

## 報 文

キャピラリー電気泳動法による黄蓮及び黄柏中のベルベリン型  
アルカロイドの定量赤田 良信<sup>®\*</sup>, 石井 信之<sup>\*</sup>Determination of berberine-type alkaloids in *Coptis Rhizoma* and  
*Phellodendri Cortex* by capillary electrophoresisYoshinobu AKADA and Nobuyuki ISHII<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University, 180, Nishihamabouji, Yamashiro-cho, Tokushima-shi, Tokushima 770

(Received 10 January 1997, Accepted 10 February 1997)

A simultaneous determination of berberine-type alkaloids (coptisine, berberine and palmatine) in *Coptis Rhizome* and *Phellodendri Cortex* water extracts was investigated by capillary electrophoresis. Free-zone capillary electrophoresis in 100 mM phosphate buffer at pH 8.5 gave complete separation of three alkaloids within 20 min. A sample solution was introduced by the hydrostatic method (10 s) and on-column detection was performed at 214 nm. The calibration curves of each alkaloid gave good linearities over the concentration range at 4~20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Coptisine, berberine and palmatine in crude drug water extracts were determined with good reproducibility.

**Keywords :** capillary electrophoresis; *Coptis Rhizoma*; *Phellodendri Cortex*; berberine; palmatine.

## 1 緒 言

日本薬局方収載の生薬であるオウレン (黄蓮) (*Coptidis Rhizoma*)<sup>1)</sup> やオウバク (黄柏) (*Phellodendri Cortex*)<sup>2)</sup> の理化学的な品質評価は、薬効成分であるベルベリン型アルカロイドの定量値により行われている。ベルベリンの分析法としては、吸光度測定法<sup>3)4)</sup>、薄層クロマトグラフィー<sup>5)6)</sup>、高速液体クロマトグラフィー<sup>7)~9)</sup> など種々の方法が報告されている。しかし、これらの方法は、生薬のような複雑なマトリックスを持つ天然物の分析法としては十分とはいえない。一方、キャピラリー電気泳動 (CE) は、高い分離能を持つ分

離分析法として知られており、生薬分析への適用も試みられている<sup>10)12)</sup>。本法は、少量の電解液を用いて短時間に分析が終了し、又分離管として中空管を使用するため、汚染しても分離管の洗浄は容易であり、繰り返し使用による変動が少ない。更に、フリーゾーンで泳動させた場合、試料中の分析対象物質を、イオン性物質に限定することができる利点がある。

著者らは、既に製剤中のベルベリン (Ber.) を CE による分析について報告したが<sup>13)</sup>、今回は、生薬である黄蓮及び黄柏の水抽出液中のベルベリン型アルカロイドである Ber., パルマチン (Pal.) 及びコブチシン (Cop.) の同時定量に本法を適用した。

<sup>\*</sup> 徳島文理大学薬学部: 770 徳島県徳島市山城町西浜傍 示 180

## 2 方 法

### 2・1 装置及び試薬

装置は、Waters Quanta 4000 System を用い、分離用キャピラリーは、75  $\mu\text{m} \times 60 \text{ cm}$  (有効長 55 cm) の Waters 製アキュセップキャピラリーを使用した。検出は、装置に内蔵の紫外吸光検出器を用い、オンカラム検出法により行い、214 nm を検出波長とした。

### 2・2 標準品、試薬及び試料

標準品は、和光純薬製の生薬定量用標準品を使用した。その他の試薬は、和光純薬製の試薬特級をそのまま用いた。

試料は、黄蓮 5 種 (鳥取産、因州産、越前産、丹波産、中国産各 1 種) 及び黄柏 6 種 (北陸市場品 1 種、大阪市場品 2 種、徳島市場品 3 種、いずれも産地不明) を用いた。

### 2・3 標準溶液及び試料溶液の調製

標準溶液は、各標準品約 2 mg を精密に量り、水に溶かして 50 ml としたものを使用した。黄蓮及び黄柏は、約 0.5 g を量り、水 50 ml を加え、直火で 1 時間で約半量になるまでせん (煎) じ、ガーゼで濾過し、濾液に水を加えて 50 ml とした。これを遠心分離して得られた上澄み液を Ber. 含量が  $2 \text{ mg } 50 \text{ ml}^{-1}$  になるように水で希釈し、前処理することなくそのまま試料溶液とした。

