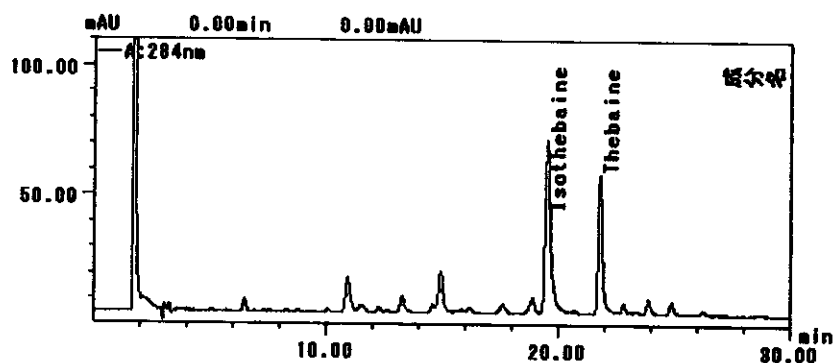
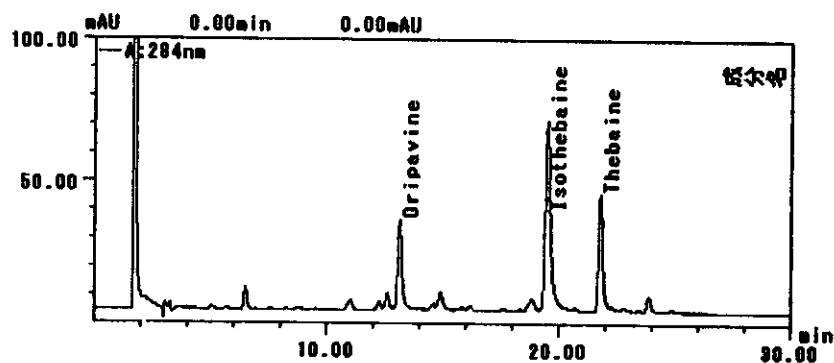
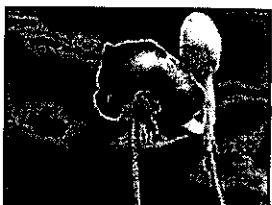


図1. オニゲシ、ハカマオニゲシ及びF1交配種の花の形態と乳液中のアルカロイドのHPLCクロマトグラム その7

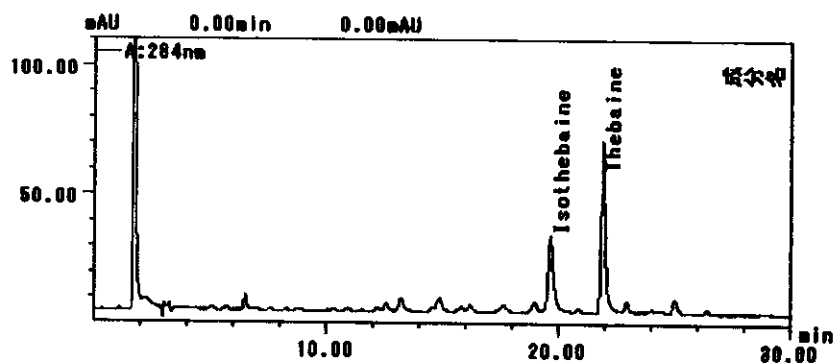
PPOxPB交配種：5-3 PPO x PB-2 導入元：



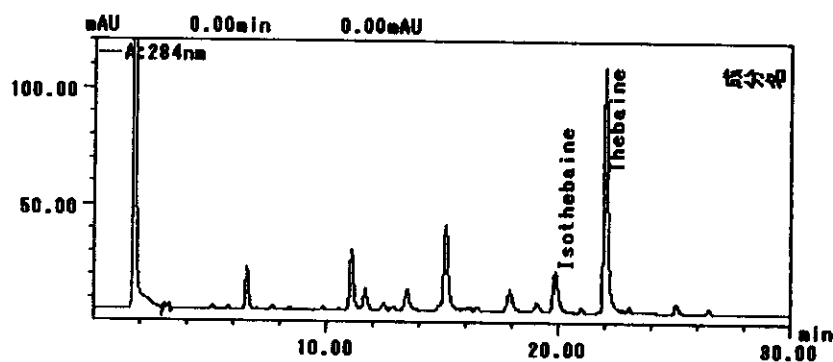
PPOxPB交配種：6-3 PPO x PB 導入元：



PPOxPB自然交配種：2-3 PPO R♂-1 導入元：



PPOxPB自然交配種：5-1 PPO R♂ 導入元：



P. pseudo-orientale の4個体は、花卉に明瞭な濃紫の斑点がある濃橙の4-6枚の花弁の花を持ち、乳液中にはイソテバインが検出された。花の下の苞葉は、あるものが2個体とないものが3個体であった。苞葉のない3個体の内、1個体は乳液中にイソテバインとともにテバインが検出された(130-95 PPO-14)。

P. bracteatum は、2個体とも花の下に苞葉があり、花卉に明瞭な黒紫の斑点がある深紅の4-6枚の花弁の花を持ち、乳液中にはテバインが検出された。

F1 交配種(PB♂ x PPO♀)は、3個体すべての花の下に苞葉が認められ、花卉に明瞭な黒紫の斑点がある朱の6枚の花弁の花を持ち、乳液中にはイソテバインとテバインが検出された。一方、F1 交配種(PPO♀ x PB♂)は、8個体のうち、花の下に苞葉があるものが3個体で、ないものが5個体であった。黒紫-紫の斑点がある濃橙-朱の4-6枚の花弁を持ち、乳液中にはテバインとオリバピンが検出された。また、1個体の乳液中には、さらにオリバピンが検出された(6-3 PPO x PB)。

乳液中のアルカロイドを TLC 分析した結果、HPLC での分析結果とほぼ一致した(図 2)。

4) ケシ、オニゲシおよびセリバオウレンの不定胚誘導

ケシ、オニゲシとも植え付け切片のすべてにおいてカルス形成が認められ、これらのカルスを植物ホルモン無添加培地に移植することにより、不定胚を形成しながら増殖・分化する培養系を確立した。さらに、発芽した不定胚を 20℃、14 時間照明下で培養することにより、植物体の再生が認められた。オウレンでは、植え

付け切片にカルスおよび不定根が形成し、さらに同条件で培養することにより不定胚培養を確立した。ケシと同様に、不定胚から発芽した個体は、20℃、14 時間照明下で培養することにより、植物体の再生が認められた。

D. 考察

前年度に引き続き、オニゲシ、ハカマオニゲシの形態とアルカロイドを調べるとともに、筑波試験場で育成されたオニゲシとハカマオニゲシ F1 交配種の形態とアルカロイドを調べた。

今回観察した *P. orientale* は、学名 *P. orientale* として種子交換により外国から導入し、播種して栽培したものである。花の形態もアルカロイドパターンも他の *P. orientale* と異なっていた植物は、混入した雑種であると考えられる。

今回観察した *P. pseudo-orientale* は、筑波で保存栽培を行っている系統(交配親)と外国から種子導入し、文献記載 3) に従って筑波試験場で同定された3種の外国系統を用いた 2)。外国から種子導入した植物はすべて導入元での学名が異なっており、各々の導入時の学名は、488-90 PPO 及び 130-95 PPO は *P. orientale*、204-92 PPO は *P. bracteatum* であった。

P. bracteatum は筑波で保存栽培を行っている系統(ドイツ産、交配親)とチェコスロバキアから種子導入し文献記載 3) に従って筑波試験場で同定された系統(14-95 PB)用いた。*P. pseudo-orientale* と同様に、導入元での学名の混乱があり、14-95 PB の導入時の学名は *P. pseudo-orientale* であった。

