

図3 *TrnL-F* 部分配列を基に作成した分子系統樹と mescaline の有無

分担研究課題 薬物の分析と同定に関する研究

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 内山奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 研究員

一麻薬である MMDA、MDA 及び TMA の前駆体 myristicin、safrole 及び elemicin を含有するニクズク科(Myristicaceae)植物の調査研究一

研究要旨 ニクズク科(Myristicaceae)植物のナツメグ(*Myristica fragrans* Houtt.)の種子は、香辛料や芳香健胃薬として広く使用されている一方で、大量摂取による向精神作用を期待しての乱用が問題となっている。主成分である芳香族化合物の myristicin、safrole や elemicin は、摂取後体内でアミノ化され、それぞれ麻薬である MMDA (3,4-methylenedioxy-5-methoxyamphetamine)、MDA (3,4-methylenedioxyamphetamine)、TMA (3,4,5-trimethoxyamphetamine) になるといわれている。そこで本研究では、myristicin、safrole および elemicin を含有するニクズク科植物の文献調査を行った。

A. 研究目的

深刻化する違法ドラッグ問題に対応するべく、平成 18 年の薬事法改正により、幻覚・中枢興奮等の精神毒性かつ保健衛生上の危害のおそれがある薬物及び植物を指定薬物として規制することとなり、平成 19 年 4 月 1 日より施行された。平成 21 年 1 月までに、39 化合物、1 植物が指定されている。これにより指定薬物の流通は減少したが、植物系違法ドラッグ製品は依然として市場に流通している。

ニクズク科(Myristicaceae)植物のナツメグ(*Myristica fragrans* Houtt.)の種子は、古くから香辛料や芳香健胃薬として広く使用されている。しかし一方で、大量摂取による向精神作用を期待しての乱用が問題となっている<sup>1-2)</sup>。その薬理作用は、主成分である芳香族化合物の myristicin、safrole、elemicin 等が、摂取後体内でアミノ化され、それぞれ麻薬である MMDA、MDA、TMA に代

謝されることにより生じるといわれている(Fig. 1)<sup>3-5)</sup>。そこで本研究では、myristicin、safrole および elemicin を含有するニクズク科植物の文献調査を行った。

B. 研究方法

SciFinder 2007 を使用して、Myristicin、safrole、elemicin を含むニクズク科(Myristicaceae)植物について文献調査を行った。

C. 研究結果・考察

Myristicin (MY)、safrole (SA)、elemicin (EL) を含有するニクズク科(Myristicaceae)植物を Table 1 に示した。これら 3 成分を含むニクズク科植物として挙げたものは 4 種類であり、全て *Myristica* 属であった。また成分に関する報告は、*M. fragrans* (ナツメグ)についてが殆どであり、他の植物に関してはそれぞれ 1-2 報程度であった。

MY は、*M. fragrans*、*M. succedanea*、*M. argentea* に含まれているが、*M. muelleri* から検出されたという報告はなかった。SA に関しては、4 種類全てに含まれていた。また、EL は、*M. fragrans*、*M. succedanea* に含まれているが、*M. argentea*、*M. muelleri* から検出されたという報告はなかった。

#### D. 結論

向精神作用を期待しての乱用が問題となっているナツメグ (*Myristica fragrans* Houtt.) の主成分である芳香族化合物の myristicin、safrole、elemicin について、これら成分を含有するニクズク科 (*Myristicaceae*) 植物について文献調査を行った。その結果、4 種の植物に含有することが明らかとなった。今回の結果は、今後植物系違法ドラッグ製品等の規制に関連するデータの一つとして有用であると考えられる。

#### E. 参考文献

- 1) Forrester M. B. Nutmeg intoxication in Texas, 1998-2004. *Hum Exp Toxicol* (2005), 24(11), 563-566.
- 2) Bernard C. S., William C. Toxicology of nutmeg abuse. *Clin. Toxicol.* (2000) 38, 671-678.
- 3) Beyer J., Ehlers D., Maurer H. H. Abuse of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt): Studies on the metabolism and the toxicologic detection of its ingredients elemicin, myristicin, and safrole in rat and human urine using gas chromatography/mass spectrometry. *Therapeutic Drug Monitoring* (2006) 28, 568-575.
- 4) Shulgin A.T. Possible implication of myristicin as a psychotropic substance. *Nature* (1966) 210, 380-384.
- 5) Shulgin A. T. 3-Methoxy-4,5-methylenedioxyamphetamine, a new psychotomimetic agent.

*Nature* (1964) 201, 1120-1121.

- 6) Archer A. W. Determination of safrole and myristicin in nutmeg and mace by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* (1988) 438, 117-121.
- 7) Maeda A., Tanimoto S., Abe T., Kazama S., Tanizawa H., Nomura M. Chemical constituents of *Myristica fragrans* Houttuyn seed and their physiological activities. *Yakugaku Zasshi* (2008) 128, 129-133.
- 8) Agusta, A. Chemical components of essential oil of pala maba (*Myristica succedanea*). *Majalah Farmasi Indonesia* (2000) 11, 103-110.

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

特になし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

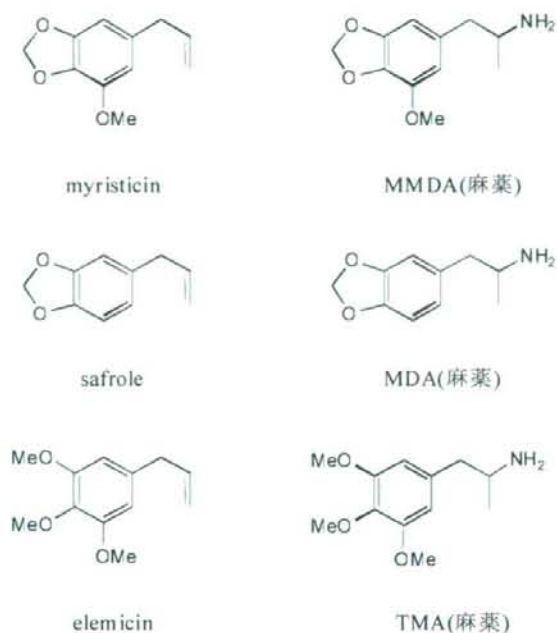


Fig. 1 Structures of nutmeg components and related compounds.

