

## 健康食品中に含有されていた新規シルデナフィル類似体について

守安貴子<sup>\*</sup>, 重岡捨身<sup>\*</sup>, 蓑輪佳子<sup>\*</sup>,  
岸本清子<sup>\*</sup>, 安田一郎<sup>\*</sup>

### New Analogues of Sildenafil in the Dietary Supplements

Takako MORIYASU<sup>\*</sup>, Sutemi SHIGEOKA<sup>\*</sup>, Keiko MINOWA<sup>\*</sup>,  
Kiyoko KISHIMOTO<sup>\*</sup> and Ichiro YASUDA<sup>\*</sup>

New analogues of sildenafil, the effective substance of Viagra, were found in dietary supplements for men in November 2003 and April 2003. They were isolated from the supplements and investigated. They were identified as homosildenafil and acetildenafil (also called 'hongdenafil'). It's first time that they have been found in Japan. The physical and chemical properties of them and analytical results by TLC, HPLC/PDA and HPLC/MS also are shown in this report.

**Keywords :** 健康食品 dietary supplements, ホモシルデナフィル homosildenafil, アセチルデナフィル acetildenafil, ホンデナフィル hongdenafil, シルデナフィル類似体 analogues of sildenafil, 薄層クロマトグラフィー TLC, 液体クロマトグラフィー-HPLC, 液体クロマトグラフィー/質量分析 HPLC/MS

### 緒 言

いわゆる「健康食品」の中には、効果を高めるために医薬品成分が添加された薬事法違反の例が後を絶たない。近年においては、既存の医薬品成分だけでなく、これらを化学修飾した新規化合物が混入される事例が見受けられる。平成 14 年に死亡者 3 名、総患者数約 700 名を出した中国製ダイエット健康食品事例<sup>1,2)</sup>では、食欲抑制剤フェンフルラミンにニトロソ基を付加した新規化合物 *N*-ニトロソフェンフルラミン<sup>3)</sup>が含有されていた。この例に見られるように、新規化合物はその薬理作用や有害作用が未知のものも多く、健康食品に含有された場合の健康被害が懸念される。

平成 15 年 11 月、強壮や男性機能亢進を目的とした健康食品についてパイアグラの成分であるシルデナフィル(Sd)の検査を行ったところ、液体クロマトグラフィー/フォトダイオードアレイ分析(HPLC/PDA)において、保持時間は Sd と異なるが紫外吸収スペクトルは同一の化合物を検出した。また、平成 16 年 4 月、別の製品について同様に Sd を目的として薄層クロマトグラフィー分析(TLC)を行ったところ、Rf 値は Sd と異なるが、ドラージェンドルフ試薬で同様に橙色に発色する化合物を検出した。そこで、著者らは、これらの化合物をそれぞれ精製単離し、構造決定を行った。その結果、これらの化合物は Shin<sup>4)</sup>らが報告しているホモシルデナフィル(Hs)及び Blok-Tip<sup>5)</sup>らの

報告や韓国 FDA から発表されているアセチルデナフィル(Ad)、別名ホンデナフィルであることがわかった。なお、我が国において、これらが健康食品に含有されていたのは本事例が初めてであった。

本報では、これらの新規化合物について、機器分析データを中心とした物理化学的性状を示すとともに、TLC、HPLC/PDA 及び液体クロマトグラフィー/質量分析(HPLC/MS)による分析結果について報告する。

### 実験方法

#### 1. 試料

薬事監視員が都内販売店及び製造所より収去した製品及び試買により購入した製品を用いた。

比較に用いたシルデナフィル標準品は、パイアグラより精製単離したものをを用いた<sup>6)</sup>。

#### 2. 精製単離

##### 1) ホモシルデナフィル

製品の錠剤 3 錠(1.9g)を粉碎し、水 10 mL 及びアンモニア水(28 %)1 mL を加え、酢酸エチル 30 mL で 3 回抽出を行った。抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水後、ろ紙ろ過し、溶媒を留去した。残留物をクロロホルム約 3 mL に溶解し、クロロホルムで充填したシリカゲル 60(球状、中性、100-210 μm、関東化学(株)製)に負荷した。この

\* 東京都健康安全研究センター医薬品部医薬品研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

カラムをクロロホルム/メタノール 50:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 3:1 各 200 mL で順次溶出し, フラクシオンを得た. このうち, クロロホルム/メタノール 30:1 のフラクシオンを集め, 溶媒を留去した後メタノールで再結晶し, 133 mg の白色粉末を得た.