以上のように、外国の植物園において

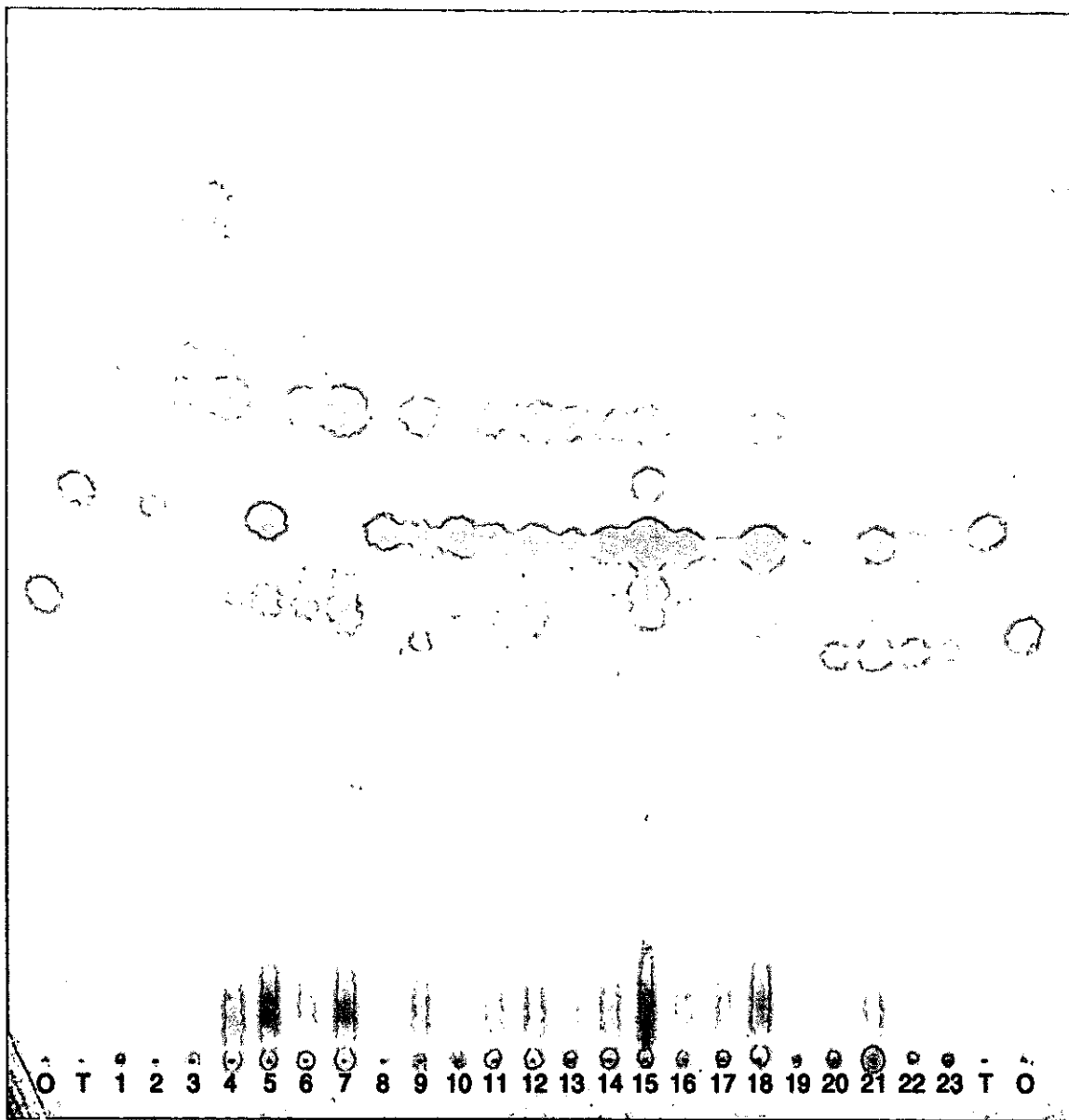


図2. オニゲシ、ハカマオニゲシ及びF1交配種乳液のTLCクロマトグラム
(検出: ドラーゲンドルフ試液)

O:Oripavine、T:Thebaine、1:*Papaver pseudo-orientale*(130-95 PPO-14)、2:*Papaver bracteatum*(14-95 PB-11)、3:*Papaver pseudo-orientale*(2-5 PPO ♂ Self -1)、4:*Papaver pseudo-orientale*(2-5 PPO ♂ Self -2)、5:PPO x PB 自然交配種(5-1 PPO R♂)、6:*Papaver pseudo-orientale*(90-488 PPO)、7:*Papaver pseudo-orientale*(204-92 PPO)、8:*Papaver bracteatum*(1-4 PB-7)、9:PPO x PB 交配種(6-3 PPO x PB)、10:PB x PPO 交配種(1-1 PB x PPO-1)、11:PB x PPO 交配種(1-1 PB x PPO-8)、12:PB x PPO 交配種(1-2 PB x PPO-9)、13:PPO x PB 交配種(5-3 PPO x PB-2)、14:PPO x PB 交配種(2-3 PPO x PB-1)、15:PPO x PB 交配種(2-3 PPO x PB-2)、16:PPO x PB 交配種(2-3 PPO x PB-3)、17:PPO x PB 交配種(2-3 PPO x PB-4)、18:PPO x PB 交配種(2-3 PPO x PB-5)、19:*Papaver orientale*(13-95-O-2)、20:*Papaver orientale*(13-95-O-13)、21:*Papaver orientale*(13-95-O-21)、22:*Papaver orientale*(13-95-O-25)、23:*Papaver orientale*(13-95-O-27)

もこれら3種の植物の分類には混乱が生じており、同ロットで導入された種子においても多様な植物が出現する要因のひとつになっていると思われる。

P. bracteatum と *P. pseudo-orientale* の交配種の花は変化に富んでおり、形態的に片親と区別するのは困難であった。しかし、すべての植物の乳液においてテバインとイソテバインが検出されることで、両者との区別が可能であった。

ケシ、オニゲシ、セリバオウレンの遺伝子組換え技術はこれまでほとんど報告されていない。これらの植物について不定胚を経由する植物再生系を確立し、これらの植物の遺伝子組換えの基盤技術を確立した。

E. 結論

オニゲシ、ハカマオニゲシおよびオニゲシとハカマオニゲシの F1 交配種の形態とアルカロイドを調べ、特徴一覧を作成するとともに、データベースを作成した。また、ケシ、オニゲシ遺伝子組換えの基礎となる不定胚培養系を確立した。

F. 研究発表

1. 吉松嘉代、士反伸和、佐藤文彦、矢崎一史：物質輸送エンジニアリングによる新規有用植物の育種 1. 遺伝子組換えオウレンの作出、第21回日本植物細胞分子生物学会香川大会・シンポジウム(2003.8.7).
2. 熊谷健夫、畠山好雄、吉松嘉代、下村講一郎：アヘンの収量および収量構成要素に及ぼす肥料の影響、国立医薬品食品衛生研究所報告、No.121、12-15、2003.
3. 吉松嘉代、柴田敏郎、木内文之、飯田

修、関田節子、牧野由紀子：ケシ属植物の形態とアルカロイド、日本薬学会第124年会(2004年3月).

4. 士反伸和、吉松嘉代、佐藤文彦、矢崎一史：オウレン形質転換体を用いた CjMDR1 の機能解析、日本植物生理学会2004年度年会(2004年3月).

G. 参考文献

1. Levy A. and Milo J. Genetics and Breeding of *Papaver somniferum*. in Bernáth J. ed "Poppy The Genus *Papaver*" Medicinal and aromatic plants-industrial profiles, Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 4. 93-103 (1998).
2. Shoyama Y., Kawachi F., Tanaka H., Nakai R., Shibata T. and Nishi K. Genetic and alkaloid analysis of *Papaver* species and their F1 hybrid by RAPD, HPLC and ELISA. *Forensic Science International* 91 207-217 (1998).
3. Goldblatt P. Biosystematic studies in *Papaver* section *Oxiton*a, *Ann. Missouri Bot. Gard.* 61 264-270 (1974).

