

オウバク中に含まれるベルベリンの イオンペアー HPLC 法による定量分析

永松 久実・武田 美雄・稲垣 昌宣・西 博行

Ion-pair HPLC Determination of Berberine in *Phellodendri Cortex*

Kumi NAGAMATSU, Yoshio TAKEDA, Masanori INAGAKI and Hiroyuki NISHI

1. 緒 言

オウバク *Phellodendri Cortex* は、アジア東北部の山地に自生するミカン科の落葉高木キハダ *Phellodendron amurense Ruprecht*, 又は *Phellodendron chinense Schneider* の周皮を除いた樹皮のことで、漢方では、健胃整腸剤として用いられる。日本古来の民間薬である「陀羅尼助（だらにすけ）」¹⁾には、このキハダのオウバクエキスが用いられており、現在でもオウバクは主に健胃薬として温清飲等の漢方処方に汎用されている。

オウバクは、オウバクエキスとともに日局 6（昭和26年 3月 1日 公示, 収載品 634）から収載されており、その主要成分はイソキノリンアルカロイドのベルベリンである（図 1 参照）。平成 23年 4月より適用された日局 16（収載品 1764）²⁾では、オウバクのほか、オウバク末、ハップ用複方オウバク散、オウバク・タンナンピン・ビスマス散の計 5 品目が収載されている。このうちオウバク及びオウバク末については、ベルベリン含有量が規定されており、換算した生薬の乾燥物に対して定量値 1.2% 以上（ベルベリン塩化物として）となっている。一方、ベルベリンは、化学医薬品の塩化ベルベリンとして日局 7（昭和36年 4月 1日, 収載品 1227）から収載された。一方、ベルベリンを含むオウレン *Coptidis Rhizoma* は、日局 2（明治24年 5月 20日, 収載品 445）に早くも収載され、日局 16 では、オウレン、オウレン末、黄連解毒湯エキスの 3 品目が収載されている。

上記のオウバクやオウレンに含まれるベルベリンについては、1980年前後からのクロマトグラフィー、特に ODS カラムテクノロジーの進展とともに、HPLC による測定法が検討され、日局 12（平成 3年 3月 25日 公示, 収載品 1221）に HPLC 定量法が採用された。この手法は、固定相に ODS カラム、移動相にラウリル硫酸ナトリウム（SDS）を使用する、ソープクロマトグラフィーと呼ばれる一種のイオンペアークロマトグラフィーである。当時の逆相固定相に用いられたシリカゲルの多くは、その純度の問題（シリカゲルに微量に混在する金属類）やシリカゲル表面の ODS 基に対する未反応シラノール基の影響で、塩基性化合物を分析する際は、吸着によりピーク形状が悪く、テーリングするケースが多く見受けられた。このような場合によく採用された手法が、SDS を添加した移動相による本手法である。この方法は、総合感冒薬に配合されているトリプロリジン塩酸塩、ジフェンヒドラミン塩酸塩、クロルフェニラミンマレイン酸塩やエフェドリン類といった塩基性薬物の定量などにも汎用されている³⁾。

このように SDS を用いる逆相 HPLC 法は、塩基性化合物、また、これらを含む複合製剤の定量法⁴⁾として有用であるが、SDS を一度用いたカラムにはその履歴が残り、洗浄を行っても、なかなか十分に洗浄できない。そのため、他成分の分析に用いた場合など、再現性が著しく劣るなどの問題があり、現実的には専用のカラムとして用いる場合が大多数である。本学薬学科の天然物化学実習では、オウバクからのベルベリンの抽出・単離と HPLC 法による定量法を日局法（公定法）によって実施（図 2 参照、ただし 25 cm カラム）しているが⁵⁾、専用のカラムで対応している。そこで今回、SDS を用いない手法について、分析用として汎用されるサイズである 15 cm カラムを用いて検討を行い、オウバクからのベルベリンの抽出と HPLC 定量を行ったので報告する。

