

ノート

## プロダクトイオンスペクトルを用いた ED 治療薬及びその類似成分の構造解析

伊達 英代, 井原 紗弥香, 寺内 正裕, 新井 清, 松尾 健\*

### Structural Analysis Method of Erectile Dysfunction (ED) Medication and the Analog Compounds Using Product Ion Spectra Matching

HIDEYO DATE, SAYAKA IHARA, MASAHIRO TERAUCHI, KIYOSHI ARAI and TAKESHI MATSUO\*

In this study, we analyzed product ion spectra of ED medications and the analog compounds acquired by measurement of LC-MS/MS and then elucidated product ions for characterizing basic structure and substituent of these compounds. As a result, we established that systematic analysis to estimate chemical structures of the ED medications and the analog compounds.

Key words : LC-MS/MS, product ion spectra, ED medications and the analog compounds, basic structure

#### 緒 言

薬事法に基づき、医薬品は適正な規制のもとに製造販売されているが、一方で、医薬品成分を含む製品が食品として流通し、「無承認無許可医薬品」[1]に該当する、「いわゆる健康食品」による健康被害の報告が後を絶たない。近年、これら「いわゆる健康食品」に、既知成分(医薬品成分や指定薬物等)の構造の一部を修飾させた類似成分が添加される事例が急増している。このような類似成分が添加された場合、成分の検知・同定に多大な時間と労力を要すること等から、健康被害の未然防止、拡大防止への迅速な対応に弊害をもたらしている。

本県においても、このような類似成分の分析に取り組んでおり、これまで勃起不全(ED)治療薬及びその類似成分を対象に、本県薬務課の「無承認無許可医薬品等買上調査」及び健康被害発生時の成分分析を実施している[2][3]。今後も、ED治療薬の類似成分を添加した製品が、引き続き流通すると予想される[4]ことから、このような成分を迅速に検知・同定する手法が必要である。そこで、過去の事例で検出されたED治療薬及びその類似成分のLC-MS/MSにおけるプロダクトイオンスペクトルについて、構造に対する帰属を解析し、基本骨格及び置換基に由来する各イオンから類似成分の構造を推定する手法を検討したので、その概要を報告する。

#### 方 法

##### 1 試薬

###### (1) 標準品

ED治療薬及びその類似成分10成分(シルデナフィル(SLF)、ホモシルデナフィル(Hom-SLF)、ヒドロキシホモシルデナフィル(Hyd-Hom-SLF)、チオシルデナフィル(Thio-SLF)、メチソシルデナフィル(Methiso-SLF)、ホンデナフィル(HDF)、ヒドロキシホンデナフィル(Hyd-HDF)、バルデナフィル(VDF)、タダラフィル(TDF)、アミノタダラフィル(Amino-TDF)を用いた(Table 1)。

Table 1 Intended ED Medication and the Analog Compounds

Components Name	Appropriate sources
Sildenafil	National Institute of Health Sciences
Vardenafil	
Methisosildenafil	
Homosildenafil	Toronto Research Chemicals Inc.
Hongdenafil	
HydroxyHongdenafil	
Tadalafil	
Aminotadalafil	Santa Crus Biotechnology, Inc.
Thiosildenafil	
HydroxyHomosildenafil	

###### (2) その他試薬

メタノール及び蒸留水はSIGMA-ALDRICH Inc. 製 HPLC用を、アセトニトリルは、関東科学(株)製

\*現広島県感染症・疾病管理センター：Hiroshima Prefectural Center for Disease Control and Prevention

HPLC用を用いた。その他試薬は、特級品を使用した。

## 2 装置

HPLCはAgilent 1100(Agilent Technologies製), MS/MSは, API 3000 (AB SCIEX 製)を用いた。

## 3 標準溶液の調製

各標準品をメタノールで10  $\mu\text{g/mL}$ となるよう調製したものを, プロダクトイオンスペクトル測定用標準溶液とした。

## 4 プロダクトイオンスペクトルの取得条件

液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析(LC-MS/MS)によるプロダクトイオンスペクトルの測定は, 豊田ら[5]の方法を用いた。まず, 標準溶液及び試料溶液についてQ1スキャンを行い, 脱プロトン化分子( $[\text{M-H}]^-$ )及びプロトン化分子( $[\text{M+H}]^+$ )と推察されるイオンを確認した。次に, そのイオンをプリカーサーイオンとし, Table 2に示したLC-MS/MS条件による, プロダクトイオンスキャン測定を実施した。