研究協力報告書

ケシ属植物におけるアルカロイド生産能解析の分子基盤

研究協力者 佐藤 文彦 京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学専攻 教授

研究要旨 本研究はケシ属植物におけるアルカロイド生合成酵素の発現とそのアルカロイド生産性の相関を解析し、アルカロイド生産性の指標としての生合成酵素の有用性を評価し、さらに、その生合成遺伝子の多様性について分子生物学的に解析を進め、ケシ属植物のアルカロイド生産能解析のための基盤的知見を得ることを目的としている。本年度は、ファイトトロンおよび組織培養で栽培したケシ (*Papaver somniferum*)、オニゲシ (*P. orientale*) からタンパク質を抽出し、イムノプロットによるイソキノリンアルカロイド生合成酵素の 1 種である 3'-hydroxy-N-methylcoclaurine 4'-O-methyltransferase (4'OMT) の検出を行った。また、オニゲシにおけるアルカロイド生合成遺伝子の単離を目的に、norcoclaurine 6-O-methyltransferase の部分配列を PCR により増幅し、配列を決定した。

A. 研究の目的

ケシから得られ鎮痛剤として利用されるモルヒネは重要な医学的価値をもつ。しかし、その生産は粗放な栽培に依存しており、乱用薬物ヘロイン製造原料としてのケシ不正栽培の起因となっている。ケシは世界各地で栽培され、形態やアルカロイド含量及び組成が異なるものがあることが知られている。また、テバイン製造原料となるハカマオニゲシ (*P. bracteatum*) は、園芸用に栽培されている同属植物と外見的判別が困難である。本研究は、ケシのアルカロイド生合成制御機構を解明し、生産機能を分子生物学的に解析するための基盤として、ケシにおける生産能の多様性を明らかとし、ケシアルカロイド生産能解析のための基礎的知見を得ることを目的としている。このような基礎的知見の確立により、極微量の植物試料から植物種あるいは品種を特定できる判別法が確立できるものと期

待できる。

B. 研究方法

1) 材料植物

筑波試験場ファイトトロン内で栽培したケシ [*Papaver somniferum* L.、一貫種およびオーストラリア産 3 種 (No.3、9、12)]、オニゲシ (*P. orientale* L.、POL2)、植物ホルモン無添加 MS 固形培地、20°C、14 時間照明下で組織培養しているケシシート培養を用いた。また、対照群として、オウレン細胞培養 (高ベルベリン生産株)、同圃場栽培株およびハナビシソウ培養細胞を用いた。

2) イムノプロット

材料植物より、簡便法によりタンパク質を抽出後、SDS-PAGE によりタンパク質を分離し、抗 4'OMT (オウレン培養細胞由来) 抗体を用いた同酵素タンパク質の検出を行った。

3) オニゲシのアルカロイド生合成遺伝

子の単離

材料植物より、常法によりゲノム DNA を単離し、既に報告されているケシの *norcoclaurine 6-O-methyltransferase* の配列を元に設計したプライマーを用いて PCR 増幅したのち、pT7blue ベクターにサブクローニングし、塩基配列決定を行なった。

C. 研究結果

ケシが生産するモルヒネの生合成系は、多くのイソキノリンアルカロイドと同様に 2 分子のチロシンから合成されるノルコクラウリンを出発分子としており、図 1 に示すような経路でレチクリンを経て合成される。そこで、すでにオウレン細胞培養から単離したイソキノリンアルカロイド生合成酵素(研究発表 1, 2)を用い、ケシにおける酵素の発現解析を試みた。

ケシ(*P.somniferum*)の植物体あるいはシュート培養物、ならびにオニゲシ(*P.orientale*)植物体よりタンパク質を抽出し、SDS-PAGE により分離したところ、オウレン細胞培養と同程度のタンパク質の分離が認められた(図 2)。しかし、オウレン細胞培養における検出と同様に、抗 4'OMT 抗体を用いた同酵素タンパク質の免疫化学的検出をおこなったが、シグナルを検出することができなかった。

そこで、オニゲシ植物体、オウレン植物体ならびに培養細胞を材料として、再度タンパク質抽出を行ない、4'OMT の検出を行なった。その結果、図 3 に示すように、微かに、オニゲシ植物体で、オウレンとほぼ同一の分子量を示すタンパク質バンドを検出した。

また、ケシ科のハナビシソウ培養細胞を用いてアルカロイド含量と 4'OMT の

発現を解析した。その結果、4'OMT タンパク質量とアルカロイドの生産性の相関は低いことが判明した。

ところで、ケシにおいては、オウレンの遺伝子配列をもとに、その生合成酵素遺伝子単離されてきた(参考論文 1)。そこで、ケシの *norcoclaurine 6-O-methyltransferase* 遺伝子情報をもとに、そのオニゲシ相同遺伝子の単離を PCR 法により試みた。その結果、未だ、予備的ではあるが、ケシとは異なる部分配列をもつ断片が単離されてきた。この配列がオニゲシの *norcoclaurine 6-O-methyltransferase* であるのか、またオニゲシの分子マーカーとして有効であるかは、今後の解析が必要であるが、ケシとオニゲシの遺伝的分化を示すものではないかと期待している。

D. 考察

ケシに特異的なモルフィナン型アルカロイドとオウレンが生産するプロトベルリン型アルカロイドの生合成経路は、前半の生合成経路が共通である。そこで、生合成系の前半の重要酵素であるオウレン由来の 3'hydroxy-N-methylcoclaurine 4'-O-methyltransferase(4'OMT)に対して作製している抗体を用い、ケシ属植物における酵素の発現解析を試みた。

しかし、オウレン培養細胞にくらべ、オニゲシならびにオウレン植物体における 4'OMT タンパク質の存在量は極めて限られており、抗体を用いた検出は困難と考えられた。