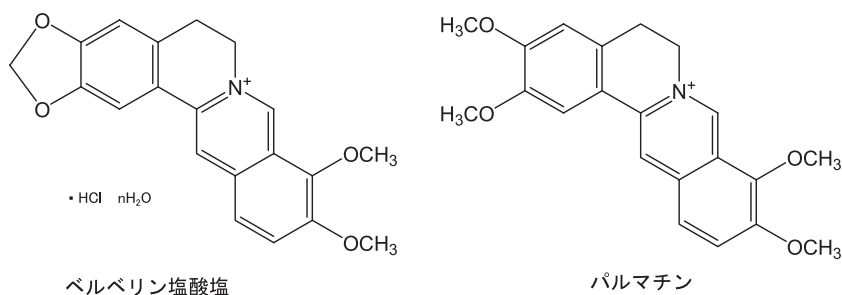
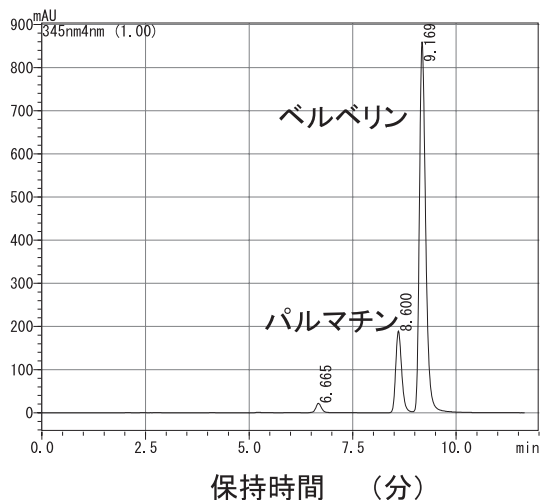


図 1 ベルベリン及びパルマチンの化学構造



操作条件：カラム：COSMOSIL 5C18-AR- II (5 μm, 4.6 ID × 250 mm)

その他の条件は本文参照

図 2 日局法（公定法）によって実施したオウバク抽出液中のベルベリンの定量
（試料溶液の HPLC クロマトグラム）

2. 方 法

2.1 装 置

HPLC 装置は、(株)島津製作所(京都)のポンプ LC-20AB, オートインジェクター SIL-20AC, システムコントローラ CBM-20, フォトダイオードアレー検出器 SPD-M20A, カラムオープン CTO-20A, デガッサー DGU-20A₃ を使用した。

カラムは ODS カラムである Phenomenex Gemini-NX5u C18 (5 μ m, 4.6 ID \times 150 mm) (島津ジーエルシー, 京都) を使用した。また, SDS を使用する専用カラムとしては, COSMOSIL 5C18-AR- II (5 μ m, 4.6 ID \times 250 mm) (ナカライテスク, 京都) を使用した。なお, カラム温度は 40 $^{\circ}$ C の一定とし, ポンプの流量は, 1.0 mL/min, 検出は 345 nm とした。

2.2 試 薬

メタノール及びアセトニトリルは, 和光純薬工業(株) (大阪) の高速液体クロマトグラフィー用を, 塩酸, 85%リン酸, リン酸二水素カリウムは和光純薬工業(株)の試薬特級を購入し, 1-オクタンスルホン酸ナトリウムと 1-ペンタンスルホン酸ナトリウムは, 和光純薬工業(株)のイオンペアクロマトグラフ用を使用した。SDS は, ナカライテスクのイオンペアクロマトグラフ用を購入した。ベルベリン原薬及びパルマチン原薬 (いずれも塩化物) は, 本学薬学科天然物化学分野から供与されたものをそのまま標品として, また, オウバク原生薬は, 日本市場品 1 ロットを使用した。

