

た後、Tetracolor ONE (生化学工業) 試薬を加え、6時間のインキュベーション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。

RAW264.7細胞に対する増殖抑制試験:

試料は DMSO に溶解した後、調整培地で希釈し、メンブレンフィルターを通した。70%コンフルエントに到達した細胞を 1×10^4 cells/100 μ L/well となるように調製し 96 穴マイクロタイタープレートに播種した。24 時間接着後、試料溶液を各濃度に調製し、細胞を播種したウェルから 50 μ L の培地と各濃度の試料溶液 50 μ L とを置換し、培養液の全量を 100 μ L とした。37°C 5% CO₂ 下で 48 時間インキュベーションを行った後、XTT 試薬 (Roche) を加え、インキュベーション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、平均値を求めてグラフを作成し、IC₅₀ を求めた。ポジティブコントロールはプロテアソーム阻害剤である MG132 (10 μ M) で確認した。

MG63細胞に対する増殖抑制試験:

試料は DMSO に溶解した後、調整培地で希釈し、メンブレンフィルターを通した。70%コンフルエントに到達した細胞を 2×10^4 cells/100 μ L/well となるように調製し 96 穴マイクロタイタープレートに播種した。24 時間接着後、試料溶液を各濃度に調製し、細胞を播種したウェルから 50 μ L の培地と各濃度の試料溶液 50 μ L とを置換し、培養液の全量を 100 μ L とした。37°C 5% CO₂ 下で 48 時間インキュベーションを行った後、Tetracolor ONE (生化学工業) を加え、2 時間のインキュベーション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、平均値を求めてグラフを作成し、IC₅₀ を求めた。ポジティブコントロールはプロテアソーム阻害剤である MG132 (10 μ M)で行った。

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 μ g/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 μ m, 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 **9-11** を得た。(HPLC condition : Mobile Phase/acetonitrile: water-1:1, Detection/UV at 210 and 254 and 280, RI range 64, Column/ Shiseido CAPCELL PAK C18 MG 5 μ m, ϕ 20 \times 250 mm, Flow Rate/ 5.0 mL/min).

(2) *Bistorta* sp., *Cephalandra indica*, *Acacia concinna*, *Tectona hamiltoniana* は乾燥後グラインダーで粉碎した後、メタノールで温浸抽出(約 60°C)を 3 回行い、減圧濃縮後、エキスとした。

C. 研究結果及び考察

(1) 今回あらたに 3 種の化合物 (化合物

9-11) を得て、各種機器分析 (NMR, HRMS 等) を用いて構造を推定した。その結果、化合物 9, 11 は新規化合物であった。(図 1)

以下、新規化合物 9, 11 の構造決定について詳細に述べる。

化合物 9 は、 $^1\text{H-NMR}$ において、シングレットメチルが 2 本で(積分値 6H 分)、水酸基の付け根のプロトンで互いにカップリング ($J = 4.2 \text{ Hz}$ であるためシスジオールと決定) している 2 本のダブルットメチン、アロマトニックに結合したダブルットメチンが 2 本観測されこれらはカップリング定数 ($d, J = 9.6 \text{ Hz}$) からオルト位であることが明らかになった。一方、重 DMSO 中で 11.97 ppm および 12.88 ppm 付近に水素結合由来ピー

クが 2 本認められたこと、また $^{13}\text{C NMR}$ においてキノンに特徴的な 180 ppm 付近のシグナルが 2 つ、ハイドロキノンに特徴的な 160 ppm 付近のシグナルも 2 つ観測されたことから、1 種のハイ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 9 の構造を確認した(図 2, 測定溶媒 CD_3OD)。高分解能マスペクトル(HRESI-TOFMS)により分子量 305.0681 を観測し、その分子式を $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_7$ と確認した。UV 測定により、キノンに特徴的な 488nm の吸収を示した。絶対立体配置については、現在のところ収量が低く、今後単離精製を進め検討する予定である。

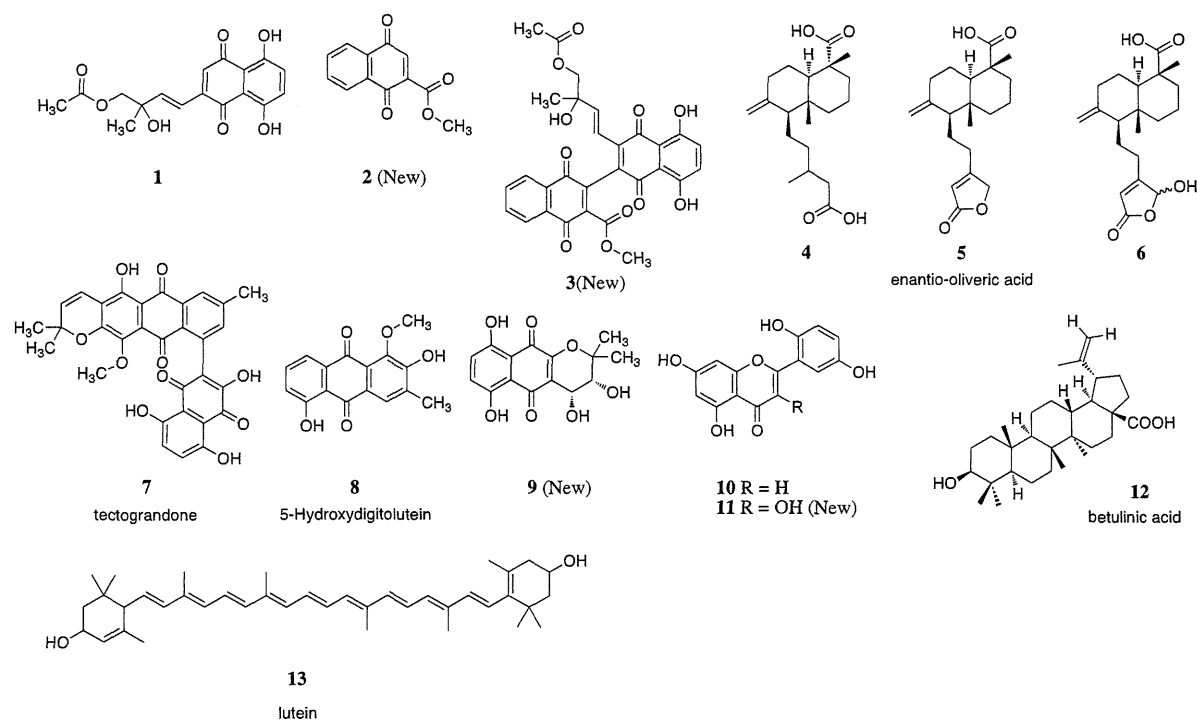


図 1 *T. grandis* より単離された化合物 1-13

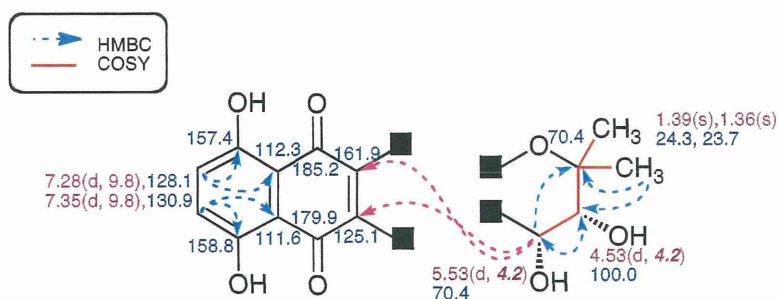


図2 化合物 9 の構造 (700 MHz, CD₃OD)

