強は認められないと考えられ、上記の結果は RJ-lectin は Ehrlich 癌細胞に直接作用してその増殖を抑制するものであることを強く示唆していると考えられる。

謝辞 ニホンアカガエル卵 lectin を供与された本学癌研究所、川内広明教授に深謝します。本研究は日本私学振興財団学術研究振興資金により援助されたことを記し、感謝の意を表します。

〔薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
98 (7) 976-979 (1978)〕

UDC 615.322.011.5.074:543.544.2.06

高速液体クロマトグラフィーによる生薬分析：オウレン、オウバク¹⁾

石川 治, 橋本 勉,^{2a)} 中嶋暉躬, 田中 治,^{2b)} 糸川秀治^{2c)}

東洋曹達工業(株)研究所,^{2a)} 広島大学,^{2b)} 東京薬科大学^{2c)}

Application of High-speed Liquid Chromatography to Analysis of Crude Drugs: Quaternary Alkaloids of Coptidis Rhizoma and Phellodendri Cortex¹⁾

OSAMU ISHIKAWA, TSUTOMU HASHIMOTO,^{2a)} TERUMI NAKAJIMA,
OSAMU TANAKA,^{2b)} and HIDEJI ITOKAWA^{2c)}

Toyo Soda Co., Ltd.,^{2a)} University of Hiroshima^{2b)} and Tokyo
College of Pharmacy^{2c)}

(Received January 13, 1978)

For the analysis of Coptidis Rhizoma, high-speed liquid chromatography was examined, not only for its major alkaloid, berberine, but also for its minor alkaloids. It was found that under an appropriate condition [on starch gel (LS-170), eluted with the solvent system of H₂O:MeCN:AcOH:Et₃N=80:20:0.3:0.745, pH 8.5], sufficient separation of berberine, magnoflorine, jatrorrhizine, palmatine, coptisine, and some other unidentified alkaloids was obtained. By means of the present procedure, content of berberine and relative content of palmatine and coptisine to berberine in some of wild and commercial coptis rhizomes were determined. Since the solvent system does not contain any non-volatile salt, the present technique also offers the possibility of application to rapid-preparative separation of alkaloids of this type by liquid chromatography. The application to analysis of alkaloids of phellodendron-cortex is also described.

Keywords—high-speed liquid chromatography; Coptidis Rhizoma; Phellodendri Cortex; berberine; coptisine; palmatine; jatrorrhizine; magnoflorine; quantitative analysis of crude drugs

オウレン (Coptidis Rhizoma), オウバク (Phellodendri Cortex) 中のベルベリンの定量法については種々報告されている³⁾。

今回著者は、主塩基ベルベリンだけでなく副塩基類についても迅速な分離定量および製造的精製を目的として高速液体クロマトグラフィーを検討し、良好な結果を得たので報告する。

1) 日本生薬学会第 24 回年会で発表、東京、1977 年 10 月 1 日。

2) Location: a) 2743-1, Ayase-cho, Koza-gun, Kanagawa; b) 1-2-3, Kasumi, Hiroshima-shi; c) 1432-1, Horiouchi, Hachioji, Tokyo. Correspondance should be addressed to O. Tanaka.^{2b)}

3) 沢田徳之助, 山原條二, 楊 瑞齡, 生薬, 24, 65 (1970); 沢田徳之助, 山原 條二, 巖千代江, 生薬, 26, 15 (1972); 木村康一, 野呂征男, 半田清作, 生薬, 26, 141 (1972); 沢田徳之助, 山原條二, 金真里子, 生薬, 27, 12 (1973); 武良哲雄, 富永敏夫, 生薬, 27, 63 (1973); 武良哲雄, 富永敏夫, 生薬, 27, 135 (1973); 沢田徳之助, 山原條二, 新谷佳子, 生薬, 28, 150 (1974); 野口 衛, 持田研秀, 生薬, 30, 47 (1976); 橋本康平, 安藤敬子, 水野瑞夫, 生薬, 30, 127 (1976); 赤田良信, 棚瀬弥一郎, 薬誌, 97, 980 (1977); 服部忠雄, 井上正秀, 早川昌克, 薬誌, 97, 1263 (1977); 服部忠雄, 神谷則賢, 井上正秀, 早川昌克, 薬誌, 97, 1305 (1977)。