## 結果及び考察

対象としたED治療薬及びその類似成分10成分(Table 1)について, Table 2に示した条件による測定で得られたプロダクトイオンスペクトルを解析したところ, 全ての成分において, ネガティブ(Neg.), ポジティブ(Pos.)両モードでプロダクトイオンスペクトルの測定が可能であった。

得られたプロダクトイオンスペクトルについて, 基本骨格が一致あるいは類似する成分ごとに構造に対する帰

属を解析し, 基本骨格及び置換基に由来する各イオンから構造を推定する手法を検討した。

## 1 シルデナフィル類

Fig. 1に示すとおり, SLF及びその類似成分(①: SLF, ②: Hom-SLF, ③: Hyd-Hom-SLF, ④: Methiso-SLF, ⑤: VDF, ⑥: Thio-SLF)の基本的な構造は, ピペラジン環とスルフォニル基及びエトキシフェニル基が結合したピラゾロピリミジン環(以下, 3環という。)である。

### (1) Neg. モード (Fig. 1)

まず, コリジョンエネルギー(CE)を-20 eVで測定した場合, 各成分の $[\text{M-H}]^-$ イオンが観測され, さらにCEの強度を-35 eVに上げると,  $[\text{M-H}]^-$ イオンからエチル基( $\text{C}_2\text{H}_4$ :28)が脱離したと推察される各イオン(①:  $m/z$  445, ②, ④及び⑤:  $m/z$  459, ③:  $m/z$  475, ⑥:  $m/z$  461)がそれぞれ強く観測された。さらに, CEの強度を50 eVとすると, スルホニル基( $-\text{S}(=\text{O})_2-$ )のベンゼン環側で開裂して脱離した3環側(⑤については, ピラゾロピリミジン環がイミダゾトリアジン環)由来と推察されるイオン $m/z$  282が観測された。⑥は, 3環側のピラゾロピリミジン環の4位がチオカルボニル基( $-\text{C}(=\text{S})-$ )であることから, ①-④より16増えた $m/z$  298が観測された。

なお, Neg. モードではピペラジン環側のイオンは観測できなかったが, 各 $[\text{M-H}]^-$ イオン及び $[\text{M-H}]^- - 28$ のイオンから, ピペラジン環についたアルキル基の種類(①及び⑥はメチルピペラジン, ②及び⑤はエチルピペラジン, ③はヒドロキシエチルピペラジン, ④はジメチルピペラジン)が推察される。

Table 2 LC-MS/MS Conditions for Acquiring Product Ion Spectra

HPLC Conditions	
Device	:Agilent 1100 (Agilent Technologies)
Column	:Phenomenex Mercury MS Luna® C18(2.0×10 mm, 3 $\mu\text{m}$ )
Flow rate	:0.2 mL/min
Column Temp.	:40°C
Inj. Volume	:1 $\mu\text{L}$
Mobile phase	:Sol.A:H <sub>2</sub> O containing 5 mmol/L CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> :Sol.B:CH <sub>3</sub> OH/CH <sub>3</sub> CN(1:1) containing 5 mmol/L CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>
Gradient profile	:A:B (80:20)→5 min→A:B (5:95) (Hold 3 min)
MS/MS Conditions	
Device	:API 3000 (AB SCIEX)
Ionization mode	:ESI (Negative and Positive)
Scan type	:Product ion scan
Ion spray voltage	:4500 eV (Negative) and 5500 eV (Positive)
CE voltage	:± 20 eV, ± 35 eV, ± 50 eV
Ion source temp.	:400°C
(The other conditions were values of each device.)	

