

平成 30 年 9 月 6 日現在

機関番号：31603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08818

研究課題名(和文) 無承認無許可医薬品・ハーブ中のアルカロイドの新規高感度・迅速分析法の開発

研究課題名(英文) Simultaneous analysis of highly polar pharmaceutical adulterants in slimming products by hydrophilic interaction liquid chromatography

研究代表者

山崎 勝弘 (Yamasaki, Katsuhiro)

いわき明星大学・薬学部・教授

研究者番号：20250334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：医薬品中、特に胃腸薬に配合されるトロパンアルカロイドであるアトロピン及びスコポラミンの分析法を強陽イオン交換と逆相の両方の性質を持つカートリッジを用いた固相抽出法で検討し、良好な分析が可能となった。  
また、分析が困難である生薬成分中のアルカロイドを、NBD-Fで発色させる高感度検出法を検討した。HPLCと検出器に紫外可視吸光度計・蛍光光度計を用いて検討した。アルカロイドを含有する試料抽出液にNBD-F試薬を用いて発色させ、さらに蛍光を測定した。3種類のエフェドリン類の定量感度は、従来法に比べて10倍ほど良好となった。

研究成果の概要(英文)：Analysis methods of atropine and scopolamine, which are tropane alkaloids to be included in gastrointestinal medicine, in particular, gastrointestinal medicine, were examined by solid phase extraction using cartridges having both characteristics of strong cation exchange and reversed phase, and good analysis was conducted. It has become possible.

Highly sensitive detection method for coloring alkaloids in crude drug ingredients, which is difficult to analyze, with NBD - F was studied. We examined using HPLC and detector with ultraviolet-visible absorption spectrophotometer / fluorometer. The alkaloid-containing sample extract was developed with NBD-F reagent and the fluorescence was further measured. Quantitative sensitivity of three kinds of ephedrine was about 10 times better than that of the conventional method.

研究分野：薬学

キーワード：アルカロイド 固相抽出 エフェドリン シネフェリン 蛍光誘導体化試薬

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、無承認無許可医薬品である脱法ドラッグ・危険ドラッグの違法な販売や使用が増大している。平成26年4月1日の薬事法改正以降、取締りが強化されたにもかかわらず、様々の重大な事件を引き起こしている。また、無承認無許可医薬品や健康食品の中には、特に微量で生理活性や毒性の強い植物アルカロイドを含有する製品が多い。アルカロイド(アルカリ様の性質を持つものの総称)は中枢神経系への作用や臓器への毒性作用を持つものなど多種多様あり、国民の健康被害の観点から、それらの規制が必要と考えられる。

(2) 一方、先進各国においても、法制度と規制対象となる物は若干異なるものの、健康被害という観点から違法ドラッグの排除、海外からの輸入規制、国内での製造や販売の規制を行っている。特に、中枢神経系に作用を及ぼすアルカロイド類の規制は非常に厳しい。しかし、ヘロイン、エフェドリン、カフェイン等の純度の高い物質は別として、ハーブ・天然物、或いはそれを単に加工した物や多成分と混合してアルカロイド含量が低い物では、それらの分析は容易ではない。高度な機器を用いた分析装置では、製品中の微量成分であっても検出可能であるが、多くの検査機関でも可能な、それらの製品からの抽出法と簡便・迅速な分析法の確立が望まれている。

## 2. 研究の目的

(1) アルカロイドはモルヒネ、エフェドリン、アコニチン類、アトロピン、カフェイン、テオフィリン等、非常に多くの有用成分が植物から抽出され、その多くが医薬品(一部は毒物)として一般に利用されてきた。それらの中には微量で生理活性・薬理活性の強いものが多いが、天然物中や生薬製剤では多くの夾雑成分が存在して、分析が困難なものが多い。

(2) 鎮痛・鎮痙作用を持つロートエキス中のトロパンアルカロイドであるアトロピン及びスコポラミンは、多量の摂取で副交感神経遮断作用による中毒作用を引き起こす。公定法では、これらのアルカロイドの抽出において複雑な液-液分配と溶媒抽出が必要である。申請者は、上記以外にも既に天然物中に含有する幾つかの成分について、固相抽出法での迅速分析法を検討し報告してきた。それらの分析方法では、イオン交換樹脂を用いた固相抽出でパターン化する方法が有効であったことから、それらの更なる検討が有用と考えられた。

