

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政策研究事業)
分担研究報告書

分担研究課題: グレーズーンの植物体に関する研究及び食薬区分の量的規制に関する研究
トウゲシバエキスおよび Huperzine 含有健康食品における Huperzine A の定量分析

研究分担者 辻本 恭 東京農工大学 工学府 特任助教
研究分担者 内山 奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部第二室長
研究分担者 袴塚 高志 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長
研究分担者 合田 幸広 国立医薬品食品衛生研究所 所長
研究分担者 西川 秋佳 国立医薬品食品衛生研究所 客員研究員
研究分担者 小川 久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長

トウゲシバ(*Huperzia serrata*) (ヒゲノカズラ科)は、全草がセンソウトウの名称で、「医薬品的効能効果を標ぼうしない限り医薬品と判断しない成分本質(原材料)リスト」(非医薬品リスト)に掲載されており、認知・記憶機能の改善や記憶・学習能力の向上の目的で、トウゲシバエキス含有健康食品として広く流通している。また、中華人民共和国においては、蛇足石杉、千層塔の名称で民間薬として止血、解毒、消炎剤として用いられている。トウゲシバより単離・構造決定されたアルカロイド Huperzine A は、強力なアセチルコリンエステラーゼ阻害作用、さらに、NMDA 型グルタミン受容体拮抗作用が報告されており、アルツハイマー型認知症治療薬として期待が持たれ研究がすすめられていた。一方、マウスに対する比較的強い致死活性があることから、Huperzine A が含まれる健康食品を過剰摂取した際に健康被害を引き起こす可能性が考えられた。これまでに、トウゲシバから抽出した Huperzine A によって吐き気や発汗に至った事例が報告されており、イタリアでトウゲシバエキス含有ダイエット用ハーブとの因果関係が疑われる薬物誘発性肝障害と診断された事例も報告されている。現在、トウゲシバエキスおよび Huperzine 含有健康食品は広く流通しており、主にインターネット通販の手段を用いて容易に入手することが可能な状況となっている。そこで、市販のトウゲシバエキスおよび Huperzine 含有健康食品計 13 検体について UHPLC-PDA-MS を用いて Huperzine A の定性分析および定量分析を試みた。得られた定量結果と製品記載の摂取方法から、1 日あたりの Huperzine A 摂取量を算出した結果、一日の最大摂取量は 5 ~ 691 $\mu\text{g/day}$ の範囲に相当することが明らかになった。

研究協力者

新井玲子: 国立医薬品食品衛生研究所 非常勤職員

A. 研究目的

ヒゲノカズラ科植物であるトウゲシバ (*Huperzia serrata*) は、全草がセンソウトウの名称で、「医薬

品的効能効果を標ぼうしない限り医薬品と判断しない成分本質(原材料)リスト」(非医薬品リスト)に掲載されており、認知・記憶機能の改善や記憶・学習能力の向上の目的で、トウゲシバエキス含有健康食品として広く流通している [1]。また、中華人民共和国においては、蛇足石杉、千層塔の名称で民間薬として止血、解毒、消炎剤として用い

られている [2]。

Huperzine A は *H. serrata* より 1986 年に上海薬物研究所の Liu らによって単離・構造決定されたアルカロイドであり [3]、強力なアセチルコリンエステラーゼ阻害作用を有している。さらに、NMDA 型グルタミン受容体拮抗作用が示され [4]、アルツハイマー型認知症治療薬として期待が持たれ研究がすすめられていた [5]。一方、マウスに対する比較的強い致死活性があることから (LD₅₀: 経口 5.2 mg/kg、腹腔内投与 1.8 mg/kg、皮下投与 3 mg/kg) [6]、Huperzine A が含まれる健康食品を過剰摂取した際に健康被害を引き起こす可能性が考えられた。これまでに、トウゲシバによる有害事象の報告は見当たらないが、トウゲシバから抽出した Huperzine A によって吐き気や発汗に至った事例が報告されている [7]。また、イタリアでトウゲシバエキス含有ダイエット用ハーブ抽出物を数回使用したところ、黄疸や掻痒、微熱を伴う右上腹部痛、上腹部圧痛、吐き気、嘔吐、褐色尿、白色便などの症状を訴え、医療機関を受診するに至った。その結果、当該製品との因果関係が疑われる薬物誘発性肝障害と診断された事例も報告されている [8]。

