

資料-4 ミャンマー北部の水生昆虫

日本の生薬には、水生昆虫を用いたものがあります。例えば、孫太郎虫（ヘビトンボの幼虫）は子供の疳の薬です。近年アジア地域では民族薬物を活用したプライマリーヘルスケアが実現されつつあります。

今回採集した場所はカチン州プタオ付記の溪流で、採取したものは 20 種類で、これらの鑑定を谷田一三教授に（大阪府立大学総合科学部自然環境学）にお願いした。鑑定結果は表に示すとおりである。はじめて見る属、日本と共通だが未見の種も多く興味深いものであるとのコメントを貰った。

| sample | order | family | name | japanese name | number |
|--------|---------------|--------------------|----------------------------------|-------------------|--------|
| 1 | Plecoptera | Perlidae | Kaninuria sp. | kanimura-kawagera | 1 |
| 1 | Plecoptera | Perlidae | Paragnetina sp. | kurakake-kawagera | 2 |
| 1 | Hemiptera | Aphelochiridae | Aphelochilus sp. | nabebutamusi | 2 |
| 2 | Megaloptera | | Protohermes sp. | hebitonbo | 1 |
| 2 | Trichoptera | Limnacentropodidae | Limnacentropus | kitagami-tobikera | 1 |
| 4 | Trichoptera | Hydropsychidae | Hydropsyche sp. (one white spot) | sima-tobikera | 2 |
| 4 | Trichoptera | Hydropsychidae | Hydropsyche sp. | sima-tobikera | 1 |
| 4 | Trichoptera | Hydropsychidae | Hydropsyche sp. | sima-tobikera | 1 |
| 4 | Trichoptera | Polycentropodidae | Plectrocnemia sp. | iwa-obikera | 1 |
| 4 | Trichoptera | Rhyacophilidae | Rhyacophila sp. | nagare-tobikera | 1 |
| 4 | Ephemeroptera | Baetidae | Baetis sp. | ko-kagerou | 1 |
| 5 | Plecoptera | Perlidae | Classenia sp. | no Japanese genus | 1 |
| 6 | Plecoptera | Perlidae | Kaninuria sp. | kanimura-kawagera | 3 |
| 6 | Plecoptera | Perlidae | Phanoperla sp. | no Japanese genus | 1 |
| 6 | Ephemeroptera | Heptageniidae | Epeorus sp. (spines) | hirata-kagerou | 1 |
| 6 | Ephemeroptera | Baetidae | Baetis sp. | ko-kagerou | 1 |
| 6 | Ephemeroptera | Ephemerellidae | Ephemerellina sp. | no Japanese genus | 3 |
| 7 | Megaloptera | | Protohermes sp. | hebitonbo | 1 |
| 8 | Plecoptera | Perlidae | Kaninuria sp. | kanimura-kawagera | 1 |
| 9 | Plecoptera | Perlidae | Classenia sp. | no Japanese genus | 1 |

資料-5 セッコクと基原植物の微量化学分析による同定法の検討

朝比奈はるか お茶の水女子大学 人間文化創成化学研究科 研究員
徳島文理大学 香川薬学部 教授 関田節子、准教授 代田修

研究要旨 麻薬代替営農作物のひとつとして、漢方生薬セッコクを選び、基源植物同定研究を行った。市場で流通しているセッコク商品が基原植物不明のまま混在している現状を科学的に把握する手段として基原植物の同定を補助するための、微量分析技術を用いた化学成分による種間の類縁関係類推の可能性について、植物及び生薬を用いて検討した。園芸種より単離したdendrobine及びnobilonineを指標とし、LC-MSによる分子種の解析とLC-CADによるdendrobineの定量を試みた。種による分子種の分布スペクトルは特徴を持っており、外部形態および遺伝子のいずれか或は両方で判断できない場合には、成分分析が有効な補助手段になる可能性が示唆された。

A. 研究目的

漢方薬に使われる生薬の基原植物の同定は、生薬の品質を保証する上で極めて重要である。本研究は麻薬代替営農作物のひとつとして条件を備えた、すなわち需要の高い漢方生薬セッコクを選抜する過程で、基原植物の同定に関する問題を解決することを目標としている。セッコク (*Dendrobium* 属植物を修治したもの) の基原植物の同定は、その花以外による外部形態では古くから難しいとされてきたため、昨年度の漢方生薬セッコクの基原植物の系統樹解析研究に引き続き、同定を補助するための微量分析技術を用いた化学成分による種間の類縁関係類推の可能性を探ることを目的とした。更に、植物および生薬を用いて定性分析及び定量分析データ利用の可能性を検討した。

B. 研究方法

広く *Dendrobium* 属植物に分布すると考えられたアルカロイド成分である dendrobine 類に着目し、同属植物の微量

な試料から調製した多種のサンプルについて、

1. Dendrobine 及び周辺分子種の種間分布について、LC/MS(液体クロマトグラフ/質量分析計)による定性分析を行った。

2. 更に dendrobine を標品として LC/CAD(液体クロマトグラフ/荷電化粒子検出器)による定量分析を行った。

使用した試料は、主に日本の野生種及び園芸種の乾燥粉末サンプルで、それに加え、2008年に中国昆明植物研究所と共同で精製したエキスを使用した。

(*Dendrobium nobile*, *D. moniliforme*, *D. tosaense*, *D. okinawense*, *D. officinale*, *D. loddigesii*, *D. fimbriatum*, *D. moscatum*, *D. pulchellum*)更に、市場で入手した 16 種のセッコク生薬もサンプルとした。

分析条件として以下を設定した。

・分析サンプルの調製

サンプル：乾燥粉末サンプル 500 mg

抽出：80% MeOH、10 mL;

超音波処理：15 min x 2

・定性分析 (LC/MS)

LC 部分 : Acquity UPLC system

(Waters Co. Ltd.)

質量分析計 : Q-ToF micro

(Micromass Co. Ltd.)

測定・解析ソフト : MassLynx 4.0

(Micromass Co. Ltd.)

カラム : Acquity UPLC BEH C18;

1.7 μm ; 2.1 x 100 mm (Waters)

分析条件 : 10 μL /injection;

0.1%TFA/ACN(90:10-60:40,v/v);

0.35 mL/min

・定量分析 (LC/CAD)

HPLC : Prominence series (島津)

検出器 : CoronaTM CADTM

(ESA Biosciences, Inc)

測定・解析ソフト : LC Solution (島津)

カラム : Cosmosil 5C₁₈-MS-II Type、

5 μm 、4.6 x 150mm (ナカライ)

分析条件 : 10 μL /injection;

0.1%TFA/ACN(85:15,v/v);1.0 mL/min

C. 研究結果及び考察

1. LC/MS による分子種の検出 :

定性分析

標準物質である dendrobine 及び

nobilonine を指標とし、各サンプルの含有分子種の検出を LC/MS により行った結果、*D. nobile* には両方の指標成分、*D. moniliforme* には nobilonine 及び未知の分子を 6 分前後に検出した(図-1)。また、*D. moniliforme* の中でも、新しい茎(葉有り)での成分と、古い茎(葉無し)での成分の相対比はそれぞれ異なっていた。また Dendrobine は必ずしも *Dendrobium* 属植物に共通のものではないことが判明した(共にデータ非表示)。他の 7 種のセッコク属植物全般にわたり、特徴的な複数の未知の物質がそれぞれあるいは数種に共通して示され、これらの物質の同定を進めれば、植物の同定を助ける手段として働き、ケモタキソノミー的なアプローチが有効となると考えられた。生薬からの分子種の検出は、現在指標にできる *Dendrobium* 属植物由来の化合物の数が少ない(今回は dendrobine と nobilonine)こともあり、この段階では同定の決定打には結びつかず、基原植物から検出できる分子種の同定を待ってから行うことが、より情報を得るのに有効であることが確認された。

