

201132009B

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス

総合研究事業

無承認無許可医薬品の調査・分析及び有害性評価に  
関する研究

平成21年度～23年度 総合研究報告書

(H21-医薬-一般-C11)

研究代表者 大塚 英昭

平成24(2012)年3月

## 目 次

I.	総合研究報告書	
	無承認無許可医薬品の調査・分析及び有害性評価に関する研究	
	大塚 英昭	..... 1
II.	研究成果の刊行に関する一覧表	..... 15
III.	研究成果の刊行物・別刷	..... 17

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療器機等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）  
総合研究報告書

無承認無許可医薬品の調査・分析及び有害性評価に関する研究

研究代表者 大塚英昭 広島大学大学院医歯薬学総合研究科教授

無承認無許可医薬品とは、医薬品としての承認や許可を受けていないにもかかわらず、医薬品としての目的性を持たせた製品であり、その判断は、医薬品の範囲に関する基準（直近の改正：平成24年1月23日付薬食発0123第3号厚生労働省医薬局長通知「医薬品の範囲に関する基準の一部改正について」）に基づき行われる。本基準は、主に成分本質（原材料）、効能効果、形状、用法用量の4要素に分けられるが、本研究では、特に成分本質（原材料）により無承認無許可医薬品と判断されるべき成分本質について、調査と分析、有害性評価を行うものである。平成21年の同通知では、専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）は、320成分（植物由来233、動物由来21、その他66）ある。これらの成分本質のうち、近年、その他（化学物質）の分類で、成分本質が専ら医薬品として判断されるものが急増している。これは主に、合成されたED治療薬類似成分である。これは主に、合成されたED治療薬類似成分である。本研究では、実態調査の際、新規に出現したこのような成分について、構造決定を行った。さらに、*MacroModel*を用いドッキングスタディを実行し、Phosphodiesterase (PDE) 5 酵素阻害活性を予測し、専ら医薬品であるかどうかの判断根拠を提示するとともに、以後、迅速に監視・指導が行えるように分析法の開発を実施した。また、これらの成分本質の有害性を評価するため、このような物質のPDE6 酵素阻害活性を実測した。さらに、通常のルートを通じ、新規に申請のあった成分本質（原材料）についても、医薬品としての使用実態、麻薬用作用、薬理活性等を調査し、専ら医薬品に分類するべきであるかどうか検討した。また、*Sida cordifolia* 等、強い生理活性を持つにもかかわらず、専ら医薬品の判断が求められないまま、違法薬物市場で、無承認無許可医薬品として販売されている成分本質について実態調査を行うとともに、痩身用の健康食品に含まれるセンナ由来粉末中の小葉、葉柄、葉軸（以上専ら医薬品）と茎（非医薬品）の形態学的な分別方法についても検討し、顕微鏡分析により両者が明確に分別できることを示した。また、電子たばこ吸入蒸気中のニコチン検出法についても確立した。さらに、今後専ら医薬品の判断が求められる可能性のある植物についても、成分検索等を実施した。本研究は、厚生労働省監視指導・麻薬対策課との密接な連携の下行われる研究であり、本研究の成果で、健康危機管理に直結するものは迅速に報道発表されるとともに、都道府県等に通知されている。

分担研究者

合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部長

#### A. 研究目的

無承認無許可医薬品とは、医薬品としての承認や許可を受けていないにもかかわらず、医薬品としての目的性を持たせた製品であり、このような製品の流通により、様々な健康被害が予想されるため、薬事法により、その製造、販売、授与、広告が禁止される。本研究は、厚生労働省の監視指導・麻薬対策課との密接な連携の下、これら製品の流通を防ぎ、国民の健康・安全を確保する目的で行われる。近年、健康食品中での出現が急増している無承認無許可医薬品成分に ED 治療薬類似物質がある。このような化合物は、①医薬品としての禁忌や用量について何も考慮されず使用されること、②構造類似体として、ターゲット酵素でない類縁酵素への阻害活性を持つ可能性が否定できないこと、③そのものに含まれる不純物や他の食品との相互作用等が全く考慮されず使用される事等、様々な有害性が予想される。本研究では、これらの化合物の迅速な取締りに対応するため、専ら医薬品として指定するための要件（構造決定、活性予測等）を準備する。さらに、指定以後の迅速広範囲な取締りに対応できるよう分析法を確立する。また、有害性を評価するため、PDE6 活性を測定する。一方で、痩身用健康食品で使用される緩下作用を持つ植物由来の成分本質について、無承認無許可医薬品として取り締まるための鑑定法の確立を行う。さらに、新規に申請のあった成分本質（原材料）についても、国民の健康・安全確保を念頭に、調査研究を行う。さらに強い生理活性を持つにもかかわらず、

専ら医薬品の判断が求められないまま、違法薬物市場で、無承認無許可医薬品として販売されている成分本質について実態調査を行う。このような研究は、世界的にも国立の研究機関と大学との共同研究で実施されているが、各国の法体系に即した研究が必須である。申請者らは、監視指導・麻薬対策課が主催する医薬品の成分本質に関する WG のメンバーであり、この分野での日本の状況を良く理解している。さらに分担研究者は、これまで 10 数種の ED 治療薬アナログを構造決定しており、このような情報交換を諸外国の担当者と常時行っているだけでなく、医薬品監視の拠点である地方衛生研究所とも緊密に交流しており、得られた成果を直ちに、国民の健康保護に還元できる立場にある。以上、本研究は、無承認無許可医薬品に関連して、厚生労働行政に直接貢献することを目的としたものである。

#### B. 研究方法

買い上げ調査等で強壮や痩身を標榜する製品から未知物質が検出された場合、未知物質を単離し、機器分析による構造決定を行う。次いで、本物質について文献調査を実施するとともに、予想されるターゲットタンパク質がある場合には、MacroModel を用いドッキングスタディを実施する。もし、PDE5 阻害活性が予想された場合には、標準的な分析法の開発を行う。さらに、必要な場合には有害性を評価するため、PDE6 活性を測定する。

痩身用健康食品で使用される緩下作用を持つ植物（センナ及び *Cassia* 属）については、医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターより標準的な植物を入手し、それぞれの種、部位について鏡検上特徴的となる要素について検

討する。特にセンナについては、小葉、葉柄、葉軸（以上専ら医薬品）と茎（非医薬品）について、どの要素が両者の鑑別の要点となるか検討する。

新規に申請のあった成分本質（原材料）については、まず基原植物の学名、和名、生薬名等について調査するとともに、医薬品としての使用実態を調査する。さらに、RTECS, Chemical Abstract, PubMed, 上記通知に記載されている参考文献等を利用して、毒性データ、二次代謝成分や生理活性、麻薬、向精神薬、覚せい剤様作用があるかどうか調査する。これらのデータを総合的に判断して、専ら医薬品に分類すべきであるかどうか検討する。

また、従来区分されているのにもかかわらず、文献情報等が少ないトウジン等の品目について、対象物を入手し、成分検索を行う。また、向精神作用等を持つ成分を含有する可能性が高く、一部の種（オウカシ：*Sida cordifolia*, *S. mysorensis*, オウカボ：*S. rhombifolia*）についてのみ専ら医薬品としての判断が行われている *Sida* 属植物については、市販品を買い上げ、成分分析を行うとともに、市販品の基原種の同定を行う。また、毒性アルカロイド等の存在が報告されているシャタバリ、キャツクローについて、含有アルカロイドの精査を行うとともに、市販品の基原種の同定を行う。さらに今後専ら医薬品の判断が求められる可能性のあるインディアンサルサやイランイランノキについて成分検討を行う。