実験

試料液の調整 生薬を日局 9 に準じ乾燥し、その粗切 500 mg をメタノール 100 ml で 7 時間還流抽出し、試料抽出液とした。抽出液はメタノールを加え正確に 100 ml とし、その 5 μ l をそのままカラムに注入することにより分析した。

高速液体クロマトグラフ 装置：HLC-802-M, カラム：LS-170 (東洋曹達製), 4 mm, I. D. $\times$ 30 cm, LS-110 (東洋曹達製), 4 mm I. D. $\times$ 30 cm, 検出器：分光光度計 (350 nm), 流速：0.65 ml/min, 温度：室温

結果

LS-170 カラムによる分離条件の検討

分離用担体として種々検討した結果、硬質デンプンゲルである LS-170 が最適であると考えられた。このカラムについて溶離液の組成比を $\text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{CN} : \text{CH}_3\text{COOH} : (\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N} = 80 : 20 : 0.3 : 0.3$ からトリエチルアミンを増していくことにより pH を上げて pH と各塩基の k' ($k' = (t_R - t_0)/t_0$, t_0 : 溶媒の流出時間, t_R : 各サンプルの溶出時間) の関係を調べると Fig. 1 に示すようになった。

その結果 pH 8.5 付近が未同定のピークを含めて、各塩基間の分離がもっともよく、すなわち $\text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{CN} : \text{CH}_3\text{COOH} : (\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N} = 80 : 20 : 0.3 : 0.745$ の組成比の溶媒を実試料の測定条件とした (Fig. 2)。

検量線 コプチシン、ベンベリン、パルマチンについてそれぞれメタノール溶液を調整し、その 5 μ l を注入することにより得られたクロマトグラムのピークの高さと注入量との関係は、Fig. 3 に示すように、原点を通る直線であった。

LS-110 カラムによる分離条件の検討

スチレン系のゲルである LS-110 について分離条件を検討した結果 LS-170 の場合と同様、酸性側とアルカリ側では塩基の溶出順序が異なり、かつ LS-170 のクロマトグラムと比較しても、クロマトグラムに相異が

Fig. 1. Dependence of k' on pH

C: coptisine, B: berberine,
P: palmatine, J: jatrorrhizine.

Fig. 3. Calibration Curve

P: palmatine, B: berberine, C: coptisine.

Fig. 2. Chromatogram of Coptidis Rizoma

Column LS-170 4 mm i.d. $\times$ 30 cm, flow rate 0.65 ml/min,
Eluate $\text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{CN} : \text{CH}_3\text{COOH} : (\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N} = 80 : 20 : 0.3 : 0.745$,
Detector Vis(350 nm), 0.16 AUFS, temperature R.T.

M: magnoflorine, P: palmatine,
J: jatrorrhizine, Un3.: unidentify 3,
Un1.: unidentify 1, B: berberine,
Un2.: unidentify 2, C: coptisine.

Fig. 4. Chromatogram of Coptidis Rhizoma

Column LS-110 4 mm i.d. × 30 cm,
flow rate 0.65 ml/min,
eluate $H_2O:CH_3CN:CH_3COOH:(C_2H_5)_3N=$
 $75:25:0.3:0.8$,
detector Vis(350 nm), 0.16 AUFS,
temperature R.T.

M: magnoflorine,
J: jatrorrhizine,
Un2.: unidentify 2,
Un3.: unidentify 3,
C: coptisine,
P: palmatine,
B: berberine.

Fig. 5. Chromatogram of *Jeffersonia dubia* (Berberidaceae)

Column LS-170 4 mm i.d. × 30 cm,
flow rate 0.65 ml/min,
eluate $H_2O:CH_3CN:CH_3COOH:(C_2H_5)_3N=$
 $80:20:0.3:0.745$,
detector Vis(350 nm), 0.02 AUFS,
temperature R.T.

