

幻覚性植物 *Salvia divinorum* 及び近縁植物の成分と基原種鑑別について

丸山卓郎, 鎌倉浩之, 花尻(木倉)瑠理, 合田幸広\*

Authentication and Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)/MS Analysis of Magic Mint, *Salvia divinorum* and Its Related PlantsTakuro MARUYAMA, Hiroyuki KAMAKURA, Ruri KIKURA-HANAJIRI, and Yukihiro GODA\*  
National Institute of Health Sciences, Division of Pharmacognosy, Phytochemistry and Narcotics,  
1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received August 16, 2007; Accepted October 1, 2007)

Ultra performance liquid chromatography (UPLC)/mass spectrometry (MS) analysis was performed to investigate whether commercial *Salvia* cultivars available in the Japanese market contain salvinorin A (**1**), which is an hallucinogen present in magic mint (*Salvia divinorum*) prior to the regulation of *S. divinorum* by the Japanese Pharmaceutical Affairs Law. In addition, a previously reported method to authenticate *S. divinorum*, utilizing an amplification refractory mutation system (ARMS) was applied to the same samples to estimate the method's accuracy. As a result of the UPLC/MS analysis, it was clear that none of the tested cultivars possessed **1** while *S. divinorum* leaves and its processed products "concentrated salvia" contained **1** in the range from 0.19% to 0.58%. Furthermore, the ARMS method could clearly distinguish *S. divinorum* from the tested cultivars. In conclusion, the authentication method is considered to be useful for the practical regulation of *S. divinorum* due to its simplicity and accuracy.

**Key words**—*Salvia divinorum*; salvinorin A; amplification refractory mutation system (ARMS); 5S rRNA-non-transcribed spacer (NTS); ultra performance liquid chromatography (UPLC)/MS

## INTRODUCTION

近年, 麻薬・覚醒剤の代用として, 様々な化学物質や植物が違法ドラッグ (いわゆる脱法ドラッグ) の名で流通している. 特にマジックマッシュルームが流行し始めた 2000 年頃より, これらの違法ドラッグが原因と思われる死亡事故や殺人事件なども発生しており, 社会問題の 1 つとなっている. また, 違法ドラッグの乱用から真の麻薬・覚醒剤乱用に陥るといったゲートウェイドラッグとしての弊害も危惧されている.

厚生労働省では, 深刻化する違法ドラッグ問題に対応するため, 流通及び乱用実態を把握した上で, 違法ドラッグ市場に存在する未規制薬物や植物の一部を, 新たに麻薬及び麻薬原料植物に指定している. また, 流通・乱用実態に即した迅速な規制を行うため, 平成 19 年度より, 薬事法内に, 指定薬物制度を設け, 幻覚性や中枢神経系への作用を有し,

乱用される恐れのある物質の製造, 輸入, 販売の禁止, 広告の制限を行っている.<sup>1)</sup> 具体的には, tryptamine 及び phenethylamine 系の麻薬・覚醒剤類似化合物, 亜硝酸エステル類など 31 化合物 1 植物が指定されている.<sup>2)</sup>

植物として唯一指定された *Salvia divinorum* は, メキシコ原産のシソ科の多年草であり, 本植物に含まれる主な幻覚成分は, salvinorin A (**1**) である (Fig. 1). メキシコの原住民が伝統的に本植物の葉を噛んだり, 抽出エキスを飲用するなどしており, その使用の歴史は長いと思われるが, 広く世界的に

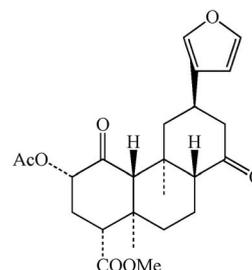


Fig. 1. The Structure of Salvinorin A

認知されるのは、1962年に原植物が新種として報告され、<sup>3,4)</sup> 1980年代に成分探索が行われた<sup>5,6)</sup>後であり、比較的新しい幻覚性物質である。1は、他の多くの幻覚性物質と異なり、その構造中に窒素原子を含まない。また作用機序も $\kappa$ -オピオイド受容体の賦活であると考えられており、<sup>7,8)</sup> これまでとは全く違うタイプの幻覚剤である。

