

研究要旨

既存添加物「キハダ抽出物」は、成分組成及び規格試験に関する具体的な情報が得られない、公的な成分規格の設定が困難な品目の一つである。今回、「キハダ抽出物」として流通が確認できたオウバクエキス製品が入手できたので、UPLC/PDA/MS 及び NMR により成分分析を行った。UPLC/PDA/MS 分析の結果、本製品にはベルベリン、パルマチン、ジャトリジン、フェロドンドリン、マグノフロリン、3-フェルロイルキナ酸及び 5-フェルロイルキナ酸の存在が示唆された。また、¹H-qNMR により、ベルベリン含量は 2.83%と算出された。今回得られた成分情報、日本薬局方の「オウバク」の成分規格を参考に「キハダ抽出物」の成分規格案の作成が可能と思われる。ただし、現在のところ、「キハダ抽出物」としては 1 製品しか流通が確認されておらず、製品間に成分組成に差がないか検討できていない。また、本製品はベルベリンを含有することから、食薬区分についても考慮しながら、成分規格案の作成を検討する必要があると考えられた。

研究協力者

中島 馨 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部

A. 研究目的

既存添加物名簿収載品目リストに記載されている「キハダ抽出物」は、キハダ (*Phellodendron amurense* RIPR.) の樹皮より水またはエタノールで抽出して得られたもので、主成分はベルベリン (Fig. 1) であり、苦味料として使用される既存添加物である¹⁾。既存添加物には、流通又は使用実態が明らかでないものがある。このような既存添加物は定期的の実態調査を行い、その販売、製造、輸入、加工、使用、貯蔵及び陳列の状況からみて、現に販売の用に供されていないと認める既存添加物並びにこれを含む製剤及び食品について、「消除予定添加物名簿(当該添加物の名称を記

載した表)」を作成の上公示し、必要な手続きを経て既存添加物名簿から削除できるとされている。これまでに上記に該当する既存添加物の消除手続きが合計 4 回行われてきたが、「キハダ抽出物」は第 4 次消除品目調査において、流通が確認され消除復活となった品目の一つである。「キハダ抽出物」製品の流通が確認されたが、製品の成分組成、規格試験に関する明確な情報が得られないため、未だに公的な成分規格が設定できない品目となっている。そこで本研究では、入手できた「キハダ抽出物」製品について、含有成分を詳しく調べると共に、キハダ(生薬名：オウバク)の主成分とされているベルベリンの定量法を検討した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

「キハダ抽出物」製品として、市場に流通しているオウバクエキス(当部管理番号 C2221)

を用いた。

ベルベリン(berberine)は和光純薬工業製のベルベリン塩化物水和物(型番 10117787)を用いた。qNMR用認証標準物質には、富士フィルム和光純薬工業製の 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate- d_6 sodium salt(DSS- d_6 , 型番 040-31671, Lot. APL6177, 認証純度値 92.4%)を用いた。重ジメチルスルホキシド(DMSO- d_6)は関東化学社製(型番 11560-23)を用いた。その他の試薬は、特級または高速液体クロマトグラフ用を用いた。

B-2) 装置

UPLC/MS: Acquity UPLC Solvent Manager /PDA Detector/SQ Detector (Waters Corporation, Massachusetts, U.S.A.)

核磁気共鳴装置(NMR): ECZ600 (プロトン共鳴周波数 600 MHz)(日本電子, 東京, 日本)

天秤: ウルトラミクロ天秤 XP2U (Mettler Toledo International Inc., Columbus, OH, U.S.A.)

電動ピペット: Multipette Xstream (Eppendorf, Hamburg, Germany)

B-3) 測定条件

B-3-1) UPLC/PDA/MS 測定条件²⁾

カラム, ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm×100 mm, 粒子径 1.7 μ m, Waters); カラム温度, 40°C; 移動相 A, 0.1%ギ酸水; 移動相 B, 0.1%ギ酸アセトニトリル; 0-8 min B10-50%, 8-10 min B10%; 注入量, 2 μ L; 流速, 0.2 mL/min; PDA 測定波長, 190-500 nm; イオン化モード, ES (pos./neg.); キャピラリー電圧, pos. 3.5 kV, neg. 2.5 kV; コーン電圧, 30 V; 脱溶媒ガス流量, 600 L/hr; コーンガス流量, 50 L/hr; 脱溶媒ガス温度, 350°C; ソース温度, 135°C; スキャン範囲, m/z 50-600.

