生薬主成分の分析化学的研究 (第 1 報) 甘草中グリチルリチンの高速液体
クロマトグラフィーによる定量

小川俊太郎, 吉田昭義, 三谷洋子

ロート製薬株式会社研究所¹⁾

Analytical Studies on the Active Constituents in Crude Drugs. I. Determination of
Glycyrrhizin in Glycyrrhizae Radix by High Speed Liquid Chromatography

SHUNTARO OGAWA, AKIYOSHI YOSHIDA and YOKO MITANI

The Research Laboratories of Rohto Pharmaceutical Co., Ltd.¹⁾

(Received July 16, 1975)

A method was established for the quantitative determination of glycyrrhizin in *Glycyrrhiza* radix by high-speed liquid chromatography. Glycyrrhizin is separated in approximately 13 min using a 1 m Permaphase AAX column with a mobile phase of 30% isopropanol in phosphate buffer (pH 5.2) at 50°. It was concluded by comparison of this method with the three currently used methods (thin-layer chromatography, diethylaminoethyl-cellulose and gas-liquid chromatography methods) that this method was significantly better than other methods with respect to simplicity, analytical time, and accuracy.

甘草, 甘草末, 甘草エキス中のグリチルリチン (G) の定量法としては, 重量法,²⁾ 比色法,³⁾ ポーラログラフ法,⁴⁾ 浮紙クロマトグラフ法,⁵⁾ 薄層クロマトグラフ (TLC) 法,⁶⁾ ガスクロマトグラフ (GC) 法⁷⁾ などが報告され, 著者等も diethylaminoethyl (DEAE)-セルローズを用いる一新簡易分析法を発表⁸⁾ したが, 各方法による甘草抽出液中 G の定量値は相違し, いずれが真の値であるか判断し難い上に DEAE 法以外は操作が比較的煩雑で定量に長時間を要するので, 著者等は高速液体クロマトグラフィー (HLC) による甘草中の G の定量法を検討し, 今回 permaphase AAX カラムを用いる簡易で精度の良い方法を確立したので報告するとともに本法と TLC 法, DEAE 法, GC 法との定量値の比較を行ない, 定量値の相違する原因について考察した。

実 験 の 部

試薬, 試液 1) グリチルリチン酸ジカリウム (G-カリウム); 丸善製薬社製品を氷酢酸より数回再結晶した。

- 1) Location: Tatsuminishi Ikuno-ku, Osaka.
- 2) A.W. Dox, G.P. Plaisahse, *J. Am. Chem. Soc.* **38**, 2156., (1916); P.A. Houseman, *J. Assoc. agric. Chem.*, **6**, 191 (1922); R. Eder, A. Sack, *Pharm. Acta Helv.*, **4**, 23 (1929); A.M. Plaza, *Inform. Quim. Anal.*, **4**, 93 (1950) [*C.A.*, **45** 1299 (1951)]; 藤田路一, 小林芳雄, 柴田承二, 薬誌, **71**, 949 (1951).
- 3) R.H. Cundiff, *Anal. Chem.*, **36**, 1871 (1964); L. Fuchs, *Monatsch.*, **81**, 70 (1950); J. Gootjes, W.T. Nauta, *Rec. Trav. Chim.*, **73**, 886 (1954); C.H. Brieskorn, W. Wallenstätter, *Arch. Pharm.*, **300**, 717 (1967); C.H. Brieskorn, G.H. Mahran, *Arch. Pharm.*, **293**, 1075 (1960).
- 4) H. Onrust, A.P. Jansen, B.S.J. Wöstmann, *Rec. Trav. Chim.*, **74**, 1515 (1955).
- 5) 羽田榮彦, 稲垣瑞穂, 薬誌, **78**, 795 (1956).
- 6) a) 黒野吾一, 佐々木牙美, 薬誌, **90**, 497 (1970); b) 田中一郎, 鈴木 堯, 寺山博行, 吉沢 弘, 昭和 48 年度厚生科学研究報告, 1974, p. 291; c) 森下紀子, 宮崎 浩, 日本薬学会第 95 年会, 西宮, 1975 年 4 月, 講演要旨集, IV, p. 13.
- 7) a) Th. Vondenhof, K.W. Glombitza, M. Steiner, *Sci. Pharm.*, **41**, 155 (1973); b) 吉田豊三, 寺門正夫, 河原畑二郎, 小野田光正, 昭和 48 年度厚生科学研究, 1974, p. 277; c) 増川健二, 福島正範, 大良 勇, *ibid.*, p. 331; d) 森下紀子, 宮崎 浩, 日本薬学会第 93 年会, 東京, 1973 年 4 月, 講演要旨集, IV, p. 30.
- 8) 小川俊太郎, 吉田昭義, 三谷洋子, 福井美佐子, 日本薬学会, 近畿支部総会, 大阪, 1974 年 11 月. 講演要旨集 p. 19.