Table 1. Myristicin (MY)、safrole (SA)、elemicin (EL)を含有するニクズク科 (Myristicaceae) 植物

Genus	Species	Family	Common name	MY	SA	EL	Reference
<i>Myristica</i>	<i>fragrans</i>	Myristicaceae	pala	○	○	○	6, 7
<i>Myristica</i>	<i>succedanea</i>	Myristicaceae	pala maba	○	○	○	8
<i>Myristica</i>	<i>argentea</i>	Myristicaceae	papua nutmeg	○	○	—	6
<i>Myristica</i>	<i>muelleri</i>	Myristicaceae	—	n.d.	○	—	6

n.d.: not detected

分担研究報告書

分担研究課題 代謝物の合成に関する研究

分担研究者 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 室長 福原 潔

研究要旨 シロシンおよびシロシピン含有キノコの摂取の有無について、確実および簡便な鑑定法の開発は急務の課題である。本研究では尿試料の直接分析による第 II 相代謝物からの使用証明を可能とする為に、シロシンの抱合体の合成に関する検討を行った。その結果、シロシピン・シロシンの主な第 II 相代謝物として報告されているシロシンのグルクロン酸抱合体を Arcolor1254 誘導ラット肝ミクロゾームを用いた酵素合成法によって 19%の収率で得ることができた。 $\beta$ -Naphthoflavone により誘導したラット肝ミクロゾームを用いるとさらに収率向上が見込まれることがわかった。また、未だ報告されていないが第 II 相代謝物として尿中への排泄が予測されるシロシンの硫酸抱合体についても合成を検討し、Pyridine sulfur trioxide complex を用いた化学合成法により 43%の収率で得ることができた。現在、硫酸抱合体は 0.3 g ほど合成しており、提供可能である。

研究協力者

正田卓司 国立医薬品食品衛生研究所  
有機化学部 研究員

A. 研究目的

マジックマッシュルームは幻覚成分であるトリプタミンアルカロイドのシロシン・シロシピンを含む菌類(キノコ)であり、日本では 2002 年 6 月に麻薬原料植物に指定され、非合法化された。それ故、販売品は現在市場には流通していないが、その乱用は未だ社会的な問題となっている。また、日本国内において自生しているヒカゲシビレタケはシロシンおよびシロシピンを含むため、誤ってヒトが摂取する場合は考えられる。従って、シロシンおよびシロシピン含有キノコの摂取の有無について、確実および簡便な鑑定法の開発は急務の課題である。

シロシピン、シロシンの予想代謝経路を Figure 1 に示す。シロシピンは体内に取り込ま

れると速やかに加水分解され、シロシンとなる。これには内在性のアルカリホスファターゼが関与していると考えられている。さらにシロシンはグルクロン酸抱合体に代謝されて尿中排泄される。<sup>1)</sup> シロシンは化学合成法が確立している為、合成した標品を鑑定法の検出対象として利用することができる。そこで、現在、シロシピン、シロシン摂取の鑑定法としては、尿を加水分解処理して第 II 相代謝物の全てをシロシンに変換して分析を行っている。しかしながら、加水分解処理の際に一部のシロシンが分解してしまうため、検出感度は大きく低下してしまう。シロシンの抱合体の合成については未だ報告されていないが、もし、尿サンプルからの鑑定にシロシンのグルクロン酸抱合体を検出対象として測定できれば、検出感度の向上だけでなく、加水分解処理を省略できるので測定時間の大幅な短縮にもつながる。そこで本研究ではシロシンのグルクロン酸抱合体の合成法に

ついて検討を行った。

グルクロン酸抱合体の合成法には、化学合成と酵素合成がある。化学合成は、Br 基などの脱離基を有するグルクロン酸ドナーを  $S_N2$  反応や  $S_N1$  反応にて導入する方法である。しかしながら、反応条件によって多くの副生成物が生成したり、目的とする  $\beta$ -アノマーとともに  $\alpha$ -アノマーも生成することが多いため、精製が困難になることが予想される。一方、酵素合成はグルクロン酸転移酵素 (UGT) を含むマイクロゾームと、補酵素 uridine 5'-diphosphoglucuronic acid (UDPGA) を用いて合成する方法である。この手法の利点は、生体反応に基づいた合成法のため、立体特異的、位置特異的にグルクロン酸抱合体を合成できる点にある。また、試薬を添加後  $37^\circ\text{C}$  にて静置するだけでよく、極めて簡便である点も利点である。

我々は、前年度の報告において、メチレンジオキシメタンフェタミン (MDMA) の代謝物である HMMA-Gluc の酵素合成に成功している。そこで本研究では酵素合成をシロシングルクロン酸抱合体の合成にも適用可能かを検討した。また、異なる誘導剤により第 II 相代謝酵素を誘導したラット肝マイクロゾームの検討を行った。

本研究ではさらにシロシピン・シロシンの新たな代謝物としてシロシンの硫酸抱合体に着目した。現在までのところシロシンの第 II 相代謝物としてはグルクロン酸抱合体のみが同定されており、硫酸抱合体については報告されていない。これは、標品としての硫酸抱合体が提供されていないことも原因の一つであると考えられる。そこで、シロシピン・シロシンの代謝物による鑑定法に硫酸抱合体の利用が可能であるか検討する為、標品としての硫酸抱合体の合成を行った。

## B. 研究方法

用いた試薬および溶媒のうち、特に明記しな

いものについては和光純薬、東京化成、関東化学から購入し、特に精製せずにそのまま用いた。シロシンは既報<sup>2)</sup>により調製したものをを用いた。Acetobromo- $\alpha$ -D-glucuronic acid methyl ester, uridine 5'-diphosphoglucuronic acid (UDPGA), alamethicin, Pyridine sulfur trioxide complex は Sigma-Aldrich から購入した。正常ラット肝マイクロゾーム (Male Sprague-Dawley rat liver microsomes (Lot No. JJS), 20 mg protein/ml, rat) および Aroclor 1254 誘導ラット肝マイクロゾーム (Aroclor 1254-induced Male Sprague-Dawley rat liver microsomes (Lot No. ADM), 24 mg protein/ml, Aro),  $\beta$ -ナフトフラボン誘導ラット肝マイクロゾーム ( $\beta$ -Naphthoflavone-induced Male Sprague-Dawley rat liver microsomes (Lot No. MTO), 18 mg protein/ml, Naph), イソニアジド誘導ラット肝マイクロゾーム (Isoniazid-induced Male Sprague-Dawley rat liver microsomes (Lot No. AYN), 16 mg protein/ml, Iso), フェノバルビタール誘導ラット肝マイクロゾーム (Phenobarbital-induced Male Sprague-Dawley rat liver microsomes (Lot No. TVZ), 28 mg protein/ml, Phe), デキサメタゾン誘導ラット肝マイクロゾーム (Dexametazone-induced Male Sprague-Dawley rat liver microsomes (Lot No. NAS), 16 mg protein/ml, Dex), クロロフィブレート誘導ラット肝マイクロゾーム (Clorofibrate-induced Male Sprague-Dawley rat liver microsomes (Lot No. 1004), 18 mg protein/ml, Clo) は日本チャールスリバーから購入した。プールドヒト肝マイクロゾーム (Pooled human liver microsomes (Lot No. 70196), 20 mg protein/ml) は BD Biosciences から購入した。

分析用 HPLC (島津) は CBM-20A システムコントローラー, LC-20A ポンプ, SPDM20A UV/Vis PDA 検出器, CTO-10AC カラムオーブ