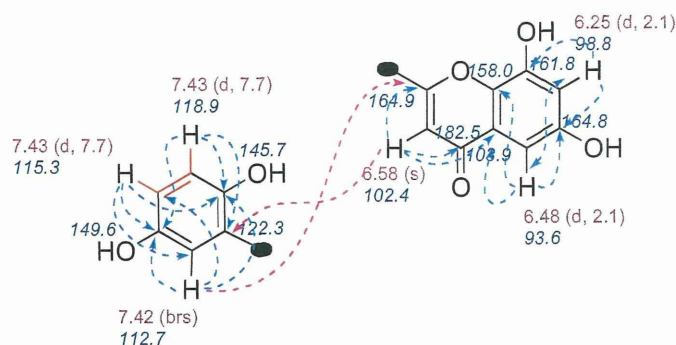


図3 化合物 11 の構造 (700 MHz, CD₃OD)

化合物 11 は、¹H-NMR において、メチル基などはみられず、アロマティックに結合したダブルットメチンが 5 本観測され、これらはカップリング定数からメタ位のもの (d, $J = 2.1$ Hz)、オルト位のもの (d, $J = 8.4$ Hz)、このオルト位のひとつのプロトンとメタ位であるもの (d, $J = 2.1$ Hz) の存在が明らかになった。一方、重 DMSO 中で 12.48 ppm 付近に水素結合由来ピークが 1 本認められた。また ¹³C NMR、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、フラボノイド骨格を有することが明らかになった (図 3, 測定溶媒 CD₃OD)。高分解能マスマスペクトル (HRESI-TOFMS) により分子量 301.0461 を観測し、その分子式を C₁₅H₉O₇ と確認した。

また、単離された化合物の抗リーシュマニア活性の結果を表 1 に示した。

表1 エキスおよび単離された化合物の抗リーシュマニア活性試験の結果(μg/mL)

	Lm	RAW
酢酸エチル分画	6.25	-
水分画	400	-
化合物 9	5.40	41.9
化合物 10	62.2	>100
化合物 11	-	-
AmB	<0.1	-

抗リーシュマニア試験 (in vitro): 表の値は IC₅₀ (μg/mL)。原虫は promastigote 体 *Leishmania major* (Lm) を用いて試験を行った。RAW264.7 (RAW) はリーシュマニア原虫が感染する際に宿主セルとなるマクロファージに対する影響を検討するため用いた。値はエキスについては MIC (μg/mL, コントロールに対し 25% 抑制)、化合物は IC₅₀ (μg/mL) で示した。ポジティブ

コントロールは amphotericin B (AmB)を用いた。

(2) ミャンマーにて入手した 3 種の植物 (*Bistorta* sp., *Cephalandra indica*, *Acacia concinna*, *Tectona hamiltoniana*) についてエキス作成し抗リーシュマニア活性試験およびヒト骨肉腫オステオサルコーマ MG63 細胞(MG)に対する増殖抑制試験を行った。結果を表 2 に示した。エキスは、メタノール抽出したものをを用いた。

表 2 ミャンマー産植物エキスの活性試験の結果 (MIC: $\mu\text{g/mL}$)

エキス名	Lm	MG
<i>Bistorta</i> sp.葉	>400	>200
<i>Bistorta</i> sp.根	400	>200
<i>C. indica</i> 地上部	>400	>200
<i>A. concinna</i> 地上部	>400	>200
<i>T. hamiltoniana</i> 枝	200	-
AmB (IC ₅₀)	<0.1	

その結果、これらの化合物は抗リーシュマニア活性を示さなかった。一方、MG63 に対しては、どのエキスも増殖抑制を示さなかったが、顕微鏡観察下において、*Bistorta* sp.の根のエキス 50 $\mu\text{g/mL}$ 添加時に接着が緩くなり形態が丸くなる現象が観察された。(図 4)

D. 結論

Tectona grandis の材はミャンマーにおいて主に高級家具材として使用され、その葉は廃棄されている。昨年度までの研究で、抗リーシュマニア試験で強い活性が見出され、葉に含まれる化合物 **1**–**3** を含む赤い色素部分に非常に強い活性があることが

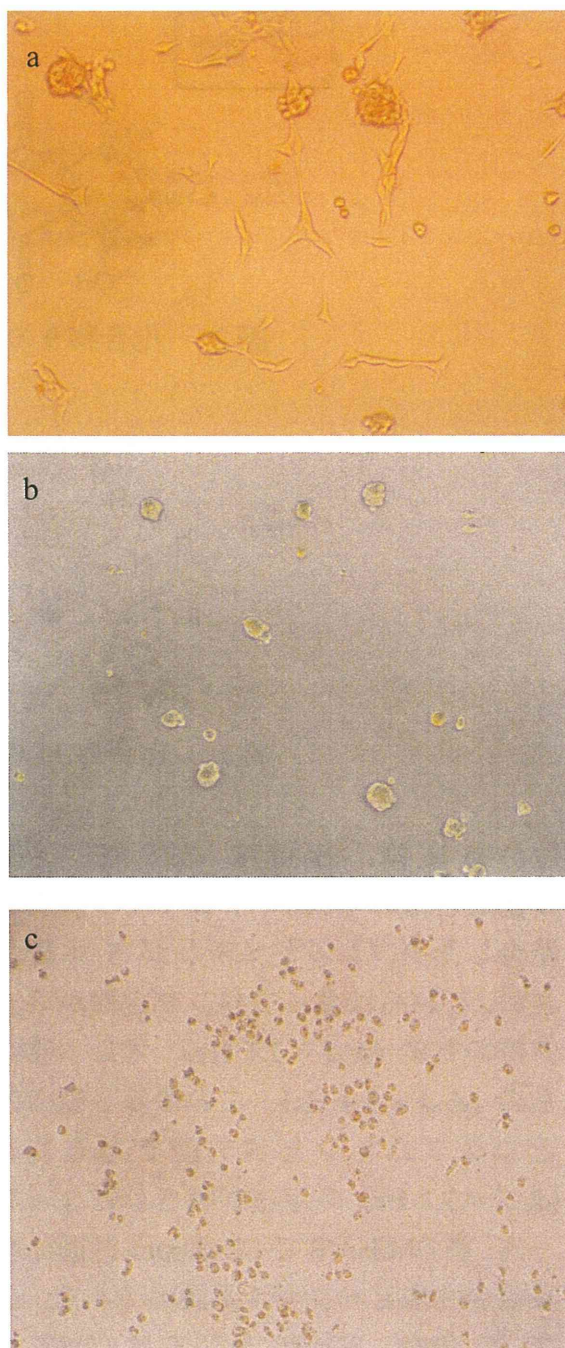


図 4. a:コントロール, b: *Bistorta* sp.の根のエキス 50 $\mu\text{g/mL}$ 添加, c: MG132 10nM 添加(ポジティブコントロール), 倒立顕微鏡下, x100.