現在、トウゲシバエキスおよび Huperzine 含有健康食品は広く流通しており、主にインターネット通販の手段を用いて容易に入手することが可能な状況となっている。そこで、市販のトウゲシバエキスおよび Huperzine 含有健康食品についてその安全性を確認するため UHPLC-PDA-MS を用いて定性分析を行うとともに、Huperzine A の定量分析を試みた。

B. 研究方法

【実験材料】

試薬:Huperzine A は和光純薬工業より購入した。トウゲシバエキスまたは Huperzine 含有健康食品 (13 種、Table 1): インターネットで市販されているものを入手し使用した。

【試料及び調製法】

標準溶液の調製

Huperzine A 1.0 mg を MeOH 1.0 ml に溶解し、標準原液とした。この原液を MeOH で希釈 (1→10、1→20、1→40、1→100、1→200、1→500、1→1000) し、それぞれ 100、50、25、10、5、2、1 µg/ml 溶液とした。

試料溶液の調製

市販のトウゲシバエキスおよび Huperzine (トウゲシバ抽出物) 含有健康食品 (計 13 種、Table 1) を検体として分析を行った。形態がハードカプセルとして市販されているものはカプセル内粉末をそのまま使用し、ソフトカプセルのものは抽出容器内でカプセルを裁断し抽出を行った。また、タブレット上の検体については 5錠を秤量し 1錠あたりの平均重量を算出した後ミキサーミル MM400 (Verder Scientific 社製) にて粉碎し (20 Hz、30 sec)、得られた粉末試料を用いて抽出を行った。製品に記載されている各検体の 1日あたりの最低使用量を (Table 1) MeOH 2.0 mL に懸濁し、超音波処理 (10 min) の後遠心分離した (1500 ×g、10 min)。上清をメンブランフィルター (0.45 µm) にて濾過し、試料原液とした。この原液を MeOH で希釈 (1→10) し、試料溶液として UHPLC-PDA-MS 定性分析および定量分析条件に附した。

【分析条件】

[UHPLC-PDA-MS] 装置: UltiMate 3000 RS LC system 及び Q Exactive Quadrupole-Orbitrap ハイブリッド型質量分析計 (Thermo Fisher Scientific 社製)、カラム: ACQUITY UPLC HSS T3 column (100×2.1 mm、particle size 1.8 µm、Waters 社製)

HPLC 条件

移動相:A: 0.1% ギ酸水溶液、B: 0.1% ギ酸-メタノール、サンプル注入量 2 µL

グラジエント条件: 5%B to 10%B (0-12 min), to 95%B (12-15 min, 3 min hold), 流速 0.4 mL/min, カラム温度 40 °C

PDA: DAD-3000 ダイオードアレイ検出器を使用し、198-600 nm の範囲で検出を行った。

質量分析条件 イオン化: エレクトロスプレーイオ

ン化 (ESI) 法、Positive and negative mode、Capillary temperature: 320 °C、Vaporizer temperature: 300 °C、Desolvation gas: helium、Splay voltage: 4.0 KV、Cone voltage: 35.0 V、Normalized collision energy: 30.0 V、mass spectral range: m/z 150-2000。キャリブレーション: LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution 及び ESI Negative Ion Calibration Solution (何れも Pierce 社製)を使用した。

C. 研究結果

検量線の作成

標準原液を MeOH で希釈し、1 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ の検量線用標準試料溶液を調製した。この溶液について UHPLC-PDA-MS 測定を行い、PDA を用いて UV 310 nm におけるクロマトグラムについて Huperzine A のピーク面積を測定した。絶対検量線法により Huperzine A の検量線を作成し、 $R^2 > 0.999$ となった 1 ~ 25 $\mu\text{g/mL}$ を測定範囲と設定した (Fig. 1)。

トウゲシバエキスまたは Huperzine 含有健康食品を検体とした Huperzine A の定量分析

定性分析として、トウゲシバエキスまたは Huperzine 含有健康食品 13 種の UHPLC-PDA-MS のクロマトグラムを確認した。このうち 12 サンプルより Huperzine A が検出された (Fig. 2)。サンプルに含まれる Huperzine A は、標品との直接比較を行い、両者の保持時間、UV スペクトルおよび ESI(+)-MS スペクトルの一致により同定した (UV: Fig. 3; MS: Fig. 4)。

定量分析においては、UV 310 nm でのクロマトグラムにおいてピーク分離は十分であったので、このクロマトグラムを用いてピーク面積を算出し定量分析を行った。得られた定量結果と製品記載の摂取方法から 1 日あたりの Huperzine A 摂取量を算出した結果、一日の最大摂取量は 5 ~ 691 $\mu\text{g/day}$ の範囲に相当することが明らかになった (Table 2)。