### 2・4 分析条件

泳動緩衝液は、100 mM リン酸二水素一カリウム水溶液に、100 mM リン酸一水素二カリウム水溶液を加えて pH 8.5 に調製したリン酸緩衝液を使用した。又、泳動電圧は 7.00 kV とした。標準溶液及び試料溶液の注入は、陽極から落差法 (10 s) で行った。定量は、ピーク面積を基にして作成した絶対検量線法により行った。

## 3 結果及び考察

### 3・1 泳動緩衝液の検討

緩衝液として、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液及びリン酸-ホウ酸緩衝液について検討したが、分離能、ピークの再現性及び対象性は、リン酸緩衝液が最も良かったので、リン酸緩衝液を使用した。

### 3・2 泳動緩衝液の pH の検討

リン酸緩衝液の pH を 2~10 まで変化させ、泳動緩

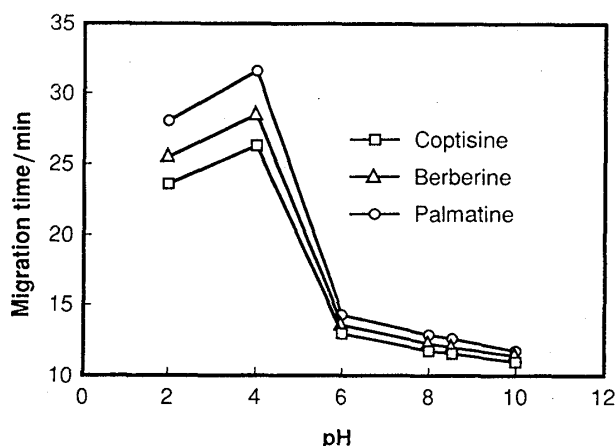


Fig. 1 Relationship between pH of phosphate buffer and migration time

衝液の pH に及ぼす 3 種のアルカロイドの泳動時間の変動を検討した。Fig. 1 に示したように、pH 6 までは緩衝液中の水素イオン濃度に泳動時間は大きく依存しているが、pH 6 以上ではあまりその影響を受けないことが分かった。この分離挙動は、各アルカロイドの  $pK_a$  が近似しているためであり、3 種のアルカロイドは、共に pH 6 付近で電離の変化が起きていることを示唆している。そこで、試料中のきょう雑成分との分離状態及び泳動時間を考慮し、泳動緩衝液の pH は 8.5 とした。

### 3・3 泳動緩衝液のイオン強度の検討

次に、リン酸緩衝液のイオン強度を 40 から 120 mM まで変化させたときの 3 種のアルカロイドの泳動時間の変動を検討したが、各アルカロイド共にほぼ同様の関係が得られ、イオン強度が高くなるに伴い泳動時間が少し長くなる関係が得られた。そこで、試料中のきょう雑成分との分離状態及びピークの対象性やシャープさを考慮し、緩衝液のイオン強度を 100 mM とした。

### 3・4 泳動電圧の検討

Fig. 2 に、泳動電圧を 3 から 11 kV まで変化させたときの 3 種のアルカロイドの泳動時間の変動を示した。泳動電圧の増加とともに各アルカロイドの泳動時間は短縮されることが分かった。しかし、泳動電圧の増加とともに泳動電流が増加するので、泳動電圧は 7 kV とした。この分析条件での泳動電流は 40  $\mu\text{A}$  であり、1 サイクルの分析時間は 20 分以内であった。