実験過程で明らかになった。得られた化合物のうち、**1**及び新規化合物**3**が最も顕著な活性を示した。(IC₅₀ 0.43-0.47 $\mu\text{g/mL}$)

今回、シスジオール構造を有する新規ベンゾキノン(**9**)に活性を見出し、さらに2種

のフラボノイドを単離した(10, 11). 化合物10はほぼ抗リーシュマニア活性を有していない事が明らかになった. 11については現在検討中である. 活性の見られた化合物9は、マウスマクロファージ様細胞RAW264.7に対して細胞毒性を有さないことが確認された.

また、ミャンマーチン州ディーティンにて入手したタデ科イブキトラノオの仲間 *Bistorta* sp. およびマンダレー管区伝統医薬大にて入手した2種の植物、ウリ科キンポウ *Cephalandra indica*, 及びネムノキ科キンモン *Acacia concinna* は、現地で薬用としてヘルペスなどの皮膚疾患(*C. indica*) や、利尿薬や洗髪剤として(*A. concinna*) 使用されているが、活性試験の結果、これらに抗リーシュマニア活性は見られなかった. しかしながら、ヒト骨肉腫オステオサルコーマに対する増殖抑制試験において、*Bistorta* sp. の根メタノールエキスに細胞の形態若しくは接着に影響を与えることが示唆された. 細胞形成を司るアクチンや微小器官に何らかの影響を与えている事が考えられるため、今後免疫染色などを検討する予定である. マンダレー管区 *Tectona hamiltoniana* の枝メタノールエキスには抗リーシュマニア活性は見られなかった.

E. 学会発表

1. 安元(森)加奈未、瀧野裕之、我妻 豊、佐竹元吉、関田節子(2011). 抗リーシュマニア活性を有する有用植物の探索 (その22) -ミ

ャンマー産植物 KYUN *Tectona grandis* の成分について-. 日本薬学会 128年会, 平成23年3月, 静岡.

2. 安元(森)加奈未、瀧野裕之、我妻 豊、佐竹元吉、関田節子(2011). 抗リーシュマニア活性を有する有用植物の探索 (その23) -ミャンマー産植物 KYUN *Tectona grandis* の成分について-. 日本生薬学会第58回年会, 平成23年9月, 東京.

3. 安元 加奈未、熱帯植物からの抗リーシュマニア活性物質の探索 . 日本薬学会生薬天然物部会奨励研究受賞講演, 第4回食品薬学シンポジウム, 平成23年10月, 東京.

F. 論文発表

1. Rangel, M; Cabrera, M. P. S.; Kazuma K.; Ando, K.; Wang, X.; Kato, M.; Nihei, K.; Hirata, I. Y.; Cross, T. J.; Garcia, A. N.; Mauro, E. L. F.; Franzolin, M. R.; Fuchino, H.; Yasumoto, K. M.; Sekita, S.; Kadowaki, M.; Satake, M.; Konno, K. (2011). Chemical and biological characterization of four new linear cationic α -helical peptides from the venoms of two solitary eumenine wasps, *Toxicon*, 57(7-8), 1081-1092.

II-4. 分担研究報告書

大麻の DNA 鑑定を目的としたゲノム多様性に関する研究

研究分担者 高上馬 希重 北海道医療大学 薬学部准教授

研究要旨 大麻の原植物であるアサは世界中に分布することから、非常に多くの多様性が存在する。葉（小葉の枚数、形状）、茎（表皮色）、種子（大きさ、形状）など様々な形態的特徴を系統ごとに調べた。また THC 含有率、THCA 生合成酵素遺伝子型を調べた。THCA 生合成酵素遺伝子の配列は、THC の含有率によって2つのタイプに分かれた（THC 高含有系統：D 型、低含有系統：F 型）。D 型はさらに D-1 型、D-2 型が存在した。F 型には F-1 型、F-2 型、F-3 型、F-4 型、F-5 型、F-6 型、F-7 型の7タイプが存在した。得られた 30 系統の形態的特徴、TCA 含有率、THCA 生合成酵素遺伝子型の各情報をもとにデータベースの構築を行った。

A. 研究目的

近年わが国における違法大麻事犯の急増により、押収大麻の鑑定の必要性が増している。この場合に被疑者が有していたものが大麻であることの立証が必要である。個人で栽培、増殖したものであるのか、あるいは他者から譲り受けたものであるのかなどを立証する必要がある。また違法大麻栽培事例では、被疑者の所有していた種子や試料が大麻であるか、あるいは末端の使用者と販売者の所有する大麻が同一のものであるかどうかを立証する必要がある。このような問題を解決する一手段として、大麻の原植物であるアサの形態的特徴や麻薬成分、DNA 情報などを総合的に関連付けたデータベースが必要である。アサは世界中に分布することから、植物学的には一種であるにもかかわらず、非常に多くの多様性が存在することが知られている。葉の外部形態では小葉の枚数や形状、茎では表皮

色（緑色、赤色など）、種子では大きさや形状などに系統ごとに特徴を有している。また麻薬性成分である THC 含有率にも大きな系統間差が知られている。これらの情報と DNA 塩基配列情報を一つに関連させたデータベースの構築を行った。DNA 情報として複数系統の試料を用い、THCA 生合成酵素遺伝子型を調べた。

B. 研究方法

【植物材料】

植物はその成育した環境によって、形態的特徴は内化学成分量に変化をきたすことがある。そこで環境要因の違いがこれらに影響することをなるべく排除するため、一定環境条件で植物体を育成する人工気象条件下(25℃, 24時間連続照明)で各系統のアサを育成した。

【THC 分析】

植物体の展開葉を暗黒、50℃で12時間通風乾燥したものを分析試料とした。試

料を粉碎後エタノールを加え、室温で 2 時間溶出した。抽出液を遠心分離(7,000 ×g, 5 min)し、上澄を分析試料とし HPLC によって分析を行った。HPLC 条件は、カラム : Waters Symmetry C18 (3.5 μm、φ 4.6 mm×100 mm、Waters)、カラム温度 : 30℃、Solvent system : MeOH – H₂O (85:15, v/v, 0.6 ml/min flow rate)、検出: UV 210 nm とした。