本実験と平行して、ケシ科のハナビシソウ培養細胞を用いてアルカロイド含量と 4'OMT の発現を解析した結果、4'OMT タンパク質量とアルカロイド生産性の相関

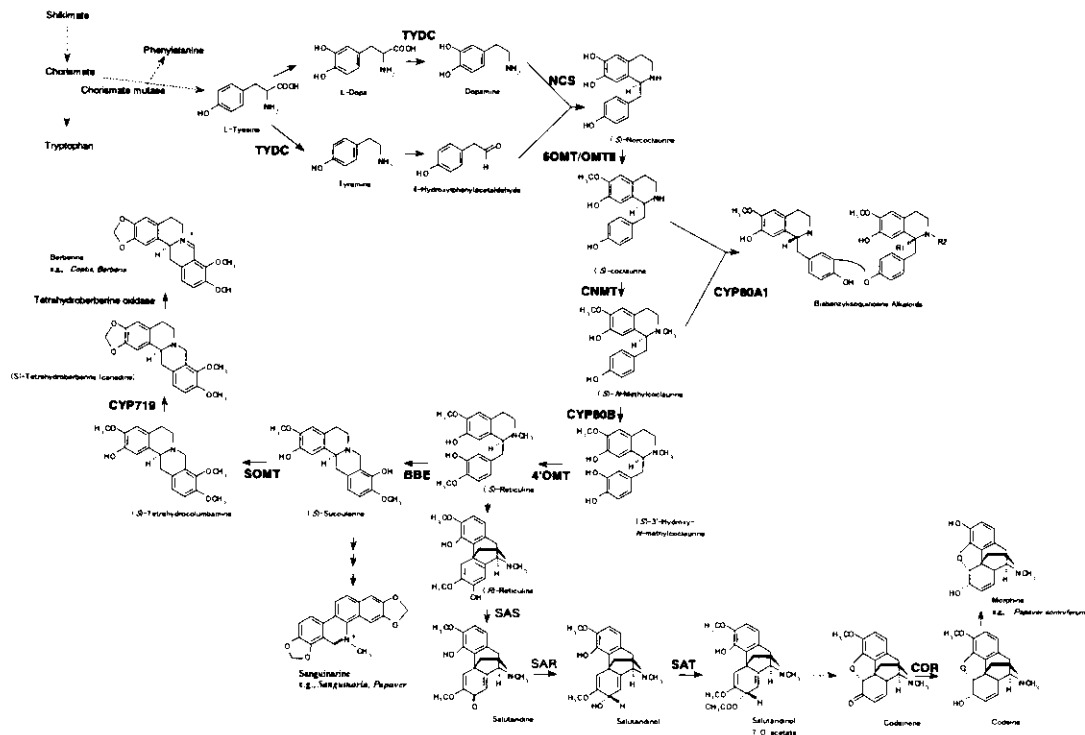


図1 イソキノリンアルカロイド生合成系

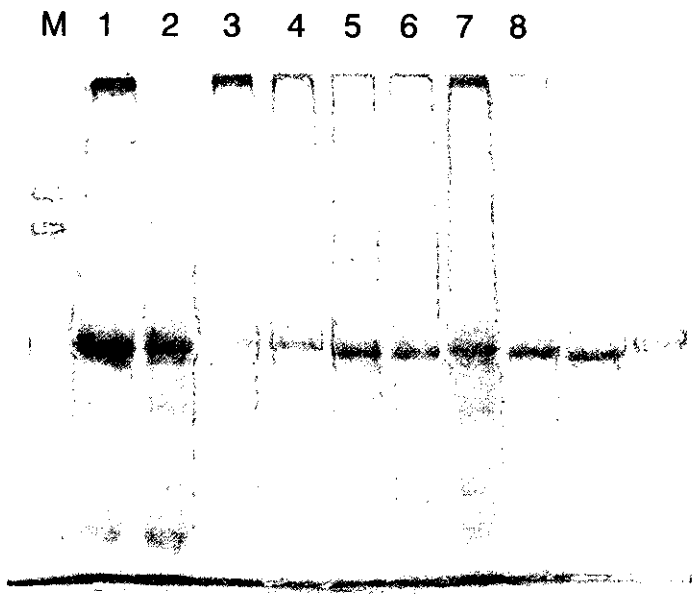


図2 ケシ植物体ならびにシュート培養物からのタンパク質分析
M; 分子量マーカー、1; ケシ#9-1 植物体、 2; ケシ#9-2 植物体、
3; ケシ#12-1 植物体、 4; ケシ#12-2 植物体、5; ケシ#9 シュート培養物、
6; ケシ#12 シュート培養物、7; ケシ#3 シュート培養物、8; ケシー貫種シュート

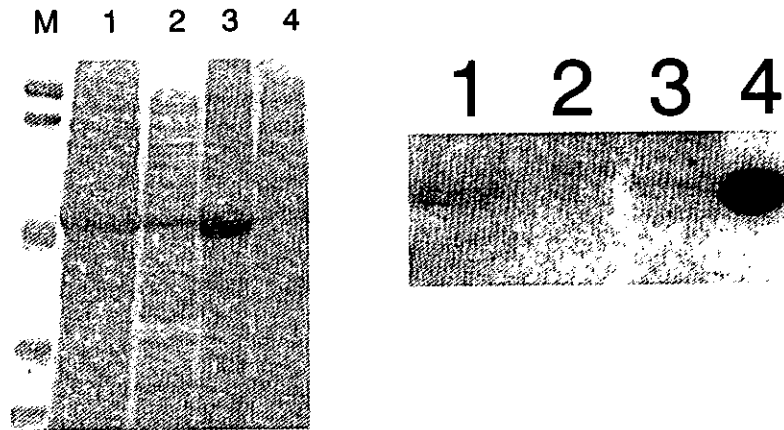


図3 オニゲシならびにオウレン植物体のタンパク質の SDS-PAGE 分析ならびにイムノプロット分析

M; 分子量マーカー, 1; オニゲシ植物体, 2; オウレン茎, 3; オウレン葉, 4; オウレン培養細胞

は低いことが判明した。このことは、必ずしも、アルカロイド生合成系すべてが同様に活性化され、アルカロイド生合成に寄与しているわけではなく、律速段階があることが示唆された。

本研究とは、別の実験から、ハナビシソウのアルカロイド生合成系では 4'OMT よりも前段階になる norcoclaurine 6-O-methyltransferase が律速していることが明らかになりつつある。従って、今後は、同遺伝子を対象として、生合成系遺伝子の発現と生合成活性の相関を解析することが望ましいと考えられる。

最近、Facchini¹⁾のグループにより、オウレンの遺伝子情報を元に、ケシの生合成遺伝子が単離されていることから、これらの遺伝子情報を元に、ケシ属植物における相同配列を PCR により増幅し、その塩基配列を決定することを試みた。その結果、ケシとオニゲシでその共通する生合成酵素 norcoclaurine 6-O-methyltransferase と想定される遺伝子配列が単離され、その配列に違いがあったことよ

り、これら2種間で遺伝的分化が生じていることが示唆された。今後、その確認をすすめるとともに、さらに多くの生合成遺伝子を単離し、比較解析していきたいと考えている。

E. 結論

ケシのアルカロイド生産能解析の分子基盤のための基盤的知見を得ることを目的に、ケシ、オニゲシよりタンパク質を抽出し、イムノプロットによるイソキノリンアルカロイド生合成酵素の1種である 3'-hydroxy-N-methylcoclaurine 4'-O-methyltransferase (4'OMT)の検出を行った。その結果、オウレン由来の抗 4'OMT 抗体を用いたイムノプロットではケシの 4'OMT を検出するのが困難であることが判明した。一方、ケシの遺伝子配列をもとに、オニゲシの相同遺伝子の部分配列を単離し、これら植物種間で塩基配列の違いが存在することを示唆する結果を得た。

F. 研究発表

1. Sato, F., Secondary metabolites and biotechnology in plants, in "Agrobiotechnology and Plant Tissue Culture", ed. S.S.Bhojwani and W.-Y. Soh, Science Pub. Inc., Enfield (NH), USA, ISBN 1-57808-243-9, pp97-104 (2003).
2. Ikezawa N, Tanaka M, Nagayoshi M, Shinkyo R, Sakaki T, Inouye K, Sato F., Molecular cloning and characterization of CYP719, a methylenedioxy bridge-forming enzyme that belongs to a novel P450 family, from cultured *Coptis japonica* cells. *J Biol Chem.* **278** 38557-65 (2003)
3. 乾貴幸、藤井名苗、田村健一、森重敬、佐藤文彦、オウレン 6OMT 遺伝子の導入によるハナビシソウアルカロイド合成系の活性化、2004 年度日本農芸化学会大会

G. 参考論文

1. Facchini, P.J., Park, S.U., Developmental and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry.* **64** 177-86 (2003).

分担研究報告書

8. 毛髪を中心とした生体試料中乱用薬物分析に関する研究 —新規麻薬指定3薬物(BZP, TFMPP 及びアミネプチン)の分析法に関する研究—

分担研究者 花尻 瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

研究要旨 1-ベンジルピペラジン(BZP)及び1-(3-トリフルオロメチルフェニル)ピペラジン(TFMPP)は、近年欧米を中心にアンフェタミン系薬物の代用品として乱用が報告されているピペラジン系薬物である。一方、アミネプチンはもともと三環系抗うつ薬として開発された薬物であるが、欧州等で依存や乱用が報告されており、国連では向精神薬に関する条約(平成2年条約第7号)第2条第7項の規定に基づき同条約の付表IIに追加している。日本においてもこれら3薬物は、平成15年10月施行の政令第415号により新たに麻薬として指定され、所持・売買・使用が厳しく規制されるようになった。今回は、上記3薬物について、呈色反応、TLC、UV、IR、NMR、LC-MS、GC-MSによる分析法を検討した。また、他の代表的ピペラジン系薬物もしくは三環系抗うつ薬との識別法も併せて検討した。

A. 研究目的

ピペラジン誘導体は新たなデザイナーズドラッグとして、欧米を中心に近年乱用されはじめた化合物である。ピペラジン誘導体の中でも、N-benzylpiperazine (BZP) は N-(3-trifluoromethylphenyl) piperazine (TFMPP) と共に最もポピュラーな薬物のひとつであり、米国内でも MDMA が疑われ押収された錠剤中からこれらの薬物が検出される例が散見している。一方、Amineptine は三環系抗うつ薬として、フランスの製薬会社により開発された薬物である。基本的には選択的なドパミンの再取り込み阻害による中枢神経興奮作用を示す。抗うつ作用は、他の三環系抗うつ剤と同様であるが、薬効が早く、耐性を生じやすい。ヨーロッパやアジア諸国では、アミネプチンによる依存症や乱用例が報告され問題となった。またその他にも、副作用として重篤な肝

