

平成 27 年 3 月 18 日

平成 25 年度及び平成 26 年度
レギュラトリーサイエンス新技術開発事業 研究実績報告書

課題番号：2502

ピロリジジナルカロイド類分析用標準試薬の作製と分析法の検討

研 究 期 間：平成 25 年度～平成 26 年度（2 年間）

研究総括者名：高山 廣光

試験研究機関名：国立大学法人 千葉大学

I. 全体計画

1. 研究目的

ピロリジジナルカロイド類 (PAs)は、植物に含有される天然毒であり、PAs を含む植物の摂取を控えるように WHO により勧告が行われ、日本においても一部含有植物の販売禁止や摂取を控えるように注意喚起がなされている。安全な食品の供給、健康被害の未然防止のためには危害要因である PAs の分析が必須である。しかし、PAs を含むと言われている国内におけるその他の植物、野菜等については、規制のための科学的根拠が十分に整っているとは言えないのが現状である。そこで、本研究では科学的根拠を得るために必要な PAs の分析用標準試料を確保することを目的とする。

2. 研究内容

(1) 中課題 1：ピロリジジナルカロイド類 (PAs) に関する文献調査

(1) 天然物データベース (Dictionary of Natural Products)や SciFinder を活用して、PAs や PAs の含有が報告されている植物、含有濃度を網羅的に調査し、リストアップする。

(2) PubMed、EFSA、英国 MHRA の報告書等を利用して、各 PAs の毒性や諸外国の取り組みに関して調査する。

(3) 該当する植物の植生地や栽培・流通などについて調査する。

(4) 上記(1)～(3)のデータに基づき、含有実態調査の対象とすべき PAs、特に大環状型ジエステル体に重きを置き選定する。

(2) 中課題 2：ピロリジジナルカロイド類 (PAs) 分析用標準試薬の作製

1) 小課題 1：コンフリーの成分探索

中課題 1 の調査結果に基づき、含有実態調査の対象とすべき PAs を多く含有し、実験材料として入手可能な植物を採集あるいは購入する。まず、PAs (大環状型ジエステル体である Senkirkine を含む) の含有が報告され、注意喚起が行われているコンフリー(*Symphytum officinale*)を実験材料として、できるだけ多数のアルカロイドを得る。

2) 小課題 2：他植物の成分探索

コンフリー以外の植物 (フキ、スイゼンジナ、モミジガサ) よりアルカロイドサンプルを得る。

3) 小課題 3：化学合成

フキノトウ等の食用植物に普遍的に含有されることが知られ、PAs の基本構造を有する Retronecine を大量に化学合成する。

4) 小課題 4：誘導体合成

上記 1)、2)、3) で得た PAs について、過酸 (メタクロロ過安息香酸) を用

いた化学反応により N-オキシド体を合成し、必要に応じて分析用標準サンプルとする。

(3) 中課題 3：ピロリジジナルカロイド類 (PAs) 分析法の予備検討

(1) アルカロイド含有確認法やアルカロイド総量の定量法の確立を行う。

(2) 中課題 2 の試験研究で得た PAs (標準試料) を LC-MS/MS に付し、スペクトルデータを取得する。

(3) 中課題 2 の試験研究で得た PAs (標準試料) が良好に分離分析可能な HPLC のカラムと溶媒等の条件を、文献情報を参考に検討する。最適化した分析条件で、PAs を LC-MS に付し、食用植物の実態調査への適用可能性について検討する。

3. 年次計画

項目	平成 25 年度	平成 26 年度
1. 文献調査	文献調査 (千葉大学) ←→	
2. 分析用標準試薬の作製		
(1) コンフリーの成分探索	←コンフリーの成分探索 (千葉大学)→	
(2) 他植物の成分探索	←	他植物の成分探索 (千葉大学) →
(3) 化学合成	←化学合成 (千葉大学)→	
(4) 誘導体合成		←誘導体合成 (千葉大学) →
3. 分析法の予備検討		←分析法の予備検討 (千葉大学) →
所要経費 (合計)	9,000 千円	8,850 千円

4. 実施体制

項目	担当研究機関	研究担当者		エフォート (%)
研究総括者	千葉大学	高山 廣光		15
1. 文献調査	千葉大学	○	高山 廣光	前出
2. 分析用標準試薬の作製	千葉大学			
（1）コンフリーの成分探索		△	北島 満里子	20
（2）他植物の成分探索		△	北島 満里子	前出
（3）化学合成		△	小暮 紀行	25
（4）誘導体合成		△	小暮 紀行	前出
3. 分析法の予備検討	千葉大学	○	北島 満里子	前出

研究担当者欄について、中課題担当者には○、小課題担当者には△を付すこと。

II. 研究実績報告

1. 中課題1：ピロリジジナルカロイド類 (PAs) に関する文献調査

(1) 成果の概要

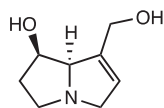
工程表	進捗状況・成果
(1) 天然物データベース (Dictionary of Natural Products)やSciFinderを活用して、PAs や PAs の含有が報告されている植物、含有濃度を網羅的に調査し、リストアップ。(平成25年度) ↓	Dictionary of Natural Products (最新版) や SciFinder を活用して、コンフリー、フキ、スイゼンジナ、モミジガサに関する文献を取得した。また、既知の PAs や PAs の含有が報告されている植物を調査した。※1 その結果、コンフリー (<i>Symphytum officinale</i>)、フキ (<i>Petasites japonicus</i>)から下記のようなPAが単離されていることがわかった(図1)。 コンフリー：Retronecine type 8 種、Heliotridine type 2 種、他 1 種。 フキ：Otonesine type 3 種、Petasinesine type 2 種。※2 (平成25年度)
(2) PubMed、EFSA、英国 MHRA の報告書等を利用して、各 PAs の毒性や諸外国の取り組みに関して調査。(平成25年度) ↓	タンデム質量分析を用いた PAs 分析法及び毒性発現機構について最新の学術論文をもとに調査した。(平成25年度)
(3) 該当する植物の植生地や栽培・流通などについて調査。(平成25年度) ↓	植物の植生地や栽培・流通などについては、農水省の資料を参考とした。
(4) 上記(1)～(3)のデータに基づき、含有実態調査の対象とすべき PAs、特に大環状型ジエステル体に重きを置き選定。(平成25年度)	実際に成分分析を実施して得た PAs を標準試料とすることとした。(平成25年度)

<成果の概要の補足>

※1：ピロリジジナルカロイド類のリスト (添付資料1)

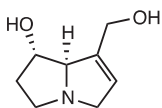
※ 2 : 図 1 ピロリジジナルカロイド類の基本骨格並びにコンフリー (*Symphytum officinale*)、フキ (*Petasites japonicus*)に含有されているピロリジジナルカロイド類

Retronecine type



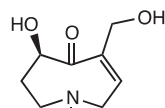
(+)-Retronecine

Heliotridine type



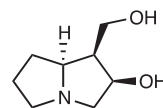
Heliotridine

Otonesine type



Otonesine

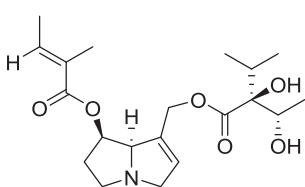
Petasinesine type



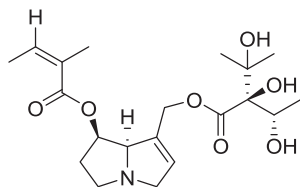
Petasinesine

from *Symphytum officinale* (コンフリー)

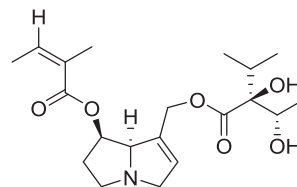
Retronecine type



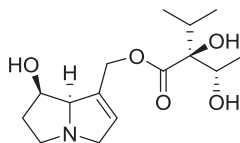
Symphytine ¹⁾



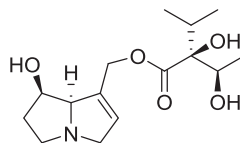
Echimidine ¹⁾



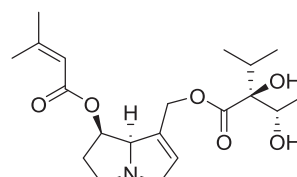
Symlandine ²⁾



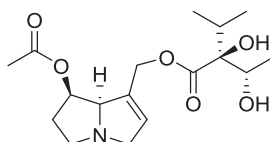
Lycopsamine ³⁾



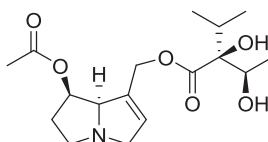
Intermedine ³⁾



Symviridine ⁴⁾

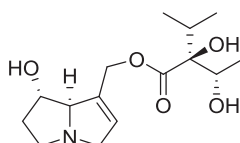


7-Acetylycopsamine ³⁾

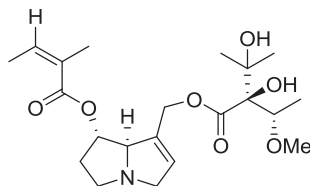


7-Acetylintermedine ³⁾

Heliotridine type

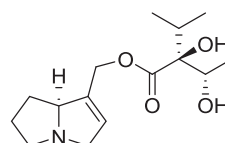


Echinatine ⁵⁾



Lasiocarpine ⁵⁾

Other type



Viridiflorine ⁵⁾

1) K. Araki *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, **1968**, *16*, 2512-2516.

2) E. W. Monroe *et al.*, *J. Nat. Prod.*, **2001**, *64*, 251-253.

