

キャピラリー電気泳動のアコニチン型アルカロイド分析への応用

庵原 聡美, 佐々木桂子, 秋保由美子, 下田はる美, 吉崎 文彦

Application of Capillary Electrophoresis to Analysis of Aconitine Alkaloids

Satomi IHARA, Keiko SASAKI, Yumiko AKIHO, Harumi SHIMODA and Fumihiko YOSHIZAKI

(Received November 22, 2004)

Capillary electrophoresis was applied to the analysis of aconitine alkaloids. An AccuSep capillary column (75 μm i.d. \times 60cm), 0.4M di-sodium hydrogenphosphate - 0.2M citric acid buffer (pH7.0) as the electrophoretic buffer, and 3.5kV as the electrophoretic voltage were employed. Aconitine, hyaconitine and mesaconitine in aconitic tuberous root were separated within about 70min and their contents were obtained.

Key words — capillary electrophoresis; aconitine; hyaconitine; mesaconitine; aconite

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) とは異なる分離モードと特徴を持つキャピラリー電気泳動 (CE) は Jorgenson らによりその応用が報告された¹⁾ 後, 近年操作性の良い装置が市販されるようになり, 現在までに様々なタイプの化合物に応用が試みられている。

CE は生薬中の成分の分析にも応用され, その品質評価や管理などに役立っているが, 著者らもまた現在までに, 防己,²⁾ 陳皮,³⁻⁵⁾ 枳実,³⁻⁵⁾ センブリ,⁶⁾ あるいは呉茱萸⁷⁾ などの主要成分についてそれぞれ分析, 定量の条件を検討して報告してきた。ひき続きここではアコニチン型アルカロイド, aconitine, hyaconitine および mesaconitine の分離, 分析条件を検討し, さらに各種附子, 烏頭中の含有量の測定に適用することを試みた。

実験方法

標準物質および試薬 標品とした aconitine はシグマ化学製 (St. Louis, MO), hyaconitine と mesaconitine は松浦薬業製 (名古屋) のものをそれぞれ用いた。リン酸二水素カリウム, リン酸水素二ナトリウム, 水酸化ナトリウム, ホウ酸, 塩化ナトリウム, 四ホウ酸ナトリウムおよびクエン酸はそれぞれナカライテスク製 (京都)

を用いた。

生薬材料 いずれも中井廣進堂薬局 (神戸) を通じて入手した。A, 修治附子 (日本製, 末); B, 烏頭 (中国香港市場品, 全形); C, 炮附子 (中国流通品, 全形); D, 修治附子 (日本製, 末); E, 烏頭 (中国流通品, 全形); F, 炮附子 (中国四川省市場品, 全形)。そのほか, オクトリカプトの野生種を本学附属薬用植物園で栽培したものの塊根 (秋に採集, そのまま放置乾燥) を G, 葉 (春に採集, 直ちに乾燥) を H とした。

被験溶液の調製 各化合物の標準溶液は, それぞれの濃度となるようにメタノールに溶解して用いた。各生薬からのアコニチン型アルカロイドの抽出は文献⁸⁾ に従った。すなわち, 粉末にして充分乾燥した生薬 500mg をメタノール 5ml で 15 分間超音波処理した後遠心分離し, 上澄液を分取することを 5 回行った。全上澄液は合して減圧下濃縮後メタノールで 5ml とし, 分析に供した。

電気泳動装置 装置は Waters 製 (Milford, MA) の Quanta 4000 system を用い, 805 Data station にて処理した。キャピラリーは 75 μm \times 60cm の同社製アキュセップキャピラリーで, 検出には装置内蔵の紫外部吸収検出器を用い, オンカラム検出法により 254nm にて検知した。試料溶

液の注入は落差法 (10秒) により行った。なお、各アルカロイドの定量はピーク面積法に拠った。

結果および考察

アコニチン型アルカロイドの分析は、既にHPLCによる報告が多数あり、これらを含む生薬とその製剤に適用されて品質評価などに役立っている。⁸⁻¹³⁾ また、血清や尿中における定量法も検討されている。^{14, 15)} しかしながら、CEによる生薬中の分析例は未だ報告されていない。

まず、泳動電圧を10.0kVとし、各種pHの緩衝液を用いて至適pHを検討したところ、中性付近において比較的良好な結果を示した。0.2Mリン酸水素二ナトリウム-0.1Mクエン酸緩衝液を用いた場合のpH6-8におけるaconitine, hyaconitineおよびmesaconitineの分離状況をFig.1に示す。

