薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
102 (1) 56-62 (1982)

生薬の品質評価に関する基礎研究 (第 6 報¹⁾) 電子顕微鏡による生薬分析
その 1 黄連中の Berberine の定量²⁾

難波恒雄*, 御影雅幸, 牛山つや子
富山医科薬科大学和漢薬研究所

Fundamental Studies on the Evaluation of Crude Drugs. VI.¹⁾ Electron
Microscopic Analysis of Crude Drugs. (1). Determination
of Berberine in *Coptidis Rhizoma*²⁾

TSUNEO NAMBA*, MASAYUKI MIKAGE and TSUYAKO USHIYAMA
Research Institute for Wakan-Yaku, Toyama Medical and Pharmaceutica
University, 2630, Sugitani, Toyama

(Received June 18, 1981)

The present paper describes elementary analysis for biological materials by using a wave dispersive type X.M.A. (X-ray microanalyzer). The wave dispersive analysis has been considered to be inadequate for analyzing the elements of biological materials because analytical specimens generally lack any specialized elements incorporated in the materials, and also tend to be damaged and charged at higher accelerating voltage. To overcome these difficulties, the specimens were treated with a reagent which reacted with the materials to be analyzed and then coated with carbon by means of vacuum evaporation.

Thus, berberine could be analyzed accurately with the wave dispersive X.M.A. after reacting with ammonium reineckate to give a berberine-Cr complex, followed by coating with carbon. This method was further applied to determine berberine presented in *Coptidis Rhizoma*.

Keywords—wave dispersive; X.M.A.; carbon coating; berberine; reinecke; Coptis; X-ray; determine

近年、分析機器の著しい進歩に伴って生薬分析にも種々多様の機器が応用されるようになり、分析精度の向上や分析時間の短縮などに成果が得られている。電子顕微鏡 (electron microscope) もその 1 つで、走査電子顕微鏡 (scanning electron microscope, SEM) による微小種子や花粉などの微細表面構造の形態分析や透過電子顕微鏡 (transmission electron microscope, TEM) による花粉などの断面の微細構造の形態分析などに効を奏している。一方、X 線マイクロアナライザー (X-ray micro analyzer, XMA) は従来、鉱物や金属の元素分析に應用されてきたが、近年、医学、生物学分野にもその應用が試みられるようになった。³⁾ しかし、現時点では生物試料においては定性分析に限られ、しかもエネルギー分散型 XMA での試みであり、分析感度の高い波長分散型 XMA の應用はほとんどなされていない。これは波長分散型がエネルギー分散型に比して分析時の試料損傷が大きいことが最大の理由であるが、反面、分析感度や定量性の面では波長分散型の方がすぐれている。そこで波長分散型 XMA をはじめとする付属機器を装備した SEM の特性を考慮し、生薬分析への應用を検討するため本研究に着手した。今回は XMA による黄連中の berberine の定量法について報告する。

前述のごとく、XMA⁴⁾ による生物試料の分析はほとんど行われていないが、その理由として、1) 電子線束による試料損傷が大きい、2) 試料にほとんど導電性がないのでチャージ (帯電) を起こし、安定した情報が得難い、3) 生物試料中に含有される個々の有機化合物中に特有な元素を含有することがほとんどなく、またたとえ含有していても極微量であるため XMA での検出限界を超えている。などが挙げられ、いずれの理由も生物試料の成分、元素分析に大きな障害となっている。そこで本研究では安定した試料の作製法を種々検討し、また生薬成分の検出に関しては特定成分を沈殿試薬により定量的に沈殿せしめ、その試薬中の特定元素を検出することにより反応した生薬成分の所在を知を試み、所期の目的を達し得た。今回は黄連を用い、含有されるアル

カロイドの検出を試み、総アルカロイド (berberine 換算量) の定量法を確立したので報告する。

XMA による分析原理および特性⁵⁾

分析試料に電子線束 (electron probe) を照射すると、試料を構成する元素からそれぞれの元素に特有な波長を有する X 線 (特性 X 線) が放出される。放出された特性 X 線を分光結晶にて分析することにより試料中の特定元素の有無を知ることができる。信号はガスフローカウンタによりパルスとして捕捉され、得られる情報量 (カウント数) は分析対象元素の試料中の重量濃度に比例して得られることから定量分析が可能である。また得られる情報量の変化をチャート紙やブラウン管上に波形として描くことや試料を面分析 (ビームを走査させて分析する) しながらブラウン管にパルスを輝点として映すこと (X 線像) が可能で、これらによる情報を二次電子像や反射電子像と比較対照することにより、試料表面を構成する元素の種類やその分布状態を知りうる。