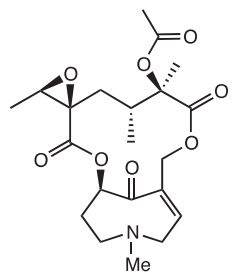
3) J. Brauchli *et al.*, *Experientia*, 1982, *38*, 1085-1087.

4) E. Roeder *et al.*, *Phytochemistry*, **1992**, *31*, 4041-4042.

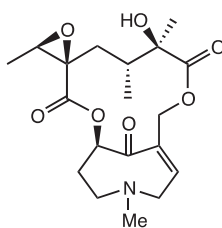
5) Y. G. Denisov *et al.*, *Rastitel'nye Resursy*, **1970**, *6*, 409-411.

from *Petasites japonicus* (フキ)

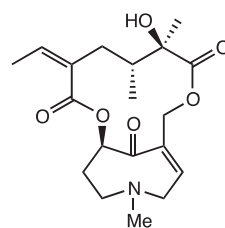
Otonesine type



Neopetasitenine ¹⁾

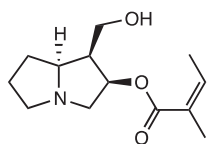


Petasitenine ¹⁾
(Fukinotoxine ²⁾)

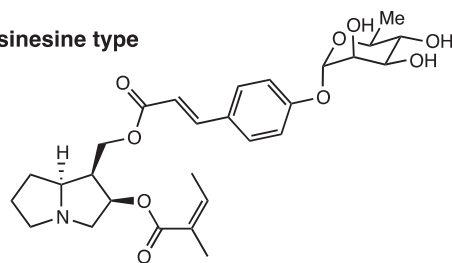


Senkirkine ³⁾

Petasinesine type



Petasine ⁴⁾



Petasinoside ⁴⁾

- 1) K. Yamada et al., *Chem. Lett.*, **1976**, 461; K. Yamada et al., *ibid.*, 1123.
- 2) T. Furuya et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **1976**, 24, 1120.
- 3) K. Yamada et al., *Phytochemistry*, **1978**, 17, 1667.
- 4) K. Yamada et al., *Tetrahedron Lett.*, **1976**, 17, 4543.

2. 中課題2：ピロリジジナルカロイド類 (PAs) 分析用標準試薬の作製

(1) 成果の概要

工程表	進捗状況・成果
コンフリーの全草(地下部を含む)を採集(小課題1関連)。(平成25年度) ↓ MeOH 抽出、液々分配によるアルカロイド分画の作成、続くカラムクロマトグラフィーを用いた分離精製により、アルカロイドを取得(小課題1関連)。(平成25、26年度) ↓ 単離したアルカロイドの化学構造を、2次元NMR等のスペクトル類を用いた詳細な解析により決定(小課題1関連)。(平成25、26年度)	コンフリーを千葉大学環境健康フィールド科学センターにて採集及び一部購入した。(平成25年度) 土を落として自然乾燥し、乾いた部分からはさみで細かく切断した(他の植物も同様)。 コンフリー(全草、1.9 kg、dry weight)をMeOHにて抽出し、MeOHエキスを(219.0 g)を得た。MeOHエキスを液液分配し、AcOEt抽出画分(8.4 g)、粗塩基分画(2.4 g)、<i>n</i>-BuOH抽出画分(34.2 g)を得た(図1)。 ※1(平成25年度) 粗塩基分画についてLC-MSを行った。※2(平成25年度) 粗塩基分画をSiO₂カラム、amino-silica gelクロマトグラフィー、HPLC等に付すことによりこれまでに7種のPAを取得した(図2)。 ※3、4(平成25年度) さらに分離を続け、PA2種を取得した。※4(平成26年度) 得られた7種のPAの各種スペクトルの測定と解析を行った。その結果、4種がRetronesine typeの既知化合物[Symphytine (1)、Echimidine (2)、Echimidine <i>N</i>-oxide (3)、Lycopsamine (4)]であり、その構造は文献値との比較により確認した(図3)。 残る3種[SO-3 (5)、SO-6 (6)、SO-8 (7)]については構造解析中である。※4、5(平成25年度) 平成26年度に得られた2種のPAは、新規PAでありSO-4 (8)とSOM-1 (9)と仮称した。(図3) ※4(平成26年度)

コンフリーを再度購入し、同様の操作で PAs の探索を行った。(小課題 1 関連) (平成 26 年度) フキ、スイゼンジナ、モミジガサの取得 (小課題 2 関連)。(平成 25、26 年度) ↓ MeOH 抽出、液々分配によるアルカロイド分画の作成、続くカラムクロマトグラフィーを用いた分離精製により、アルカロイドを取得 (小課題 2 関連)。(平成 25、26 年度)	4 種の新規アルカロイド[SO-3 (5), SO-6 (6), SO-4 (8), SO-8 (7)] について、既知 PA と NMR データを詳細に解析することにより立体配置の可能性をしぼった。また、SOM-1 について NMR データを解析することにより、相対配置を決定した。※ 5 (平成 26 年度) コンフリー (全草、4.34 kg, dry weight) を MeOH にて抽出し、MeOH エキス (424.6 g) を得た。MeOH エキスを液液分配し、AcOEt 抽出画分 (28.11 g)、粗塩基分画 (2.77 g)、<i>n</i>-BuOH 抽出画分 (22.58 g) を得た (図 5)。※ 6 (平成 26 年度) 粗塩基分画を SiO₂ カラム、amino-silica gel クロマトグラフィー、HPLC 等に付すことによりこれまでに 5 種の既知 PA を取得した (図 6)。※ 7 (平成 26 年度) <u>フキ</u>: フキを千葉大学薬学部薬用植物園にて採集した (全草, 6.8 kg, dry weight)。 <u>スイゼンジナ</u>: 熊本県産スイゼンジナを入手した (自然乾燥後 2 kg、4 °C にて保存 (現在 972 g))。 <u>モミジガサ (シドケ)</u>: 山形県産、秋田県産、宮城県産のモミジガサ (シドケ) をそれぞれ 2 kg (wet weight)、1.2 kg (wet weight)、2 kg (wet weight) 購入した。(平成 25 年度) <u>フキ</u>: フキ (全草, 6.8 kg, dry weight) を MeOH にて抽出し、MeOH エキスを得た。MeOH エキスをスキームに従って分配し、AcOEt 抽出画分 (20.6 g)、粗塩基分画 (2.97 g)、<i>n</i>-BuOH 抽出画分 (90.9 g) を得た (図 7)。粗塩基分画のうち 97.8 mg を冷蔵保存した。※ 8
--	---