そこで次に、5種類のpH7.0付近を示す泳動緩衝液を用いて泳動電圧10kVの下、各化合物の泳動時間を比較したところ、Table 1のような結果を得た。最も良好な分離を示したのは0.2Mリン酸水素二ナトリウム-0.1Mクエン酸緩衝液 (pH7.0) であった。

さらにこの泳動緩衝液について、イオン濃度を変化させたときの各化合物の分離の様子を観

察した結果をFig.2に示す。イオン強度が高くなるほど3つの化合物の分離は良くなる傾向であった。しかしそれと同時に泳動電流が極端に高くなり、逆にイオン強度が低いと泳動電流も低

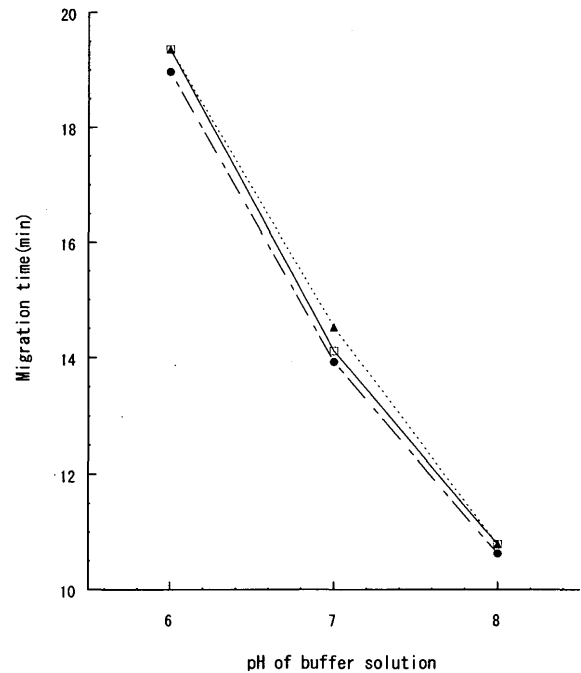


Fig. 1. Influence of pH of the Electrophoretic Buffer on the Migration Time of Aconitine Alkaloids. Electrophoretic buffer, di-sodium hydrogenphosphate - citric acid; migration voltage, 10kV; □, aconitine; ●, hyaconitine; ▲, mesaconitine.

Table 1. Migration Time of Aconitine Alkaloids Performed in Various Kinds of Buffer

Buffer	Migration time (min)		
	Hyaconitine	Aconitine	Mesaconitine
1/15M KH ₂ PO ₄ - 1/15M Na ₂ HPO ₄ (Time lag)	14.50 ± 0.02 (0.18)	14.68 ± 0.01 (0.37)	15.05 ± 0.01
1/5M KH ₂ PO ₄ - 1/5M NaOH (Time lag)	13.49 ± 0.02 (0.15)	13.64 ± 0.02 (0.37)	14.01 ± 0.02
1/5M Boric acid+1/20M NaCl - 1/20M Sodium tetraborate (Time lag)	8.61 ± 0.01 (0.06)	8.67 ± 0.01 (0.21)	8.88 ± 0.01
1/10M KH ₂ PO ₄ - 1/20M Sodium tetraborate (Time lag)	11.30 ± 0.05 (0.12)	11.42 ± 0.01 (0.34)	11.76 ± 0.11
1/5M Na ₂ HPO ₄ - 1/10M Citric acid (Time lag)	13.93 ± 0.07 (0.19)	14.12 ± 0.07 (0.41)	14.53 ± 0.01

Each pH value is around 7.0. All values represent the mean ± S.E., n=3. Migration voltage, 10kV.

いが、生薬に適用した場合に妨害ピークの出現によって定量不能となった。そこで、一般に好ましいとされる $100 \mu\text{A}$ 以下の泳動電流で生薬の良好な分析を行なうためには泳動緩衝液にイオン強度の高い 0.4M リン酸水素二ナトリウム - 0.2M クエン酸緩衝液 (pH7.0) を用い、泳動電圧を 3.5kV に抑えざるを得なかった。この条件では泳動電流は約 $85 \mu\text{A}$ となったが、泳動時間は極めて長くなり、分析終了までに約70分を要した。

本条件下での分析を各種附子、烏頭のメタノール抽出液に適用してみたところ、特に試料EとGにおいて3に示すごとく良好なフェログラムが得られた。泳動時間は hypaconitine (1), aconitine (2) および mesaconitine (3) でそれぞれ $54.9 \pm 1.1, 55.6 \pm 1.0$ および 57.1 ± 1.7 各分で、変動係数はそれぞれ 4.35, 3.67 および 5.23% であった。また、検出限界は hypaconitine $2.3 \mu\text{g/ml}$, aconitine $2.8 \mu\text{g/ml}$ および mesaconitine $2.5 \mu\text{g/ml}$ であった。

