

表 1 本研究で使用了 Passiflora 属植物標品

Sample no. ^{*1}	Voucher no.	Scientific name	habitat	date ^{*2}	description
Pa-1	S115	<i>P. caerulea</i>	種子島研究部	2008.4.18	
Pa-2	S176	<i>P. caerulea</i>	種子島研究部	2008.4.18	
Pa-3	S26-1	<i>P. edulis</i>	種子島研究部	2008.4.18	
	S246-1	<i>P. edulis</i>	種子島研究部	2008.4.18	
	S246-2	<i>P. edulis</i>	種子島研究部	2008.4.18	
	S246-3	<i>P. edulis</i>	種子島研究部	2008.4.18	
	S246-4	<i>P. edulis</i>	種子島研究部	2008.4.18	
	S246-5	<i>P. edulis</i>	種子島研究部	2008.4.18	
	S246-6	<i>P. edulis</i>	種子島研究部	2008.4.18	
	S246-7	<i>P. edulis</i>	種子島研究部	2008.4.18	
	S246-8	<i>P. edulis</i>	種子島研究部	2008.4.18	
	S246-9	<i>P. edulis</i>	種子島研究部	2008.4.18	
	S246-10	<i>P. edulis</i>	種子島研究部	2008.4.18	
Pa-4	S288-1	<i>P. edulis</i>	種子島研究部	2008.4.18	
Pa-5	S288-2	<i>P. edulis</i>	種子島研究部	2008.4.18	
Pa-6	S288-3	<i>P. edulis</i>	種子島研究部	2008.4.18	
Pa-7	S288-4	<i>P. edulis</i>	種子島研究部	2008.4.18	
Pa-8	S288-5	<i>P. edulis</i>	種子島研究部	2008.4.18	
Pa-9	S238-1	<i>P. quadrangularis</i>	種子島研究部	2008.4.18	
Pa-10	S238-2	<i>P. quadrangularis</i>	種子島研究部	2008.4.18	
Pa-11	S238-3	<i>P. quadrangularis</i>	種子島研究部	2008.4.18	
Pa-12	S238-4	<i>P. quadrangularis</i>	種子島研究部	2008.4.18	
Pa-13	S238-5	<i>P. quadrangularis</i>	種子島研究部	2008.4.18	
	S238-6	<i>P. quadrangularis</i>	種子島研究部	2008.4.18	
	S238-7	<i>P. quadrangularis</i>	種子島研究部	2008.4.18	
	S238-8	<i>P. quadrangularis</i>	種子島研究部	2008.4.18	
Pa-14	S58-1	<i>P. incarnata</i>	種子島研究部	2008.4.18	
Pa-15	S58-2	<i>P. incarnata</i>	種子島研究部	2008.4.18	
Pa-16	S58-3	<i>P. incarnata</i>	種子島研究部	2008.4.18	
Pa-17	S58-4	<i>P. incarnata</i>	種子島研究部	2008.4.18	
Pa-18	S58-5	<i>P. incarnata</i>	種子島研究部	2008.4.18	
	S58-6	<i>P. incarnata</i>	種子島研究部	2008.4.18	
Pa-19	none	<i>P. edulis</i> ルビースター	種子島研究部	2008.4.18	
Pa-20	none	<i>P. edulis</i> サマークイーン	種子島研究部	2008.4.18	
Pa-21	none	<i>P. edulis</i> F1 種	種子島,採集品	2007.9.25	<i>P. edulis</i> x <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> ?
Pa-22	none	<i>P. edulis</i> 在来種-1	種子島,採集品	2007.9.25	
Pa-23	none	<i>P. edulis</i> 在来種-2	種子島,採集品	2007.9.25	
Pa-31	none	<i>P. rubra</i>	日本新葉	2007.10.22	
Pa-32	none	<i>P. incarnata</i>	日本新葉	2007.10.22	
Pa-33	none	<i>P. vitifolia</i>	日本新葉	2007.10.22	
Pa-34	none	<i>P. suberosa</i>	日本新葉	2007.10.22	
Pa-35	none	<i>P. edulis</i>	日本新葉	2007.10.22	

*1) 前年度の報告書と統一した。no. のない試料は、前年度未試験。

*2) 採取日。

表 2 本研究で使⽤したチャボトケイソウ製品

Sample No.	Name	Form
Pak-1	パッションフラワー・エキス	カプセル
Pak-2	パッションフラワー	カプセル
Pak-3	パッションフラワー・ハーブティー原液	チンキ
Pak-4	トケイ草(パッションフラワー)エキス	カプセル
Pak-5	トケイ草 カプセル	カプセル
Pak-6	トケイ草 チンキ剤	チンキ
Pak-7	有機パッションフラワー	葉
Pak-8	有機ハーブ パッションフラワー	葉
Pak-9	パッションフラワー	茎葉
Pak-10	パッションフラワー <i>Passiflora incarnata</i> オーガニック	葉
Pak-11	【有機】パッションフラワー	葉
Pak-12	パッションフラワー	葉
Pak-13	パッションフラワー ハーブティー(ストレート)	茎葉
Pak-14	パッションフラワー(オーガニック)	茎葉

表3 Passiflora eduris で見いだされた Chemotype

Chemotype	Retention time (min)											Samples				
	6.6	6.9	8.3	8.6	10.5	10.8	12.4	12.7	13.1	13.4	15.2			20.3	21.5	
	m/z											Authentic	Commercial			
	449	449	433	433	563	579 433	433	577	579 433	563	563			867 485 467 449	271	
Type1								●				●	●	●	Pa-3, S246-1 to-10, Pa-4 to -8, Pa-22, 23	Pak-2, 9
Type2	●	●		●		●	●			●				●	Pa-35	Pak-1, 5, 6
Type3	●	●	●	●	●			●	●	●	●	●	●	●	Pa-2, Pa-19 to -21	

表 4 Passion flower 製品の推定基原種

Sample No.	Putative species	Sample No.	Putative species
Pak-1	<i>P. edulis</i>	Pak-8	<i>P. incarnata</i>
Pak-2	<i>P. edulis</i>	Pak-9	<i>P. edulis</i>
Pak-3	<i>P. incarnata</i>	Pak-10	<i>P. incarnata</i>
Pak-4	<i>P. incarnata</i>	Pak-11	<i>P. incarnata</i>
Pak-5	<i>P. edulis</i>	Pak-12	<i>P. incarnata</i>
Pak-6	<i>P. edulis</i>	Pak-13	<i>P. incarnata</i>
Pak-7	<i>P. incarnata</i>	Pak-14	<i>P. incarnata</i>