D. 考察

Huperzine A は、中華人民共和国薬典には Huperzine A (石杉碱甲)、そのタブレット (石杉碱甲片)、注射液 (石杉碱甲注射液)、カプセル (石杉碱甲胶囊) が収載されており、その用法においては第五批化学药品说明书 (第 5 版化学薬品説明書) に Huperzine A の一日摂取量が 450 μg を超えてはいけない、と定められている [9]。今回の分析に供した検体の中では、Huperzine A の一日最大摂取量が中華人民共和国薬典において設定されている上限値を上回るものが 1 検体存在した (検体 8, Table 2)。日本国内に流通している健康食品は、①トウゲシバエキスを含むもの (検体 1~5、7、12~13)、②植物から抽出された Huperzine A を含むもの (検体 6、8-11) に大別される。その中では、②植物抽出物の Huperzine A を含むものに Huperzine A は多く含まれていた。

E. 結論

今回の分析に供したサンプルの中では、その製品の一日当たりの最大摂取量に従った摂取により、上記の中華人民共和国薬典収載の一日摂取量の上限値を上回るものが 1 検体存在した (690 $\mu\text{g/day}$)。また、今回分析に供したものの以外にも多くのトウゲシバエキスおよび Huperzine A 含有健康食品は現在流通している。従って、今後さらにサンプルを増やし、定量分析を行う必要があるものと考えられる。

F. 研究発表

1. 学会発表

辻本 恭、小関良宏、袴塚高志、内山奈穂子: トウゲシバエキス含有健康食品中に含まれる Huperzine A の分析. 日本食品化学学会 第 26 総会・学術大会 (2020 年 8 月. 誌上開催)

2. 誌上発表

該当無し

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し

H. 参考文献

- [1] 医薬品的効能効果を標ぼうしない限り医薬品と判断しない成分本質(原材料)リスト <https://www.mhlw.go.jp/content/000658256.pdf> (Accessed, March, 2021)
- [2] 中华人民共和国药典 2015 年版 第二部、163.
- [3] Liu, J.-S.; Zhu, Y.-L.; Yu, C.-M.; Zhou, Y.-Z.; Han, Y.-Y.; Wu, F.-W.; Qi, B.-F. The Structures of Huperzine A and B, Two New Alkaloids Exhibiting Marked Anticholinesterase Activity. *Can J. Chem.* 1986, 64, 837-839.
- [4] Zhang, J.-M.; Hu, G.-Y. Huperzine A, a nootropic alkaloid, inhibits N-methyl-D-aspartate-induced current in rat dissociated hippocampal neurons. *Neuroscience*, 2001, 105, 113-119.
- [5] Yang, G.; Wang, Y.; Tian, J.; Liu, J.-P. Huperzine A for Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *PLoS One*, 2013, 8, e74916.
- [6] Yan, X.-F.; Lu, W.-H.; Lou, W.-J.; Tang, X.-C. Effects of huperzine A and B on skeletal muscle and the electroencephalogram. *Acta Pharmacol. Sin.* 1987, 8, 117-123.
- [7] Zhang, R. W.; Tang, X. C.; Han, Y. Y.; Sang, G. W.; Zhang, Y. D.; Ma, Y. X.; Zhang, C. L.; Yang, R. M. Drug evaluation of huperzine A in the treatment of senile memory disorders. *Acta Pharmacol. Sin.* 1991, 12, 250-252.
- [8] Tarantino, G.; Pezzullo, M. G.; di Minno, M. N. D.; Milone, F.; Pezzullo, L. S.; Milone, M.; Capone, D. Drug-induced liver injury due to "natural products" used for weight loss: a case

report. *World J Gastroenterol.* 2009, 15, 2414-2417.

