UDC 547.94:582.937

256. 金子秀彦, 藤本理平, 難波健輔, 池田 登: 本邦産印度蛇木成分分析 (第1報)

総アルカロイドの定性, 定量

Hidehiko Kaneko, Rihei Fujimoto, Kensuke Namba, and Noboru Ikeda:

Analysis of Alkaloids in the Domestic *Rauwolfia serpentina*Root. I. Qualitative and Quantitative Determination
of Total Alkaloid Assay.

(Research Laboratory, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.*1)

Total alkaloid assay in *Rauwolfia serpentina* root was modified to use petroleum ether for preliminary extraction, by which the emulsion was prevented and analytical procedure was improved. The total alkaloid content in domestic plant was measured by this modified method using individuals according to age of the plant and to month of the year. The relative content ratio of strong basic alkaloids was roughly estimated by using ultraviolet spectra of total alkaloids. The pattern on the paper chromatogram of the total alkaloid in the domestic plant was similar to that of the foreign origin. The low content of strong basic alkaloid in the domestic plant seemed to be the distinct difference from the plant of the foreign origin.

(Received March 26, 1962)

血圧降下剤, 鎮静剤などの医薬品の原料植物として現在広く利用されている印度蛇木 (*Rauwolfia serpentina* BENTH) は元来インドを中心とする東南アジアの熱帯地方に野生している植物であるが, 近年わが国においても栽培の研究がなされ, 鹿児島県, 高知県, 宮崎県などの一部無霜地帯において露地栽培が可能とされるに至っている. しかしながら熱帯とは気候, 風土を異にする条件で栽培を行なった場合, 原産地と比べ含有成分が変化することが考えられる. 著者はこれを調査する目的で国内栽培品の含有アルカロイドの定性的, 定量的検討を行ない原産地のものと比較を行なった. 試験方法として (i) 総アルカロイド (以下 TA と略) 含量の定量, (ii) UV スペクトルによる強塩基含量の相対的な比較, (iii) ペーパークロマトグラフィー (以下 PPC と略) による含有アルカロイドの検出などを行なった.

(i) 総アルカロイドについて a) 定量法 ラウオルフィア根の TA 定量法はすでに第7薬局方に収載されているが, 著者が国内栽培品について本定量法を行なった場合, 抽出操作過程において根中に夾雑する樹脂分に起因すると思われる乳化がしばしばおこり, 以後の分離操作を著しく困難ならしめた. よって著者はこれらの乳化を抑え, かつ上記日局法に比し時間的短縮をはかった. Chart 1 に示す定量法を考案し, 国内栽培品の分析に適用した. すなわち著者法の日局法と異なる点は原生薬をエタノールでまず抽出し, えられたエキスを 5N 酢酸に溶解し, この溶液を石油エーテルで振盪して脱脂後, 以下日局法と原理的に類似の実験の部に記載したようなアルカロイドの定量行程を行なうにある. Table I に示すように本法と日局法との間には分析値に有意差は認められず, なおまた石油エーテル移行部はマイヤー試薬によるアルカロイド反応がわずかに認められる程度で PPC ではアルカロイドは検出されなかった.

Table I. Comparison of the Proposed Method with J.P. VII Method

Sample	Proposed method	J.P. VII method
1	2.6	2.7
2	2.2	2.2
3	2.1	2.3
4	2.2	2.1
5	2.7	2.6
6	2.8	2.6

*1 Kami-ebie, Fukushima, Osaka.