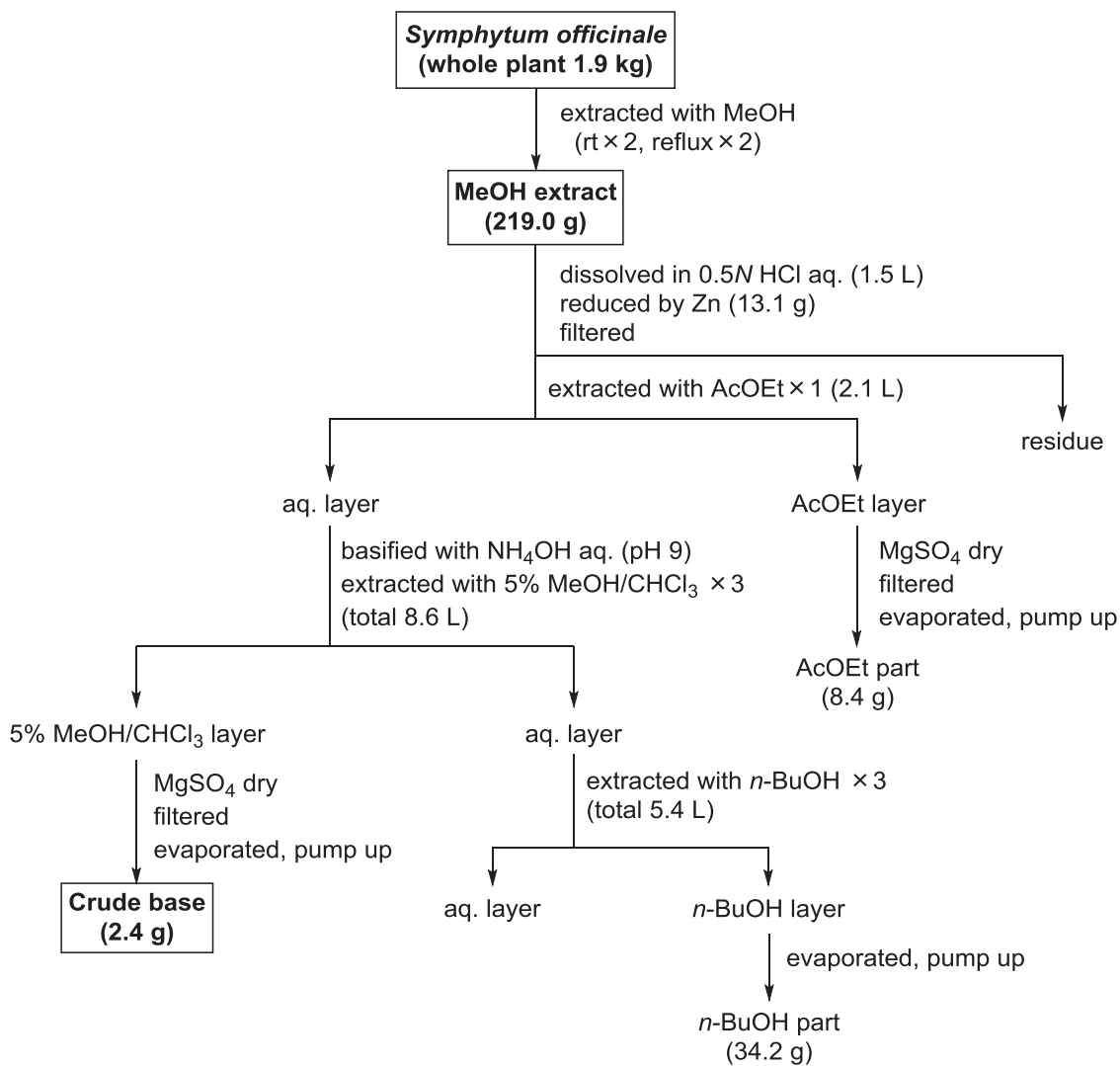
↓	粗塩基分画について LC-MS を行った。※ 9 (平成 2 5 年 粗塩基分画 (2.96 g) を SiO₂ カラム、amino-silica gel クロマトグラフィー、HPLC に付し、4 種の PA を取得した (図 8、9)。※ 1 0、1 1 (平成 2 5 年度) <u>モミジガサ (シドケ)</u> : 取得した 3 種の植物についてそれぞれ MeOH 抽出を行った。 ・山形県産モミジガサ 1920.27 g (wet weight) を MeOH にて抽出 (8.0 L, rt 3 d; 7.0 L x 4 d; 6.0 L, reflux 8 h; 6.5 L, reflux 8 h) し、MeOH エキス 60.14 g (4 °C にて保存) を得た。 ・秋田県産モミジガサ 191.56 g (dry weight) を MeOH にて抽出 (3.0 L, rt 63 h; 2.3 L, rt 50.5 h; 2.5 L, reflux 8 h; 2.5 L, reflux 8 h) し、MeOH エキス 32.51 g (4 °C にて保存) を得た。 ・宮城県産モミジガサ 429.39 g (dry weight) を MeOH にて抽出 (4.3 L, rt 63 h; 3.5 L, rt 50.5 h; 3.8 L, reflux 8 h; 3.5 L, reflux 8 h) し、MeOH エキス 60.54 g (4 °C にて保存) を得た。(平成 2 5 年度) 上記の MeOH エキスをすべてまとめて、スキームに従って分配し、AcOEt 抽出画分 (32.18 g)、粗塩基分画 (1.85 g)、<i>n</i>-BuOH 抽出画分を得た (図 1 0)。※ 1 3 粗塩基分画 (2.96 g) を SiO₂ カラム、amino-silica gel クロマトグラフィー、HPLC に付し、詳細な成分探索を行い、2 種の化合物を単離した。PA の存在は確認できなかった (図 1 1、1 2)。※ 1 4、1 5 (<u>平成 2 6 年度</u>)
--------------------------------------	---

単離したアルカロイドの化学構造を、2次元 NMR 等のスペクトル類を用いた詳細な解析により決定（小課題 2 関連）。（平成 25、26 年度）	<u>熊本県産スイゼンジナ</u>：全草 921 g（半乾燥）を MeOH にて抽出（9.5 L, rt 42 h; 8.9 L, rt 22.5 h; 6.3 L, reflux 8 h; 7.2 L, reflux 8 h）し、MeOH エキス 103.3 g を得た。 MeOH エキスをスキームに従って分配し、AcOEt 抽出画分（24.6 g）、粗塩基分画（4.24 g）、<i>n</i>-BuOH 抽出画分を得た（10.9 g）（図 13）。※16 粗塩基分画（4.18 g）を SiO₂ カラム、amino-silica gel クロマトグラフィー、HPLC に付し、詳細な成分探索を行い、4 種の化合物を単離した。PA の存在は確認できなかった（図 14、15）。※17、18（平成 26 年度） <u>フキ</u>：得られた 4 種の PA の各種スペクトルの測定と解析を行った。その結果、3 種が Otonesine type の既知化合物 [Neopetasitenine (13)、Petasitenine (14)、Senkirkine (15)] であることがわかり、その構造は文献値との比較により確認した（図 9）。また、詳細な NMR のアサインをした。残る 1 種[PJ-4 (16)]は Otonesine type の新規化合物であることがわかった。本化合物については、スペクトル解析に加え、Petasitenine (14) の加溶媒分解により得た化合物と一致したことから、その構造を立体化学も含めて決定した。（図 9）※11（平成 25 年度） 上記結果について第 5 回食品薬学シンポジウム（平成 25 年 11 月 1-2 日、京都大学）にて発表した。タイトル：フキ (<i>Petasites japonicus</i>) に含有されるピロリジジナルカロイド類の検索研究。優秀発表賞を受賞した。※12
--	---

PAsの基本構造を有する Retronecine の化学合成を検討し、Retronecine を大量に取得(小課題3 関連)。(平成 2 5、2 6 年度) ↓ Retronecine の誘導体を合成 (小課題 4 関連)。(平成 2 6 年度) 取得した PAs の N-オキシド誘導体を合成(小課題 4 関連)。(平成 2 6 年度)	(+)-Retronecine (1)の合成を Scheme 1～4 に従って検討した。(図 1 6) ※ 1 9 (平成 2 5、<u>2 6 年度</u>) Retronecine の全合成は達成できなかったが、天然物 Loroquine の全合成を達成した。 ※ 1 9 (<u>平成 2 6 年度</u>) N-オキシド体の合成を行うためには、取得した PAs の量が少なかった。 【追】 PAs の安定性が疑われたため、PAs の安定性を確かめるために下記の実験を行った。和光純薬工業より Retrorsine を購入し、CDCl₃を溶媒として NMR 測定を行った。そのサンプルを溶液のまま冷蔵庫で7か月保管したが、分解は認められていない。 ※ 2 0 (<u>平成 2 6 年度</u>) 【追】PA の純度を確認するため、定量 NMR を行った。和光純薬工業より購入した 1,4-BTMSB-d₄ を内標準物質として用い、Senkirkine の純度測定を行ったところ、99.2%と算出した。 ※ 2 1 (<u>平成 2 6 年度</u>)
---	---

<成果の概要の補足>

※1：図1 コンフリーの抽出・液液分配のスキーム



※2： コンフリーの粗塩基分画の LC-MS （添付資料2）

※3：図2 コンフリーの粗塩基分画、カラムの各フラクションの TLC

TLC プレート：SiO₂

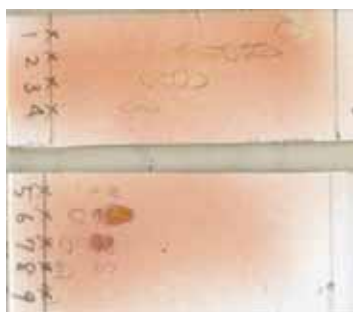
展開溶媒：10% MeOH/CHCl₃

検出：UV 254 nm（鉛筆書き）及び Schlittler 発色

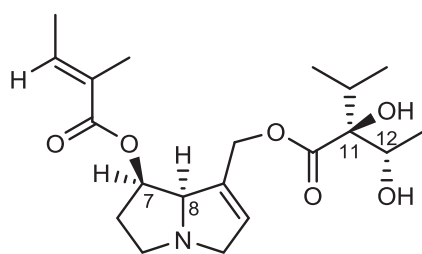
・粗塩基分画



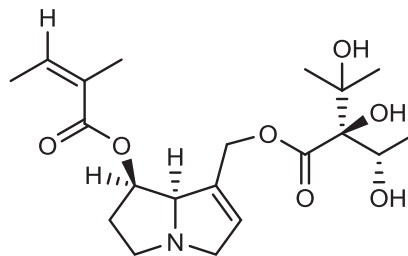
・カラム (SiO₂ flash カラム φ 4.5 cm x h 8.0 cm, MeOH/CHCl₃ gradient にて分離) のフラクション



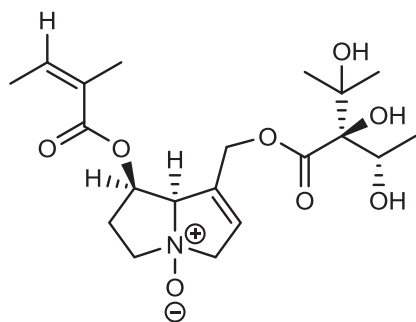
※4：図3 コンフリーから取得したピロリジジナルカロイド類



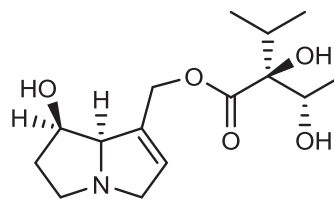
Symphytine



Echimidine



Echimidine N-oxide



Lycopsamine

Symphytine (1)	20.1 mg
Echimidine (2)	47.0 mg
Echimidine <i>N</i> -oxide (3)	2.3 mg
Lycopsamine (4)	1.6 mg
SO-3 (5)	3.2 mg
SO-6 (6)	7.0 mg
SO-8 (7)	10.2 mg
SO-4 (8)	1.6 mg
SOM-1 (9)	4.0 mg

