

CM-Sephadex によるベルベリン型アルカロイドの定量

沢田徳之助, 山原 條二, 巖 千代江

京都薬科大学¹⁾

The Assay of Berberine-type Alkaloids by CM-Sephadex

TOKUNOSUKE SAWADA, JOHJI YAMAHARA and CHIYOE IWAO

Kyoto College of Pharmacy¹⁾

(Received September 7, 1971)

Berberine-type alkaloids were quantitatively adsorbed by the Sephadex ion exchanger and eluted with pyridine : AcOH : H₂O; 1 : 4 : 20.

The alkaloids could be determined directly in the eluate by ultraviolet spectrophotometry.

イオン交換樹脂による生薬中のアルカロイド定量法は 1956 年 Brochmann-Hanssen²⁾ がキナ皮およびホミカについての成績を発表している。またベルベリン型アルカロイドの定量に関してイオン交換樹脂を応用した報告³⁾⁴⁾ も行なわれているが、しかしこれをベルベリン型アルカロイド含有生薬である黄連、黄柏などに応用した品質評価という点については考察されていない。著者らはさきに微生物試験法によるベルベリン定量法⁵⁾ ならびに黄連および製剤中のベルベリン含量に関する考察を行ない⁶⁾、さらに黄連の抗菌作用⁷⁾ ならびに消炎作用⁸⁾ における生物試験について詳細な実験をし、それらの作用発現は従来考えられていた黄連即ちベルベリンだけでなくコプティシンのような他のベルベリン型アルカロイドを含めて活性のあることを報告した。したがって黄連の品質評価をする場合、総ベルベリン型アルカロイド含量の定量も問題とすべきであると考え、これらアルカロイド特にベルベリン、コプティシンの定量法について検討しイオン交換樹脂 Amberlite CG 50, CM-Sephadex, CM-Cellulose および Florisil を用いていずれも定量可能なことを見出した。ここにそのうち最も操作法の簡単である CM-Sephadex を用いての定量法について報告する。

実験方法および材料

カラム管は 3 cm×25 cm, CM-Sephadex C-25 は Pharmacia 社製のものを使用した。検体は水溶液あるいはメタノール溶液の場合は 5%メタノール溶液として用いた。Fig. 1 のようにカラム管に Sephadex 2.5 g を充填し、蒸留水で数回洗浄した後、検体溶液を吸着させ、流出液が透明になるまで蒸留水で Sephadex を洗浄し、ベルベリンのみの場合は 1N-NaOH でベルベリン、コプティシンおよび黄連、黄柏のメタノールエキスの場合は 1N-NaOH のみでは Sephadex から十分に脱離されないベルベリン型アルカロイドがあるためにピリジン：酢酸：水；1：4：20 の溶液をそれぞれ溶出液として用い、1N-NaOH で溶出した場合は 20% 塩酸で酸性として、後者の場合塩酸酸性とした場合と 420 mμ における吸光度は実験した範囲では変わらないので直にメスフラスコでいずれも 5 μg/ml～50 μg/ml の塩酸ベルベリン相当となるように蒸留水で調節し 420 mμ での吸光度から塩酸ベルベリンに換算した値を求めた。CM-Sephadex の再生は 1N-NaOH の場合は蒸留水で洗浄をくり返し流出液を酸性とし、ピリジン：酢

1) Location: Misasagi-Yamasina, Higashiyama-Ku, Kyoto, Japan.

2) E. Brochmann-Hanssen, J. Am. Pharm. Assoc., 45, 74 (1956).

3) 高橋幸太郎, 幸松紀夫, 清水利雄, 金沢大学紀要, 8, 5 (1958).

4) 渡辺兵蔵, 日化, 83, 51 (1962).

5) 沢田徳之助, 山原條二, 楊 瑞齡, 生薬, 24, 69 (1970).

6) 沢田徳之助, 山原條二, 楊 瑞齡, 生薬, 24, 73 (1970).

7) 沢田徳之助, 山原條二, 後藤勝実, 山村みどり, 生薬, 25, 74 (1971).

8) 藤村 一, 沢田徳之助, 後藤勝実, 薬誌, 90, 782 (1970).

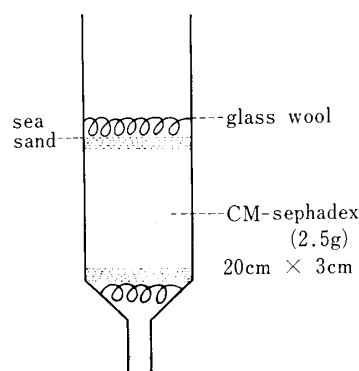


Fig. 1.