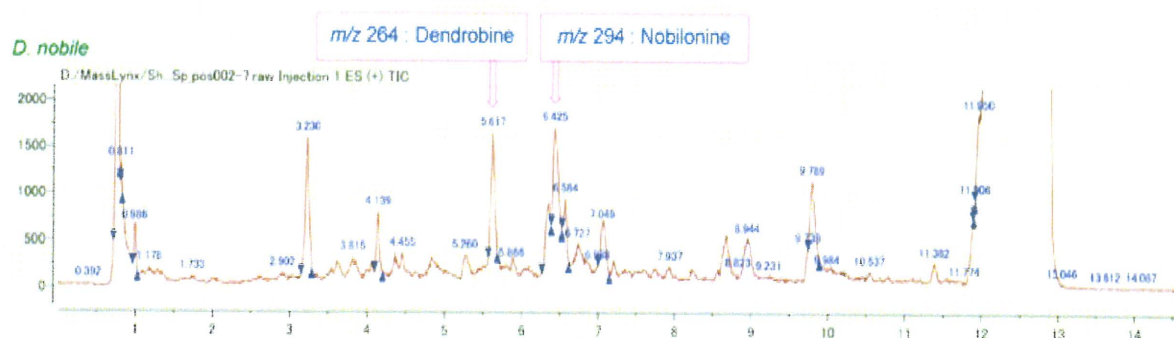


図-1 LC/MS による含有分子種の検出

2. CAD 検出器による dendrobine の定量分析

次に、UV 吸収をもたない dendrobine の定量を Corona™ CAD™ 検出器により試みるため、まず UV254nm 検出器による波形と比較したところ、CAD™ 検出器では dendrobine および nobilonine の明瞭なピークを観察した(図-2)。Dendrobine を含有していることを確認済みの *D. nobile* (No. noch, nocc) のサンプルには明らかに dendrobine が検出された(図-3)。しかし MS で dendrobine が不検出であったサンプル(例えば、*D. moniliforme* であるサンプル No. mok 及び mom)にも Corona™ CAD™ 検出器による dendrobine 溶出ピーク時間にはピークが弱いながらもある程度観察され(図-3)、CAD™ 検出器の感度の良さが結果として誤測定を引き起こす可能性が考えられた。このことから目的の物質(今回は dendrobine)との共存物質をできる限り取り去るような抽出条件を探し出す必要性があると考えられた。

E. 結論

外部形態及び遺伝子のいずれか或は両方で基原植物の同定ができない場合には、成分分析が有効な補助手段になると考えられた。Dendrobine や Nobilonine は *Dendrobium* 属(そしてさらに下位の *Dendrobium* 節)に必ずしも共通しては存在しないことが明らかとなり、この結果はこれらのアルカロイドが種の同定に有効な指標物質のとなりうることを示唆している。しかし *Dendrobium* 属植物、いわゆるセッコクの種類は 1000 以上あり、同定の補助情報とするには更に複数の分子種を単離・同定し、指標物質の種類を増やすことが必要である。Corona™ CAD™ 検出器による定量については、感度の良さが結果として誤測定を引き起こすこと避けるため、目的の物質(今回は dendrobine)との共存物質をできる限り取り去るような抽出条件を探し出す必要性があると考えられた。ケモタキソノミー的なアプローチには指標となる複

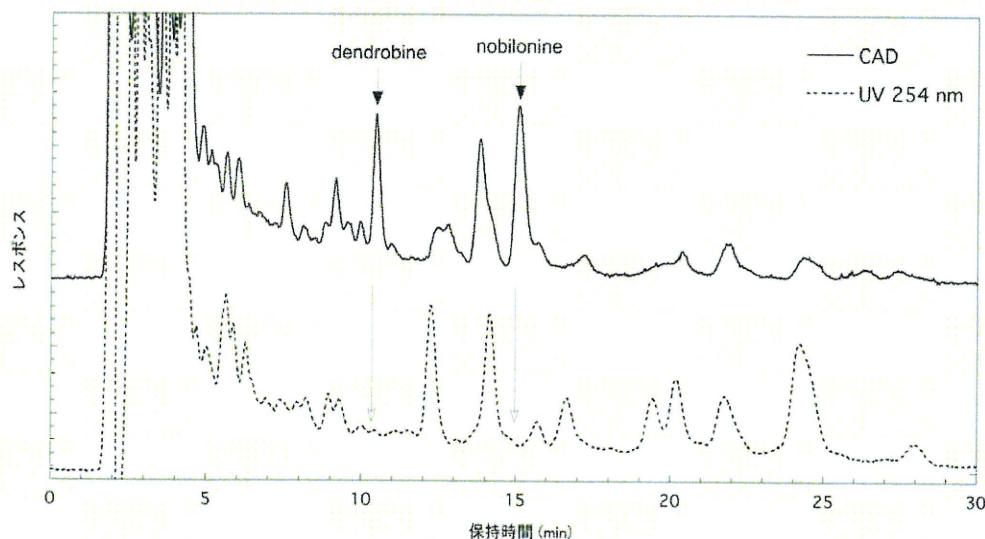


図-2 CAD と UV_{254nm} によるクロマトグラムの比較

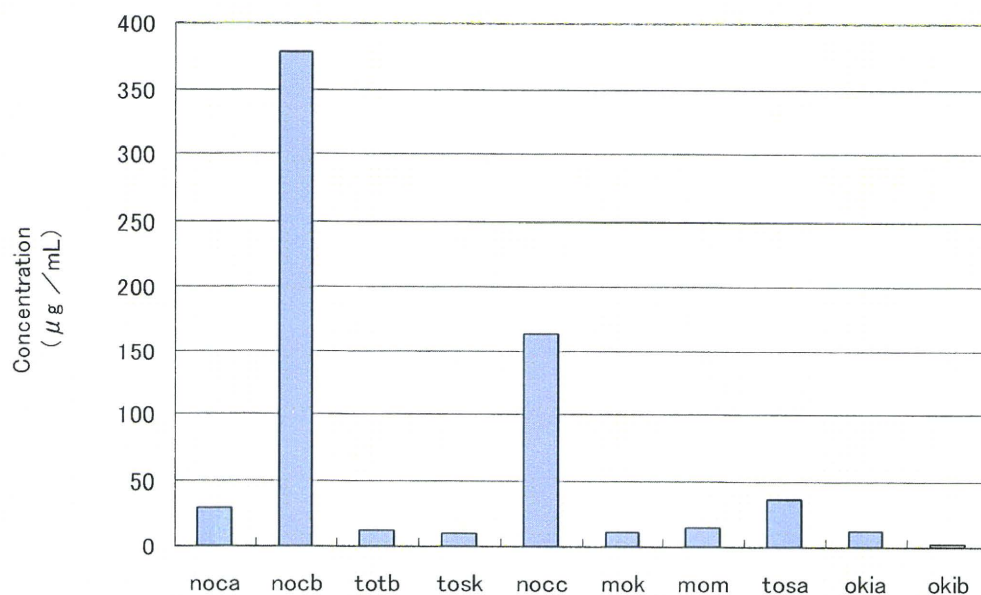


図-3 LC/CADによる dendrobine の定量

D. nobile 園芸交雑種 (noca, nocb, nocc)、*D. tosaense* (totb, tosk, tosa)、*D. moniliform* (mok, mom)、*D. okinawense* (okia, okib)