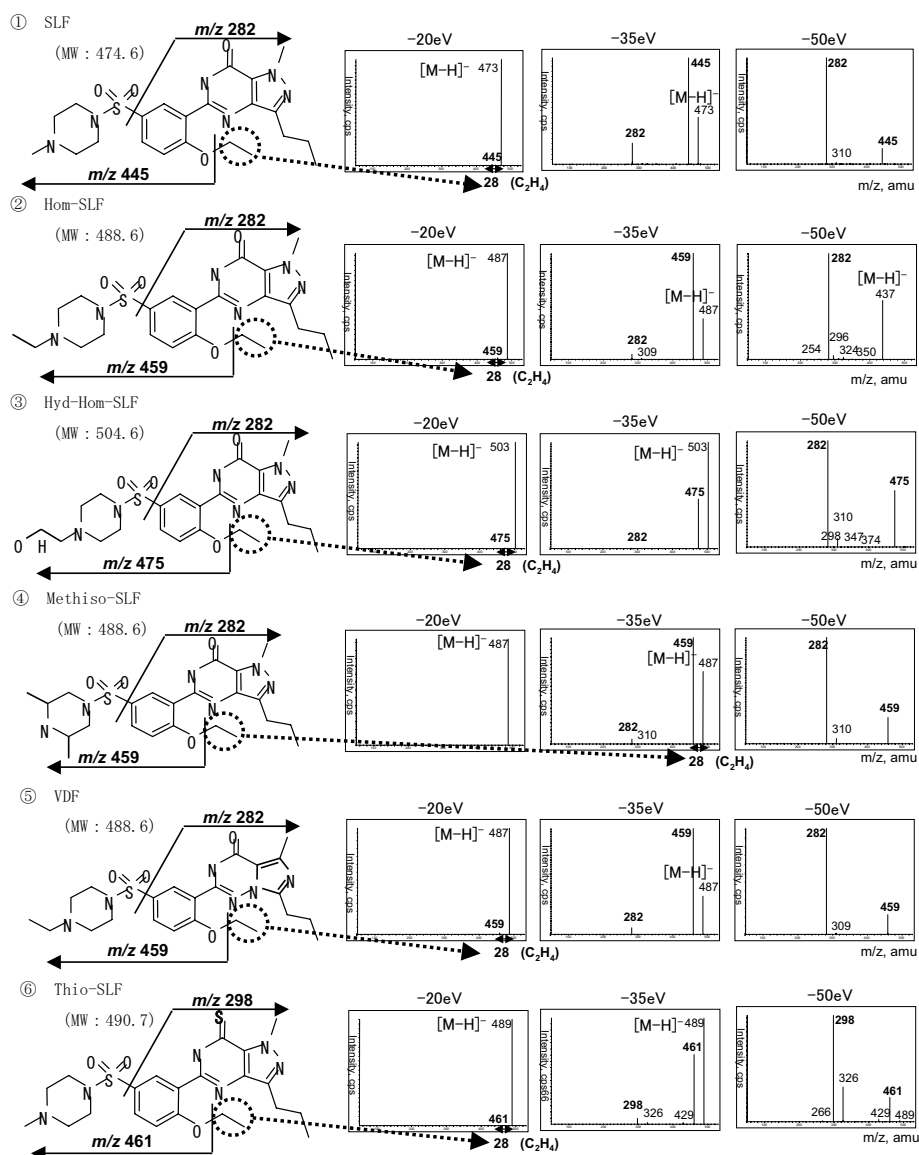


Fig. 1 Structures and Product Ion Spectra (Neg. mode) of Sildenafil and the Analog Compounds  
 ① : Sildenafil, ② : Homosildenafil, ③ : HydroxyHomosildenafil, ④ : Methisosildenafil,  
 ⑤ : Vardenafil, ⑥ : ThioSildenafil

(2) Pos. モード (Fig. 2)

Pos. モードでは, CE の強度が 20 eV 及び 35 eV において各成分の  $[M+H]^+$  イオン (① :  $m/z$  475, ②, ④ 及び⑤ :  $m/z$  489, ③ :  $m/z$  505, ⑥ :  $m/z$  491) が強く観測された。さらに, CE 35 eV において, スルホニル基の両側で開裂し, ピペラジン環に由来すると推察されるイオン及び3環 (⑤)については, イミダゾトリアジン環)に由来すると推察されるイオンがわずかに観測され, CE 50 eV に電圧を上げるとさらに強く観測された。まず, ピペラジン環由来と推察されるイオンについては, メチルピペラジンである①及び⑥は  $m/z$  100, エチルピペラジンである②, ⑤及びジメチルピペラジンである④は  $m/z$  113, ヒドロキシエチルピペラジンである③は

$m/z$  129 が観測された。

続いて, 3環側由来と推察されるイオンについては, ①-④は  $m/z$  311 が観測された。また, イミダゾトリアジン環である⑤は,  $m/z$  312 のイオンが観測された他, イミダゾトリアジン環由来と推察される  $m/z$  151 のイオンも強く観測された。⑥については, Neg. モード同様に3環側のピラゾロピリミジン環の4位がチオカルボニル基であることから, ①-④より16増加した  $m/z$  327 が観測された。