B-3-2) ^1H -qNMR 測定条件

照射中心, 5 ppm; 観測幅, 20 ppm; フリップ角, 90°; 遅延時間, 60 秒; 積算回数, 254 回; ダミースキャン, 2 回以上; ^{13}C デカップリング, on; サンプル回転, no; 測定温度, 25°C.

なお, Alice for qNMR (日本電子, 東京, 日

本)を ^1H -qNMR の解析に用いた。

B-4) 「キハダ抽出物」製品の溶解性確認

「キハダ抽出物」製品を 10 mL バイアルに量り, 5 mg/mL となるように水, 水/メタノール (50/50) 混液, メタノールまたは DMSO を加え, 超音波下で溶解し, 状態を観察した。次いで, 2 mg/mL となるよう更に溶媒を加え, 状態を観察した。2 mg/mL 溶液は不溶部があったため, 静置して上清を希釈したものと, 攪拌した懸濁液を水/アセトニトリル (90/10) 混液で 0.1 mg/mL に希釈したものを調製した。これらの溶液を 3-i) の条件で分析した。

B-5) キハダ抽出物の ^1H -qNMR 測定

「キハダ抽出物」製品約 2 mg, DSS- d_6 約 1 mg を精密に量り, DMSO- d_6 2.0 mL を加えて溶解させたものを ^1H -qNMR 用試験液とした。この試験液 0.6 mL を NMR チューブに移し, 封管して 3-ii) に示す測定条件で ^1H -qNMR 測定に付した。

C. 結果及び考察

C-1) キハダ抽出物の溶解性

「キハダ抽出物」製品を水, 水/メタノール (50/50) 混液, メタノールまたは DMSO に溶解した。まず 5 mg/mL となるように溶媒を加え, 超音波下で溶解しようと試みたが, いずれの溶媒でも微細なゼリー状の溶け残りが生じた。さらに溶媒を加え 2 mg/mL としたが, 完全に溶けなかった (Fig. 2)。DMSO 溶液は他の溶液と比べ溶け残りが少なく, 透明度も高かった。日本薬局方³⁾に記載されているオウバクはキハダの樹皮であり, 確認試験に「本品の粉末に水を加えてかき混ぜるとき, 液は粘液のためゲル状を呈する」とある。「キハダ抽出物」製品を水などの溶媒に溶かした際に生じたゼリー状の溶け残りはこの粘液と思われた。粘液については, 水溶性の多糖類でラムノース, アラビノース, ガラクトース及びガラクトキロン酸で構成される分子量 2×10^6 ダルトン以上の物質との報告がある⁴⁾。

次に, ベルベリンの溶解性について調査し

たところ、DMSOによく溶け、次いでメタノール、エタノールに溶け、水にはほとんど溶けない⁵⁾とのことであり、¹H-qNMR測定時の溶媒としてDMSO-*d*₆が妥当であると判断した。

C-2) 「キハダ抽出物」製品のUPLC/PDA/MS

C-1)で調製した各溶液の上清と懸濁液を希釈したものをUPLC/PDA/MSに付し比較した(Fig. 3)。溶媒の違い及び上清と懸濁液との間には、ピークが検出されない・面積や高さが大きく変化する等の違いはなかった。よって、「キハダ抽出物」製品中のクロマトグラムで確認できる成分は十分に溶解していると判断した。

Fig. 3に各溶液のクロマトグラムを示した。ベルベリンとパルマチンのUVスペクトルから両化合物の λ_{\max} が222 nmであると確認できたため(Fig. 4)、検出波長をUV 222 nmに設定し、各溶液のベルベリンとパルマチンのピーク面積及びピーク面積比を求めた(Table 1)。その結果、各溶液のベルベリンとパルマチンのピーク面積比は、パルマチンを1としたときベルベリンが6.3~6.9(平均6.5, RSD 3.03%)であった。各溶液のベルベリンとパルマチンのピーク面積比に差違が観察されなかったことから、1)で調製した各溶液中の「キハダ抽出物」製品の濃度では、溶媒により含有成分の溶解性の差はほぼないと判断した。