一方で、*Salvia* 属植物は、地中海沿岸、中央及び東アジア地域、中南米を中心に900種以上が分布し、<sup>9)</sup> その花は、非常に多様な色、形態を持つことから、園芸植物として多くの種(品種)が、市場に流通している。また、薬用セージ(*S. officinalis*)やタンジン(*S. miltiorrhiza*)などのように薬用に供されるものもある。

したがって、*S. divinorum* の指定薬物への移行に際しては、一般の園芸店など、身近に存在する園芸品種の*Salvia* 属植物に1が存在しないことを確認するとともに、園芸品種と*S. divinorum* を区別する分析方法の確立が望まれる。

そこで本研究では、園芸植物として流通する*Salvia* 属植物について、UPLC/MS分析を行い、1の有無を調査した。*Salvia* 属植物は、*Heterosphaera* 節及び*Salviastrum* 節に属する一部の例外を除き、ユーラシア及びアフリカ大陸分布種とアメリカ大陸分布種とで、分子系統的に異なることが示されており、<sup>9)</sup> 前者の多くが abietane 型のジテルペノイドを含有するのに対し、後者は、1と同じ neoclerodane 型のジテルペノイドを含有する。<sup>10)</sup> そこで、調査対象としては、アメリカ大陸原産の*Salvia* 属植物を基原とする品種を選んだ。

また、最近、Berteauらは、5S rRNA, non-transcribed spacer (NTS) 塩基配列の違いを利用した amplification refractory mutation system (ARMS) 法による*S. divinorum* の鑑定法を報告している。<sup>11)</sup> しかし、鑑別の比較対象にヨーロッパ原産種1種のみを用いていることから、その精度には疑問が持たれる。そこで、*S. divinorum* により近い種であるアメリカ大陸産の*Salvia* 属植物群を比較対象に用いて、文献の方法の精度及び有用性を検討した。

## MATERIALS AND METHODS

**1. Samples and Reagents** 本研究に使用した園芸市場に流通する*Salvia* 属植物及び違法ドラッ

Table 1. Commercial *Salvia* Cultivars and *Salvia divinorum* Products Used in This Study

Sample No.	Commercial name	Scientific name	Form
<b>Sa-0</b>	<b>Salvia divinorum</b>	<i>S. divinorum</i>	seedling
Sa-1	Prairie sage	<i>S. azurea</i>	seedling
Sa-2	Eyelish leaved sage	<i>S. blepharophylla</i>	seedling
Sa-3	Buchanan's sage	<i>S. blepharophylla</i>	seedling
Sa-4	Cacalia sage	<i>S. cacaliaefolia</i>	seedling
Sa-6	Salvia discolor	<i>S. discolor</i>	seedling
Sa-7	Pineapple sage	<i>S. elegans</i>	seedling
Sa-8	Honey Melon sage	<i>S. elegans</i>	seedling
Sa-9	Autumn sage	<i>S. greggii</i>	seedling
Sa-10	Anise scented sage	<i>S. guaranitica</i>	seedling
Sa-11	Rose leaf sage	<i>S. involucrata</i>	seedling
Sa-12	Mexican bush sage	<i>S. leucantha</i>	seedling
Sa-13	Mexican sage	<i>S. mexicana</i>	seedling
Sa-14	Patens	<i>S. patens</i>	seedling
Sa-15	Sinaloa sage	<i>S. sinaloensis</i>	seedling
Sa-16	Bog sage	<i>S. uliginosa</i>	seedling
Sa-17	Urica	<i>S. urica</i>	seedling
<b>Sa-58</b>	<b>Salvia X5</b>	<i>S. divinorum</i>	unknown
<b>Sa-59</b>	<b>Salvia X10</b>	<i>S. divinorum</i>	unknown
<b>Sa-64</b>	<b>Salvia·divinorum</b>	<i>S. divinorum</i>	leaf

Commercial *Salvia divinorum* products are indicated in bold letter.