(3) エフェドリン類(ノルエフェドリン、 $\beta$ -エフェドリン等)などのアルカロイドは、1級アミン(窒素原子にアルキル基が1つ、水

素が2つ結合している。)又は2級アミン(窒素原子にアルキル基が2つ、水素が1つ結合している。)を持っている。そこで、高感度の検出法として、1級・2級アミンに特異的に結合する蛍光誘導体化法で蛍光検出器付きHPLCを用いて、高感度で特異的な分析法を確立する。次に、この蛍光誘導体化法の適用が可能かどうかを、網羅した1級・2級アミンを持つアルカロイドを対象として、本分析法の妥当性を検証する。

本研究は、ハーブや製剤中からの分析法が確立されておらず、従来の分析法では正確なデータが得られないアルカロイドについて、蛍光誘導体化試薬等を用いて、新規に高感度で迅速・簡便な分析法を確立する目的で行う。

## 3. 研究の方法

(1) アルカロイドの固相抽出法を用いた分析法の確立

現在、日本薬局に規定されているロートエキス散中のアトロピン及びスコポラミン定量法<sup>1)</sup>は非常に煩雑であるため、新たに簡便な固相抽出の後にHPLCで分析する手法を検討する。また、ロートエキスを配合した市販の製剤を購入し、開発した固相抽出法-HPLC法がどの程度適用できるか検討する。また、他のアルカロイドに網羅的に適用させることで、分析法の可否や抽出条件を検討する。

(2) 蛍光ラベル化法によるアルカロイド成分の分析法の確立

エフェドリン類については、新しい分析法として、アミノ基に特異的に結合する蛍光誘導体化試薬である4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F)等を用いて、蛍光検出器-HPLC分析法を用いて高感度かつ特異的な分析法を検討する。NBD-Fとそれ以外の蛍光ラベル化試薬を用いて、分析可能なアルカロイドを網羅的に検索する。特に1級アミン及び2級アミンを持つ物質に特異的に反応することが予想されるが、実際にその分析法がどのアルカロイドに適用可能であるかを検討する。要するに、本手法が実際に適用できる範囲を検討し、それらの分析法を確立していく。蛍光ラベル化試薬で反応しない3級アミンからなるアルカロイドについては、直接、蛍光ラベル化試薬のN(窒素)への結合が困難であることが予想されることから、窒素部位を2級アミンに変換(結合の切断等)後、蛍光ラベル化試薬を結合させることを検討する。

## 4. 研究成果

(1) 固相抽出法を用いたトロパンアルカロイド分析法の確立

胃腸薬に配合されるロートエキス中のトロパンアルカロイドであるアトロピンとスコポラミンの簡易分析法を検討した。最近のロートコンを配合した製剤中のアルカロイドの定量法としては志村らの報告があり、陽

イオン交換樹脂で妨害成分を除去することで微量のアルカロイドを定量している<sup>2)</sup>。また、山辺らは食品中のアトロピン、スコポラミンをやはり固相抽出法で精製し、LC/MS/MSを用いて定量している<sup>3)</sup>。これらの方法は、精度や迅速性において、試料中のアルカロイドを測定するのに優れた方法である。そこで我々は、まず、試料の前処理をポリマーベースの強陽イオン交換と逆相系の性質を持つ固相を用いて、HPLCで胃腸薬のトロパンアルカロイドを迅速・簡便に定量できる、より効率的な方法を検討した。胃腸薬製剤中のトロパンアルカロイドであるアトロピン及びスコポラミンの分析法を固相抽出法で検討した。製剤中のアトロピンとスコポラミンの定量分析に、強陽イオン交換と逆相の両方の性質を持つ固相カートリッジ Oasis MCX を用いてクリーンアップし、HPLCで分析した。洗浄に水/メタノール/アンモニア混液を用いることで、分析の妨害となるほとんどの夾雑物質が簡便に除去できた。これらの手法によって、試料中に非常に微量に含有するアトロピン及びスコポラミンを簡便・迅速に定量することが可能になり、それらの品質評価に役立つことが出来るものと考えられる。