#### <倫理面への配慮>

本研究では、ヒト由来試料を用いた実験は行わず、倫理面で大きな支障となる問題はないと考えられる。

## C. 結果と考察

### C.1 無承認無許可医薬品に関する分析及び有害性評価

地方衛生研究所より問い合わせを受けた強壯を標榜する「いわゆる健康食品」に含まれていた不明成分について、各種機器分析を行い、同成分は、国内では「いわゆる健康食品」から検出された事例のない、アイルデナフィル aildenafil (methisosildenafil, dimethylsildenafil)であることを明らかにした。

さらに、別に問い合わせを受けた成分は、分子式  $C_{27}H_{35}N_9O_5S_2$  を示し、0.1%ギ酸 (0.02 mol/L, pH 3 程度) の生理的条件下で、アイルデナフィルを生成することが明らかになった。この本化合物は、Venhuis らのグループが報告した nitrosoprodenafil と同一と考えられたが、Venhuis らによる推定構造は以下の点で我々の測定した NMR データと不整合が見られた。

1) アイルデナフィルアナログ部分以外の側鎖は 3 つの炭素原子 ( $\delta_c$  150.1, 139.2, 115.2) を持つが、これらの化学シフト値が説明可能な構造であること。

2) 2D-INADEQUATE スペクトルから、 $\delta_c$  115.2 ppm の炭素と  $\delta_c$  150.1 ppm の炭素間で相関が観測されており、この両者の炭素間の直接結合を満足させる構造であること。

3)  $\delta_H$  3.78 ppm のメチル基から  $d_c$  115.2 ppm 及び 139.2 ppm の炭素原子への HMBC 相関が説明可能な構造であること。

本研究では、まず、これらの条件を全て満たすことの出来る、ニトロ基を有するイミダゾール環により修飾されたチオアイルデナフィルアナログ(チオアイルデナフィルに N-メチルニトロイミダゾール基がスルフィド結合した

構造)が構造として正しいものと推定した。そこで、アイルデナフィルと 5-クロロ-1-メチル-4-ニトロイミダゾールより目的化合物を合成し、各種スペクトルデータを健康食品より単離した化合物と比較した結果、両者は完全に一致し、この化合物の構造を 1-methyl-4-nitro-1*H*-imidazol 基が 5 位で, thioaildenafil の thio 基に結合した構造 (Fig. 1) であることを明らかにし, nitroso 基をもたないことから, 名称を mutaprodenafil とし報告を行った。本化合物は, 無承認無許可医薬品として, これまで出現していなかったプロドラッグタイプの化合物であった。

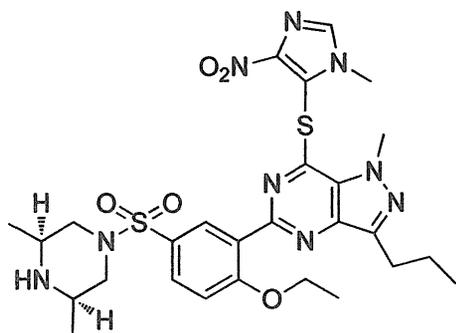


Fig. 1 Structure of mutaprodenafil

また、地方で健康被害が生じた、強壯を標榜する「いわゆる健康食品」に含まれていた 4 検体に含有する不明成分について、LC-PDA-MS 分析を行い、同成分をシルデナフィルと同定した。さらに、各種分析を行い、これらの検体には、他成分が含まれている可能性は低いことを示した。

さらにメチソシルデナフィル及びアセチルアシッド, ヒドロキシホモシルデナフィルについて Human phosphodiesterase 5 (PDE5) とのコンピュータシミュレーションによる結合モデルを構築し, 活性について検討したところ, 同化合物は, PDE5 と結合し, 阻害活性を示すものと考えられた。

ED 治療薬は, PDE 5 阻害を活性発現のための機序としている。従って, 「いわゆる健康食品」に違法に混入された ED 治療薬の構造類似化合物に対し, 類推される副作用として, 同じ酵素ファミリーである PDE6 阻害が考えられる。PDE6 は主に網膜に発現しており, PDE6 阻害の程度によっては ED 治療薬の構造類似化合物による視覚障害も懸念される。事実, シルデナフィルでは, PDE6 阻害に対する PDE5 阻害の選択性が数倍程度しかなく, 色覚異常が副作用として報告されている。そこで, 「いわゆる健康食品」から単離・精製した ED 治療薬類似構造化合物 6 化合物について, PDE6 阻害活性試験を行い, これらの物質の PDE5 阻害活との比較を行った。その結果, その結果, プソイドバルデナフィルにおいて, PDE5 より PDE6 に選択的に阻害活性を示すことが明らかとなり, 本化合物を含む強壯を標榜する健康食品を摂取すると, 色覚障害が現れる危険性が高いことが判明した。さらに, シルデナフィル類似化合物でも, シルデナフィルと比較して, PDE5 選択性は, 小さくなっており, 混入されている構造類似化合物量を考えると, シルデナフィルと同様の副作用が生じる可能性がより高いものと考えられた。

また、別に地方衛生研究所より問い合わせを受けた強壯を標榜する「いわゆる健康食品」に含まれていた不明ピークについて単離し, 各種機器分析を行い, 同定を行ったところ, ミカン科植物に多く含まれているヘスペリジンであることが判明した。さらに, 別な地方衛生研究所より依頼を受けた物質については専ら医薬品成分である magnoflorine と同定した。

また, 強壯を標榜する健康食品のカプセル基剤について MeOH 抽出後, LC/MS 分析を行ったところ, カプセル剤 107 製中 13 製品より ED 治療

薬であるタダラフィルが検出され、1 カプセルあたりの含有量は 0.4~0.8mg であった。通常の薬用量は、5-10mg であり、今回の含量は数錠服用すれば、ある程度の活性が予想される量である。また、簡易分析法として抽出操作を伴わない Direct Analysis in Real Time (DART)-TOFMS による簡便なスクリーニング法について検討を行ったところ、LC/MS でタダラフィルが検出された 13 製品全てより同物質由来と考えられるシグナルが検出され、本法は、このようなカプセル基剤中の ED 治療薬成分に検出に対しても、有用なスクリーニング法であることが明らかとなった。

また別に、電子たばこ吸入蒸気中のニコチンの簡易分析法を開発し、カートリッジ内容物よりニコチンが検出された 20 銘柄すべてにおいて、吸入蒸気中から、専ら医薬品成分であるニコチンが検出されることを明らかにした。

## C.2 鏡検によるセンナ茎粉末と葉軸粉末の鑑別

センナ茎由来と称する食品中に、「専ら医薬品成分」であるセンナの小葉や葉軸、果実などが混入している例が明らかにされている。刻みの製品であれば、肉眼でもこれらの混入を判別することは可能であるが、製品が粉末状の場合、特に茎と葉軸の鑑別は難しい。そこで、鏡検により、センナ茎粉末と葉軸粉末が鑑別できるかどうか検討した。その結果、センナの茎には、規則的に気孔が分布する部位があり、この部位はほぼ方形~等径性多角形の表皮系細胞より形成されている一方、気孔周辺の表皮細胞の長軸方向の径は、ほとんど全て、気孔のものより小さいことが判明した。これに対し葉軸では、主として長軸方向に長い長方形~長六角形の表皮細胞より形成されており、気孔周辺の表皮細胞