Chart 1. Quantitative Determination of Total Alkaloid of *R. serpentina*

b) TA 含量の生育年数による変化および季節的消長 本植物の根の TA 含量は文献によりまちまちであり一定しない。Badhwar ら¹⁾はインド原産地のもので 1.0~1.3% とのべ、第 7 薬局方に収載されたラウオルフィア根の TA はインド薬局方と同様 0.8% 以上と規定されている。しかしながら著者が市販品 11 ロットを無作為的に抽出し、これらを分析してえた平均 TA 含量は 2.18% (σ 0.32) でかなり高い含量を示した。これと比較したとき今回国内栽培品 1 年生株、2 年生株、3 年生株、4 年生株 (以上いずれも 11 月より 3 月までの落葉期採集) 計 74 ロットの各年ごとの平均 TA 含量は Table II に示すようにいずれも高く、推計学的にもインド産のものと比べ有意差が認められたが、生育年数による TA 含量の有意差は認められない。

Table II. Correlation between Content of Total Alkaloid and Age of Plant in Domestic *R. serpentina* and U.V. Absorbance of Total Alkaloid at 307 m μ (250 γ /10 ml. EtOH)

Age of plant	No. of test plant	Total alkaloid content in root (%)			Extinction at 307 m μ (250 γ /10 ml. EtOH, 1 cm.)
		$\bar{x}$	$\frac{\sigma}{\pm 1.98\sqrt{n}}$	σ	
First-year growth	12	2.55	± 0.209	0.365	0.215
Second-year growth	34	2.47	± 0.134	0.394	0.249
Third-year growth	16	2.36	± 0.082	0.193	0.343
Fourth-year growth	12	2.46	± 0.188	0.329	0.361
Commodity from India	11	2.18	± 0.191	0.320	0.475

1) R.L. Badhwar, et al.: The Indian Forester 81, 258(1955).

つぎに本植物の TA 含量の季節的変動については未だ報告が見られないが, 今回著者は 4 年生株の 4 月より順次翌年 2 月までの各月採根検体について TA 含量を分析して季節的な消長を調べた. その成績は Table III^{*2} に示すように TA 含量は植物生長期の 6 月, ついで 7 月が最高値を示し, 生長停止期の 11 月, 12 月が最低値を示した.

Table III. Seasonal Variation of Total Alkaloid Content in Domestic *R. serpentina*

Harvest time	April	May	June	July	Aug.	Sept.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.
Total alkaloid content (%)	2.3	2.2	2.8	2.6	2.5	2.5	2.5	2.1	2.1	2.4	2.2

Fig. 1.
U.V. Spectra of Total Alkaloid
at 250 γ/10 ml. EtOH

(ii) UV スペクトルによる強塩基含量比較 本植物の根には 20 種近いアルカロイドが含有されているが, このうち主なアルカロイドである serpentine, serpentinine の強塩基のみが 307 mμ に強い吸収極大を示すのに反し, 他のアルカロイドはこの位置にほとんど吸収を示さない. この吸収は TA のような混合アルカロイドにおいても Fig. 1 のように見られ, これを利用して各ロットの TA の一定濃度における 307 mμ の吸光度を相互に比較すれば強塩基含量の多少を相対的に知ることができる. 著者は国内栽培品の強塩基含量の相対的な比較を routine に知るためにこの方法を用いた. 1 年生~4 年生株の TA の吸光度 ($E_{307\text{ m}\mu}$) は Table II に示されるが, Table II より明らかなように生育年数が長くなるにしたがい 307 mμ の吸光度は増加し, したがって強塩基含量が年数とともに増加することを意味する. しかしながらインド産のそれと比べた場合 4 年生株でも未だかなり小さいので, 国内栽培品の強塩基含量は原産地のものに比しかなり少ないことを示唆するものである.

(iii) PPC 法によるアルカロイドの鑑識 PPC により本植物中の多数のアルカロイドを同時に分離すること

Fig. 2.
Paper Chromatogram of Rauwolfia Alkaloids

S: serpentine, Y: yohimbine, Rs: reserpine, Rc: rescinnamine, Ri: reserpinine, Ac: ajmalicine, Aj: ajmaline, Si: serpentine, Yα: 3-epi-α yohimbine, M: mixture of nine alkaloids, R. dom: domestic *R. serpentina*, R. com: India

^{*2} 各月検体 3~5 株を一群とし, その混合粉末を試料に用いて分析し, 分析値 2 回の平均値を記載している.
2) J.C. Carol, D. Banes, J. Wolf, H.O. Follisheer: J. Am. Pharm. Assoc. 45, 200(1956).