- [9] 石杉碱甲胶囊说明书; 第五批化学药品说明书
<https://www.nmpa.gov.cn/wwwroot/hy5/078.htm> (Accessed, April, 2021)

Table 1 本研究に用いたトウゲシバエキスおよび Huperzine 含有健康食品

表示						
No.	原材料名	内容量	1 粒あたりの量	用量	トウゲシバエキス量	Huperzine A として
1	マルトデキストリン、トウエシバエキス	ハードカプセル 5.58 g (1 粒 186 mg)	186 mg (140 mg)	1 粒/日	10 mg	100 µg
2	DHA 含有精製魚油、ウコンエキス末、食物繊維 (難消化性デキストリン)、スクワレン、秋ウコン粉末、シダ抽出物、黒コショウ抽出物 / ゼラチン、ビタミン C、グリセリン、ビタミン E、ビタミン B6、ミツロウ、グリセリン脂肪酸エステル、ビタミン B2、カカオ色素、植物レシチン(大豆由来)、ビタミン B1、ビタミン B12	ソフトカプセル 32.4 g (60 粒 x 540 mg)	540 mg	2 粒/日		13 µg
3	大豆レシチン(ホスファチジルコリン含有)、DHA・EPA 含有精製魚油、ゴツコラエキス、イチョウ葉エキス、ビタミン E、トウゲシバエキス、葉酸、ビタミン B12、ゼラチン、乳化剤、グリセリン	ソフトカプセル 90 カプセル x 250 mg	250 mg	3 粒 / 日	60 mg (3 カプセル)、製品に記載なし	
4	DHA・EPA 含有精製魚油、ゴツコラエキス末、シダ抽出物、イチョウ葉エキス末/ゼラチン、レシチン(大豆由来)、V-E、ミツロウ、乳化剤、カラメル色素、葉酸、V-B12	ソフトカプセル	390 mg (250 mg)	2-4 粒/日	20 mg	
5	DHA・EPA 含有精製魚油、ゴツコラエキス末、シダ抽出物、イチョウ葉エキス末/ゼラチン、レシチン(大豆由来)、V-E、ミツロウ、乳化剤、カラメル色素、葉酸、V-B12	ソフトカプセル 120 粒 x 380 mg	380 mg (250 mg)	2-4粒/日	20 mg	
6	Vitamin B12, Huperzine A (club moss extracts), alpha GPC, Phosphatidyl Serine	(ハードカプセル) 60 veg capsules		2 粒 / 日		200 µg
7	Vitamin D, Vitamin B12, Fish oil, KSM-66 (Ashwagandha extract), Gwinkgo extract, Gotu Koda extract, Ac-L-Carnitine, Phosphatidylserine, Asian Ginseng extract, Rhodiola (Rhodiola Rosea) extract, Toothed clubmoss extract (1% Huperzine-A), BioPerine complex (Black pepper extract, Ginger extract)	(ソフトカプセル) 60 liquid soft gels		2 粒 / 日	0.5 mg	
8	Huperzine A (from toothed clubmoss extract [whole herb])	(ハードカプセル) 60 veg capsules		1~4 カプセル / 日		200 µg
9	Huperzine A	(錠剤) 120 tablets	400 mg	4> tablet / day		200 µg
10	Huperzine A (from Huperzia Serrata)	(錠剤) 30 tablets		1 tablet / day		50 µg
11	Huperzine A (from Huperzia serrata whole plant extract)	(錠剤) 120 tablets		1 tablet / daily.		200 µg
12	イチョウエキス(イチョウ) 60 mg, RoseOx(標準ローズマリー葉エキス) 25 mg, ホスファチジルセリン 15 mg, フェルジン複合体 (Huperzia serrata) (モス) 25mg, L-グルタミン(フリーフォーム) 125 mg, Gotu Kola (Centella asiatica) (4:1 抽出物) (リーフ) 125 mg, コリン(酒石酸コリンから) 50 mg	120 ベジカプセル		1~2 カプセル / 日		25 µg
13	ギンコビローバエキス 60 mg (フラボングリコンド 24% 以上、ギンコライド 6%) (葉), RoseOx 25 mg (ローズマリー葉標準化エキス) (カルバシジン酸 6% 以上), ホスファチジルセリン 15 mg (大豆由来), ヒューベルジン A 25 mg (フリーフォーム) (コケ), L-グルタミン 125 mg (フリーフォーム), ゴツコラ 125 mg (4倍濃縮エキス) (葉), コリン 50 mg (重酒石酸コリン)	60 ベジカプセル		1~2 カプセル / 日		25 µg

