

報 文

キャピラリー電気泳動法によるキナ皮中のキナルカロイド類の定量

赤田 良信^{®*}, 黒木 まり*Determination of cinchona alkaloids in *Cinchona bark* by capillary electrophoresis

Yoshinobu AKADA and Mari KUROGI*

* Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University, 180, Nishihamabouji, Yamashiro-cho, Tokushima-shi, Tokushima 770

(Received 15 July 1997, Accepted 9 August 1997)

The simultaneous determination of cinchona alkaloids (quinine, quinidine, cinchonine and cinchonidine) in *Cinchona bark* water extracts were investigated by capillary electrophoresis. Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) in 5 mM phosphate-borate buffer containing 15% *tert*-butanol at pH 8.5 with 50 mM SDS as surfactant gave complete separation of four alkaloids within 20 min. A sample solution was introduced by hydrostatic method (10 s) and on-column detection was performed at 214 nm. The calibration curves of alkaloid gave good linearities over the concentration range at 8~40 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Quinine, quinidine, cinchonine and cinchonidine in *Cinchona Bark* water extracts were determined with good reproducibility.

Keywords : micellar electrokinetic chromatography; cinchona alkaloids; *cinchona bark*; quinine; quinidine; cinchonine; cinchonidine.

1 緒 言

キナ皮 (*Cinchona bark*) は, *Cinchona succiruba* Pavon et Klotzsch 又はその他同族植物 (Rubiaceae) の樹皮であり, 抗マラリア剤として広く知られている. その主な有効成分はアルカロイドであり, キニーネ (Qn.), キニジン (Qnd.), シンコニン (Cin.) 及びシンコニジン (Cind.) がその主要成分である. 従って, キナ皮の理化学的な品質評価は, 薬効成分である Qn., Qnd., Cin. 及び Cind. の分別定量を行う必要がある. 一方, これらのアルカロイドの分析法としては, 非水滴定法¹⁾, 吸光度法²⁾, 薄層クロマトグラフ法³⁾, 高速液体クロマト

グラフ法^{4)~6)}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言にくい. 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^{7)~9)}. 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, 目的成分が泳動されたら分析を中止し, カラムを洗浄することにより, 残った未泳動成分を容易に追い出すことができる利点がある. 又, 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も少ない.

著者らは, CE の生薬分析への適用について種々検討しているが¹⁰⁾¹¹⁾, 今回は, キナ皮の水抽出液中の Qn., Qnd., Cin. 及び Cind. の同時定量にドデシル硫酸ナト

* 徳島文理大学薬学部: 770 徳島県徳島市山城町西浜傍 示 180

リウム (SDS) を用いるミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) を適用した。

2 実 験

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 μm $\times$ 60 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、装置に内蔵の紫外外部吸収検出器を用い、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、東京化成製試薬特級を使用した。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。

キナ皮は、いずれも産地不明の大阪市場品、東京市場品及び徳島市場品各 1 種を用いた。

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 100 ml としたものを使用した。キナ皮は、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、ガーゼで汙過し、汙液に水を加えて 50 ml とした。これを遠心分離して得られた上澄み液を Qn. 含量が 2 mg 100 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、5 mM ホウ砂水溶液に 5 mM リン酸水溶液を加えて pH 8.5 に調整し、SDS を 50 mM になるように添加し、15% になるように *t*-ブチルアルコールを加えた緩衝液を使用した。又、泳動電圧は 25 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、Qn., Qnd., Cin. 及び Cind. は、いずれの緩衝液についても 1 本のシャープなピークとして泳動され、各アルカロイドを分離することはできなかった。これは、4 種のアルカロイドの pK_a が近似しているためと考えられる。そこで、4 種の緩衝液に 50 mM になるように SDS を加えた緩衝液を用いる MEKC について同様の実験を行ったところ、

Qn., Qnd., Cin. 及び Cind. の分離に改善は認められなかったが、泳動時間は増大していることが分かった。これは、各アルカロイドが SDS ミセルに取り込まれてはいるが、ミセルへの分配の差が小さいため分離できないことを示唆している。

3・2 泳動緩衝液に添加する有機溶媒の検討

pH 8.5 に調整し、SDS を 50 mM になるように添加した 5 mM リン酸-ホウ酸緩衝液に、メタノール(B)、エタノール(C)、プロパノール(D)、2-プロパノール(E)、*t*-ブチルアルコール(F) 及びアセトニトリル(G) を各々 15% になるように加えた緩衝液について検討した。Fig. 1 に示したように、有機溶媒の効果は明白であり、特に F が Qn., Qnd., Cin. 及び Cind. が良好にベース分離したシャープなピークとして泳動しており、最も優れていることが分かった。なお、ここには有機溶媒の添加量を 15% に固定したときの結果のみを示したが、別に各有機溶媒濃度の検討を行った結果、いずれの場合もキナアルカロイド類の分離には *t*-ブチルアルコールが優れていることが分かった。