ンを用いた。カラムは CAPCELL PAK C18 MGII 5  $\mu$ m, 4.6 x 250 mm (資生堂)を用いた。移動層は A: 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)/H<sub>2</sub>O, B: 0.1% TFA/CH<sub>3</sub>CNを用いた。分取用 HPLC (センシユー化学) は SSC-660 グラジエントコントローラー, SSC-3465 ポンプ, SSC-5410 UV/Vis 検出器, SSC-3465 カラムオープンを用いた。カラムは SenshuPak PEGASIL ODS column, 5  $\mu$ m, 20 x 250 mm (センシユー化学)を用いた。移動層は A: 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O, B: 0.1% TFA/CH<sub>3</sub>CNを用いた。

<sup>1</sup>H NMR および <sup>13</sup>C NMR スペクトルは Varian MERCURY VX 400 を用いた。ケミカルシフトは D<sub>2</sub>O の場合は Sodium 3-(trimethylsilyl)-propionate-2,2,3,3-*d*<sub>4</sub> (TSP)を 0 ppm として補正した。

MS は低分解能 MS (LR-MS) を micromass ZQ (Waters), 高分解能 MS (HR-MS) を LTQ Orbitrap (Thermo Fischer Scientific) を用いて測定した。

LC-MS (Waters) は Alliance model 2695, Dual  $\lambda$  Absorbance Detector 2487, micromass ZQ を用いた。カラムは CAPCELL PAK C18 MGII 5  $\mu$ m, 4.6 x 250 mm (資生堂)を用いた。移動層は A: 0.1% HCOOH/H<sub>2</sub>O, B: CH<sub>3</sub>CN を用いた。

### 1. シロシングルクロン酸抱合体の酵素

反応溶液 10 ml (50 mM Tris-HCl (pH, 7.5), 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 25  $\mu$ g/ml alamethicin, 10 mM UDPGA, 10 mM シロシン) に 200  $\mu$ l Aroclor 1254 誘導ラット肝ミクロゾームを添加し, 37  $^{\circ}$ C, 20 時間緩やかに振盪してインキュベートした。10 ml 10% HClO<sub>4</sub> を添加して反応を止め, これを 3000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10 分間遠心して得られた上清をさらに 0.2  $\mu$ m フィルターにて濾過した。これを 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O にて希釈し, 数回に分けて分取用 HPLC にて精製を行った。

得られた画分を凍結乾燥し, 白色固体 (3.6 mg, 収率 19%) を得た。

LC (CAPCELL PAK C18 MGII 5  $\mu$ m, 4.6 x 250 mm, SHISEIDO, Flow: 1 ml/min, solvent A: 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O, B: 0.1% TFA/CH<sub>3</sub>CN, B conc of 5-30%, 15 min) R<sub>T</sub> = 9.6 min

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  2.74 (3H, s), 2.76 (3H, s), 3.15-3.28 (2H, m), 3.36-3.46 (2H, m), 3.49-3.59 (3H, m), 3.90 (1H, d, J = 9.6 Hz), 5.28 (1H, d, J = 7.6 Hz), 6.69 (1H, d, J = 7.2 Hz) 7.04 (1H, t, J = 8.0 Hz), 7.09-7.11 (2H, m)  
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  22.0, 42.6, 43.6, 59.0, 71.71, 71.73, 73.1, 75.9, 99.9, 103.6, 107.4, 123.1, 124.4, 138.8, 150.7

LR-MS 381 [M+H]<sup>+</sup>, 379 [M-H]<sup>-</sup>

HR-MS calcd for C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub><sup>+</sup> 381.1656, Found 381.1661 (delta 0.5 mmu)

### 2. シロシングルクロン酸抱合体の各種ミクロゾームによる合成

反応溶液 80  $\mu$ l に各種ミクロゾーム (詳細および略称は実験の部を参照) を 20  $\mu$ l 添加し (total 100  $\mu$ l, 各終濃度, 50 mM Tris-HCl (pH, 7.5), 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 25  $\mu$ g/ml alamethicin, 5 mM UDPGA, 5 mM シロシン), 37  $^{\circ}$ C, 20 時間緩やかに振盪してインキュベートした。100  $\mu$ l 10% HClO<sub>4</sub> を添加して反応を止め, これを 3000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10 分間遠心してタンパク質を除去した溶液 20  $\mu$ l を LC-MS にて分析した。

### 3. シロシン硫酸抱合体の合成

シロシン 0.56 g (2.8 mmol) をピリジン 10 ml に溶解した。Pyridine-sulfur trioxide complex 0.96 g (6.1 mmol) を添加し, 窒素雰囲気下, 5  $^{\circ}$ C にて 24 時間攪拌した。反応溶媒を減圧留去し, 残渣を 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O に溶解し, 逆相 HPLC にて精製した。得られた画分を凍結乾燥し, 白色固体 (0.34 g, 収率 43%) を得た。化合物は次第に青味を帯びてきた。



LC (CAPCELL PAK C18 MGII 5  $\mu$ m, 4.6 x 250 mm, SHISEIDO, Flow: 1 ml/min, solvent A: 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O, B: 0.1% TFA/CH<sub>3</sub>CN, B conc of 5-30%, 15 min) R<sub>T</sub> = 9.3 min

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  2.83 (6H, s), 3.14-3.18 (2H, m), 3.37-3.41 (2H, m), 6.96 (1H, t, J = 7.6 Hz), 7.04 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.07 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.12 (1H, d, J = 2.0 Hz), 9.14 (1H, br), 10.90 (1H, s)

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  21.9, 43.1, 58.7, 108.0, 108.9, 110.6, 120.3, 122.1, 124.2, 139.2, 147.4

LR-MS 285 [M+H]<sup>+</sup>

HR-MS calcd for C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>SNa<sup>+</sup> 307.0723, Found 307.0729 ( $\delta$  0.6 mmu)

## C. 研究結果

### 1. シロシングルクロン酸抱合体の酵素合成

前年度に報告した HMMA-Gluc の酵素合成法を参考にして、シロシングルクロン酸抱合体の合成を検討した (Figure 2). その結果、シロシンと UDPGA, MgCl<sub>2</sub>, alamethicin を含む溶液に Aroclor 1254 によってグルクロン酸転移酵素 (UGT) 等の薬物代謝酵素を誘導させたラット肝マイクロゾームを添加し、37°C で 20 時間インキュベートしたサンプルを HPLC にて分析すると、クロマトグラム上で、原料以外に新たなピークが現れた。そこで反応溶液に 10% HClO<sub>4</sub> を添加して反応を停止させ、分取 HPLC によりこの新規ピークを精製し、白色固体を得た。これを <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR およびマスペクトルにより構造を解析したところ、シロシンのグルクロン酸抱合体が生成していることがわかった。なお、<sup>1</sup>H NMR において、5.28 ppm に見られるアノメリックプロトン (H1') の H2' とのカップリング定数 (J 値) が 7.6 Hz であることからグルクロン酸は  $\beta$  配置で結合していることを確認した。精製して得られたシロシング

ルクロン酸抱合体の HPLC チャートを Figure 3 に示す。シロシングルクロン酸抱合体の保持時間は 9.6 分であった。同条件におけるシロシンの保持時間は 11.6 分であった。以上、本反応はシロシン 10mM を含む 10ml の反応スケールで行うことによって、3.6 mg (収率 19%) のグルクロン酸抱合体を得られることがわかった。