日本薬局方³⁾において、オウバク中のベルベリンの含有量を定量する際、HPLCクロマトグラムでベルベリンとパルマチンの分離の確認を行っている。「キハダ抽出物」製品にもオウバク同様、パルマチンが含まれており、ベルベリンの直前にパルマチン(m/z 352)のピークが観察された⁶⁾。また、「キハダ抽出物」製品のLCクロマトグラム上のベルベリン及びパルマチン以外のピークは、MSスペクトルより、ジャトリジン(m/z 338)、フェロデンドリン(m/z 342)、マグノフロリン(m/z 342)、3-フェルロイルキナ酸(m/z 368)、5-フェルロイルキナ酸(m/z 368)と推定された(Fig. 5)。一方、オウバクの成分とされているオウバクノン及びリモニン⁶⁾は確認できなかった。

C-3) ¹H-qNMRを用いた「キハダ抽出物」製品中のベルベリンの定量

「キハダ抽出物」製品をDMSO-*d*₆に溶解し、¹H-qNMR測定に付し、製品中のベルベリンの含量を求めた(Fig. 6)。 δ 0 ppm付近のDSS-*d*₆のシグナル(9H)を基準とし、 δ 6.170 ppm (-OCH₂O-, 2H)^{7, 8)}のベルベリンのシグナルの定量用とした。その結果、「キハダ抽出物」製品中のベルベリン含有量は2.83%と算出された。¹H-qNMRスペクトル上には、 δ 7.5~10 ppmにベルベリンのシグナルが確認されたが、Fig. 5のクロマトグラムから類似構造のパルマチン等の存在が示唆され、これらのシグナルがベルベリンと重なっている可能性があるため定量には用いなかった。また δ 3.5 ppm付近の大きなシグナルは、多糖類のものと推定される。なお、¹H-qNMR測定後、NMR試験管内に析出が観察されたことから、測定溶媒の選定は更に検討する余地があると考えられた。

D. 結論

「キハダ抽出物」製品について、UPLC/PDA/MSより分析した結果、ベルベリン、パルマチン、ジャトリジン、フェロデンドリン、マグノフロリン、3-フェルロイルキナ酸及び5-フェルロイルキナ酸の存在が示唆された。また、¹H-qNMRにより、「キハダ抽出物」製品中のベルベリン含量は2.83%と算出された。含有成分の正確な定量法の確立には、日本薬局方等を参考に更に検討する必要がある。また、現在のところ、「キハダ抽出物」としては1製品しか流通が確認されておらず、製品間に成分組成に差違がないか検討できていない。更に、本製品はベルベリンを含有することから、食薬区分についても考慮しながら、成分規格の設定が必要と考えられる。

E. 文献

- 1) 既存添加物名簿収載品目リスト注解書
- 2) Mohan MC, Abhimannue A, Kumar P: Identification and Characterization of Berberine in *Tinospora cordifolia* by Liquid Chromatography Quadrupole Time of Flight

Mass Spectrometry (LC MS/MS Q-tof) and Evaluation of its anti Inflammatory Potential, *Pharmacogn J.* 2017; 9(3): 350-355 (doi:10.5530/pj.2017.3.59).

- 3) 第十八改正日本薬局方
- 4) 藤原剛：キハダ水溶性多糖類の構造について，奈良大学紀要．1980; 9 : 111-114
- 5) <https://lktlabs.com/product/berberine-chloride/>
- 6) <https://www.fukudaryu.co.jp/sozai2/oubakuHP.pdf>
- 7) Yu L-L, Li R-T, Ai Y-B, Liu W, Deng Z-S, Zou Z-M: Protoberberine Isoquinoline Alkaloids from *Arcangelisia gusanlung*, *Molecules* 2014; 19: 13332-13341 (doi:10.3390/molecules190913332).
- 8) 薬用植物総合情報データベース，独立行政法人医薬基盤研究所，http://mpdb.nibiohn.go.jp/mpdb-bin/get_image.cgi?table=nmr_data&column=spectrum_file&id=9&original=1

