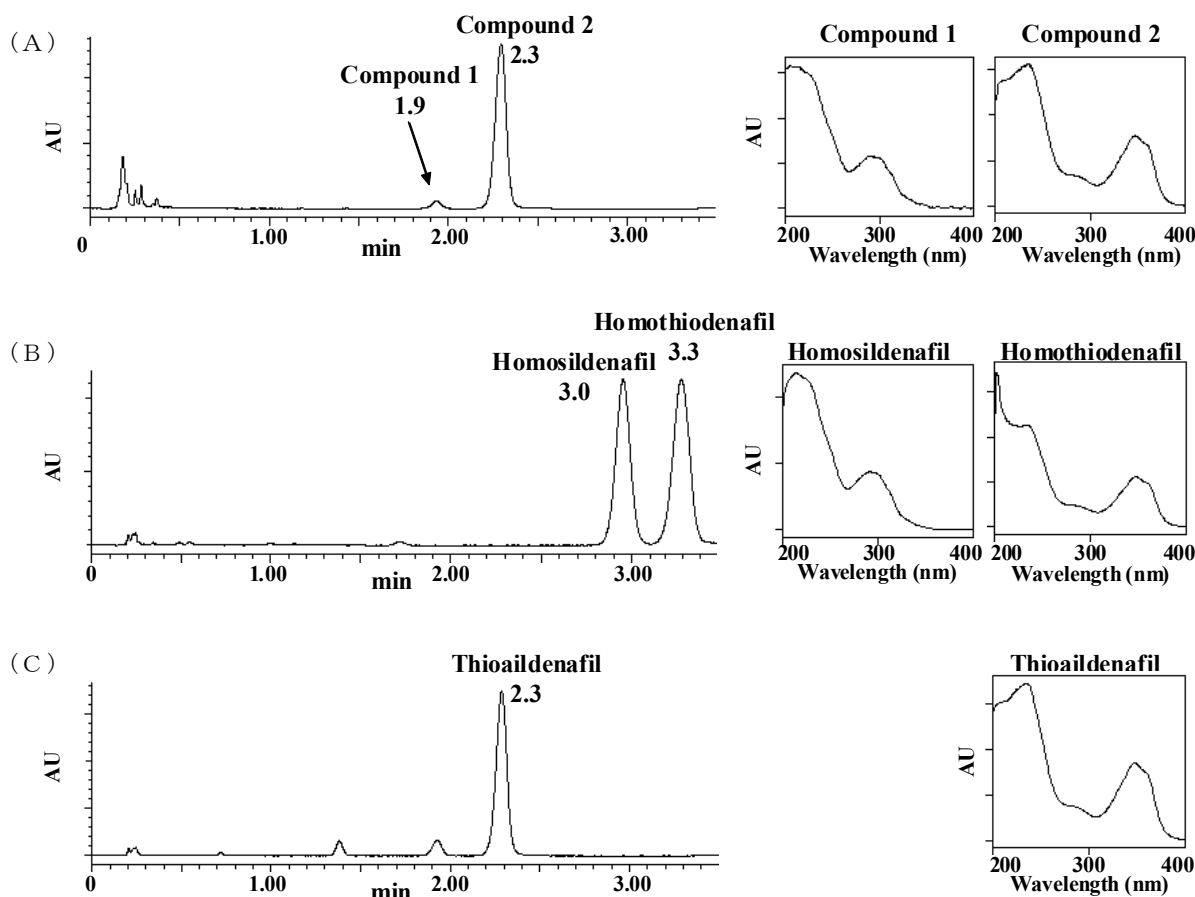
また、UPLC-PDA 分析において、成分 1 は保持時間 1.9 分に検出され、ホモシルデナフィルの保持時間 (3.0 分) とは異なる保持時間を示した (Fig.3)。そのため、成分 1 はホモシルデナフィルではないと判断された。

当該不明成分は、その UV スペクトルからシルデナフィル構造類似体であることが推測されたため、分取 TLC による単離・精製を行い、DART-TOF-MS 分析及び NMR 分析による構造解析を行った。分取 TLC により単離・精製を行ったところ、不明成分は白色の粉末であった。