は近接した気孔よりも長軸方向の径が大きいことが判明した。さらに茎、葉軸を混合した粉末においても、出現する表皮片は由来する組織に見られた特徴をよく表しており、両者を区別することが可能であることが判明した。

さらに、鑑定のための上記の特徴が、系統や栽培環境によらず、普遍的なものであることを示すため、系統及び栽培環境の異なった株を入手し、比較検討を行なった。その結果、アレキサンドリアセンナ (*Cassia acutifolia*)、チンネベリセンナ (*C. angustifolia*) の両種において、種子島栽培品及び、富山大学附属薬用植物園栽培品ともに、同様の内部形態を示し、系統及び栽培環境の異なる株においても、茎および葉軸を鑑別するための形態的特徴に違いのないことを確認した。さらに、茎、葉軸の粉末を作成し、種々の割合で混合した試験粉末を作成し、鑑定の可否および精度について検討した結果、葉軸の混合割合を5%程度であっても、気孔より大型の長楕円形の表皮細胞からなる表皮片は特徴的であり、粉末状の試料であっても葉軸が混入していることを明確に判別できることが明らかとなった。

これらの結果より、気孔を伴う表皮片に限定し、表皮細胞と気孔の大きさの関係に着目して鑑定を行なうことにより、粉末状態となったセンナ茎粉末中に混入した「専ら医薬品成分」である葉軸粉末を容易に確認できることが明らかとなった。さらに、これらの表皮細胞の特徴を把握しておくことで、センナ茎の粉末に小葉が混入した場合や、小葉の粉末中に夾雑する茎や葉軸などについても、鑑別が行なえるものと考えられた。

## C.3 新規に調査依頼があった成分・本質について

我が国の「専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）リスト」に例示される成分であるかどうか、依頼のあった新規な植物由来物質 16 品目のうち、特に専ら医薬品と考えられるもの及び、安全性についてさらに考慮すべきと考えられるものを以下に記す。

kawakawa については、麻薬、向精神薬及び覚醒剤様作用があるもの並びにこれらの原料植物と判断されることから、専ら医薬品とすべき成分本質である物と考察した。また、アフリカマンゴノキは、食経験は十分にあるものの、瘦身作用があることが論文報告されておりまた、脂質形成を抑制作用に関して米国で PCT パテント出願がおこなわれていることから、専ら医薬品として取り扱うべき物となる可能性が考えられた。

依頼のあった新規な化学物質 8 品目では、ED 治療薬類似成分等であるヒドロキシチオホモシルデナフィル、アセチルアシッド、ムタプロデナフィル(当初は、緩やかな酸性条件下でメチソシルデナフィルに変化する分子量 629 と推定される成分)は、その構造から、明らかに、シルデナフィルやタダラフィル様の ED 治療薬としての作用を期待して合成された化合物と考えられ、計算による活性予測から、シルデナフィル等と同様の作用があるものと推定され、指定医薬品かつ医師の処方箋の必要な医薬品であるクエン酸シルデナフィルに相当する成分と考えられるため、専ら医薬品として使用される成分本質として規制すべきであると考察した。また、アルカロイドである magnoflorine は、劇薬相当の LD50 値を持つことから、専ら医薬品とすべき成分本質であるものと考察した。

なお、本研究班の研究当初 Spice と称する

ハーブ製品より検出同定された、カンナビシクロヘキサノール CP-47497, JWH-018 等の合成カンナビノイド類 3 品目は、専ら医薬品の判断を行うことなく、直接指定薬物として薬事法の規制下に置かれることになった。

また、別に「医薬品の成分本質に関するワーキンググループ」のための資料を作成した。

これまでの検討成果を元に、平成 23 年 6 月 14 日及び 11 月 8 日に「医薬品の成分本質に関する WG」が開催され、同 WG での議論を元に、平成 24 年 1 月 23 日に、医薬食品局長より「医薬品の範囲に関する基準の一部改正について」（薬食発 0123 第 3 号）が発出され、新たに、専ら医薬品成分として、ウイザネア（全草）、シッサスクアドラングラリス（全草）、マグフロリンが指定された。（本通知は、本総合研究報告書に参考として添付されている。）なお、前 2 品目については、平成 25 年 1 月 22 日までの間、その成分本質（原材料）の分類のみをもって、直ちに医薬品に該当するとの判断を行わないこととされている。

#### C.4 植物系成分・本質の調査と分析及び有害性評価

毒性不明のアルカロイド成分が存在するため、詳細な成分検索が必要と判断がなされたトウジン [*Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. および *C. tangshen* Oliv.] について、含有成分を明らかにする目的で、研究を行った。その結果、既知ピロリジンアルカロイドとして codonopyrrolidium B, radicamine A を、新規化合物として 4 種のピロリジンアルカロイドを単離、構造決定した。ピロリジンアルカロイドには、bgugaine のように、強い肝毒性を持つ化合物が知られており、本植物から複数のピロリ

ジンアルカロイドが単離されたこと及びトウジンが日本において医薬品としての使用実態があること等を考え合わせると、トウジンは引き続き、専ら医薬品の区分であることが適切であるものと考えられた。

*Sida* 属植物の有害性評価及び規制の範囲の検討に資する知見を得ることを目的に、海外より *Sida* 属植物の採集及び購入を行うと共に、形態観察及び rDNA の internal transcribed spacer (ITS) 領域の塩基配列解析による基原種の推定を行った。その結果、*Sida* 属植物は、花の外観による鑑別が非常に難しいことが明らかとなった。さらに、海外市場に流通する *Sida* 属植物製品には、誤同定によるものと思われる別植物の流通が、高頻度 (16 試料中、*Sida* 属植物以外であったもの 8 試料、*Sida* 属植物以外の植物も同定されたもの 2 試料、DNA の増幅が出来なかったもの 1 試料、*Sida* 属植物であったもの 5 試料) で確認された。また、*Sida* 属植物が確認された 7 試料中、表示された学名と遺伝子鑑別がほぼ一致した試料は、国内の園芸店から入手した全植物 1 試料と、Brazil から商社を通じて入手した 5 試料中の 1 試料 (*S. cordifolia* leaf) のみであり、流通の段階で、ほとんど植物学的な同定がなされていないことが明らかとなった。*Sida* 属植物は、Ephedrine 等の向精神作用を持つアルカロイドを含むことが知られており、違法薬物市場でも流通の可能性がある植物属である。従って、*Sida* 属植物の有害性評価を行うには、まず、分析を行う植物の同定が重要であり、規制を行うためには、遺伝子情報による鑑別法の確立が重要であるものと考えられた。

次に、*Sida* 属植物含有製品 4 品目について、成分探索を行い、アルカロイド成分 5 種を含む

12 成分を単離・同定した。このうち、遺伝子分析により *S. cordifolia* と推定された製品からは、quinazoline アルカロイドである vasicine, vasicinone, 3-hydroxyepigallocatechin gallate を始め 9 化合物が単離同定された。また、全製品に ephedrine 類の含有が示唆される結果が得られた。