F. 研究発表

F-1) 学会発表

F-1-1) 学会等

- 1) 増本直子，中島馨，西崎雄三，石附京子，杉本直樹，佐藤恭子：クロロゲン酸類縁体の構造と相対モル感度の関係．日本食品化学学会第 28 回総会・学術大会(2022.5).
- 2) 田村夏希，高橋未来，西崎雄三，増本直子，杉本直樹，佐藤恭子，井之上浩一：DPPH Antioxidant assay の技能向上に関する基礎検討．日本食品化学学会第 28 回総会・学術大会(2022.5).
- 3) 加藤菜帆，西崎雄三，増本直子，石附京子，中島馨，大槻崇，松藤寛，杉本直樹，佐藤恭子：天然苦味料ニガヨモギ抽出物の成分規格作成を目的とした基礎的検討．日本食品化学学会第 28 回総会・学術大会(2022.5).
- 4) 西崎雄三，建部千絵，石附京子，増本直子，中島馨，吉田久美，杉本直樹，佐藤恭子：外部標準法定量 NMR(EC-qNMR)によるアントシアニンの純度測定．日本食品化学学会第 28 回総会・学術大会(2022.5).
- 5) 中島馨，増本直子，西崎雄三，石附京子，杉本直樹，佐藤恭子：りんごに含まれるクロロゲン酸類の相対モル感度を用いた定量法の確立．日本食品化学学会第 28 回総会・学術大会(2022.5).
- 6) 内山奈穂子，細江潤子，石附京子，杉本直樹，鈴木梓，浅野龍二，五十嵐靖，三浦亨，末松孝子，小松功典，日向野太郎，古川茶勲，嶋田典基，合田幸広：ブシモノエステルアルカロイドの相対モル感度(RMS)を用いた日本薬局方定量法の検討．日本生薬学会第 68 回年会(2022.9).
- 7) 阿部裕，山口未来，六鹿元雄，佐藤恭子，杉本直樹：電子レンジ調理食品用器具・容器包装の溶出試験条件の検討．第 8 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム(2022.9).
- 8) 西崎雄三，鳥海栄輔，中西資，石附京子，増本直子，杉本直樹：既存添加物：乾留抽出物製品の PAHs 定量分析法の開発と実態調査．第 59 回全国衛生化学技術協議会年会(2022.10).
- 9) 西崎雄三，石附京子，吉村弘伸，松熊伸也，朝倉克夫，末松孝子，杉本直樹：Q 値を指標にした外部標準法定量 NMR(EC-qNMR)の測定自動化とその定量精度について．第 61 回 NMR 討論会(2022.11).
- 10) 石附京子，西崎雄三，増本直子，杉本直樹，佐藤恭子：乾留抽出により得られる既存添加物の成分比較(木酢液・チャ乾留物・モウソウチク乾留物)．日本食品衛生学会第 118 回学術講演会(2022.11).
- 11) 中森洋紀，布目真梨，辻巖一郎，出水庸介，増本直子，杉本直樹，井之上浩一：デザイン SR-HPLC 法によるアナトー色素の定量評価の構築．日本食品衛生学会第 118 回学術講演会(2022.11).
- 12) 都築明日香，西崎雄三，増本直子，鈴木俊宏，兎川忠晴，杉本直樹：外部標準法定量 NMR (EC-qNMR)：試料間でレシーバーク