不明成分を DART-TOF-MS で分析した結果、 $m/z$  489.2279 (Calcd 489.2284) に  $[M+H]^+$  が得られ、分子式は  $C_{23}H_{32}N_6O_4S$  と推定された。また、 $^1H$ -NMR スペクトルから、 $\delta$  4.16 (3H, s) よりメチル基、 $\delta$  1.33 (3H, t,  $J=6.9$  Hz)、 $\delta$  4.20 (2H, q,  $J=6.9$  Hz) よりエトキシ基、 $\delta$  0.93 (3H, t,  $J=7.5$  Hz)、 $\delta$  1.73 (2H, qt,  $J=7.5, 7.5$  Hz)、 $\delta$  2.77 (2H, t,  $J=7.5$  Hz) より *n*-プロピル基、 $\delta$  7.37 (1H, d,  $J=8.7$  Hz)、 $\delta$  7.81 (1H, dd,  $J=2.4, 8.7$  Hz)、 $\delta$  7.83 (1H, d,  $J=2.4$  Hz) より ABX タイプの芳香族水素の存在が示唆された (Table)。

一方、 $^{13}C$ -NMR スペクトルから、5つのメチル炭

素、1つのアルコキシ炭素 ( $\delta$  65.0) を含む 5つのメチレン炭素、3つの芳香族炭素 ( $\delta$  130.0, 131.6 及び 113.4) を含む 5つのメチン炭素、7つの芳香族四級炭素 ( $\delta$  145.1, 148.4, 138.0, 124.6, 126.6, 123.8 及び 159.9) 及びカルボニル炭素 ( $\delta$  153.9) の存在が示唆された (Table)。これら  $^1H$ -NMR 及び  $^{13}C$ -NMR スペクトルから得られるシグナルは、分子式  $C_{23}H_{32}N_6O_4S$  を示しシルデナフィル構造類似体であるホモシルデナフィルのシグナル<sup>4)</sup>と類似していたが、ホモシルデナフィルに観察される *N*-エチルピペラジン環部分の *N*-エチル基のシグナルは観察されなかった。一方、同様に分子式  $C_{23}H_{32}N_6O_4S$  を示し、ジメチルピペラジン環構造を有するシルデナフィル構造類似体のメチソシルデナフィルのシグナル<sup>11)</sup>と不明成分のシグナルは非常によく類似しており、 $^1H$ -NMR スペクトルから、 $\delta$  1.68 (2H, t,  $J=10.7$  Hz) よりアキシアルのメチレン水素、 $\delta$  3.45 (2H, dd,  $J=2.0, 10.7$  Hz) よりエカトリアルメチレン水素、 $\delta$  2.73 (2H, m) よりアキシアルのメチン水素と思われるシグナルが観察された。 $^1H$ - $^1H$  COSY から H-25 (H-27) のメチン水素と H<sub>2</sub>-24 (H<sub>2</sub>-28) のメチレン水素、H<sub>3</sub>-29 (H<sub>3</sub>-30) のメチル水素の相関等がみられた (Fig.4)。



**Fig.3.** UPLC chromatograms and spectra of sample extract and standard solution

$\lambda = 290$  nm, (A) Sample extract, (B) Standard solution of homosildenafil (100  $\mu$ g/mL) and homothiodenafil (100  $\mu$ g/mL), (C) Standard solution of thioaildenafil (100  $\mu$ g/mL)

これらの結果と HMBC から不明成分はメチルピペラジン環以外はシルデナフィルと同様の構造で、ジメチルピペラジン環を有していると推定された (Fig.4)。また、NOESY から H-15 のメチン水素と H<sub>2</sub>-24 (H<sub>2</sub>-28) のメチレン水素に相関がみられた (Fig.5)。このことから、ジメチルピペラジン環のメチレン炭素と結合した窒素原子と硫黄原子が結合しているものと推定された。以上の結果から、不明成分は 1-[[3-(6,7-dihydro-1-methyl-7-oxo-3-propyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)-4-ethoxyphenyl]-sulfonyl]-3-(R), 5-(S)- dimethylpiperazine (メチソシルデナフィル) であると判断された (Fig.6)。

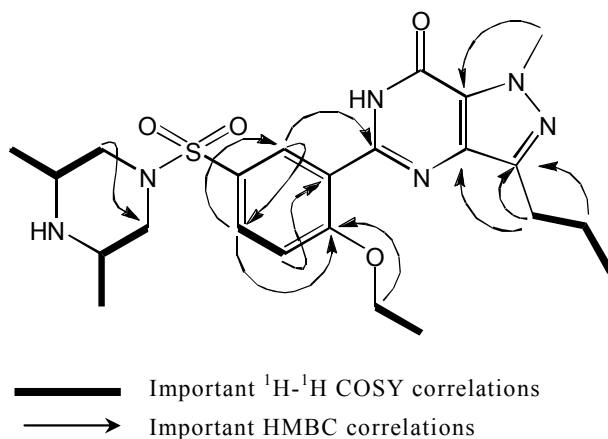
当該製品から検出されたチオアイルデナフィルとメチソシルデナフィルについて、UPLC-PDA を用いて定量を行った結果、含有量はそれぞれ 48.2 mg/カプセル (166 μg/mg) 及び 1.5 mg/カプセル (5.2 μg/mg) であった。