XMA によるアルカロイドの定量法

生薬 (粉末) 中のアルカロイドを適当な方法で抽出した後にアルカロイド沈殿試薬と反応させ、得られた沈殿物を洗浄後抽出残渣と合し、よく研和した後分析試料とする。別に目的のアルカロイドの単品と用いるアルカロイド沈殿試薬を反応させて沈殿物を作り、同じ生薬の抽出残渣と正確に秤量して混合研和して得られた標準試料を分析し、検量線を作製する。使用した生薬の重量を A 、分析試料の重量を B 、検量線から得られた分析試料中のアルカロイドを $C\%$ 、生薬中のアルカロイド含有量を $x\%$ とすると、生薬試料中のアルカロイド含有量は

$$x = \frac{BC}{A} \quad (1)$$

にて求められる。また検量線からアルカロイド 100% 時の分析値を想定して D カウントとし、分析結果を E カウントとすると

$$= c \frac{E}{D} \times 100$$

であるから (1) 式に代入すると

$$x = \frac{100 BE}{AD} \quad (2)$$

が得られ、本式により生薬中のアルカロイド含量が求められる。またさらに分析しようとする生薬の抽出残渣が常に生薬末からアルカロイド含量を差し引いた量の $F\%$ であるなら、分析試料の重量 B は

$$B = \frac{F(A - \frac{Ax}{100})}{100} + \frac{Ax}{G} \quad (G \text{ はアルカロイド沈殿試薬にて生成した沈殿物中のアルカロイドの重量 } \%)$$

であるから (2) 式に代入して整理すると、

$$x = \frac{100 EFG}{100 DG + EFG - 10000 E} \quad (3)$$

が得られる。XMA による元素分析値が分析試料の重量とは関係なく、その元素の分析試料中の重量濃度に比例して得られるため、あらかじめ F が予測できるならば (3) 式によって全操作過程において一切計量することなくアルカロイドを定量することも可能である。

実 験 の 部

材料 生薬材料の内、丹波黄連、越前黄連およびネパール産黄連は板本天海堂 (大阪, 1971 年)、因州黄連は同店 (1972 年)、ビルマ黄連は小城商店 (大阪, 1972 年) からの入手品。Coptis japonica (THUNB.) MAKINO var. japonica SATAKE キクバオウレンは富山市呉羽山での自生品を用いた (1979 年 9 月採集)。

アルカロイド試薬の選択 アルカロイド沈殿試薬は現在 10 数種が知られているが、本実験に供し得る試薬は示性式中に植物体には検出されない特異な元素を含有するものが望まれ、Cr, Mo, Cd, I, W, Pt, Au, Hg, Bi などを含む試薬が考えられる。検討した結果これらの元素の中で、現有装置で分析する際に最もノイズの少

ないものは Cr であったので、本実験ではアルカロイド沈殿試薬としてしばしば定量分析に利用される⁷⁾ ammonium reineckate を使用した。

試薬 Berberine·HCl——市販の特級品（半井化学薬品）を水およびエタノールで再結晶し、硫酸デシケーターで減圧乾燥して得た。mp 204—205°C, *Anal.* Calcd $C_{20}H_{18}ClNO_4 \cdot 2H_2O$: C, 58.90; H, 5.44; N, 3.43. Found: C, 58.63; H, 5.36; N, 3.69.

Ammonium Reineckate——市販の特級品（半井化学薬品）を使用。

標準試料用 Berberine Reineckate の製造 Berberine·HCl を酢酸酸性溶液に溶解し、0.1% ammonium reineckate 水溶液を氷浴中でわずかに過量となる程度に加え、30 分間放置し沈殿物を得、洗液 (satld. ammonium reineckate soln. 2→1000)⁷⁾ にて 1 回洗浄し、凍結乾燥した後硫酸デシケーター中にて減圧乾燥して得た。mp. 262—264°C. *Anal.* Calcd $C_{20}H_{18}NO_4 \cdot [Cr(NH_3)_2(SCN)_4]$: C, 44.03; H, 3.69; N, 14.98. Found: C, 43.75; H, 3.85; N, 14.79.