また, 3環側からさらにエチル基が脱離したと推察されるイオン (①-④ :  $m/z$  283, ⑤ :  $m/z$  284, ⑥ :  $m/z$  299) がそれぞれ観測された

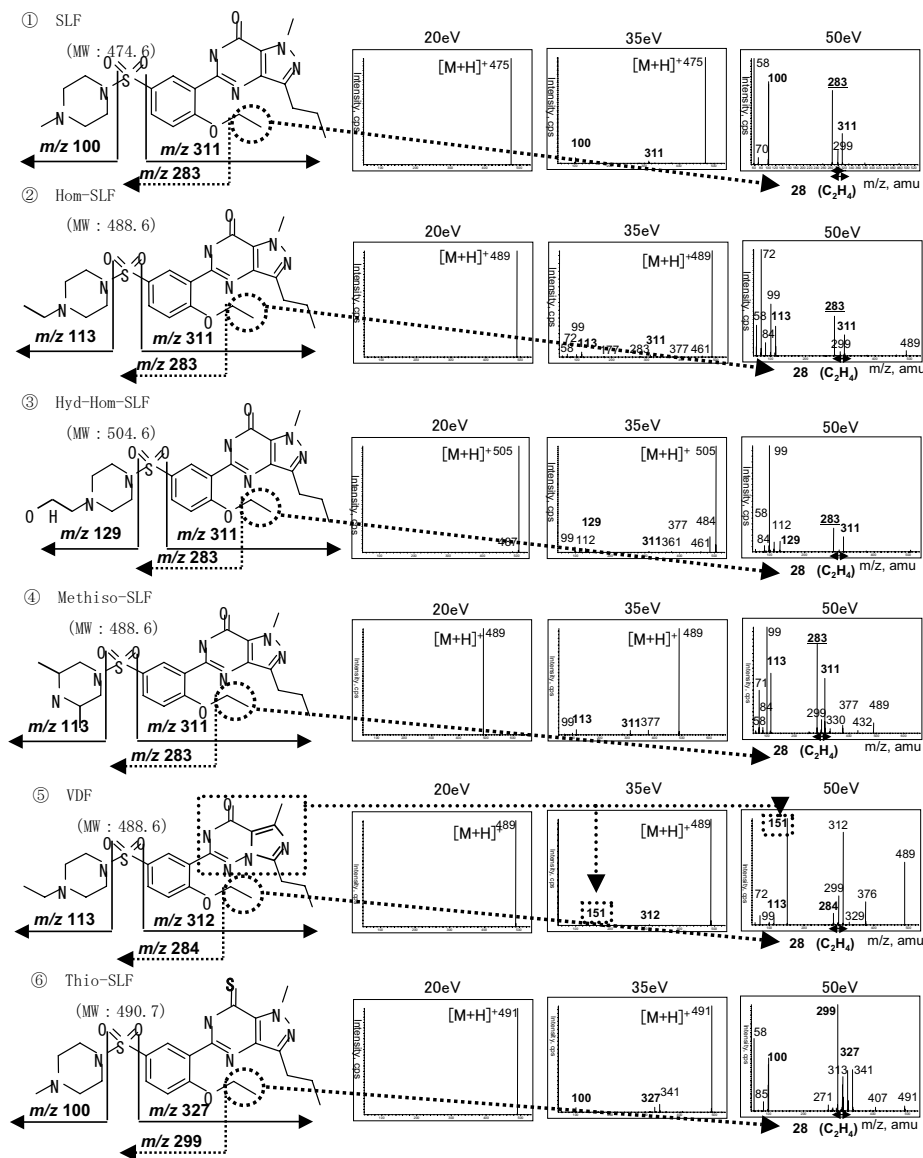


Fig. 2 Structures and Product Ion Spectra (Pos. mode) of Sildenafil and the Analog Compounds  
 ① : Sildenafil, ② : Homosildenafil, ③ : HydroxyHomosildenafil, ④ : Methisosildenafil,  
 ⑤ : Vardenafil, ⑥ : ThioSildenafil

## 2 ホンデナフィル類

① : HDF 及び② : Hyd-HDF の構造は, Fig. 3 に示すとおり, 先の SLF のスルホニル基の部分からカルボニル基 (-C(=O)-) となった構造を有している。