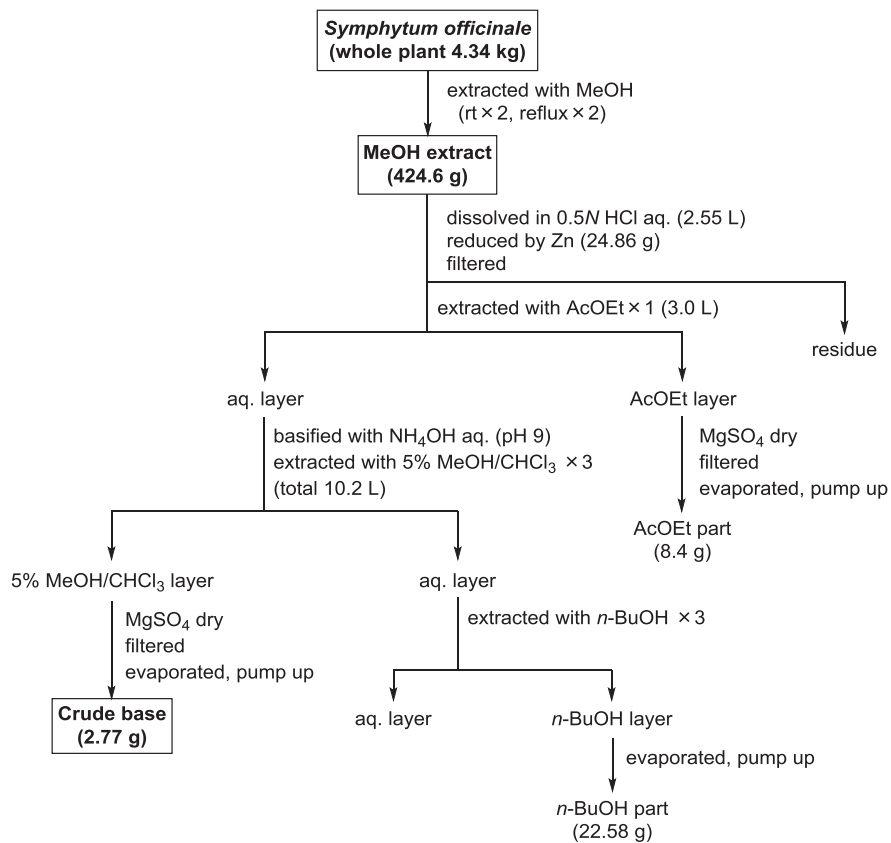
添付資料3 化合物 **1-4** の NMR スペクトル

添付資料4 化合物 **1-3** の ESI-MS チャート

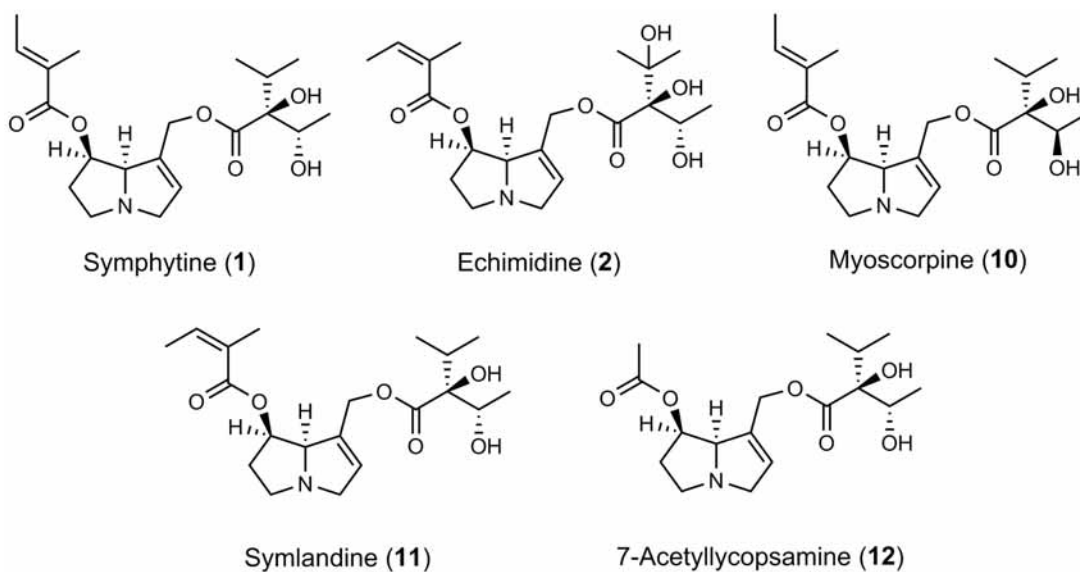
※5：新規 PAs[SO-3 (5), SO-6 (6), SO-4 (8), SO-8 (7), SOM-1 (9)] の立体配置解析

新規アルカロイド SO-3 (5), SO-6 (6), SO-4 (8), SO-8 (7), SOM-1 (9) について立体配置の解析を行った。これまでに単離報告されている PAs の $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ のケミカルシフトを詳細に解析し、予測を行った。SOM-1 (9) については、相対配置を決定した。

※6：図5 コンフリーの抽出・液液分配のスキーム（2回目）



※7：図6 コンフリーから取得したピロリジジナルカロイド類（2回目）

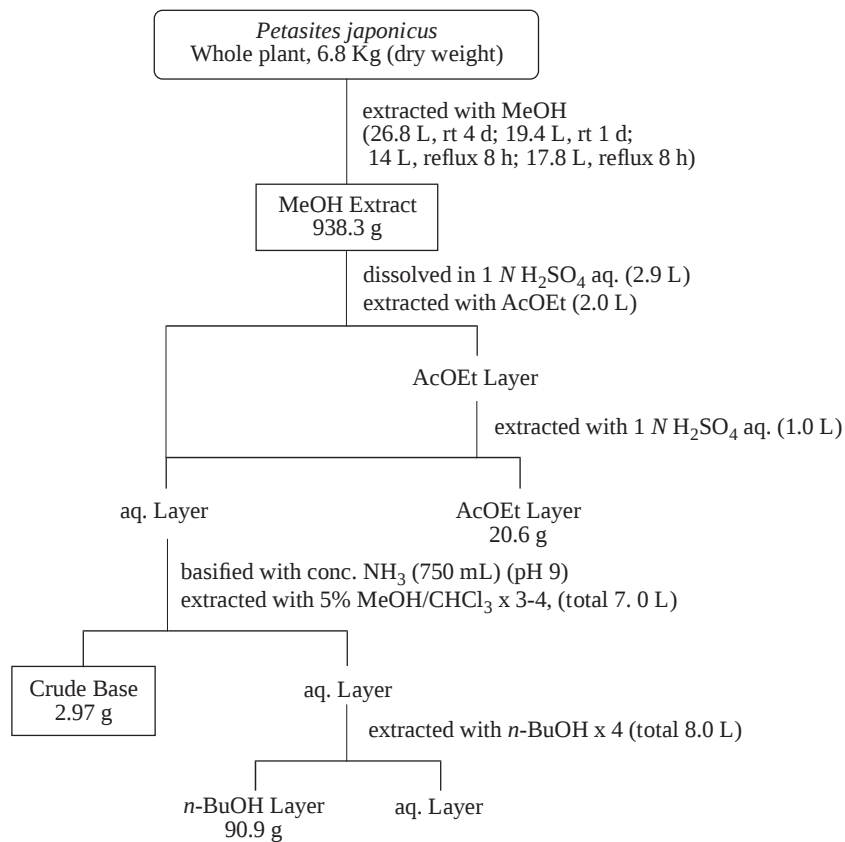


Symphytine (1)	1.3 mg
Echimidine (2)	37.6 mg
Myoscorpine (10)	3.7 mg
Symlandine (11)	0.4 mg
7-Acetyllycopsamine (12)	14.0 mg

添付資料 5 : 化合物 **10-12** の NMR チャート

添付資料 6 : 化合物 **10-12** の ESI-MS チャート

※ 8 : 図 7 フキの抽出・液液分配のスキーム



※ 9 : フキの粗塩基分画の LC-MS (添付資料 7)