【THCA 生合成酵素遺伝子解析】

植物体の生葉 150 mg から genomic DNA を得た。ここから THCA 生合成酵素遺伝子を単離した。プライマー a (5'-TGA AGA AAA AAA ATG AAT TGC TCA GCA TTT TCC -3') とプライマー b (5'-TCT ATT TAA AGA TAA TTA ATG ATG ATG CGG TGG -3')、PfuTurbo^R DNA polymerase (STRATAGENE)を用い、PCR 反応条件は95℃ 2分プレヒート、95℃ 30秒、50℃ 30秒、72℃ 2分を30サイクル後、72℃ 10分とした。PCR産物を TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) により Cloning Kit (Invitrogen) によりクローニングした。BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE biosystems)によりフラグメント配列を決定した。シーケンス反応には、プライマー a、b 及び c (5'-CAA ACT GGT TGC TGT CCC ATC-3')、d (5'-AGC TGG GAA GAA GAC GGC TTT CTC A-3')、e (5'-CGT CTT CTT CCC AGC TGA TCT-3')、f (5'-CGC CAA CAG TAG GGC AAT ACC-3') を用いた。

C. 研究結果

図 1 に人工気象条件下で育成したア

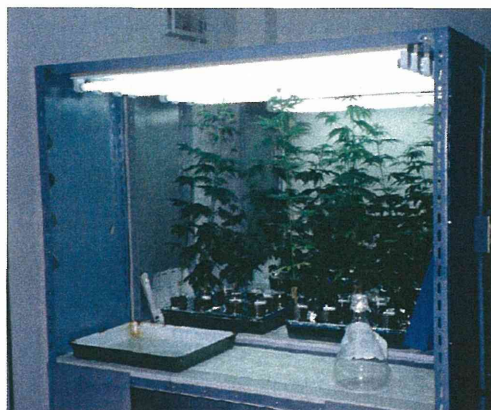






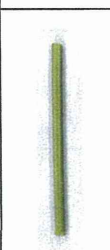



図1 人工気象条件下で育成したアサ植物体

サ植物体を示した。本環境で得られた 30 系統のアサ植物体の形態的特徴、THC 含有率、THCA 生合成酵素遺伝子型を図 2-①～⑥に示した。
















また各情報をデータベースソフト「ファイルメーカー Pro 11」を用いてデータベース化した (図 3)。

THCA 生合成酵素遺伝子の DNA 配列は、THC の含有率によって 2 つのタイプに分

系統番号	葉形態	茎形態	種子形態(千粒重 g, fw)	THC含有率 (%, dw)	THCA生合成 酵素遺伝子型
001			 17.56	1.41~1.66	D-2型 187 A→C 366 A→T 399 A→G 1179 A→T
004			 18.61	0.13	
005			 22.87	0.12	F-7型 46 A→T 79 T→A 800 G→A 1398 C→T
007			 4.69	0.09	
009			 15.17	not detected	F-2型 79 T→A 198 G→A 800 G→A 1398 C→T
















* THCA生合成酵素遺伝子型
:D型はD-1型に対して異なる塩基種と位置を表示
:F型はF-1型に対して異なる塩基種と位置を表示

図2-① 各系統の形態的特徴、THC含有率、THCA生合成遺伝子型

系統番号	葉形態	茎形態	種子形態(千粒重 g, fw)	THC含有率 (%, dw)	THCA生成 酵素遺伝子型
010			 12.64	1.19	D-1型
011			 16.19	0.06	F-4型 79 T→A 619 G→T 800 G→A 1398 C→T 1560 G→A
013			 15.32	2.79～7.51	D-1型
015			 27.46	0.21	
016			 26.51	not detected	















* THCA生成酵素遺伝子型
:D型はD-1型に対して異なる塩基種と位置を表示
:F型はF-1型に対して異なる塩基種と位置を表示

図2-② 各系統の形態的特徴、THC含有率、THCA生成遺伝子型

系統番号	葉形態	莖形態	種子形態(千粒重 g, fw)	THC含有率 (%, dw)	THCA生成 酵素遺伝子型
020			 15.63	4.45	D-1型
023			 18.19	0.14	
028			 11.63	0.06	
030			 12.32	0.09~1.24	
031			 17.18	2.91	
















* THCA生成酵素遺伝子型
: D型はD-1型に対して異なる塩基種と位置を表示
: F型はF-1型に対して異なる塩基種と位置を表示

図2-③ 各系統の形態的特徴、THC含有率、THCA生成遺伝子型

系統番号	葉形態	莖形態	種子形態 (千粒重 g, fw)	THC含有率 (% dw)	THCA生合成酵素遺伝子型
032			 15.24	0.05	
034			 18.31	0.08	
044			 31.80	0.08~0.19	
045			 41.32	0.05	F-1型
053			 29.20	1.63	D-1型

* THCA生合成酵素遺伝子型
: D型はD-1型に対して異なる塩基種と位置を表示
: F型はF-1型に対して異なる塩基種と位置を表示

図2-④ 各系統の形態的特徴、THC含有率、THCA生合成遺伝子型

系統番号	葉形態	茎形態	種子形態(千粒重 g, fw)	THC含有率 (%, dw)	THCA生合成 酵素遺伝子型
054			 23.40	3.36	D-1型
059			 20.60	0.77	
062			 18.30	1.61	
064			 12.10	0.06	
065			 13.90	0.06	

* THCA生合成酵素遺伝子型
: D型はD-1型に対して異なる塩基種と位置を表示
: F型はF-1型に対して異なる塩基種と位置を表示

図2-⑤ 各系統の形態的特徴、THC含有率、THCA生合成遺伝子型

系統番号	葉形態	莖形態	種子形態(千粒重 g, fw)	THC含有率 (%, dw)	THCA生合成 酵素遺伝子型
066			 18.10	0.05~0.18	F-6型 79 T→A 800 G→A 1398 C→T
067			 18.10	0.11	
068			 13.00	0.07	F-5型 79 T→A 229 A→G 800 G→A 1398 C→T
069			 12.60	3.93	
078			 6.67	0.08	F-3型 800 G→A 1398 C→T 1410 T→G