Fig. 3 に、著者らが設定した CE 条件で得られた電気泳動図を示した。Fig. 3 の (A) は 3 種の標準品であ

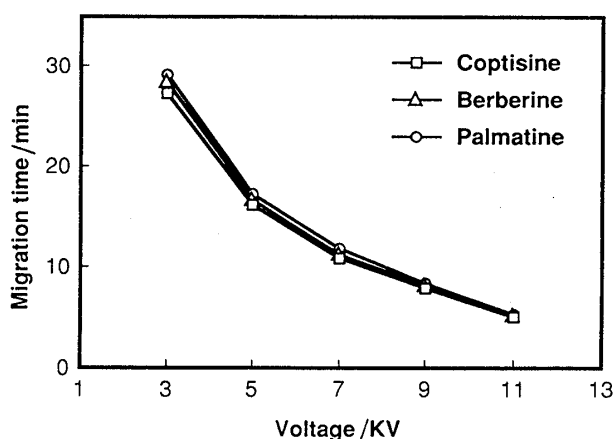


Fig. 2 Relationship between migration voltage and migration time

り, (B) は黄蓮 (試料 1), (C) は黄柏 (試料 1) の水煎液の電気泳動図である. 試料中の Cop., Ber. 及び Pal. は, 水抽出液中の他の含有成分の影響を受けることなく各々単独のシャープなピークとして泳動されている.

### 3.5 定量精度

標準溶液中の 3 種のアルカロイドの濃度と得られた電気泳動図のピーク面積の間には,  $4\sim 20\ \mu\text{g ml}^{-1}$  の範囲で, 良好な直線関係 ( $r=0.999$ ) が認められた. 又,

直線域でのピーク面積の再現性は, 相対標準偏差が約 2% 以内 ( $n=4$ ) となり, 満足のいく精度で定量できることが分かった.

### 3.6 添加回収実験

試料に, 各アルカロイドの含有量とほぼ同量の標準品を添加し, 定量と同様の操作を行い, 回収率を算出した. 結果は, Cop. は 98.5%, Ber. は 101.2%, Pal. は 99.2% となり, 又相対標準偏差も 2% 以内と定量精度と大差のない回収率が得られた.

### 3.7 黄蓮及び黄柏水抽出液中の Cop., Ber. 及び Pal. の定量

著者らが用いた 5 種の黄蓮及び 6 種の黄柏水抽出エキス中の Cop., Ber. 及び Pal. の定量結果を Table 1 及び 2 に示した.

結果は, 黄蓮及び黄柏の水抽出液中の各アルカロイドの定量値を, 水抽出液を減圧濃縮して得られたエキス中の含量 (%) で示したが, いずれの試料についても定量値の変動は 2% 前後であった. なお, 黄柏水抽出液中には Cop. は検出されなかった.

黄蓮及び黄柏中のベルベリン型アルカロイドの CE による簡便な分析法を確立した. 本法により, 生薬の水煎液中の Cop., Ber. 及び Pal. が, 前処理などの必要はなく, 抽出液をそのまま装置に導入することにより, 短

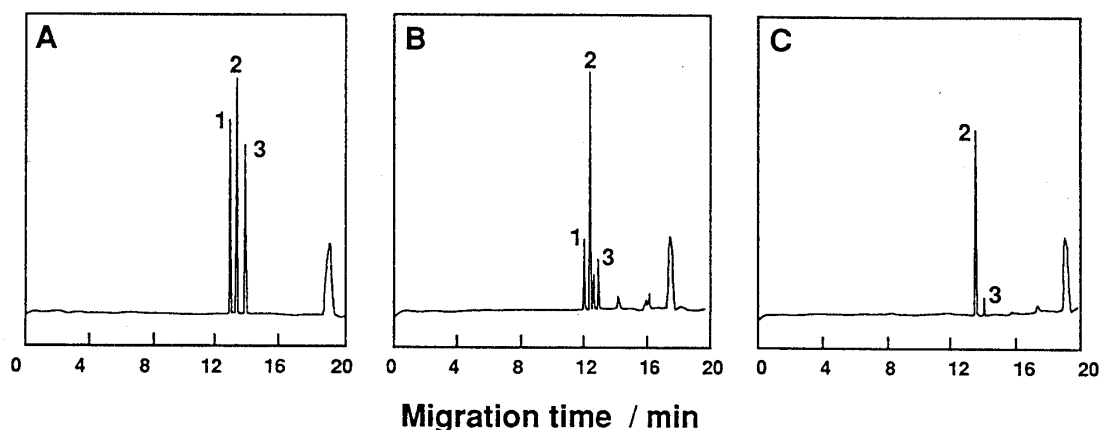


Fig. 3 Electropherograms of berberine type alkaloids

Electropherogram: A, standards solution; B, 'Ohren' decoction; C, 'Ohbaku' decoction; Peaks: 1, coptisine; 2, berberine; 3, palmatine. Conditions: capillary,  $75\ \mu\text{m}\times 60\ \text{cm}$  (55 cm to the detector); electrolyte, 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 8.5); applied voltage, 7 kV; detection, 214 nm