酸：水溶液の場合は 1 N-NaOH で一度洗浄した後前記同様に酸性とすれば少なくとも反復 3 回は使用出来る。検体は既報⁷⁾と同様のものを使用した。黄柏は長野，新潟，鳥取，愛媛および朝鮮産のを使用し，エキス調製法は既報⁷⁾に準じたがエーテルによる脱脂は局方試験法に準じた。また栽培黄連エキスは前報⁹⁾と同様のものを使用した。

実験結果

1) ベルベリンおよびコプティシン標準液の吸光度および回収率 TABLE I に各アルカロイド塩酸塩水溶液の吸光度および回収率を示した。CM-Sephadex に吸着後各々の溶出液で溶出した後の吸光度から回収率は 96.5%~100.4% であった。

TABLE I. Light Absorbancy of Alkaloids

	Before the elution	After the elution OD at 420 m μ	Recovery rate(%)
Berberine-HCl			
5 $\mu\text{g/ml}$	0.056	0.055	98.2
10	0.116	0.112	96.5
20	0.229	0.230	100.4
30	0.352	0.350	99.6
40	0.490	0.489	99.8
50	0.556	0.556	100.0
Coptisine-HCl			
5 $\mu\text{g/ml}$	0.049	0.048	97.9
10	0.097	0.098	101.0
20	0.156	0.155	99.4
30	0.290	0.290	100.0
40	0.392	0.392	100.0
50	0.460	0.461	100.2

average values of five determination

2) 1 N-NaOH 溶出液の吸光度におよぼす経時的変化 一般にベルベリンはアルカリ性溶液中では不安定であるといわれているので 1 N-NaOH で溶出後経時的に酸性として吸光度を求めた (Fig. 2)。

3) 黄連および黄柏エキスの総ベルベリン量 因州，丹波，越前，ビルマ，川，雲南，*C. teeta* およびツルゴカヨウ，また黄柏は長野，新潟，鳥取，愛媛および朝鮮産のものについてそれぞれ定量した。黄連は 1g を，黄柏は 5g を用いソックスレー抽出メタノール溶液をそのまま 5% メタノール溶液として測定し含量を求めた。

4) 栽培黄連の総ベルベリン量 丹波黄連の畑栽培 28 カ月~70 カ月までのもの，および武田薬品京都農園産の 28 カ月~64 カ月までの乾燥メタノールエキス 10 mg 中の含量を求めた。栽培黄連の個体重量，個体エキス収量などに

9) 沢田徳之助，山原條二，大橋宣子，土橋裕子，生薬，26, 12 (1972)。

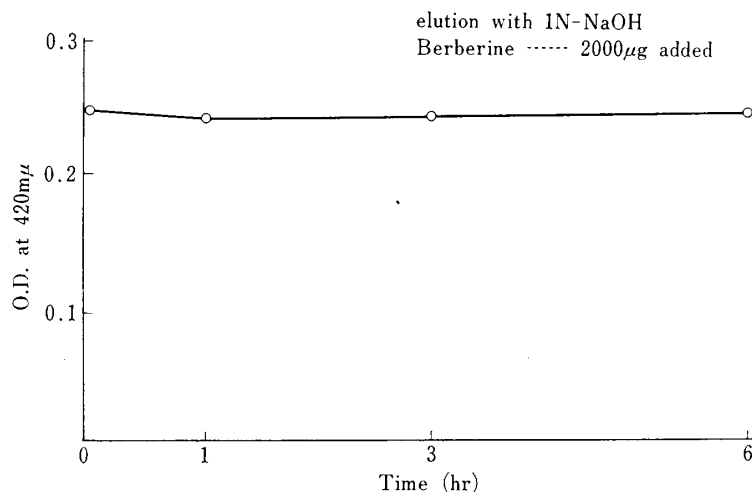


Fig. 2. Stability of Berberine in 1 N-NaOH

TABLE II. Assay of Coptis and Phellodendron

		Berberine-type Alkaloids (%) as Berberine-HCl
Coptis		
因 州 黄 連		13.0
越 前 "		12.0
丹 波 "		12.8
ビルマ "		12.5
雲 南 "		13.0
川 "		11.7
C. teeta		10.9
ツルゴカヨウ		2.5
Phellodendron		
愛 媛 産		4.0
鳥 取 "		5.3
長 野 "		6.4
新 潟 "		5.6
エーテルで脱脂		5.8
朝 鮮 "		1.6
エーテルで脱脂		1.8

については前報⁹⁾で報告した。

結論および考察

局方のベルベリン定量法は少量の検体また含有量の少ない場合、さらに製剤となった場合などの実験操作には技術が必要で時間がかかる。著者らはこの点を解決するための新定量法を検討中 CM-Sephadex 他数種の樹脂を用いての定量法に成功した。今回の黄連および黄柏中のベルベリン量は従来報告されているものよりも高く出ているが一般にイオン交換樹脂および薄層クロマトを用いる定量法では局方値の2倍程度の報告が多い。CM-Sephadex による定量ではベルベリン型アルカロイド全てを定量し、総塩酸ベルベリンとして示したのでさらに高く表われたものと推定される。ベルベリン、コプティシンおよび各エキスを吸着させた場合さらに現在検討中である漢方エキス製剤その他ベルベリン製剤30数種の洗浄液ならびに溶出液を濃縮、それぞれ薄層クロマトで検討し、漢方製剤中しばしば共存する大黃、黄芩、山梔子等の色素成分は本法になんら影響を与えない事など知ったが目下詳細に上記製剤中の成分含量

TABLE III. Assay of Cultivated Coptis

Cultivated Periods (months)	Berberine-type Alkaloids(%)	
	Takeda*	Tanba**
28	27.5	36.5
31	28.5	36.0
34	27.5	37.0
37	29.0	38.0
40	30.0	33.0
43	30.0	36.5
46	36.5	38.0
49	34.7	—
52	34.0	42.5
55	38.8	42.0
60	42.0	45.0
64	36.0	38.2
67	—	47.5
70	—	45.0

* 武田薬品京都試験農園, ** 兵庫県氷上郡山南町

と記載量とについて検討中であるが、黄連および黄柏の品質評価をするための定量法としては満足すべきものと考え
る。