数の化学成分の同定が必要であり、また標品の精製には一定量の植物が必要になるが、ラン科植物の特殊事情(CITES等)により植物の入手が最も難題であり、

標品の単離・同定のための栽培なども視野に入れる必要性が考えられた。

参考文献、引用文献共になし

資料 6-1 ミャンマー市場の薬用植物 2010年

Medicinal plant in Myanmar (Yangon Maechet, Sandhi Brothers Trading Co.,LTD)

11.12.2010.

| No | Myanmar Name | Myanmar Name | scientific name | useful part | family name |
|----|--------------|--------------|--------------------------------|------------------|----------------|
| 1 | ကရဝေးရွက် | karauieie- | <i>Cinnamomum oblongifolia</i> | leaf | Lauraceae |
| 2 | ဆောင်စေခါး | saunme-u- | <i>Acolus</i> sp. | rhizoma | Araceae |
| 3 | စူလာနုဖာ | suranafa | | whole plant | |
| 4 | စယို | sayo | <i>Menispermaceae</i> plant | stem | Menispermaceae |
| 5 | နန္ဒင်းတက် | nanintetu | <i>Curcuma longa</i> | rhizoma | Zingiberceae |
| 6 | နာဂမုန်း | nagamon | <i>Zingiberaceae</i> plant | rhizoma | Zingiberceae |
| 7 | ဆီမီးတောက် | si-mi-tau | <i>Orchis</i> sp. | rhizoma, bulb | Orchidaqceae |
| 8 | ဂမုန်း | gamon | <i>Zingiberaceae</i> plant | rhizoma | Zingiberceae |
| 9 | မိုးသလ | manioga | | bark | |
| 10 | ဆေးပုလဲ | se-pare | <i>Gentiana</i> sp. | root | Gentianaceae |
| 11 | တောရှောက် | tousyau | | wood | |
| 12 | ကျွမ်းဖက် | konfa | <i>Plantago psydium</i> | seed | Plantaginaceae |
| 13 | ဂုံညှင်းနီး | gon-niindo- | <i>Entada</i> sp. | seed | Leguminosae |
| 14 | ခရက်ကီး | taieji- | <i>Croton oblongifolius</i> | stem | Euphrbiaceae |
| 15 | ဂျင်းချောက် | jinchau | <i>Zingiber officinale</i> | rhizoma | Zingiberceae |

資料6-2 ヤンゴン購入の生薬写真

1. ကာဝေးရွတ် Karauieie

Cinnamomum oblongifolia



2. ဆောင်စေခါး Saunme-u

Acolus sp.



3. ဟန်ဖာ Suranafa

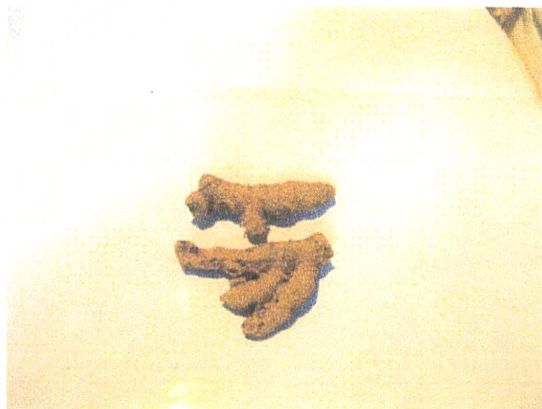


4. ဓယံ Sayo *Menispermaceae* plant



5. နန္ဒိတတ် Nanintetu

Curcuma longa



6. နာဂမုန့် Nagamon

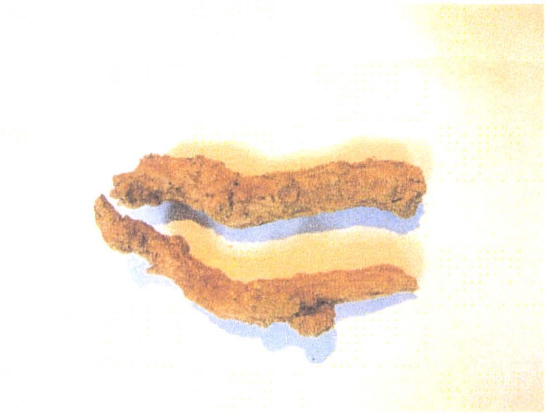
Zingiberaceae plant



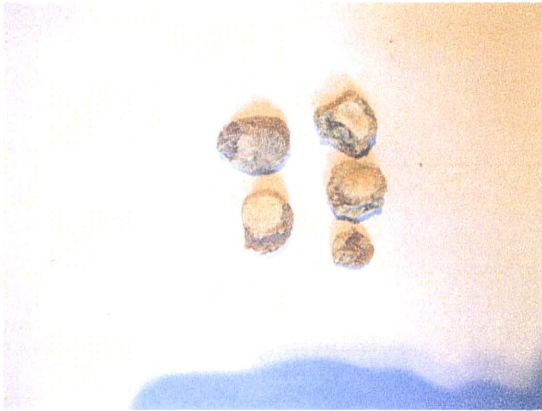
7. ဆိမိတောက် Si-mi-tau *Orchis* sp.



10. ဆေးပုလဲ Se-pare *Gentiana* sp.



8. ဂမုန်း Gamon *Zingiberaceae* plant



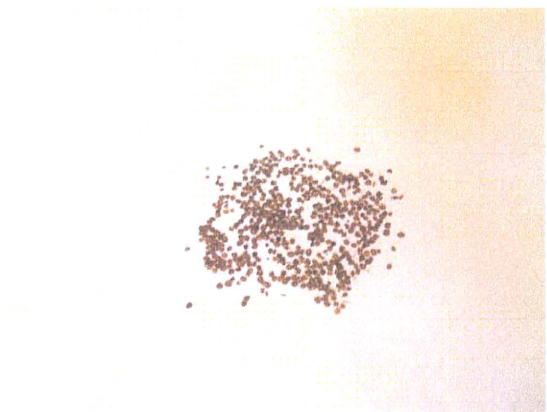
11. တောရောင် Tousyau



9. မွဲသဃ Manioga



12. ကွမ်းဖတ် Konfa *Plantago psydium*



၁၃. ဂုံညင်းနီ Gon-niindo *Entada* sp.



၁၄. ဘရဲတံတီး Taieji-
Croton oblongifolius



II-2. 分担研究報告書

覚せい剤(ATS)の原料物質エフェドリンに関する研究

高純度覚せい剤のプロファイリング —簡便で高感度な原料エフェドリン類の検出—

研究分担者 長野 哲雄 東京大学大学院薬学系研究科 教授

研究要旨 本研究は、世界各地で正規流通している覚せい剤原料 *l*-ephedrine 及び *d*-pseudoephedrine (エフェドリン類)の化学的情報を覚せい剤密造用原料の規制対策に役立てることを目的としている。これまでの研究では、覚せい剤プロファイリングを課題にして、不純物分析による合成ルート推定(GC-MS)、光学異性体分析(HPLC)及び炭素・窒素・水素の安定同位体比質量分析(IR-MS)による覚せい剤原料の起源推定について検討し、その有用性を明らかにしてきた。近年、日本を含む東南アジア諸国で純度の高い覚せい剤が押収される傾向があり、覚せい剤のプロファイリングにおいて、原料物質がエフェドリン類であると推定されても検出できない例が増え、東南アジア諸国の覚せい剤プロファイリング分析に大きな支障が出ている。そこで、本年度は、東南アジア諸国の法化学研究室に設置されている汎用型のHPLCを用い、抽出や誘導体化等の前処理を省いた密造原料エフェドリン類の簡便で高感度な分析法を確立し、関係国の担当者に技術指導を行った。カラムは ODS系の MGII (4.6 I.D. x 250 mm)を用い、6%アセトニトリル含有 50 mM KH₂PO₄水溶液の均一濃度の移動相を用いた。試料溶液は前処理操作なしで、*d*-methamphetamine/HCl 結晶 20 mg を水 1 mL に溶かし、その溶液 50 µL を直接注入した。本法は汎用されている HPLC による簡便でかつ高感度な分析法であり、近年増加している高純度 *d*-methamphetamine/HCl 結晶の原料に関する化学情報として役立つものである。

