UDC 615.784.6-07 : 543.544

36. 郡 定文, 河野通文: クロマトグラフィーによるマオウ・アルカロイドの分離定量
(第1報) メチルエフェドリンとエフェドリンまたは
プソイドエフェドリンとの分離定量^{*1}

Sadayuki Kori and Mitihumi Kono: Chromatographic Analysis of Ephedra
Alkaloids. I. Quantitative Separation of *l*-N-Methylephedrine
from *l*-Ephedrine or *d*-Pseudoephedrine.

(Osaka Plant, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.^{*2})

Separatory determination of Ephedra alkaloids has not been established as yet. By the application of partition column chromatography or adsorption chromatography, separatory determination of *l*-methylephedrine from *l*-ephedrine or *d*-pseudoephedrine was successfully carried out. In the case of partition chromatography, Celite 545 was used as the carrier, buffer solution of pH 6.4 as the stationary phase, and chloroform as the moving phase to separate *l*-methylephedrine from the sample of alkaloid mixture. The use of chloroform-ethanol mixture (5:1 by volume) as the moving phase then separated *l*-ephedrine or *d*-pseudoephedrine. In adsorption chromatography, Brockmann's alumina was used as the adsorbent and the mixture sample was developed with 85% butanol-ether mixture (1:50 by volume) to separate *l*-methylephedrine. Development with 85% ethanol-ether mixture (1:1 by volume) eluted the remaining *l*-ephedrine or *d*-pseudoephedrine. Each of the alkaloids separated by chromatography was determined by nonaqueous or neutralization titration.

(Received June 1, 1960)

マオウ (麻黄) には *l*-エフェドリン (以下エフェドリンと略) のほか, *d*-プソイドエフェドリン (以下プソイドエフェドリンと略), *l*-N-メチルエフェドリン (以下メチルエフェドリンと略), ノル-*d*-プソイドエフェドリン, *d*-N-メチルプソイドエフェドリン, *l*-ノルエフェドリンなどのアルカロイドが含有される¹⁾. これらアルカロイドの分離定量法としては, Feng²⁾ は, ビューレット反応による呈色を利用して比色法によりエフェドリンとプソイドエフェドリンの混合物の定量を行ない, Krishna ら^{3,4)} はエフェドリンとプソイドエフェドリンの塩酸塩のクロロホルムに対する溶解度の差によつて両者を分離しているが, いずれも定量法として充分なものとは思われない. また「日局 VI」, BPC^{*3}, IPC^{*4} などのマオウの定量法は, ただ総アルカロイドの量を求めるにすぎない.

著者らは製薬原料として使用されるマオウあるいはマオウエキスの品質評価の必要からマオウ・アルカロイドの分離定量を企て, Celite を固定相の保持剤とする分配カラムクロマトグラフィーを応用して, メチルエフェドリンとエフェドリンまたはプソイドエフェドリンとの分離に成功した.

分配クロマト法による分離条件の検討に先立ち, エフェドリン, プソイドエフェドリンおよびメチルエフェドリンにつき, リン酸緩衝液とクロロホルムの2液相間の分配係数を測定したところ, エフェドリンとプソイドエフェドリンはほとんど変わらないが, この両者とメチルエフェドリンの間にはかなりの差が認められ, 分配クロマト法による分離が可能である予測が得られた (Table I).

そこで Celite を保持剤として用い, リン酸緩衝液を固定相に, クロロホルムを移動相とし, エフェドリンとメチルエフェドリンの混合物を試料として種々分別溶離の条件を調べた (Fig. 1). この結果, カラムの温度, 添加試料の量, 緩衝液の使用量, その pH, 溶離速度などはいずれもアルカロイドの分別溶離に影響をおよぼし, 分離操作の条件を定める上に重要な要素であることを知った. またクロロホルムのみではエフェドリンの tailing が

^{*1} 第 80 回日本薬学会年会で発表 (1960).

^{*2} Ebie-kami-2-chome, Fukushima-ku, Osaka.