### 2. 各種マイクロゾームによるシロシングルクロン酸抱合体の酵素合成

前年度に報告した HMMA-Gluc の酵素合成では、Aroclor 1254 誘導ラット肝マイクロゾームを用いることにより 71% の収率で抱合体が得られるのに対して、今回、同じマイクロゾームで行ったシロシングルクロン酸抱合体の酵素合成の収率は 19% であった。この合成収率の違いは誘導された酵素に対する基質特異性が原因と考えられる。そこで次に、収率の向上を目指して、各種誘導剤によって前処置したラット肝マイクロゾームを用いて同様の酵素合成法を行い、グルクロン酸抱合体の合成収率について検討を行った。反応は 100  $\mu$ l スケールで 37°C 20 時間インキュベートして行い、抱合体の生成は LC-MS を用いて LC の保持時間およびその MS 情報によって確認した。酵素反応に対する各種誘導ラット肝マイクロゾームの影響は、生成した抱合体と未反応のシロシンの 254nm の吸光度から比較した。その結果を Figure 4 に示す。全てのマイクロゾームでシロシングルクロン酸抱合体を生成することが確認された。Aro の収量を 1 としたとき、Naph は 1.3, Clo は 0.4, Dex は 0.1, Phe は 0.3, Iso は 0.5 であった。また、rat は 0.4, human は 0.9 であった。これらの結果より、酵素反応を  $\beta$ -ナフトフラボンで誘導させたラット肝マイクロゾームで行うと、Aroclor 1254 誘導ラット肝マイクロゾームの場合と比べて収率を 1.3 倍に改善させられることがわかった。一方、今回の条件 (total 100  $\mu$ l,

5 mM UDPGA, 5 mM シロシン, 37°C, 20 時間インキュベート) では, 全てのマイクロゾームの場合において原料であるシロシンも検出されたことから, 反応が不十分であることもわかった. 反応条件の最適化が今後の課題である.

### 3. シロシングルクロン酸抱合体の化学合成

本研究では, 化学法によるシロシングルクロン酸抱合体の合成法についても検討した (Figure 5). まず, 化学合成に利用可能な溶媒としてシロシンに対する溶解性を検討したところ, シロシンはメタノール, DMF, アセトニトリルといった比較的極性の高い溶媒に溶解することがわかった. 一方, ジクロロメタン, クロロホルムには溶けにくく, ベンゼン, トルエン, ジエチルエーテル, ジオキサン, THF, アセトン, 酢酸エチル, ジクロロエタンには不溶であることがわかった.

続いて, HMMA-Gluc の化学合成に成功した反応系でシロシングルクロン酸抱合体の合成を試みた. 本反応は LiOH-DMF 溶媒系で行うのでシロシンは容易に溶解する. グルクロン酸ドナーとして Acetobromo- $\alpha$ -D-glucuronic acid methyl ester を用いて反応を行ったところ, 開始直後から反応液が黒く変色しはじめた. TLC にて反応の進行を確認したところ, 原点吸着のスポットが現れ, 目的の生成物は得られなかった. そこで LiOH の他に, NaH や  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  も検討したが生成物は得られなかった. 続いて一般的な O-グルクロン酸抱合体の合成法である Koenigs-Knorr 反応を検討した. まずトルエンや, ベンゼンなどの Koenigs-Knorr 反応に一般的に用いられる溶媒で検討したが, シロシンが溶解しないためか, 反応は進行しなかった. そこでシロシンをクロロホルムやジクロロメタンで溶解させ, 触媒に  $\text{Ag}_2\text{O}$  や,  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{AgOTf}$ ,  $\text{AgCl}$ ,  $\text{CdSO}_4$  を用いて反応を検討したが, どの条件でも反応が進まなかった. さらにクロロホルム溶媒中,  $\text{BF}_3$

や  $\text{TMSOTf}$  等のルイス酸を用いた反応も行ったが, 反応は進行しなかった. 反応が進行しない理由としてインドール環の NH 基の影響が考えられる為, NH 基を Boc 基で保護した化合物 9 を合成して同様の反応を試みた (Figure 6). 9 はシロシンに比べて安定な化合物であったが, いずれの反応条件でもグルクロン酸抱合体を合成することはできなかった.

### 4. シロシン硫酸抱合体の合成

シロシンのグルクロン酸抱合体は尿に含まれるシロシピン・シロシンの主代謝物として報告されているが, 硫酸抱合体に関する報告は現在のところ行われていない. しかしながら, 多くのトリプタミン系化合物が代謝物としてグルクロン酸抱合体とともに硫酸抱合体が検出されていることから, シロシンも硫酸抱合体として尿中排泄されていることが予測される. そこで尿中代謝物のより詳細なプロファイルを行うためにも, 標品およびそのスペクトル情報を用意しておくことは重要であると考え, シロシン硫酸抱合体の合成を試みた (Figure 7).

反応はピリジンに溶解したシロシン 2.8mmol に, Pyridine sulfur trioxide complex を添加し, 窒素雰囲気下, 5°C にて一昼夜攪拌して行った. 溶媒を減圧留去後, 残渣を 0.1% TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  にて希釈し, 少量を HPLC にて分析すると, 新規のピークが現れた. そこで, 全量を分取用 HPLC にて精製し, 得られたフラクションを凍結乾燥することにより, 白色固体 340mg を得た. これを  $^1\text{H}$  NMR および  $^{13}\text{C}$  NMR, マススペクトルにより構造解析を行い, シロシン硫酸抱合体であることを確認した. 以上, 43%での収率でシロシン硫酸抱合体を合成することができた. 精製して得られたシロシン硫酸抱合体の HPLC のクロマトグラムを Figure 8 に示す. シロシン硫酸抱合体の保持時間は 9.3 分であった. シロシン硫酸抱合体は, 精製直後は白色の固体であったが, 次第に青味

を帯びてきた。また、溶液状態で非遮光、室温で保管すると、直ちに不純物のピークが現れることから、シロシン硫酸抱合体は極めて不安定な化合物であると考えられる。

#### D. 考察

シロシピン、シロシンはマジックマッシュルームなどのキノコ類に含まれる幻覚成分である。体内に取り込まれることでシロシピンはリン酸基部分が加水分解されてシロシンへと代謝される。さらに、シロシンは4位のOH基が第II相代謝酵素により抱合化され、第II相代謝物として体外に排泄される。現在、これら幻覚成分を含むキノコ類の摂取の有無を鑑定する方法としては、加水分解処理した尿サンプル中からのサイロシンの分析が行われている。もし、尿サンプル尿を直接分析して第II相代謝物を検出できれば、感度の向上、分析時間の大幅な短縮が可能となる。そこで、本研究では、標品として用いるためのシロシンの第II相代謝物としてシロシングルクロン酸抱合体とシロシン硫酸抱合体の合成を行った。