Table 2 トウゲシバエキスおよび Huperzine 含有健康食品中の Huperzine A の定量分析

No.	原材料名	内容量	表示			測定値				
			1粒あたりの量	用量(1日あたり)	トウゲシバエキス量	Huperzine A として	試料溶液中の量 (µg/ml)	1錠(カプセル)の量 (µg)	平均値 (µg)	最大摂取量 (µg/day)
1	マルトデキストリン、トウゲシバエキス	ハードカプセル 5.58 g (1粒 186 mg)	186 mg (140 mg)	1粒	10 mg	100 µg	3.76	75.13	76.63	76.63
							3.85	76.97		
							3.89	77.81		
2	DHA 含有精製魚油、ウコンエキス末、食物繊維 (難消化性デキストリン)、スクワレン、秋ウコン粉末、シダ抽出物、黒コショウ抽出物 / ゼラチン、ビタミン C、グリセリン、ビタミン E、ビタミン B6、ミツロウ、グリセリン脂肪酸エステル、ビタミン B2、カロチノイド色素、植物レシチン(大豆由来)、ビタミン B1、ビタミン B12	ソフトカプセル 32.4 g (60粒 × 540 mg)	540 mg	2粒		13 µg	0.26	5.18	5.90	11.80
							0.33	6.68		
							0.29	5.84		
3	大豆レシチン(ホスファチジルコリン含有)、DHA・EPA 含有精製魚油、ゴツコラエキス、イチョウ葉エキス、ビタミン E、トウゲシバエキス、葉酸、ビタミン B12、ゼラチン、乳化剤、グリセリン	ソフトカプセル 90粒 × 250 mg	250 mg	3粒	60 mg (3粒)		0.13	2.67	2.61	7.83
							0.14	2.89		
							0.11	2.27		
4	DHA・EPA 含有精製魚油、ゴツコラエキス末、シダ抽出物、イチョウ葉エキス末/ゼラチン、レシチン(大豆由来)、V-E、ミツロウ、乳化剤、カラメル色素、葉酸、V-B12	ソフトカプセル	390 mg (250 mg)	2-4粒	20 mg		0.52	10.49	10.41	41.64
							0.52	10.45		
							0.51	10.30		
5	DHA・EPA 含有精製魚油、ゴツコラエキス末、シダ抽出物、イチョウ葉エキス末/ゼラチン、レシチン(大豆由来)、V-E、ミツロウ、乳化剤、カラメル色素、葉酸、V-B12	ソフトカプセル 120 × 380 mg	380 mg (250 mg)	2-4粒	20 mg		0.52	10.31	10.45	41.80
							0.53	10.63		
							0.52	10.41		
6	Vitamin B12, Huperzine A (club moss extracts), alpha GPC, Phosphatidyl Serine	(ハードカプセル) 60 veg capsules		2粒		200 µg	5.24	104.82	105.91	211.82
							5.63	112.63		
							5.01	100.28		
7	Vitamin D, Vitamin B12, Fish oil, KSM-66 (Ashwagandha extract), Gwinko extract, Gotu Koda extract, Ac-L-Carnitine, Phosphatidylserine, Asian Ginseng extract, Rhodiola (Rhodiola Rosea) extract, Toothed clubmoss extract (1% Huperzine-A), BioPerine complex (Black pepper extract, Ginger extract)	(ソフトカプセル) 60 liquid soft gels		2粒	0.5 mg		ND	ND	ND	ND
							ND	ND		
							ND	ND		
8	Huperzine A (from toothed clubmoss extract [whole herb])	(ハードカプセル) 60 veg capsules		1~4 カプセル		200 µg	8.74	174.78	172.92	691.68
							8.67	173.38		
							8.53	170.60		
9	Huperzine A	(錠剤) 120 tablets	400 mg	4> tablet		200 µg	2.68	53.62	52.96	211.83
							2.63	52.52		
							2.64	52.73		
10	Huperzine A (from Huperzia Serrata)	(錠剤) 30 tablets		1 tablet		50 µg	2.63	52.66	52.36	52.36
							2.63	52.69		
							2.59	51.74		
11	Huperzine A (from Huperzia serrata whole plant extract)	(錠剤) 120 tablets		1 tablet		200 µg	10.69	213.87	219.65	219.65
							11.20	224.03		
							11.05	221.05		
12	イチョウエキス(イチョウ) 60 mg, RoseOx(標準ローズマリー葉エキス) 25 mg, ホスファチジルセリン 15 mg, フェルジン複合体 (Huperzia serrata) (モス) 25µg, レグルタミン(フリーフォーム) 125 mg, Gotu Kola (Centella asiatica) (4:1 抽出物) (リーフ) 125 mg, コリン(酒石酸コリンから) 50 mg	120 ベジカプセル		1-2 カプセル		25 µg	0.12	2.50	2.63	5.26
							0.15	3.01		
							0.12	2.39		
13	ギンコピローバエキス 60 mg (フラボングリコンド 24% 以上、ギンコライド 6%) (葉), RoseOx 25 mg (ローズマリー葉標準化エキス) (カルシン酸 6% 以上), ホスファチジルセリン 15 mg (大豆由来), ヒューベルジン A 25 µg トウゲシバ(コケ), レグルタミン 125 mg (フリーフォーム), ゴツコラ 125 mg (4倍濃縮エキス) (葉), コリン 50 mg (重酒石酸コリン)	60 ベジカプセル		1-2 カプセル		25 µg	0.13	2.65	2.78	5.55
							0.17	3.47		
							0.11	2.20		