分担研究課題 「専ら医薬品」の規制範囲と見直しに関する研究

分担研究者 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長 合田幸広
協力研究者 丸山卓郎 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 主任研究官

セロリ種子の成分と原植物について

研究要旨 3-n-butylphthalide を主成分とするセロリ種子及び coumarin 類を主成分とするセロリ種子について、外部形態比較及び核 rDNA, ITS 塩基配列解析による基原種鑑別を行った。その結果、前者は、真正のセロリ (*Apium graveolens*) を基原とし、後者は、同じセリ科の *Seseli diffusum* を基原としていることを示唆する結果を得た。国内に流通するセロリ種子には、インド周辺から輸入されているものもある。また、coumarin 類である furocoumarin 類は、光過敏症誘発や発がん性が示唆されている。従って、偽セロリ種子の輸入について、注意が必要であること、もし実態調査でこのことが明らかとなった場合には、本植物について、専ら医薬品としての注意喚起が必要であると思われる。

A. 研究目的

セロリ (*Apium graveolens*; Umbelliferae) は、葉柄が野菜として利用される他、種子（形態学的には、果実）もスパイスとしてカレー、ケチャップ、ソースなどの製造に利用される 1-2 年生の草本である。また、最近では、尿酸排泄の促進等による関節痛の除去を目的に、セロリ種子あるいはそのエキスを利用した健康食品が販売されている。セロリ種子の主成分としては、3-n-butylphthalide 及び (furo) coumarin 誘導体の単離の報告が、それぞれ、日本及びインドの研究者よりなされている（図 1, 2）¹⁻³⁾。これらの化合物は、どちらもセリ科植物に広く分布することが知られているが、後者の化合物の中には、光線過敏症誘発及び発がん性を持つものが知られているため、摂食材料における furocoumarin 類

の含有は、食薬区分の判断のための重要な要素である⁴⁻⁶⁾。

我々が行ったパキスタン産のセロリ種子の成分分画では、主成分として coumarin 誘導体が得られ、phthalide 類は、全く得られなかった。インド周辺では、セロリの他に、*Trachyspermum ammi*, *Apium leptophyllum*, *Carum roxburghianum* などの近縁植物の種子が民間薬及びスパイスとして利用されている。このことから、インドのグループが報告した coumarin 化合物は、他の近縁植物を実験材料として使用した可能性が考えられた。

そこで本研究では、furocoumarin 化合物を含有するセロリ種子の原植物を特定するため、3-n-butylphthalide を主成分とするセロリ種子及び coumarin 類を主成分とするセロリ種子、双方を入手し、外部形態の比較及び DNA 塩基配列

解析による基原種鑑別を行い、種と成分の相関を調査した。

B. 研究方法

1. 実験材料

本研究に使用したセロリ種子類を表 1 にまとめた。3-n-butylphthalide 類を主成分とするセロリ種子 (Ce-1) は、昭和大学薬学部の北島潤一先生より御恵与いただいたものを用いた。このものは、朝岡スパイス株式会社がインドより輸入したもので、北島博士のグループが 3-n-butylphthalide 及び sesquiterpene 類等を単離、報告したもの¹⁾と同じものである。Coumarin 類を主成分とするセロリ種子 (Ce-2) は、パキスタン、カラチの市場で購入したものを用いた。

他に、標準植物試料として近縁植物の種子 (Ce-62, 63) を大学及び薬用植物園より御分与いただいた。

2. 実験方法

2-1. 形態観察

各種子の形態観察は、デジタルマイクروسコープレンズ、VH-Z25 (Keyence) を用いて行い、双懸果の側面、分果の背面、合わせ面、横断面について画像を記録した。

2-2. DNA 塩基配列解析

各試料、約 30 mg を粉砕器 MM-300 (Qiagen) により粉末化し、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて、genomic DNA を抽出、精製した。このものを鋳型とし、植物の核 rDNA に保存性の高い配列に設計した各プライマー対を用いて、PCR を行うことにより、核 rDNA の ITS 領域 (ITS1-5.8S rDNA-ITS2) を増幅した。PCR は、KOD DNA

polymerase (Toyobo) を用い、以下の温度プログラムにより行った：94° C, 4 min; 40 cycles of 98° C, 15 sec, 55° C, 5 sec and 74° C, 30 sec; 74° C, 4 min. 得られた PCR 産物を、Montage-PCR (Millipore) により精製した後、ダイレクトシーケンシングへと供した。Cycle sequencing 反応には、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、解析は、ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行った。得られた塩基配列の多重配列解析は、Clustal W プログラムを用いて行った。本研究に使用したプライマーの配列は下記の通りである：ITS-S1, 5' -CTTTATCATTAGAGGAAGGAG-3' ; ITS-AS1, 5' -TTTCCTCCGCTTATTGATATGC-3' .

C. 研究結果

各試料の形態観察の結果を図 3 に示した。3-n-Butylphthalide を主成分とするセロリ種子 (Ce-1) は、側面が圧縮された球形を有し、各分果には、外果皮より突き出した 5 つの稜を持っていた。一方、coumarin 類を主成分とするセロリ種子 (Ce-2; 図は、Ce-27 を代用) は、ほぼ球形を有し、各分果は、合わせ面が扁平な楕円形で、その横断面は、半円形であった。このものも、Ce-1 と同様に、外果皮より突き出した 5 つの稜を持っていたが、その大きさは、Ce-1 のものに比べ、非常に大きかった。これらの特徴の違いから、両者は、明らかに別の植物種であると思われる。2種の標準植物試料との比較では、coumarin タイプの種子が、*Seseli diffusum* 標品と非常によく似た特徴を有していた。

核 rDNA, ITS 領域の塩基配列解析では、2種の標準植物試料、*Cyclospermum leptophyllum* (Ce-62) 及び *Seseli diffusum* (Ce-63) の ITS 配

列は、データベース上の *Bunium* 属及び *Psammogeton* 属植物と高い相同性を示したが、一致する塩基配列は無かった。この 2 種の ITS 塩基配列は、データベースへの登録を行った (Acc. no.: AB243689 for Ce-62, AB243688 for Ce-63)。Ce-1 の ITS 配列は、国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank) 上の *A. graveolens* の配列 (Acc. no.: U30552, U30553) と ITS2 領域の 1 塩基を除き一致した。一方、Ce-2 の ITS 配列は、*S. diffusum* (Ce-63) のものと完全に一致し、形態観察の結果とよく一致する結果であった。