我々は前年度、MDMAのグルクロン酸抱合体の合成方法の検討を行い、Aroclor 1254誘導ラット肝マイクロゾームを用いた酵素合成法が有効であることを報告した。そこで、シロシングルクロン酸抱合体の合成に本合成法が適用可能ではないかと考え検討を行った。その結果、シロシンをpH 7.5, MgCl<sub>2</sub>, alamethicin, UDPGAを含む溶液中で、Aroclor 1254誘導ラット肝マイクロゾームを酵素原として添加し、37°C, 20時間のインキュベートすることによって、グルクロン酸抱合体を合成することができた。本反応は10mMのシロシンを10mlスケールで行い、収量は3.6 mg, 収率は19%であった。同様のスケールで反応の本数を増やすことにより、大量合成は十分可能である。

さらに収率を改善する方法を見出すため、反

応系に添加するマイクロゾームの検討を行った。入手可能な薬剤誘導マイクロゾームを添加してグルクロン酸抱合体の生成を検討した結果、β-ナフトフラボン誘導ラット肝マイクロゾームを用いるとAroclor 1254誘導ラット肝マイクロゾームと比べて1.3倍の収率向上が見込めることがわかった。一方、他の誘導剤で処理したマイクロゾーム(Clo, Dex, Phe, Iso)を用いた場合は収率が低下することがわかった。なお、反応後の原料シロシンとシロシングルクロン酸抱合体の総和は各種マイクロゾーム間で大きく異なることから、用いるマイクロゾームにより回収率が異なることがわかった。収率の向上を図る為には、反応条件の最適化や回収法についてさらに検討する必要がある。

シロシピン、シロシンの第II相代謝物としてはシロシンのグルクロン酸抱合体が同定されているが、硫酸抱合体など、他の抱合体に関する報告はこれまでのところない。これは加水分解等の後処理により、シロシン硫酸抱合体が分解し、検出されていないという可能性が考えられる。従って、もし尿成分を直接解析して第II相代謝物の情報を得ることができれば、グルクロン酸抱合体以外の抱合体からも幻覚キノコ摂取の有無について証明可能となる。そこで、今年度は、シロシンの硫酸抱合体の合成についても検討を行った。その結果、シロシンにPyridine sulfur trioxide complexを反応させたところ、収率43%で硫酸抱合体を得ることに成功した。現在、提供可能なシロシン硫酸抱合体を0.3 g程度保有している。

本研究班ではこれまでに、シロシングルクロン酸抱合体の化学合成法として、トリクロロアセトイミデートや、N-メトキシフェニルトリフルオロアセトイミデートを有するグルクロン酸ドナーを用い、ルイス酸処理によって生成するオキソカルベニウムイオン中間体にシロシンの水酸基を反応させる方法が試みられているが、十分な収率は得られていない。そこで本

研究では Acetobromo- $\alpha$ -D-glucuronic acid methyl ester をグルクロン酸ドナーとして用いて、シロシンとの反応条件を検討した。通常グリコシル化反応で用いられるハロゲン化溶媒にシロシンは溶解し難い為、DMF 等の非アルコール性極性溶媒を用いて  $S_N2$  タイプの反応を行ったが目的とする付加体は得られなかった。また、非極性溶媒中の Koenigs-Knorr 反応やルイス酸を用いた反応を試みたが、いずれも反応は進まなかった。次に、インドール骨格のNHをBocで保護することにより水酸基の反応性を変化させて同様のグリコシル化反応を検討した。しかし、目的とするグルクロン酸付加体は得られなかった。

今後は、反応pHや基質、補酵素の各種濃度、反応時間等の反応条件等を最適化することで、鑑定に用いる標品として提供可能な量のサイロシングルクロン酸抱合体の大量合成を行う予定である。また、さらに、本研究の結果を応用して、各種麻薬物質の第II相代謝物の合成を行い、有用な情報を提供する予定である。

#### E. 参考文献

- 1) Hasler, F., Bourquin, D., Brenneisen, R., Vollenweider, F. X., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, **30**, 331-339.
- 2) Shirota O., Hakamata, W., Goda, Y., *J. Nat. Prod.*, 2003, **66**, 885-887.

#### F. 健康危機情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

- 1) 4-Hydroxy-3-Methoxymethamphetamine Glucuronide as a Phase II Metabolite of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine: Enzyme-Assisted Synthesis and Involvement of

Human Hepatic UGT2B15 in the Glucuronidation. Shoda, T., Fukuhara, K., Goda, Y. and Okuda H, *Chem. Pharm. Bull.*, in press.

- 2) Enzyme-assisted Synthesis of Peilocin Glucuronide. Shoda, T., Fukuhara, K., Goda, Y. and Okuda H, *Chem. Pharm. Bull.*, in preparation.

#### F. 学会発表

- 1) 正田卓司, 福原潔, 合田幸広, 奥田晴宏, 肝ミクロゾームによるMDMA代謝物の合成とヒトUGTの同定, 日本分析化学会第57年会(福岡)
- 2) 正田卓司, 福原潔, 合田幸広, 奥田晴宏, シロシン代謝物の合成に関する検討, 日本薬学会第129年会(京都)