※ 10 : 図 8 フキの粗塩基分画、カラムの各フラクションの TLC

TLC プレート : SiO₂

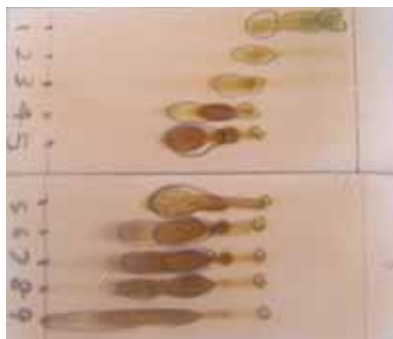
展開溶媒 : 20% MeOH/CHCl₃

検出 : UV 254 nm (鉛筆書き) 及び Schlittler 発色

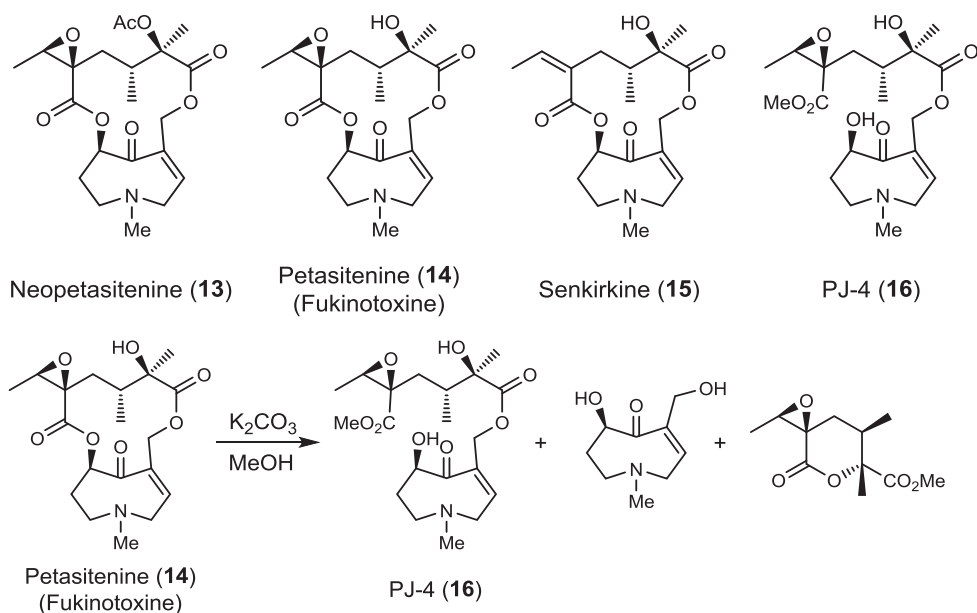
・粗塩基分画



- ・カラム (SiO₂ flash カラム φ 4.6 cm x 9.0 cm, MeOH/CHCl₃ gradient にて分離) のフラクション



※ 1 1 : 図 9 フキから取得したピロリジジナルカロイド類



Neopetasitenine (13)	172.2 mg
Petasitenine (14)	181.8 mg
Senkirkine (15)	24.7 mg
PJ-4 (16)	2.7 mg

添付資料 8 化合物 13-16 の NMR スペクトル

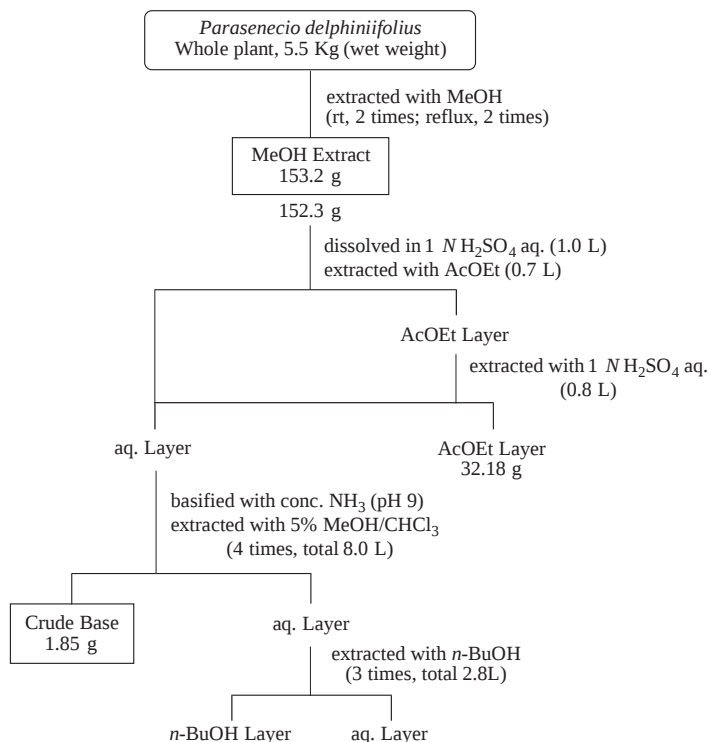
添付資料 9 化合物 13-16 の ESI-MS スペクトル

添付資料 1 0 化合物 13-16 の HPLC 分析

添付資料 1 1 化合物 13-16 の LC-MS/MS スペクトル

※ 1 2 : 第 5 回食品薬学シンポジウムポスター (添付資料 1 2)

※13：図10 モミジガサの抽出・液液分配のスキーム



※14：図11 モミジガサの粗塩基分画、カラムの各フラクションの TLC

TLC プレート：SiO₂

検出：UV 254 nm（鉛筆書き）及び

Anisaldehyde 発色（左 TLC）、Schlittler 発色（右 TLC）

・ MeOH エキス (M)、粗塩基分画 (C)、

カラム (SiO₂ flash カラム φ 3.0 cm x 8.0 cm, MeOH/CHCl₃ gradient にて分離) のフ
ラクション Fr. 1-4

展開溶媒：10% MeOH/CHCl₃



- ・粗塩基分画 (C)、カラムのフラクション Fr. 6-8

展開溶媒：20% MeOH/CHCl₃



- ・粗塩基分画の HPLC

Column : InertSil ODS-3 (GL Science) 5 μm (4.6 x 250 mm)

A 液 0.2 % aq. HCOOH

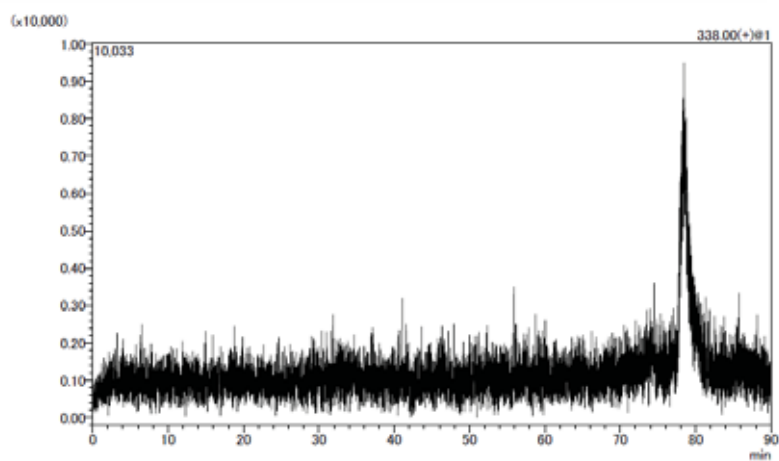
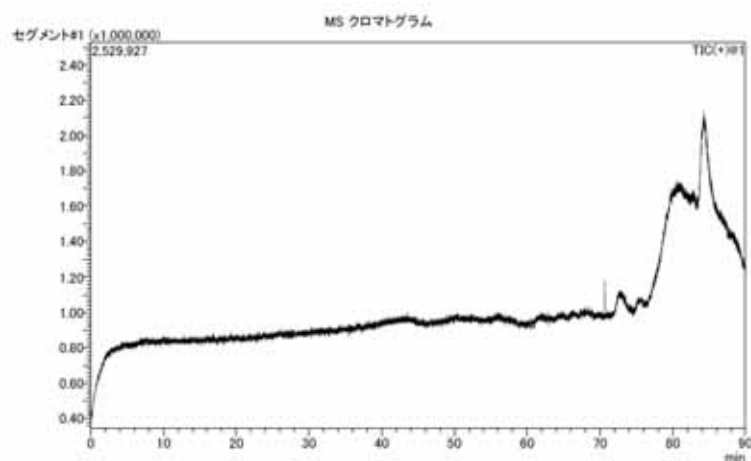
B 液 0.2 % HCOOH / MeOH