### (1) Neg. モード (Fig. 3)

1 (1) と同様に, CE の強度 20 eV においてそれぞれの [M-H]<sup>-</sup> イオン (① :  $m/z$  465, ② :  $m/z$  481) が観測され, さらに CE の強度を 35 eV に上げると, [M-H]<sup>-</sup> からエチル基が脱離したと推測される, 28 少ないイオン (① :  $m/z$  437, ② :  $m/z$  453) が強く観測された。さらに, カルボニル基のベンゼン環側で開裂して脱離した, 3 環側由来と推察されるイオン  $m/z$  282 がそれぞれ観測された。

これらのイオンは SLF 及びその類似成分と同様であることから, 成分の構造推定の際に注意が必要と思われる。

### (2) Pos. モード (Fig. 4)

CE の強度が 20 eV 及び 35 eV において, 各成分の [M+H]<sup>+</sup> イオン (① :  $m/z$  467, ② :  $m/z$  483) が強く観測された。CE の強度を 50 eV に上げると, カルボニル基を中心に開裂し, 脱離したと推察されるイオンが各種観測された。

まず, カルボニル基のベンゼン環側で開裂した 3 環側由来と推察されるイオン ( $m/z$  311) が観測された。さらに, カルボニル基のピペラジン環側で開裂したと推察されるイオン ( $m/z$  341) 及びカルボニル基の  $\beta$  位で

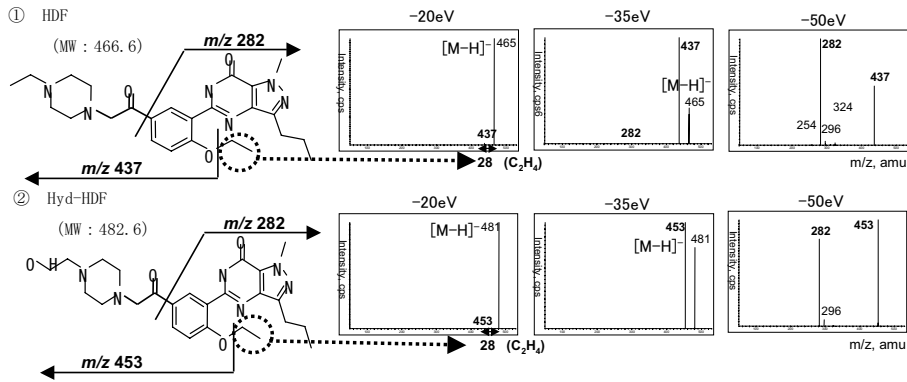


Fig. 3 Structures and Product Ion Spectra (Neg. mode) of Hongdenafil and HydroxyHongdenafil  
① : Hongdenafil, ② : HydroxyHongdenafil

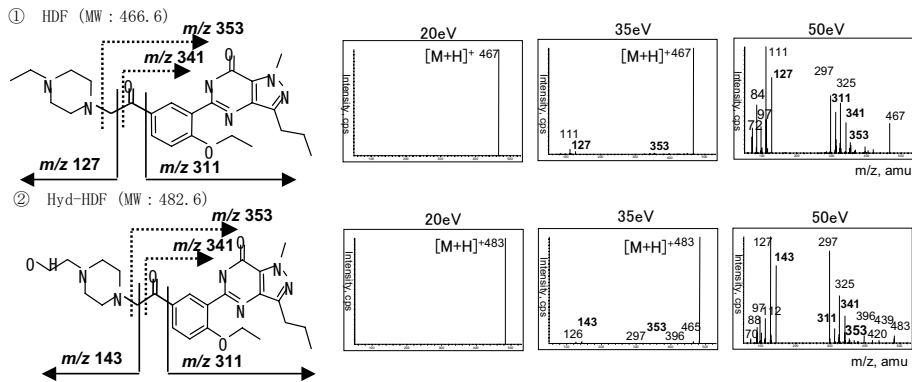


Fig. 4 Structures and Product Ion Spectra (Pos. mode) of Hongdenafil and HydroxyHongdenafil  
① : Hongdenafil, ② : HydroxyHongdenafil