分析装置および測定条件 走査電子顕微鏡に波長分散型 XMA を装備した日本電子製 JSM-35FCS. タングステン・ヘアピンフィラメント。加速電圧 (accelerating voltage) は高いほど得られる情報量が多く好ましいが、逆に試料損傷やチャージが起こりやすくなる。そこで種々検討した結果、フィラメントの安定性や寿命をも考慮して 25 kV とした。試料吸収電流 (absorption electric current) についても同様の理由で 2×10^{-8} A とした。分析対象元素 Cr の特性 X 線は強度が最強の $K\alpha-1, 2$ 線を分光結晶 LiF にて検出した。I 値 (I-value) 159.31, スリット幅 300 μm . バックグラウンドは I 値 160.5 にて測定した。

測定は分析原理上点分析が好ましいが、本実験に用いた試料では表面が完全な平面ではないため、点分析では得られる情報が安定しない。そこでラピッドスキャン (rapid scan, 0.08 ms/line, 0.04 s/frame) による面分析を行った。分析面の広さは広いほど試料吸収電流が安定するが、その反面ローランドサークルから外れる部分が多くなる。種々検討した結果、100 μm 平方程度の面分析では X 線像においてほぼ全画面に均一性が認められた (Fig. 1). そこで本実験では連続した 100 μm 平方 10 ヶ所を各々 10 秒間測定し、分析値はカウント/秒に換算し、小数第 1 位まで求めた。

分析試料の調製 200—300 メッシュの末にした材料を恒量となるまで減圧乾燥したものの適量⁸⁾ を、1—3 % 酢酸水溶液で抽出液の色が無色となるまで数回抽出する。残渣 (1) は凍結乾燥させる。抽出液を約 1 ml に濃縮し、イソプロピルアルコール 5 ml を加える。析出物を遠心分離し、少量のイソプロピルアルコールで液が無色となるまでくり返し洗浄し、沈殿物 (2) を得る。これらのイソプロピルアルコール層は合した後揮散させる。残渣に精製水を適量加え、完全に溶解させた後に氷浴中で 0.1% ammonium reineckate 水溶液をわずかに過剰となるまで加え、30 分間放置し、berberine reineckate を生成させる。遠心分離して得られた沈殿物を少量の洗液にて 1 回洗浄し、乾燥させる。得られた (1), (2) および berberine reineckate を合し、少量のアセトンで

Fig. 1. X-Ray Area Maps of Berberine-reineckate (X-Ray : Cr $K\alpha-1, 2$)

White dots show the distribution of Cr on the surface of the specimen. Though the Cr distribution in the specimen is homogenous, the map A (larger analytical area, 500 μm sq.) includes any undetectable zones shown above, and the map B (100 μm sq.) shows the more real Cr distribution, due to the limitation of the detector used.

Chart 1. Preparation of Analytical Specimens

加えてよく研和し、分析試料末とする (Chart 1)。

分析試料末は減圧乾燥した後、その適量を取り、マイクロ錠剤成形器を用いて約 1000 kg/cm^2 の圧力で圧縮し、表面が平坦な分析試料とした。

カーボン蒸着と分析値への影響 分析試料は打錠したままではチャージを起こすため安定した情報が得られないので、試料表面に導電性物質の被膜を施す必要がある。しかし理論的には被膜を施すことにより分析値は低下する。そこでその影響が最も少ないカーボンを蒸着し、蒸着膜の厚さが分析値に及ぼす影響を調べた (Table I)。

分析試料は berberine reineckate を用い、2 検体を準備し、それぞれ同一条件でカーボン蒸着し、分析後さらに同一条件でカーボン蒸着を重ねて分析した。蒸着膜の厚さは市販の比色板と対比し判断した。その結果蒸着膜の厚さが $500 \text{ \AA}$ までは分析値に有意差のないことがわかった。しかし膜の厚さが $90 \text{ \AA}$ では 2 検体間の分析値の差が大きく、かつ他に比してバックグラウンドにノイズが多い。これらは分析試料のチャージによるものと考えられ、蒸着が不足していることを示している。そこで、長時間の蒸着では熱の影響も考えられるので、カーボン蒸着膜の厚さは $200\text{—}300 \text{ \AA}$ とした。

なお、このようにして作製した分析試料を室温で 3 ヶ月間保存した後分析した結果、全く同様の値が得られた。

検量線および計算式 本法によるアルカロイド抽出過程で得られた残渣 (1) および沈殿物 (2) をよく研和し減圧乾燥した粉末に、種々の割合に berberine reineckate を精秤して加え、研和後分析した結果を Fig. 2 に破線で示す。得られた検量線は分析試料中の berberine 含量を示すものであるが、berberine 含量が 15% 程度まではほぼ直線性が得られ、本検量線から分析試料中の berberine 含量が 10% 時には毎秒約 74 カウントであることがわかった。また残渣 (1) と沈殿物 (2) を合したものに berberine-HCl を正確に加え、任意の berberine 含有黄連末を得、このものを Chart 1 に従って試料調製し、得られた (1), (2) および berberine reineckate を

TABLE I. Vacuum Evaporative Carbon Coating and Influence on Analysis

Thickness of evaporated film(carbon)	90Å		190Å		270Å		500Å	
Sample	A	B	A	B	A	B	A	B
Analytical counts at 100 μm sq. per 10 s. 10 parts	25586	27025	26096	26978	26572	26824	26479	26371
Back ground	218	232	148	137	135	133	136	139

Material : berberine reineckate.