固相抽出の操作法：製剤試料の粉末 1.0 g を 0.1 mol/L 塩酸（炭酸水素ナトリウムを配合した製剤では 1 mol/L 塩酸）で 2 回抽出し、用いた塩酸溶液で 25 mL とした抽出液を固相抽出用試料溶液とした。なお、0.1 mol/L 塩酸/メタノール混液（1 : 1）に溶かした場合についても検討した。この固相抽出用試料溶液 5 mL を Oasis MCX に負荷し、カートリッジを水/メタノール/アンモニア水（28）混液（75 : 25 : 5）5 mL で洗浄し、メタノール/水/アンモニア（28）混液（70 : 30 : 5）3 mL で溶出させ、これにリン酸緩衝液（リン酸二水素ナトリウム 5 g、リン酸 5 mL、アセトニトリル 10 mL に水を加えて 100 mL とした液）を加えて 5 mL とし、HPLC 用試料溶液とした。

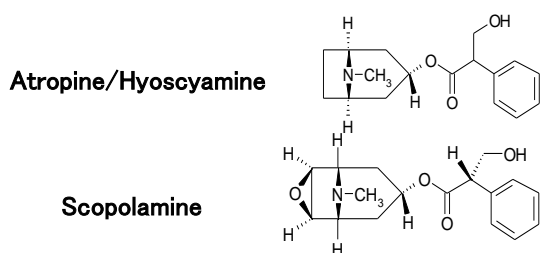


図 1. アトロピンとスコポラミンの化学構造

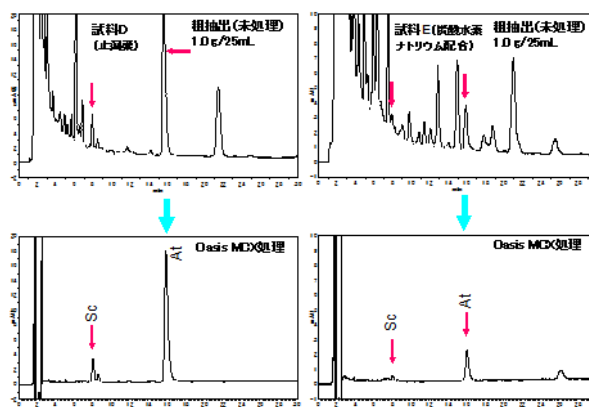


図 2. 胃腸薬中クロマトグラム—アトロピンとスコポラミンの固相抽出

At:アトロピン、Sc:スコポラミン

HPLC 条件

検出器：PDA 検出器（定量時の測定波長は 210 nm）、  
 カラム：L-column ODS，4.6 mm (ID) × 15 cm，  
 5 μm  
 カラム温度：40℃，  
 移動相：10 mmol/L リン酸二水素ナトリウム溶液/アセトニトリル混液（9:1, v/v），  
 流量：1.0 mL/min，  
 注入量：20 μl。

また、Oasis MCX 処理を行った場合のトロパンアルカロイドを配合した製品数品目への添加回収実験の結果、試料の抽出液に 0.1 mol/L 塩酸/メタノール混液を用いた場合に At 及び Sc の回収率が低下した。この原因としては固相からのオーバーロードが考えられた。今回の検討では抽出溶媒として 0.1 mol/L 塩酸又は 1 mol/L 塩酸を用いることで、回収率が At で 96%以上、Sc が 88%以上と良好であった。

なお、トロパンアルカロイド以外に、インドールアルカロイド、キノリンアルカロイド等のアルカロイドについても、同様の固相抽出法を検討したが、分析条件を若干変更することで、分析が可能になることを確認した

(2) プレカラム誘導体化試薬を用いたマオウ含有漢方製剤中のエフェドリンアルカロイドの分析

(2-1) NBD-F とエフェドリンアルカロイド アミノ酸などアミノ基を有する成分分析においては種々のラベル化試薬が、定性・定量分析に用いられている。そこで、マオウ中のエフェドリンアルカロイドを高感度で検出するために、試料抽出液に NBD-F 試薬を用いて発色させ、さらに蛍光強度を測定した。