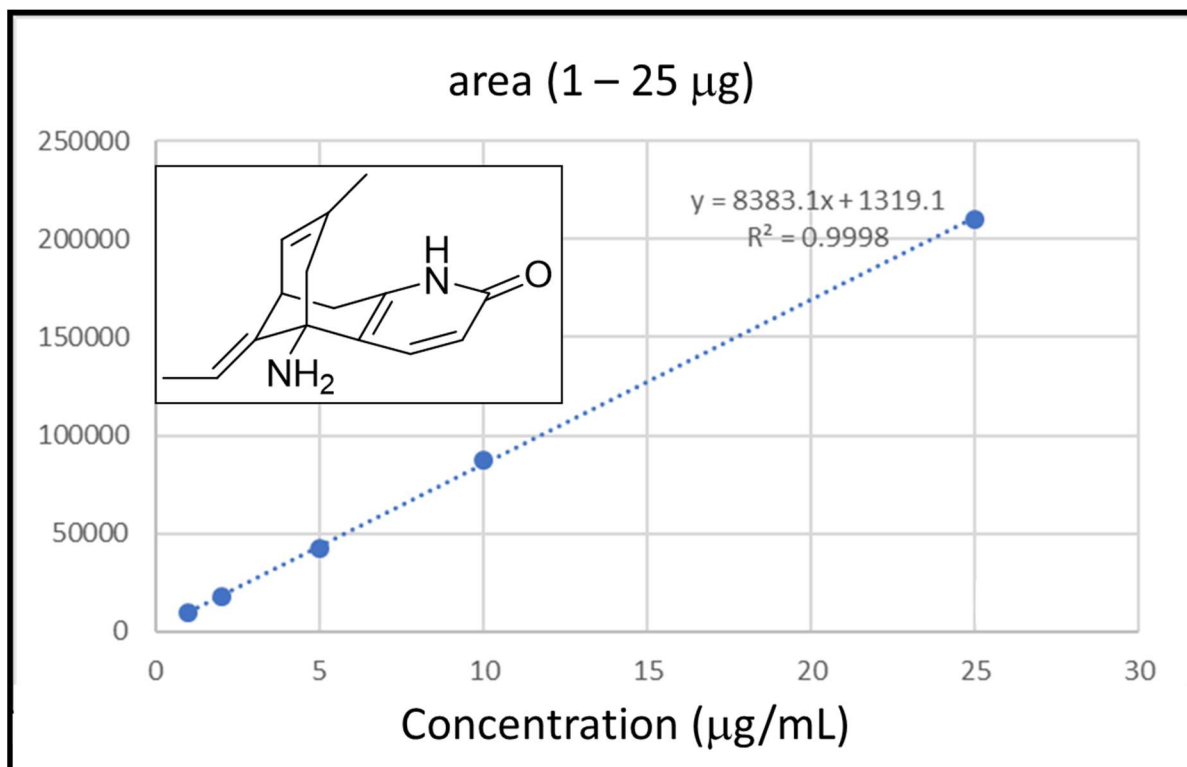


Fig. 1 Huperzine A の検量線

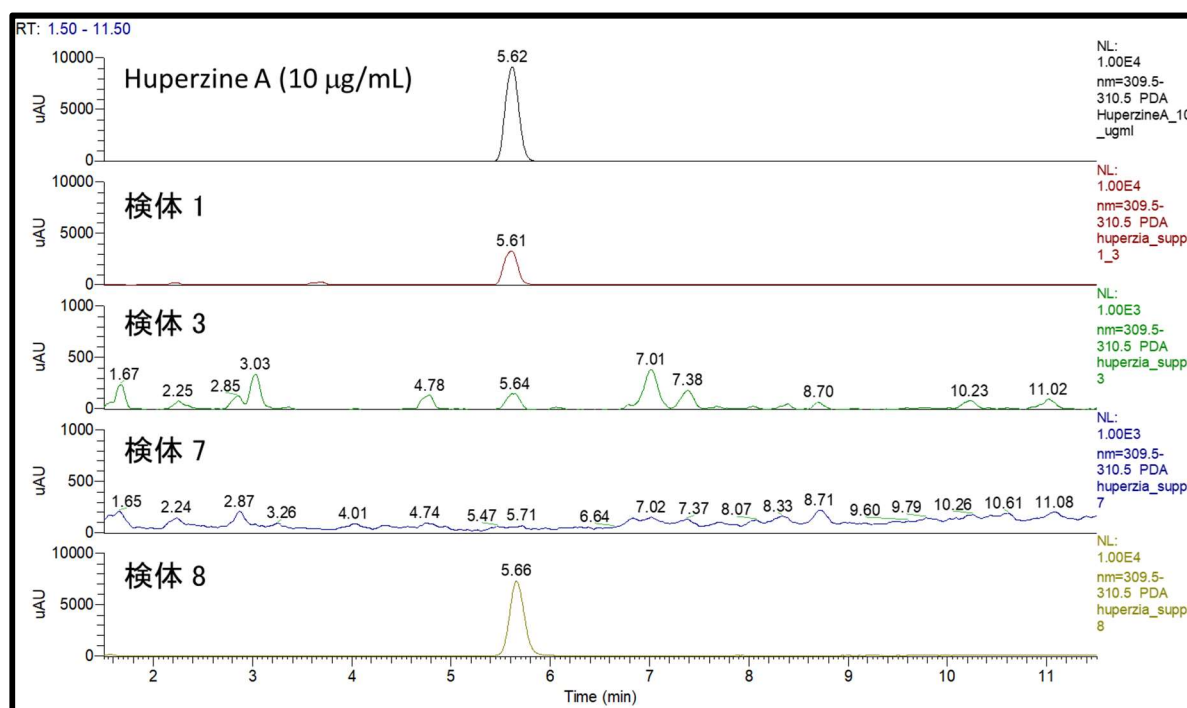


Fig. 2 Huperzine A および検体 1, 3, 7, 8 の UHPLC-UV クロマトグラム (310 nm)