- インが異なるときの補正について. 第4回日本定量NMR研究会年会(2022.12).
- 13) 内山奈穂子, 清田浩平, 細江潤子, 小松功典, 杉本直樹, 石附京子, 小出達夫, 村林美香, 小林謙吾, 藤峰慶徳, 横瀬俊幸, 大藤克也, 清水仁, 長谷部隆, 浅井由美, 江奈英里, 菊池純子, 藤田和弘, 武藤仁美, 小浜亜以, 五島隆志, 安田万寿, 植田知彦, 合田幸広: ^{31}P -qNMR を利用した有機リン化合物ソフスブビルブシモノエステルアルカロイドの相対モル感度(RMS)を用いた日本薬局方定量法の検討. 第4回日本定量NMR研究会年会(2022.12).
 - 14) 伊藤遥菜, 永津明人, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹: 定量NMR (^1H -qNMR)を用いた生薬中の精油成分の定量~バニラおよびバニラ香料中の vanillin および ethylvanillin の定量~, 日本薬学会第143年会(2023.3).
 - 15) 二村佳音, 永津明人, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹: 定量NMR (^1H -qNMR)を用いた生薬中の精油成分の定量~ウイキョウおよび類似生薬中の anethole の定量~, 日本薬学会第143年会(2023.3).
 - 16) 天倉吉章, 内倉崇, 好村守生, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹: 既存添加物ヒマワリ種子抽出物の成分解析, 日本薬学会第143年会(2023.3).
 - 17) 杉本直樹: 医薬品, 食品分野等における定量NMRの実装とこれから. 定量NMRの標準化と実用化. 日本薬学会第143年会一般シンポジウム(2023.3).
 - 18) 渡辺麻衣子, 吉成知也, 西崎雄三, 増本直子, 多田敦子, 工藤由起子, 杉本直樹: 食品添加物の微生物限度試験における真菌数試験法の比較検討. 日本農芸化学会2023年度大会(2023.3).
 - 19) 吉成知也, 関根葵, 小林直樹, 西崎雄三, 杉本直樹, 工藤由起子, 渡辺麻衣子: MALDI-ToF MS を用いた既存添加物酵素の基原生物の同定手法に関する研究. 日本農芸化学会2023年度大会(2023.3).

F-1-2) シンポジウム等

- 1) 杉本直樹, 齋藤剛, 末松孝子: qNMRによる純度測定的一般要求事項に関するISO規格の概要. 第4回日本定量NMR研究会年会(2022.12).
- 2) 杉本直樹: 医薬品, 食品分野等における定量NMRの実装とこれから. 定量NMRの標準化と実用化. 日本薬学会第143年会一般シンポジウム(2023.3).

F-2) 論文発表

F-2-1) 論文等

- 1) Uchiyama N, Kiyota K, Hosoe J, Komatsu T, Sugimoto N, Ishizuki K, Koide T, Murabayashi M, Kobayashi K, Fujimine Y, Yokose T, Ofuji K, Shimizu H, Hasebe T, Asai Y, Ena E, Kikuchi J, Fujita K, Makino Y, Iwamoto Y, Miura T, Muto Y, Asakura K, Suematsu T, Muto H, Kohama A, Goto T, Yasuda M, Ueda T, Goda Y: Quantitative ^{31}P -NMR for purity determination of sofosbuvir and method validation. Chem. Pharm Bull., 2022; 70: 892-900.
- 2) Iwasaki D, Kanazawa M, Kawamoto F, Araho D, Murakami T, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N: A new single-reference quantitative method using liquid chromatography with relative molar sensitivity based on ^1H -qNMR for khellactone esters from Peucedanum japonicum root extract. Food Chem., 2022; Submitted.
- 3) Hirose S, Watanabe M, Tada A, Sugimoto N, Sato K, Hara-Kudo Y: Evaluation on suitability of culture broth and conditions for Escherichia coli growth and gas production test of food additives. Food Hyg. Saf. Sci., 2022; Submitted.
- 4) Yoshinari T, Sekine A, Kobayashi N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Hara-Kudo Y, Watanabe M: Determination of the biological origin of enzyme preparation by SDS-PAGE and peptide mass fingerprinting. Food Add. Contam. A., 2022; In preparation.

F-2-2) 総説等

- 1) 杉本直樹：既存添加物の化学的安全性確保.
食品衛生研究 2022; 72: 5.
- 2) 杉本直樹：食品添加物公定書 10 版は予定
通りの発刊へ. フードケミカル 2022; 9: 2-
5.
- 3) 杉本直樹：食品添加物の化学的安全性確保
とこれからの課題. FFI ジャーナル, 2022;
227: 343-346.