## 2) アセチルデナフィル

製品 1 本(液状, 50 mL)に 1 N 塩酸 5 mL を加え, メタノール, 水各 10 mL でコンディショニングした Oasis MCX( 充填量 500 mg, Waters (株) 製)3 本に負荷した. これを各々 0.1 N 塩酸 7 mL, 100 %メタノール 20 mL で洗浄後, 水 15 mL で置換し 5 %アンモニア水 45 mL を用いて溶出した. ただし, 溶出液の初流 15 mL は廃棄した. 得られた溶出液 30 mL を酢酸エチル 15 mL で 3 回振とう抽出し, 酢酸エチル層を遠心分離後集め, 溶媒を減圧留去し, 油状物質 8.7 mg を得た.

## 3. 分析機器による測定

### 1) 核磁気共鳴スペクトル測定

機器は日本電子(株)製 ALPHA500 を用いた. Hs は溶媒に DMSO を, Ad は  $\text{CDCl}_3$  を用い,  $^1\text{H-NMR}$  及び  $^{13}\text{C-NMR}$  を測定した.

### 2) 高分解能質量分析

Hs は Waters(株)製 LCT-Premier, Ad は日本電子(株)製 JMS-MS700V を用い, 直接導入により測定した.

### 3) 融点測定

Hs の融点は YAZAWA 製 BY-1 型融点測定器を用いて, 191 から 1 /分で昇温し, 試料をカバーガラスに挟んで測定した.

### 4) TLC 分析

Hs 及び Ad は, それぞれクロロホルムに溶解し, 約 1,000 ppm になるように調製した.

測定条件は以下のとおり.

薄層板: MERCK 社製 Silica gel 60 F<sub>254</sub> (Art No.5715),

展開溶媒: クロロホルム/メタノール/アンモニア水(90 :

1 : 5)の下層, アセトン/イソプロピルアルコール(8:2),

検出: 紫外線 254 nm (暗紫色吸収スポット), ドラージェンドルフ試薬噴霧 (橙色スポット), スポット量: 2  $\mu\text{L}$

### 5) HPLC/PDA 分析

Hs はアセトニトリルに, Ad は 0.01 M クエン酸溶液 / アセトニトリル(1:1)に溶解し, 約 50 ppm になるように調製した.

機器には, 日本分光(株)製 PU-980 型ポンプ, 同 MD-915 型フォトダイオードアレイ検出器, 同 DG-980-50 型デガッサー, 同 AS-950 型オートサンプラー, 同 CO-965 型恒温槽, JASCO-BORWIN データ処理システムにより構成した装置を用いた.

測定条件は以下のとおり.

カラム: Cosmosil 5C<sub>18</sub>-AR<sup>-</sup> (4.6 mm i.d.  $\times$  150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), カラム温度: 40 , 移動相: アセトニトリル/水/リン酸 (290 : 710 : 1) 混液にヘキサンスルホン酸ナトリ

ウムを 5 mM となるように添加したものを, 流速: 1 mL/min, 検出: PDA (定性) 及び Hs 290 nm (定量), Ad 280 nm (定量), 試料注入量; 10  $\mu\text{L}$ .

### 6) HPLC/MS 及び HPLC/MS/MS 分析

HPLC/PDA 用試料溶液を HPLC/MS は約 5 ppm, HPLC/MS/MS は約 0.1 ppm に希釈し, 試料溶液とした.

装置に Quattro Ultima(ジャスコインターナショナル(株)製)を用い, 以下の条件により測定した.

HPLC 条件: カラム; XTerra MS C<sub>18</sub> (2.1 mm i.d.  $\times$  150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), カラム温度; 40°C, 流速; 0.2 mL/min, 移動相; A 液 0.1 %ギ酸含有アセトニトリルと B 液 0.1 %ギ酸のグラジエント, 0-4 分: A 液 30 %, 4-10 分: A 液 30 % 70 %, 10-15 分: A 液 70 %, 注入量; 1  $\mu\text{L}$ . MS 条件: イオン化モード; ESI<sup>+</sup>, キャピラリー電圧; 3kV, ソース温度; 120°C, デソルベーション温度: 300°C, コーンガス流量; 57 L/hr, デソルベーションガス流量; 553 L/hr, コーン電圧 100 V, コリジョンガス電圧: 15 V (MS/MS 分析).