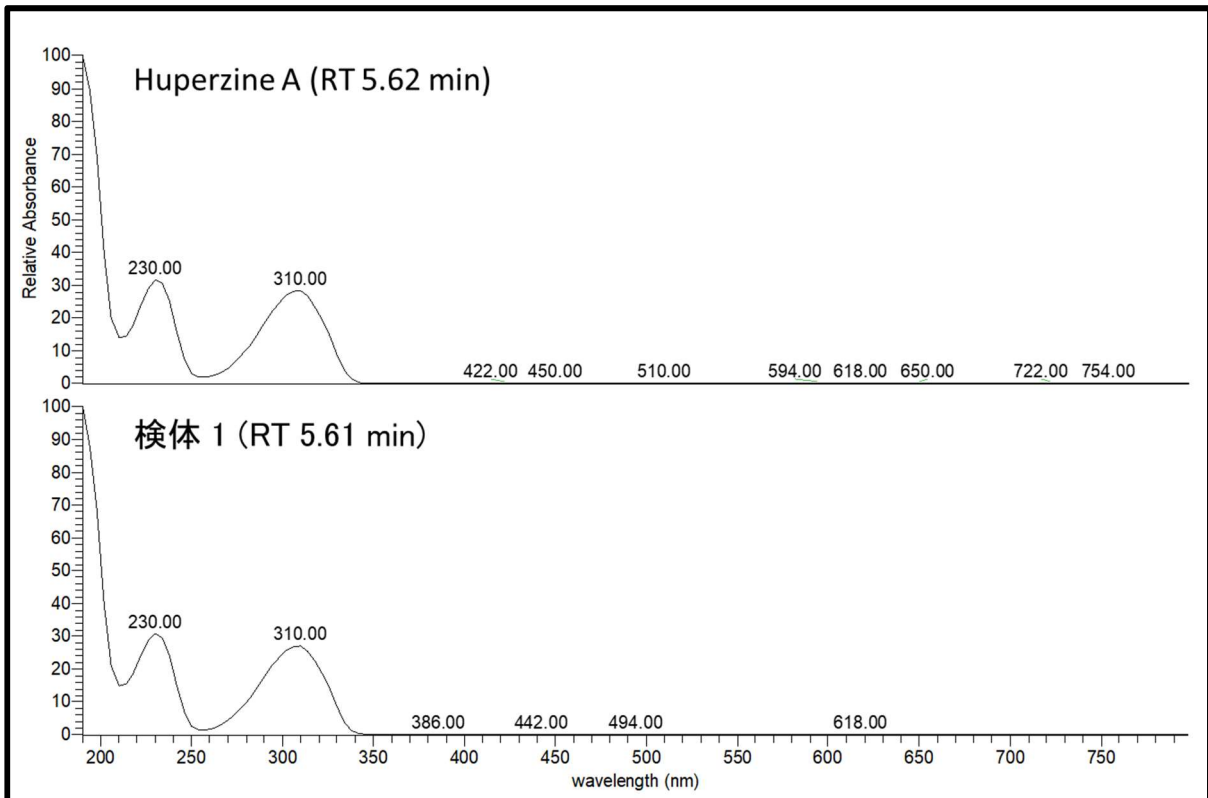


Fig. 3 Huperzine A と検体 1 の UV スペクトル