^{*3} British Pharmaceutical Codex (1954).

^{*4} The Indian Pharmaceutical Codex (1953).

1) T. A. Henry: "The Plant Alkaloids," IV Ed. 635(1949).

2) C. T. Feug: Chinese J. Physiol. 1, 397(1927) (C. A. 22, 2027(1928)).

3) S. Krishna, T. P. Ghose: J. Soc. Chem. Ind. (London) 48, 67T(1929).

4) T. P. Ghose, S. Krishna: Arch. Pharm. 268, 636(1930).

Table I. Partition Coefficients ($K = C_{\text{Buffer}}/C_{\text{CHCl}_3}$) of *l*-Methylephedrine, *l*-Ephedrine, and *d*-Pseudoephedrine (at 20°C)

pH Value of 0.5M phosphate buffer	<i>l</i> -Methylephedrine		<i>l</i> -Ephedrine		<i>d</i> -Pseudoephedrine	
	K	$\log K$	K	$\log K$	K	$\log K$
6.20	10.22	1.01	57.7	1.76	51.6	1.71
6.40	7.42	0.87	42.5	1.63	42.5	1.63
6.60	5.17	0.71	36.0	1.55	36.0	1.55
7.00	2.28	0.36	22.8	1.36	20.7	1.32

Fig. 1.

a) Variation in Temperature of the Column

Column, 15 g. of Celite, 5 cc. of 0.5M phosphate buffer, pH 6.4; eluant, CHCl_3 ; rate of flow, 2 cc./min.; sample, *l*-methylephedrine 10 mg. + *l*-ephedrine 10 mg.

b) Variation in the Load of Alkaloids

Column, 15 g. of Celite, 5 cc. of 0.5M phosphate buffer, pH 6.4; eluant, CHCl_3 ; rate of flow, 2 cc./min.; temperature, 20°

c) Variation in the Quantity of Buffer

Column, 15 g. of Celite; eluant, CHCl_3 ; rate of flow, 2 cc./min.; temperature, 20°; sample, *l*-methylephedrine 10 mg. + *l*-ephedrine 10 mg.

d) Variation in the Concentration of the Buffer

Column, 15 g. of Celite, 5 cc. of phosphate buffer; eluant, CHCl_3 ; rate of flow, 2 cc./min.; temperature, 20°; sample, *l*-methylephedrine 10 mg. + *l*-ephedrine 10 mg.

e) Variation in the pH Value of the Buffer

Column, 15 g. of Celite, 5 cc. of 0.5M phosphate buffer; eluant, CHCl_3 ; Rate of flow, 2 cc./min.; temperature, 20°; sample, *l*-methylephedrine 10 mg. + *l*-ephedrine 10 mg.