Condition : accelerating voltage 25 kV, absorption electric current $2 \times 10^{-8} \text{ A}$.

Target line : Cr K α -1,2, Crystal LiF, I -value 159.31 (B.G. 160.5).

Analytical area : 100 μm sq.

Fig. 2. Calibration Curves of Berberine

Dotted line: berberine in the analytical specimen.
Solid line: berberine in the Coptidis Rhizoma.

精秤し, XMA にて分析した結果, 先の検量線によく合致し, berberine の回収率はほぼ 100% であることを確認し得た. 故に原料末量 A , 分析試料末量 B , 分析値 E , 原末中の berberine 含量 x (%) との間に

$$x = \frac{100 BE}{740 A} = \frac{BE}{7.4 A} \quad (4)$$

の関係式が得られ, 以下本式により定量した.

ところで今回の実験結果では, 本法におけるアルカロイド抽出過程の残渣 (1) および沈殿物 (2) の重量の和が, 生薬からアルカロイド含量を差し引いたものの約 87% であった. また作製した berberine reineckate 中の berberine 含量の元素分析結果か

ら, berberine と ammonium reineckate との反応が $C_{20}H_{18}O_4N^+ + [Cr(NH_3)_2(SCN)_4]^- \longrightarrow C_{20}H_{18}O_4N \cdot [Cr(NH_3)_2(SCN)_4]$ で示される式で進行していると考えられ, (3) 式における G は 51.4 となる. これらを (3) 式に代入して整理すると

$$x = \frac{87 E}{740 - 1.08 E} \quad (5)$$

が得られ, 本式により一切の計量なしに試料原末中の berberine 含量が求められる. 今, (5) 式を Fig. 2 に表わすと実線で示すような曲線となる. 次いで (4) 式による berberine 分析値が 6.90% の黄連末に種々の割合で正確に berberine·HCl を加えた試料を分析した結果, (5) 式の曲線にほぼ一致した (Fig. 2).

結果および考察

産地別黄連の Berberine 含量

越前, 丹波, 因州, ビルマ, ネパール産の各黄連をそれぞれ 2 個体とり, 各々任意に 3 ヶ所を分析した結果を Table II に示す.

同一産地の個体においても berberine 含量にかなり個体差のあることがわかった. また同一株においても測定箇所により berberine 含量に変異があるものも認められた. そのような黄連は概して太い, 細いの差のはげしいもので, 一般に太い部位ほど berberine 含量が多く認められた. これは黄連の根茎の内部構造を観察すると, 太い部位では柔細胞の占める割合が多くなっているためと考えられる.

黄連の各組織中の Berberine 含量

キクバオウレンの生品を用い, 凍結乾燥後実体顕微鏡下で根茎の皮層 (コルク層を除く), 木部, 髓および根の各組織に分離し, 粉末にした後に本法にて分析した結果を Table III に示す.

オウレン地下部の組織別 berberine 含有量は一般に根茎の皮層部に最も多く認められたが, 髓中にもほぼ同程度認められる個体もあった. また木部中にも認められたことは除ききれない木部放射組織の柔細胞に由来するも

TABLE II. Assay of Berberine Content of Coptidis Rhizoma (as $C_{20}H_{19}NO_5$)

		Echizen	Tamba	Insyu	Burma	Nepal
Rhizome A	Part 1	5.76%	12.23	9.91	8.40	9.30
	Part 2	4.06	12.77	12.39	7.86	10.95
	Part 3	3.75	13.78	10.17	9.28	12.29
Rhizome B	Part 1	8.33	9.31	6.74	9.10	9.72
	Part 2	9.21	11.32	6.91	6.65	8.07
	Part 3	6.45	11.30	6.88	5.59	7.33

TABLE III. Berberine Content on Each Tissue of Coptidis Rhizoma (as $C_{20}H_{19}NO_5$)

Sample	Average from 4 random samples of the rhizome	Cortex	Xylem	Pith	Root near rhizome	Root remote from rhizome
A	9.61%	11.89	3.28	7.85	2.58	2.86
B	6.66	10.07	3.50	6.11		
C	9.33	13.33	3.33	4.84		
D	10.93	15.80	2.71	16.92		