シャタバリは、主に女性の強壯を目的として使用されるアユルヴェーダ生薬であり、その基原は *Asparagus racemosus* の根と規定されている。シャタバリは、健康食品素材として使用され、本研究班の前身である「専ら医薬品としての規制の範囲に関する研究」では、polycyclic pyrrolizidine (pyrrolo[1,2-a]azepine) アルカロイドアルカロイドの含有から、専ら医薬品として取り扱うべきと考えられていた。本研究ではシャタバリ中の含有するといわれる同アルカロイドについて、文献を詳細に検討した。その結果、*A. racemosus* の成分として、毒性アルカロイドである asparagamine A の単離が報告されているが、asparagamine A のような pyrrolo[1,2-a]azepine アルカロイドは、*Stemona* 属植物に広く分布が知られる化合物であることが明らかとなった。また、生薬として使用される *A. racemosus* と *Stemona* 属植物は、形態が近似していることが判明した。従って報告されている毒性アルカロイド asparagamine A の単離は、*Stemona* 属植物を誤同定したことによるものである可能性が高いことが明らかになった。一方で、*A. racemosus* と *Stemona* 属植物を誤同定したと思われる文献は、他にも見出された。

*A. racemosus* 中のアルカロイドの有無はシャタバリ製品の食薬区分上の取り扱いにおいて重要な事項であることから、本研究では引き続き、基原が確認されたシャタバリにおけるアル

カロイドの有無に関して研究を行った。

まず、現在日本市場に流通しているシャタバリ製品について、DNA 塩基配列解析による基原種鑑別を行った。その結果、本研究で用いた製品はすべて *Asparagus* 属植物を原料としていることが確認された。さらに、*Stemona* 属植物の混入の有無を確認するため、*Stemona* 属植物特異的なプライマーを用いた ARMS-PCR 法を構築し、各シャタバリ製品に適用したところ、すべての製品において1%以上の *Stemona* 属植物の混入は認められなかった。

次に、遺伝子解析により *Asparagus* 属植物を原料とすることが確認されたシャタバリ製品について、*A. racemosus* に特徴的なステロイドサポニン成分を分析した結果、これらの製品の基原が *A. racemosus* であることを確認した。さらに、基原が確認された製品と *A. racemosus* 標準植物試料のアルカロイド成分の分析を行い、いずれの検体にも asparagamine A は含有されていないことを確認した。従って、*A. racemosus* に asparagamine A は含まれないことが明らかとなった。本研究結果を受けて、平成23年6月14日及び11月8日に開催された「医薬品の成分本質に関するWG」で議論が行われ、シャタバリについて、専ら医薬品成分とはしないことが示された。

キャッツクロー (cat's claw) は、非医薬品としてリストに存在するものの、専ら医薬品であるチョウトウコウ (カギカズラ、トウカギカズラ) と同様に oxindole alkaloid 類を特徴的な二次代謝成分として含む成分本質である。また、基原植物は、*Uncaria tomentosa* とされているが、*U. tomentosa* の主産地であるペルーでは、同属植物である *U. guianensis* も分布し、両者は、しばしば混同される。そこで本

研究では、食薬区分に関しより正確な情報入手するため、国内の市場に流通するキャクロー製品を購入し、遺伝子解析による原料植物の同定を行うとともに、LC-PDA-MS 分析による含有アルカロイドの調査を行った。その結果、市販製品には、本来の原料である *Uncaria tomentosa* の他に、別の植物の混入が認められた。さらに、含有アルカロイドのパターンにも違いが見られた他、一日摂取目安量に換算したアルカロイド摂取量も、各製品により、大きく異なる事が明らかとなった。

サルサ (サルサパリラ) は、以前は専ら医薬品リストに掲載されていたが、平成19年4月17日の通知の一部改正により、サルトリイバラ科のシオデ属 (サンキライの塊茎・根茎を除く) として、非医薬品リストに掲載となった。一方、インドでは、サルサパリラ (小さなブドウのような蔓性の低木) とは、ガガイモ科の *Hemidesmus indicus* を意味しており、本植物は、日本ではインディアン (インド) サルサパリラと呼ばれる場合が多い。本植物の根は、アユルベーダ医薬品であり、現在、日本では、本植物由来製品は、食薬区分の判断が行われないうまま、ネット販売が行われている。本研究では、インドの研究者より入手したインディアンサルサパリラについて成分研究を行い、新たに、新規プレグナン配糖体、比較的まれな構造を有するフェニルプロパノイド配糖体を単離構造決定した。

イランイランノキ (バンレイシ科) の花より得られる精油は芳香があり、鎮静を目的としてアロマセラピーに用いられているので、精油成分の研究は精力的に行われている。さらに性欲亢進などの効用も報告されており、密かなブームにもなっている。また、ある種のバンレイ

シ科の植物の葉はカリブ海地方でお茶として飲用され、それが原因で擬似的パーキンソン病を発現することが知られている。しかし、イランイランノキの葉の成分についての化学的検討はあまり行われておらず、日本でも食薬区分の判断がなされていない。本研究では、タイ王国チェンマイ大学薬用植物園にて栽培されている *C. odorata* var. *odorata* の葉部を採集し、メタノール抽出画分について分画を行い、シスエノールが配糖体化で安定した変形モノテルペン、変形モノテルペンのジエステル類、アリアルナフタレン型のリグナンジカルボン酸エステルを単離構造決定した。このうち、リグナンジカルボン酸エステルは蛍光を有していた。

#### D. 結論

本研究は、厚生労働省の基準（医薬品の範囲に関する基準）に直接対応した研究である。無承認無許可医薬品成分の同定、活性予測、専ら医薬品への指定、分析法の提示といった本研究で行われる一連の成果が監視指導行政で利用されることで、薬事法による無承認無許可医薬品の迅速な取締りが行われ、国民の健康被害を防止することが可能となる。また、使用者に対して失明の危険を伴う PDE6 阻害活性等、重篤な危険性が予想される ED 治療類似薬の場合、行政を良く理解した本研究体制で行うことで、迅速な対応が可能となる。

本研究では、強壯を標榜する健康食品由来の ED 治療類似薬成分等について構造決定を行い、アイルデナフィル及び、新規化合物としてムタプロデナフィルを同定した。前者は、*in silico* で PDE5 阻害活性を予測され、後者は、生理的な酸性条件下でアイルデナフィルを生じるプロドラックタイプの化合物であった。さらに、

ED 治療薬アナログについて、PDE6 阻害活性を実測した結果、プソイドバルデナフィルについて、PDE5 より PDE6 に選択的に阻害活性を示すことが明らかとなり、本化合物摂取により色覚障害が現れる危険性が高いこと判明した。

さらに、電子たばこ吸入蒸気中のニコチンの簡易分析法を開発し、カートリジ内容物よりニコチンが検出された 20 銘柄すべてにおいて、吸入蒸気中から、専ら医薬品成分であるニコチンが検出されることを明らかにした。

また、痩身を標榜する健康食品中に含まれる場合が多いセンナについて、専ら医薬品成分となる部位の鑑別法を確立した。実態調査に本研究のような化学的、植物学的な研究を組み合わせることで、初めて有効な法規制が行えることになる。