流速 : 0.5 mL / min

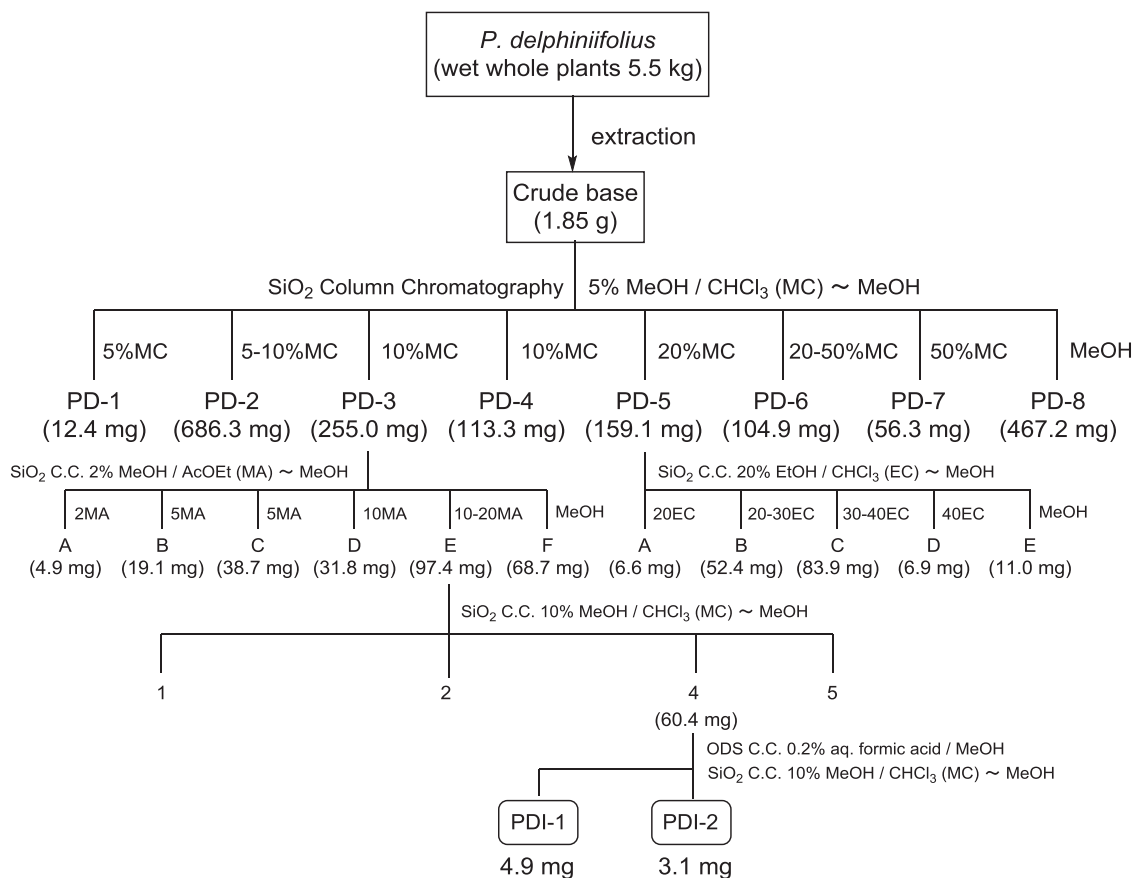
カラムオープン : 30 °C

Inject : 0.21mg / 20mL MeOH を 3μL inject

Time (min)	A (%)	B (%)
0	70	30
60	10	90
61	0	100
90	stop	

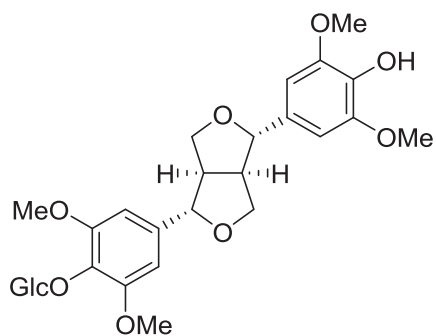


※15：図12 モミジガサの分離スキームの一部と取得化合物



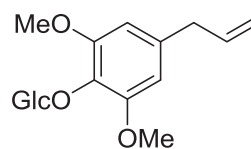
A, B, C…、1, 2, 3…は分離フラクションの仮称を表す（低極性から A, B, C…）

compounds isolated from *Parasenecio delphiniifolius*



PDI-1

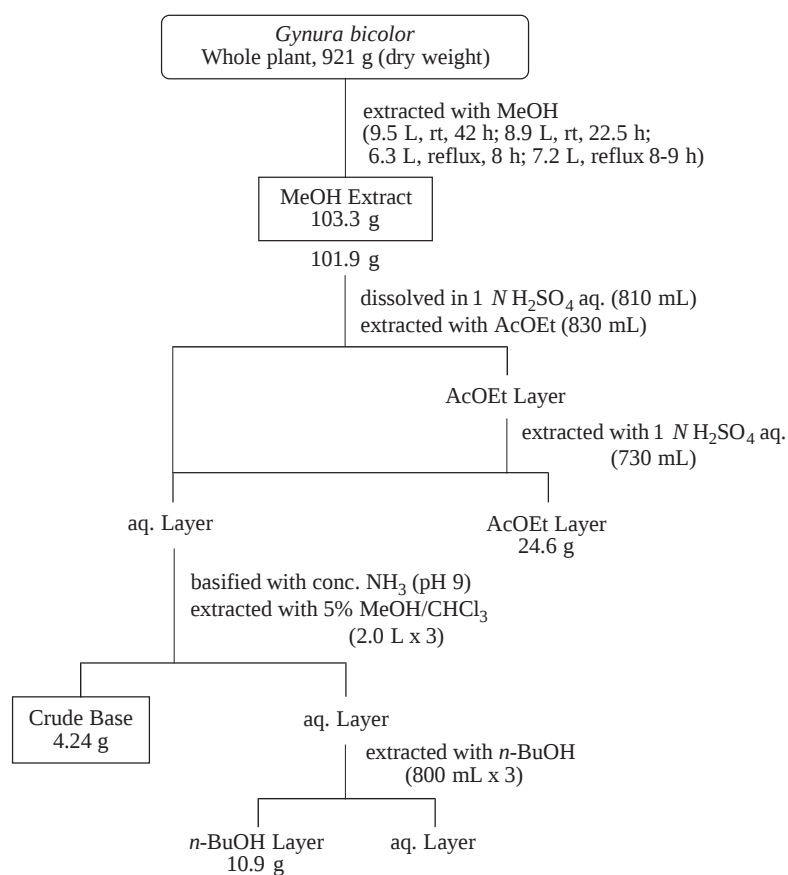
(+)-syringaresinol-O-β-D-glucoside



PDI-2

4-allyl-2,6-dimethoxyphenol glucoside

※ 1 6 : 図 1 3 スイゼンジナの抽出・液液分配のスキーム



※ 1 7 : 図 1 4 スイゼンジナの粗塩基分画、カラムの各フラクションの TLC

TLC プレート : SiO_2

検出 : UV 254 nm (鉛筆書き) 及び Hanessian 発色

・粗塩基分画

展開溶媒 : 10% MeOH/ CHCl_3



・カラム (SiO₂ flash カラム φ 4.5 cm x 8.0 cm, MeOH/CHCl₃ gradient にて分離) のフラクション

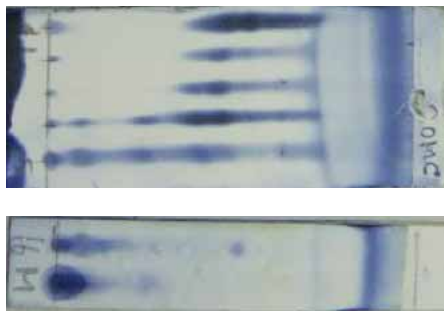
Fr. 1-5 展開溶媒 : 5% MeOH/CHCl₃



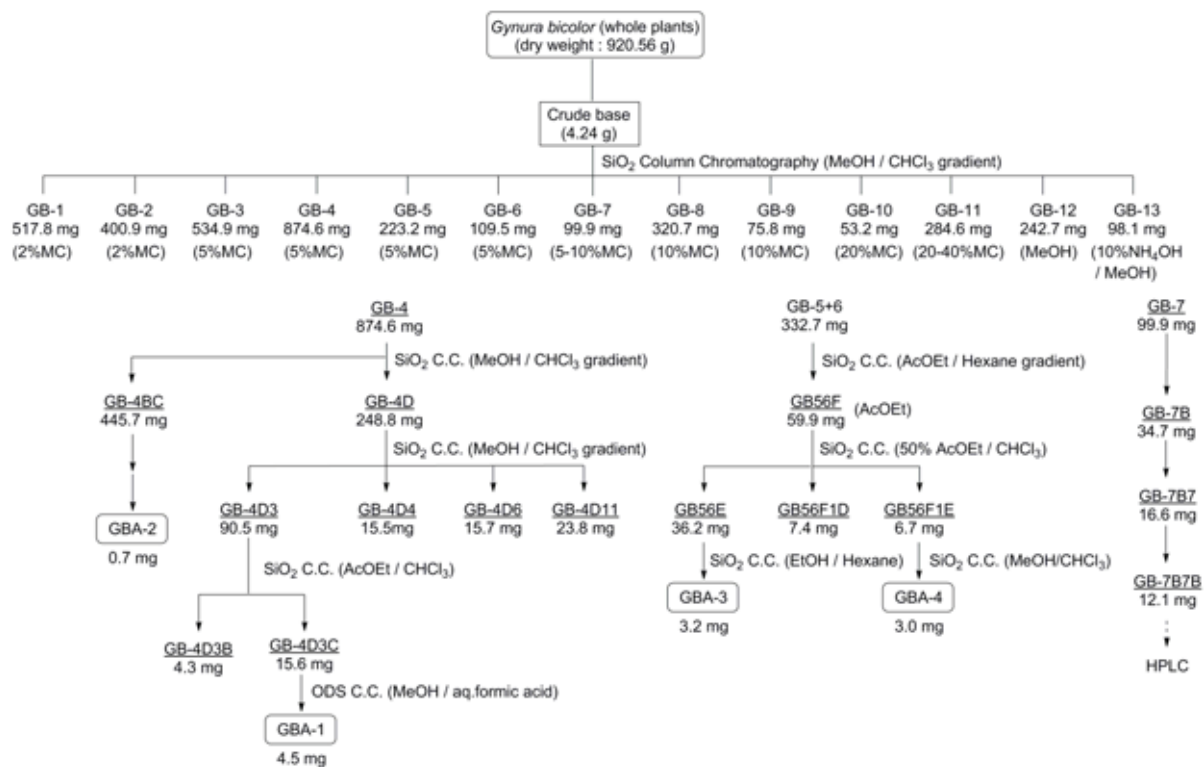
Fr. 6-10 展開溶媒 : 10% MeOH/CHCl₃



Fr. 11-16, MeOH 回収 (M) 展開溶媒 : 20% MeOH/CHCl₃



※18：図15 スイゼンジナの分離スキームの一部と取得化合物



A, B, C…、1, 2, 3…は分離フラクションの仮称を表す（低極性から A, B, C…）

HPLC 分離条件 (Fr. 7B7B)

Column : Inertsil C18 (GL Science) 5 μm (10 x 250 mm)

