

生薬資源の研究 (第 1 報)

ベルベリン型アルカロイドの定量と日本産黄連について¹⁾米田諒典*,^a, 山形悦子^a, 宮浦雅子^a, 華 龍津^a, 水野瑞夫^b^a 大阪大学薬学部, ^b 岐阜薬科大学

Studies on Resources of Crude Drugs (I)

Quantitative Analysis of Berberine Type Alkaloids and Japanese Coptis Rhizome¹⁾KAISUKE YONEDA*,^a ETSUKO YAMAGATA,^a MASAKO MIYAURA,^aHUA LONGJIN^a and MIZUO MIZUNO^b^a Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamada-oka,
Suita, Osaka 565, Japan^b Gifu Pharmaceutical University, 6-1 Mitahora-higashi 5 chome,
Gifu, Gifu 502, Japan

(Received February 2, 1987)

Berberastine (1), jatrorrhizine (2), coptisine (3), palmatine (4), berberine (5) are main protoberberine type alkaloids contained in Japanese Coptis Rhizome, and they were found to be efficiently separated from each other by high-performance liquid chromatography (HPLC). Then this method was applied to the quantitative analysis of Coptis Rhizome produced in various parts of Japan. On the HPLC data, principal component analysis was carried out. It was shown that those samples from Echizen (Fukui pref.) contained more 1 but less 3 when compared with rhizome samples from other parts of Japan. Tamba (Hyogo pref.) rhizomes and Inshu rhizomes (Tottori pref.) were similar to each other in their alkaloid compositions.

Keywords—Coptis Rhizome; *Coptis japonica*; protoberberine type alkaloids; quantitative analysis; HPLC

黄連は *Coptis japonica* MAKINO および同属植物 (キンボウゲ科) を基源とし, 日本では奈良時代以降栽培による生産が行われ, 現在でも国内の需要の多くを賄っている. 生薬には丹波黄連, 因州黄連, 越前黄連などのように古くからの産地由来の名称があり, その名称はいまなお使われている. 一方, 黄連の評価の方法として, いままで分析法についての報告は多いが, 大半はベルベリンのみであったり, ベルベリンと他の 2~3 成分またはベルベリン系アルカロイド総含量の分析に関する報告²⁾である. また, 近年薄層クロマトグラフィー・デンストメトリー法 (TLC・DM) により 5 成分の同時定量も報告³⁾されている. 今回著者らは, 黄連の主要なプロトベルベリンタイプのアルカロイド—berberastine (1), jatrorrhizine (2), coptisine (3), palmatine (4), berberine (5)—5 成分について高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて良好に分離し, これまでの分析法に比べて簡便, 迅速でしかも多数のアルカロイドの同時定量を可能にした. また, この分析法を用いて日本各地に産する生薬黄連のアルカロイド組成について比較検討を行ったのであわせて報告する.

実 験 の 部

1. 標 品

1~5 はいずれも黄連 (丹波産と中国産黄連 500 g を MeOH 1.2 l で 3 時間還流して得たエキスを 2 回薄層分離を行い単離した. ただし展開溶媒は Ikuta らの方法^{3a)}に従って 1 と 3~5 の分離には溶媒 1 を, 2 の分離には溶媒 2 とした. 薄層板; Silicagel 60F₂₅₄ (Merck) 厚さ 0.5 mm, 展開溶媒 1; benzene : AcOEt : *n*-PrOH : MeOH : NH₂Et (8 : 4 : 2 : 1 : 1), 展開溶媒 2; MeOH : H₂O : NH₃ (8 : 1 : 1)

2. 実験材料

1934～1986年に入手した次に示す日本各地で生産された生薬黄連33検体を用いた。丹波産（5検体）、因州産（5）、越前産（11）、加賀産（2）、広島産（2）、富山産（1）、新潟産（1）、日光産（1）、山形産（1）、佐渡ヶ島産（1）

3. 試料の調製

各試料の粉末 0.2 g を MeOH 50 ml で 3 時間還流を行い、coumarin（半井化学、内部標準物質）の HPLC の移動相溶液（0.03 mg/ml）で10倍に希釈し HPLC の検液とした。

