

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：83907  
研究種目：若手研究  
研究期間：2019～2021  
課題番号：19K15782  
研究課題名（和文）高精度タンデム質量分析による健康食品に違法添加された強壮成分の探索・同定法の開発

研究課題名（英文）Development of a screening method for dietary supplements illegally adulterated with PDE-5 inhibitors and their analogues by high resolution tandem mass spectrometry

研究代表者  
館 昌彦（Tachi, Masahiko）  
愛知県衛生研究所・衛生化学部医薬食品研究室・主任研究員

研究者番号：60744274  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：高精度なLC-MS/MS測定とMS/MSスペクトルの類似性に基づく階層的クラスタリングによるPDE-5阻害薬/類似体の迅速かつ信頼性の高いスクリーニング法を開発した。MS/MSスペクトルの階層的クラスタリングは、PDE-5阻害薬/類似体を系統樹上でその特徴的な構造に従ってグループ化することができた。本法は、複雑な試料マトリックスからPDE-5阻害薬の類似体を選択的に発見し、その構造情報を得る能力を有していることが示唆された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

一部の強壮用健康食品は、違法な混入物として勃起不全の治療に用いられるPDE-5阻害薬やそれらに構造が類似する様々な成分が発見されている。今後も新たな類似体の出現が懸念される。本研究で開発した分析法は、既存のPDE-5阻害薬及び類似体のみならず、新たな類似体に対しても迅速にスクリーニングできる方法であることから、違法な製品の早期発見及び摘発に貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have developed a rapid and reliable screening method for PDE-5 inhibitors/analogues using LC-MS/MS with high mass accuracy, followed by hierarchical clustering based on similarity of MS/MS spectra. The MS/MS spectral clustering enabled PDE-5 inhibitors/analogues to group according to their characteristic structures in a dendrogram. Our method has the ability to selectively uncover PDE-5 inhibitor analogues from complex sample matrix and to obtain their structural information.

研究分野：分析化学

キーワード：液体クロマトグラフィータンデム質量分析 ホスホジエステラーゼ-5阻害薬 クラスタ分析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

一部の健康食品には効果を高めようと医薬品成分を違法に添加した製品が見つかり、その摂取による健康被害が多数報告されている。中国製ダイエット食品の事例では、死亡を含め肝障害等の重篤な健康被害が発生しており、その主原因は、既存の医薬品成分の構造を部分的に修飾させた類似成分とされている。このような医薬品成分の基本構造をベースに部分的に構造を修飾させた類似成分は、オリジナルと同様の薬理作用を持つことがあるが、一方で安全性についての評価はされていないことから、人体に及ぼす影響は予測できない。近年、国内で発見される医薬品成分混入事例の中で、特に強壯用健康食品からホスホジエステラーゼ-5 (PDE-5) 阻害薬であるシルデナフィル等の医薬品成分のほか、それらに類似した様々な成分が検出されている(図1)。これらの類似成分もまた健康被害の発生が懸念される。

液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析法(LC-MS/MS)は、化合物の同定能力に優れた分析技術である。本技術は、国をはじめ各自自治体の研究機関において、健康食品中の医薬品成分の分析に用いられており、毎年違法な製品の摘発に貢献している。試料中の違法成分の同定は、あらかじめその成分の標準品の質量スペクトル情報等を取得し、試料の情報と照合させることで行われる。しかし、このような標準品に依存する同定法では、未知の成分には迅速に対応できないという問題点が残されている。

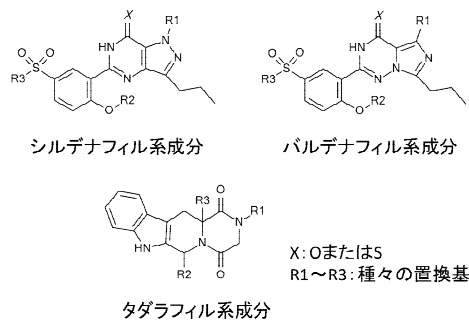


図1 PDE-5 阻害薬の基本構造

### 2. 研究の目的

本研究は、健康食品中に混入される恐れのあるPDE-5阻害薬を迅速かつ高精度に検出できる、タンデム質量分析計を用いたスクリーニング分析法を開発すること、さらには、医薬品成分だけでなく、その構造類似体をも検出可能とするため、PDE-5阻害薬/類似体のMS/MSスペクトルを用いた特異的な探索・同定システムを構築し、実試料に対する有用性を検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 【令和元年度】