さらに、市場で流通するグレーズーンの植物体として考えられる *Sida* 属植物やシャタバリ、キャツクロー、インディアンサルサ等について、食薬区分に関する正確な情報を入手するため、成分検討を行うとともに、基原種の確認等を実施した。特に、シャタバリについては、現植物である *A. racemosus* に毒性アルカロイドが含まれるという文献記述は、生薬の誤同定に由来する可能性が非常に高いことを示し、シャタバリは、専ら医薬品成分と判断すべきではないことを明確にした。また、新たに申請を受けた成分本質（原材料）等について、専ら医薬品に分類するべきであるかどうか検討した。

これらの研究成果は、厚生労働省における医薬品の成分本質に関する WG での議論に反映され、平成 24 年 1 月 23 日に、医薬食品局長より「医薬品の範囲に関する基準の一部改正について」（薬食発 0123 第 3 号）が発出された。

以上、本研究は、厚生労働省の監視指導・麻

薬対策課との密接な連携の下行われる研究であり、本研究の成果で、厚生労働省の健康危機管理に直結するものは、迅速に報道発表されるとともに、都道府県等に通知された。また、食薬区分の判断等、様々な形で施策に反映されている。

#### E. 健康危機情報

年度毎の報告書に記載している。

#### F. 研究発表等

##### 論文発表

- 1) Maruyama, T., Khan, A. A., Choudhary, M. I., Tsuda, Y., Goda, Y., Farille, M., Reduron, J.-P., “Botanical origin of Indian celery seed (Fruit).” *J. Nat. Med.*, **63**, 248-253 (2009).
- 2) Harinantenaina, L., Matsunami, K. Otsuka, H., “Chemical constituents of *Pteris cretica* Linn. (Pteridaceae).” *Biological Systematics and Ecology*, **37**, 133-137 (2009).
- 3) Takahashi, K., Hasegawa, T., Saijo, M., Nagata, T., Wakana, D., Goda, Y., “Identification of sildenafil analogues found in a dietary supplement.” *Annual Report of the Chiba Prefectural Institute of Public Health*, **58**, 55-60 (2009).
- 4) Kamakura, H., Maruyama, T., Sugimura, K., Iida, O., Goda, Y., “The source plants and the chemical composition of the passion flower products available as dietary supplements.” *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **17**, 198-206 (2010).
- 5) Wakana, D., Kawahara, N., Goda, Y., “Three new triterpenyl esters, codonopilates A-C, isolated from *Codonopsis pilosula*.” *J. Nat. Med.*, **65**, 18-23 (2011).
- 6) Matsumoto, T., Anjiki, N., Arifuku, K., Kawahara, N., Goda, Y., “Metabolome analysis of Setsucha (*Thamnia vermicularis* Ach.) products based on <sup>1</sup>H NMR spectroscopy.” *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **18**, 43-47 (2011).
- 7) Tokumoto, H., Shimomura, H., Iida, O., Hakamatsuka, T., Goda, Y., “Morphological discrimination of powdered senna stem and powdered senna leaf rachis.” *Jpn. J. Pharmacog.*, **65**, 114-128 (2011).
- 8) Demizu, Y., Wakana, D., Kamakura, H., Kurihara, M., Okuda, H., Goda, Y., “Identification of mutaprodenafil in a dietary supplement and its subsequent synthesis.” *Chem. Pharm. Bull.*, **59**, 1314-1316 (2011).
- 9) Kumeta, Y., Maruyama, T., Wakana, D., Kamakura, H., Goda, Y., “Method for identifying botanical origin of shatavari product and its application for survey analysis of the products in Japanese market.” *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **18**, 163-167 (2011).
- 10) Abbaskhan A., Choudhary M. I., Ghayur M. N., Parween Z., Shaheen F., Gilani A., Maruyama T., Iqbal K., Tsuda

- Y., "Biological activities of Indian celery, *Seseli diffusum* (Roxb. Ex Sm.) Sant. & Wagh." *Phytother. Res.*, online available, doi: 10.1002/ptr.3600 (2011)
- 11) Kumeta, Y., Maruyama, T., Wakana, D., Kamakura, H., Goda, Y., "Chemical analysis to reveal botanical origin of shatavari products and confirmation of absence of alkaloid asparagamine A in *Asparagus racemosus*" *J. Nat. Med.*, accepted (2012).
- 12) Zhao, Z., Matsunami, K., Otsuka, H., Negi, N., Kumar, A., Negi, D. S., "A condensed phenylpropanoid glucoside and pregnane saponins from the roots of *Hemidesmus indicus*" *J. Nat. Med.*, submitted (2012).
- 13) Wakana, D., Maruyama, T., Kamakura, H., Sugimura, K., Iida, O., Kanai, T., Yamaji, S., Kimura, T., Chao-Ying, L., Goda, Y., "Morphological features and botanical origin of the plant products sold as *Sida* spp." *Jpn. J. Food Chem. Safety*, submitted (2012).
- 学会発表等
- 1) 合田幸広, 食薬区分と違法(脱法)ドラッグ「漢方薬・生薬認定薬剤師研修会」(2009年9月, 東京).
- 2) 永島次郎, 杉本幸子, 松浪勝義, 大塚英昭, Duangporn Lhieochaiphant, Sorasak Lhieochaiphant イランイランノキ (*Cananga odorata* Hooker f. var. *odorata*) の新規配糖体成分, 日本生薬学会第56回年会 (2009年10月, 京都).
- 3) 若菜大悟, 川原信夫, 細江智夫, 河合賢一, 合田幸広, トウジン(党参)のアルカロイド成分, 日本生薬学会第56回年会 (2009年10月, 京都).
- 4) 徳本廣子, 下村裕子, 飯田 修, 合田幸広: 鏡検によるセンナ茎粉末と葉軸粉末の鑑別, 日本生薬学会第56回年会 (2009年10月, 京都).
- 5) 合田幸広, 健康食品の基原と品質, 医療経済研究・社会保険福祉協会第18回健康食品フォーラム (2009年10月, 東京).
- 6) 最所和宏, 花尻(木倉)瑠理, 合田幸広, 平成20年度無承認無許可医薬品の買い上げ調査について—強壮用健康食品—, 第46回全国衛生化学技術協議会年会 (2009年11月, 盛岡).
- 7) Goda, Y., Survey analyses of illegal compounds in dietary supplements intended for sexual enhancements or diet and herbal products implying psychotropic effects by NIHS in Japan, FHH Standing Committee Meeting (2009年11月, 香港).
- 8) 最所和宏, 花尻(木倉)瑠理, 合田幸広, LC/MS及びDART-TOFMSによるカプセル基剤中のED治療薬関連成分の分析, 日本薬学会第130年会 (2010年3月, 岡山).
- 9) 若菜大悟, 丸山卓郎, 鎌倉浩之, 杉村康司, 飯田修, 合田幸広, *Sida* 属植物の含有成分から見た安全性の評価に関する研究, 日本薬学会第130年会 (2010年3月, 岡山).