2.3 日局法 (日局16) によるオウバク中のベルベリンの定量

本品の粉末約 0.5 g を精密に量り, メタノール/希塩酸混液 (100 : 1) 30 mL を加え, 還流冷却管を付けて水浴上で 30 分間過熱し, 冷後, ろ過する。残留物は, メタノール/希塩酸混液 (100 : 1) 30 mL 及び 20 mL を用いて, 更にこの操作を 2 回行う。最後の残留物にメタノール 10 mL を加え, よく振り混ぜた後, ろ過する。全ろ液を合わせ, メタノールを加えて正確に 100 mL とし, 試料溶液とする。別に, ベルベリン塩化物標準品約 10 mg を精密に量り, メタノールに溶かして正確に 100 mL とし, 標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 20 μ L ずつを正確にとり, 次の条件で液体クロマトグラフィー <2.01> により試験を行う。

操作条件

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：345 nm)

カラム：内径 4 ~ 6 mm, 長さ 15 ~ 25 cm のステンレス管に 5 ~ 10 μ m の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充てんする。

カラム温度：40 $^{\circ}$ C 付近の一定温度

移動相：水/アセトニトリル混液 (1 : 1) 1000 mL にリン酸二水素カリウム 3.4 g 及びラウリル硫酸ナトリウム 1.7 g を加えて溶かす。

流量：ベルベリンの保持時間が約 10 分になるように調整する。

カラムの選定：ベルベリン塩化物標準品及び塩化パルマチン 1 mg ずつをメタノールに溶かして 10 mL とする。この液 20 μ L につき, 上記の条件で操作するとき, パルマチン, ベルベリンの順に溶出し, それぞれのピークが完全に分離するものを用いる。

試験の再現性：上記の条件で標準溶液につき, 試験を 5 回繰り返すとき, ベルベリンのピー

ク面積の相対標準偏差は1.5%以下である。

2.4 新 HPLC 条件

検討の結果、採用した操作条件（移動相）を以下に記す。

操作条件

移動相：薄めた酢酸（1 → 1000）／メタノール混液（9：11）に1-オクタンスルホン酸ナトリウム1.7 gを加えて溶かす。

検出器、カラム、カラム温度、流量、カラムの選定及びカラムの再現性は、日局法と同様である。

2.5 検量線の作成

ベルベリン原薬約25 mgを精密にはかり、メタノールに溶かし、正確に50 mLとした。この液をそれぞれ1, 2, 3, 4 mLを正確にとり、移動相を加えて全量を正確に5 mLとし、0.1, 0.2, 0.3, 0.4及び0.5 mg/mL濃度の検量線作成用試料溶液を調整した。これらの試料溶液20 μ Lずつを正確にとり、2.4に示した液体クロマトグラフィー操作条件により試験を行った。

3. 結果および考察

3.1 移動相及びイオンペアー試薬の検討

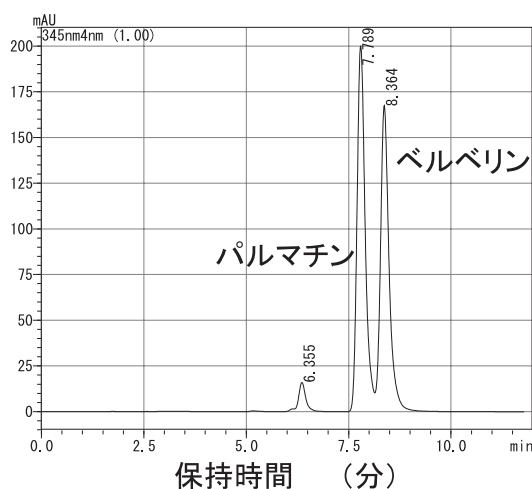
ベルベリンの HPLC 分析法に関しては多くの報告がある^{6~11)}。その中でイオンペアー試薬を使用していないものを参照し^{6,7)}、0.1%酢酸と有機溶媒混液を移動相として、上記2.3に記載のカラムの選定に用いる溶液（以下、カラム選定用試料溶液）の分析を行った。カラムの選定に用いられているパルマチンは、オウバク、オウレンに含まれているイソキノリンアルカロイドの一種である。化学構造は、図1に示したようにベルベリンのメチレンジオキシ基がジメトキシ基になっている化合物で、図2に示したようにベルベリンのピークの直前に溶出する。含有量はベルベリンに対して5分の1前後である⁸⁾。