とは不可能であるが、著者は主アルカロイドを対象として国内栽培品について Carol ら²⁾の法に準じて PPC を行なった。得られたクロマトグラム (Fig. 2) の pattern は国内栽培品とインド原産地のものとほとんど差異は認められなかった。しかし reserpinine および ajmalicine の 2 コのスポットが国内栽培品ではインド産に比し著しく大きく、これに反し原点付近の serpentine + serpentinine のスポットが著しく弱い。このことは前述の UV スペクトル法による強塩基含量比較の結果と良く一致する。

実 験 の 部

総アルカロイド定量法 *Rauwolfia serpentina* BENTH. の根の乾燥粉末*³ 約 15 g を秤量後円筒汙紙に入れ Soxhlet 抽出器で、第一回 EtOH 150 ml で 5 hr、第二回は EtOH 100 ml で 3 hr 抽出、両抽出液を合し磁製蒸発皿に入れ水浴上で濃縮、残渣を 5N AcOH 25 ml に溶解、200 ml 分液ロートに入れ石油エーテル 25 ml ずつ 2 回洗滌後、石油エーテル層は 5N AcOH 5 ml で抽出、両 AcOH 液を合し CHCl₃ 25 ml を加え振盪しながら 30% NaOH でアルカリ性とし、EtOH 25 ml, Et₂O 100 ml を加え、さらに 2N H₂SO₄ 30~50 ml を加えて酸性となし振盪後分液、有機溶媒層はさらに 0.5N H₂SO₄ 20 ml×2, 10 ml×3 計 5 回で抽出。水層をさきの水層と合し NH₄OH 試液 5 ml を加えた後 CHCl₃ 30 ml, 20 ml×3, 10 ml×2 計 6 回抽出。各 CHCl₃ 抽出液を合する (A)。水層はついで 20% NaOH 20 ml を加え CHCl₃ 20 ml, 10 ml で抽出、この CHCl₃ 液を (B) とする。前記 CHCl₃ 抽出液 (A) は蒸留水 20 ml で水洗後汙過し、コニカルビーカー (200 ml) にとる。水層は CHCl₃ 液 (B) に混ぜ振盪後、CHCl₃ 層を汙過し (A) の洗滌後の汙液に合する。水層は NH₄OH 試液 0.5 ml を加え CHCl₃ 5 ml×2 で抽出、CHCl₃ を汙過して (A), (B) の汙液に合し、ビーカー中の CHCl₃ 量が 5 ml になるまで濃縮後、はかりびんに移し、ビーカーを CHCl₃ 2 ml ずつ 3 回洗い洗液を同じはかりびんに加えて CHCl₃ 留去、残留物を 80°, 3 mmHg, 3 hr. 減圧乾燥後、総アルカロイドとして秤量し含量を算出。

総アルカロイドUVスペクトル測定 総アルカロイド 2.5 mg を厳密に秤量し、これを EtOH 100 ml に溶解、この溶液を自記紫外分光光度計でスペクトラムを作製し (Fig. 1), その 307 m μ の吸光度 ($E_{307\text{ m}\mu}$) を記録。

ペーパークロマトグラフィー TA の EtOH 溶液を試料とし、東洋汙紙 No. 50 を固定相とし Carol らの法²⁾により行なった。アルカロイド検出には UV 照射 (汙紙にトリクロル酢酸を前もって粉霧), Dragendorff 試薬を用いた。試料にはインド産植物ならびに本邦産植物の総アルカロイド、対照に reserpinine, ajmalicine, reserpine, rescinnamine, ajmaline, yohimbine, 3-epi- α -yohimbine, serpentine, serpentinine などを用いた。

終りに本研究に御賛同、御協力戴きました厚生省薬務課関係者、鹿児島、宮崎、高知県薬務課関係者、国立衛生試験所 刈米所長、高城種子島薬用植物栽培試験場長に御礼申し上げます。また本研究に終始御鞭撻を賜った当社 加藤常務、筒井研究所長、於勢次長に深謝します。

大日本製薬株式会社中央研究所

*³ 80°, 3 hr 減圧乾燥品。