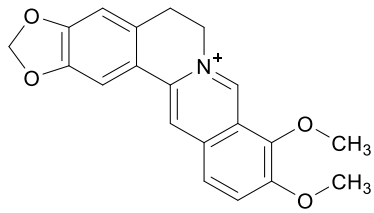


Fig. 1 ヱルベリンの構造

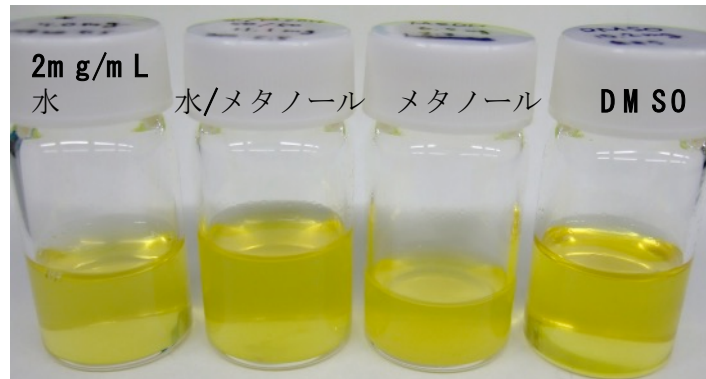


Fig. 2 「キハダ抽出物」製品の溶解性確認

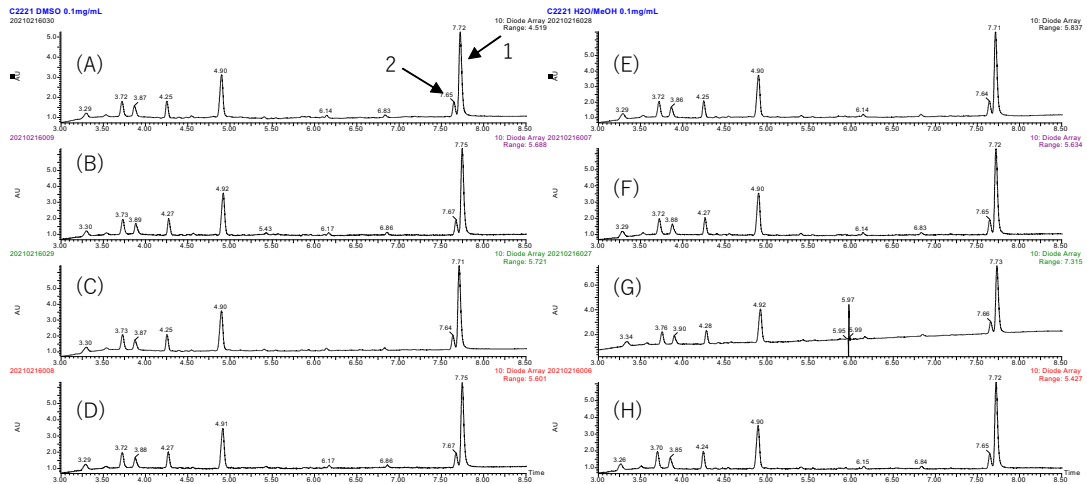


Fig. 3 「キハダ抽出物」製品の各溶媒による抽出液の懸濁液と上清を希釈した溶液の PDA クロマトグラム(190-500 nm)

A:キハダ抽出物/DMSO の懸濁液, B: キハダ抽出物/DMSO の上清, C: キハダ抽出物/メタノールの懸濁液, D: キハダ抽出物/メタノールの上清, E: キハダ抽出物/メタノール:水(1:1)の懸濁液, F: キハダ抽出物/メタノール:水(1:1)の上清, G: キハダ抽出物/水の懸濁液, H: キハダ抽出物/水の上清

1:ベルベリン, 2:パルマチン

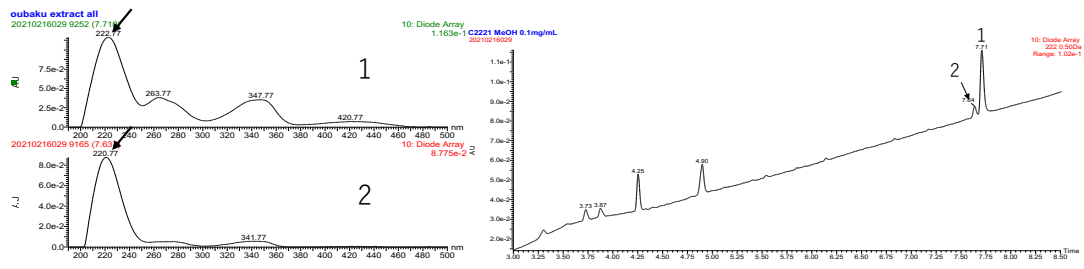


Fig. 4 「キハダ抽出物」製品のメタノール懸濁溶液中のベルベリン(1)とパルマチン(2)のUVスペクトル及びクロマトグラム(検出波長: 222 nm)