メタノール（25%）を用いた場合では、約4.5分のところに2成分は分離して（分離係数 $\alpha=1.275$ ）溶出したもののテーリングが認められ（シンメトリー係数 $S=1.08$ ）、理論段数は極めて悪かった（約2000段）。そこで有機溶媒をアセトニトリル（13%）に変更して分析を行ったが⁷⁾、今度は溶出時間が遅い（11.5分）のにも関わらず、分離選択性がメタノール使用の場合に比べて劣った（ $\alpha=1.166$ ）。

そこで有機溶媒にはメタノールを用いることとし、0.1%酢酸／メタノール混液をベースに検討を行うことにした。イオンペアー試薬がない条件で分離が達成されていた報告^{6,7)}があったが、これは他成分との分離も含めてのグラジエント溶出法であることが理由と考えられ、アイソクラティック溶出法での検討ではピーク形状が劣った。そこでこの改善を目的としてイオンペアー試薬の使用を試みた⁸⁾。イオンペアー試薬には、アルキル鎖の長さが異なる様々なものが市販されているが、塩基性化合物の分離に汎用されている2種類、すなわち、1-ペンタンスルホン酸ナトリウム（ C_5SO_3Na ）と、1-オクタンスルホン酸ナトリウム（ C_8SO_3Na ）を用いた。添加量は、SDSの添加量と同じ量（約1.7 g）として比較検討したところ、後者のほうがシンメトリー係数、理論段数ともに勝っていたので、 C_8SO_3Na を使用することとした。なお、1.7 g添加

は、SDS (Mw : 288.4) では約 6 mM に、C5SO₃Na (Mw : 174.2) では約 10 mM に、C8SO₃Na (Mw : 216.3) では約 8 mM に相当する。

図 3 に新 HPLC 移動相条件でのカラム選定用試料溶液を分析したときのクロマトグラムを示す。新規法においては表 1 に示すとおり、カラムの理論段数 N は約 8000 段、分離度 R_s は 1.58 であり、ベルベリンとパルマチンが完全に分離 (R_s > 1.5) されることが分かった。今回使用した 15 cm カラム (流量 1.0 mL/min) では、345 nm 検出なのでシグナルは出ていないが、ポイドボリューム t₀ は 1.45 min で、キャパシティーファクター k は 5 前後であった。なお、イオンペアー試薬の添加濃度の増加とともに試料の保持時間は遅くなり、それに連動して両ピークの見かけの分離度 R_s も若干の改善が認められたが、その寄与はある一定濃度 (5 mM) 以上の添加では大きくなかったため、上記濃度 (1.7 g 添加) とした。



操作条件：カラム：Phenomenex Gemini-NX5u C18 (5 μm, 4.6 ID×150 mm)
その他の条件は本文参照

図 3 C8SO₃Na を用いる移動相によるベルベリンとパルマチンの分離
(カラム選定用試料溶液の HPLC クロマトグラム)

表 1 日局法 (公定法) 及び新 HPLC 条件におけるパルマチンとベルベリンの分離

測定法	保持時間	理論段数	分離度
日局法 (公定法)	8.224	8675	2.08
	8.969	9798	
新 HPLC 条件	7.789	7653	1.58
	8.364	8086	

3.2 新 HPLC 条件によるオウバク抽出液中のベルベリン定量

図 4 に新 HPLC 移動相条件で、2.5 に従って求めた検量線を示す。検量線の相関係数 R² は 0.999 であり、良好な直線性を示した。なお、ベルベリンの定量値はオウバクでは 1.2% 以上、オウレンでは 4.2% 以上 (いずれもベルベリン塩化物として) と規定されており、オウバクでのベルベリンの報告されている平均含有量は 5 ~ 8% であることから^{9), 10)}、検量線範囲は 0.1 mg/mL