4. HPLC の測定条件

column; Inertsil ODS(4.6 mm×25cm), mobile phase; CH₃CN : H₂O(55 : 45), 50 mM sodium laurylsulfate, 37 mM L-(+)-tartaric acid, column temp. 50°C flow rate; 1.0 ml/min, detector; 340 nm, integrator; Sic Chromatocorder 11

5. 検量線の作成

内部標準物質 coumarin に対して 1 を0.03～0.82倍, 2 を0.17～1.09倍, 3 を0.02～1.12倍, 4 を0.01～0.84倍, 5 を0.29～1.91倍の4種の濃度比の HPLC 移動相溶液を作成し, 10 μl を HPLC に注入した。3回ずつ測定を行い, 内部標準物質に対するピーク面積比から最小二乗法により算出した回帰方程式を求めた。いずれもほぼ原点を通る直線関係を示した。1; $y=5.577x+0.239$ ($r=0.999$), 2; $y=1.846x+0.038$ ($r=0.999$), 3; $y=2.209x+0.001$ ($r=0.999$), 4; $y=6.046x-0.096$ ($r=0.999$), 5; $y=0.895x-0.020$ ($r=0.999$)。なお, x は内部標準物質に対す

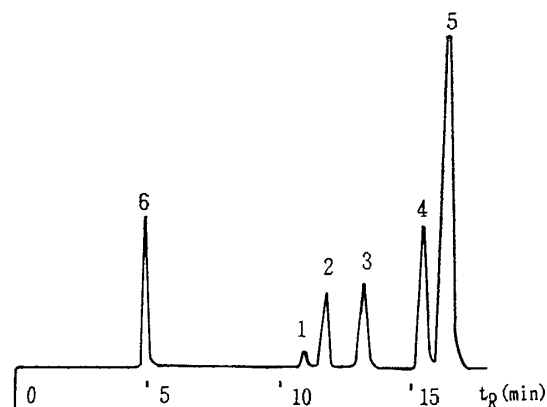


Fig. 1. HPLC-Profile of Coumarin and the Authentic Alkaloids Contained in Japanese Coptis Rhizome

1: berberastine, 2: jatrorrhizine, 3: coptisine, 4: palmatine, 5: berberine, 6: coumarin.

TABLE I. Alkaloid-Contents in Coptis Rhizome

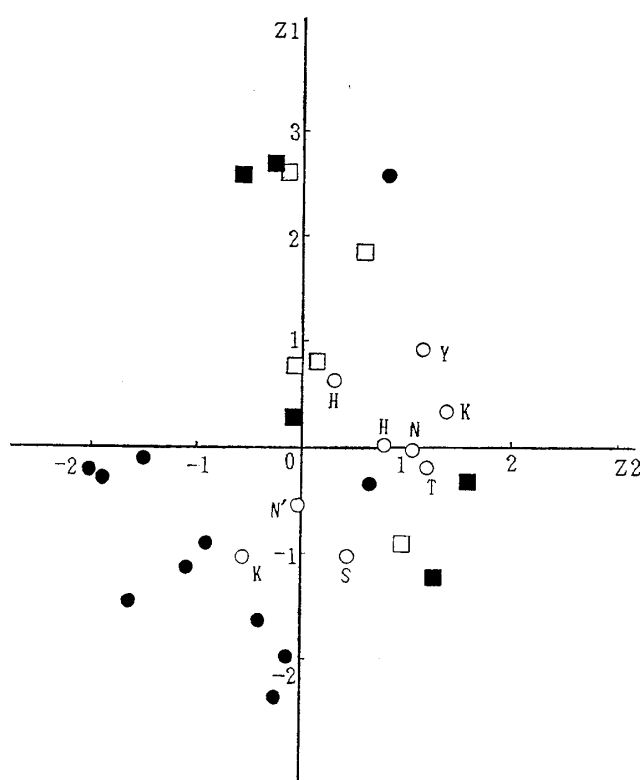
Samples (numbers)	Alkaloids (% , $n=3$)					Total
	1	2	3	4	5	
Tamba (5)	0.25	4.09	2.55	0.42	9.68	17.07
Inshu (5)	0.46	4.65	2.63	0.42	8.45	16.74
Echizen (11)	2.05	3.97	1.06	0.33	6.44	13.95
Kaga (1)	1.73	3.24	0.21	0.36	6.38	12.06
(1)	0.50	2.84	3.23	0.21	6.82	13.60
Hiroshima (2)	0.36	5.06	3.28	0.88	5.42	15.39
Niigata (1)	0.74	3.02	2.89	0.20	6.32	13.30
Toyama (1)	0.52	2.90	2.56	0.24	6.06	12.40
Nikko (1)	1.81	2.62	1.23	0.22	7.20	13.23
Yamagata (1)	1.51	2.44	4.02	0.19	8.26	16.52
Sadogashima (1)	3.57	2.04	2.89	0.16	5.78	14.54