A 液 0.2 % aq. HCOOH

B 液 acetonitrile

流速 : 1.0 mL / min

カラムオーブン : 30 °C

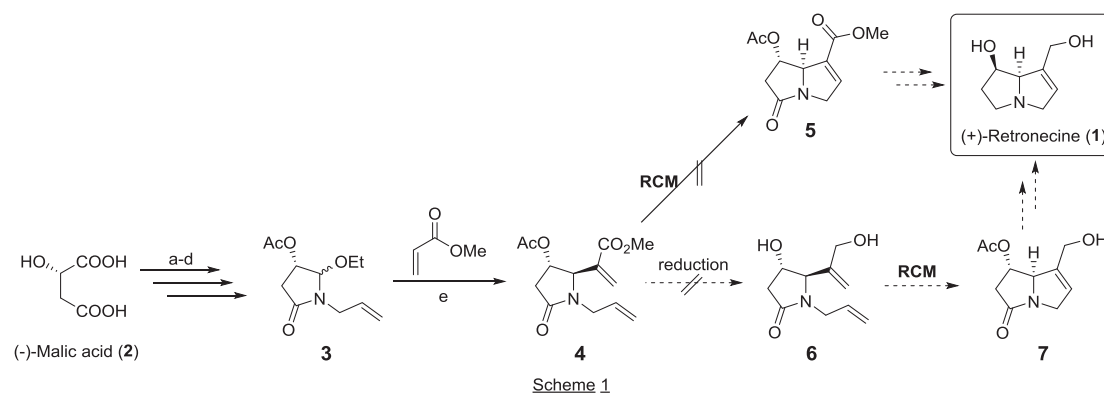
Inject : 12.1 mg / 100 μL (MeOH)を 50 μL

Time (min)	A (%)	B (%)
0	40	60
60	0	100

※19：図16 (+)-Retronecine の合成検討

ピロリジジン環構築を閉環メタセシス反応 (RCM)で行うこととした (Scheme 1)。市販の(-)-リンゴ酸を出発原料に既知ラクタム **3** を合成し、続いて Baylis-Hillman 反応によって **4** を得た。**4** に対する RCM は進行しないことが既に報告されているので、反応性を高めるためにメチルエステル基を還元して、**6** の合成を試みたが目的物を得ることができなかった。メチルエステル基の還元には下記の条件を検討した (Table 1)。

また Baylis-Hillman 反応は再現性がとれず **4** を大量供給できなかったため、本合成経路は困難であると判断した。

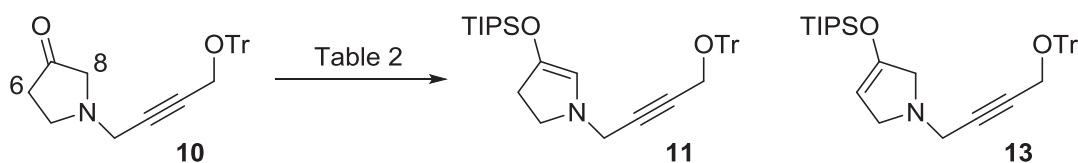
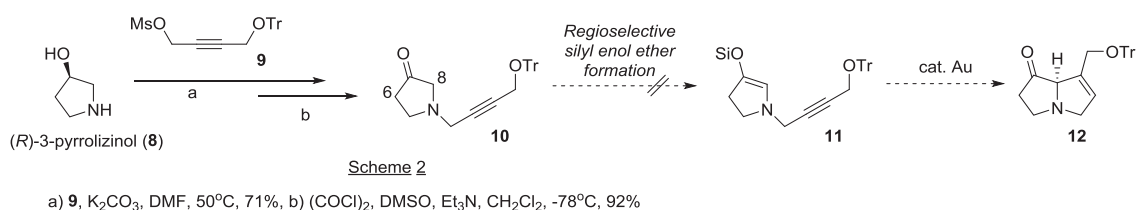


a) AcCl, reflux, b) allylamine, CH₂Cl₂, rt., c) AcCl, reflux 71% (3 steps), d) NaBH₄, 1M H₂SO₄, EtOH, -50°C, 74%, e) methyl acrylate, TMSOTf, BH₃THF, Me₂S, MeCN, rt., 0-41%

Entry	reductant	solvent	condition	result
1	DIBAL 8.0 eq.	THF	- 70 °C 30 min	complex mix.
2	BH ₃ · THF 6.0 eq.	THF	- 70 to 0 °C 30 min	complex mix.
3	LiAlH ₄ 15 eq.	THF	0 °C 30 min	complex mix.
4	LiAlH ₄ 8.0 eq.	THF	0 °C 1 h	complex mix.

Table 1

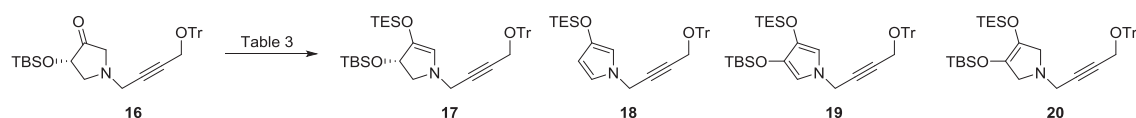
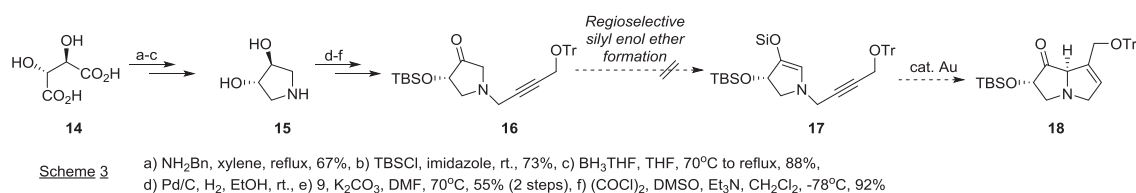
次に金触媒環化反応を用いたピロリジジン環構築の検討を行った (Scheme 2)。
 (*R*)-3-Pyrrolizinol (**8**)を出発原料に設定し、*N*-アルキル化、酸化の 2 工程で **10** へ導いた。
 続いて位置選択的なシリルエノール化反応の検討を行った。種々条件検討を行った
 (Table 2) が、所望のシリルエノールエーテル **11** は得られず、6 位で脱プロトン化した
 シリルエノール体を与える結果となった (Table 2)。



Entry	Si source	Base	solvent	condition	11	13	10 (S.M.)
1	TIPSOTf 2.5 eq.	Et ₃ N 2.0 eq.	CH ₂ Cl ₂	rt 3.5 h	-	82%	-
2	TIPSCl 2.0 eq.	LDA 1.5 eq.	THF	-78 °C to 0 °C 30 min	-	-	trace
3	TIPSCl 3.0 eq.	KHMDS 1.5 eq.	toluene	-78 °C to 0 °C 30 min	-	19%	-
4	TIPSCl 3.0 eq.	LDA 1.5 eq.	THF/toluene 1 : 1	-78 °C to 0 °C 30 min		decomp.	

Table 2

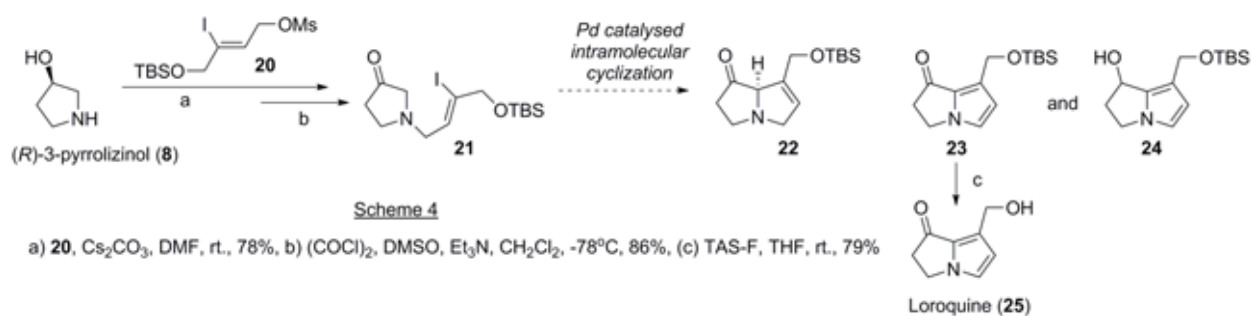
そこで6位プロトンの脱プロトン化を抑制することを目的に、6位に嵩高い置換基を導入した基質 **16** を合成中間体に設定し、シリルエノールエーテル化反応を行うことを計画した (Scheme 3)。まず出発原料として L-酒石酸を用い、6 工程で **16** を得た。続いて位置選択的なシリルエノール化反応の条件検討を行ったが (Table 3)、本基質でも所望の **17** は得られなかった。



Entry	TESCl	Base	Solvent	Condition	17	18	19	20
1	3.0 eq.	LDA 1.4 eq.	THF	-78 °C to 0 °C 30 min		N.R.		
2	3.0 eq.	LHMDS 1.5 eq.	THF	-78 °C to 0 °C 30 min		N.R.		
3	3.0 eq.	KHMDS 1.5 eq.	toluene	-78 °C to 0 °C 30 min	-	25%	7%	17%
4	3.0 eq.	KHMDS 1.5 eq.	toluene	-90 °C to 0 °C 30 min	-	24%	5%	21%

Table 3

金触媒環化反応を用いた合成経路と並行して、Pd 触媒エノラート環化反応を用いたピロリジン骨格構築を検討した (Scheme 4)。まず(*R*)-3-Pyrrolizinol (8)を出発原料に 2 工程で **21** を得、これを用いて Pd 触媒によるエノラート環化反応について検討した (Table 4)。現時点ではピロール化された環化体 **23**、**24** を得るのみで目的物は得られていない。また得られたピロール **23** に対して TBS 基の脱保護を行い、天然物である Loroquine (**25**) へと導いた。