臓障害が報告されている。国連では向精神薬に関する条約(平成2年条約第7号)第2条第7項の規定に基づき同条約の付表IIに追加している。日本においても、これら3薬物は、平成15年10月施行の政令第415号により新たに麻薬として指定され、所持・売買・使用が厳しく規制されるようになった。そのため、今後、これら薬物の鑑定嘱託が増加する可能性が考えられる。そこで今回は、薬物鑑定を行う際に有用な化学的情報を提供することを目的とし、新規麻薬指定3薬物について、呈色反応、TLC、IR、NMR、LC-MS、GC-MSによる各種分析法を検討した。また又は日本で市販されている代表的三環系抗うつ薬との識別法も併せて検討した。

B. 研究方法

1. 標準試料

A) ピペラジン系薬物 (図 1)

1-Benzylpiperazine (BZP), 1-(3-Trifluoromethylphenyl)piperazine (TFMPP) 塩酸塩,
1-(3-Chloro phenyl)piperazine (3CPP) 塩酸塩,
1-(4-Methoxyphenyl)piperazine (4MPP) 塩酸塩

各 0.1 mg/mL メタノール溶液

B) 三環系薬物 (図 2)

錠剤 (1錠中アミネプチン塩酸塩 100 mg 含有) より再結晶した Amineptine 塩酸塩及びその他の三環系抗うつ薬 (Carbamazepine, Desipramine, Imipramine, Nortriptyline, Amitriptyline, Trimipramine, Clomipramine)

各 0.1 mg/mL メタノール溶液

なお、Amineptine に関しては、以下の通り錠剤から抽出し再結晶したものについて各試験を行った。

- 1) 錠剤 1錠を乳鉢で細かく碎き、50mM リン酸緩衝液 (pH 8.5) 100mL に溶解し、酢酸エチル 100mL で 3 回抽出を行う。
- 2) 抽出液を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水を行った後、蒸発乾固して希塩酸により再結晶を行う。

2. 分析法

各測定は以下の通り行った。

1) NMR

各薬物 5 mg を重メタノール 0.6 mL に溶解し、¹H NMR を測定した。(ECA500, JEOL)

2) IR

日本薬局方 14 局一般試験法に従い、BZP は KBr 錠、その他の薬物の塩酸塩は KCl 錠で測定した。(SPX200, JEOL)

3) UV

各メタノール溶液を測定した。(BZP (1→4000)、TFMPP 塩酸塩 (1→10000)、アミネプチン塩酸塩 (1→5000))

(UV2100PC, Shimadzu)

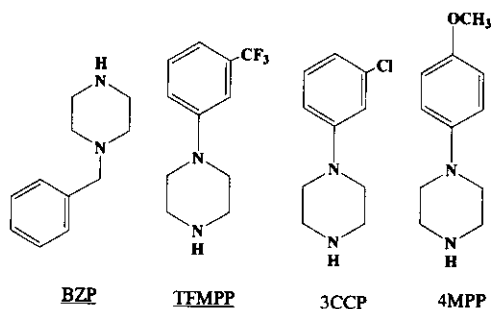


図 1 ピペラジン系薬物の構造

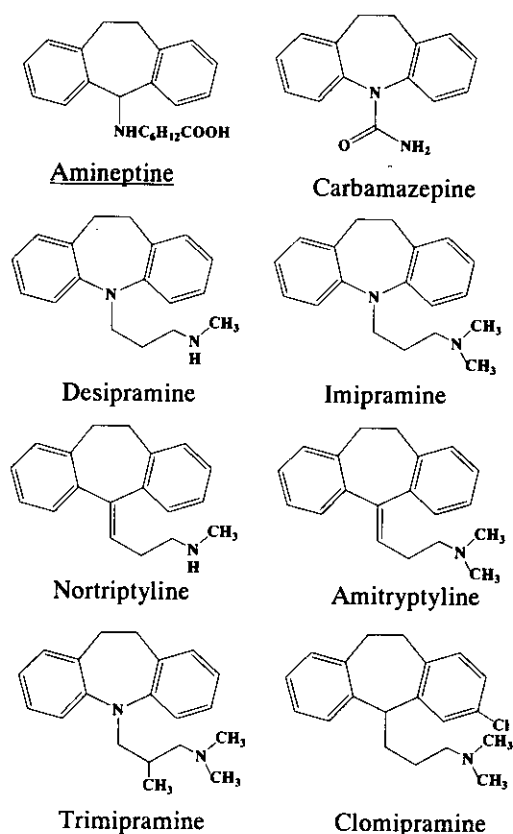


図 2 Amineptine 及び三環系抗うつ薬の構造

4) 呈色試薬

シモン試薬、ドラーゲンドルフ試薬、マルキス試薬、エールリッヒ試薬、スコット試薬は日本薬学会編・薬毒物化学試験試験法に従いそれぞれ調製した。

5) TLC

プレート：けい光剤入シリカゲルプレート

展開溶媒：

i) CHCl_3 : CH_3OH : 28 % NH_4OH aq

(90 : 10 : 0.7)

ii) 酢酸エチル : CH_3OH : 28% NH_4OH aq

(50 : 50 : 1)

iii) CH_3OH : 28% NH_4OH aq (100 : 1.5)

検出試薬：ヨウ化白金酸カリウム試液

6) LC-MS

A) ピペラジン系薬物の一斉分析

カラム：Atlantis (2.1x150mm, 5 μm , Waters)

移動相：Acetonitrile : 10 mM Ammonium

Formate (pH 3.5)

10:90(0-3min)-25%/12min-35:65(15min)

流速：0.3 mL/min、カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$ 、

注入量：5 μL

イオン化法：ESI法 (ポジティブモード)

Fragmentor Voltage : 120 V, Capillary

Voltage : 3500 V, Drying Gas Flow : 13

mL/min, Nebulizer Pressure : 50 psi,

Drying Gas Temp. : 350 $^{\circ}\text{C}$

B) 三環系薬物の一斉分析

カラム：Atlantis (2.1x150mm, 5 μm , Waters)

移動相：Acetonitrile : 10mM Ammonium

Formate (pH 4) 30 : 70

流速：0.3 mL/min、カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

注入量：5 μL

イオン化法：ESI法 (ポジティブモード)

Fragmentor Voltage : 90 V, Capillary

Voltage : 3500 V, Drying Gas Flow : 12

mL/min, Nebulizer Pressure : 50 psi,

Drying Gas Temp. : 325 $^{\circ}\text{C}$

7) GC-MS

A)ピペラジン系薬物の一斉分析

カラム：DB5-MS (30 m x 0.25 mm i.d.,

0.25 μm , J&W Scientific)

カラム温度：100 $^{\circ}\text{C}$ (1 min hold) - 12 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$

- 280 $^{\circ}\text{C}$ (5 min hold) (非誘導体)

100 $^{\circ}\text{C}$ (1 min hold) - 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ - 180 $^{\circ}\text{C}$

(5min hold) - 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ - 280 $^{\circ}\text{C}$

(TFA 誘導体)

キャリアーガス：He, 1 mL/min

注入量：1 μL 、注入口温度：200 $^{\circ}\text{C}$, Splitless

検出器温度：280 $^{\circ}\text{C}$

イオン化法：EI法

トリフルオロアセチル (TFA) 誘導体化：

溶媒を蒸乾固した試料にトリフルオロ酢

酸無水物 100 μL 及び酢酸エチル 100 μL

を加え 60 $^{\circ}\text{C}$ で 20 分間加温する。その後

過剰の試薬を窒素気流下で除き、酢酸エ

チル 100 μL に溶解して、分析試料とする。

B) 三環系薬物の一斉分析

カラム：DB5-MS (30 m x 0.25 mm i.d.,

0.25 μm , J&W Scientific)

カラム温度：150 $^{\circ}\text{C}$ (1 min hold) - 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ -

220 $^{\circ}\text{C}$ (3 min hold) - 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ -

280 $^{\circ}\text{C}$ (10 min hold)

