

国立医薬品食品衛生研究所塩化ベルベリン標準品 (Control 001)

小出達夫・岩田美保・前川京子・斎藤博幸
谷本 剛[#]・岡田敏史

Berberine Hydrochloride Reference Standard
(Control 001) of National Institute of Health Sciences

Tatsuo Koide, Miho Iwata, Keiko Maekawa, Hiroyuki Saito,
Tsuyoshi Tanimoto[#], and Satoshi Okada

The raw material of Berberine Hydrochloride was examined for preparation of the "Berberine Hydrochloride Reference Standard". The analytical data obtained were: UV spectrum: λ_{\max} , 420, 345, 263 and 228 nm and specific absorbance ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$) in ethanol at each λ_{\max} , 155, 724, 796 and 820, respectively; IR spectrum, specific absorptions at 2844, 1635, 1569, and 1506 cm^{-1} ; and the spectrum of raw material was consistent with that of Standard (Control 941). Also, thin-layer chromatography, an impurity was detected; high-performance liquid chromatography, several impurities were detected. The amount of each impurity was estimated at less than 0.1% and the total amount of impurities was less than 0.2%.

Based on the above results, the candidate material was authorized as the Berberine Hydrochloride Reference Standard (Control 001) of the National Institute of Health Sciences.

Keywords: berberine hydrochloride, quality evaluation, authorization, NIHS Reference Standard

第十三改正日本薬局方に収載されている「オウバク」、「オウバク末」、「オウレン」及び「オウレン末」中のベルベリン含量の定量に用いられる国立医薬品食品衛生研究所「塩化ベルベリン標準品 (Control 001)」（日本薬局方標準品）を製造したので報告する。

1. 標準品原料

標準品原料はアルプス薬品工業株式会社より入手した。同社による試験成績は次のとおりである。水分：12.43%，比吸光度 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (λ_{\max}): 648, HPLCによる純度試験：純度99.7%。

2. 参照物質及び試薬

日本薬局方塩化ベルベリン標準品 (Control 941；日局標準品と略称)¹⁾を対照物質とした。試薬及び溶媒は特級品又は特級相当品を用いた。

3. 装置

本標準品原料の品質評価試験にあたり、下記の測定装置を用いた。

自記分光光度計：島津製作所, UV2500PC.

赤外分光光度計：日本分光, FT-IR VALOR-III.

水分測定器：平沼産業, AQ-6型.

液体クロマトグラフ装置：島津製作所製のLC-6A型ポンプ, SPD-10A型検出器, CT0-6A型カラムオープン及び資生堂製データ処理装置S-mc.

4. 試験方法

特に記すもののほかは、日局一般試験法を準用した。

1) 紫外吸収スペクトル

標準品原料約5mgを精密に量り、水10mlを加え、加温して溶かし、冷後、水を加えて正確に100mlとする。この液10mlを正確に量り、水を加えて正確に50mlとし、試料溶液とする。この液につき、210～500nmの波長範囲で紫外及び可視吸収スペクトルを測定する。吸収極大波長を求め、その吸光度より比吸光度を求める。別途、水分量を求め、無水物換算を行う。

2) 赤外吸収スペクトル

標準品原料を乾燥し(60℃, 1時間)、その2mgを量り、赤外吸収スペクトル測定用臭化カリウム0.2gと混合、磨砕した後、打錠する。この臭化カリウム錠剤につき、空気を対照に4000～400 cm^{-1} の範囲で赤外吸収スペクトルを測定する。

3) 薄層クロマトグラフ (TLC) 法による純度試験

標準品原料5mgをメタノール1mlに溶かし、試料溶液とする。この液40, 20, 10, 5 μl を量り、メタノールを加えてそれ

[#] To whom correspondence should be addressed:

Tsuyoshi Tanimoto; 1-1-43 Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan; Tel: 06-6941-1533; Fax: 06-6942-0716; E-mail: tanimoto@nihs.go.jp