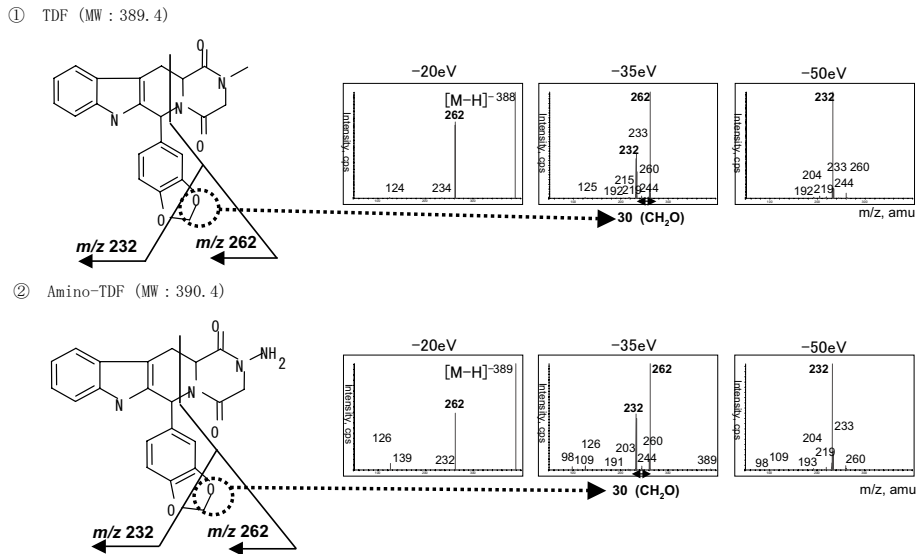


Fig. 5 Structures and Product Ion spectra (Neg. mode) of Tadalafil and Aminotadalafil  
① : Tadalafil, ② : Aminotadalafil

開裂し、先の  $m/z$  341 の部分に炭素 1 個分の 12 増えた  $m/z$  353 のイオンが観測された。また、ピペラジン環由来と推察されるイオンとして、メチルピペラジンである TDF は  $m/z$  127、ヒドロキシエチルピペラジンである Hyd-HDF は  $m/z$  143 と、各構造に応じてそれぞれ観測

された。

### 3 タダラフィル類

Fig. 5 に示すとおり、① : TDF 及び② : Amino-TDF は、ピラジノピリドインドール環 (以下、4 環という.)

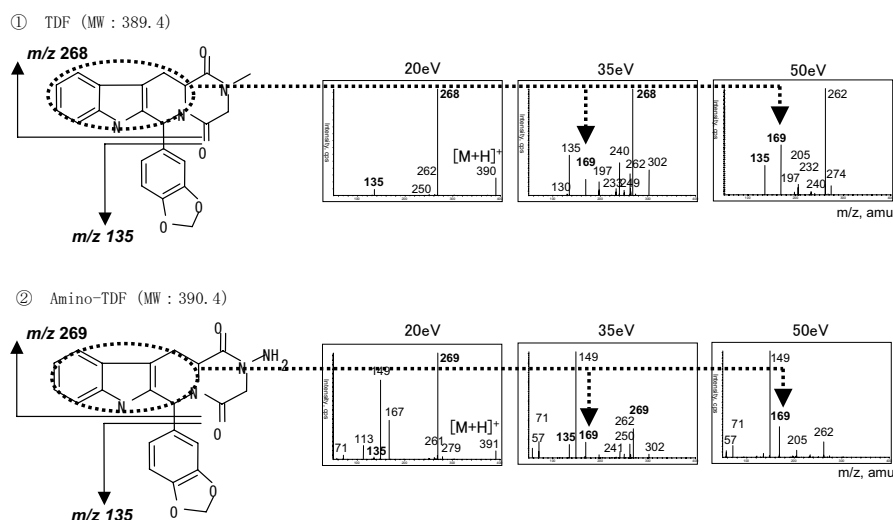


Fig. 6 Structures and Product Ion spectra (Pos. mode) of Tadalafil and Aminotadalafil  
 ①: Tadalafil, ②: Aminotadalafil

とベンゾジオキソールからなる構造を有している。

(1) Neg. モード (Fig. 5)

まず, CEの強度が-20 eVにおいて,  $[M-H]^-$ イオン(①:  $m/z$  388, ②:  $m/z$  389)が観測され, さらに, ピペラジン-2,5-ジオンが脱離したと推察されるイオン  $m/z$  262が認められた。さらに, CEの強度を-35 eV及び-50 eVに上げたところ, 先の  $m/z$  262のイオンからメトキシ基(-OCH<sub>3</sub>)が脱離したと推察される  $m/z$  232のイオンが観測された。