PDE-5阻害薬及び類似体は、それらの共通構造に由来するフラグメントイオンの生成により、互いにMS/MSスペクトルが似通っていることが特徴的である[1,2]。このMS/MSスペクトルの類似性に基づく階層的クラスタリングにより、既知PDE-5阻害薬/類似体のMS/MSスペクトルから、未知類似体のスクリーニングと、さらにはその構造がある程度予想できると考えられる(図2)。令和元年度は、これまでに発見されているPDE-5阻害薬/類似体について、厚生労働省や各都道府県が実施した買上調査結果及び各種文献等を調査した。これらの調査をもとにPDE-5阻害薬/類似体の一覧表を作成したのち、本研究に用いる標準物質として40種を選定した。また、液体クロマトグラフィー-四重極-オービトラップ(LC-Q-Orbitrap)型質量分析計Q-Exactive Focusを用いて、標準品40種のLC-MS/MS測定条件及びMS/MSスペクトルのクラスタ分析を検討した。

#### 【令和2年度】

PDE-5阻害薬/類似体を添加されるおそれのある健康食品は、錠剤、カプセル剤、液剤及びハーブ等がある。製品中の含有成分は多様であり、それら成分は夾雑物としてPDE-5阻害薬/類似体のスクリーニング分析を複雑にさせる。実試料に適用するためには、膨大な夾雑物のスペクトルデータをより迅速に処理する方法が必要であ

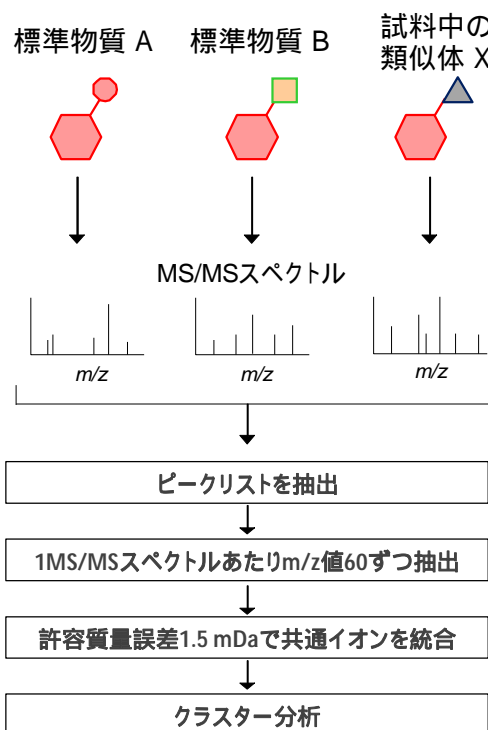


図2 MS/MS スペクトルのクラスタ分析によるPDE-5 阻害剤/類似体のスクリーニング分析

る。そこで、令和2年度は解析の自動化を検討した。スペクトルデータの取り出しには、解析ソフト MS-DIAL を用い、質量分析メーカー各社のデータに対応できるようにした。また、検出化合物間における共通のフラグメントイオンをまとめたフラグメントイオンテーブルの作成は、Microsoft Excel Visual Basic for Applications (VBA) を用いて自動化した[3]。Q-Orbitrap 型質量分析計に加え、四重極-時間飛行 (Q-TOF) 型質量分析計を用いることにより、本法の互換性を検討した。

#### 【令和3年度】

構築した迅速法の有用性を検証するため、上記40種の標準物質とは異なる PDE-5 阻害薬の類似体2種をハーブ試料に添加し、そのメタノール抽出液を LC-MS/MS 測定したのち、図2に示す手順の通り40種の標準物質の LC-MS/MS データと共に階層的クラスタリングを行った。また、オンラインショップで強壯用健康食品（錠剤及びカプセル剤）を購入し、実試料における本法の有用性を検討した。錠剤はブレンダーで粉碎し、カプセル剤はカプセル殻を除去し内容物を回収した。メタノール抽出液を LC-MS/MS 測定したのち、40種の標準物質の LC-MS/MS データと共に階層的クラスタリングを行った。