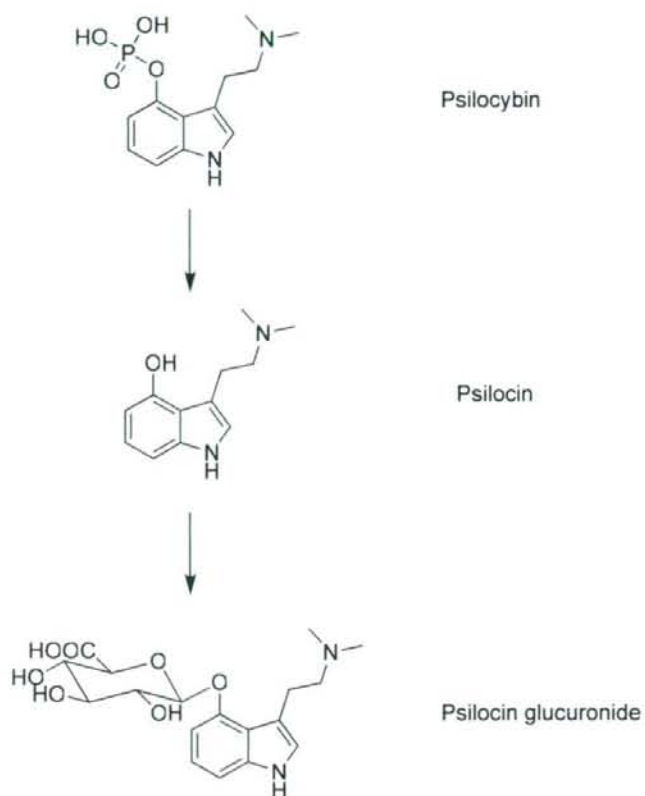


Figure 1 シロシピン, シロシンの代謝経路

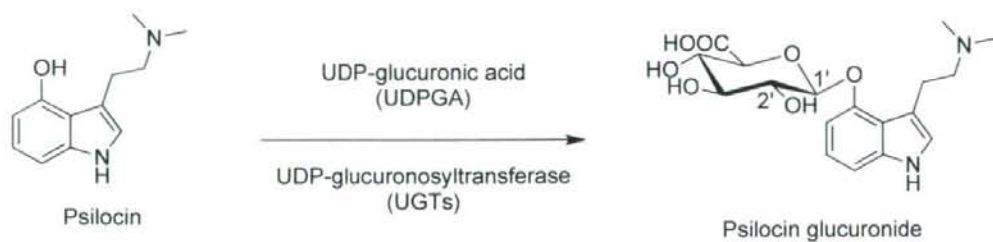


Figure 2 シロシンからシロシングルクロン酸抱合体の合成

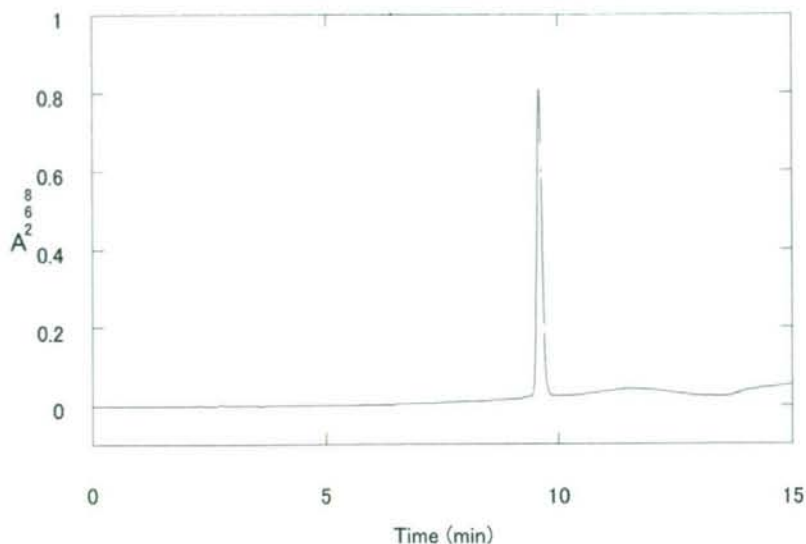


Figure 3 シロシングルクロン酸抱合体のクロマトグラム. LC (CAPCELL PAK C18 MGII 5  $\mu$ m, 4.6 x 250 mm, SHISEIDO, Flow: 1 ml/min, solvent A: 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O, B: 0.1% TFA/CH<sub>3</sub>CN, B conc of 5 - 30%, 15 min) R<sub>T</sub> = 9.6 min

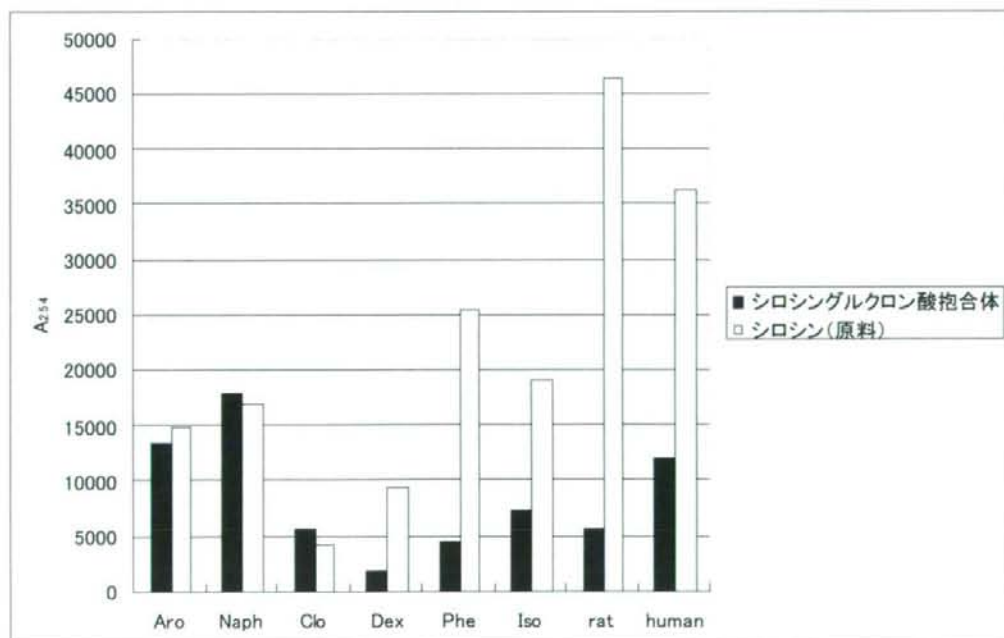


Figure 4 各種マイクロゾームによるシロシングルクロン酸抱合体の生成率. 縦軸は A<sub>254</sub>.  
マイクロゾームの略称は研究方法を参照.

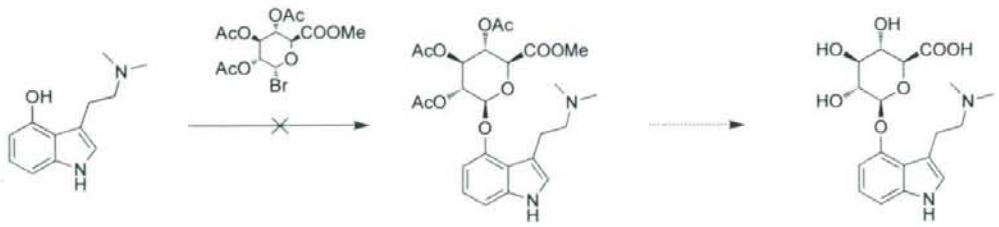


Figure 5 Acetobromo- $\alpha$ -D-glucuronic acid methyl ester をグルクロン酸ドナーとして  
用いたサイロシングルクロン酸抱合体の合成