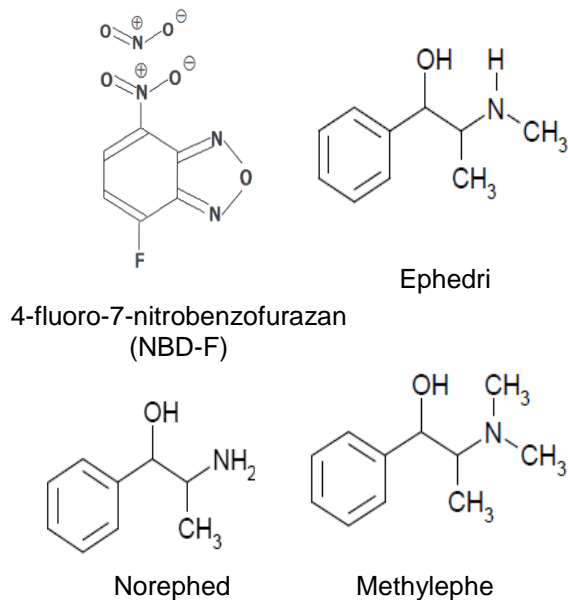


図 3. NBD-F 試薬と 3 種類のエフェドリン

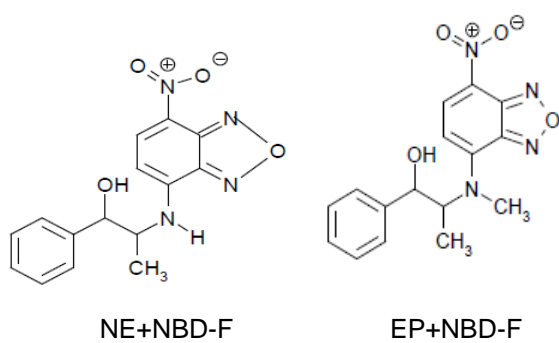


図 4. NBD-F 試薬とエフェドリン類との結合

(2-2) ラベル化反応の条件設定

次に、エフェドリンに対する NBD-F の反応率について検討した。

まず、NBD-F の濃度について 1 mmol/L~15 mmol/L の範囲で検討した。NBD-F の濃度は 10 mmol/L 以上で反応率が一定となった(図 5)。なお、ME は全く反応しなかった。

次に温度の検討は、反応温度を 40~100℃について検討した。それぞれ 10 分間反応させた結果、60℃で最大で、それ以上高い温度ではかえって反応率が低下した(図 6)。

以上のことから、NBD-F の濃度を 10 mmol/L、反応時間を 10 分に設定した。

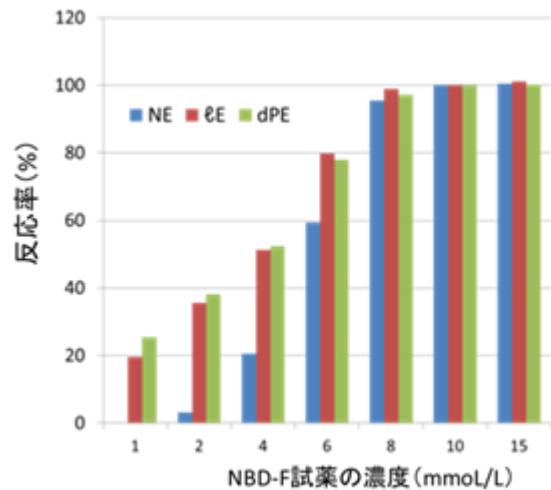


図 5. NBD-F 濃度とエフェドリン類の反応率

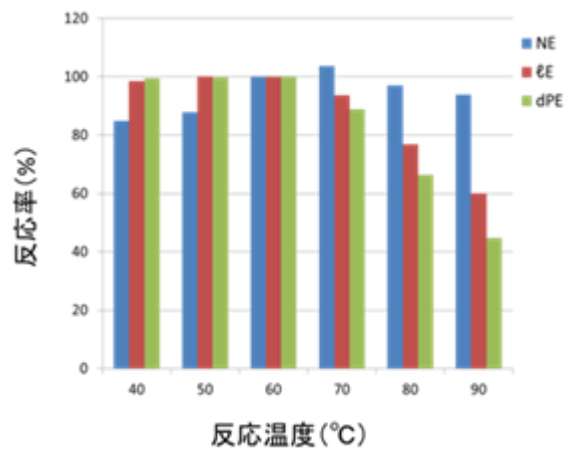


図 6. 反応温度とエフェドリン類の反応率

生薬や製剤中のアルカロイドは NBD-F によって誘導体化され赤色に変化したことから、500 nm で測定した。マオウに含有されるエフェドリン類は、3 級アミンであるメチルエフェドリン (ME) だけがラベル化されなかった。NBD-F は 1 級及び 2 級アミンの N と結合することが知られており、3 級アミンとの結合は不可能であった。したがって、NBD-F を用いて発色できるアルカロイドは 1 級及び 2 級アミンに限られた。