- 10) 丸山卓郎, 若菜大悟, 鎌倉浩之, 杉村康司, 飯田修, 合田幸広, *Sida* 属植物として海外市場に流通する植物製品の基原種について, 日本薬学会第 130 年会 (2010年3月, 岡山) .
- 11) 趙志敏, 松浪勝義, 大塚英昭, Devendra S. Negi, インドのインディアンサルサパリラの根の成分研究, 日本薬学会第 130年会 (2010年3月, 岡山) .
- 12) 鎌倉浩之, 最所和宏, 合田幸広, ED治療薬類似化合物のPDE6阻害活性について, 第16回日本食品化学学会総会・学術大会 (2010年6月, 大阪) .
- 13) 栗原正明, 出水庸介, 佐藤由紀子, 花尻瑠理, 合田幸広, 奥田晴宏, 定量的構造活性相関 (QSAR) 等による違法薬物の活性予測, 第54回日本薬学会関東支部大会 (2010年10月, 東京) .
- 14) 鎌倉浩之, 最所和宏, 合田幸広, ED治療薬類似化合物のPDE6阻害活性について, 第16回日本食品化学学会総会・学術大会 (2010年6月, 大阪) .
- 15) 合田幸広, 食薬区分と違法ドラッグ, 漢方薬・生薬認定薬剤師研修会 (2010年9月, 東京) .
- 16) 合田幸広, 食薬区分と生薬, 東京農工大学講義 (2010年10月, 東京) .
- 17) 高橋市長, 長谷川貴志, 西條雅明, 小倉誠, 元木裕二, 永田知子, 若菜大悟, 合田幸広, いわゆる健康食品中から検出されたシルデナフィル構造類似体について, 第47回全国衛生化学技術協議会 (2010年11月, 神戸) .
- 18) 最所和宏, 花尻 (木倉) 瑠理, 合田幸広, 電子たばこ吸入蒸気中のニコチンの簡易分析法について, 日本薬学会第131回年会 (2011年3月, 静岡) .
- 19) 金井哲朗, 山路誠一, 木村孟淳, 李 昭瑩, 若菜大悟, 丸山卓郎, 鎌倉浩之, 合田幸広, 杉村康司, 飯田 修, アオイ科 *Sida*属植物由来商品の基原種の生薬学的研究, 日本薬学会第131年会 (2011年3月, 静岡) .
- 20) 栗原正明, 出水庸介, 佐藤由紀子, 花尻瑠理, 合田幸広, 奥田晴宏, 定量的構造活性相関 (QSAR) 等による活性予測の応用, 日本薬学会第131年会 (2011年3月, 静岡) .
- 21) 合田幸広, 天然物の基原と品質, 日本食品化学学会第17回学術大会・総会 (2011年5月, 東京) .
- 22) 最所和宏, 花尻 (木倉) 瑠理, 合田幸広, 電子タバコカートリッジ中のニコチン等の分析法及び吸入蒸気中のニコチンの簡易分析法, 日本食品化学学会第17回学術大会・総会 (2011年5月, 東京) .
- 23) 合田幸広, 食薬区分とは, 健康食品制度化への障壁研究会 (2011年5月, 東京) .
- 24) 合田幸広, 食薬区分と違法ドラッグ, 漢方薬・生薬認定薬剤師研修会 (2011年9月, 東京) .
- 25) 糸田幸恵, 丸山卓郎, 若菜大悟, 鎌倉浩之, 合田幸広, シヤタバリ (*Asparagus racemosus*) を原料とするいわゆる健康食品の基原種について, 日本生薬学会第58回年会 (2011年9月, 東京) .
- 26) 山路誠一, 金井哲朗, 坂本啓輔, 木村孟淳, 若菜大悟, 丸山卓郎, 鎌倉浩之, 合田幸広, 杉村康司, 飯田 修, *Sida* 属植物を含むアオイ科植物の組織形態学

- 的研究(2), 日本生薬学会第58回年会 (2011年9月, 東京).
- 27) 合田幸広, 食薬区分と生薬, 東京農工大学講義 (2011年10月, 東京).
- 28) 合田幸広, 食薬区分について, 第4回食品薬学シンポジウム (2011年10月, 東京).
- 29) 栗原正明, 出水庸介, 佐藤由紀子, 花尻瑠理, 合田幸広, コンピュータシミュレーションによる違法性薬物のレギュレーション, 第55回日本薬学会関東支部大会 (2011年10月, 東京).
- 30) 合田幸広, ニセ薬の話, モグラたたきのサイエンス, 国立医薬品食品衛生研究所シンポジウム (2011年11月, 東京).
- 31) 合田幸広, ニセ薬の話, 痩身や強壮などを標榜する健康食品中の医薬品成分の分析と同定, 第1回バイオ・ナノ産学連携セミナー: 食品分析ソリューションセミナー2012 (2012年1月, 東京).
- 32) 勝井美果, 杉本幸子, 松浪勝義, 大塚英昭, イランイランノキ (*Cananga odorata* var. *odorata*) の新規リグナン誘導體研究, 日本薬学会第132年会 (2012年3月, 札幌).
- 33) 若菜大悟, 出水庸介, 鎌倉浩之, 栗原正明, 奥田晴宏, 合田幸広, 強壯を標榜する健康食品から単離されたプロドラッグタイプのED治療類似物質 mutaprodanafil の構造, 日本食品化学学会第18回学術大会・総会 (2012年6月, 函館).
- 1) 平成20年度無承認無許可医薬品等買上調査の結果について (2009年8月20日) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課,  
<http://www.mhlw.go.jp/za/0820/d13/d13.html>
- 2) 新規医薬品成分を含有していた「いわゆる健康食品」についてヒドロキシチオホモシルデナフィル (2010年1月14日) 神奈川県,  
<http://www.pref.kanagawa.jp/osirase/yakumu/yakuan/kensyoku/220114press.html>
- 3) 平成21年度無承認無許可医薬品等買上調査の結果について (2010年7月16日) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課,  
<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r9852000000cmh6.html>
- 4) スーパーエックス, 酸性条件下で「メチソシルデナフィルとなる成分」(2010年12月20日) 神奈川県, 千葉県, 大阪府, 浜松,  
<http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/other/050623-1.html>
- 5) BS30, 酸性条件下で「メチソシルデナフィルとなる成分」(2010年12月21日, 24日) 大阪府, 広島県  
<http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/other/050623-1.html>
- 6) 平成22年度無承認無許可医薬品等買上調査の結果について (2011年5月30日) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課,

報道発表

<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r9852000001cvry.html>

- 7) いわゆる健康食品からの医薬品成分の検出について（2011年5月12日）神奈川県,

<http://www.pref.kanagawa.jp/prs/p307374.html>

- 8) 模造医薬品による健康被害に対する注意喚起について（第2報）模造医薬品の分析の結果シルデナフィル検出（2011年5月26日）厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課, 奈良県,