## 4. 研究成果

### 【令和元年度】

健康食品に添加される PDE-5 阻害薬の多くは、シルデナフィル、タダラフィル及びその類似体である。類似体はオリジナルのものと化学構造が似ていることから、LC 分離において保持時間が近いことが想定される。シルデナフィル、バルデナフィル、タダラフィル及びそれら類似体の標準物質を用いて LC 分離条件を検討した。また、標準物質には、ユニークな構造を持つアバナフィルとキサントアントラフィルも加えた。様々な化合物の分離分析を達成するため、60分と長い LC 分離時間を設定し、移動相には、ギ酸含有アセトニトリル及びギ酸のグラジエント溶出を用いた。その結果、マスクロマトグラム上において40種の標準物質はすべて良好なピークが観察された。

図2に示すように、取得した各 MS/MS スペクトルから、標準物質ごとに強度の高い  $m/z$  値を60ずつ抽出し、質量差 1.5 mDa 以内に観測されたものは、同じフラグメント構造を持つイオンとみなし、統合した。各イオンがどの化合物から検出されたかを示すフラグメントイオンテーブルを作成した。これを基に、化合物間のユークリッド距離を求め、MS/MS スペクトルの類似性に基づいた系統樹を作成した。その結果、アバナフィルとキサントアントラフィルを除く38種の標準物質は、共通構造に基づいて大きく2つのクラスターを形成した。一つ目は、シルデナフィルとバルデナフィル及びそれらの類似体のクラスター、二つ目はタダラフィルとその類似体のクラスターであった。一つ目のクラスターは、さらに部分構造に基づいて、6つのサブクラスターに分かれた。

### 【令和2年度】

MS-DIAL を用いることにより、全成分スペクトルデータの一括出力が可能となり、また、その後のエクセルへのデータ移行性も向上したため、数時間かかる解析を10分程度に短縮することができた。構築した解析方法は、Q-Orbitrap 型及び Q-TOF 型装置で取得したデータに対して使用可能であった。MS/MS スペクトルをクラスター分析することにより PDE-5 阻害薬/類似体の標準物質の系統樹を作成したところ、いずれの装置データにおいても共通構造に基づいてクラスターを形成した。このことから、Q-Orbitrap 型や Q-TOF 型装置等の高分解能な質量分析計であれば、MS/MS スペクトルの類似性に基づいた階層的クラスタリングが可能であることが示唆された。

### 【令和3年度】

ハーブ試料への添加試験では、ハーブ由来夾雑物は標準物質とは異なるグループを形成した。それに対し、添加した PDE-5 阻害薬類似体は、類似構造を持つ標準物質のクラスターに属した。最も近接した標準物質の MS/MS スペクトルとの比較により、添加した類似体の構造推定が容易となった。次に、オンラインショップで試買した強壯用健康食品（錠剤及びカプセル剤）に適用した。その結果、違法な混入物として、錠剤試料から PDE-5 阻害薬のシルデナフィルが、カプセル剤試料からシルデナフィルとタダラフィルが検出された。それら以外に標準物質のクラスター内に属した成分はなかった。以上の結果から、本法は、健康食品中の PDE-5 阻害薬及び類似体の迅速なスクリーニング法としての有用性が示された。

### （参考文献等）

[1] U. Kim et al., *Molecules*, 25, E2734 (2020); [2] X. Ge et al., *Comprehensive Analytical Chemistry Chapter6*, 155-197 (2016); [3] M. Tachi et al., *Mendeley Data*. (2022) <https://data.mendeley.com/datasets/bg3246vf6c/1>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 館昌彦、小林俊也、富田浩嗣、上野英二、今西進、棚橋高志
2. 発表標題 Q-Orbitrap型質量分析計を用いた強壯用健康食品中医薬品成分のスクリーニング法の検討
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	今西 進  (Imanishi susumu)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------