研究協力者

牧野 由紀子 東京大学薬学部
薬品代謝化学教室 研究員

A. 研究目的

社会の不安を背景に心の病が広がる今日、芸能人による覚せい剤やコカインの薬物乱用事件、学生の大麻事件、向精神薬乱用事件と薬物問題が次々と発生している。その都度、薬物の恐ろしさについて大きく報道がなされている。しかし、

薬物乱用をくい止めるには啓発活動により薬物の需要を絶つと同時に薬物の供給源自体を絶つことがきわめて重要である。本研究は、1998年の国連麻薬犯罪取締局(UNODC)主催の覚せい剤のプロファイリングに関する東京会議をスタートとしている。その後、アンフェタミン型覚せい剤(ATS)とその原料物質についての化学情報による取締行政への支援に関する様々なプロジェクトが、関係国で積極的に繰り広げられている。本研究は覚せい

剤問題解決のため関係国の法化学者と連携をとり、覚せい剤の原料規制に役立つ化学情報の提供を目的としている。UNODC の 2010 年の SMART (Synthetics Monitoring, Analyses, Reporting and Trends) プロジェクトでの報告書では、アジア太平洋地域全体で、最も乱用が広まっている薬物はメタンフェタミンであるとの分析がなされている。また、覚せい剤等 ATS の密造所は世界の様々な国に拡散傾向にある。密造所が多いのは最大の需要があるアジア太平洋地域で、中国の広東省、四川省、湖北省、黄金の三角地帯(ミャンマー、タイ及びラオスの三国境に接する)、ミャンマーの山岳地帯、インドネシア、マレーシア、フィリピン及びオーストラリアで大小の密造所が摘発されている。覚せい剤の密造所の摘発やトン単位の押収があった東南アジアの法化学研究所では覚せい剤の密造原料規制への化学情報の活用に関心をいただき、ネットワークを組んでの取り組みを UNODC の協力を得て 2009 年 11 月にスタートさせ、Asian Forensic Sciences Network (AFSN)にて、情報交換をすすめている。本分担研究の成果は、本年度ブルネイで開催された AFSN の会議で報告するとともに、インドネシアの法化学研究所からの依頼で、ラボを 2 回訪問し技術支援を行った。東南アジア諸国の法化学研究所では、既存の汎用機器を用いての化学情報を得るプロファイリングを実施する必要に迫られている。汎用型の GC-MS や HPLC の設置が進んでいる東南アジア諸国では、覚せい剤のプロファイリングで GC-MS を使用した有機不純物分析や HPLC を用いた光学異性体分析については実施可能となっている。し

かし、高純度な覚せい剤の流通が多くなってきたことに伴い、製造法の推定に重要なキー不純物を GC-MS 分析で検出できない例が増加している。特に *l*-ephedrine 及び *d*-pseudoephedrine の検出が難しくなっている。本報告書では、汎用型の HPLC を用い、抽出や誘導體化といった煩雑な前処理を必要としない簡便でかつ高感度な原料エフェドリン類の検出について検討したので報告する。

B. 研究方法

1. 試料

l-Ephedrine 及び *d*-pseudoephedrine の両塩酸塩は富士薬品製を、内部標準試料 2-phenylethylamine/HCl は東京化成製品を使用した。*l*-Norephedrine は徳島文理大学香川薬学部代田准教授より譲り受けた。*d*-Methamphetamine/HCl 七試料は、厚生労働省より交付を受けた日本で裁判終了後の押収品を用いた。水は MILLI-Q ADVANTAGE A10 (日本ミリポア社製)により製造した精製水を用いた。その他の試薬は HPLC 分析用を購入し使用した。

2. 装置と分析条件

装置は Agilent 製及び Shiseido 製のフォトダイオードアレイ検出器付液体クロマトグラフを用いた。分析カラムは Shiseido 製 ODS 系 MGII (4.6 I.D. x 250 mm)を使用した。カラム温度は 40 °C、注入量は 50 µl で、検出は UV 吸収波長 210 nm でモニターした。移動相は acetonitrile と緩衝液 50 mM KH₂PO₄ の混合液を用い、組成は下記の通りとした。流速は 1.0 mL/min とした。

A 液 : 50 mM KH₂PO₄、B 液 : acetonitrile
B 液% : 6% (0 min) → 6% (20 min) →
13% (20.1min) → 13% (35.0 min)

→6 % (35.1 min) →6 % (60 min)

3. 試料調製及び HPLC 分析

標準品試料溶液は、*l*-ephedrine 及び *d*-pseudoephedrine の両塩酸塩の濃度がそれぞれ 10 µg/mL (10 ng/µL) の水溶液を調製した。内部標準物質としては 2-phenylethylamine/HCl の 10 µg/mL 水溶液を調製した。添加実験用試料は、押収品の中から純度の高い *d*-methamphetamine/HCl を選び、再結晶を 5 回繰り返して、本分析系で *l*-ephedrine 及び *d*-pseudoephedrine の両塩酸塩が検出されないことを確認したものを使用した。再結晶は、溶媒に chloroform を用い、*n*-hexane を滴下して結晶を析出させた。

検出感度及び再現性の精度検討用試料としては、再結晶を繰り返した試料 200 mg を直接ガラス製容器にはかりとり、ミリ Q 水 10 mL を加え、良く攪拌した試料液から 1 mL ずつ、5 つの容器に小分けした。各試料液に内部標準物質溶液 (10 ng/µL) を一定量 (20 µL) 添加し、*l*-ephedrine 及び *d*-pseudoephedrine の両塩酸塩の標準品試料液をそれぞれ 3、6、9、12 ppm の含有濃度になるように添加した。9 ppm 添加試料調製を例として示すと下記のようなになる。測定は各濃度の試料につき 5 回おこなった。注入量は 50 µL とした。

I.S. 溶液のみ添加試料調製：

試料液 1 mL + I.S. 溶液 20 µL + 水 18 µL

9 ppm 添加試料調製：

試料液 1 mL + I.S. 溶液 20 µL + 標準品
混合試料液 18 µL

標準品混合試料液調製：

A 液 100 µL + B 液 100 µL + 水 1800 µL

(A: *d*-pseudoephedrine/HCl 5.0 mg in H₂O 25 mL

B: *l*-ephedrine/HCl 5.0 mg in H₂O 25 mL)

I.S. 試料液調製：

C 液 100 µL + 水 1900 µL

(C: 2-phenylethylamine 5.0 mg in H₂O 25 mL)

押収品試料としては、エフェドリン類の含有について予備的に本法で分析し、濃度範囲が 20 ppm 以下の純度の高い押収品 6 試料と 20 ppm 以上の 1 試料を選んだ。いずれの試料も塩基性 (pH 10.5) で液-液抽出した試料の GC-MS による不純物分析でエフェドリン類を密造原料としていることを示唆するキー不純物が GC-MS で検出されているが、エフェドリン類は検出できなかった試料である。試料溶液としては、各結晶試料 50 mg を直接ガラス製容器にはかりとり、ミリ Q 水 2.5 mL を加えた溶液を用意し、2 つの容器に 1 mL ずつ小分けした。各試料溶液 1 mL に内部標準物質溶液 (10 ng/µL) を 20 µL と水 18 µL を添加した溶液と内部標準物質溶液 (10 ng/µL) を 20 µL と *l*-ephedrine 及び *d*-pseudoephedrine の両塩酸塩を 9 ppm 相当含有となるよう 10 ng/µL の標準品混合溶液を 18 µL 添加した 2 試料を準備した。測定は各試料について 5 回ずつおこなった。各試料溶液の注入量は 50 µL とした。