各試料中のこれらアコニチン型アルカロイドの含量を定量したところ、Table 2 のような結果を得た。なお、使用した検量線は次のとおりである。Aconitine, $y=0.03553x+2.06989$ ($\gamma=0.984$); hypaconitine, $y=0.03174x-13.68892$ ($\gamma=0.999$); mesaconitine, $y=0.00466x-22.93321$ ($\gamma=0.999$)。ただし、 y は各アルカロイドの濃度で $\mu\text{g}/5\text{ml}$, x はピーク面積で $\mu\text{V}/\text{sec}$ である。3化合物のうち、

いずれかが検出できなかったものもあり、中にはすべてが含まれていないものもあった。市場に流通している多くの附子、烏頭には減毒加工が施されているはずであるが、その実態は不明確で、成分含量のバラつきも大きいとされ、¹³⁾ 問題のひとつになっている。ここにおいても各

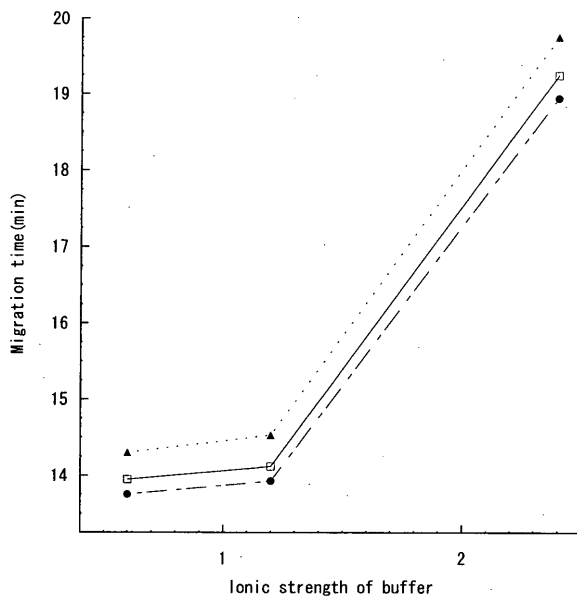


Fig. 2. Relationship Between the Ionic Strength of the Electrophoretic Buffer and the Migration Time of Aconitine Alkaloids
Electrophoretic buffer, di-sodium hydrogenphosphate - citric acid (pH7.0); migration voltage, 10kV ; □, aconitine; ●, hypaconitine; ▲, mesaconitine.

Table 2. Contents of Aconitine Alkaloids in Various Aconitic Tuberos Roots Treated for Reduction in Virulence

Sample	Amount ($\mu\text{g/g}$)		
	Aconitine	Hypaconitine	Mesaconitine
A	62.2 ± 2.5	ND	ND
B	ND	189.8 ± 8.7	ND
C	ND	174.2 ± 4.8	ND
D	54.2 ± 2.1	ND	ND
E	52.1 ± 3.5	54.7 ± 3.4	457.3 ± 35.6
F	ND	ND	ND
G ^{a)}	72.1 ± 3.6	135.8 ± 14.1	307.6 ± 26.9
H ^{b)}	ND	106.8 ± 9.7	87.1 ± 10.5

All values represent the mean \pm S.E., $n=3$. Each sample was commercially procured except G and H. a), tuberous root of aconite; b), leaf of aconite. ND, not determined.