D. 考察

核 rDNA, ITS 領域の塩基配列解析の結果、3-n-butylphthalide 類を主成分とするセロリ種子 (Ce-1) は、データベース上の *A. graveolens* の配列と一致あるいはほぼ一致する配列を示し、このものは、真正のセロリ、*A. graveolens* を原料としていると考えられた。一方、coumarin 類を主成分とするセロリ種子 (Ce-2) は、形態学的な特徴及び ITS 配列が *S. diffusum* のものとよく一致していた。*S. diffusum* は、インド北部において種子を駆虫薬として用いるセリ科植物である⁷⁾。この植物は、パキスタンにおいても分布が確認されており⁸⁾、さらに、Späth らは、*S. indicum* (*S. diffusum* の異名) の種子より、coumarin 類である seselin, bergapten, isopimpinellin を単離、報告している⁹⁾。これらの事実は、Ce-2 の原料植物が *S. diffusum* であることを強く示唆している。従って、インドのグループが、図 2 に示す coumarin 類を単離した材料植物は、*A. graveolens* ではなく、*S. diffusum* である可能性が高いと思われる。ただし、今回の調査では、*S. diffusum* の標準植物が、1 試料のみであるため、今後、Ce-2 の原料植物が、*S.*

diffusum であるかどうかは、慎重に検討する必要がある。

我々が行ったパキスタンにおける市場調査では、主に *A. graveolens*, *S. diffusum*, *T. ammi* と推定される種子が、セロリ種子として流通していた (data not shown)。パキスタンに流通するセロリ種子は、インドからパキスタン中東部の都市、ラホールを経由して輸入されているものも多く、上記 3 種の流通は、インドの生薬市場においても同様であると思われる。現在、食品原料として使用されるセロリ種子は、インドからの輸入品も多いことから、原植物の確認には注意を要する。特に、セロリ種子を使用した錠剤及びカプセル状の健康食品の原料として、coumarin 類を含有するセロリ種子が誤って使用された場合、coumarin 類の摂取量が多量になりがちであり、光線過敏症等の健康被害に直結する恐れがあると思われる。従って、偽セロリ種子の輸入について、注意が必要であり、もし実態調査でこのことが明らかとなった場合には、本植物について、専ら医薬品としての注意喚起が必要であるかもしれない。

E. 結論

A. graveolens 種子の成分として報告されている coumarin 類は、原料植物の誤同定による可能性が高いことが示された。また、この coumarin 類含有セロリ種子の原植物は、*S. diffusum* であることが示唆された。

食品及び健康食品の原料として、*S. diffusum* を基原とするセロリ種子が使用された場合、光線過敏症等の健康被害を引き起こす恐れがあり、注意が必要である。

参考文献

- 1) Kitajima J., Ishikawa T., Satoh M., Polar constituents of celery seed, *Phytochemistry*, **64**, 1003-1011 (2003).
- 2) Garg S. K., Gupta S. R., Sharma N. D., Coumarins from *Apium graveolens* seed, *Phytochemistry*, **18**, 1580-1581 (1979).
- 3) Garg S. K., Gupta S. R., Sharma N. D., Glucoside of *Apium graveolens*, *Planta Med.*, **38**, 363-365 (1980).
- 4) Scheel L. D., Perone V. B., Larkin R. L., Kupel R. E., The isolation and characterization of two phototoxic furanocoumarins (psoralens) from diseased celery, *Biochemistry*, **2**, 1127-1131 (1963).
- 5) Ashwood-Smith M. J., Ceska O., Choudhary S. K., Mechanism of photosensitivity reactions to diseased celery, *Br. Med. J.*, **290**, 1249 (1985).
- 6) International Agency for Research on Cancer (IARC) monographs supplement 7, 8-Methoxypsoralen (methoxsalen) plus ultraviolet radiation, pp126 (1986).
- 7) Datta S. C., Banerjee A. K., Useful weeds of west Bengal rice fields, *Econ. Bot.*, **32**, 297-310 (1978).
- 8) eFloras (2008). Published on the Internet <http://www.efloras.org> [accessed 5 June 2008] Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO & Harvard University Herbaria, Cambridge, MA.
- 9) Späth E., Bose P. K., Matzke J., Guha N. C., Die cumarine von *Seseli indicum* und die konstitution des seselins, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **72**, 821-830 (1939).
- F. 研究発表
1. 学会発表
- 1) 丸山卓郎, A. A. Khan, M. I. Choudhary, 津田喜典, 合田幸広, M. Farille, J.-P. Reduro, パキスタン市場に流通するセロリ類似種子の基原植物, 成分, 生物活性, 第23回日本香料研究会, (2008, 11, 金沢).
2. 論文発表
- 1) Maruyama T., Khan A. A., Choudhary M. I., Tsuda Y., Goda Y., Farille M., Reduro J.-P., Botanical origin of Indian celery seed (fruit), *J. Nat. Med.*, in press (2009).
- G. 知的財産権の出願, 登録状況
無し
- H. 健康危機情報
インド, パキスタン周辺で流通するセロリ種子には, coumarin 類を主成分とする種を基原植物とするものがあり, 一般のセロリ種子と同様に扱われた場合, 光線過敏症などを引き起こす恐れがある。

表1 本研究に使用したセロリ及び近縁植物種子

Sample No.	Name	Source	Voucher No.
Ce-1	celery	Prof. Junichi Kitajima, Showa Pharmaceutical University, Japan	none
Ce-2	celery	Karachi market, Pakistan	none
Ce-62	<i>Cyclospermum leptophyllum</i> (Pers.) Sprague ex Britt. & Wilson	Dr. Sherri Tenessi, USDA, ARS Plant Genetic Resource Unit, Cornell University, USA	PI 325867 94C11
Ce-63	<i>Seseli diffusum</i> (Roxb. ex Sm) Santapau & Wagh.	Prof. Jean-Piere, Herbarium FARILLE, Jardin Botanique Alpin, La Jaysinia, Samoens, France	n 84-272