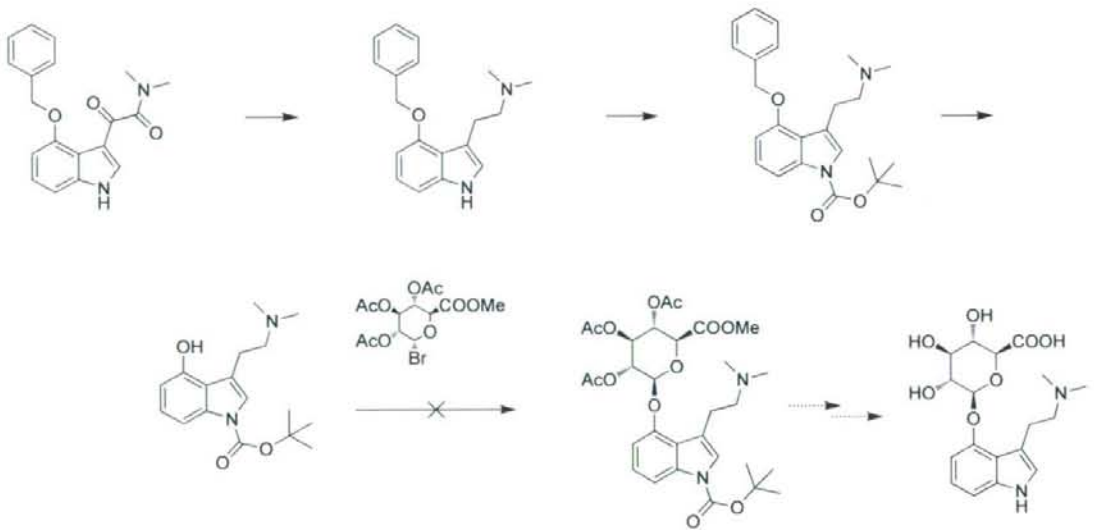


Figure 6 シロシングルクロン酸抱合体の合成

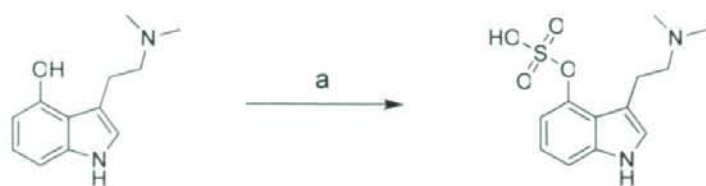


Figure 7 シロシン硫酸抱合体の合成

a) pyridine sulfur trioxide complex, pyridine, 5 °C, O/N, y. 43%

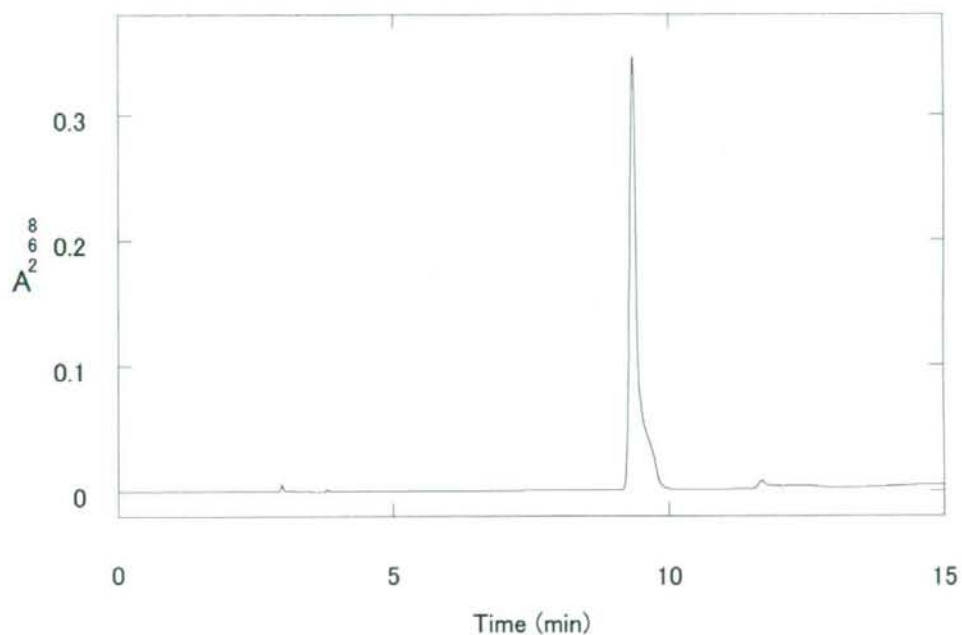


Figure 8 シロシン硫酸抱合体のクロマトグラム, LC (CAPCELL PAK C18 MGII 5  $\mu$ m, 4.6 x 250 mm, SHISEIDO, Flow: 1 ml/min, solvent A: 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O, B: 0.1% TFA/CH<sub>3</sub>CN, B conc of 5 - 30%, 15 min) R<sub>T</sub> = 9.3 min



分担研究報告書

分担研究課題 植物系薬物の調査と分析及び代謝物の合成に関する研究

分担研究者 徳島文理大学香川薬学部 准教授 代田 修

要旨 網羅的合成法により得たエフェドリン類について、揮発性イオンペア試薬を用いた新たな分析条件の検討を行った。また、マジックマッシュルームの幻覚性成分シロシン・シロシビンの推定代謝産物であるグルクロン酸包合体について合成を行った。

A. 研究目的

様々な幻覚性植物が麻薬や覚せい剤の代用として、お香（スモークインセンス）や植物標本、観賞用植物などの仮の名目で売られてきたが、これらはいわゆる「違法ドラッグ」であり、含有される成分が麻薬や覚せい剤、医薬品などの化合物とその構造が類似するものも多い。これらは植物（ハーブ）であることで、その受けるイメージが優しくなり、比較的安易な使用がなされる可能性がある。近年、これら違法ドラッグの一つであったマジックマッシュルームが麻薬原料植物として規制され、また、幻覚物質であるサルビノリンAを含有するサルビア（*Salvia divinorum*）が薬事法の指定薬物に指定されたことは、記憶に新しい。しかし、これらが規制されても、また違う植物系薬物が広まることは、容易に想像される。

エフェドラアルカロイドは、マオウに含有される主活性成分であり、覚せい剤であるメタンフェタミンなどの原料となりうる。日本薬局方におけるマオウのエフェドラアルカロイドのHPLC分析は、ラウリル硫酸ナトリウム（SDS）を用いたイオンペア法の原理に基づく。しかし、この分析法では、全エフェドラアルカロイド6種を網羅的に分

析することが困難であることが判明した。また、質量分析法と組合せて検出すること（LC/MS）を想定すると、局方の分析法において使用している不揮発性のSDSを排除した移動相を用いる必要がある。しかしながら、通常LC/MSに用いられる移動相では、アルカロイド以外の成分に由来するピークが多数被さって現れるので都合が良くない。そこで今回、揮発性イオンペア試薬を添加した移動相を用い、エフェドラアルカロイドの一斉分析を検討した。

いわゆる“マジックマッシュルーム”と呼ばれる幻覚性キノコは、その活性成分としてシロシン（psilocin:1）およびシロシビン（psilocybin:2）を含有するため、平成14年6月6日より麻薬原料植物として規制された。しかし、日本国内において普通に自生しているヒカゲシビレタケなどもこれらの幻覚成分を有している。それ故、販売品が規制により市場から姿を消しても、自然に生えているものを採取することも考えられる。そのため、ヒトが摂取した後、その摂取の有無を鑑定することが必要である。そこで、1および2の推定代謝物であるシロシングルクロン酸抱合体（psilocin-4-O- $\beta$ -glucuronide:3）を合成し、検査のための標準品とすることを目

的とした。

## B. 研究方法

### 1. エフェドラアルカロイドの一斉分析の検討

昨年度確立した網羅的合成法により得たエフェドリン類全6種について、HPLC分析の条件を検討することとした。また、検出器としてLC/MSよりも安価な荷電化粒子検出器(CAD)を用いて検討することにした。荷電化粒子検出器(CAD)は、分析成分を球状微粒子とし、コロナ電極により荷電化されたプラスの窒素イオンと衝突させることで分析成分分子をプラスに帯電させ、この電荷量を電流値として測定することを原理としている。そのため、その化学構造や性質に関わらず不揮発性成分の検出が可能となる。分析には、揮発性イオンペア試薬として、トリフルオロ酢酸(TFA)、ペンタフルオロプロピオン酸(PFPA)、およびヘプタフルオロ酪酸(HFBA)を用いた。移動相は、揮発性イオンペア試薬をそれぞれ5、10、20 mMに調製した水性溶離液とアセトニトリルとの混合溶液を用いた。また、一般的なODSカラムにて分離を行った。