(2) Pos. モード (Fig. 6)

CE 20 eVにおいて各 $[M+H]^+$ イオン(①: $m/z$  390, ②: $m/z$  391)が観測された。さらに, 4環とベンゾジオキソールが結合した部分で開裂し, 4環部分の構造を示すと推察されるイオン(1位のNにメチル基がついたTDF:  $m/z$  268, 1位のNにアミノ基のついたAmino-TDF:  $m/z$  269), 及び, ベンゾジオキソール由来と推察されるイオン  $m/z$  135も観測された。さらに, CE 35 eV及び50 eVにおいて, 4環からピペラジン-2,5-ジオン部分が脱離した, ピリドインドール環 (Fig. 6点線丸部分)に由来すると推察されるイオン  $m/z$  169が観測された。

ま と め

ED治療薬及びその類似成分10成分について, 構造が類似した成分毎にLC-MS/MSにおけるプロダクトイオンスペクトルを解析し, 基本骨格及び置換基に由来すると推定される各イオンの情報を整理することで, 脱離に規則性があることが明らかとなった。

まず, ピペラジン環とエトキシフェニル基が結合したピラゾロピリミジン環 (VDFはイミダゾトリアジン環)

からなる3環をスルフォニル基で結合した構造を有するSLF及びその類似成分については, Neg.モードにおいては,  $[M-H]^-$ イオンの他に, そのイオンからエチル基が脱離したと推察される28少ない各イオン  $[M-H]^- - 28$ 及びスルフォニル基から開裂した3環部分を示す  $m/z$  282(3環側のピラゾロピリミジン環4位がチオカルボニル基であるThio-SLFは  $m/z$  298)のイオンが観測された。

Pos.モードにおいても, スルフォニル基から開裂し, 3環部分を有することを示すイオン ( $m/z$  311及びエチル基が脱離したと推察される  $m/z$  283)が観測された。さらに, アルキル基の種類等が変化したピペラジン環を示す各イオン把握することにより, スルフォニル基の両側の各構造の推定が可能であった。

次にSLFと異なり, ピペラジン環とエトキシフェニル基が結合したピラゾロピリミジン環からなる3環がカルボニル基で結合したHDF及びHyd-HDFについては, Neg.モードにおいては, SLF及びその類似成分と同様のイオンが得られることから, さらに, Pos.モードでスペクトルを測定し, 各構造部分を示すイオンを観測することで構造の推定が可能となると考えられる。

TDF及びAmino-TDFは, Neg.モードにおけるスペクトルで観測される  $m/z$  262及び  $m/z$  232, Pos.モードにおけるスペクトルで観測される  $m/z$  135及び  $m/z$  169の各イオンがTDF及びAmino-TDFであることを推定するのに有用なイオンであり, ピラジノピリドインドール環についてメチル基あるいはアミノ基の推定は, Pos.モードにおけるイオン ( $m/z$  298あるいは  $m/z$  269)を観測することで可能であった。

以上より, 解明した脱離の規則性を応用し, 基本骨格

及び置換基に由来する各イオンを検知することで、ED治療薬の類似成分について、迅速に構造を推定することが可能となった。

今後、このED治療薬及びその類似成分の構造推定手法を用いることにより、成分検査の迅速化が可能となり、健康被害の拡大防止及び未然防止のための情報を、行政側に速やかに提供できると考える。

## 文 献

- [1] 無承認無許可医薬品の指導取締りについて、最終改正平成25年7月10日、薬食発第0710第2号。
- [2] 伊達英代, 寺内正裕, 松尾健. 健康食品中のシルデナフィル, タダラフィルの検出事例. 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告. 2009;17:37-42.
- [3] 伊達英代, 井原紗弥香, 寺内正裕, 新井清, 松尾健. 健康食品中のムタプロデナフィルの検出事例. 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告. 2011;19:21-25.
- [4] 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. 健康食品中に含有さ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. 2011;62:25-39.
- [5] 豊田安基江, 杉村光永, 松尾健, 寺内正裕, 伊達英代, 井原紗弥香, 森田晃祥, 山辺真一, 肥塚加奈江, 藤原美智子他. 相互利用可能なLC/MS/MSスペクトルライブラリ作成のための研究(第1報)ープロダクトイオンスキャンによるMS/MSスペクトル取得条件の検討ー. 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告. 2008;16: 1- 4.