チオアイルデナフィルについては、近年、国内外で「いわゆる健康食品」から検出された事例が報告されており<sup>1, 15)</sup>、シルデナフィルと類似の化学構造を有するため、当該物質を含有する「いわゆる健康食品」は無承認無許可医薬品として規制されている。メチソシルデナフィルは、国外では「いわゆる健康食品」から検出された事例が報告されているが<sup>10, 11)</sup>、国内での検出事例は本件が初めてであった。このメチソシルデナフィルについても「専ら医薬品として使用される成分本質」に該当するものとの判断がされ、当該物質を含有する「いわゆる健康食品」は無承認無許可医薬品として規制されることとなった。

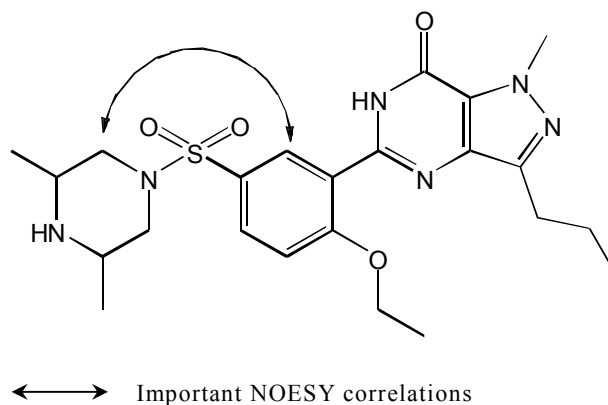
**Table** NMR data of the unknown compound

Position no.	measures	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (J in Hz)
1	145.1	—
4	153.9	—
6	148.4	—
8	138.0	—
9	124.6	—
10 (3H)	38.0	4.16s
11 (2H)	27.4	2.77t (7.5)
12 (2H)	21.9	1.73qt (7.5, 7.5)
13 (3H)	14.0	0.93t (7.5)
14	126.6	—
15 (1H)	130.0	7.83d (2.4)
16	123.8	—
17 (1H)	131.6	7.81dd (2.4, 8.7)
18 (1H)	113.4	7.37d (8.7)
19	159.9	—
20 (2H)	65.0	4.20q (6.9)
21 (3H)	14.4	1.33t (6.9)
24/28 (4H)	52.0	1.68t (10.7) 3.45dd (2.0, 10.7)
25/27 (2H)	49.9	2.73m
29/30 (6H)	19.1	0.91d (6.4)

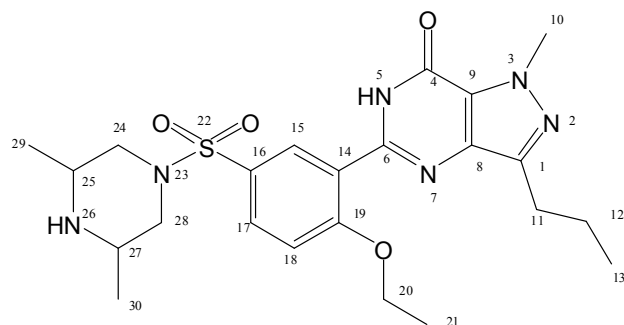
今回、「いわゆる健康食品」からチオアイルデナフィルに加えて、国内では検出されていなかったメチソシルデナフィルが新たに検出された。この様に、依然として ED 治療薬類縁物質を「いわゆる健康食品」に添加する事例があることから、今後も新たな ED 治療薬類縁物質が検出される可能性を念頭において試験検査を行っていくことが必要であると考えられる。



**Fig.4.** Important <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY and HMBC correlations of the unknown compound