グ市場に流通する*S. divinorum* 製品を Table 1 にまとめた。これらは、インターネット上の販売店及び国内の輸入雑貨店等より購入した。なお、表示の学名は、販売店による記載であり、植物分類学的な確認は行っていない。各試料は、乾燥後、1年間、室温にて保存したものをを用いた。UPLC/MS分析に用いた1の標品は、徳島文理大香川薬学部の代田准教授が、*S. divinorum* より単離し、NMR, MSなどのスペクトルデータにより構造を確認したもの<sup>12)</sup>を御恵与頂き、使用した。

**2. UPLC/MS 分析** 試料溶液の調製は、次のように行った。細片化した試料 20 mg に、MeOH 1 ml を加え、1時間、室温で振とう抽出したのち、遠心上清を Millex-HV (0.45  $\mu$ m, Millipore) によりフィルターろ過し、その 1  $\mu$ l を分析に供した。

分析は、装置に Waters Acquity Ultra Performance LC system (Waters) 及び Waters LCT Premier TOF mass spectrometer (Waters) を、カラムに Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> column (100 mm×2.1 mm i.d., 1.7  $\mu$ m particle size, Waters) を用いて行った。移動相は、H<sub>2</sub>O (A)/acetonitrile (B) を 20% B

(0 min)-55% B (10 min)-85% B (15 min) のグラジエント条件で用い、流速を 0.4 ml/min とした。カラム温度は、40°C とした。MS 検出器におけるイオン化は、electron spray ionization (ESI) のポジティブモードで行い、キャピラリー電圧、3000 V、コーン電圧、30 V、脱溶媒ガス流量は、750 l/min、コーンガス流量、50 l/min、脱溶媒温度は、350°C、イオン源温度は、120°C とした。またスキャン範囲は、100–1000 amu とした。

また、定量は、各濃度 (3, 10, 30, 100 µg/ml) の標準溶液を調製し、疑似分子イオンピーク値 ( $m/z$  433 [M+H]<sup>+</sup>) におけるマスクロマトグラムのピーク面積を用いた絶対検量線法により行った。分析法のバリデーションは、各濃度について分析法の全操作を 3 回繰り返し行った結果から評価した。

**3. ARMS 分析** 乾燥試料 30 mg より、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて、genomic DNA を抽出、精製した。Genomic DNA 溶液 0.5 µl を鋳型として、polymerase chain reaction (PCR) を行い、5S rRNA NTS 領域を増幅した。PCR 産物、1 µl をアガロースゲル電気泳動 (2%, 100 V, 30 min) により分析した。PCR 酵素には、Nova Taq Hot Start DNA polymerase (Merck) を用い、PCR 試薬には、Ampdirect plus (Shimadzu) を用いた。プライマーは、文献<sup>1)</sup>記載の 5S-P1, 5S-P2, SD-F, SD3 を使用した。この内、5S-P1 及び 5S-P2 は、植物の 5S rRNA の配列に保存性の高い領域に設計されたプライマーであり、各試料から調製した DNA が、PCR の使用に適した品質を保持しているかを確認するための positive primer である。一方、SD-F 及び SD3 は、*S. divinorum* に特異的な配列に設計されたプライマーであり、*S. divinorum* 由来の genomic DNA を鋳型に用いた際のみ、PCR 産物の増幅が起こると期待される specific primer である。PCR のタイムプログラムは、ホットスタート、95°C 10 min、続いて、95°C 15 sec, 56°C 15 sec, 72°C 25 sec を 40 サイクルののち、終了反応、72°C 7 min の条件で行った。

## RESULTS AND DISCUSSION

分析法のバリデーションの評価結果を Table 2 に示した。1 の検量線は、10–100 µg/ml の範囲で、良好な直線性を示した。本条件において、Sa-0 の抽