ぞれ正確に20mlとし、標準溶液1, 2, 3, 4とする。試料溶液及び各標準溶液5 μ lにつき、以下の条件で薄層クロマトグラフ法による試験を行う。

薄層板：メルク社製プレコート薄層板シリカゲル 60 F₂₅₄ (厚さ, 0.25mm)。

展開溶媒：1-ブタノール/水/酢酸(100)混液 (7:2:1)。

展開距離：10 cm

検出：1) 紫外線照射 (主波長：254nm)

不純物スポットの蛍光または呈色の強さを標準溶液1~4のスポットのそれと比較し、不純物量を推定する。

4) 液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験

標準品原料約5mgを精密に量り、メタノール10mlを加えて溶かし、試料溶液とする。この液1mlを正確に量り、メタノールを加えて正確に100mlとし、標準溶液とする。標準溶液5mlを正確に量り、メタノールを加えて正確に100mlとし、希釈標準溶液とする。試料溶液、標準溶液及び希釈標準溶液20 μ lにつき、次の条件で液体クロマトグラフ法により試験を行う。それぞれの液の各々のピーク面積を自動積分法により測定し、全ピーク面積に対する相対面積百分率を求める。

操作条件

検出器：紫外吸光度計 (測定波長：345nm)

カラム：Tskgel ODS-80Ts (4.6mm ϕ × 150mm)

カラム温度：40°C付近の一定温度

移動相：ラウリル硫酸ナトリウム2g及び酒石酸0.4gを水450mlに溶かし、アセトニトリルを加えて1000mlとする。

流量：1.0ml/min

カラムの選定：塩化ベルベリン及び塩化パルマチン1mgずつをメタノールに溶かして10ml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。

検出感度：希釈標準溶液20 μ lにつき分析するとき、ベルベリンのピーク面積が自動積分法により確実にカウントされるように調整する。また、標準溶液20 μ lから得られるベルベリンのピーク高さがフルスケールの20%前後となるようにデータ処理装置の感度を調整する。

面積測定範囲：溶媒ピークの後、ベルベリンの保持時間の2倍の範囲

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。

5) 水分

標準品原料約5mgを精密に量り、電量滴定法によるカールフィッシャー水分測定法により本候補品中の水分含量を測定する。

5. 試験結果

1) 紫外吸収スペクトル

標準品原料のメタノール溶液の紫外吸収スペクトルを測定するとき、波長420, 345, 263, 228nm付近に吸収の極大が観察され (Fig. 1), 極大吸収波長における比吸光度E_{1%}^{1cm}はそれぞれ155.24 \pm 2.24, 724.47 \pm 8.60, 796.49 \pm 9.73, 820.41 \pm 10.70, (n=11)であった。

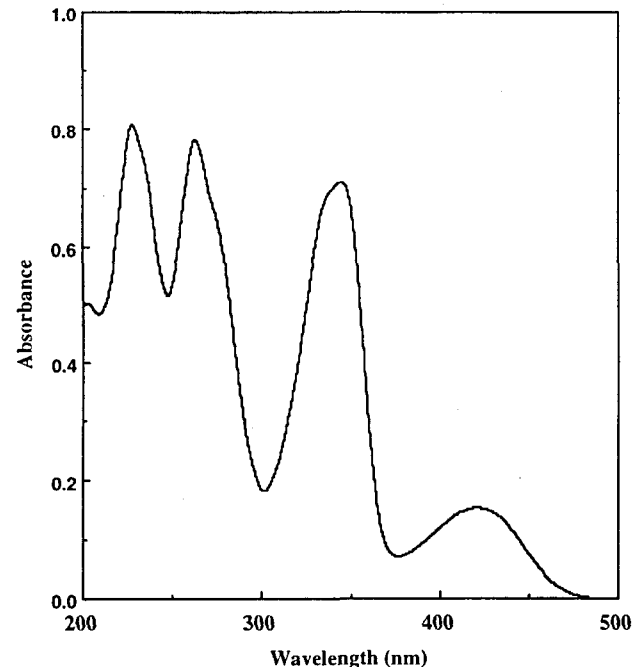


Fig.1 Ultraviolet absorption spectrum of the raw material for Berberine Hydrochloride Reference Standard