**Fig.5.** Important NOESY correlations of the unknown compound



**Fig.6.** Chemical structure of methisosildenafil

## 文献

- 1) 健康被害情報・無承認無許可医薬品情報, 厚生労働省医薬食品局監査指導・麻薬対策課 (<http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/musounin.html>)
- 2) 守安貴子, 重岡捨身, 岸本清子, 石川ふさ子, 中嶋順一, 上村尚, 他: 健康食品中に含有するシルデナフィルの確認試験, 薬学雑誌, 121, 765-769 (2001)
- 3) Zhu,X.,Xiao,S.,Chen,B.,Zhang,F.,Yao,S.,Wan,Z. et al.: Simultaneous determination of sildenafil, vardenafil and tadalafil as forbidden components in natural dietary supplements for male sexual potency by high-performance liquid chromatography- electrospray ionization mass spectrometry.,*J.Chromatogr.A.*, 1066, 89-95 (2005)
- 4) Shin,M.H.,Hong,M.K.,Kim,W.S.,Lee,Y.J.,Jeoung,Y.C.: Identification of a new analogue of sildenafil added illegally to a functional food marketed for penile erectile dysfunction.,*Food Addit.Contam.*,20,793-796 (2003).
- 5) Blok-Tip,L.,Zomer,B.,Bakker,F.,Hartog,K.D, Hamzink, M.,Ten Hove,J.et al.:Structure elucidation of sildenafil analogues in herbal products.,*Food Addit.Contam.*,21,737-748, (2004).
- 6) Zou,P.,Hou,P.,Low,M.Y.,Koh,H.L.:Structural elucidation of a tadalafil analogue found as an adulterant of a herbal product.,*Food Addit. Contam.*,23,446-451 (2006).
- 7) Hou,P.,Zou,P.,Low,M.Y.,Chan,E.,Koh,H.L.:Structural identification of a new acetildenafil analogue from pre-mixed bulk powder intended as a dietary supplement.,*Food Addit. Contam.*,23,870-875 (2006).
- 8) Reepmeyer,J.C.,Woodruff,J.T.:Use of liquid chromatography-mass spectrometry and a hydrolytic technique for the detection and structure elucidation of a novel synthetic vardenafil designer drug added illegally to a "natural" herbal dietary supplement.,*J.Chromatogr.A.*,1125,67-75 (2006).
- 9) Reepmeyer,J.C.,Woodruff,J.T.:Use of liquid chromatography-mass spectrometry and a chemical cleavage reaction for the structure elucidation of a new sildenafil analogue detected as an adulterant in an herbal dietary supplement.,*J.Pharm.Biomed.Anal.*,44,887-93 (2007).
- 10) Reepmeyer,J.C.,Woodruff,J.T.,d'Avignon,D.A.:Structure elucidation of a novel analogue of sildenafil detected as an adulterant in an herbal dietary supplement.,*J.Pharm.Biomed.Anal.*,43,1615-1621 (2007).
- 11) Choi,D.M.,Park,S.,Yoon,T.H.,Jeong,H.K.,Pyo,J.S., Park,J.et al.:Determination of analogs of sildenafil and vardenafil in foods by column liquid chromatography with a photodiode array detector, mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance spectrometry.,*J.AOAC Int.*,91,580-588 (2008).
- 12) Hasegawa,T.,Saijo,M.,Ishii,T.,Nagata,T.,Haishima, Y.,Kawahara,N.et al.:Structural elucidation of tadalafil analogue found in a dietary supplement.,*Shokuhin Eiseigaku Zasshi*,49,311-315 (2008).
- 13) Zou,P.,Hou,P.,Oh,S.S.,Chong,Y.M.,Bloodworth, B.C.,Low,M.Y.et al.:Isolation and identification of thiohomosildenafil and thiosildenafil in health supplements.,*J.Pharm.Biomed.Anal.*,47,279-284 (2008).
- 14) Hasegawa,T.,Takahashi,K.,Saijo,M.,Ishii,T., Nagata,T., Kurihara,M. et al.:Isolation and structural elucidation of cyclopropentynafil and *N*-octylnortadalafil found in a dietary supplement., *Chem.Pharm.Bull.*,57,185-189 (2009).
- 15) Reepmeyer,J.C.,d'Avignon,D.A.:Structure elucidation of thioketone analogues of sildenafil detected as adulterants in herbal aphrodisiacs.,*J.Pharm.Biomed.Anal.*, 49,145-150 (2009).
- 16) Li,L.,Low,M.Y.,Aliwarga,F.,Teo,J.,Ge,X.W., Zeng,Y.et al.:Isolation and identification of hydroxythiohomosildenafil in herbal dietary supplements sold as sexual performance enhancement products.,*Food Addit.Contam.*, 26,145-151 (2009).