各エフェドリン類の溶出順序は、NBD-F 未処理では NE, dPE (d-Pseudoephedrine), EP, ME の順であるが、誘導体化によって EP と dPE が逆転した。未処理の場合の分離度 (Rs) はそれぞれ、NE (Rs=3.5), dPE (Rs=2.3), EP (Rs=3.4) であったが、NBD-F 処理後ではそれぞれ、NE (Rs=5.2), EP (Rs=8.1), dPE (Rs=8.1) と、大幅に向上した(図 7、図 8)。生薬マオウ及びマオウ含有漢方製剤についても検討した。マオウのクロマトグラムを図 9 に示した。

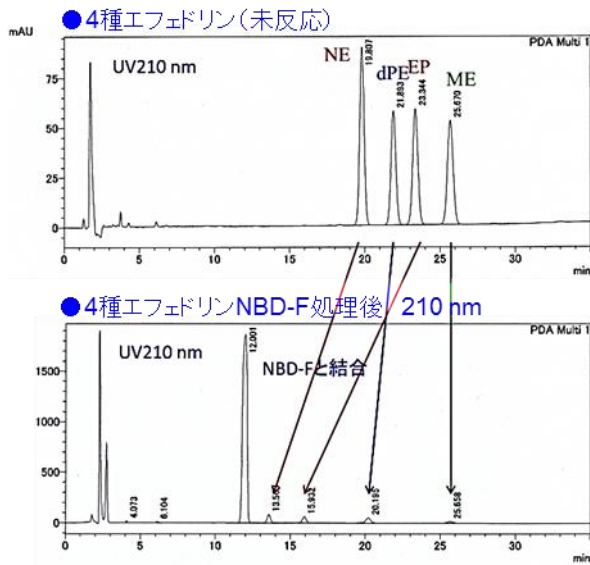


図 7. 4 種エフェドリンのクロマトグラム (210 nm)

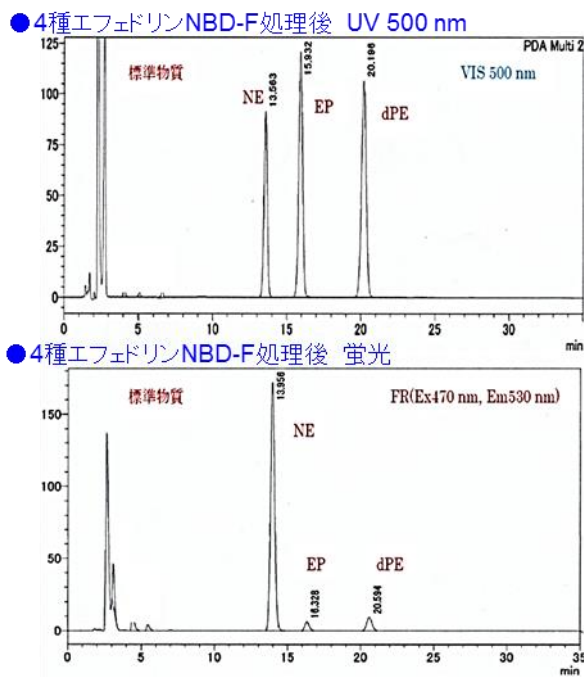


図 8. エフェドリン類の NBD-F 処理後のクロマトグラム

製剤中のエフェドリン類は、NBD-F で誘導体化され、3 級アミンであるメチルエフェドリン以外は効果的にラベル化された。各エフェドリンの溶出順序は、誘導体化されて変化し、各エフェドリンの分離度は 5 以上となった。また、500 nm (赤色領域) で測定することで、妨害成分の影響を抑制できた。さらに、蛍光検出器 (励起波長: 470 nm, 蛍光波長: 530 nm) でも良好な結果が得られた。この方法は、従来法よりも数倍高感度、高精度であった。現在、マオウ製剤中のエフェドリンア