Table 1 Determination of coptisine, berberine and palmatine contents (%) in various 'Ohren' water extracts by CE method

| Sample No. | Coptisine, % <sup>†</sup> | Berberine, % <sup>†</sup> | Palmatine, % <sup>†</sup> |
|------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1          | 7.0                       | 20.9                      | 5.0                       |
| 2          | 4.9                       | 25.7                      | 1.0                       |
| 3          | 0.6                       | 19.7                      | 2.0                       |
| 4          | 6.8                       | 29.0                      | 1.4                       |
| 5          | 3.5                       | 19.7                      | 0.7                       |

<sup>†</sup>Each alkaloid contents (%) were calculated from 'Ohren' water extract being evaporated to dryness under reduced pressure.

Table 2 Determination of berberine and palmatine contents (%) in various 'Ohbaku' water extracts by CE method

| Sample No. | Berberine, % <sup>†</sup> | Palmatine, % <sup>†</sup> |
|------------|---------------------------|---------------------------|
| 1          | 9.9                       | 0.3                       |
| 2          | 8.3                       | 0.6                       |
| 3          | 11.1                      | 0.8                       |
| 4          | 12.5                      | 0.6                       |
| 5          | 8.3                       | 0.4                       |
| 6          | 7.0                       | 0.6                       |

<sup>†</sup>Each alkaloid contents (%) were calculated the same as in Table 1

時間に十分な精度で定量ができることが分かった。

## 文 献

- 1) “第十三改正日本薬局方解説書”, D-151 (1996), (廣川書店).
- 2) “第十三改正日本薬局方解説書”, D-138 (1996), (廣川書店).
- 3) D. K. Desae, S. P. Kurani, A. G. Seshadrinathan: *Indian Drugs*, **25**, 533 (1988).
- 4) S. M. Hassan, F. Belal, M. Sultan: *Talanta*, **35**, 977 (1988).
- 5) R. Bhushan, I. Ali: *J. Planar Chromatog. -Mod. TLC*, **2**, 397 (1989).
- 6) Q. Jiao, R. Yu, Q. Yang, T. Zhao: *Zhongguo Yaxue Daxue Xuebao*, **19**, 125 (1988).
- 7) 赤田良信, 河野貞子, 棚瀬弥一郎: 薬学雑誌, **100**, 766 (1980).
- 8) T. Misaki, K. Sagara, M. Ojima, S. Kajizawa, T. Oshima, H. Yoshizawa: *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 354 (1982).
- 9) Y. Wang, L. Yu, D. Lin, S. Dong, D. An: *Yaoxue Xuebao*, **24**, 275 (1989).
- 10) S. Honda, K. Suzuki, M. Kataoka, A. Makino, K. Kakehi: *J. Chromatogr.*, **515**, 653 (1990).
- 11) H. Chen, S. Sheu: *J. Chromatogr.*, **653**, 184 (1993).
- 12) W. Thormann, A. Minger, S. Molteni, J. Caslavsky, P. Gebauer: *J. Chromatogr.*, **593**, 278 (1992).
- 13) 赤田良信, 石井信行, 中根徳人: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **41**, 349 (1992).

## 要 旨

キャピラリー電気泳動 (CE) を用いた黄蓮及び黄柏の水抽出液中のベルベリン型アルカロイド (コプチシン, ベルベリン及びパルマチン) の分析条件を検討した。pH 8.5 に調整した 100 mM リン酸緩衝液を用いるフリーゾーン電気泳動により, 20 分以内に 3 種のアルカロイドを完全分離できる泳動条件を確立した。試料溶液は落差法 (10 s) により注入し, 検出は 214 nm によるオンカラム法により行った。3 種のベルベリン型アルカロイドはともに, 4~20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  の間で良好な直線性を持つ検量線が得られた。生薬の水抽出液中のコプチシン, ベルベリン及びパルマチンが, 良好な精度で分析できることが分かった。