f) Variation in the Rate of Flow

Column, 15 g. of Celite, 5 cc. of 0.5M phosphate buffer, pH 6.4; eluant, CHCl_3 ; temperature, 20°; sample, *l*-methylephedrine 10 mg. + *l*-ephedrine 10 mg.

~~~~~ Tailing
 ——— Position of maximum on elution curve

はなはだしく定量的分離には適当でないが、メチルエフェドリンが溶離した後、移動相をクロロホルム・エタノール (5:1) 混液に切り替えることによってエフェドリンまたはプソイドエフェドリンを完全に溶離できた。かくして最適の分離条件を定め、分離したアルカロイドは非水滴定法により定量することとし、標準試料を用いて回収実験を行なった。その回収率は Table II, 溶離曲線は Fig. 2 の通りである。

Table II. Recovery Test on Control Samples by the Partition Chromatography

Expt. No.	Added			Recovered			
	<i>l</i> -Methylephedrine (mg.)	<i>l</i> -Ephedrine (mg.)	<i>d</i> -Pseudoephedrine (mg.)	<i>l</i> -Methylephedrine (mg.)	(%)	<i>l</i> -, <i>d</i> -Pseudoephedrine (mg.)	(%)
1	5.4	20.1	—	5.3	98.1	19.8	98.5
2	10.1	20.2	—	10.2	101.0	19.7	97.5
3	13.5	21.1	—	13.4	99.2	21.0	99.5
4	5.2	—	22.2	5.2	100.0	21.7	97.7
5	11.0	—	21.4	10.9	99.1	21.2	99.1
6	13.3	—	20.2	13.2	99.2	19.5	96.5
7	5.2	14.5	6.3	5.3	101.9	21.0	101.0
8	5.1	9.8	12.2	5.0	98.0	21.7	98.6
9	5.3	9.6	10.5	5.2	98.1	20.2	100.5

Fig. 2.

Elution Curve of Ephedra Alkaloids
from Celite Column

Fig. 3.

Elution Curve of Ephedra Alkaloids
from Alumina Column

メチルエフェドリンとエフェドリンまたはプソイドエフェドリンの分離を行なうには、アルミナを吸着剤とする吸着クロマトグラフィーによることもまた可能である。展開溶媒として、エーテルと種々のアルコールまたはケトン類の混液を用いて検討した結果、85 v/v% ブタノール・エーテル (1:50) 混液を用いてまずメチルエフェドリンを溶離した後、85 v/v% エタノール・エーテル (1:1) 混液に替え、エフェドリンまたはプソイドエフェドリンを溶離するのが最もよいことがわかった。本法による標準試料の回収率は Table III, 溶離曲線を Fig. 3 に示す。

Table III. Recovery Test on Control Samples by the Adsorption Chromatography

Expt. No.	Added			Recovered			
	<i>l</i> -Methylephedrine (mg.)	<i>l</i> -Ephedrine (mg.)	<i>d</i> -Pseudoephedrine (mg.)	<i>l</i> -Methylephedrine (mg.)	(%)	<i>l</i> -, <i>d</i> -Pseudoephedrine (mg.)	(%)
1	12.5	12.0	—	12.4	99.2	11.6	96.7
2	12.7	11.9	—	12.5	98.4	11.5	96.6
3	7.3	17.1	—	7.5	102.7	15.9	93.0
4	18.1	6.8	—	17.3	95.6	6.5	95.6
5	18.3	6.6	—	18.1	98.9	6.3	95.4
6	12.6	—	12.4	12.5	99.2	12.0	96.8
7	12.5	—	12.7	12.7	101.6	12.2	96.1

なおエフェドリンとプソイドエフェドリンの分離を上記 2 法により試みたが、適当な分離条件を見出すに至らなかった。

実 験 の 部

試 料 エフェドリン ($\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$): mp 40°. $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{ON}$ 94.8%.

ブソイドエフェドリン mp 117°. メチルエフェドリン mp 88°.

試薬および試液 試薬は特級または一級を使用.

Celite 545 (Johns-Manville Co.): 本品 200 g に dil HCl 2 L を加え, かき混ぜながら 10 min 煮沸後, メチルオレンジ中性となるまで蒸留水で洗浄, 105° で 15 hr 乾燥.