Table 1 「キハダ抽出物」製品から調整した各溶液中のベルベリンとパルマチンの
222 nm におけるピーク面積比

溶液	area 比	
	パルマチン	ベルベリン
DMSO 懸濁	1	6.61
DMSO 上清	1	6.62
メタノール懸濁	1	6.94
メタノール上清	1	6.40
メタノール:水(1:1)懸濁	1	6.31
メタノール:水(1:1)上清	1	6.59
水懸濁	1	6.43
水上清	1	6.41

C2221 MeOH 0.1mg/mL
20210216029

10: Diode Array
Range: 5.721

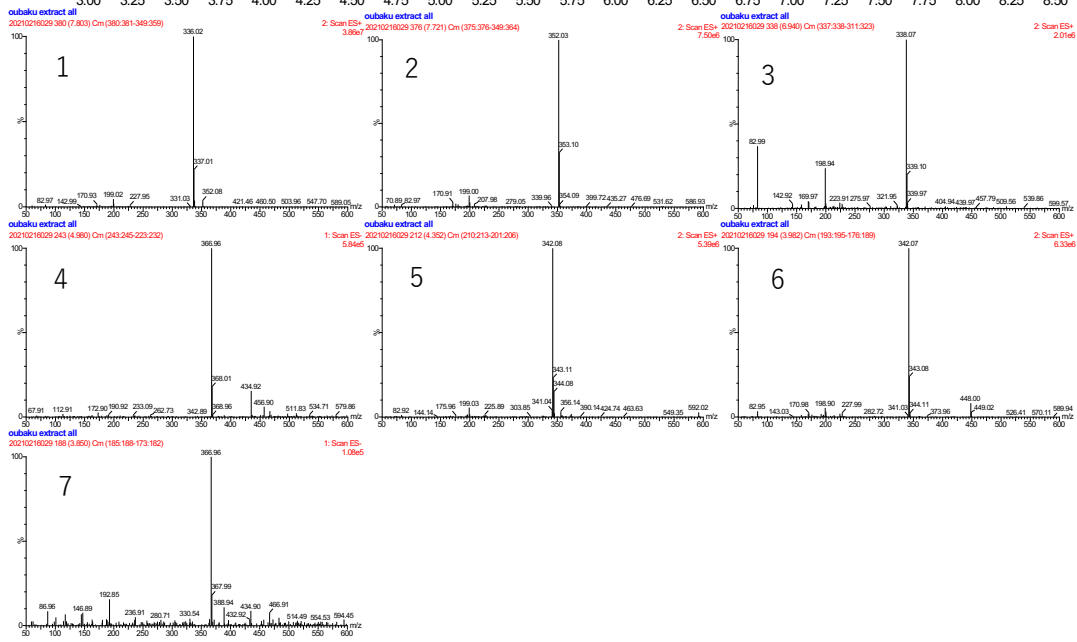
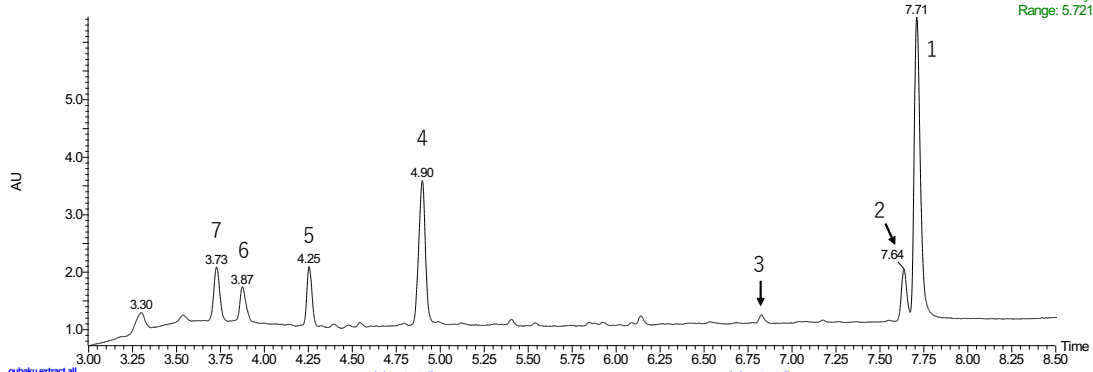