3・3 *t*-ブチルアルコールを添加する泳動緩衝液について

リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液及びリン酸-ホウ酸緩衝液について、各々 15% になるように *t*-ブチルアルコールを加え緩衝液について検討したが、Qn., Qnd., Cin. 及び Cind. は、リン酸-ホウ酸緩衝液により短時間に安定した分離が得られることが分かった (Fig. 2)。なお、クエン酸緩衝液及び酢酸緩衝液が不适当であったのは、この pH では緩衝能が小さいためと考えられる。

3・4 泳動緩衝液の pH の検討

リン酸-ホウ酸緩衝液の pH を 7.5~9.0 まで変化させ、泳動緩衝液の pH に及ぼす 4 種のアルカロイドの泳動時間の変動を検討した。Fig. 3 に示したように、pH 7.5 から 8.0 までは、急激な泳動時間の減少が認められるが、pH 8.0 以上では泳動時間に及ぼす pH の影響はほとんど認められなかった。これは、4 種のアルカロイドの pK_a が近似しており、各アルカロイドはともに pH 8 付近で電離の変化が起きていることが考えられるが、各アルカロイドの電離度と移動度の関係は不明であり、目下検討中である。従って、ピークの再現性や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。

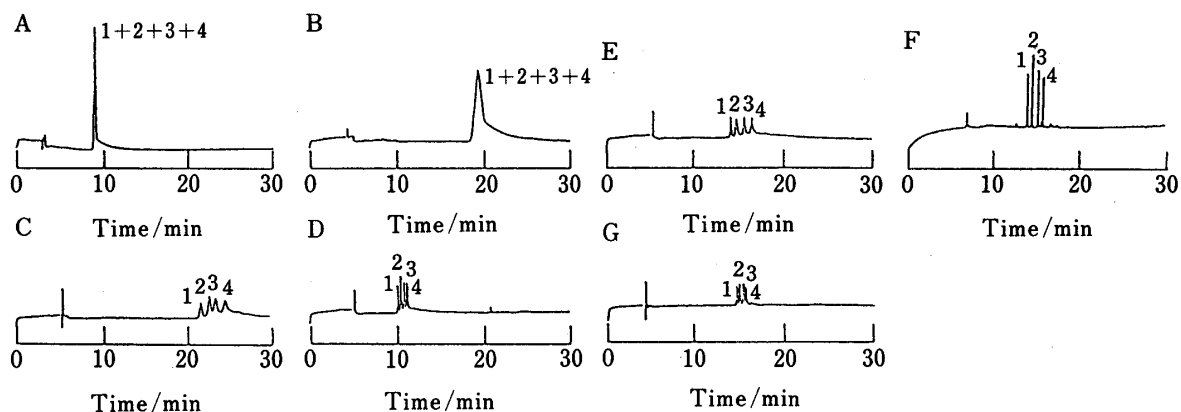


Fig. 1 Electropherograms of standard solution analyzed by MEKC in 5 mM phosphate-5 mM borax buffer (pH 8.5) with 50 mM SDS

A: non-added; B: with 15% methanol; C: with 15% ethanol; D: with 15% prop-anol; E: with 15% *iso*-propanol; F: with 15% *tert*-butanol; G: with 15% acetonitrile. Conditions: applied voltage, 25 kV; detection, UV 214 nm. Peaks: 1, cinchonine; 2, cinchonidine; 3, quinidine; 4, quinine

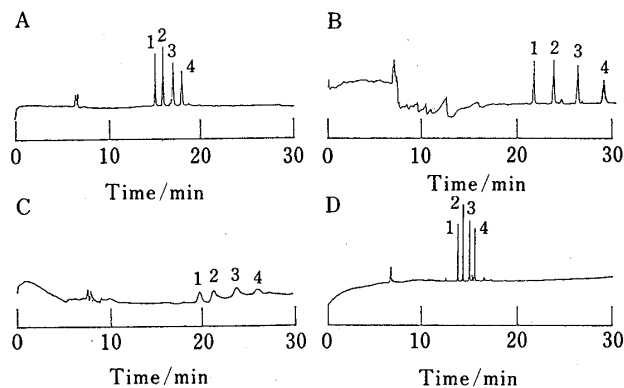


Fig. 2 Electropherograms of standard solution analyzed by MEKC in different electrolyte with 50 mM SDS with 15% *tert*-butanol

A: 5 mM phosphate buffer (pH 8.5); B: 5 mM citrate buffer (pH 8.5); C: 5 mM acetate buffer (pH 8.5); D: 5 mM phosphate-5 mM borax buffer (pH 8.5). Peak numbers correspond to the compounds and other conditions were the same as in Fig. 1

3.5 泳動緩衝液のイオン強度の検討

リン酸-ホウ酸緩衝液のイオン強度を 2.5 から 10 mM まで変化させたときの 4 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短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形状や再現性の最も良い 5 mM とした.