#### <測定条件>

装置: Prominence LC-20 (Shimadzu)

検出器: Corona CAD (ESA)

カラム: Mightysil RP-18; 4.6 φ x 150 mm;  
5 μm (関東化学製)

カラム温度: 35 °C

インジェクション量: 10 μL

移動相: 5-20 mM 揮発性パーフルオロカルボン酸/アセトニトリル

流量: 1.0 ml/min

### 2. シロシン代謝物の合成

シロシンの推定代謝物であるシロシン-4-*O*-β-グルクロニド(3)の合成は、既報

の方法に準じて合成した1をアクセプターとして用い、ドナーとしての活性化グルクロン酸誘導体には、イミデート体であるトリクロロアセトイミデート体(4)と、更に活性が高いと考えられる*N*-メトキシフェニルトリフルオロアセトイミデート体(5)を用いた。さらに、カルバメート体としてトリクロロアセチルカルバメート体(6)も検討に加えた。また、カップリング反応は、BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>をはじめとする種々のルイス酸を用い、モレキュラーシーブの有無や、さらには反応溶媒についても検討した。

## C. 研究結果

### 1. エフェドラアルカロイドの一斉分析の検討

想像されたように、フルオロカーボン側鎖が一番長いHFBAを用いたときエフェドラアルカロイドの保持が一番強かった。しかし、HFBAとPFPAでは、エフェドラアルカロイド6種の内2種のピークが重なった。唯一TFAを用いた場合に、まだ分離は不十分であるが、6本のピークとして検出できた。また、水性溶離液の割合が大きいくほど、検出感度が下がる傾向が見られた。15 mM TFAを用いた場合に分離が最適となった。また、簡易な分析条件として、0.1% TFAを用いた場合、エフェドラアルカロイド検出限界は16.7 pmol (2.5-3 ng)であった。さらに、簡易条件によりマオウ抽出物を分析したところ、エフェドラアルカロイド以外の成分が重なる部分もあるが、概ね分析が可能であった。

### 2. シロシン代謝物の合成

4をドナーとして種々反応条件の検討を行ったが、収率の改善は見られなかった。そこで、ドナーをさらに活性が高いとされる5を用いたところ、反応自体は綺麗であ

り、TLC 上でも生成物が主要スポットとして確認できたが、またも満足行く収率では得られなかった。さらに、6 を用いた場合では、反応自体が殆ど進まなかった。結局、カップリング反応は 25-30%という低い収率のまま改善せず、C-グルクロニドを含むいくつかの副生成物を生じた。次にカップリング体をアルカリ性条件下で脱保護を行い、目的とする 3 を 50%で得た。このステップでも副生成物が生じ、生成物の化学的性質上、分取 HPLC を頼るしか無かった。

#### D. 考察

##### 1. エフェドラアルカロイドの一斉分析の検討

0.1% TFA を揮発性イオンペア試薬として用いることで、マオウのエフェドラアルカロイドの一斉分析が可能となることが判明した。今後、この条件をもとに、LC/MS によるエフェドラアルカロイドの一斉分析を確立したい。

##### 2. シロシン代謝物の合成

今回検討したシロシングルクロン酸抱合体の合成は、未だ満足行く収率を得られていない。今後、反応条件の更なる検討を行うと共に、得られたグルクロン酸抱合体を *in vivo* 代謝産物と HPLC 等で比較する予定である。

#### E. 参考文献

- 1) O. Shirota, W. Hakamata, Y. Goda, *J. Nat. Prod.*, **66**, 885-887, (2003).
- 2) R. T. Brown, N. E. Carter, S. P.

Mayalarp, F. Scheinmann, *Tetrahedron*, **56**, 7591-7594, (2000).

- 3) B. Yu, H. Tao, *Tetrahedron Lett.*, **42**, 2405-2407, (2006).
- 4) K. Jayakanthan, Y. D. Vankar, *Carbohydr. Res.*, **340**, 2688-2692, (2005).
- 5) J. Matsuo, T. Shirahata, S. Omura, *Tetrahedron Lett.*, **47**, 267-271, (2006).

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

論文発表等

なし

学会発表

- 1) 代田 修、安藤広和、関田節子. 荷電化粒子検出器を用いたエフェドラアルカロイド一斉分析の検討. 日本生薬学会第 55 年会、平成 20 年 9 月 19-20 日、長崎.
- 2) 代田 修、永松久実、関田節子. シロシングルクロン酸抱合体の合成. 日本生薬学会第 55 年会、平成 20 年 9 月 19-20 日、長崎.
- 3) Shirota, O., Research on the Terpenoid Constituents of Some Medicinal Plants. 2008' Shanghai International Symposium for Pharmaceutical Sciences, Dec 19-20, 2008, Shanghai, China.

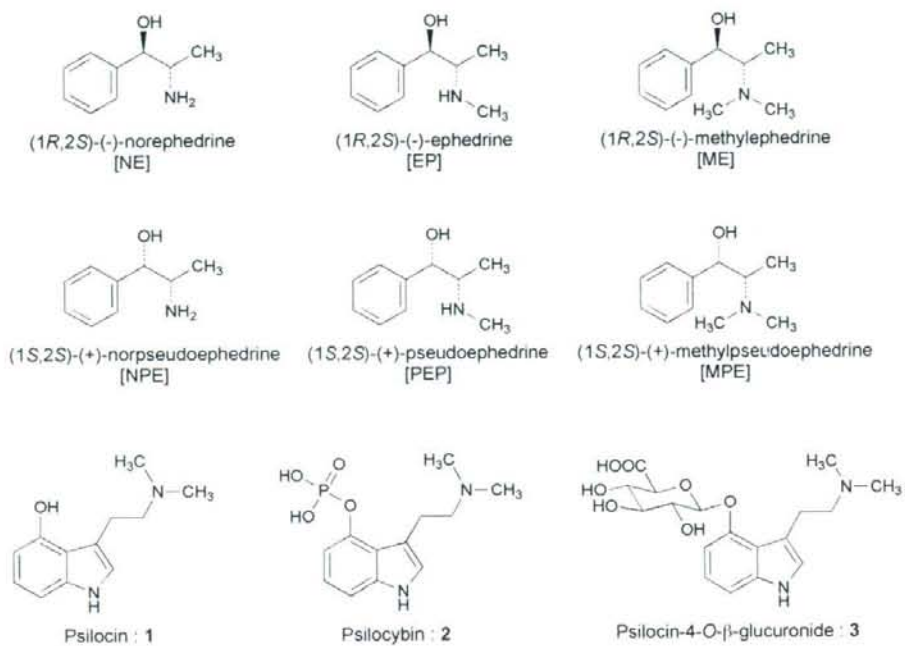


図1. エフェドラアルカロイドおよびシロシン類の構造