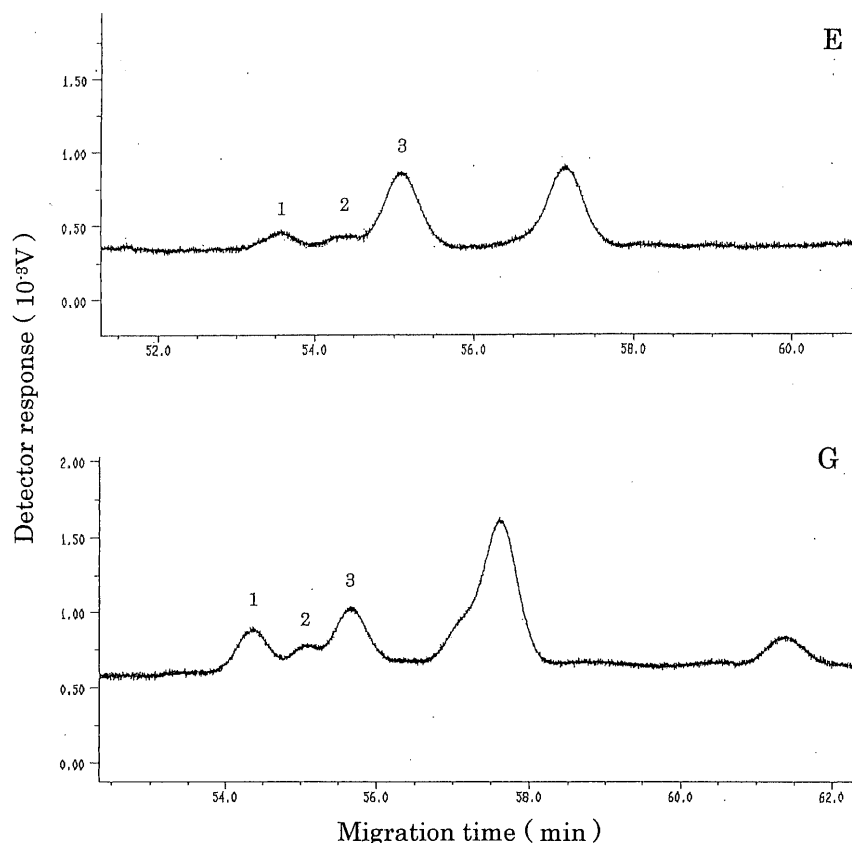


Fig. 3. Capillary Electropherograms of Methanolic Extracts of Aconitic Tuberos Roots
 Buffer solution, 0.4M di-sodium hydrogenphosphate—0.2M citric acid (pH7.0); capillary column, 75 μ m
 i.d. \times 60cm; applid voltage, 3.5kV. Peaks: 1, hyaconitine; 2, aconitine; 3, mesaconitine.

化合物の含量には大きなバラつきが認められる結果となった。また、葉についても定量可能であったが、その含量は地下部に比べて多いとは言えなかった。試料は春に採集したものであり、季節によっては異なる結果となる可能性が高い。

CEは高い理論段数や感度のほか、微量の試料、泳動緩衝液のページと再充填による分析時間の短縮と経済性など多くの特徴を持ち、²⁻⁷⁾ HPLCとはまた違った存在価値を示している。しかしながら、今回検討した附子、烏頭中のアコニチン型アルカロイドについては、分析自体は簡便で定量は可能であったが、生薬中の妨害ピークなどのため分析終了までの時間が長い条件を設定せざるを得なかった。各化合物の分離状況も考慮すると、HPLCと比較して同等の有用性があるとは言い難いようであり、その向上のためには泳動条件の再検討、あるいはミセル動電ク

ロマトグラフィーなど、他のモードの採用を考える必要がある。

REFERENCES

- 1) Jorgenson J.W., Lukacs K.D., *Anal. Chem.*, **53**, 1298-1302 (1981).
- 2) Yoshizaki F., Takei H., Hosogoe S., *Nat. Med.*, **51**, 550-553 (1997).
- 3) Takei H., Ohsone M., Okamura Y., Yoshizaki F., *Anal. Sci.*, **14**, 1165-1168 (1998).
- 4) Takei H., Hirabuki M., Yoshizaki F., *Anal. Sci.*, **15**, 1017-1020 (1999).
- 5) Takei H., Yoshizaki F., *Bunseki Kagaku*, **49**, 639-643 (2000).
- 6) Takei H., Nakauchi K., Yoshizaki F., *Anal. Sci.*, **17**, 885-888 (2001).

- 7) Ihara S., Shimoda H., Akiho Y., Yoshizaki F., *Nat. Med.*, **57**, 110-113 (2003).
- 8) Hatano K., Kamura K., Shoyama Y., Nishioka I., *Planta Med.*, **53**, 152-155 (1988).
- 9) Hikino H., Murakami M., Konno C., Watanabe H., *Planta Med.*, **48**, 67-71 (1983).
- 10) Kitagawa I., Chen Z.L., Yoshihara M., Yoshikawa M., *Yakugaku Zasshi*, **104**, 867-872 (1984).
- 11) Taki M., Nakajima K., Sasaki H., Okada M., *Nat. Med.*, **54**, 334-337 (2000).
- 12) Nose M., Arai T., Zhao C.-Q., Kojima K., Ogihara Y., Sekita S., Satake M., *Nat. Med.*, **55**, 124-133 (2001).
- 13) Taki M., Terabayashi S., Matsuba T., Sasaki H., Fukuchi M., Okada M., *Nat. Med.*, **56**, 163-172 (2002).
- 14) Ohta H., Seto Y., Tsunoda N., *J. Chromatogr. B*, **691**, 351-356 (1997).
- 15) Ohta H., Seyo Y., Tsunoda N., Takahashi Y., Matsuura K., Ogasawara K., *J. Chromatogr. B*, **714**, 215-221 (1998).