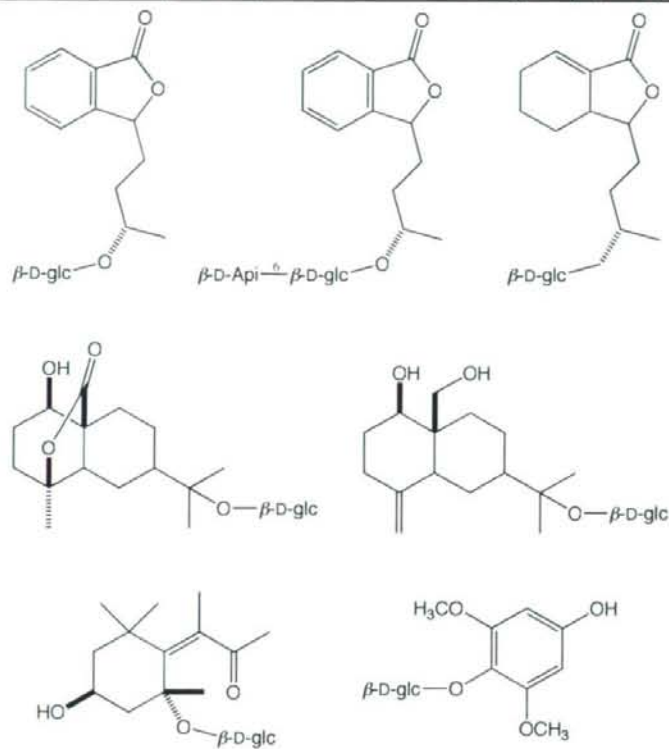


図1 北島らにより報告されたセロリ種子の主な高極性成分

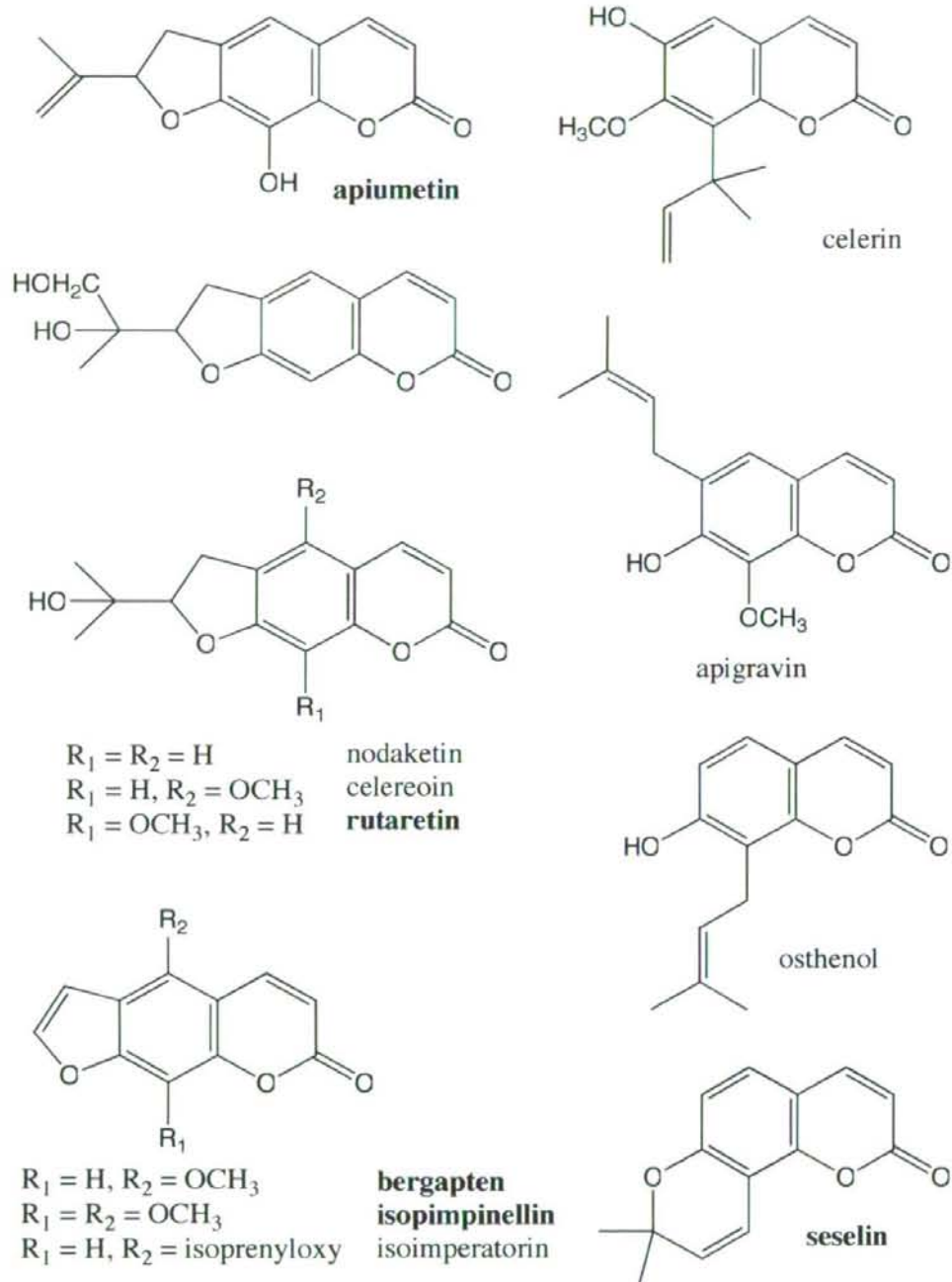


図2 インドのグループにより報告されたセロリ種子の主な成分

ハキスタン産のセロリ種子 (Ce-2) より単離された成分を太字で示した。

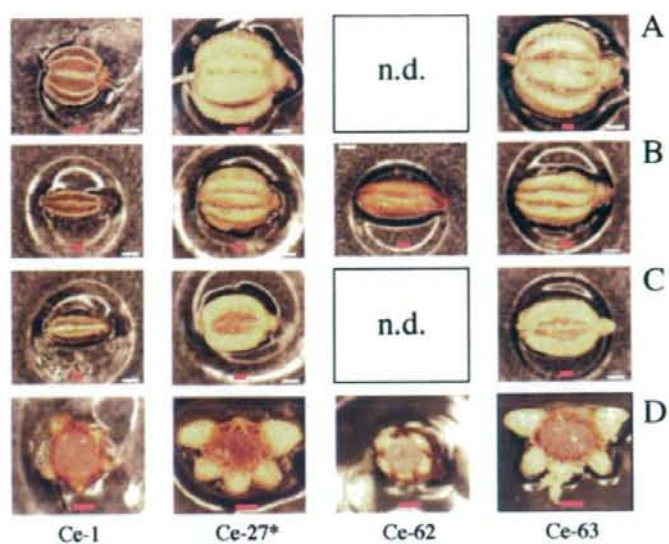


図3 本研究に使用したセロリ種子及びセロリ種子の形態比較

A, 双懸果の側面; B to D, 分果の背面 (B), 合わせ面 (C), 横断面 (D)

*: Ce-2 は、量が少なかったため、Ce-2 と同一の遺伝子型、成分パターンを示す別試料 (Sindh の market で購入) で代用した。

分担研究課題 専ら医薬品の規制範囲と見直しに関する研究

分担研究者 合田 幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 部長
研究協力者 最所 和宏 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