Entry	Pd cat.	Et ₃ N	additive	solvent*	condition	22	23	24
1	Pd(PPh ₃) ₄ 20 mol%	3.0 eq.	-	DMF	80 °C 18 h	-	24 %	-
2	Pd(PPh ₃) ₄ 20 mol%	3.0 eq.	Na ascorbate 1.0 eq.	DMF	80 °C 18 h	-	40 %	-
3	Pd(PPh ₃) ₄ 20 mol%	-	Na ascorbate 1.0 eq.	DMF/Et ₃ N (1 : 1)	80 °C 18 h	-	39%	-
4	Pd(PPh ₃) ₄ 20 mol%	-	-	Et ₃ N	80 °C 18 h	-	45%	18%
5	Pd(OAc) ₂ 30 mol%	-	PPh ₃ 60 mol%	DMF/Et ₃ N (1 : 1)	80 °C 9 h	-	26%	-

* 使用した溶媒は全て凍結脱気を行った。

Table 4

※20 添付資料13 : Retrorcine の ^1H -NMR データと安定性の確認

※21 添付資料14 : Senkirkine (15) の定量 NMR データ

Senkirkine (15) の定量 NMR

Senkirkine 7.78 mg と 1,4-BTMSB- d_4 0.66 mg を用いて NMR サンプルを調製し (CDCl₃ 溶媒)、NMR 測定をおこなった。その積分値を用いて、下記の式により純度を 99.2 % と算出した。

$$P_{\text{sample}} = \frac{S_{\text{sample}}}{S_{\text{std}}} \times \frac{N_{\text{std}}}{N_{\text{sample}}} \times \frac{m_{\text{std}}}{m_{\text{sample}}} \times \frac{M_{\text{sample}}}{M_{\text{std}}} \times P_{\text{std}}$$

P : 純度、 S : ピーク面積、 N : プロトン数、 m : 調製試料質量、 M : 分子量

$$P_{\text{sample}} = \frac{1}{2.48} \times \frac{18}{1} \times \frac{0.66}{7.78} \times \frac{365.4}{226.5} \times 99.9 = 99.2 \%$$

3. 中課題3：ピロリジジナルカロイド類 (PAs) 分析法の予備検討

(1) 成果の概要

工程表	進捗状況・成果
(1) アルカロイド含有確認法やアルカロイド総量の定量法の確立。(平成26年度)	アルカロイド含有を確認する発色試薬を文献調査したところ、PA 発色を目的に開発された Mattocks–Molyneux 試薬の存在が明らかとなったので、実際の PA 探索に用いた。 (図1) ※1 <u>(平成26年度)</u>
(2) 中課題2の試験研究で得た PAs (標準試料) を LC-MS/MS に付し、スペクトルデータを取得。(平成26年度)	5 種の PAs [Symphytine (1) , Echimidine (2) , Myoscorpine (10) , Symlandine (11) , 7-Acethyllycopsamine (12)] について LC-MS/MS を行い、 <i>m/z</i> 120 のピークが PA 含有の確認に有用であるという知見を得た。 ※2 <u>(平成26年度)</u>
(3) 中課題2の試験研究で得た PAs (標準試料) が良好に分離分析可能な HPLC のカラムと溶媒等の条件を、文献情報を参考に検討。(平成26年度)	文献を参考に、逆相カラムとギ酸水溶液–MeOH 溶媒系を用いた条件で分離を検討したが、良好な分析条件は得られなかった。 ※3 <u>(平成26年度)</u>
↓	
最適化した分析条件で、PAs を LC-MS/MS に付し、食用植物の実態調査への適用可能性について検討。(平成26年度)	最適化条件の確立には至っていない。

＜成果の概要の補足＞

※1：図1 PAs の TLC 分析

Mattocks-Molyneux 試薬の調製法 (*J. Chromatography*, **1980**, *195*, 412-415)

A 液：1% *O*-chloranil (tetrachloro-*o*-benzoquinone) / benzene 溶液

B 液：*p*-dimethylaminobenzaldehyde (2.0 g)の無水エタノール(100 mL) 溶液
+ Boron trifluoride etherate (2.0 mL)

C 液：10%無水酢酸 / benzene 溶液

使用法：①A 液をスプレーし、すぐホットプレートで加熱して乾かす。

(N-oxide 体の場合は C 液をスプレーする)

②B 液をスプレーし、もう一度ホットプレートで加熱する。

PAs は紫色に発色する。

Symplandine (**11**) を含む同一のフラクションを異なる発色剤で TLC 分析を行った。

(SiO₂ プレート、展開溶媒：10% MeOH / CHCl₃)



Hanessian 試薬

Mattocks-Molyneux 試薬

左側から 5mm の位置にスポットし、4 cm 展開。(TLC プレートは約 5 cm)

スポットの位置は展開位置から 6 mm で R_f 値は 0.15。

Mattocks-Molyneux 試薬は PA に特異的に発色することが確認された。

※2 添付資料 15：化合物 **1, 2, 10-12** の LC-MS/MS スペクトル

※3 PAs の HPLC 分析条件

Sample : Echimidine (2) を main に含むフラクション
(Echimidine (2)を保管しておいたサンプル)

Column : Inertsil ODS-3 (GL Science) 3 μ m (4.6 x 250 mm)

A 液 0.2 % aq. HCOOH

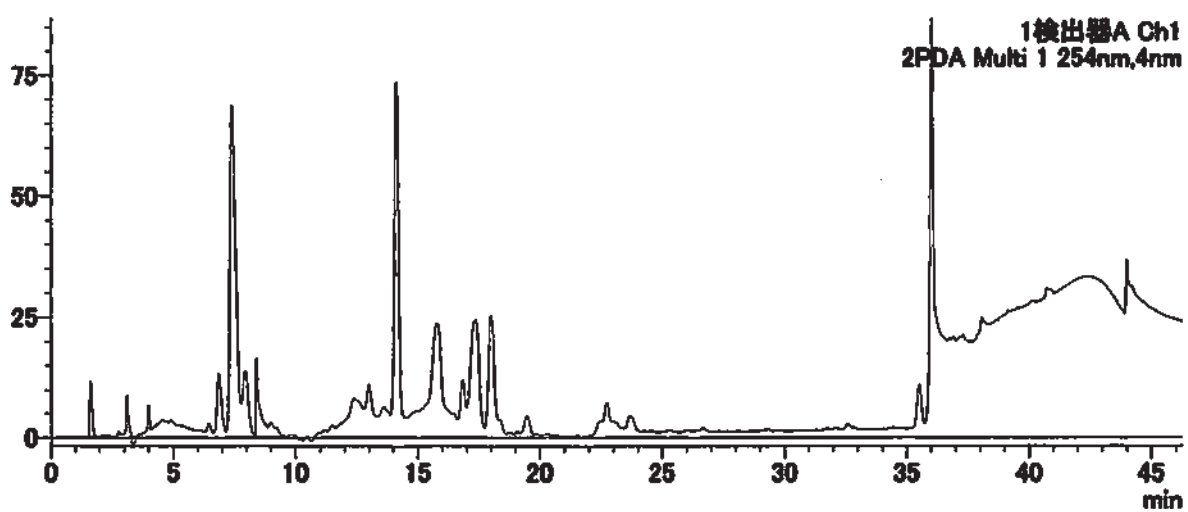
B 液 MeOH

流速 : 0.3 mL / min

カラムオーブン : 30 $^{\circ}$ C

Inject : 21.7 mg / 3mL (MeOH)を 3 μ L

Time (min)	A (%)	B (%)
0	40	60
60	0	100



7.5 min 付近の大きなピークが Echimidine (2) のピークと推定される。

Ⅲ. 主要な成果

1. 成果の内容

1) ピロリジジナルカロイド(PAs)の取得と構造決定

コンフリー、フキより 16 種のピロリジジナルカロイドを取得し、そのうち 12 種について構造を決定した。さらに取得した PAs の各種スペクトルデータを収集し、代表的なピロリジジナルカロイドの同定を容易にした。

2. 成果の活用

1) ピロリジジナルカロイド含有検査。

植物などにピロリジジナルカロイドが含有されているか否か、LC-MS/MS を用いることにより予測することができる。今後、HPLC 分析条件などが精査されることにより、さらに含有検査の精度が上がると期待できる。

Ⅳ. 論文、特許等の実績及び推進会議の開催状況等

学会発表

第 5 回食品薬学シンポジウム（平成 25 年 11 月 1-2 日、京都大学）

タイトル：フキ (*Petasites japonicus*) に含有されるピロリジジナルカロイド類の検索研究。優秀発表賞を受賞。

第 108 回日本食品衛生学会（平成 26 年 12 月 3-6 日、金沢）

タイトル：野菜や山菜に含まれるピロリジジナルカロイド類のリスク管理の必要性に関する考察

推進会議

平成 25 年 6 月 14 日

平成 25 年度レギュラトリーサイエンス新技術開発事業第 1 回研究推進会議

平成 26 年 2 月 19 日

平成 25 年度レギュラトリーサイエンス新技術開発事業第 2 回研究推進会議

平成 26 年 6 月 4 日

平成 26 年度レギュラトリーサイエンス新技術開発事業第 1 回研究推進会議

平成 27 年 3 月 5 日

平成 26 年度レギュラトリーサイエンス新技術開発事業第 2 回研究推進会議

論文、特許等の実績等

学術論文

タイトル、著者名、学会誌名、巻、ページ、発行年月	機関名

口頭発表

タイトル、発表者名、学会等名、発表年月	機関名

出版図書

区分：①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

区分	著書名、(タイトル)、著者名、出版社名、発行年月	機関名

(5) 国内特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

(6) 国際特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名