* THCA生合成酵素遺伝子型

:D型はD-1型に対して異なる塩基種と位置を表示

:F型はF-1型に対して異なる塩基種と位置を表示

図2-⑥ 各系統の形態的特徴、THC含有率、THCA生合成遺伝子型

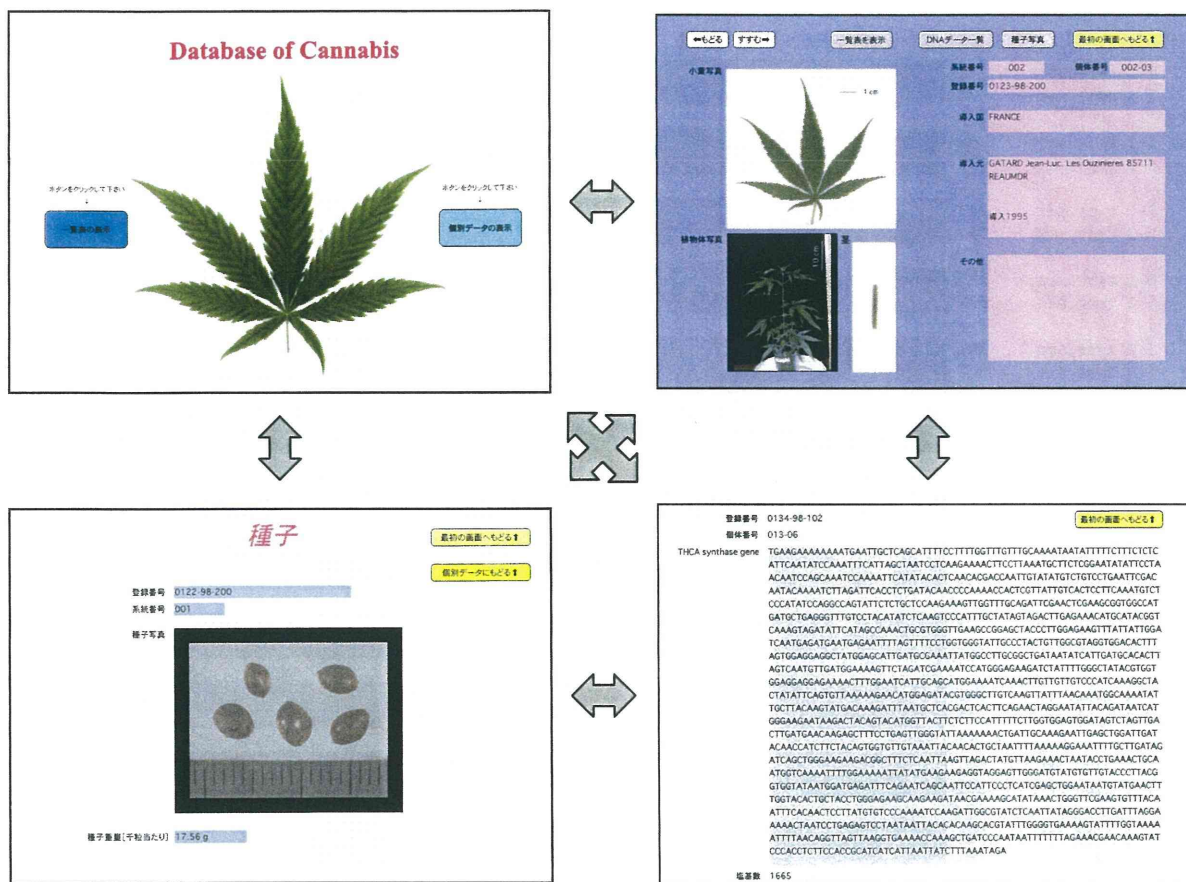


図3 大麻データベースの構築
(植物形態情報、成分情報、DNA情報)

かれた。THC 高含有系統の THCA 生合成酵素遺伝子の DNA 配列を D 型 (Drug-type)、THC 低含有系統の DNA 配列を F 型 (Fiber-type) とした。D 型の系統にはさらに 2 つのタイプが存在したことから、それぞれを D-1 型、D-2 型とした。D-2 型は D-1 型に対して 4 塩基の置換が認められた。また F 型に 7 つのタイプが存在し、それぞれ F-1 型、F-2 型、F-3 型、F-4 型、F-5 型、F-6 型、F-7 型とした。F-1 型に対してそれぞれ、4 塩基 (F-2 型)、3 塩基 (F-3 型)、5 塩基 (F-4 型)、4 塩基 (F-5

型)、3 塩基 (F-6 型)、4 塩基 (F-7 型) の置換が認められた。

図 4 には D-1 型 (013 系統) と F-1 型 (045 系統) の配列を示した。

植物体の形態的特徴からは THC 含有率、THCA 生合成遺伝子型と関連する事項は認められなかった。

図 5 には本研究の過程で得られた特異的な特徴を有する葉形態を示した。図 5 に示した 3 つの葉は全て同じ系統 (045 系統) から得られた植物体のものである。図 5-a は一般的な形態である。図-b、c

D-1 type.seq	1	TGAAGAAAAAATGAATTGCTCAGCATTTTCTTTGGTTGTTTGCAAAAATATATTTTCTTCTCATTCCATATCCAAATTTCA	90
F-1 type.seq	1A.....	90
D-1 type.seq	91	ATAGCTAATCCTGAGAAAACTTCTTAAATGCTTCTCAAACATATTCACAACATGTAGCAATCCAAAACCTGTATACACTCAACAC	180
F-1 type.seq	91A.....GG.....T.....CC.....T.....A.....	180
D-1 type.seq	181	GACCAATTGTATATGCTATCCTGAATTCGACAATACAAAATCTTAGATTCACTCTGATACAACCCAAAACCACTCGTTATTGCTACT	270
F-1 type.seq	181G.....C.....	270
D-1 type.seq	271	CCTTCAAATAACTCCCATATCCAAGCAACTATTATGCTCTAAGAAAGTTGGCTTGCAATTGCAACTCGAAGCGGTGCCATGATGCT	360
F-1 type.seq	271GT.....G.....C.....G.....C.....C.....T.....	360
D-1 type.seq	361	GAGGGTATGTCCTACATATCTCAAGTCCCATTGTTGTAGTAGACTTGAGAAACATGCATTCGATCAAATAGATGTTTCATAGCCAAACT	450
F-1 type.seq	361T.....C.....A.....A.....G.....G.....A.....	450
D-1 type.seq	451	GCCTGGGTTGAAGCCGGAGCTACCCTTGGAGAAGTTATTATTGGATCAATGAGAAAGATGAGAATCTTAGTTTTCTGGTGGGTATTGC	540
F-1 type.seq	451T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	540
D-1 type.seq	541	CCTACTGTTGGCGTAGGTGGACACTTAGTGGAGGAGGCTATGGAGCATTGATGCGAAATATGGCCTTGGCGCTGATAATATTATTGAT	630
F-1 type.seq	541C.....	630
D-1 type.seq	631	GCACACTTAGTCAATGTTGATGGAAAAGTTCTAGATCGAAAATCCATGGGAGAAGATCTGTTTTGGGCTATACGTGGTGGTGGAGGAGAA	720
F-1 type.seq	631A.....A.....	720
D-1 type.seq	721	AACTTGGAAATCATTGCAGCATGGAAAATCAAACCTGGTGGCTGTCCCATCAAAGTCTACTATATTCAGTGTAAAAAGAACATGGAGATA	810
F-1 type.seq	721T.....T.....G.....	810
D-1 type.seq	811	CATGGGCTGTCAAGTATTAAACAAATGGCAAAATATTGCTTACAAGATGACAAAGATTTAGTACTCATGACTCACTTCAACAAAG	900
F-1 type.seq	811G.....A.....G.....C.....G.....T.....G.....	900
D-1 type.seq	901	AATATTACAGATAATCATGGGAAGAATAAGACTACAGTACATGGTACTTCTCTCAATTTTTCATGGTGGAGTGGATAGTCTAGTCCGAC	990
F-1 type.seq	901C.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	990
D-1 type.seq	991	TTGATGAACAAGAGCTTCTCAGTGGGATTAAAAAACTGATTGCAAGAATTAGCTGGATTGATACAACCATCTTACAGTGGT	1080
F-1 type.seq	991G.....	1080
D-1 type.seq	1081	GTTGTAATTTAACTGCTAATTTTAAAAAGAAATTTGCTTGATAGATCAGCTGGGAAGAAGACGGCTTCTCAATTAAGTTAGAC	1170
F-1 type.seq	1081AC.....	1170
D-1 type.seq	1171	TATGTTAAGAAAACAATTCAGAAACTGCAATGGTCAAATTTTGGAAAAATTATATGAAGAAGATGTAGGAGCTGGGATGTATGTGTG	1260
F-1 type.seq	1171T.....A.....T.....G.....	1260
D-1 type.seq	1261	TACCCTTACGGTGGTATAATGGAGGAGATTTGAGAAATCAGCAATCCATTCCCTCATCGAGCTGGAATAATGTATGAACTTTGGTACACT	1350
F-1 type.seq	1261T.....	1350
D-1 type.seq	1351	GCTTCTGGGAGAAGCAAGAAGATAATGAAAAGCATATAAACTGGGTCGAAGTGTATAAATTTACGACTCCTTATGTGTCCCAAAAT	1440
F-1 type.seq	1351A.....C.....C.....C.....A.....	1440
D-1 type.seq	1441	CCAAGATTGGCGTATCTCAATTATAGGGACCTGATTTAGGAAAACTAATCATGCGAGTCCTAATAATTAACACAAGCACGTATTTGG	1530
F-1 type.seq	1441C.....A.....	1530
D-1 type.seq	1531	GGTGAAGAATTTTGGTAAAAATTTAACAGTTAGTTAAGGTGAAAACATAAGTTGATCCCAATAATTTTTTGAAGAACGAAACAAAGT	1620
F-1 type.seq	1531C.....C.....	1620
D-1 type.seq	1621	ATCCACCTTCCACCGCATCATTAATTATCTTTAAATAGA	1665
F-1 type.seq	1621	1665