一強壯用健康食品中から新規に検出された PDE5 阻害化合物
チオキナピペリフィルについて一

研究要旨 近年、強壯を標榜する健康食品より、医薬品成分の構造を一部改変した構造を持つ成分の検出が相次いでいる。これまでに買い上げ調査や、地方衛研との協力で、強壯を標榜する健康食品より、hydroxyhomosildenafil、hydroxyhongdenafil、chloropretadarafil、xanthoanthrafil、norneosildenafil、nitrodenafil 等の新規な無承認無許可医薬品成分について、構造決定を行っている。平成 19 年度に行った買い上げ調査においても、強壯を標榜する健康食品中より、チオデナフィルが検出されるとともに、未知な化合物が検出され、同化合物について単離、構造決定を行った。方法は、強壯用健康食品中にメタノールを加えて、超音波抽出を行い、抽出液から分取 HPLC により目的物質を単離した。単離した化合物について FT-MS を測定し、擬似分子イオンについて精密質量（理論値 m/z 449.21236、実測値 m/z 449.21181）を得、擬似分子式 $C_{24}H_{29}N_6OS$ が明らかとなった。さらに、 1H -NMR、 ^{13}C -NMR データ並びに各種 NMR（DQF-COSY、HMQC 及び HMBC 等）スペクトル解析と MS のフラグメントの解析から、本化合物の構造は 3-ethyl-1,3-dihydro-8-[[[2-[4-(hydroxylmethyl)-1-piperidinyl]phenyl]methyl]amino]-2H-imidazo[4,5-g]quinazoline-2-thione であることが判明した。本化合物は、既に（株）協和発酵により PDE5 阻害剤「KF31327」として論文報告されており、同社の了解のもと、その構造から thioquinapiperifil（チオキナピペリフィル）と命名した。抽出精製物を基に定量を行ったところ、1 錠中 13-15mg の同化合物が含有されていた。また、別に本製品から、1 錠中 0.4 mg の thiodenafil が検出された。本化合物は PDE5 阻害活性を有することから、専ら医薬品成分に該当するものと考えられた。

研究協力者

花尻（木倉）瑠理 国立医薬品食品衛生研究所
室長

内山奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所研究
員

A. 研究目的

近年、強壯を標榜する健康食品より、医薬品成分の構造を一部改変した構造を持つ成分の

検出が相次いでいる¹⁻⁴⁾。国立衛研では、これまでに買い上げ調査や、地方衛研との協力で、強壯を標榜する健康食品より、hydroxyhomosildenafil、hydroxyhongdenafil、chloropretadarafil、xanthoanthrafil、norneosildenafil、nitrodenafil 等の新規な無承認無許可医薬品成分について、構造決定を行っている¹⁾。平成 19 年度に行った買い上げ調査においても、PDE5 阻害活性を有すると考えられるチオデナフィ

ル (thiodenafil) が検出された強壯を標榜する健康食品中に、未知な化合物が検出され、同化合物について単離、構造決定及び定量を行ったので報告する。

B. 研究方法

試料は、平成 19 年度買い上げ調査の試料中の錠剤を乳鉢で粉碎及び均一化したものを用いた。

1. 抽出方法

上記試料 0.8 g にメタノール 20 mL を加えて、超音波抽出 20 分間行った。抽出液を乾固後、水/アセトニトリル (6/4) に溶解した。その溶液を HPLC にて分取後、乾固し、目的物を得た。

分取 HPLC 条件

カラム: Inertsil ODS-3 (20 x 250 mm, 5 μ m, GL Sciences)

ガードカラム: Inertsil ODS-3 (7.6 x 30 mm, 5 μ m, GL Sciences)

移動相: アセトニトリル/水 60/40

流速: 3 mL/min

カラム恒温槽温度: 40 $^{\circ}$ C

検出器: フォトダイオードアレイ検出器

2. NMR による構造解析

NMR 装置は日本電子社製 ECA600 を用いた。溶媒は重ジメチルスルホキシドを用いた。

3. 高分解能 MS 測定

MS 装置 (電場型フーリエ変換質量分析計) は Thermo Fisher 社製 LTQ Orbitrap XL を用いた。単離した化合物の 0.1% ぎ酸溶液/メタノール (1/1) 溶液を流速 5 mL/min にて直接注入した。

MS 条件 (電場型フーリエ変換質量分析計)

Ionization: ESI positive

Spray voltage: 5000 V

Capillary voltage: 4 V

Tube lens: 60 V

Capillary temp.: 275 $^{\circ}$ C

Mass range: 100 - 1000

脱溶媒室温度: 250 $^{\circ}$ C

マスレンジ: 100 - 1000

4. LC/PDA/MS 分析

LC/MS (四重極) 装置は Agilent technologies 社製 HPLC1100 series に LC/MSD1100 series を連結したものを用いた。

LC 条件

カラム: Inertsil ODS-3 (2.1 x 150 mm, 5 μ m, GL サイエンス)

移動相 A 液: アセトニトリル/5 mM ぎ酸アンモニウム緩衝液 (pH 3.5) 25/75

移動相 B 液: アセトニトリル

グラジエント条件 (A 液/B 液): 100/0 (0-3 min) - 70/30 (13-20 min) - 50/50 (30-50 min)

流速: 0.3 mL/min

カラム恒温槽温度: 40 $^{\circ}$ C

検出器: フォトダイオードアレイ検出器 (モニター波長 290 nm) 及び質量分析計

注入量: 1 μ L

MS 条件

イオン化法: ESI ポジティブモード

ネブライザー圧力: 60 psi

乾燥ガス流量: 13 mL/min

乾燥ガス温度: 350 $^{\circ}$ C

キャピラリー電圧: 3000 V

フラグメンター電圧: 60V

5. 製品中のチオキナピペリフィルの定量

錠剤を乳鉢で粉碎及び均一化した試料 20 mg に 1% ぎ酸溶液/CH₃CN (1/4) 2 mL を加え、超音波下 5 分間抽出を行った。遠心分離を 1500 rpm にて 3 分間行った後、上澄液 1 mL に移動相 A 液 1 mL を加え膜ろ過 (Ultrafree-MC, 0.45 μ m filter unit, MILLIPORE) を行い、LC/PDA/MS に 1 μ L 注入して、定量した。分析条件は上記 4. LC/PDA/MS 分析と同じ条件で行った。

C. 研究結果及び考察

平成 19 年度に行った買い上げ調査中、5 製品 (2 製品は重複) より、チオデナフィル (図 1)