ルカロイド含量は EP と dPE の合計量で規定されており、本分析法の適用で、妨害成分の影響を受けずに、より正確な定量値が得られるものと考えられた。

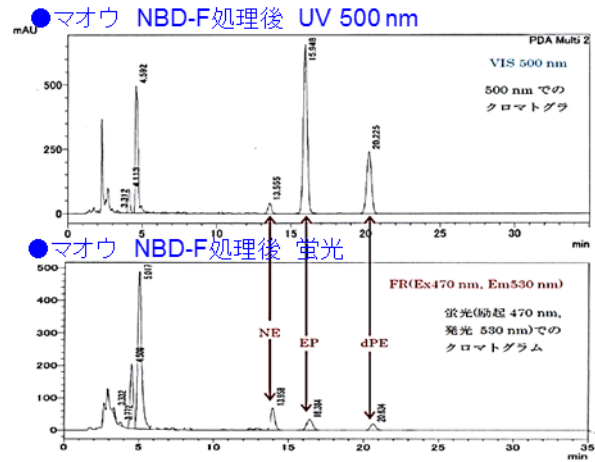


図 9. マオウ NBD-F 処理後のクロマトグラム

HPLC 条件 (図 7-図 9) 【イオンペアー法】  
 ・検出器: フォトダイオードアレイ検出器 (但し、測定波長は 210 nm 及び 500 nm)  
 ・蛍光検出器 励起波長 470 nm, 蛍光波長 530 nm, ・カラム: Inertsil ODS SP (内径 4.6 mm, 長さ 25 cm, 粒子径 5 μm) ・カラム温度: 40°C ・移動相: ラウリル硫酸ナトリウム溶液 (1→128) /アセトニトリル/リン酸混液 (650: 350: 1) ・流量: 1.5 mL/min ・注入量: 未反応液 20 μL, NBD-F 反応液 60 μl

(2-4) エフェドリンアルカロイドの分析条件の検討

従来の HPLC におけるエフェドリンアルカロイドの分析では、移動相にラウリル硫酸ナトリウムを添加するイオンペアー法でなければ、4 種類のアルカロイドを同時に分析することはできなかった。しかし、エフェドリン類を含む試料溶液を NBD-F 処理することで各エフェドリンの化学構造が変化し、イオン抑制法でしかも、短い分析用カラムでエフェドリン類が容易に分離することが明らかになった。そのため、移動相条件がイオンペアー試薬を用いないイオン抑制法 (若干の酸を添加するのみ) で可能となった。このため、分析の手間が省けることとなった。マオウとマオウ配合漢方エキスのクロマトグラムを図 10 に示した。

(2-5) エフェドリンアルカロイドの検出限界・感度・特異性

検出限界は各エフェドリンとも、紫外部 210 nm では 1 ppm であるのに対して、可視部 500 nm 及び蛍光では 0.2 ppm (SN=5) であり、可視部及び蛍光では (エフェドリンによる) 約 5 倍感度が高かった。また、測定波長

が 210 nm では、妨害成分の影響を受けやすいがラベル化法では、NBD-F が 1 級、2 級アミンを持つエフェドリン類に結合して赤色に変化するために特異性が高く、500 nm では影響が少なく、また、蛍光測定でも同様の結果が得られた。