## 結果及び考察

### 1. 精製単離

Hs の単離は, シリカのオープンカラムにより, 容易に精製が可能であった. 一方, Ad は UV 吸収スペクトルが類似である少量の夾雑物質との分離が, シリカカラムでは困難であった. そこで, イオン交換モードの固相抽出カートリッジカラムについて検討した. カラムからの溶出に 5 %アンモニア含有メタノールを用いると溶出率は高かったが, 夾雑物も同時に溶出した. そこで, 有機溶媒を含まないアンモニアアルカリ溶液を用いたところ, 夾雑物質との分離が可能であった. したがって, 溶出には溶出率はあまり高くないが精製度の良い 5 %アンモニア水を用いた.

### 2. 核磁気共鳴スペクトル測定

Hs の構造式は Fig.1 に示すように, Sd の N-CH<sub>3</sub> 基が N-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> 基に, また, Ad は Sd の SO<sub>2</sub> 基が CH<sub>2</sub>CO 基になっており, 基本的な構造は Sd に大変よく似ている.

Hs の  $^{13}\text{C-NMR}$  及び  $^1\text{H-NMR}$  におけるケミカルシフト値は Table 1 に示すとおりであり, Shin らの報告<sup>4)</sup> に一致した. Ad の  $^{13}\text{C-NMR}$  は 22 位の CO 基と 23 位の CH<sub>2</sub> 以外は Hs とほぼ同じであり, プロトンは  $^1\text{H-NMR}$  及び C-H 二次元 NMR の HMQC により, Fig.1 に示した Ad の構造に矛盾なく帰属できた. また, これは Blok-Tip<sup>5)</sup> らの報告によく一致した.

### 3. 高分解能質量分析

本分析により, Hs の分子量 [M+H]<sup>+</sup> は 489.2302, これから推定される組成式は C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>N<sub>6</sub>S であり, 報告<sup>4)</sup> と一致した. Ad の分子量 [M+H]<sup>+</sup> は 467.2769 であり, 推定される組成式は C<sub>25</sub>H<sub>34</sub>O<sub>3</sub>N<sub>6</sub> であった.

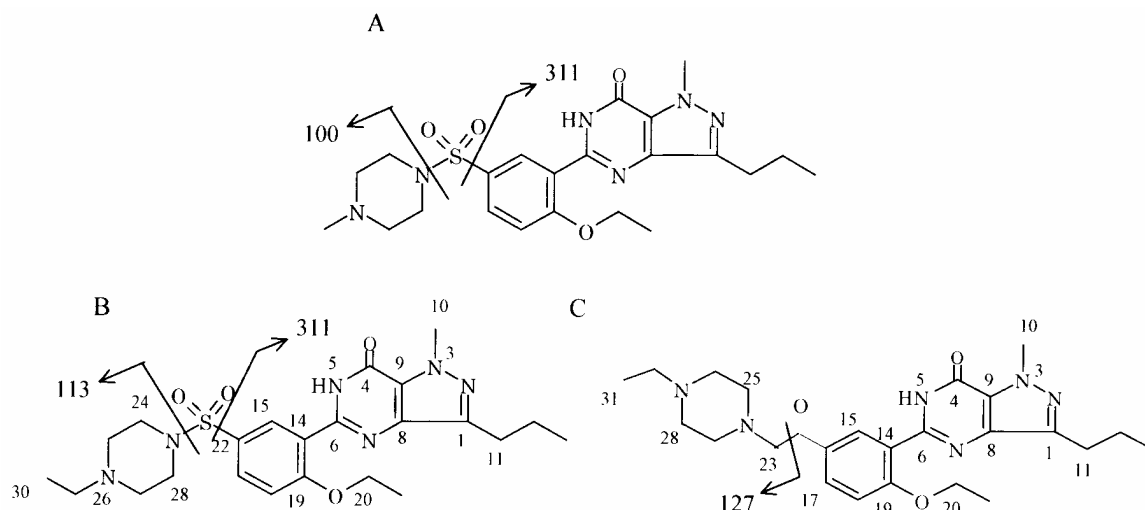


Fig. 1. Structure and Mass Fragmentation of Sildenafil and its Analogues

A: sildenafil (MW.474), B: homosildenafil (MW.488), C: acetildenafil (MW.466)