C. 研究結果及び考察

1. HPLC 条件の検討

本報で対象とした *l*-ephedrine 及び *d*-pseudoephedrine の両塩酸塩の構造式は Fig.1 に示す通りで、いずれも覚せい作用のある *d*-methamphetamine の密造用原料である。本報の目的は、法化学実験室に設置されている汎用型 HPLC を用い、煩雑な抽出や誘導体化の前処理を必要としない簡便であるが高感度な覚せい剤原料 *l*-ephedrine 及び *d*-pseudoephedrine の両塩酸塩を覚せい剤押収品結晶から検出する

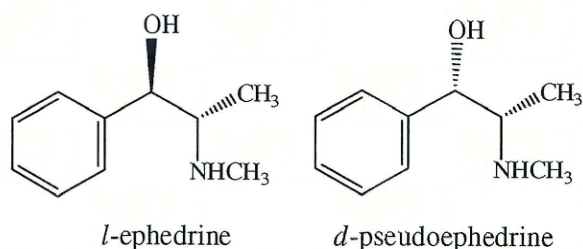


Fig.1 Chemical structures of the ephedrines investigated in this study.

分析法を提案することであるので、其の点に焦点を当て検討を行った。2002年の報告では、ODS系カラム CAPCELL PAK C₁₈ UG-120 を用い、移動相に SDS を添加し塩基性化合物とイオンペアを形成させることで見掛け上非イオン性化合物としてカラムへの保持力をもたせ、適切な分離を確保した[1]。しかし、カラムの保持力の限界に近い濃度の試料注入で、微量成分エフェドリン類の検出感度は 500 ppm までであった。そこで、UG-120 同様の ODS 系カラムであるが、UG-120 よりシリカゲルのシラノール基の高水準封鎖と直鎖アルキル(C₁₈)基の導入量の増加で、保持力が高くなるよう設計された CAPCELL PAK C₁₈ MG II (4.6 x 250 mm) を多種類の市販カラムから選び検討した。移動相は、ODS 系カラムの劣化を招きやすくコンデショニングに時間のかかる界面活性剤 SDS を使用せず、単純なリン酸緩衝液 50 mM KH₂PO₄ と acetonitrile の混液を用い、*l*-ephedrine 及び *d*-pseudoephedrine の両塩酸塩の分離に適する比率を検討した。逆相系カラムの場合には有機溶媒比率を低くするほど分析対象成分の保持が強くなるが、5%以下になると疎水性の高いカラム表面で、液の表面張力で水系移動相は充填剤細孔内から流出するようになり、逆に分析対象成分の保持が弱くなる。そこで、*l*-ephedrine

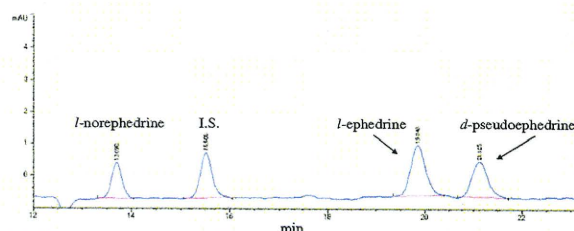


Fig. 2 Chromatogram of *l*-norephedrine/HCl 2-phenylethylamine/HCl, *l*-ephedrine/HCl and *d*-pseudoephedrine/HCl in water

と *d*-pseudoephedrine の両塩酸塩の最適な分離が得られる acetonitrile の含有率を 15%~6% の間で検討した。Fig.2 に *l*-norephedrine/HCl を加えた標準品のみ水に溶かした試料のクロマトグラムを示す。Acetonitrile の割合が 6% で *l*-ephedrine と *d*-pseudoephedrine の両塩酸塩の分離係数 (R_s) は 1.9 で、完全分離の基準となる 1.2 以上の十分な分離係数が得られた。多量の主成分中の微量成分の分析では、バルクな主成分のカラムへのオーバーロードの影響で微量なエフェドリン類の分離度の低下が予測されたが、3 ppm、6 ppm、9 ppm 及び 12 ppm を添加しての R_s は 1.2~1.3 であり十分な分離を維持できた。一例として再結晶をした試料に *l*-ephedrine と *d*-pseudoephedrine の両塩酸塩を各 3 ppm を添加してのクロマトグラムを Fig. 3 に示す。次に、6% acetonitrile 含有の均一濃度の移動相で連続分析の影響について検討したところ、徐々に保持時間の変動が起こり、14 回目の分析では内部標準物質の保持時間が 2 分の 1 になった。本分析では、注入量 50 μ L あたり 1 mg の *d*-methamphetamine/HCl を含有という高濃度の主成分及び不純物がカラムに保持されていることが予測されるので、連続分析では、それらがカラムに徐々に蓄積されていくことにより、保持に影響がで

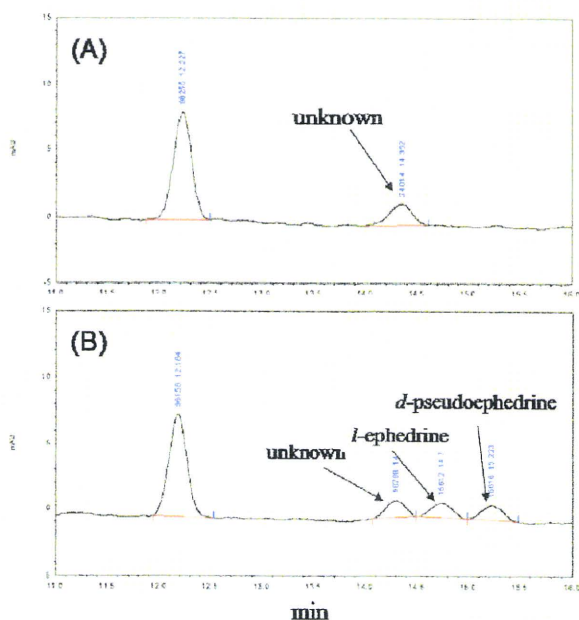


Fig. 3 Chromatograms for recrystallized methamphetamine/HCl (A) and spiked (B) with analytes at 0.06 µg each in 20 mg crystal methamphetamine/HCl (3 ppm)

ていることが想定された。そこで、本分析対象物質であるエフェドリン類が溶出しきるまでは 6% acetonitrile の均一濃度の移動相を用い、その後はカラム圧の変動しない 13% acetonitrile 組成の移動相を 15 分間流し、更に 6% acetonitrile 組成の移動相を流してカラムのコンデショニングを行うこととした。その結果、*l*-ephedrine と *d*-pseudoephedrine の両塩酸塩の含有量がそれぞれ 3 ppm、6 ppm、9 ppm 及び 12 ppm の混合標準溶液を添加して連続分析(n=20)を行い、内部標準物質、*l*-ephedrine と *d*-pseudoephedrine の両塩酸塩の保持時間の再現性をみた結果は、それぞれ 0.63%、0.76%及び 0.78%の相対標準偏差(RSD)が得られ良好であった。*l*-Ephedrine と *d*-pseudoephedrine の両塩酸塩のピーク面積値の再現性は Table-1 に示すとおりであり、3ppm 添加の場合は少し変動が大きかったが、定性分析を目