が検出されるとともに、未知な化合物が検出され（クロマトグラムを図2に示す）、同化合物について単離、構造決定および定量を行った。B-1に記述の抽出方法により得られた化合物について高分解能MS（電場型フリーエ変換質量分析計）を測定したところ、精密質量（理論値 m/z 449.21210、実測値 m/z 449.21181）より、擬似分子式 $C_{24}H_{29}N_5OS$ が得られた。さらに、図3及び表1に 1H -NMR、 ^{13}C -NMR及び各種二次元NMRのデータを示した。本化合物は、 1H -NMRにおいて、 δ 1.28 (3H, t, $J = 7.2$ Hz) にメチル基のシグナル、 δ 7.12、7.15 (each 1H, dd, $J = 7.6, 1.0$ Hz)、6.96、7.19 (each 1H, td, $J = 7.6, 1.0$ Hz) にAA' BB'-タイプのアロマティックプロトン、 δ 7.64、8.09、8.37 (each 1H, s) に別のアロマティックプロトンのシグナルが確認された。さらに、 δ 1.33 ~ 4.84 (each 2H) に7つのメチレンプロトンのシグナルが確認された。また ^{13}C -NMRにおいて、 δ 66.1に酸素に結合した炭素のシグナル、 δ 39.6に窒素に結合した炭素のシグナルが観測された。さらに ^{13}C -NMRデータ並びに各種二次元NMR (DQF-COSY, ROEs, HMQC及びHMBC) スペクトル解析より、本化合物の母核部分の構造は、チオニル基を有するイミダゾキナゾリン骨格であることが明らかとなった。また、ベンゼン環およびピペリジン環の存在も示唆された。さらに、精密質量測定及びNMRデータを解析した結果、本化合物は3-ethyl-1,3-dihydro-8-[[[2-[4-(hydroxymethyl)-1-piperidinyl]phenyl]methyl]amino]-2H-imidazo[4,5-g]quinazolin-2-thioneであると同定した。本化合物について検索を行ったところ、本化合物は(株)協和発酵により「KF31327」という化合物名で既に合成されており、PDE5阻害活性を有することもあわせて報告されていた。同社の了解を得、その構造的長からチオキナピペリフィル (thioquinapiperifil) と命名した。これは、藤沢薬品工業（現アステラス製薬）がPDE5阻害剤「F

K58550」として合成したキサントアントラフィルと同様なケースであった。

図4および5にLC/PDA/MS分析の結果を示した。マスフラグメント（フラグメンター電圧230V）は、精密質量測定及びNMRデータを解析した結果を支持するものであった。尚、本分析条件では、シルデナフィル9分、バルデナフィル7分、タダラフィル18分、ホモシルデナフィル10分、ヒドロキシホモシルデナフィル9分、ホンデナフィル6分、ユーデナフィル12分、アミノタダラフィル16分、ブソイドバルデナフィル33分付近に溶出される。

製品中のチオキナピペリフィル含有量は、抽出・分取したチオキナピペリフィル（クロマトグラムを図4に示す）を基にして、定量を行った。チオキナピペリフィルが検出された製品は5製品あり、製品中濃度0.043-0.048 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 、1錠中13-15 mg含有されていた。尚、5製品全てから、チオデナフィルも同時に検出され、5製品すべて製品中濃度0.001 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 、1錠中0.4 mgのチオデナフィルが含有されていた。

E. 結論

強壯を標榜する健康食品より検出された、未知な化合物の構造決定を行い、最終的に3-ethyl-1,3-dihydro-8-[[[2-[4-(hydroxymethyl)-1-piperidinyl]phenyl]methyl]amino]-2H-imidazo[4,5-g]quinazolin-2-thioneであると同定した。検索の結果、(株)協和発酵により「KF31327」という化合物名で既に合成されており、PDE5阻害活性を有することもあわせて報告されていた。同社の了解を得、その構造的長からチオキナピペリフィル (thioquinapiperifil) と命名した。PDE5阻害活性を有することから、専ら医薬品成分に該当するものと考えられた。

F. 参考文献

1. 厚生労働省ホームページ

<http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/other/050623-1.html>

2. Oh SS, Zou P, Low MY, Koh HL, *J. Toxicol. Environ. Health A*, 69(21), (2006) 1951-1958.
3. Reepmeyer JC, Woodruff JT, *J. Chromatogr. A Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 1125(1), (2006) 67-75.
4. Blok-Tip L, Zomer B, Bakker F, Hartog D, Hamzink M, Hove JT, Vredenburg M, Kaste DD, *Food Addit. Contam.*, 21(8), (2004) 737-748.
5. Fujino K, Takami H, Atsumi T, Ogasa T, Mohri S, Kasai M, *Org. Process Res. Dev.*, 5, (2001) 426-433.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Uchiyama, N., Saisho, K., Kikura-Hanajiri, R., Haishima, Y., Goda, Y., Determination of a new type of phosphodiesterase-5 inhibitor, thioquinapiperifil, in a dietary supplement promoted for sexual enhancement. *Chem. Pharm. Bull.*, 56(9), 1331-1334 (2008).

2. 学会発表

- 1) 最所和宏, 内山奈穂子, 花尻(木倉)瑠理, 合田幸広, 強壯を標榜した健康食品より検出されたイミダゾキナゾリン誘導体(チオキナピペリフィル)について, 日本食品化学学会第14回総会・学術大会(武庫川女子大学, 2008年5月)