(2%相当) ~ 0.5 mg/mL (10%相当) とした。また、試験の再現性(標準溶液5回分析でのベルベリンピーク面積の相対標準偏差)は0.04%となり、良好であった。

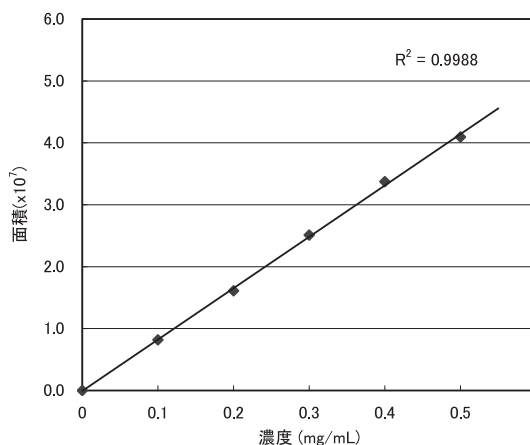
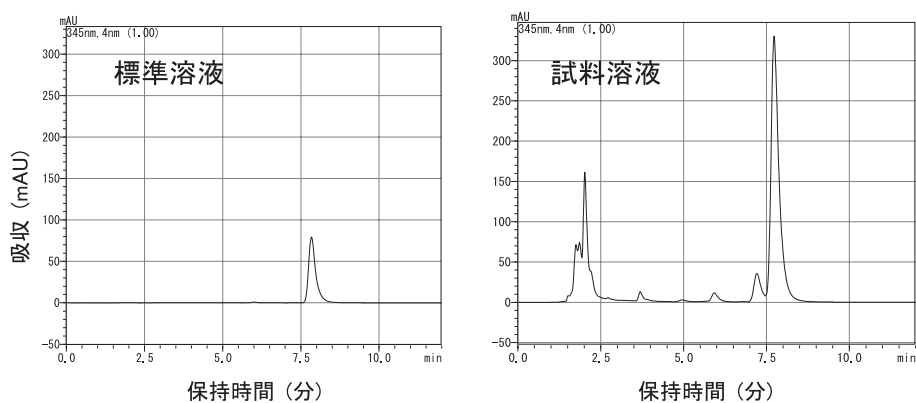


図4 新HPLC条件での検量線

応用として、日本市場品1ロットのオウバクに含まれているベルベリンを日局に従って抽出し、ベルベリン原薬をそのまま標品として用いて定量した(n=5)。その時の標準溶液及び試料溶液のクロマトグラム例を図5に示す。分析の結果、ベルベリンの平均含有量は5.29%であり、日局適合のオウバクであることが確認された。なお、5回測定における定量値の相対標準偏差は1.57%であった。



カラム：Phenomenex Gemini-NX5u C18 (5 μm, 4.6 ID×150 mm)

図5 新HPLC条件によるオウバク抽出液中のベルベリンの定量

最後に比較のため、イオンペアー試薬の検討に用い、SDSを使用していなかったPhenomenex Gemini-NX5u C18 (5 μm, 4.6 ID×150 mm)で、SDSを用いる日局法(公定法)での分離を行った。結果を表1にあわせて示す。SDSを添加した条件のほうがR_sが優れていたが、新

HPLC 条件でパルマチンとベルベリンのピークは完全に分離 ($R_s > 1.5$) しており、汎用性を考えると新 HPLC 条件のほうが有用であると判断された。

なお、今回の検討では、逆相固定相として薬学科薬品分析化学実習 2 の HPLC 実習で使用している Phenomenex Gemini-NX5u C18 を使用したが、検討の過程で固定相 (ブランド) の違いの影響もあるように見受けられた。また、試料溶液の液性、すなわち、試料の溶解に用いる有機溶媒の割合もピークの形状に大きく影響した。今後、今回の C_8SO_3Na を用いる条件を他の逆相固定相へ適用し、堅牢性に関する検討を、さらには UHPLC モードでの適用について検討を進める予定である。