的とする本分析においては再現性の良いクロマトグラムが得られたと考える。濃度とピーク面積との関係は、3~12 ppm の濃度範囲で良好な関係が得られた。検出限界については、3 ppm 添加の場合、*l*-ephedrine が $S/N = 7.4$ で、*d*-pseudoephedrine が 7.5 であった。ピーク面積の再現性は Table-1 に示したように 3 ppm で *l*-ephedrine の RSD が 9.3%、*d*-pseudoephedrine が 5.9%であり、S/N 値及び再現性値から、3 ppm が微量の定性分析を目的とする本条件での検出限界と考える。参考までに、本分析条件では、*l*-norephedrine 塩酸塩は内部標準物質として用いた 2-phenylethyl- amine 塩酸塩の保持時間より早く、本分析目的に影響を及ぼすことはなかった。本報での内部標準物質は定量のために使用したのではなく、カラムの良否の状況把握が目的である。

2. 押収品中の *l*-ephedrine 及び *d*-pseudoephedrine の検出

日本で押収された高純度の *d*-methamphetamine/HCl 結晶 7 サンプル中の *l*-ephedrine 及び *d*-pseudoephedrine の検出は、内部標準物質溶液のみを添加した試料液と 9 ppm の濃度になるよう *l*-ephedrine 及び *d*-pseudoephedrine の両塩酸塩の標準品溶液及び内部標準物質溶液を添加した 2 試料を用意し、各試料液について 5 回測定し、比較した。標準品を 9 ppm 添加したクロマトと内部標準物質のみ添加したクロマトグラムについて、保持時間及び peak 面積を比較し、ピークの定性確認を行った。この方法は HPLC での定量分析時に用いられる内部標準法と標準物質添加法を組み合わせる定性分析に利用したものであり、薄層クロマトグラフィー(TLC)での混ぜ打ちと呼ばれ

Table 1. Reproducibility of the peaks of 2-phenylethylamine, *l*-ephedrine and *d*-pseudoephedrine in bulk methamphetamine

| Concentration | Ratio of Peak Area Mean \pm RSD (%) (n = 5) | |
|---------------|---|---|
| | <i>l</i> -ephedrine/2-phenylethylamine | <i>d</i> -pseudoephedrine/2-phenylethylamine. |
| 3 ppm | 0.14676 \pm 9.3 | 0.18609 \pm 5.8 |
| 6 ppm | 0.34134 \pm 3.9 | 0.36518 \pm 4.4 |
| 9 ppm | 0.52041 \pm 3.8 | 0.53887 \pm 2.6 |
| 12 ppm | 0.72367 \pm 1.1 | 0.72185 \pm 2.9 |

る基礎的な手法の応用である。試料番号1~7の各クロマトグラムで、番号5の試料では *d*-pseudoephedrine の UV スペクトルを得ることができなかつたが、他の試料については UV スペクトルを得ることができた。9 ppm 添加しての対応ピークの保持時間での面積増加による定性確認に加え UV スペクトルが得られることでより信頼性の高い定性分析をすることが可能であったと考える。試料5と6での *l*-ephedrine 及び4と7の *d*-pseudoephedrine は検出限界以下の微量であったが、UV スペクトルが得られたので trace とした。クロマトグラム及び UV スペクトルの一

例を Fig. 4 に示す。参考までに、*l*-ephedrine 及び *d*-pseudoephedrine の 2-phenylethylamine に対するピーク面積比と内部標準物質のみ添加した試料のクロマトで、それぞれの比の差の値を 9 ppm 相当とし、1点標準添加法であるが、含有量を推定した結果を Table-2 に示す。試料1については 200 ppm 程度の含有率が推定されたので、試料液(20mg/mL)を 20 倍希釈して他の試料同様に試料調製し測定した。押収品である覚せい剤結晶は純度が高くて含有されている不純物

Table 2. Estimated concentrations of ephedrines in samples of seized *d*-methamphetamine hydrochloride (ppm)

| Sample | <i>l</i> -ephedrine | <i>d</i> -pseudoephedrine |
|--------|---------------------|---------------------------|
| 1 | 183 | 102 |
| 2 | 43 | 8 |
| 3 | 6 | 3 |
| 4 | 3 | trace (2) |
| 5 | trace (1) | N.D. (not detected) |
| 6 | trace (1) | 10 |
| 7 | 3 | trace (1) |

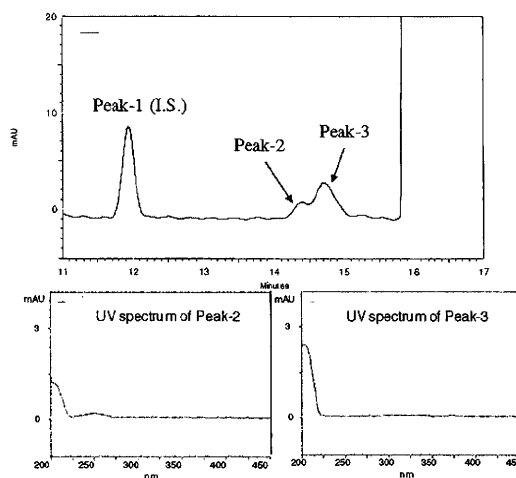


Fig. 4 Chromatograms and UV spectra of *d*-methamphetamine/HCl seized in Japan (sample 6)