Table 1.  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  Chemical Shifts of Homosildenafil and Acetildenafil ( $\delta$  in ppm)

homosildenafil (DMSO)			acetildenafil ( $\text{CDCl}_3$ )		
No.	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	No.	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$
1	145.1	-	1	146.8	-
4	153.9	-	4	153.7	-
6	148.3	-	6	147.4	-
8	137.9	-	8	138.5	-
9	124.5	-	9	124.5	-
10	37.9	4.14 (3H, <i>s</i> )	10	38.2	4.21 (3H, <i>s</i> )
11	27.3	2.75 (2H, <i>t</i> )	11	27.8	2.88 (2H, <i>t</i> )
12	21.8	1.72 (2H, <i>sextet</i> )	12	22.4	1.81 (2H, <i>sextet</i> )
13	13.9	0.91 (3H, <i>t</i> )	13	14.1	0.98 (3H, <i>t</i> )
14	126.2	-	14	129.9	-
15	130.1	7.83 (1H, <i>d</i> )	15	132.2	9.08 (1H, <i>d</i> )
16	123.7	-	16	120.1	-
17	131.7	7.81 (1H, <i>dd</i> )	17	132.5	8.08 (1H, <i>dd</i> )
18	113.4	7.36 (1H, <i>d</i> )	18	112.7	7.03 (1H, <i>d</i> )
19	160.0	-	19	159.8	-
20	65.0	4.19 (2H, <i>q</i> )	20	65.8	4.31 (2H, <i>q</i> )
21	14.3	1.32 (3H, <i>t</i> )	21	14.6	1.57 (3H, <i>t</i> )
24,28	46.0	2.88 (4H, <i>m</i> )	22	194.9	-
25,27	51.3	2.39 (4H, <i>m</i> )	23	64.7	3.75 (2H, <i>s</i> )
29	51.2	2.27 (2H, <i>q</i> )	25,29	53.4	2.62 (4H, <i>m</i> )
30	11.9	0.90 (3H, <i>t</i> )	26,28	52.6	2.49 (4H, <i>m</i> )
5-NH	-	12.2 (1H, <i>br.s</i> )	30	52.2	2.37 (2H, <i>q</i> )
			31	11.9	1.02 (3H, <i>t</i> )
			5-NH	-	10.8 (1H, <i>br.s</i> )

#### 4. 融点測定

Hs の融点は 197 であり、報告<sup>4)</sup>の値 196.5 と一致した。

#### 5. TLC 分析

結果を Fig.2 に示した。いずれの化合物も 254nm の紫外外部吸収を持つほか、ドラージェンドルフ試薬による橙色の発色が顕著であり、シルデナフィル類似化合物の検出に有用であった。また、2種の展開溶媒を組み合わせることにより、3種の化合物を判別することが可能であった。TLCにおける検出限界は、Hs が 100 ng/spot (UV254nm), 300 ng/spot (ドラージェンドルフ試薬による発色), Ad が 100 ng/spot (UV254 nm), 100 ng/spot (ドラージェンドルフ試薬による発色)であった。

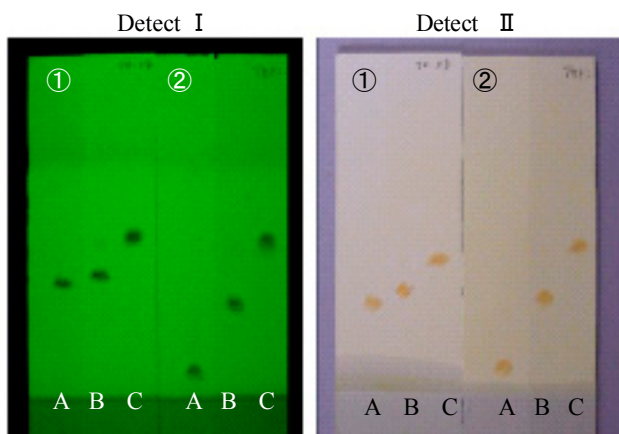


Fig. 2. TLC Chromatograms of Sildenafil and its Analogues

Mobile Phase ①CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/NH<sub>4</sub>OH Mixture (90:1:5) of Under Layer, ② (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO/(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHOH Mixture (8:2)  
Detect I : UV 254 nm, II : dragendorff's reagent  
A: acetildenafil, B: sildenafil, C: homosildenafil