キャリアーガス：He, 1 mL/min、

注入量：1 μL 、注入口温度：250 $^{\circ}\text{C}$, Splitless

検出器温度：280 $^{\circ}\text{C}$

イオン化法：EI法

トリメチルシリル (TMS) 誘導体化：

溶媒を蒸乾固した試料に TMS 誘導体化

剤 (N,O-Bis(trimethylsilyl)-

trifluoroacetamide + 1% Trimethylchloro

silane) 100 μL を加え、90 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間加

温し、分析試料とする。

C. 研究結果及び考察

1. NMR, IR 及び UV

今回測定した3薬物の NMR(図 3)、UV(図

4) 及び IR (図 5) の各スペクトルを示す。

2. 呈色反応及び TLC

各薬物の代表的な呈色試薬との反応を表

1 に、また 3 種類の展開溶媒による TLC

の R_f 値を表 2 にそれぞれ示した。

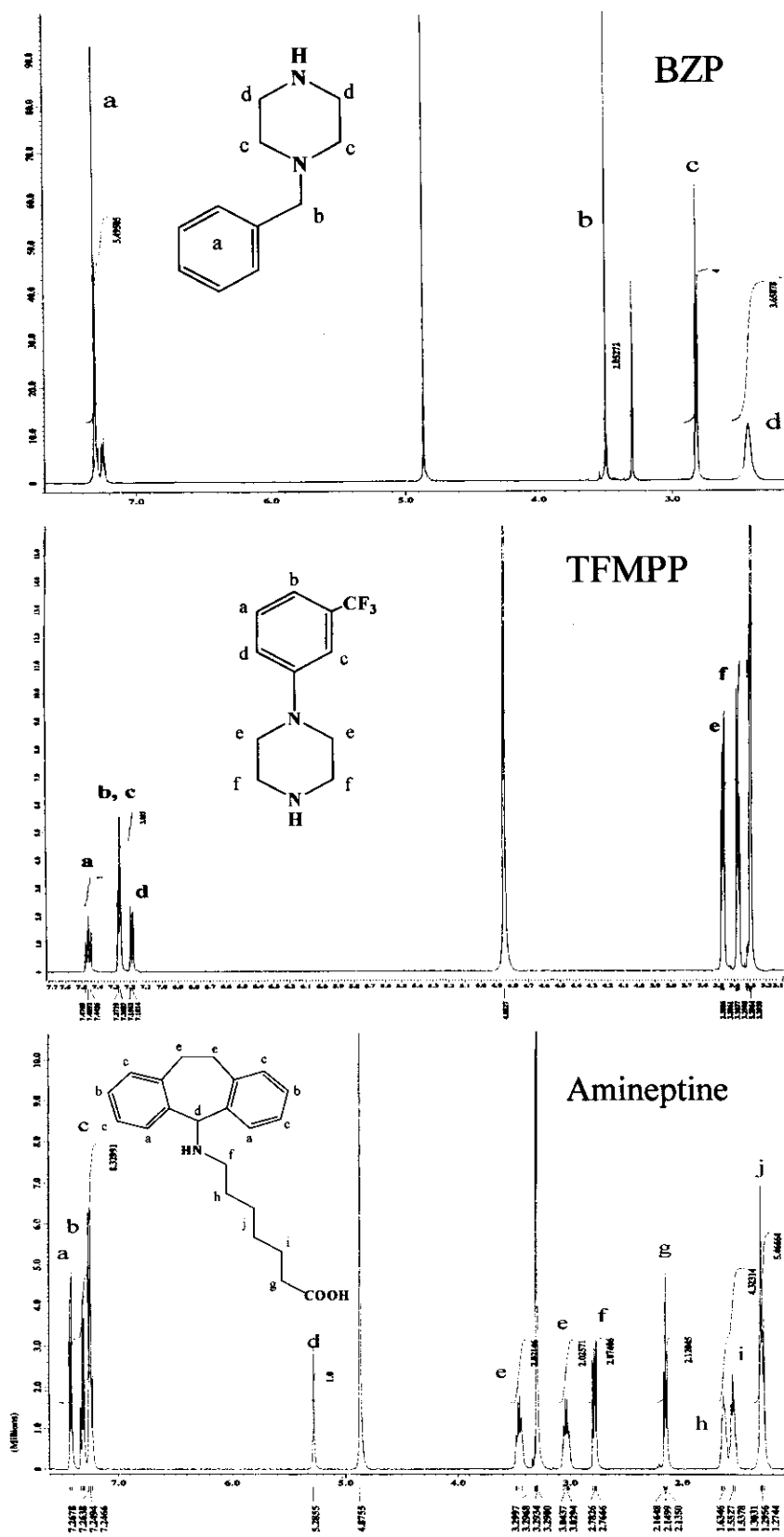