1: berberastine, 2: jatrorrhizine, 3: coptisine, 4: palmatine, 5: berberine

TABLE II. Eigen Vector from the Data of HPLC Analysis for Coptis Rhizome

	Z_1	Z_2	Z_3
1	-0.235	-0.480	-0.357
2	0.212	-0.535	0.658
3	0.511	0.585	0.082
4	0.026	-0.022	0.753
5	0.799	-0.373	-0.029
Eigen value	5.111	1.522	0.832
Cumulative contribution	0.636	0.825	0.929
Ratio			

1: berberastine, 2: jatrorrhizine, 3: coptisine, 4: palmatine, 5: berberine

Fig. 2. Distribution of Japanese Coptis Rhizome on the Basis of the 1st Principal Component (Z_1) and 2nd Principal Component (Z_2)

■: Tamba, □: Inshu, ●: Echizen, ○: others [K: Kaga, H: Hiroshima, N: Niigata, T: Toyama, N: Nikko, Y: Yamagata, S: Sadogashima]

る各成分の濃度比, y は内部標準物質に対する各成分の面積比, r は相関係数である.

6. 定 量

試料溶液 10 μ l を HPLC に注入し, それぞれ 3 回ずつ繰り返してピーク面積比の平均値を求めた.

7. 主成分分析 (PCA)

1 ~ 5 の 5 成分の定量値を変数とし, 分散, 共分散から固有値, 固有ベクトル, 因子負荷量および主成分のスコアを求めた. 計算機には大阪大学大型計算機センターの ACOS1000 を, 計算のプログラムには TSS/LIB-6⁴⁾ を利用した (登録番号 A63529; A). 解析法は奥野らの方法⁵⁾ に従った.

結 果

1. HPLC において 1～5 は良好に分離した。また、内部標準については種々の物質について検討した結果、coumarin が良好な結果を示した (Fig. 1)。

2. 1～5 の 5 成分について HPLC で定量した結果を TABLE I に示した。丹波産と因州産黄連とは 5 成分の組成は近似していた。越前産黄連のほとんどに 1 が 2.0～2.6% 含まれ、丹波産と因州産黄連では 0.8% 未満であるのに対し非常に多かった。また、丹波産と因州産の黄連には 3 と 5 がそれぞれ 0.8～4.2%, 5.1～10.4% 含まれ、越前産のものでは 0.3～1.0% および 4.0～7.7% であった。丹波と因州産の黄連には 5 成分の総含量が 20% 以上のものがあった。加賀産の黄連 2 検体のうち一方は越前産のものに、他方は広島や新潟、富山産の黄連に成分含量が似ていた。

3. おおのの分析値をもとに PCA を行って得られた固有値と累積寄与率、固有ベクトルを TABLE II に示した。固有値 1 以上となるのは第 2 主成分 (Z_2) までであり、 Z_2 までの累積寄与率は 82.5% であった。第 1 主成分 (Z_1) と Z_2 における各試料のスコアを比較すると (Fig. 2), 越前産の黄連は 2 検体を除いて丹波や因州産の黄連とかなり異なった分布を示した。固有ベクトルを考え合わせると越前産の黄連の特徴は他よりも 1 が多く、3 が少ないことにある。また、丹波や因州産の黄連にはスコアの分布から、2 と 5 が多いものと少ないものがあることが明らかとなった。加賀産の黄連には越前産のものに近似するものがあり、日光や佐渡ヶ島産のものは越前と丹波、因州産との黄連の中間的な分布を示したが、他は丹波や因州産の黄連に近似していた。