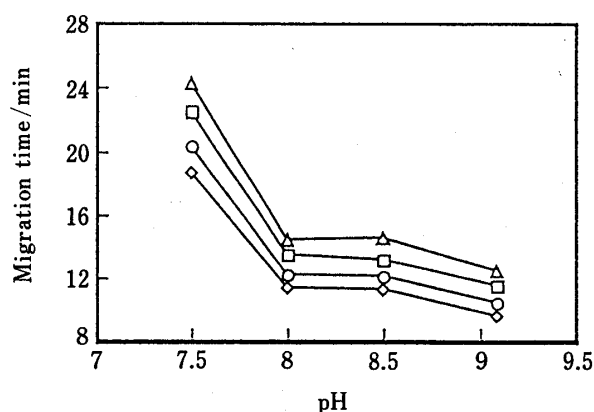


Fig. 3 Relationship between pH of electrolyte and migration time

◇: cinchonine; ○: cinchonidine; □: quinidine; △: quinine

3.6 SDS 濃度の検討

SDS の添加量を無添加から 60 mM まで変化させ, SDS が及ぼす Qn., Qnd., Cin. 及び Cind. の泳動時間の影響を見た. SDS を添加しないと 4 種のアルカロイドは混合ゾーンを形成し分離しないが, SDS の添加量が増えるに従い各アルカロイドは分離していき, かつ泳動時間も長くなり, 30 mM の添加量でほぼ一定となることが分かった. そこで, ピークの形状や再現性を考慮し, 50 mM の SDS を用いた.

3・7 *t*-ブチルアルコール濃度の検討

t-ブチルアルコールの添加量を無添加から 25% まで検討したが、20% までは 4 種のアルカロイドの分離能は飛躍的に良くなっていくことが分かったが、20% 以上の添加量では逆に分離が悪くなっていき、25% の添加量で Qn. と Qnd. 及び Cin. と Cind. は、それぞれ分離せず混合ゾーンを形成することが分かった (Fig. 4). これは、多量の有機溶媒の添加は、電解液の電離を抑制し、かつミセルの構造が変化するためと推察される。そこで、*t*-ブチルアルコールの添加量は 4 種のアルカロイドの分離が最も良い 15% とした。

3・8 泳動電圧の検討

泳動電圧を 15 から 30 kV まで変化させ、各アルカロイドの泳動時間の変化を見たが、4 種共に泳動電圧の増加に従って、その泳動時間は短縮されることが分かった。しかし、泳動電圧の増加によるジュール熱の発生等のトラブルと分析時間を考慮して泳動電圧は 25 kV とした。

Fig. 5 に、著者らが設定した MEKC 条件で得られた

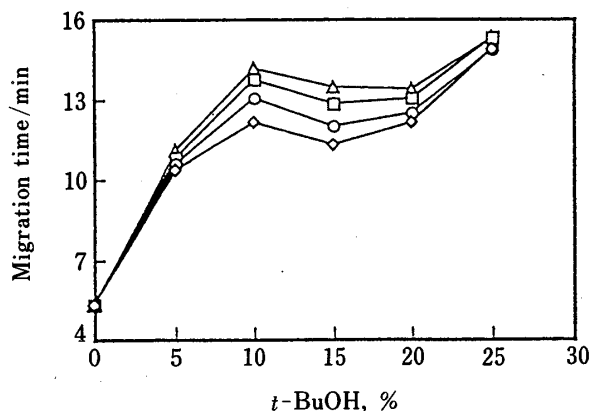


Fig. 4 Relationship between concentration of *t*-BuOH and migration time

◇: cinchonine; ○: cinchonidine; □: quinidine; △: quinine

電気泳動図を示した。Fig. 5 の (A) は 4 種の標準品であり、(B) はキナ皮 (試料 1) 水煎液の電気泳動図である。試料中の Qn., Qnd., Cin. 及び Cind. 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ベース分離したピークとして泳動されている。

3・9 定量精度

標準溶液中の 4 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、 $8\sim 40\ \mu\text{g ml}^{-1}$ 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 ($n=5$) となり、満足のいく精度で Qn. Qnd. Cin. 及び Cind. を分離定量できることが分かった。