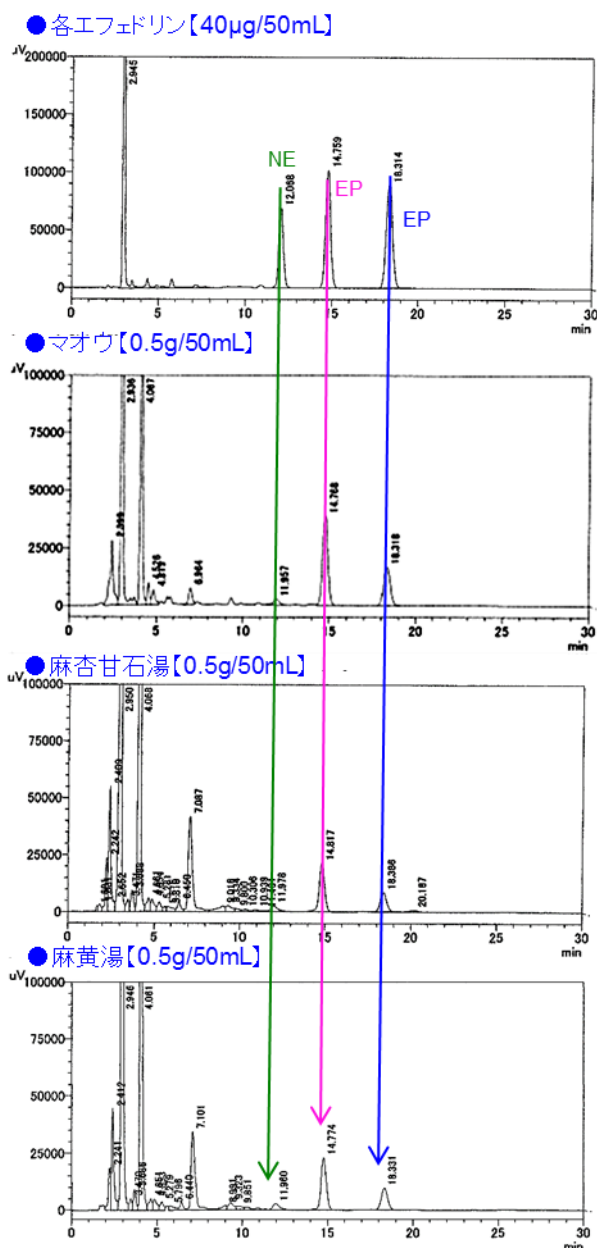


図 10. マオウとエキス製剤のクロマトグラム HPLC 条件(図 10)【イオン抑制法】

・検出器: フォトダイオードアレイ検出器(但し、測定波長は 210 nm 及び 500 nm)・蛍光検出器励起波長 470 nm, 蛍光波長 530 nm, ・カラム: SKgel ODS 120A (内径 4.6 mm, 長さ 15 cm, 粒子径 5µm) ・カラム温度: 40℃・移動相: 水/アセトニトリル/リン酸混液 (650 : 350 : 1) ・流量: 1.0 mL/min・注入量: 未反応液 20µL, NBD-F 反応液 60 µl

(3) エフェドリン以外のアルカロイドについての検討

柑橘類に含有 2 級アミンとしてはシネフリンが知られている。このシネフリンについても、エフェドリン同様の検討を行った。シネフリンは、NBD-F によるラベル化によって、標準物質では、12 分付近に 493nm に吸収極大波長を持つ成分が検出された。そこで、チンピおよびキジツについても、メタノール又は希エタノールで抽出後、ラベル化を行ったが、検出出来なかった。その原因は不明である。なお、今後、他のアルカロイドについても検討していく予定である。

(4) まとめ

製剤中のエフェドリン類は、NBD-F で誘導体化され、3 級アミンであるメチルエフェドリン以外は効果的にラベル化された。各エフェドリンの溶出順序は、完全分離度が可能となった。また、500 nm で測定することで、妨害成分の影響を抑制できた。なお、イオンペアー法を用いなくても、NE, dPE, EP の分析が十分可能となった。

《引用文献》

- 1) 第 17 改正日本薬局方(2016)
- 2) 志村恭子、佐藤 誠、橋爪 清、中山 治: ロートコン配合製剤中のアルカロイドの定量法について、三重保環研年報 第 7 号, 48-53 (2005).
- 3) 山辺真一、肥塚加奈江、田邊英子、北村雅美、今中雅章: LC/MS/MS による食品中のアトロピン、スコポラミンの迅速定量, 岡山県環境保健センター年報 31, 127-132 (2007).

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- 1) 山崎勝弘: プレカラム誘導体化試薬を用いたマオウ含有漢方製剤中のエフェドリンアルカロイドの分析, 要旨集 2 P. 207, (横浜, 2016)
- 2) 山崎勝弘, 三浦誉司: プレカラム誘導体化試薬を用いたマオウ含有漢方製剤中のエフェドリンアルカロイドの分析 (第 2 報), 要旨集 2 P. 194, (仙台, 2017)
- 3) 山崎勝弘, 久保田耕司岸本清子: プレカラム誘導体化試薬を用いたマオウ含有漢方製剤中のエフェドリンアルカロイドの分析 (第 3 報), 要旨集 2 P. 156, (金沢, 2018)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 山崎 勝弘  
(YAMASAKI, katsuhiko)  
いわき明星大学 薬学部 教授  
研究者番号: 20250334