謝 辞

パルマチン原薬を供与いただきました、本学薬学部神田博史教授に感謝いたします。

引 用 文 献

- 1) 第 2 類医薬品 (H.19.4.1. 施行, 医薬品リスク分類)。吉野山や大峰山の近傍に製造所があり、登山客や行者参りの人々のお土産として人気がある。
- 2) 「第十六改正日本薬局方」, じほう社 (2011)。
- 3) 一般用医薬品の試験法 II ——かぜ薬・解熱鎮痛薬の試験法——, 日本大衆薬工業協会編, じほう社 (2000)。
- 4) Izumoto S., Machida Y., Nishi H., Nakamura K., Nakai H., Sato T., Chromatography of crotamiton and its application to the determination of active ingredients in ointments, *J.Pharm.Biomed.Anal.*, 15 (1997) 1457-1466.
- 5) 天然物化学実習 I 実習書 (2010年度版), 安田女子大学薬学部 (2010)。
- 6) Ren L., Xue X., Zhang F., Xu Quing., Liang X., High performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis of protoberberine alkaloids in medicine herbs, *J. Sep. Sci.*, 30 (2007) 833-842.
- 7) Gao X., Yang X.-W., Marriott J. P., Simultaneous analysis of seven alkaloids in *Coptis-Evodia* herb couple and zuojin pill by UPLC with accelerated solvent extraction. *J. Sep. Sci.*, 33 (2010) 2714-2722.
- 8) Min B.-S., Cho J. S., Quantitative determination of protoberberines from the roots of *Coptis chinensis*, *Natural Product Sciences*, 14(1) (2008) 68-72.
- 9) Hattori T., Kamiya N., Inoue M., Hayakawa M., Analytical studies on the active constituents in crude drugs. II .Determination of berberine in *Coptidis Rhizoma* by high performance liquid chromatography, *Yakugaku zasshi* 97 (12) (1977) 1305-1308.
- 10) Ishikawa O., Hashimoto T., Nakajima T., Tanaka O., Itokawa H., Application of high-speed liquid chromatography to analysis of crude drugs quaternary alkaloids of *Coptidis Rhizoma* and *Phellodendri Cortex*, *Yakugaku zasshi* 98(7) (1978) 976-979.
- 11) Okamura N., Miki H., Ishida A., Ono H., Yada A., Tanaka T., Ono Y., Yagi A., Simultaneous determination of baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin, berberine, coptisine, palmitin, jateorrhizine and glycyrrhizin in kampo medicines by ion-pair high-performance liquid chromatography, *Biol. Pharm. Bull.*, 22(10) (1999) 1015-1021.

Summary

Reversed-phase HPLC determination method of berberine in *Phellodendri Cortex* was investigated with a mobile phase without sodium dodecyl sulfate (SDS) and a 15 cm length analytical size

column. Ion-pair HPLC method with 1-octanesulfonate was found to be effective for the baseline separation ($R_s > 1.5$) of the two compounds, berberine and palmatin, those are used for the selection of column in an official monograph (JP16) of Berberine Chloride Hydrate. Under the developed HPLC operating conditions, linearity was investigated in the concentration range 0.1 ~ 0.5 mg/mL of berberine. A straight line with a correlation coefficient R^2 0.999 was observed, and system repeatability (RSD%) of five injections of the standard solution was 0.04 %. According to the extraction procedure in JP16 and the novel HPLC determination method, berberine in *Phellodendri Cortex* (1 lot), which is purchased in the domestic market, was determined. Average content (n=5) 5.29% was obtained, showing this *Phellodendri Cortex* conforms to JP16. Finally the developed HPLC determination method of berberine was found to be useful as an alternative of the official method JP16.

[2011. 9. 29 受理]