図3 各薬物の¹H NMR スペクトル

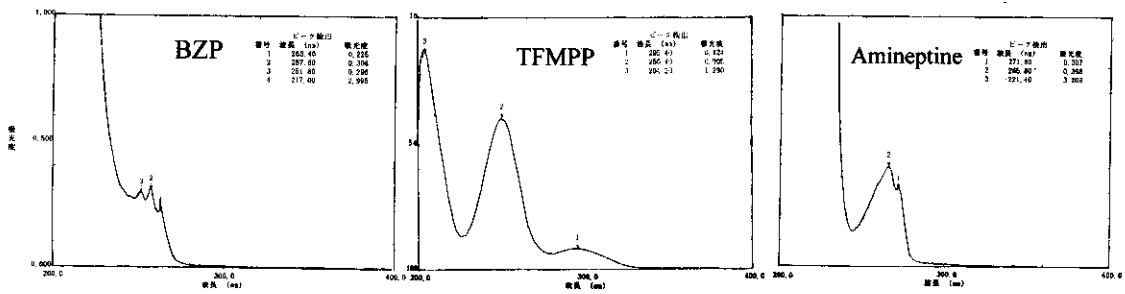


図4 各薬物のUVスペクトル

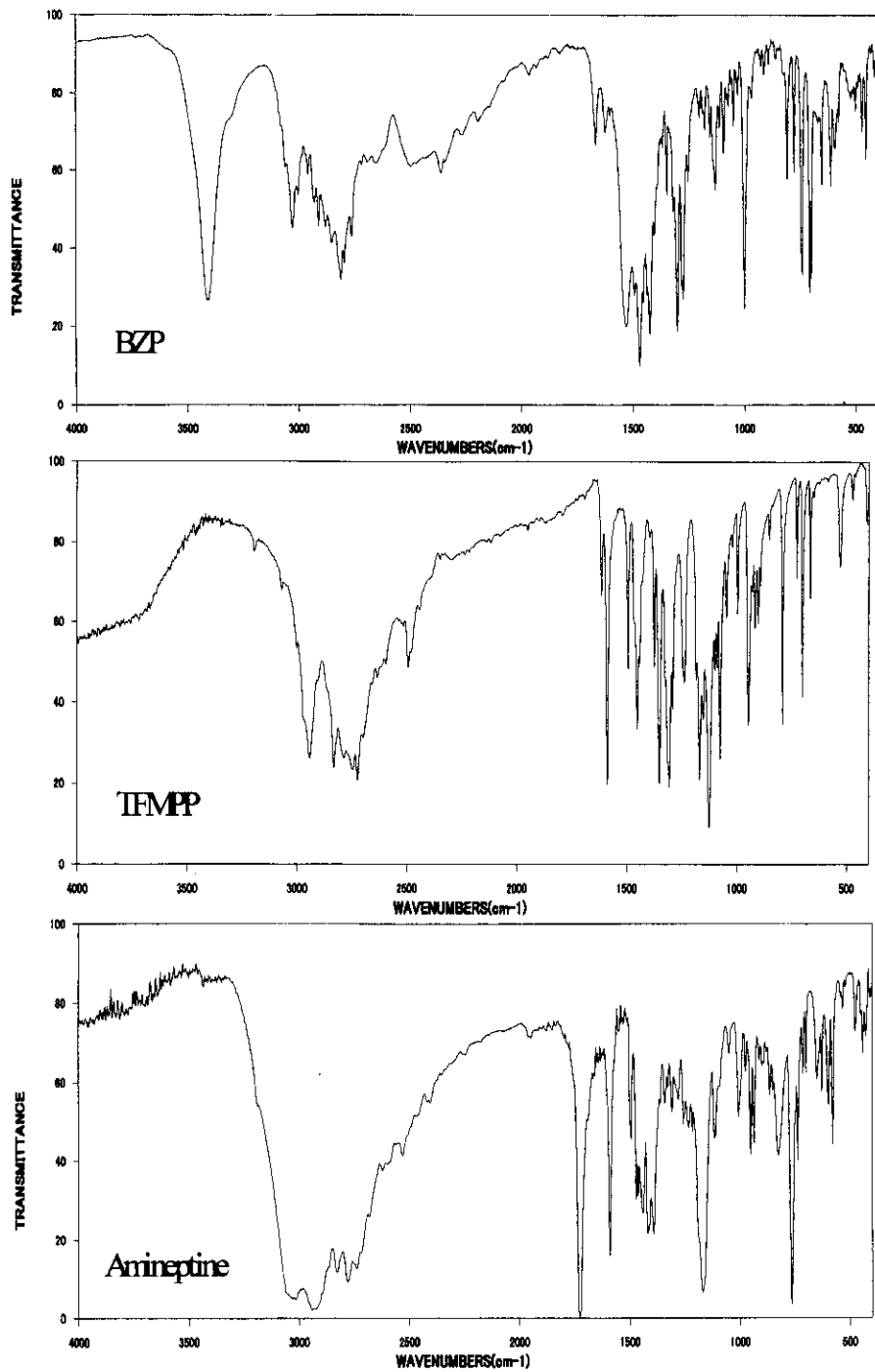


図5 各薬物のIRスペクトル

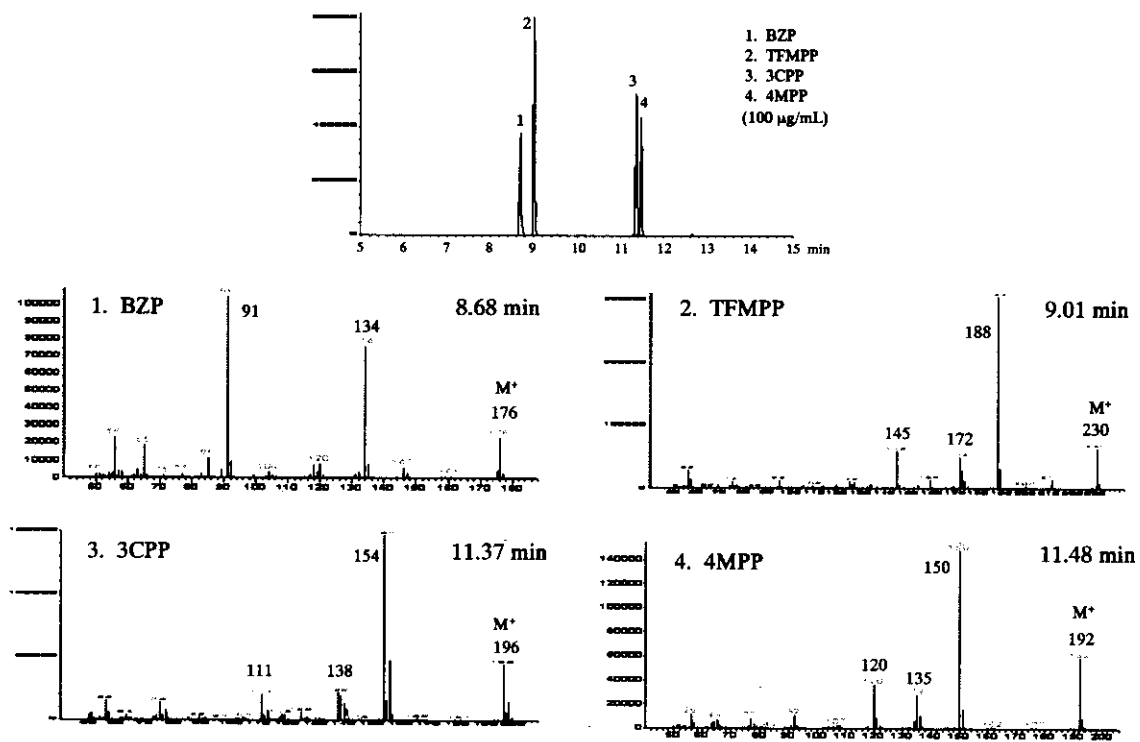


図6 ピペラジン系薬物のGC-MSによる一斉分析 (非誘導体)

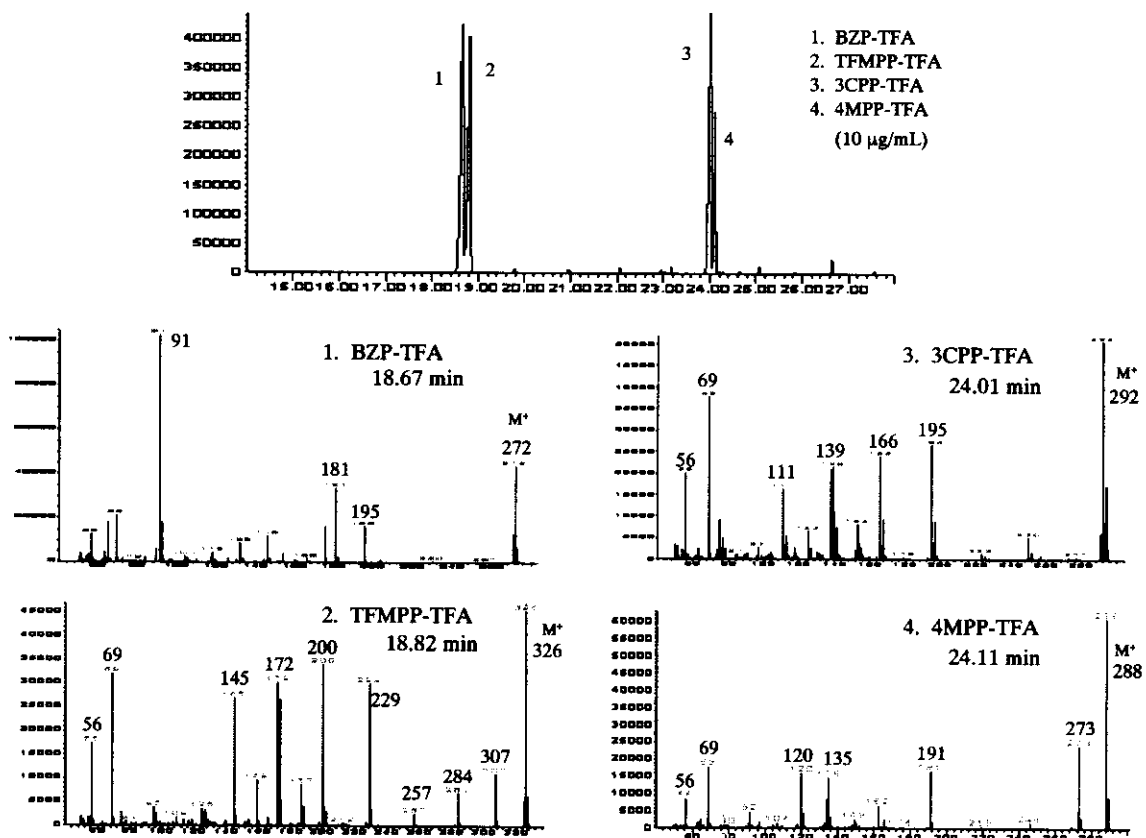


図7 ピペラジン系薬物のGC-MSによる一斉分析 (TFA 誘導体)

表1 各薬物の呈色反応

| 試薬 | BZP | TFMPP | Amineptine |
|-----------|--------|-------|------------|
| シモン | 濃紺→赤紫色 | 薄赤紫色 | 赤紫→黒青色 |
| ドラージェンドルフ | 橙色沈殿 | 橙色沈殿 | 橙色沈殿 |
| エールリッヒ | 黄色 | — | — |
| マルキス | (褐色) | — | 橙黄色 |
| スコット | — | — | — |