<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r9852000001dl4u.html>

研究成果の刊行に関する一覧表

原著論文

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻、号	ページ	出版年
Maruyama, T. 他	Botanical origin of Indian celery seed (Fruit)	J. Nat. Med.	63	248-253	2009
Harinantenaina, L. 他	Chemical constituents of <i>Pteris cretica</i> Linn. (Pteridaceae)	Biological Systematics and Ecology	37	133-137	2009
Takahashi, K. 他	Identification of sildenafil analogues found in a dietary supplement	Annual Report of the Chiba Prefectural Institute of Public Health	58	55-60	2009
Kamakura, H. 他	The source plants and the chemical composition of the passion flower products available as dietary supplements	Jpn. J. Food Chem.Safety	17(3)	198-206	2010
Wakana, D. 他	Three new triterpenyl esters, codonopilates A-C, isolated from <i>Codonopsis pilosula</i>	J. Nat. Med.	65(1)	18-23	2011
Matsumoto, T. 他	Metabolome analysis of Setsucha ( <i>Thamnia vermicularis</i> Ach.) products based on <sup>1</sup> H NMR spectroscopy	Jpn. J. Food Chem.Safety	18(1)	43-47	2011
Tokumoto, H. 他	Morphological discrimination of powdered senna stem and powdered senna leaf rachis	Jpn. J. Pharmacog.	65(2)	114-128	2011
Demizu, Y. 他	Identification of mutaprodenafil in a dietary supplement and its subsequent synthesis	Chem. Pharm. Bull.	59(10)	1314-1316	2011
Kumeta, Y. 他	Method for identifying botanical origin of shatavari product and its application for survey analysis of products in the Japanese market	Jpn. J. Food Chem.Safety	18(3)	163-167	2011
Abbaskhan A. 他	Biological activities of Indian celery, <i>Seseli diffusum</i> (Roxb. Ex Sm.) Sant. & Wagh	Phytother. Res.	online available DOI:10.1002/ptr.3600		2011
Kumeta, Y. 他	Chemical analysis to reveal botanical origin of shatavari products and confirmation of absence of alkaloid asparagamine A in <i>Asparagus racemosus</i>	J. Nat. Med.	accepted		2012
Zhao, Z. 他	A condensed phenylpropanoid glucoside and pregnane saponins from the roots of <i>Hemidesmus indicus</i>	J. Nat. Med.	submitted		
Wakana, D. 他	Morphological features and botanical origin of the plant products sold as <i>Sida</i> spp	Jpn. J. Food Chem.Safety	submitted		

## Botanical origin of Indian celery seed (fruit)

Takuro Maruyama · Ahmed Abbaskhan ·  
Muhammad Iqbal Choudhary · Yoshisuke Tsuda ·  
Yukihiro Goda · Michel Farille · Jean-Pierre Reduron

Received: 24 June 2008 / Accepted: 9 January 2009 / Published online: 13 February 2009  
© The Japanese Society of Pharmacognosy and Springer 2009

**Abstract** In the course of our study on the traditional medicines and foodstuffs used in Pakistan, we investigated the origin of Indian celery by using the analysis of the internal transcribed spacer (ITS) sequence of nuclear rDNA and a phytochemical approach. We found that the source plant of the Indian celery containing coumarin derivatives such as seselin (1), bergapten (2) and isopimpinellin (3) was not common celery, *Apium graveolens*. Our results suggest the source plant is *Seseli diffusum* even though Indian workers reported that *A. graveolens* seeds contain the aforementioned compounds. In addition, a market survey of the Indian celery in Pakistan and related countries revealed that the Indian celery seeds in Pakistani markets are mainly composed of three species which have been confused in rural markets.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s11418-009-0321-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

T. Maruyama (✉) · Y. Goda  
Division of Pharmacognosy, Phytochemistry and Narcotics,  
National Institute of Health Sciences,  
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku,  
Tokyo 158-8501, Japan  
e-mail: t-maruya@nihs.go.jp

A. Abbaskhan · M. I. Choudhary · Y. Tsuda  
H.E.J. Research Institute of Chemistry,  
International Center for Chemical and Biological Sciences,  
University of Karachi, Karachi 75270, Pakistan

M. Farille  
Passin Les Granges 01260,  
Champagne-en-Valromey, France

J.-P. Reduron  
Conservatoire Botanique Service des espaces verts  
Ville de Mulhouse, 2 rue Pierre et Marie Curie,  
10020, 68948 Mulhouse Cedex 9, France

**Keywords** Indian celery · (Furo)coumarin derivatives ·  
*Seseli diffusum* · rDNA internal transcribed spacer  
sequence

### Introduction

Indian celery is used in Pakistan to treat amenorrhea, urinary discharges, fever with cough, rheumatism, chest pains and inflammation. Indian celery is prescribed as an anti-spasmodic for use in treating bronchitis, asthma and, to some extent, liver obstructions, intestinal debility and spleen disorders [1].

In the course of bioassay screenings of traditional medicines and foodstuffs used in Pakistan, we observed that the 80% methanol/water extract of the Indian celery seeds (botanically fruit), available as “ajmod” in a local market in Karachi, showed several interesting biological activities: one was the cytotoxicity to yeast strains ascribed to hexane and chloroform extracts; the others were antioxidant and spasmolytic activities of water-soluble fractions<sup>1</sup>. The phytochemical study of the constituents of the Indian celery guided by the activities revealed that nine coumarin derivatives (1–9; Fig. 1) and a phenylpropanoid (10; Fig. 1) were responsible for its biological activities (see footnote 1).

In the late 1970s to early 1980s, Indian authors reported the presence of angular and linear (furo)coumarin derivatives (1–6, 8, 9, isoimperatorin, osthenol, apiumetin etc.) from the seeds which they perceived to be of *Apium graveolens* [2–10]. Judging from the similarity to the chemical composition reported by the Indian researchers, it was noticeable that they treated the same species as our material. On the other hand, the seeds of common celery,

<sup>1</sup> Details will be reported in our successive papers.

*A. graveolens*, are known to contain 3-*n*-butylphthalide derivatives with their characteristic fragrance [11], and these distinctive compounds were not observed in our isolation study of the Indian celery.

In India, various celery-related products are used as folk medicines and/or spices: ajmud (*A. graveolens*), ajwain (*Trachyspermum ammi*), Radhuni (*Carum roxburghianum*) and wild celery (*A. leptophyllum*). The contradicting constituents of celery seeds reported by the Indian [2–10] and the Japanese researchers [11] are possibly due to the indiscriminate handling of celery and celery-related seeds in Indian (and also Pakistani) crude drugs/spices markets.

In order to solve this anomaly, we investigated the botanical origin of the Indian celery by using the analysis of the internal transcribed spacer (ITS) sequence of nuclear rDNA. Furthermore, we collected the seed samples sold as

'celery seeds' from local markets in Pakistan and related countries and classified the source plants of the procured samples based on their ITS genotypes, morphological features and chemical compositions to rationalize their regional characteristics regarding the local names and the botanical source in Pakistan.

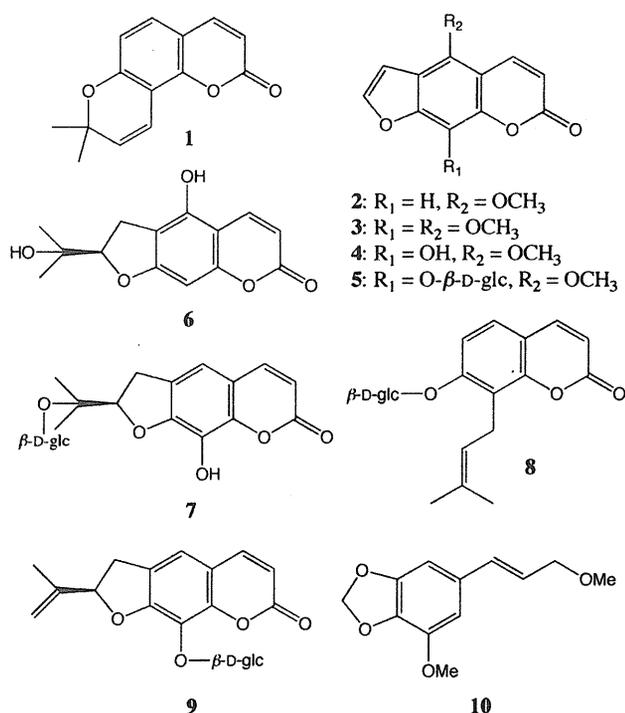
## Materials and methods

### Materials

The seeds of the authentic celery-related plants were generously supplied by each university or herbarium (Table 1). The seeds of *A. graveolens* used in this study were the same as those studied by the researchers at Showa Pharmaceutical University in their phytochemical studies [11], and they were originally imported from India by Asaoka Spice Co., Ltd. The Indian celery samples were purchased from local markets in Pakistan and related countries. The sample details are summarized in Table 2 together with their ITS genotypes. For the morphological observation and TLC analysis, Ce-27, Ce-30 and Ce-33 were used as the representatives of the major genotypes in the Pakistani markets.