図4 D-1型およびF-1型のTHCA生成酵素遺伝子配列

(D-1型: 013系統、F-1型: 045系統の配列を示した)

はこれ単独ではアサとは判断しがたいものであった。

このような葉は 013 系統、044 系統でも確認された。また同一系統で、同一個体

で「a」、「b」、「c」の3タイプと同様な形態をした葉を展開する個体も認められた。

上記の本研究の各種情報を用いてデータベースを構築した (図 3)。

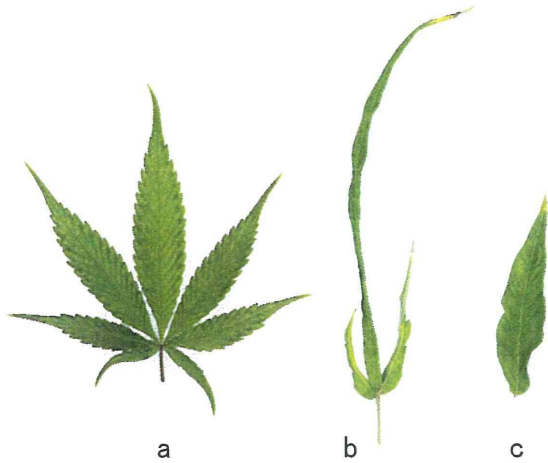


図5 同一系統内(個体)で異なる葉の形態
(a、b、cはそれぞれ045系統のものを示した)

D. 考察

本研究から、アサの形態的特徴、THC含有率、THCA 生合成酵素遺伝子型の情報が総合的にデータベース化された。THCA 生合成酵素遺伝子型には非常に多くのタイプが存在することから、大麻鑑定における有効な鑑定手段であることが再認識された。植物体の形態的特徴からは THC含有率、THCA 生合成遺伝子型を推定することは困難であった。このことは従来、文献などで「植物体および葉身が細身のものは THC 含有率が高い」としたことを否定した。本研究で得られた総合的なアサの多様性情報は今後の大麻事犯における鑑定作業に非常に有用であると考えられる。

E. 結論

大麻の原植物であるアサ 30 系統の形態的特徴、TCA 含有率、THCA 生合成酵素遺伝子型の各情報をもとにデータベースの構築を行った。本研究で得られた総合的なアサの多様性情報は今後の大麻事犯における鑑定作業に非常に有用である。

F. 参考文献

1. E. Small, A. Cronquist, A practical and natural taxonomy for Cannabis, Taxon 25 (1976) 405–435.
2. S. Sirikantaramas, S. Morimoto, Y. Shoyama, Y. Ishikawa, Y. Wada, Y. Shoyama and F. Taura, Molecular cloning and heterologous expression of Δ^1 -tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis sativa* L., Journal of Biological Chemistry 279 (2004) 39767–39774.

G. 研究発表及び論文発表

なし

H. 学会発表

1. 高上馬希重、金尚永、2012年3月30日、違法薬物「大麻」の植物学的特徴とDNA情報の多様性のデータベース化、日本薬学会第132年会（札幌）
(ハイライト発表に選出された)

III. 研究成果の刊行物・別刷

1. Makino Yukiko “Simple HPLC method for detection of trace ephedrine and pseudoephedrine in high-purity methamphetamine”, *Biomedical Chromatography*, 2012;26:327-330

Simple HPLC method for detection of trace ephedrine and pseudoephedrine in high-purity methamphetamine

Yukiko Makino*

ABSTRACT: A simple and sensitive HPLC technique was developed for the qualitative determination of ephedrine and pseudoephedrine (ephedrines), used as precursors of clandestine *d*-methamphetamine hydrochloride of high purity. Good separation of ephedrines from bulk *d*-methamphetamine was achieved, without any extraction or derivatization procedure on a CAPCELLPACK C₁₈ MGII (250 × 4.6 mm) column. The mobile phase consisted of 50 mM KH₂PO₄-acetonitrile (94:6 v/v %) using an isocratic pump system within 20 min for detecting two analytes. One run took about 50 min as it was necessary to wash out overloaded methamphetamine for column conditioning. The analytes were detected by UV absorbance measurement at 210 nm. A sample (20 mg) was simply dissolved in 1 mL of water, and a 50 µL aliquot of the solution was injected into the HPLC. The detection limits for ephedrine and pseudoephedrine in bulk *d*-methamphetamine were as low as 3 ppm each. This analytical separation technique made it possible to detect ephedrine and/or pseudoephedrine in seven samples of high-purity *d*-methamphetamine hydrochloride seized in Japan. The presence of trace ephedrines in illicit methamphetamine may strongly indicate a synthetic route via ephedrine in methamphetamine profiling. This method is simple and sensitive, requiring only commonly available equipment, and should be useful for high-purity methamphetamine profiling. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: HPLC; ephedrine; pseudoephedrine; high-purity methamphetamine; profiling analysis