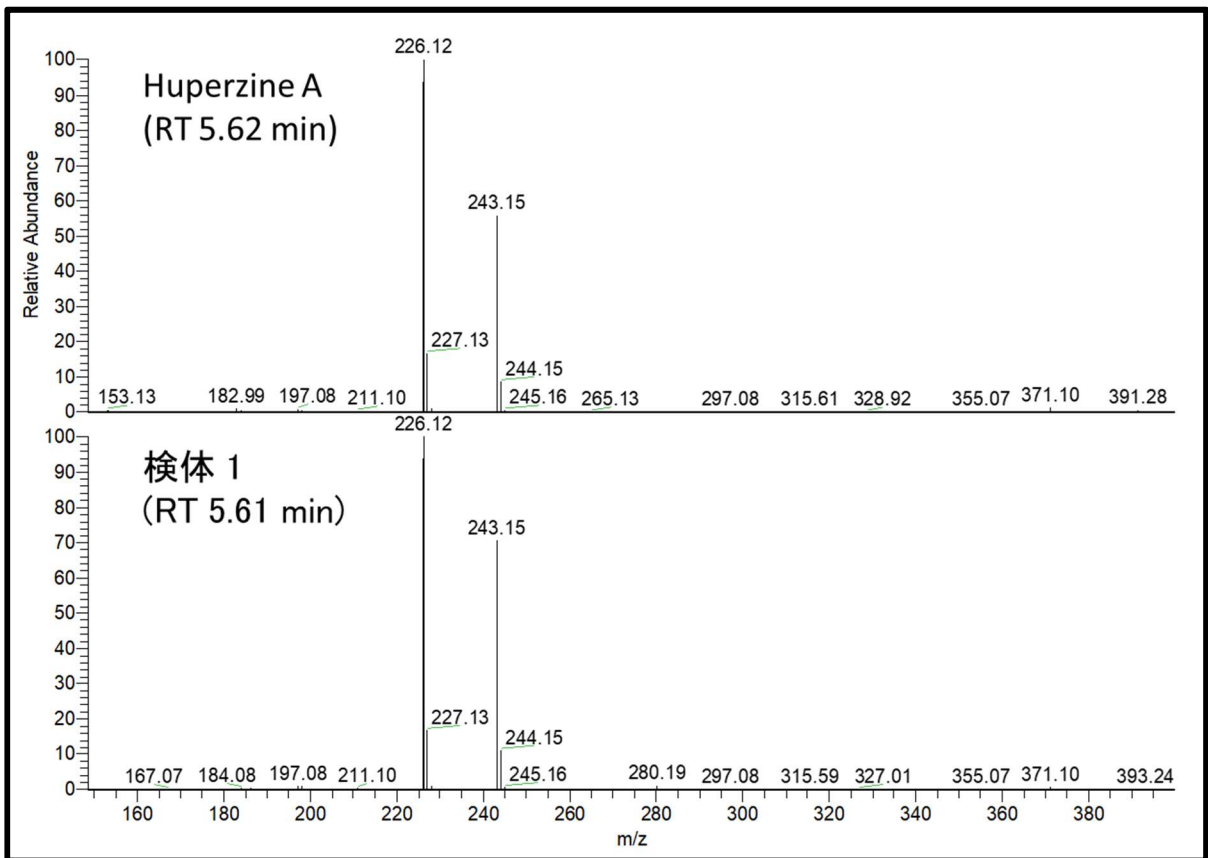


Fig. 4 Huperzine A と検体 1 の ESI(+)-MS スペクトル