3・10 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、Qn. は 100.3%, Qnd. は 100.5%, Cin. は 100.4%, Cind. は 100.5% となり、又、相対標準偏差も 3% 以内と定量精度と大差のない回収率が得られた。

3・11 キナ皮水抽出液中の Qn., Qnd., Cin. 及び Cind. の定量

著者らが用いた 3 種のキナ皮水抽出液中の Qn., Qnd.,

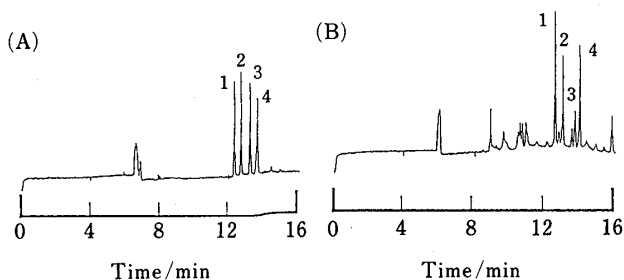


Fig. 5 Electropherograms of standard solution (A) and cinchona bark decoction (B)

Other conditions were the same as in Fig. 1

Table 1 Determination of quinine, quinidine, chinchonine and chiconidine contents ($\mu\text{g ml}^{-1}$) in various water extract using 0.5 g cinchona bark by MEKC and HPLC method⁶⁾

Sample No.	Quinine		Quinidin		Chinchonine		Chiconidine	
	MEKC	HPLC	MEKC	HPLC	MEKC	HPLC	MEKC	HPLC
1	91.6	93.4	13.6	13.0	12.7	13.5	62.0	65.5
2	64.6	62.0	6.8	6.5	36.7	32.3	80.3	83.2
3	2.9	3.2	0.1	0.1	20.2	18.3	5.2	4.8

Cin. 及び Cind. の定量結果を Table 1 に示した.

結果は, キナ皮の水抽出液中の Qn., Qnd., Cin. 及び Cind. の定量値を, 0.5 g キナ皮を用いて調製した水抽出液中の含量 ($\mu\text{g ml}^{-1}$) で示したが, いずれの試料についても定量値の変動は 3% 前後であり, 定量精度の変動値と大差のない精度で水抽出液中のこれらのアルカロイドが分離定量できることが分かった. 又, HPLC 法⁶⁾より得られた定量値を併記したが, 両者の間には良い一致が認められ, 本法の実用性も十分と考えられる.

文 献

- 1) “第十三改正日本薬局方解説書”: C-2696, C-2691 (1996), (廣川書店).
- 2) H. D. Grant, J. H. Jones: *Anal. Chem.*, **22**, 679 (1950).
- 3) R. Verpoorte, Th. Mulder-Krieger, J. J. Troost, A. Baerheim Svendsen: *J. Chromatogr.*, **184**, 79 (1980).
- 4) D. V. McCalley: *Chromatographia*, **17**, 264 (1983).
- 5) A. Hermans-Lokkerbol, T. Van Der Leer, R. Verpoorte: *J. Chromatogr.*, **479**, 39 (1989).
- 6) D. V. McCalley: *Analyst*, **115**, 1355 (1990).
- 7) S. Honda, K. Suzuki, M. Kataoka, A. Makino and K. Kakehi: *J. Chromatogr.*, **515**, 653 (1990).
- 8) H. Chen, S. Sheu: *J. Chromatogr.*, **653**, 184 (1993).
- 9) M. Unjer, D. Stockigt, D. Belder, J. Stockigt: *J. Chromatogr.*, **767**, 263 (1997).
- 10) 赤田良信, 石井信行, 中根徳人: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **41**, 349 (1992).
- 11) 赤田良信, 石井信行: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **46**, 491 (1997).

要 旨

キナ皮水抽出液中のキナアルカロイド類 (キニーネ, キニジン, シンコニン及びシンコニジン) の同時定量をキャピラリー電気泳動法により行うための分析条件の検討を行った. 50 mM ドデシル硫酸ナトリウムを含む pH 8.5 の 5 mM リン酸-ホウ砂緩衝液に 15% になるように *t*-ブチルアルコールを添加するミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) により, 20 分以内に 4 種のアルカロイドを完全に分離することができた. 試料溶液は, 10 秒間の落差法で注入し, 検出はオンカラム法により行い, 214 nm を検出波長とした. 各アルカロイドの検量線は, 8~40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ の濃度範囲で良好な直線性が得られた. キナ皮水抽出液中のキニーネ, キニジン, シンコニン及びシンコニジンが良い再現性をもって分離定量することができた.