#### 6. HPLC/PDA 分析

HPLC クロマトグラムを Fig.3 に示したが、各化合物は Ad, Sd, Hs の順に溶出し、Sd と Hs は保持時間が近かった。また、Sd と Hs は、共役系が同一の基本骨格を持つため、Fig.4 に示すように両者の UV スペクトルが完全に一致し、スペクトルによる区別が不可能であった。一方、Ad は Sd と異なるスペクトルを示し、これによる確認は有用であると考えられた。

#### 7. HPLC/MS 及び HPLC/MS/MS 分析

Fig.5 に示すように Ad は 3.7 分、Hs は 5.5 分に溶出し、5.0 分に溶出する Sd と分離した。また、それぞれの [M+H]<sup>+</sup> をモニターすることにより、1 ppm でも十分に検出することができた。

マススペクトルは Fig.6 に示すように、Hs は *m/z* 489、Ad は *m/z* 467 とそれぞれの [M+H]<sup>+</sup> がベースピークとして測定されたが、MS 分析ではフラグメントイオンは測定

されなかった。類似体の場合、構造式は異なるが同じ分子量を持つ異性体の可能性もあることから、MS/MS 分析を行い、マスフラグメントを測定した。その結果、Ad は Fig.1 の構造式に示したように、22 位 CO 基と 23 位 CH<sub>2</sub> 基の間で開裂した *m/z* 127 のフラグメントが得られた。また、Hs

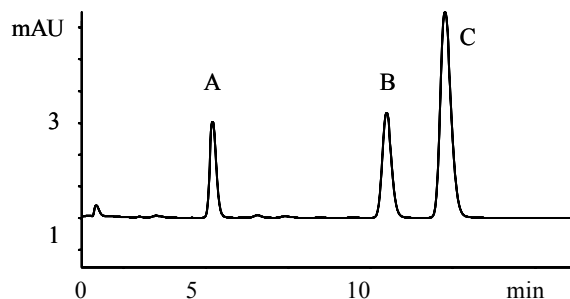


Fig. 3. HPLC Chromatograms of Sildenafil and its Analogues  
A: acetildenafil, B: sildenafil, C: homosildenafil

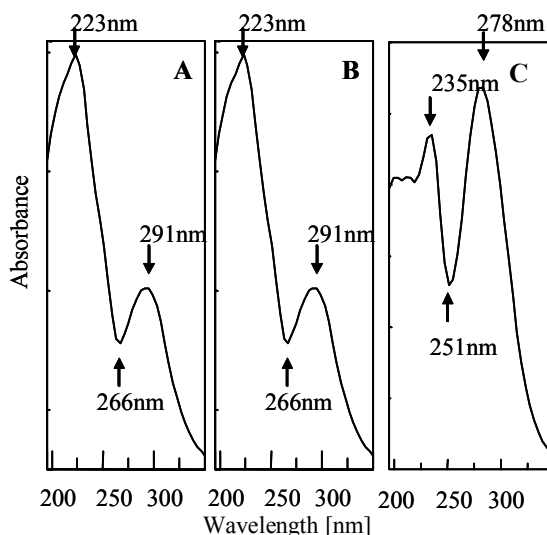


Fig. 4. UV Spectra of Sildenafil and its Analogues  
A: sildenafil, B: homosildenafil, C: acetildenafil

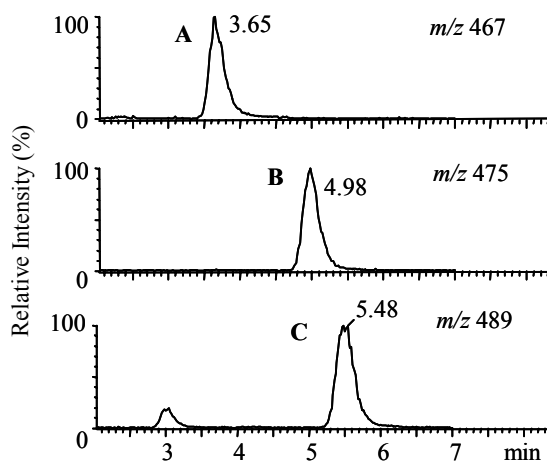


Fig. 5. HPLC/MS Chromatograms of Sildenafil and its Analogues  
A: acetildenafil, B: sildenafil, C: homosildenafil