結 論

1. 黄連の重要な成分である 1～5 の 5 種のプロトベルベリンタイプのアルカロイドを HPLC を用いて良好に分離、定量することができた。その結果、とくに 1 は比較的含量が多く、越前産黄連を特徴づける成分であることから、1 も同時に定量することによって重要な知見が得られた。本条件は 1～5 のアルカロイドの同時定量を可能にしていることの他に迅速かつ簡便な方法であることより、黄連のベルベリン系アルカロイド類の定量分析に有効な分析法と考えられる。なお中国産の味連に含まれる epiberberine も本条件で良好に分離し、分析が可能であるが、日本産の黄連には Ikuta ら^{3b)}の指摘するように認められなかった。

2. 日本各地産の黄連に対し、1～5 の 5 種のアルカロイドの定量的結果をもとにして PCA を行ったところ、越前産の黄連は丹波や因州産のものとは主成分のスコアが大きく異なっていた。越前産の黄連は丹波や因州産のものより 1 が多く 3 が少ない特徴があった。丹波と因州産の黄連は近似しているが 2 と 5 の含量の多いものと少ないものがあった。加賀産の黄連で越前産のものに近似するものがあったが、他の産地の黄連の多くは丹波や因州産のものに近似していた。

なお、日本産黄連の生薬の成分組成の違いに原植物としての *Coptis japonica* の変種の違いや、栽培による生産法の違いなどが原因として考えられるが、実際の生産にあたってはそれぞれの産地では単純であり、しかも水野らの報告している *Coptis* 属の分布を考慮しても植物種と成分組成の違いとの関連は明確ではなかった。しかし、この原因については現在検討中である。

引用文献および注

- 1) 日本生薬学会第33回年会 (埼玉, 1986年10月) にて一部発表。
- 2) a) 黒野吾市, 小倉紀代, 佐々木敬佑, 薬誌, **85**, 262 (1965); b) 木村康一, 野呂征男, 半田清作, 生薬, **26**, 141 (1972); c) 沢田徳之助, 山原條二, 金真理子, 生薬, **27**, 12 (1973); d) 沢田徳之助, 山原條二, 新谷佳子, 生薬, **28**, 150 (1974); e) 黒田鈍夫, 河内敬朝, 医薬品研究, **7**, 154 (1976); f) 野口 衛, 持田研秀, 生薬, **30**, 47 (1976); g) 橋本庸平, 安藤敬子, 水野瑞夫, 生薬, **30**, 127 (1976); h) 赤田良信, 棚瀬弥一郎, 薬誌, **97**, 940 (1977); i) 服部忠雄, 井上正秀, 早川昌克, 薬誌, **97**, 1263 (1977); j) 服部忠雄, 神谷則賢, 井上正秀, 早川昌克, 薬誌, **97**, 1305 (1977); k) 石川 治, 橋本 勉, 中嶋暉躬, 田中 治, 糸川秀治, 薬誌, **98**, 976 (1978); l) 赤田良信, 河野貞子, 棚瀬弥一郎, 薬誌, **100**, 766 (1980); m) T. Misaki, K. Sagara, M. Ojima, S. Kakizawa, T. Oshima, H. Yoshizawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 354 (1982); n) 難波恒雄, 御影雅幸, 牛山つや子, 薬誌, **102**, 56 (1982)。
- 3) a) A. Ikuta, H. Itokawa, *Shoyakugaku Zasshi*, **37**, 195 (1983); b) A. Ikuta, A. Kobayashi, H. Itokawa, *Shoyakugaku Zasshi*, **38**, 279 (1984)。
- 4) NEC 編, ‘ACOS アプリケーションシステム ACOS-6 タイムシェアリングライブラリ説明書<TSS/LIB-6 統計計算編>’, 日本電気株式会社, 東京, 1983, p. 207。
- 5) 奥野忠一, 久米 均, 芳賀敏郎, 吉澤 正, “多変量解析法”, 日科技連, 東京, 1971, pp. 159-257。