Introduction

Clandestine manufacture of methamphetamine is an increasing problem, particularly in East and Southeast Asia, where the main precursor for illicit methamphetamine has been ephedrine or pseudoephedrine for a long time. Impurity profiling of methamphetamine hydrochloride is a very useful tool for monitoring the synthetic routes and distribution of drugs and precursors (Remberg and Stead, 1999). The chemical information on the precursor is useful for the strict control of precursor chemicals, which is a valuable countermeasure to prevent illicit synthesis. Therefore, the identification of ephedrine or pseudoephedrine as a starting material in illicit methamphetamine is essential to estimate the precursor (Makino *et al.*, 2005; Kurashima *et al.*, 2009). There have been seizures of high-purity *d*-methamphetamine hydrochloride in Japan. It is not possible to detect ephedrine and/or pseudoephedrine in these samples by GC-MS (Sasaki and Makino, 2006) or HPLC (Makino *et al.*, 2002). A number of analytical methods have been developed for the separation and determination of ephedrines in herbal materials and illicit methamphetamine hydrochloride (Makino *et al.*, 2002; Iwata *et al.*, 2006; Pellati and Benvenuti, 2008). It may be possible to determine trace ephedrines in bulk samples if using HPLC-MS or GC-TOF-MS with high sensitivity and selectivity. However, these instruments are not yet available for many forensic laboratories in East and Southeast Asia. Therefore, I have investigated a simple and practical HPLC method for the detection of trace ephedrine and pseudoephedrine in high-purity methamphetamine. Few simple methods for the determination of trace ephedrines in bulk methamphetamine hydrochloride have been reported in the literature. In our previous work, the

detection limit for ephedrines was 500 ppm (Makino *et al.*, 2002). Iwata *et al.* (2006) reported the detection limit of ephedrines in bulk methamphetamine to be 40 ppm by capillary electrophoresis. In recent years, Indonesia and Malaysia have reported the increasing scale and sophistication of methamphetamine manufacture (World Drug Report by UNODC, 2010), and there is a need for forensic laboratories in Southeast Asia to obtain chemical information on seized methamphetamine quickly and conveniently, using conventional instruments in hand. Most forensic laboratories in Southeast Asia already have facilities to determine key impurities of seized methamphetamine by GC-MS and the optical activity by simple HPLC (Makino *et al.*, 1999). However, there is no decisive chemical information for estimating the precursor for high-purity methamphetamine, because there is no simple and sensitive method that would be applicable in many forensic laboratories in which only conventional HPLC is available. As a continuation of our previous work (Makino *et al.*, 2002), the present paper describes a simple and more sensitive HPLC method for the qualitative analysis of ephedrine and pseudoephedrine in high-purity methamphetamine samples from which ephedrines were not detected by GC-MS or GC as reported in our methamphetamine profiling (Sasaki and Makino, 2006).

* Correspondence to: Y. Makino, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan. E-mail: ymakino@mol.f.u-tokyo.ac.jp

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

Experimental

Materials

l-Ephedrine hydrochloride, *d*-ephedrine hydrochloride and *d*-pseudoephedrine hydrochloride were purchased from Daiichi Fine Chemical (Takaoka, Japan). 2-Phenylethylamine hydrochloride was purchased from Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan). Seven illicit methamphetamine hydrochloride samples seized in Japan were provided by the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan. Water was purified with a Milli-Q system (Nihon Millipore, Tokyo, Japan). All other chemicals were of analytical reagent grade.

Instruments and HPLC analysis

A Shiseido Nanospace liquid chromatograph equipped with a photodiode array detector linked to a data system (EZChromElite kit for Shiseido, Tokyo, Japan) was used for data acquisition and storage. The column effluent was monitored by measuring UV absorbance at 210 nm. The system consisted of two pumps, a column oven, an autosampler and a degassing unit. Chromatographic separation was achieved at 40°C on an octadecylsilyl (ODS)-type column (CAPCELLPAK C₁₈ MGII S-5, 250 × 4.6 mm, 5 μm, Shiseido, Tokyo, Japan) using the following mobile phase: (A) acetonitrile and (B) 50 mM aqueous KH₂PO₄. Elution was started with 6% A solution (20 min hold) for detecting ephedrines, changed to 13% A solution at 20.1 min (15 min hold) for washing out bulk methamphetamine, and then turned back to 6% A solution. The flow-rate was 1 mL/min.

Sample preparation

Standard solution was prepared at a final concentration of 10 μg/mL in water (10 ng/μL) for each analyte. An internal standard solution of 2-phenylethylamine hydrochloride was prepared at a final concentration of 10 μg/mL in water (10 ng/μL). A sample without ephedrine and pseudoephedrine was prepared by recrystallization of seized high-purity *d*-methamphetamine hydrochloride in order to examine the accuracy and precision of this method. The recrystallization was repeated five times from chloroform by dropping of *n*-hexane (sample 500 mg, chloroform 30 mL and *n*-hexane 30 mL for the first step). The recrystallized sample (200 mg) was dissolved in water (10 mL), and 1 mL aliquots were added to five vials. The internal standard solution (20 μL) was added and standard aqueous solution was spiked into each vial to give final contents of 0, 3, 6, 9 and 12 ppm. Seven seized samples were selected for this study based on the preliminary impurity profiling by GC-MS carried out in our earlier work (Sasaki and Makino, 2006). The optical activities of the seven samples were all *dextro*-form, and the impurity characteristics of samples are summarized in Table 1. Each sample was dissolved at the high concentration of 40 mg per 2 mL water. Each sample solution was divided equally into two vials. The internal standard solution (20 μL) was added to each vial. Eighteen microliters of the standard solution was added into one vial to give a final content of 9 ppm. The measurement of each sample was carried out five times. The injection volume was 50 μL for all measurements.

Results and discussion

HPLC conditions

In order to develop a simple and sensitive HPLC technique for the qualitative identification of trace ephedrines (for structures see Fig. 1) in pure *d*-methamphetamine hydrochloride, I modified our previous method (Makino *et al.*, 2002), in which an ODS type UG-120 column was used with a mobile phase containing an ion-pairing reagent, because the detection limit of ephedrines in bulk methamphetamine was 500 ppm and mobile phase containing sodium dodecyl sulfate (SDS) was not good for

Table 1. Characteristics of seven samples selected for this study

Sample no.	Key impurity ^a		
	Azi	Nap	Eph
1	+	–	–
2	–	+	–
3	–	+	–
4	–	+	–
5	–	–	–
6	+	–	–
7	+	–	–

+, Detected; –, not detected.

Azi, *cis*- and/or *trans*-1,2-dimethyl-3-phenylaziridine; Nap, 1,3-dimethyl-2-phenyl-naphthalene and/or 1-benzyl-3-methylnaphthalene; Eph, ephedrine/pseudoephedrine.

^aKey impurity was detected by GC-MS.