### ITS sequence analysis

Each seed sample (20 mg) was crushed in a mixer mill, MM-300 (Qiagen, Germany), under liquid N<sub>2</sub>. Genomic DNA was extracted from the powdered samples by using a DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany). The ITS region (small subunit rDNA-ITS1-5.8S rDNA-ITS2-large subunit rDNA) of nuclear rDNA was amplified by a polymerase chain reaction (PCR) by using the obtained genomic DNA as a template. PCR was catalyzed using KOD DNA polymerase (Toyobo, Japan) with the following program in a Takara Thermal Cycler MP (Takara Bio, Japan) or a DNA engine PTC-200 (MJ Research, USA; currently Bio-Rad, USA): 94°C, 4 min; 40 cycles of 98°C, 15 s, 55°C, 5 s and 74°C, 30 s; 74°C, 4 min. The primers were designed for the conserved sequence among plant rDNA genes. The sequence information is as follows: ITS-S1, 5'-CTT TAT CAT TTA GAG GAA GGA G-3'; ITS-AS1, 5'-TTT TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'. After the removal of



**Fig. 1** Structures of the constituents isolated from Indian celery seed: seselin (1), bergapten (2), isopimpinellin (3), 8-hydroxy-5-methoxy-psoralene (4), 5-methoxy-8-*O*-β-D-glucosyloxypsoralene (5), celereoin (6), isorutarin (7), vellein (8), apiumetin glucoside (9), anthriscinol methyl ether (10)

**Table 1** Details of the authentic plants used in this study

Sample no.	Scientific name	Source	Voucher no.
Ce-1	<i>Apium graveolens</i>	Prof. Junichi Kitajima, Showa Pharmaceutical University, Japan	None
Ce-62	<i>Cyclospermum leptophyllum</i> (Pers.) Sprague ex Britt. & Wilson	USDA, ARS Plant Genetic Resource Unit, Cornell University, USA	PI 325867 94CII
Ce-63	<i>Seseli diffusum</i> (Roxb. ex Sm) Santapau & Wagh	Herbarium FARILLE, Jardin Botanique Alpin, La Jaisinia, Samoens, France	n 84-272

**Table 2** Details of the celery seed samples purchased in local markets

No.	Sample no.	Local name	Market place	Genotype*
1	Ce-2	Ajmod	Karachi	B
2	Ce-3	Ajmod	Karachi	B
3	Ce-4	Ajmod	Karachi	B
4	Ce-5	Ajmod	Karachi	B
5	Ce-6	Wal-ajowain	Sialkot	A
6	Ce-8	Ajmodh	Sargodha	A
7	Ce-9	Unknown	Peshawer	A
8	Ce-10	Ajmodh	Peshawer	A
9	Ce-11	Ajmodh	Peshawer	A
10	Ce-12	Ajmodh Karafas	Peshawer	A
11	Ce-13	Unknown	Mongora	A
12	Ce-14	Unknown	Hasan Abdal	C
13	Ce-15	Unknown	Dera Ismail Khan	A
14	Ce-16	Indian Ajowain	Lahore	B
15	Ce-17	Unknown	Taxila	A
16	Ce-18	Unknown	Peshawer	A
17	Ce-19	Unknown	Jalalabad, Afganistan	A
18	Ce-20	Celery	Karachi	D
19	Ce-23	Juwano	Kathmandu, Nepal	D
20	Ce-24	Jwano	Kathmandu, Nepal	D
21	Ce-25	Ajwain	Dibrugarh, India	D
22	Ce-26	Ajmodh Karafas	Peshawer	A
23	Ce-27	Ajmod	Hyderabad	B
24	Ce-28	Wal-ajowain	Bahawalpur	B
25	Ce-30	Ajmod, Karfas	Bahawalpur	A
26	Ce-31	Wal-ajowain	Bahawalpur	B
27	Ce-32	Wal-ajowain	Sialkot	D
28	Ce-33	Wal-ajowain	Sialkot	D
29	Ce-34	Ajmod	Sialkot	A
30	Ce-35	Wal-ajowain	Sialkot	B
31	Ce-36	Ajmud, Ajwain karfas	Murree	A
32	Ce-37	Wal-ajowain	Murree	B
33	Ce-38	Wal-ajowain	Rawalpindi	B
34	Ce-39	Wal-ajowain	Rawalpindi	B
35	Ce-40	Thick ajowain	Peshawer	D
36	Ce-41	Thin ajowain Desi ajowain	Peshawer	D
37	Ce-43	Indian ajowain Thick ajowain	Peshawer	D
38	Ce-44	Thin ajowain	Peshawer	D
39	Ce-45	AjowainKharasani	Peshawer	D
40	Ce-46	Wal-ajowain	Manshera	B
41	Ce-47	Wal-ajowain	Abbottabad	B
42	Ce-48	Indian ajowain Thick ajowain	Abbottabad	D

**Table 2** continued

No.	Sample no.	Local name	Market place	Genotype*
43	Ce-50	Wal-ajowain	Lahore	B
44	Ce-51	Ajowain wel	Lahore	B
45	Ce-52	Ajowain wel	Lahore	B
46	Ce-53	Wel-ajowain	Lahore	B
47	Ce-54	Wel-ajowain	Sukher	B
48	Ce-55	Wel-ajowain	Sukher	B
49	Ce-56	Wel-ajowain	Sukher	B
50	Ce-57	Wel-ajowain	Sukher	B
51	Ce-58	Wel-ajowain	Quetta	A
52	Ce-59	Ajowain	Quetta	B

\*Sequence types A to D have high similarity or are identical to *Apium graveolens* (U30552, U30553), the authentic *Seseli diffusum* (AB243688; this study), *Conium maculatum* (U79609, U79612) and *Trachyspermum ammi* (U78380, U78440), respectively

excess primers and dNTPs from the reaction mixture by Montage-PCR (Millipore, USA), the amplicons with a length of about 700 base pairs (bp) were directly sequenced on an ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). A cycle sequencing reaction was performed using a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). The DNA sequences were aligned on the basis of the Clustal W program [12].

#### Morphological observation

Twenty-kernel weight of each mericarp was measured in triplicate. The length, width and thickness of the mericarps were measured with a digital vernier caliper ( $n = 20$ ). Microscopic observations of fruit and mericarp were performed using a digital microscope zoom lens, VH-Z25 (Keyence).

#### TLC analysis

Ten milligrams of each sample was extracted with 200  $\mu$ L methanol at 60°C for 1 h. After centrifugation, the supernatant was charged on a TLC plate Silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) and developed with hexane/ethyl acetate (4:1).

#### Results and discussion

##### Botanical origin of Indian celery containing furocoumarins

We investigated the origin of the Indian celery, whose main principles were furocoumarin derivatives, using the