Table 2. Calibration Curve, Accuracy and Precision in Quantitative Determination

Conc. (µg/ml)	RSD (% , n=3)	Calibration curve	Lineality (R <sup>2</sup> )	Range (µg/ml)
3	14.8	$y=31.9x+311.7$	0.9954	10–100
10	9.6			
30	6.7			
100	7.8			

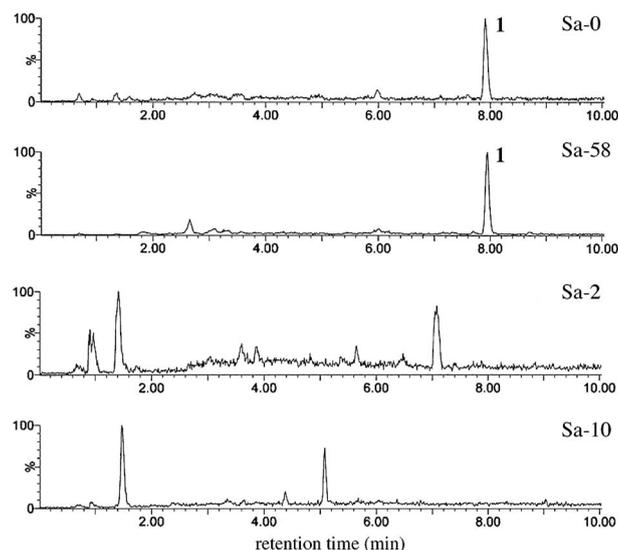


Fig. 2. Mass Chromatograms ( $m/z$  433) on UPLC/MS Analysis

1: Salvinorin A

出操作を 6 回繰り返し行った結果、定量値のバラツキが小さかった (CV 2.7%) ため、各検体の分析は、1 回とした。

UPLC/MS 分析の結果の一部を Fig. 2 に示した。1 の標品は、上記条件で、保持時間、約 7.9 分で溶出した。違法ドラッグ市場に流通する *S. divinorum* 製品 (Sa-0, -58, -59, -64) からは、1 と同一の保持時間にピークが認められ、そのマススペクトルも標品のものと一致した。一方、園芸植物試料においても、1 と同一の保持時間にピークを検出する検体が認められたが、疑似分子イオンピーク 433 [M+H]<sup>+</sup> におけるマスクロマトグラム ( $m/z$  433.1–433.2) において、該当するピークは、検出されなかった。また、それぞれのマススペクトルは、いずれも 1 の標品のものとは一致しなかった。したがって、本分析条件において、今回、試験を行った園芸植物試料 16 種から、1 は検出されないことを確認

した。

違法ドラッグ市場品, Sa-0, -58, -59, -64 における **1** の含量は, それぞれ, 0.23, 0.37, 0.58, 0.19% であり, この結果は, 先に東京都健康安全センターが行った調査結果<sup>13)</sup>と同様の傾向を示した. なお, 本方法における **1** の検出限界及び定量限界は, それぞれ, 1 ng (S/N=3) 及び 10 ng (S/N=10) であった.

ARMS 分析の結果を Figs. 3 and 4 に示した. Positive primer (5S-P1 及び 5S-P2) を用いた PCR では, いずれの試料も約 500 bp に PCR 産物を生成しており (Fig. 3, Fig. 4(A), (B)), 各試料より, PCR 法を適用可能な品質の DNA が調製されていることが確認できた. 一方, *S. divinorum* specific primer (SD-F 及び SD3) を用いた PCR では, *S. divinorum* 試料のみに, 約 320 bp の PCR 産物を認めた (Fig. 3, Fig. 4(C), (D)). したがって, 本方法による *S. divinorum* の基原種鑑別は, 非常に精度の高い方法であることが確認された. また, 文献<sup>11)</sup>の方法では, PCR に, 50 サイクルを要しているが, 本研究では, 試料由来の PCR 酵素阻害物質の作用を抑える働きを持つ Ampdirect plus を利用することにより, PCR におけるサイクル数を 40 に