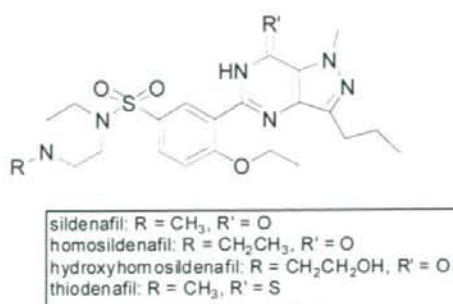


図1 シルденаフィル及びその類似体の構造

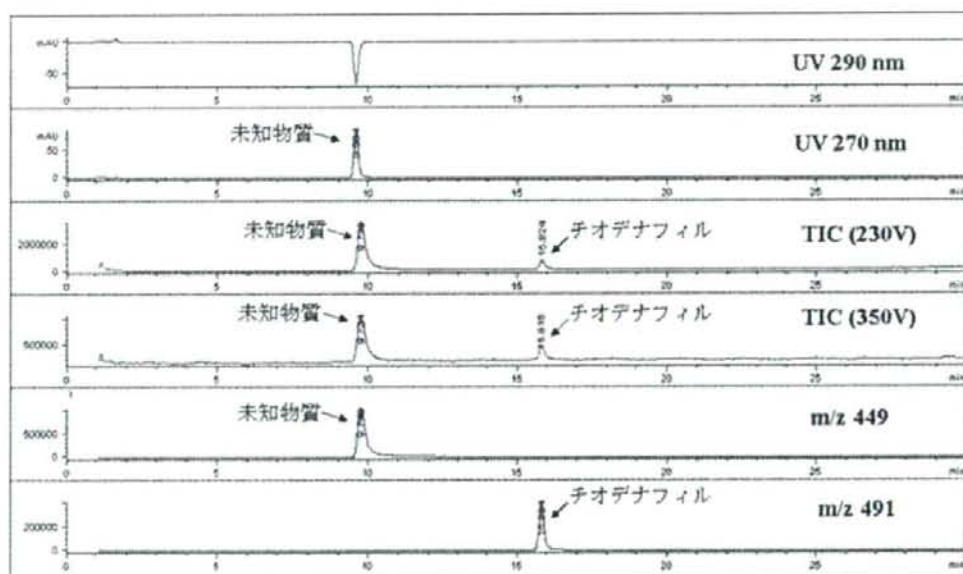
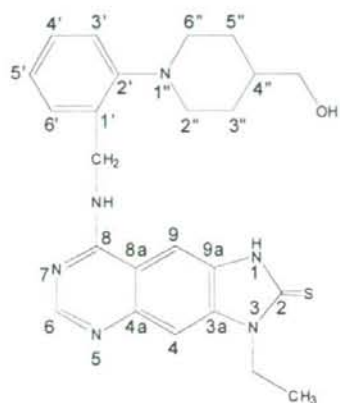


図2 未知物質（チオキナピペリフィル）及びチオデナフィル含有製品の抽出物のLCクロマトグラム、トータルイオンクロマトグラム（TIC）、マスクロマトグラム

A



B

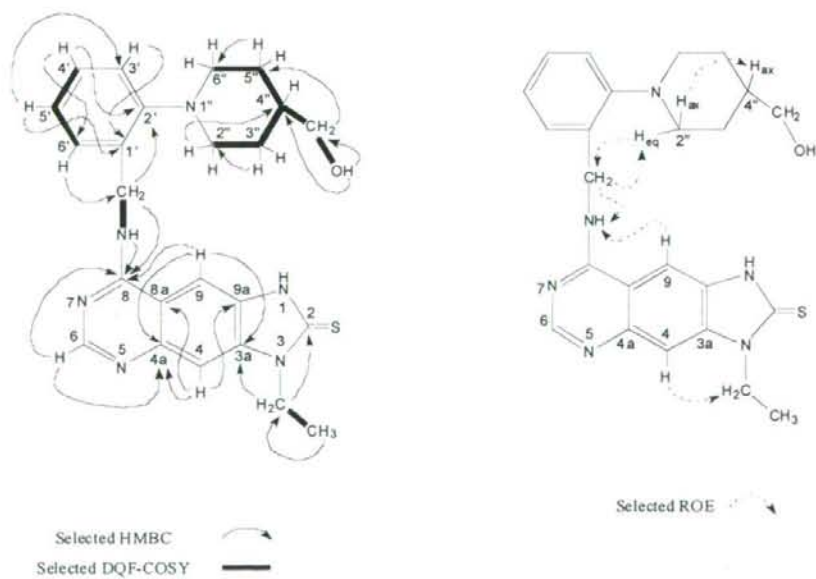


図3 チオキナピペリフィルの構造 (A) および NMR データ (DQF-COSY、HMBC、ROE) (B)

表1 チオキナピペリフィル (Compound 1) および KF31327 の NMR データ

No.	Compound 1 in DMSO- d_6^a			DMF solvate of KF31327 in DMSO- d_6^c	
	^{13}C	^1H	HMBC ^b	^{13}C	^1H
2	172.0	-		171.9	-
3a	136.6	-		136.5	-
4	105.3	7.64 (1H, s)	4a, 8a, 9a	104.9	7.64 (1H, s)
4a	146.0	-		145.7	-
6	153.9	8.37 (1H, s)	4a, 8	153.5	8.37 (1H, s)
8	159.9	-		159.7	-
8a	111.3	-		111.0	-
9	101.4	8.09 (1H, s)	3a, 4a, 8	101.2	8.10 (1H, s)
9a	130.4	-		130.6	-
1'	133.6	-		133.4	-
2'	151.9	-		151.6	-
3'	119.6	7.12 (1H, dd, $J=7.6, 1.0$ Hz)	1', 5'	119.3	7.10-7.20 (3H, m, 3', 4' or 6')
4'	127.5	7.19 (1H, td, $J=7.6, 1.0$ Hz)	2', 6'	127.2 ^d	7.10-7.20 (3H, m, 3', 4' or 6')
5'	123.2	6.96 (1H, td, $J=7.6, 1.0$ Hz)	1', 3', 4', 6'	122.9	6.95 (1H, m)
6'	127.5	7.15 (1H, dd, $J=7.6, 1.0$ Hz)	2', $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{NH}$	127.3 ^d	7.10-7.20 (3H, m, 3', 4' or 6')
2''/6''	52.9	eq, 3.09 (2H, brd, $J=12.0$ Hz) ax, 2.65 (2H, td, $J=12.0, 2.0$ Hz)	4'', 2''/6'' 2''/6''	52.6	3.10, (2H, t, $J=11.5$ Hz) 2.65 (2H, t, $J=10.9$ Hz)
3''/5''	29.6	eq, 1.77 (2H, brd, $J=12.0$ Hz) ax, 1.33 (2H, qd, $J=12.0, 3.1$ Hz)	3''/5'' 2''/6''	29.3	1.80 (2H, d, $J=11.1$ Hz) 1.25-1.38 (5H, m, 3'' and CH_2CH_3)
4''	38.4	1.49 (1H, m)	-	39.4 ^e	1.60 (1H, m)
$-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$	38.4	4.34 (2H, q, $J=7.2$ Hz)	2, 3a, $\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_3$	39.4 ^e	4.31 (2H, q, $J=7.1$ Hz) 1.25-1.38 (5H, m, 3'' and CH_2CH_3)
$-\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_3$	12.8	1.28 (3H, t, $J=7.2$ Hz)	$\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$	12.5	CH_2CH_3
$-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OH}$	66.1	3.31 (2H, t, $J=5.5$ Hz)	3''/5''	65.9	3.20-3.50 (2H, m)
$-\text{CH}_2\underline{\text{O}}\text{H}$	-	4.49 (1H, t, $J=5.5$ Hz)	4'', $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OH}$		4.47 (1H, t, $J=5.4$ Hz)
$-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{NH}$	39.6	4.84 (2H, d, $J=5.5$ Hz)	8, 1', 2', 6'	38.1 ^e	4.84 (2H, d, $J=5.6$ Hz)
$-\text{CH}_2\underline{\text{N}}\text{H}$	-	8.70 (1H, t, $J=5.5$ Hz)	8		8.70 (1H, t, $J=5.6$ Hz)
1-NH	-	13.24 (1H, s)			13.22 (1H, brs)

^a Recorded at 600 MHz (^1H) and 150 MHz (^{13}C), respectively; data in δ ppm (J in Hz). ^b $J=8$ Hz, The proton signal correlated with the indicated carbons. ^c Recorded at 300 MHz (^1H) and 75 MHz (^{13}C), respectively. ^{d,e} The assignment may be interchanged.