TABLE IV. Comparison of Three Methods for Berberine Analysis (as $C_{20}H_{19}NO_5$)

	X.M.A. Method	Acetone-berberine Method (J.P.X)	CM-Sephadex absorptiometry	
			Method 1 ^{a)}	Method 2 ^{b)}
Sample A	9.18%	4.41	6.85	7.84
Sample B	8.89	4.32	6.71	7.66

a) 1 g of material was extracted with 100 ml of MeOH by Soxhlet's extractor.

b) 50 mg of material was extracted repeatedly with ca. 10 ml of 1–3% AcOH in one time.

ので、木部放射組織中にはおそらく髄と同程度の berberine が含有されているものと思われる。また根においては根茎に近い部位と先端部に分けて測定したが、有意差を認めなかった。

他の分析方法との比較

「日局十」⁹⁾ のアセトンベルベリン法に比して約 2 倍の値が得られた。また沢田ら¹⁰⁾ の CM-Sephadex による berberine 定量法 (試料約 1 g をメタノール 100 ml でソックスレー抽出) も総 berberine 型アルカロイドを求めるものであるが、XMA 法はその約 1.3 倍の値が得られた (Table IV)。沢田らも指摘しているように、一般にイオン交換樹脂や薄層クロマトを用いる定量法ではアセトンベルベリン法の 2 倍程度の報告が多く、XMA 法もそれらとほぼ同様の結果が得られた。また XMA 法は CM-Sephadex 法よりもさらに高い値が得られたが、その一因として試料からのアルカロイドの抽出効率の違いが考えられたので、XMA 法で行った抽出とほぼ同様に抽出 (試料約 50 mg を酢酸酸性水溶液で抽出液が無色となるまでくり返し抽出) した後、CM-Sephadex 法にて測定し比較したところ、XMA 法は CM-Sephadex 法の約 1.1 倍の値であった (Table IV)。種々検討した結果、黄連中の berberine の抽出にはより少量の試料を酸性水溶液で抽出するのがよいことが明らかになった。さらに、CM-Sephadex 法で行った場合、黄連中に berberine に次いで多く含有される coptisine の吸光度が 420 m μ では berberine よりも低く、また吸着剤からの再抽出が必ずしも 100% ではないことなど¹⁰⁾ から、アルカロイド量を berberine 換算した場合には実際の値よりもわずかに低く出てくる。一方 XMA 法では測定値 (カウント数) は測定する元素の試料中の重量濃度に比例して得られるが、coptisine の分子量が berberine よりも小さいため、coptisine reineckate の方が berberine reineckate よりも高い測定値が得られるために berberine 換算した場合には実際よりもわずかに高い値が得られる。以上の理由で XMA 法の方が CM-Sephadex 法よりも定量値がやや高くなっていると考えられる。

本法による利点は a) 試料が極めて少量 (5–20 mg) で足りる、b) 本実験においては一切計量することなく定量分析することもある程度可能である、c) 分析試料の長期保存が可能で、再現性が高いことなどである。また、本法は他のアルカロイド含有生薬にも応用可能であるが、berberine 以外のアルカロイドの場合は検出感度、分析感度などを考慮してアルカロイド沈殿試薬の選択、最適分析条件の設定などを検討する必要がある、目下、附子、苦参などについても検討中である。

引用文献および注

- 1) 第 5 報：吉崎正雄，富森 毅，吉岡成美，難波恒雄，薬誌，97，916 (1977)。

- 2) 日本薬学会, 第99年会, 1979年8月(札幌)にて発表.
- 3) 水平敏和, 木村美智子, 総合臨床, **23**, 76 (1974).
- 4) ここでは波長分散型 XMA についての一般論を述べる.
- 5) 詳細は成書⁶⁾にあるので, ここでは本報を記すにあたっての必要最少限を述べるに止める.
- 6) 内山 郁, 渡辺 融, 紀本静雄, "X線マイクロアナライザ," 日刊工業新聞社, 東京, 1972 をはじめとする書物がある.
- 7) F.J. Bandelin, *J. Am. Pharm. Assoc., sci. Ed.*, **39**, 493 (1950).
- 8) 今回の実験では 5—20 mg を用いた.
- 9) 日本公定書協会, 第十改正日本薬局方, 広川書店, 東京, 1981, p. 919.
- 10) 沢田徳之助, 山原條二, 巖千代江, 生薬, **26**, 15 (1972).