抑えるとともに, 伸長時間も 25 秒に短縮しており, PCR に要する時間を大幅に短縮することに成功した. なお, 本条件において, specific primer による増幅の際に, 目的の約 320 bp の PCR 産物のほかに, 約 900 bp の PCR 産物が確認された (lane 9 in Fig. 4(C) (D)). これは, 文献<sup>11)</sup>とは異なる酵素系を使用したことによる非特異的増幅に由来するもの

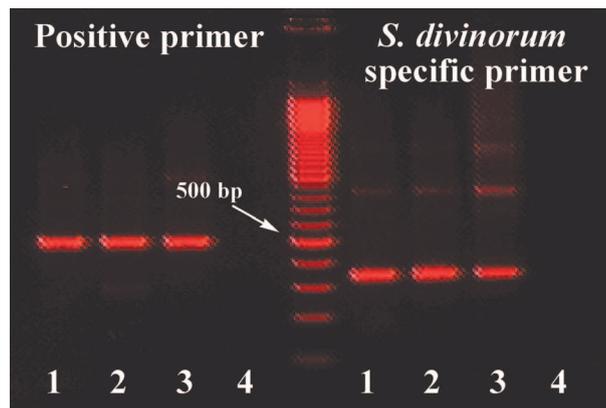


Fig. 3. ARMS Assay for the Commercial *S. divinorum* Products

Lanes 1 to 3: Sa-58, 59 and 64, lane 4: no template control, Positive primer: 5S-P1 and 5S-P2, *S. divinorum* specific primer: SD-F and SD3.