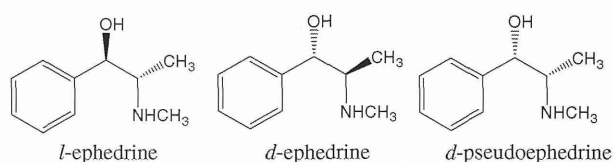


Figure 1. Chemical structures of the ephedrines investigated in this study.

the column's lifetime. For the present purpose, a CAPCELLPAK C₁₈ MGII column was selected, which offers better retention and can be more highly loaded with basic amines than the UG-120 column. The ability to inject higher-concentration samples (20 mg/mL water) on the MGII afforded better sensitivity. The merit of this column is derived from the ultimately shielded silanol groups of packing materials and the high ligand density of octadecyl groups on the surface of polymer-coated silica (Kanda *et al.*, 2004). The optimum ratio of acetonitrile in buffer solution was investigated to obtain good separation of *l*-ephedrine hydrochloride and *d*-pseudoephedrine hydrochloride from bulk methamphetamine without the use of SDS. Too low a concentration of acetonitrile (5% and under) can degrade column performance, resulting in poor retention and slow recovery of performance (Luo *et al.*, 2008). Concentrations of 15–6% acetonitrile in potassium phosphate buffer were examined. At the acetonitrile concentration of 6%, the resolution value (*R*_s) was 1.9, which is sufficient for separation of *l*-ephedrine hydrochloride and *d*-pseudoephedrine hydrochloride. However, *l*-ephedrine hydrochloride and *d*-ephedrine hydrochloride were not separated with this ODS-type column. It is important to check if ephedrine and/or pseudoephedrine used as precursors are present in high-purity methamphetamine. Samples spiked in the range of 3–12 ppm ephedrines in recrystallized methamphetamine were examined. The separation was satisfactory, and no interfering peaks were seen. A chromatogram of a sample spiked at the content of 3 ppm is shown in Fig. 2(A). Next, 20 successive analyses of a bulk sample were performed by isocratic elution with 50 mM KH₂PO₄-acetonitrile (94:6 v/v %). The retention time of each analyte decreased gradually to as little as half of the initial value by impairment of the column efficiency from sample

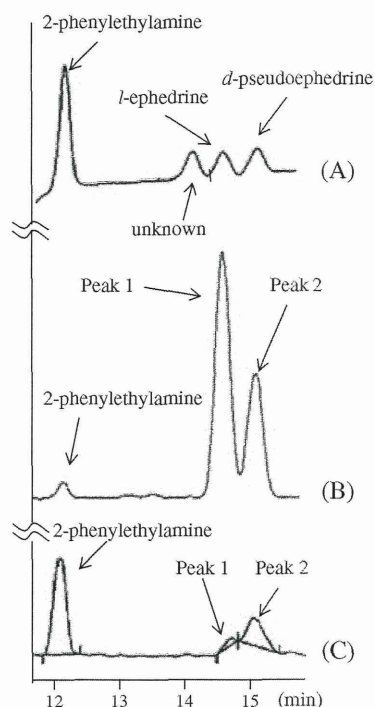


Figure 2. Chromatograms of some samples. (A) Solution spiked with the analytes at 0.06 µg each in 20 mg crystal methamphetamine (final content: 3 ppm). (B) Illicit *d*-methamphetamine seized in Japan (sample no. 1). (C) Illicit *d*-methamphetamine seized in Japan (sample no. 6).

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

Content	Ratio of peak area ^a (n = 5)	
	<i>l</i> -Ephedrine Mean ± RSD (%)	<i>d</i> -Pseudoephedrine Mean ± RSD (%)
3 ppm	0.14676 ± 9.3	0.18609 ± 5.8
6 ppm	0.34134 ± 3.9	0.36518 ± 4.4
9 ppm	0.52041 ± 3.8	0.53887 ± 2.6
12 ppm	0.72367 ± 1.1	0.72185 ± 2.9

^aPeak area ratio of *l*-ephedrine (or *d*-pseudoephedrine) to 2-phenylethylamine.

Table 3. Results of ephedrines in seven seized samples

Sample no.	Ephedrine	Pseudoephedrine
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	trace
5	trace	-
6	trace	+
7	+	trace

+, Detected; -, not detected.

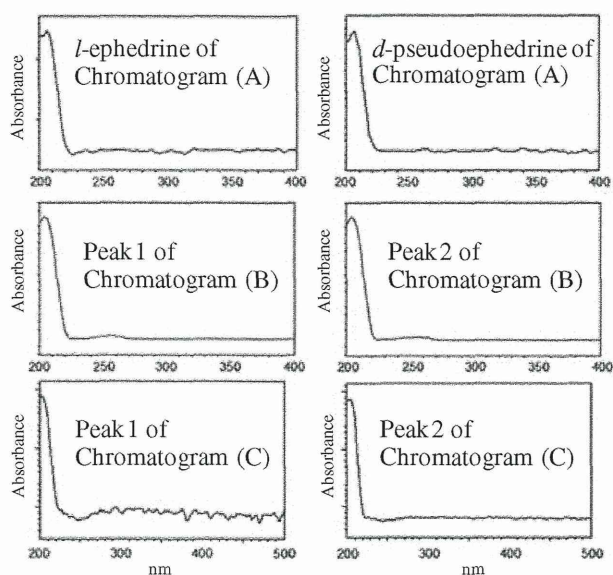


Figure 3. Spectra of ephedrines in the chromatograms of Fig. 2.

overloading. To achieve good performance in continuous analysis, bulk methamphetamine containing unknown impurities must be washed out rapidly. The cleaning of the column was performed by increasing the acetonitrile concentration in buffer solution to 13% after elution of ephedrines. The values of repeatability of retention time for 2-phenylethylamine hydrochloride (t_R , 12.1 min), *l*-ephedrine hydrochloride (t_R , 14.6 min) and *d*-pseudoephedrine hydrochloride (t_R , 15.1 min) were 0.63, 0.76 and 0.78%, respectively (RSD for retention times at samples of 3, 6, 9 and 12 ppm ephedrines spiked in bulk methamphetamine, $n = 20$), which are acceptable for the qualitative determination of ephedrines in bulk methamphetamine. In this study, 2-phenylethylamine hydrochloride was used for checking the column efficiency. The reproducibility of the area for each peak in bulk methamphetamine is shown in Table 2. Peak areas of each analyte had good correlation for the content. This method is not intended for quantification of ephedrines, and so the results are sufficient for qualitative determination of trace ephedrines in bulk methamphetamine. The detection limit was examined with samples containing 3 ppm ephedrines, and the signal-to-noise ratio was 7.4 for *l*-ephedrine and 7.5 for *d*-pseudoephedrine. Based on the data in Table 2 and the chromatogram of Fig. 2(A), the limit of detection can be set at 3 ppm for qualitative analysis of trace ephedrines in bulk methamphetamine; this corresponds to 60 ng ephedrine or pseudoephedrine hydrochloride in 20 mg methamphetamine hydrochloride.

Method application

The developed method was used to determine ephedrine and pseudoephedrine in seven samples of pure *d*-methamphetamine hydrochloride seized in Japan. The qualitative detection of ephedrines was based on the match of retention time and UV spectrum with those of the standard ephedrines. The results are presented in Table 3. The trace notation in Table 3 means that the acquired area of peak was smaller than the area of peak containing 3 ppm ephedrines. Figures 2 and 3 display representative chromatograms and the UV spectra of spiked