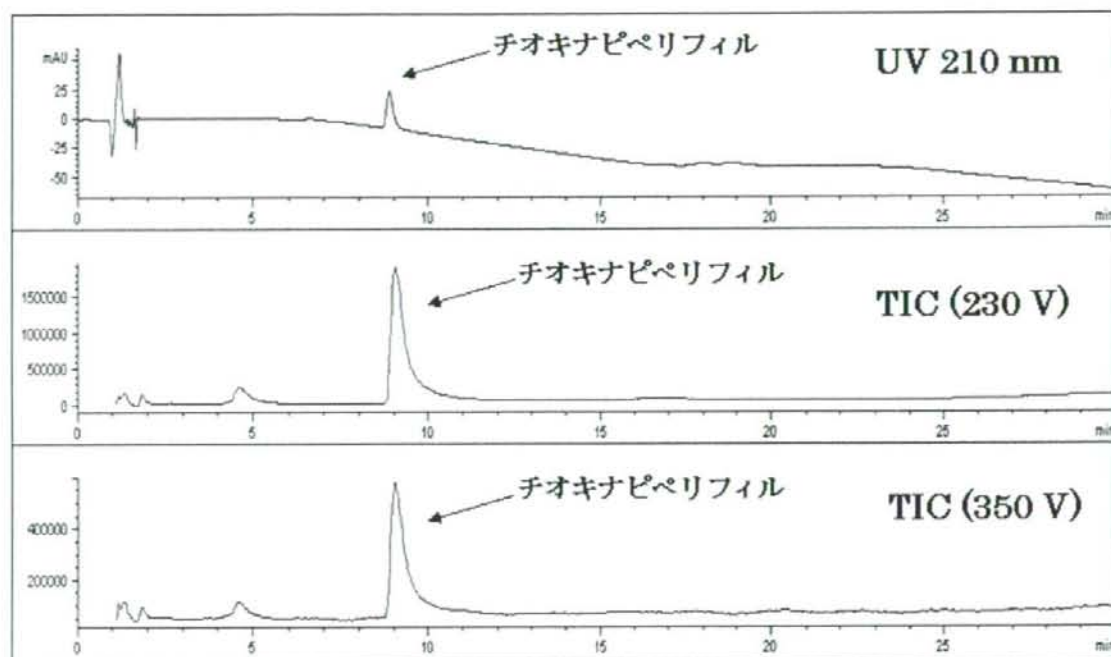


図4 抽出したチオキナピペリフィルの移動相A溶液 (0.1mg/mL) のLCクロマトグラム、LC/MSトータルイオンクロマトグラム (TIC)

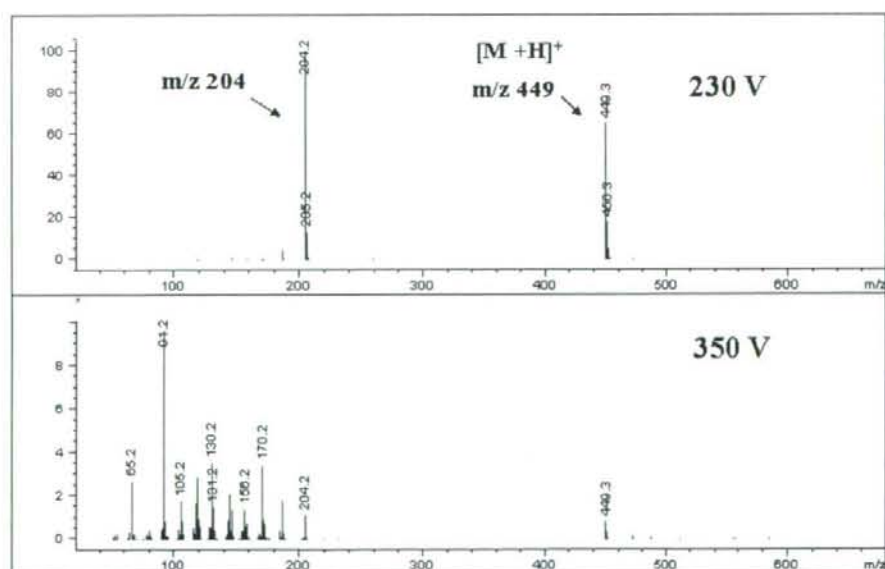


図5 図4の保持時間9.6分のピークのマスペクトル(上段 フラグメンター電圧 230V、下段 フラグメンター電圧 350V)

ラグメンター電圧 350V)

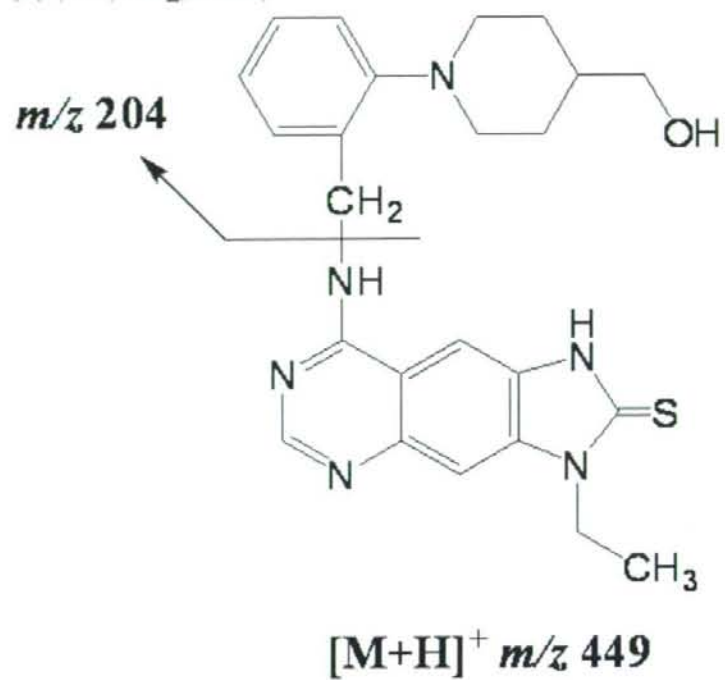


図6 LC/MSにおけるチオキナピペリフィルの推定されるマスフラグメント