2) 赤外吸収スペクトル

標準品原料の臭化カリウム錠剤法による赤外吸収スペクトルをFig. 2に示す。標準品原料の赤外吸収スペクトルを日局標準品のそれと比較するとき、同一波数のところに同様の強度の吸収が認められた。

3) 純度試験

(a) TLC法：標準品原料及び日局標準品の薄層クロマトグラムをFig. 3に示した。標準品原料及び日局標準品とも、それらの試料溶液から1個の不純物スポットを検出したが、0.025%以下と推定され本標準品原料の純度に大きな影響をあたえるものではなかった。

(b) HPLC法：標準品原料及び日局標準品の液体クロマトグラムをFig. 4に示した。標準品原料及び日局標準品とも、微量の不純物ピークが観察された。面積百分率で0.01%以上の不純物ピークの総量は、標準品原料で0.19 \pm 0.00% (n=3), 日局標準品で0.12% (n=2)と推定された。

4) 水分

標準品原料のカールフィッシャー法による水分含量は12.41 \pm 0.55% (n=5)であった。

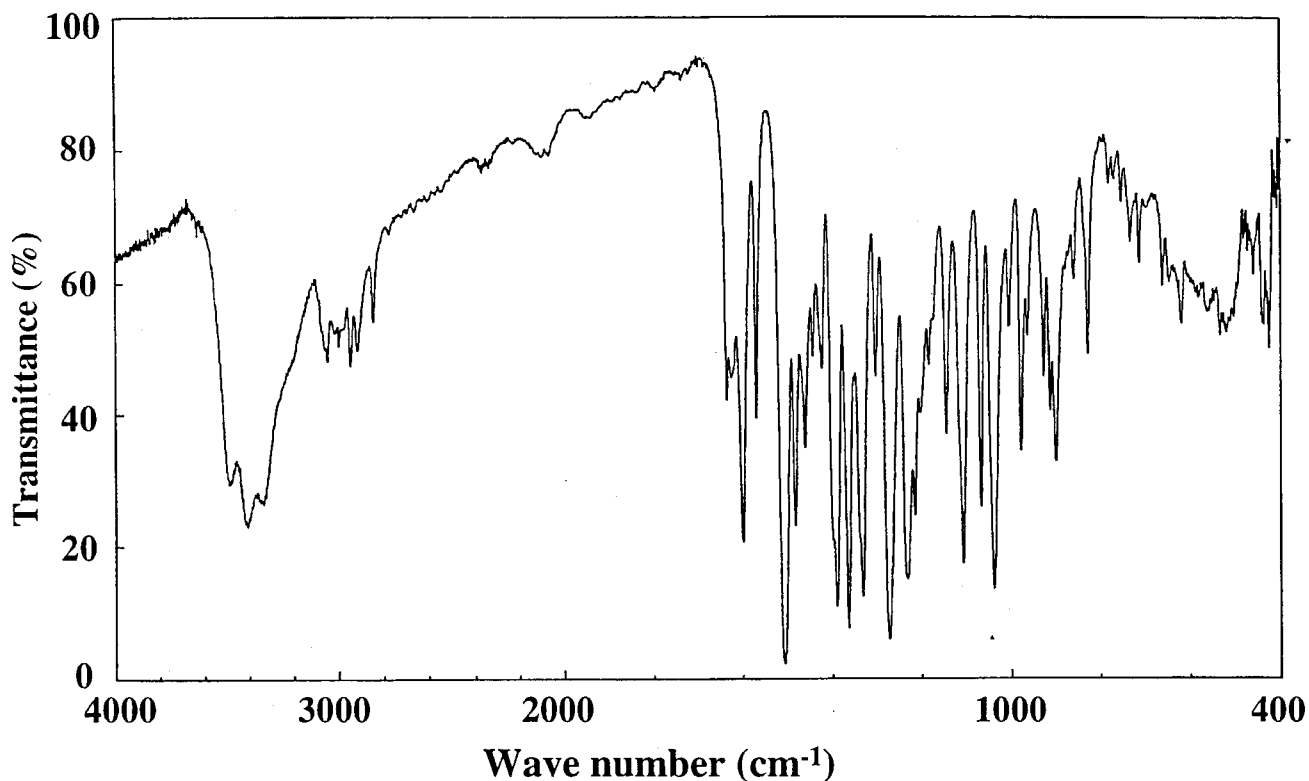


Fig.2 Infrared absorption spectrum of the raw material for Berberine Hydrochloride Reference Standard

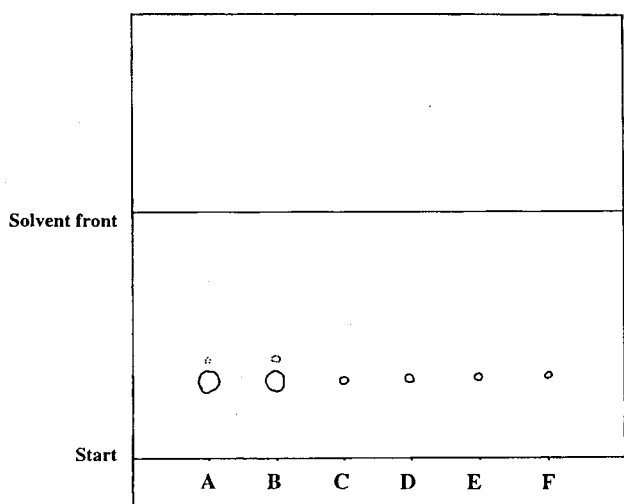


Fig.3 Thin-layer chromatograms of the raw material for Berberine Hydrochloride Reference Standard