表2 TLCのRf値

| 化合物 | 展開溶媒 | | |
|---------------|------|------|------|
| | i) | ii) | iii) |
| BZP | 0.18 | 0.19 | 0.27 |
| TFMPP | 0.38 | 0.37 | 0.41 |
| 3CPP | 0.37 | 0.34 | 0.39 |
| 4MPP | 0.28 | 0.26 | 0.34 |
| Amineptine | 0.05 | 0.54 | 0.76 |
| Carbamazepine | 0.59 | 0.75 | 0.72 |
| Desipramine | 0.27 | 0.27 | 0.29 |
| Imipramine | 0.51 | 0.55 | 0.52 |
| Nortriptyline | 0.35 | 0.35 | 0.36 |
| Amitriptyline | 0.59 | 0.62 | 0.59 |
| Trimipramine | 0.73 | 0.74 | 0.67 |
| Clomipramine | 0.64 | 0.62 | 0.59 |

3. LC-MSによる一斉分析法

BZP、TFMPP及び代表的なピペリジン系脱法ドラッグである3CPP、4MPPについて、LC-MSによる一斉分析を検討した結果、「研究方法」に記載した条件で4薬物は良好に分離し、正イオン測定において各薬物の分子イオンピーク([M+H]⁺)が主に観察された。

LC保持時間及び[M+H]⁺：

BZP：3.3 min, m/z 177, 4MPP：4.8 min, m/z 193, 3CPP：11.8 min, m/z 197, TFMPP：14.6 min, m/z 231

一方、アミネプチン及び代表的な7種類の三環系抗うつ薬についても、「研究方法」に記載した条件で良好に分離し、正イオン測定において各薬物の分子イオンピーク([M+H]⁺)が主に観察された。

LC保持時間及び[M+H]⁺：

Amineptine：8.6 min, m/z 237,
Carbamazepine：7.9 min, m/z 338,
Desipramine：11.9 min, m/z 267,
Imipramine：13.4 min, m/z 281,
Nortriptyline：14.2 min, m/z 264,
Amitriptyline：16.1 min, m/z 278,
Trimipramine：18.2 min, m/z 295,
Clomipramine：27.1 min, m/z 315

4. GC-MSによる一斉分析法

BZP、TFMPPを含むピペラジン系4薬物について非誘導体及びTFA誘導体の一斉分析法を検討したところ、「研究方法」に記載した条件で良好に分離し、各薬物のピークにおいて図6及び7に示したフラグメントイオンが観察された。

一方、Amineptineについて、まず誘導体化を行わずにGC-MSにより分析したところ、ブロードなピークと共に、分解物と思われるピークが観察された。そこで、TMS誘導体化を行った後に分析条件を検討したところ、「研究方法」に記載されている条件下でCarbamazepineを除く各薬物(Amineptine、Desipramine及びNortriptylineはTMS誘導体、その他は非誘導体)は良好に分離し、GC保持時間28.6分のAmineptine-TMSのピークにおいて、m/z 192(ベースピークイオン)、178、115、218、165、409(M⁺)のフラグメントイオンが観察された。

GC保持時間：

Amitriptyline：19.6 min,
Trimipramine：19.8 min,
Imipramine：20.0 min,
Nortriptyline-TMS：21.5 min,
Desipramine-TMS：21.8 min,
Clomipramine：22.2 min,
Amineptine-TMS：28.6 min (図8)

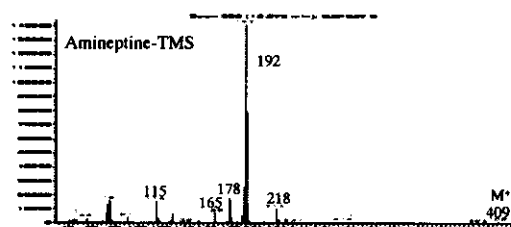
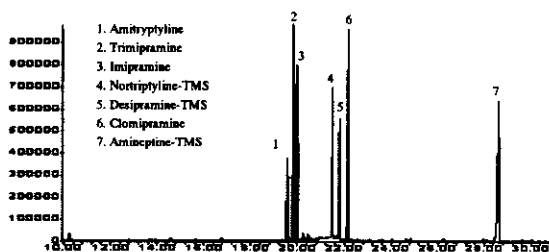


図8 Amineptine 及び6種類の三環系抗うつ薬のGC-MSによる一斉分析(TMS誘導体)

D. 結論

新規麻薬指定3薬物について、呈色反応, TLC, UV, IR, NMR, UV, LC-MS, GC-MSによる分析法を検討した。また、他の代表的ピペラジン誘導体の脱法ドラッグ(3CPP, 4MPP)もしくは三環系抗うつ薬(Carbamazepine, Desipramine, Imipramine, Nortriptyline, Amitriptyline, Trimipramine, Clomipramine)とのTLC, LC-MS及びGC-MSによる識別法も併せて検討した。

今回示した分析法により、新規麻薬指定3薬物の定性分析が可能であった。今後、これら薬物の鑑定嘱託が増加する可能性が考えられるが、今回検討した分析法及び分析結果は薬物鑑定を行う際に有用であると思われる。

E. 参考文献

1. R. F. Staack, G. Fritschi and H. H. Maurer,

J. Chromatogr. B, **773**, 35-46 (2002).

2. D. De Boer, I. J. Bosman, E. Hidvegi, C. Manzoni, A. A. Benko, L. J. A. L. Dos Reys, R. A. A. Maes, *Forensic Sci. Int.*, **121**, 47-56 (2001).

3. Luijten, J. P. Volland, E. Mocaer and A. Kamoun, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **15**, 339-45 (1990).

4. C. Tsaconas, P. Paudieu, P. d'Athis, E. Mocaer and N. Bromet, *J. Chromatogr.* **487**, 313-329 (1989).

F. 研究発表

1. 花尻(木倉)瑠理、最所和宏、宮坂一善、牧野由紀子、合田幸広「新規麻薬指定3薬物(BZP, TFMPP及びアミネプチン)の分析法について」日本薬学会第124年会(大阪)、2004年3月

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

1. 熊谷健夫、畠山好雄、吉松嘉代、下村耕一郎、アヘンの収量及び収量構成要素に及ぼす肥料の影響、*国立医薬品食品衛生研究所報告*, **121**, 12-15 (2003).
2. 高上馬希重, 村中俊哉, 吉田茂男, 飯田修, 関田節子, 佐竹元吉, 牧野由紀子, 大麻 *Cannabis sativa* L.における cannabinoid 生合成遺伝子の解析、*DNA 多型* **12**, in press (2004).
3. 小島 尚, 関田節子, エフェドラアルカロイドを含む健康食品に含まれる医薬品成分の検討、*医薬品研究*, **35**, 22-28 (2004).
4. Amal Kaddoumi, Ruri Kikura-Hanajiri, Kenichi Nakashima, Amal Kaddoumi, Ruri Kikura-Hanajiri, Kenichi Nakashima, High-performance liquid chromatography with fluorescence detection for the simultaneous determination of 3,4-methylenedioxymethamphetamine, methamphetamine and their metabolites in human hair using DIB-Cl as a label, *Biomedical Chromatography*, **18**, 202-204 (2004).
5. Naoki Kurashima, Yukiko Makino, Setsuko Sekita, Yasuteru Urano, Tetsuo Nagano, Determination of Origin of Ephedrine Used as Precursor for Illicit Methamphetamine by Carbon and Nitrogen Stable Isotope Ratio Analysis, *Anal. Chem.*, in press (2004)
6. Takuro Maruyama, Kazumasa Yokoyama, Yukiko Makino, Yukihiro Goda, Phylogenetic Relationship of Psychoactive Fungi Based on the rRNA Gene for a Large Subunit and Their Identification Using the TaqMan Assay, *Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 710-714 (2003).
7. Osamu Shiota, Wataru Hakamata, Yukihiro Goda, Concise Large Scale Synthesis of Psilocin and Psilocybin, Principal Hallucinogenic Constituents of "Magic Mushroom", *J. Nat. Prod.*, **66**, 885-887 (2003).
8. Takuro Maruyama, Nobuo Kawahara, Kazumasa Yokoyama, Yukiko Makino, Toshimitsu Fukiharu, Yukihiro Goda, Phylogenetic Relationship of Psychoactive Fungi Based on the rRNA Gene for a Large Subunit and Their Identification Using the TaqMan Assay (II), *Forensic Sci. Int.*, submitted (2004).
9. Y.Makino, S.Kurobane, K.Miyasaka, K.Nagano, Profiling of Ecstasy Tablets seized in Japan, *Microgram Journal*, **1**, 169-176 (2003).