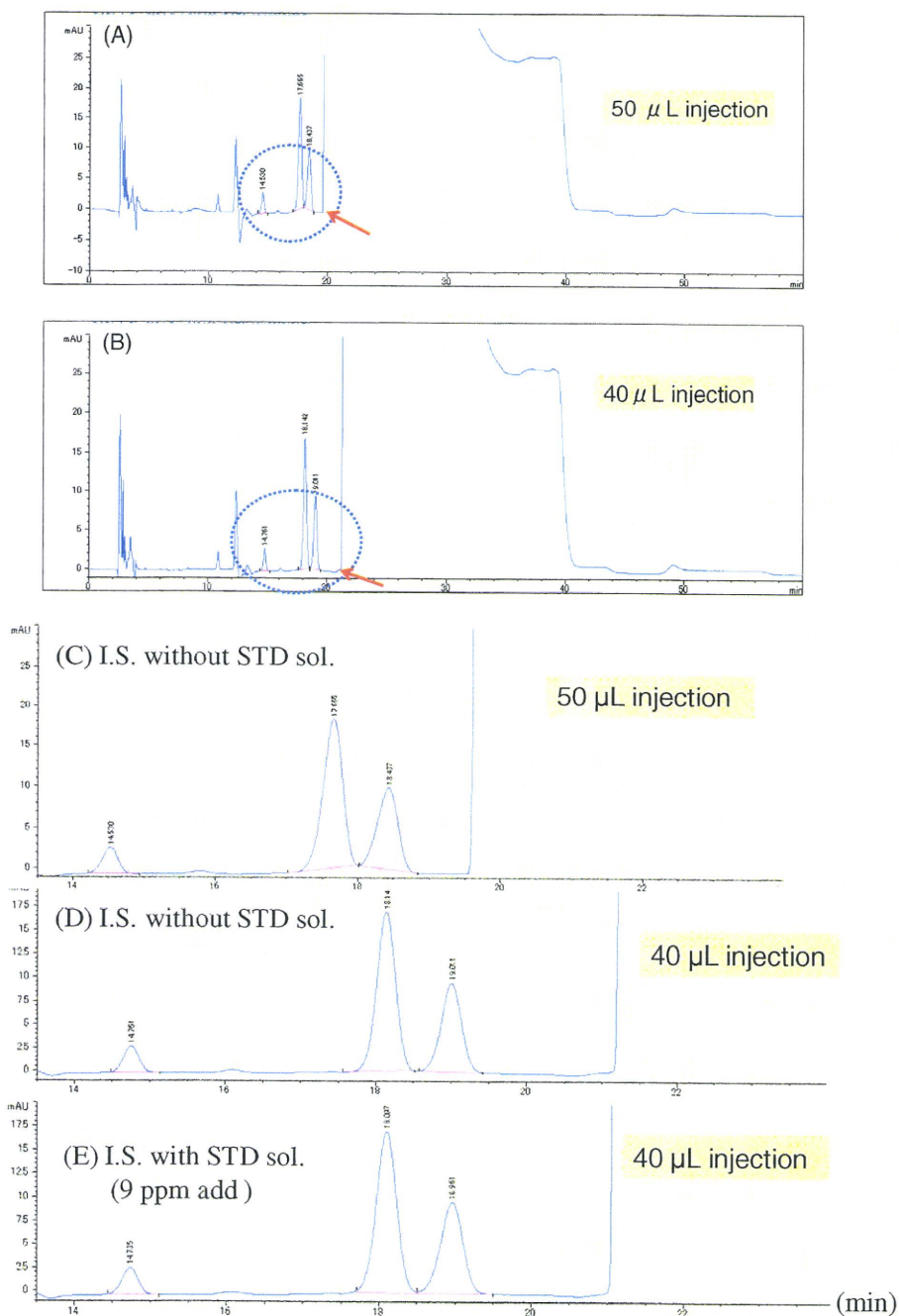


Fig. 5 Comparison of chromatogram by the variation of injection volume. Chromatograms (C, D & E) at lower part are partial enlargement of chromatogram at upper part.

の化学的性質は多様で予測できない。同じように試料調製し、50 μL 注入でも *d*-methamphetamine のピークの出始める時間 (Fig. 5 の赤矢印)が微妙に変動する。ただし、同じ試料溶液で同容量の注入ではピークの出始める時間は一定である。

そこで、微量のエフェドリン類の良いクロマトグラムを得るには、まず 50 μL 注入してデータを得て、*d*-methamphetamine のピークの出始める時間が 20 分より早く、エフェドリン類の分離が不十分な場合には、注入量を 40 μL に変更した方

がエフェドリン類の良い分離が得られる。Table 2に記載した番号1の試料溶液を50 μL と40 μL 注入したクロマトグラムをFig.5の(A)と(B)に、それぞれのクロマトグラムの点線の丸で囲った部分を拡大したクロマトグラムを(C)と(D)に、標準品試料溶液を添加した試料のクロマトグラムを(E)に示した。この試料の場合には40 μL 注入した方が *l*-ephedrine と *d*-pseudoephedrine の良好な分離結果が得られた。本分析の目的は純度の高い覚せい剤の押収品に微量存在していると推測されるエフェドリン類の検出であるため、試料により注入量を考えながら分析することが必要である。更に、カラムへの不純物や多量のメタンフェタミンの付着履歴の影響でエフェドリン類の分離が不十分になることも十分予測されるので、そのような場合にはコンデショニングを十分に行う必要がある。更に、連続していくつかの試料を分析する場合には、水みの試料を注入し、試料の履歴による不純物ピークの有無をチェックしながら行うと良いクロマトグラムが得られる。本分析系で内部標準物質として使用した2-phenylethylamine は定量のためではなく、カラムの状況を把握するためであり、このピークの保持時間の変動やピークの形状の変化をチェックし、最良の状況で分析を行うのに役立てた。

D. 結論

ODS系カラム CAPCELL PAK C₁₈ UG-120 や phenyl- β -CD-type カラムによる HPLC での検出限界は 500 ppm で [1]、岩田等の CE を用いた分析方法[2]では検出

限界が 40 ppm であった(岩田等の論文では検出限界が 0.04 ppm と記載あるが、誤記であることを著者との検討で確認してある)。本分析法で、*d*-methamphetamine/HCl に含有される微量の *l*-ephedrine 及び *d*-pseudoephedrine を煩雑な前処理操作である抽出や蛍光誘導体化を省略し、3 ppm まで高感度分析することが可能となった。ただし、通常の GC-MS での不純物分析等でエフェドリン類が検出できる場合には、本法を行う必要はない。本法は通常の方法でエフェドリン類が検出できないが、プレカーサーとしてエフェドリン類を用いていることが他の分析で推定される純度の高い覚せい剤のプロファイリングで利用すると役立つ結果が得られる方法である。本報告で選んだ押収品は不純物分析で、エフェドリン類を原料としていることか推定されていたが検出できない純度の高い試料であり、本分析で検出されたことは、覚せい剤密造原料推定用化学情報として役立つ結果であったと考える。法化学分野では、各国の諸事情で必ずしも各種の最新の分析装置が十分に設置されているところばかりではないのが現状であり、汎用されている HPLC 装置での簡便で高感度な分析法の確立は意義あるものである。

F. 参考文献

1. Y.Makino, Y.Urano, T.Nagano, *J. Chromatogr. A*, 947 (2002) 151-154
2. Y.Iwata, H.Inoue, K.Kuwayama, T.Kanamori, K.Tsujikawa, H.Miyaguchi, T.Kishi, *Forensic Sci Int.* 161 (2006) 92-96

II-3. 分担研究報告書

麻薬植物の不法栽培地域での代替薬用植物の導入研究

研究分担者 関田節子 徳島文理大学香川薬学部 教授

研究要旨 ミャンマーの重要な森林資源であるチークノキ *Tectona grandis* の葉に熱帯リーシュマニア原虫に対する活性を検討し、有用な成分を見出した。

研究協力者 安元加奈未

徳島文理大学香川薬学部 助教

A. 研究目的

ミャンマー連邦山間地域に代替植物を導入し経済植物栽培を確立する方策の一つとして、現地の有用植物の活用を検討している。そのためには科学的な選定基準を設定し、健康に寄与するものであるとの理解を得ることが必要である。そこで、現地に生育する植物を対象に抗リーシュマニア活性等を検討している。WHO の報告によると、リーシュマニア症は新旧大陸の熱帯地域 88 カ国に蔓延し、少なくとも 1200 万人の患者がいるとされている。現在用いられているアンチモン製剤は、副作用が強く、厳しい管理の下でしか適用できないため、有効かつ副作用が少なく安価な医薬品の開発が望まれている。これまでに、我々は、抗リーシュマニア活性が顕著であった成分として、*Paris tibetica* Franc からステロイド配糖体である (25R)-spirost-5en-3-β-yl-O-α-L-arabino-furanosyl-(1-4)-O-[α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)] β-D-glucopyranoside など 2 種類の化合物を、また、ウルシ科の植物 *Semecarpus*

anacardium からは ursiol 類似の新規化合物 3 種を見出し、構造決定を行った。また、古文献に香りが良く化粧品として利用されていると記述されている *Cordia fragrantissima* Kurz. の化学的研究を行い、新規ハイドロキノン化合物 3 種を含む 8 成分の構造決定と活性強度の比較を行った。さらに、建築材・家具材や仏壇、野球のバットに使用されているカキノキ科の *Diospyros burmanica* Kurz. について検討し、活性試験と成分検査を行い、新規ビスナフトキノン 4 種ならびに新規ナフトキノン 2 種を含む 14 種の成分を単離同定した。

本年度は、以前より研究に着手しているチークノキ *Tectona grandis* Linn. について、抗リーシュマニア活性を示した葉の成分研究を進めた。*T. grandis* はミャンマーの重要な森林資源の一つで、材を主に高級家具に使用している。本研究では、通常、資源として利用されず、廃棄される葉の有効利用を検討するべく、葉のメタノールエキスについて活性成分の探索と構造決定、活性を検討した(1)。また、21 年度にミャンマーカチン州プタオ郡において入手した 3 種の植物について抗リーシュマニア活性試験を行った

ので併せて報告する(2).