は SO<sub>2</sub> 基の両側で開裂した  $m/z$  113 と 311 が測定された。これは, Sd の開裂と同じであり, 他の SO<sub>2</sub> 基を持ったシルデナフィル類似体はいずれも同様の開裂をすることから, 今後, 新たな類似体が発見された際に, 構造式を推定する一つの指標となると考えられた。

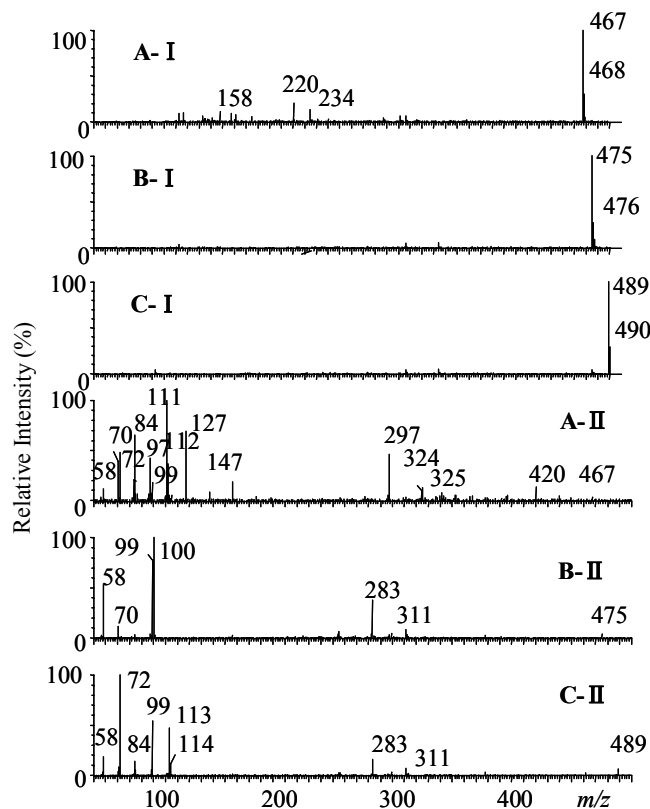


Fig. 6. Mass and Tandem Mass Spectra of Sildenafil and its Analogues  
A: acetildenafil, B: sildenafil, C: homosildenafil  
I : mass spectra, II : tandem mass spectra

### ま と め

1. 強壮や男性機能亢進を目的とした健康食品から, パイアグラの成分である Sd の類似体を検出した。これらは Shin らが報告している Hs 及び Blok-Tip<sup>5)</sup>らの報告や韓国 FDA から発表されている Ad であり, 我が国では初めての検出事例であった。
2. Hs 及び Ad を製品から精製単離し, 核磁気共鳴スペクトル測定, 高分解能質量分析, 融点測定を行い, これらの物理化学的性状を明らかとした。
3. Hs 及び Ad の TLC, HPLC/PDA, HPLC/MS 及び HPLC/MS/MS 分析法について検討し, その分析結果を示した。

### 文 献

- 1) 厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課報道発表資料: 中国製ダイエット用健康食品による健康被害事例等, 2003年5月30日。
- 2) 守安貴子, 岸本清子, 蓑輪佳子, 他: 東京衛研年報, **54**, 69~73, 2003。
- 3) 厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課報道発表資料: 中国製ダイエット用健康食品(未承認医薬品)に関する調査結果, 2003年2月12日。
- 4) M.-H. Shin, M.-K. Hong, W.-S. Kim, *et al*: Food Additives Contaminants, **20**, 793~796, 2003。
- 5) L. Blok-Tip, B. Zomer, F. Bakker, *et al*: Food Additives Contaminants, **21**, 737~748, 2004。
- 6) 守安貴子, 重岡捨身, 岸本清子, 他: 薬学雑誌, **121**, 765~769, 2001。