Fig. 5 「キハダ抽出物」製品のメタノール溶液のクロマトグラムと各ピークのMSスペクトル
1:ベルベリン, 2:パルマチン 3:ジャトリジン, 4:5-フェルロイルキナ酸, 5:マグノフロリン, 6:フェロデンドリン, 7:3-フェルロイルキナ酸

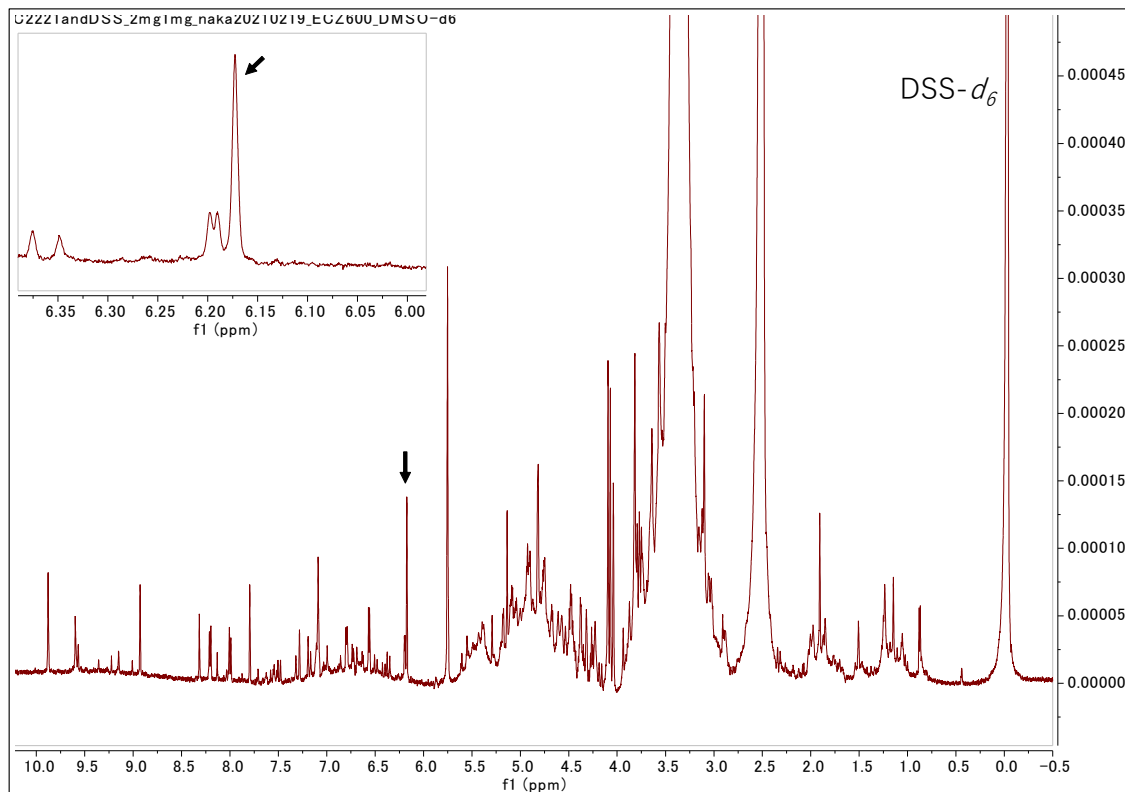


Fig. 6 キハダ抽出物の ^1H -qNMR チャート

↓:ベルベリン定量シグナル