B. 研究方法

(1) 試料 *Tectona grandis* の葉は主任研究者より供与された。

(2) 現地名ドローチャ、トゥエアーサー、ゴーリィチャについては研究協力者が平成 21 年度にミャンマー調査にて入手した。(学名は不明)

溶媒、試薬類は和光純薬工業、化学用を用いた。NMR 測定は Bruker Avance-700 並びに 400 を使用した。

Leishmania 原虫の培養: *Leishmania major* の前鞭毛体 (promastigote) は 25cm² tissue culture Flask 中 10%FCS 入り Medium199 培地を用いて 26.5 度 5% CO₂ に設定した CO₂ インキュベーター内で培養を行い、2-3 日後コンフルエント到達後 50~100 倍希釈を行い継代とした。アッセイに使用するリーシュマニアは、使用直前に血球計算板上でカウントし、Medium 199 培地により 1x10⁶ promastigotes/mL に希釈して用いた。

活性評価 (in vitro): 試料は DMSO に溶解した後、Medium 199 培地で希釈し、メンブレンフィルターを通した。試料溶液は 9 つの濃度に調製し、96 穴マイクロタイタープレートに各濃度の試料溶液 50 μL と、1x10⁶ promastigotes/mL となるように調製した *L. major* 液 50 μL をそれぞれ接種し、培養液の全量を 100 μL とした。27 度 5% CO₂ 下で 48 時間インキュベーターを行った後、Tetracolor ONE (生化学工業) 試薬を加え、6 時間のインキュベーターの後にマイクロプレートリーダーにより OD 値 (450-630nm) を測定

した。試験は n=3 で行い、平均値および平均誤差を求めてグラフを作成した。

IC₅₀ はグラフより求めた。

抽出と単離: (1) 葉 (3.0 kg) は、メタノールにてホモジナイズ後、温浸抽出を 3 回繰り返し抽出した。メタノールエキスは、水と酢酸エチルで分配し、活性を示した酢酸エチル抽出物 (MIC: 6.25 μg/mL) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付した (*n*-hexane: ethyl acetate = 7:3, Silica gel 60N, 40-50 μm, Kanto Chemical Co.,). 分画した各フラクションについて、リーシュマニア原虫を用いたバイオアッセイに従って、さらにシリカゲル中圧カラムクロマトグラフィー (*n*-hexane: ethyl acetate = 1:1, UV254 nm, RI range 128)、ODS オープンカラムクロマトグラフィー (methanol: water = 8:2-9/1-95/5-100/0, Cosmosil 75C18-OPN, Nakalai tesque)、HPLC を繰り返し行うことで化合物 **3** を得た。(HPLC condition: Mobile Phase/acetonitrile: water-1:1, Detection/UV at 210 and 254 and 280, RI range 64, Column/ Shiseido CapcellPak C18 MG 5 μm, ø20×250 mm, Flow Rate/ 5.0 mL/min).

(2) 現地名ドローチャ、トゥエアーサー、ゴーリィチャについては乾燥後グラインダーで粉碎した後、メタノール及び水で温浸抽出を 3 回繰り返し減圧濃縮後サンプルとした。

C. 研究結果

(1) 今回得られた化合物 **3-14** について、各種機器分析 (NMR, HRMS) を用いて構造を推定した。化合物 **3** は新規化合物

であった。

得られた化合物一覧を図 1 に示した。これらの構造のうち、図 2 に示した化合物 3 の構造について以下に詳細に述べる。化合物 3 は、 $^1\text{H-NMR}$ において、シングレットメチルが 4 本で積分値 12H 分、アセテートメチル 1 本 6H 分、アセチル基に隣接するメチレン基 2 本 4H 分、アロマティックに結合した H(6.5-8.5 ppm 付近)が 5 本観測され、そのカップリングパターンと化学シフト($d \times 2$, 4H, $J = 7.3$ Hz, $m \times 1$, 4H)からオルト位でカップリングした 4 置換ベンゼン環と、オルト位が 2 置換されたベンゼン環の構造であることが推定され、またトランスオレフィン(結合定数 $J = 15.9$ Hz)由来シグナルが観測された。一方、12 ppm 付近に水素結合由来ピークが 3 本認められたこと、また ^{13}C NMR においてキノンに特徴的

な 180 ppm 付近のシグナルが 8 つ、ヒドロキノンに特徴的な 160 ppm 付近のシグナルも 4 つ観測されたことから、2 種のナフトキノンおよび 1 種のヒドロキノン骨格を有し、分子内水素結合をしていることが示唆された。HMBC 及び H-H COSY スペクトルにより部分構造の相関を検討した結果、本化合物 3 は、これまでに得られた化合物 1 と 2 が炭素-炭素結合した化合物であることが確認できた(図 2, 測定溶媒 CDCl_3)。本化合物は ^1H および ^{13}C NMR チャート上で同様の構造を支持する 2 種類のシグナルが観測されたことからジアステレオマー混合物である事が示唆された。高分解能マススペクトル(HRESI-TOFMS)により分子量 569.1187 を観測し、その分子式を $\text{C}_{29}\text{H}_{22}\text{O}_{11}\text{Na}$ と確認した(calc 569.1060)。論文検索の結果、現在まで天

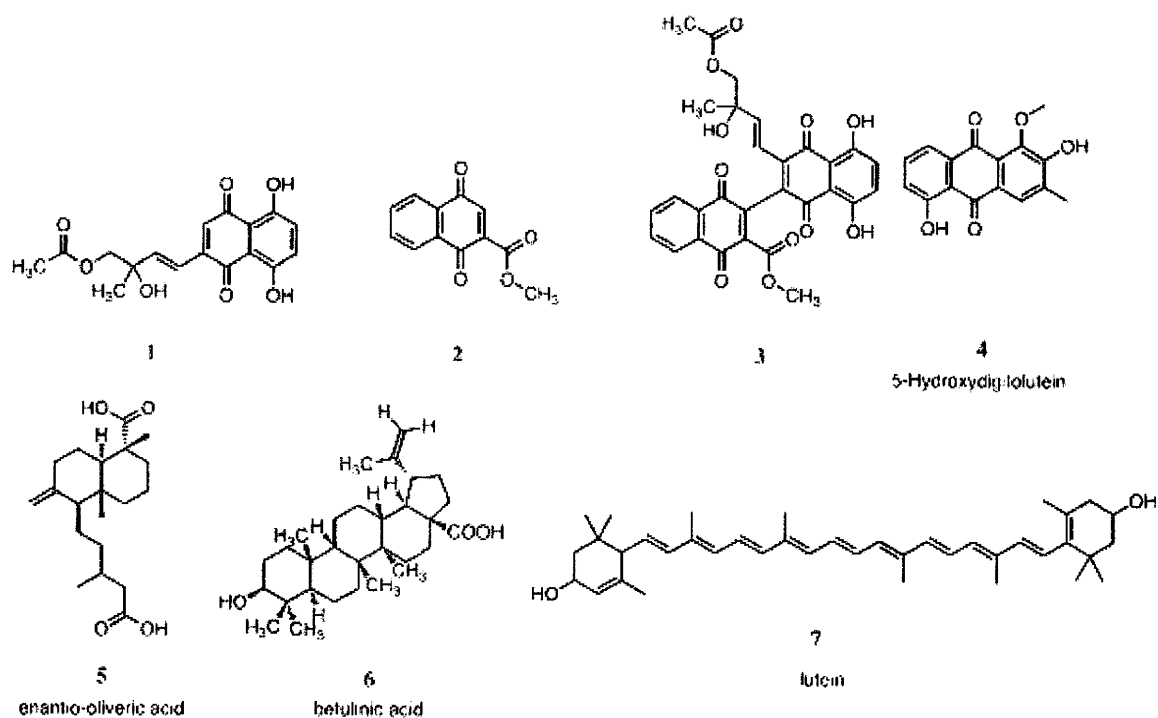


図 1 *T. grandis* より得られた化合物の構造一覧。