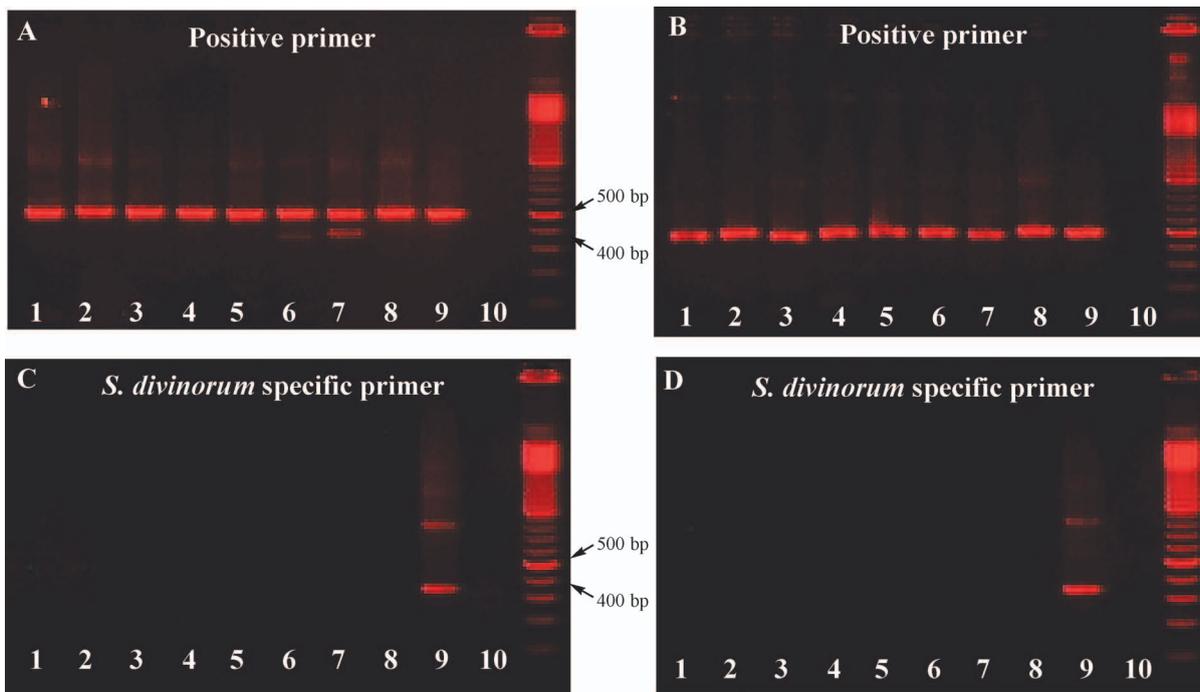


Fig. 4. ARMS Assay for the Commercial *Salvia* Cultivars

A and B show the PCR products amplified using positive primer (5S-P1 and 5S-P2). C and D show the PCR products amplified using *S. divinorum* specific primer (SD-F and SD3). Lanes 1 to 4 in A and C: Sa-1 to -4, lanes 5 to 8 in A and C: Sa-6 to -9, Lanes 1 to 8 in B and D: Sa-10 to -17, Lanes 9 and 10 in all panels mean positive control (Sa-58) and no template control, respectively.

であると思われる。PCRにおける温度プログラムを検討することにより、このPCR産物の産生を抑制できるものと思われるが、目的の約320 bpのPCR産物が明瞭に検出できるため、本研究では、検討を行わなかった。

以上の結果から、園芸市場に流通する *Salvia* 属植物は、**1** を含有せず、*S. divinorum* の指定薬物への移行に際し、特に問題にならないことが明らかになった。また、文献既報の ARMS 法による基原種鑑別法は、非常に精度が高く、アメリカ大陸原産の *Salvia* 属植物との間でも良好な鑑別が可能であることが示された。本鑑別法は、*S. divinorum* が指定薬物となった現在、塩基配列解析を必要としない簡便な方法として、非常に有用であると考えられる。

**Acknowledgements** 本研究を行うに当たり、**1** の標品を御恵与頂きました徳島文理大学香川薬学部の代田修先生に御礼申し上げます。また、本研究は、厚生労働科学研究費補助金により行われた。

#### REFERENCES

- 1) The revision of the Pharmaceutical Affairs Law (Jun. 14, 2006), Law No. 69 (2006).
- 2) Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, Ordinance No. 14 (Feb. 28, 2007).
- 3) Epling C., Játiva-M. C. D., *Bot. Museum Leaflets*, Harvard University, **20**, 75–76 (1962).
- 4) Wasson R. G., *Bot. Museum Leaflets*, Harvard University, **20**, 77–84 (1962).
- 5) Ortega A., Blount J. F., Manchand P. S., *J. Chem. Soc. Perkins Trans. I*, 2505–2508 (1982).
- 6) Valdés III, L. J., Butler W. M., Hatfield G. M., Paul A. G., Koreeda M., *J. Org. Chem.*, **49**, 4716–4720 (1984).
- 7) Roth B. L., Baner K., Westkaemper R., Siebert D., Rice K. C., Steinberg S., Ernsberger P., Rothman R. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 11934–11939 (2002).
- 8) Sheffler D. J., Roth B. L., *Trends Pharmacol. Sci.*, **24**, 107–109 (2003).
- 9) Walker J. B., Sytsma K. J., Treutlein J., Wink M., *Am. J. Bot.*, **91**, 1115–1125 (2004).
- 10) Luis J. G., “Chemistry, biogenesis, and chemotaxonomy of the diterpenoids of *Salvia*,” *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*, by Tomas-Barberan F. A., ed. Clarendon Press, Gloucestershire, UK, 1991. (ISBN 0–1985773–9–7).
- 11) Berteza C. M., Luciano P., Bossi S., Leoni F., Baiocchi C., Medana C., Azzolin C. M. M., Temporale G., Lombardozzi M. A., Maffei M. E., *Phytochemistry*, **67**, 371–378 (2006).
- 12) Shirota O., Nagamatsu K., Sekita S., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **30**, 1105–1114 (2007).
- 13) Hamano T., Shioda H., Nakajima J., Yasuda I., *Shoyakugaku Zasshi*, **61**, 1–5 (2007).