Spot : 25 μg (A) of Berberine Hydrochloride Reference Standard (Control 941), 25 μg (B), 0.2 % (C), and 0.1 % (D) 0.05 % (E) and 0.025 % (F) of the raw material.

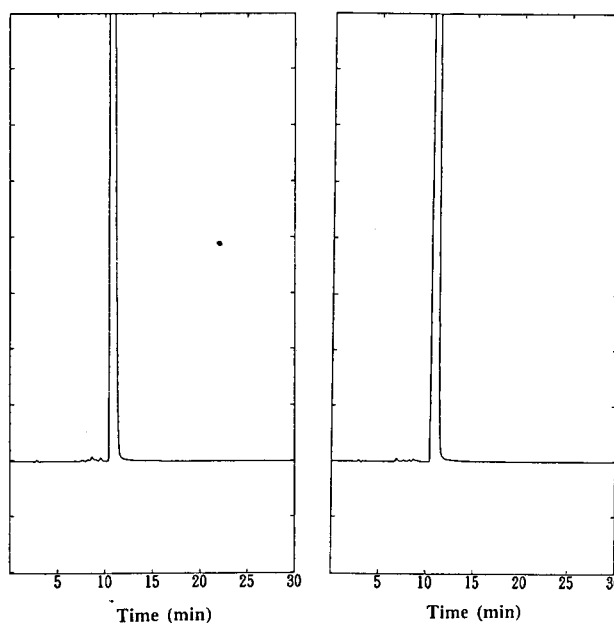


Fig.4 High-performance liquid chromatograms of the raw material (A) and Berberine Hydrochloride Reference Standard (Control 941) (B)

結 論

塩化ベルベリン標準品原料につき、日局標準品 (Control 941) を対照にその品質を比較検討した結果、両者の間に物質特性の差はなく、標準品原料の純度は99.5%以上であることを認めた。これらの結果から、本標準品原料は国立医薬品食品衛生研究所標準品 (日本薬局方標準品) として十分な品質を有するものと認定し、Control 001として製造・配

布することとした。

文 献

- 1) Satoshi Okada, Aya Kitajima, Tsuyoshi Tanimoto, Hideyo Suzuki and Motokichi Satake : *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **113**, 121-126 (1995)