た. 未同定のピークを含めた各塩基間の分離はアルカリ側がよく, Fig. 4 に示すようであった.

各地オウレン, オウバクの分析結果

LS-170 カラムによる高速液体クロマトグラフィーにより, 各地オウレン中のベルベリンの含量およびベルベリンを 100 とした場合のパルマチン, コプチシンの相対値を比較した結果, Table I に示すようになった. その結果, ベルベリン含量にかなりばらつきが見られた. また沢田らによれば抗菌作用が他のアルカロイドより強いと言われるコプチシ

ンの相対値も違いが見られ, すでに指摘されているように島根県産のものは非常に多いということが注目された.⁴⁾

TABLE I. Alkaloid-Contents in Coptidis Rhizoma

Sample	Berberine content (%)	Relative content (berberine=100)	
		Palmatine	Coptisine
Wild			
W-1 Shimane-ken, Yatsuka-gun	6.0	1.8	17.9
W-2 Hiroshima-ken, Takada-gun	8.1	1.5	8.8
W-3 Hiroshima-ken, Saiki-gun	8.1	2.4	9.5
W-4 Hiroshima-ken, Saiki-gun	8.7	2.3	8.9
W-5 Hiroshima-kun, Saiki-gnn	7.9	1.7	5.9
W-6 Hiroshima-ken, Kohnu-gun	7.0	3.7	13.2
Commercial			
C-1	9.2	2.0	7.5
C-2	5.2	0.7	12.1
C-3	8.2	2.3	10.1
C-4	8.0	2.4	6.6
so-called Burma-Coptidis rhizoma	8.1	5.6	17.4

4) 沢田徳之助, 山原條二, 後藤勝実, 山村みどり, 生薬, 25, 74 (1971).

一方いわゆる鮮オウレン (韓国産 *Jeffersonia dubia* BENTH *et* Hook, Berberidaceae) について同様に分析した結果, Fig. 5 に示すように日本産オウレンは全く異なるクロマトグラムを示した.

オウバクについても Fig. 6 に示すようにオウレンと同様に分析可能であった.

考 察

今回使用した高速液体クロマトグラフィー用分離担体である, 硬質デンプンゲル LS-170 によりオウレン, オウバク中のアルカロイド類の迅速な分析が可能となり, 生薬および生薬製剤の品質評価に役立つものと思われる. また, 350 nm に吸収のあるニトロアニリン, ジメチルニトロアニリン, ニトロリアニソールを用い内部標準物質として使用可能かどうか検討を行なったが, Fig. 2 の条件では LS-170 を用いた場合, Unidentify 3 よりも前に溶出されるが, LS-110 を用いた場合にはこれらの物質は強く吸着されベルベリンよりも遅れて溶出されるか, ほとんど溶出されないという状態であった. このため内部標準は用いずに定量にはそのままのピーク高を測定することにより行なった.

またこのような芳香族化合物の溶離態度に比べ, ベルベリン型塩基が Fig. 2, Fig. 4 に示すような溶出パターンを示すのはこれら塩基に特異的なものであるとも考えられ, 両者を併用することにより, さらに分析結果が良好になるものと考えられた. また以上の分析法は塩基類をそのままの形でかつ塩類を用いることなく揮発性の溶媒のみを用いて分離するものであるからそのまま分離製造にも応用することができる.

謝辞 御指導ならびに試料を提供していただきました広島大学山崎和男助教授に深謝いたします.

Fig. 6. Chromatogram of Phellodendri Cortex

Column LS-170 4 mm i.d. $\times$ 30 cm,
flow rate 0.65 ml/min,
eluate $\text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{CN} : \text{CH}_3\text{COOH} : (\text{C}_2\text{H}_5)_3$
 $\text{N} = 80 : 20 : 0.3 : 0.745$,
detector Vis(350 nm), 0.16 AUFS,
temperature R.T.