Al_2O_3 “Brockmann”: 本品を磁製ざらに入れ, かき混ぜながら 180~200° に 30~40 min 間加熱 (活性度 I) デンケーター (P_2O_5) 中に保存.

リン酸緩衝液: KH_2PO_4 と NaOH を用いて作成.

0.01N HClO_4 : HClO_4 (60%) 0.25 cc をジオキサンに溶かして 250 cc とする. フタル酸水素カリウム (標準試薬) を用いて標定.

酢酸第二水銀液: $(\text{AcO})_2\text{Hg}$ の 3% 氷酢溶液.

クリスタルバイオレット試液: クリスタルバイオレットの 0.1% 氷酢溶液.

分配クロマトグラフィー

分配係数の測定 エフェドリン, ブソイドエフェドリン, およびメチルエフェドリンの分配係数 (緩衝液/ CHCl_3) を文献⁵⁾ に準じて測 20° で測定. ただし溶液の成分含量の決定は, CHCl_3 層につき後記の非水滴定法により行なう.

分離条件の検討 各種の条件で分離操作を行ない, 分離液のフラクション (5 cc) をとりブромクレゾールグリーン溶液 (ブромクレゾールグリーン試液 1 cc に水 100 cc を加え, 緑色 (pH 4.4) になるまでこれに 0.005N H_2SO_4 を滴加) を加え, その変色 (緑色→青色) によつてアルカロイドの分離範囲を決定. また 0.005N H_2SO_4 で滴定し, その消費 cc 数によつて分離の極大をきめる.

カラムの調製 精製した Celite 15 g に 0.5M リン酸緩衝液 (pH 6.4) 5 cc を加えてよく混合. 外筒管を有するクロマト用管 (内径 16 mm, 長さ 330 mm) に CHCl_3 を用いて湿式法により詰め, 上辺をろ紙片で押さえる.

分離操作 試料 (塩基 20~40 mg) を CHCl_3 少量に溶かし, カラムの上端に添加. 管の内壁を CHCl_3 少量で数回洗う. CHCl_3 を移動相とし, 2 cc/min の速度で分離. 分離液は初めの 50 cc を捨て, 続く分離液 60 cc を集める (メチルエフェドリン). ついで移動相を $\text{CHCl}_3\cdot\text{EtOH}$ (5:1) に替えて分離. 分離液 250 cc を採る (エフェドリンまたはブソイドエフェドリン). 操作中外筒管に $20\pm 1^\circ$ の水を通しカラムを恒温に保つ.

滴 定 各分離液をビーカーに移し, conc. HCl 2~3 滴を加えて水浴上で注意して蒸発乾固. 残留物を氷酢に溶かし, $(\text{AcO})_2\text{Hg}$ 液適量を加え, 0.01N HClO_4 で滴定. (指示薬クリスタルバイオレット試液)

0.01N HClO_4 1 cc = 1.793 mg メチルエフェドリン ($\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{ON}$)

= 1.652 mg エフェドリンまたはブソイドエフェドリン ($\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{ON}$)

吸着クロマトグラフィー

カラムの調製 活性度を調整した Al_2O_3 20 g を外筒管を有するクロマト用管 (内径 10 mm, 長さ 660 mm) に後記の展開液 (I) を用いて湿式法により詰め, 上辺をろ紙片で押さえる.

分離操作 展開液にはつぎの混液を用いる. (I) 85 v/v% $\text{BuOH}\cdot\text{Et}_2\text{O}$ (1:50), (II) 85 v/v% $\text{EtOH}\cdot\text{Et}_2\text{O}$ (1:1).

試料 (塩基 20~25 mg) を Et_2O 少量に溶かし, カラムの上端に注意して添加する. 管の内壁は展開液 (I) の少量で数回洗った後, 展開液 (I) を用いて 1.5 cc/min の速度で展開する. 初めの分離液 10 cc を除き, 続く 90 cc を集める (メチルエフェドリン). カラムの上部に残った展開液 (I) をビベットで吸取して除き, 引き続き展開液 (II) により展開. 分離液 100 cc を集める (エフェドリンまたはブソイドエフェドリン).

操作中外筒管に $20\pm 1^\circ$ の水を通し, カラムを恒温に保つ.

滴 定 各分離液をビーカーに移し, 0.02N H_2SO_4 10 cc を正確に加え, 水浴上で溶媒臭のなくなるまで加温し, 新たに煮沸し冷却した水 20 cc を加え, 0.02N NaOH で過量の酸を滴定する. (指示薬 メチルレッド試液)

0.02N H_2SO_4 1 cc = 3.586 mg メチルエフェドリン ($\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{ON}$)

= 3.304 mg エフェドリンまたはブソイドエフェドリン ($\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{ON}$)

終りに本研究に当たり, 御指導いただいた京都大学 宇野教授, 御激励下さった加藤支店長, 檜山工場長に厚く御礼申し上げます.

大日本製薬株式会社大阪工場

5) E. Hecker (次田, 沢田共訳): “カウンター・カーレント” 第1版 16(1958), 南江堂.