2) 甘草; 日本薬局方品を使用。3) 磷酸緩衝液 (pH 5.2); m/30 磷酸一水素ナトリウム (試薬特級), m/30 磷酸二水素カリウム (試薬特級) より調製。4) イソプロピルアルコール (iso-PrOH); エタノール (EtOH); 試薬特級品を使用。

装置および測定条件 機器; UV 254 nm 検出器 付島津デュポン高速液体クロマトグラフ 830 型。カラム; permaphase AAX (1 m×2.1 m.m.i.d.)。カラム温度; 50°。移動相; iso-PrOH 30%/磷酸緩衝液 (pH 5.2) 70% 混合液。流速; 0.75 ml/min。試料注入量; ハミルトン高圧マイクロシリンジ (HP-305 形) にて 5 μl を正確に注入する。

定量法 甘草の細切または甘草末 500 mg を精密に量り、水 40 ml と共に直火で 1—2 時間加熱還流する。遠心分離し、上澄液を吸引ろ過する。抽出残渣をさらに水約 8 ml で洗浄し、洗液とろ液を合したのち水で正確に 50 ml とし、試料溶液とする。別に標準 G-カリウム 50 mg を精密に量り、水を加えてとかし、正確に 100 ml とし、標準液とする。甘草エキス、甘草湯などの試料の場合は、G 含量が大体 0.05% となるように水で一定量に希釈して試料溶液とする。標準溶液および試料溶液の各 5 μl を正確に HLC に注入し、得られるクロマトグラム (Fig. 1) よりそれぞれの G のピーク高を求め、次式により試料中の G 含量を算出する。

$$\text{甘草中のグリチルリチンの含量 (\%)} = \frac{\text{標準グリチルリチンジカリウム採取量 (mg)}}{100} \times \frac{H_p}{H_s} \times \frac{50}{\text{甘草の採取量 (mg)}} \times \frac{822.92}{899.14} \times 100$$

H_p : 試料溶液の G のピーク高

H_s : 標準溶液の G のピーク高

甘草抽出液を用いて 6 回実験を行い、操作上の誤差を検討したところ、含量 (%) は 5.09—5.23 の間にあって、 $\bar{x}=5.16$, $\delta=0.038$, $c.v.=0.81\%$ となった。

検量線 標準 G-カリウムの 0.25—0.75 mg/ml 含有の水溶液を調製し、このおのこの 5 μl を正確に注入し、検量線を作成したところ、G 濃度とピーク高との間に原点を通る良好な直線関係が得られた。

結果および考察

甘草細切および甘草末を熱湯抽出した抽出液を G として約 0.05% 含むように一定量に希釈した液につき、本法および著者等が発表した DEAE 法,⁸⁾ 田中らの TLC 法,^{6b)} 増川らの GC 法^{7c)} を行なって G 含量を求めると Table I の結果が得られた。

DEAE 法と TLC 法, HLC 法と GC 法とが相互に近い値を示しているが、HLC 法と DEAE 法, TLC 法

Fig. 1. Chromatograms of Glycyrrhizin

I: standard glycyrrhizin solution

II: sample solution

apparatus: Shimadzu Du Pont High Speed Liquid Chromatograph 830

condition: permaphase AAX (1 m×2.1 m.m.i.d.) 50°; mobile phase, 30% iso-PrOH/70% phosphate buffer (pH 5.2); flow rate 0.75 ml/min; detector, UV 254 nm; detector sensitivity, 0.08 AUs; sample size 2.5 μg

TABLE I. Comparison of Glycyrrhizin Content in Glycyrrhizae Radix with Several Methods

Method	Glycyrrhizin content (Cut) (%)	Glycyrrhizin content (Pulv.) (%)
HLC (c.v.=0.81%, n=6)	5.16	4.45
DEAE (c.v.=2.01%, n=7)	7.22	5.73
TLC (c.v.=2.77%, n=7)	7.36	5.98
GC (c.v.=2.49%, n=6)	5.14	4.41

Fig. 2. UV Absorption Curves of the Glycyrrhizin Separated by HLC

—: standard solution
---: sample solution

Fig. 3. Chromatograms of Glycyrrhizin Fraction Separated by TLC and DEAE Methods

—: TLC method, ---: DEAE method
...: blank solution
Chromatographic conditions were the same as in Fig. 1.

との間には細切では 2%, 末では 1.5% に近い差がみられる. この差がいかなる原因によるものか, 同時に HLC 法での G の分離が十分であるかどうかを検討するために次の実験を行なった. すなわち, HLC における定量条件で, 試料溶液と標準溶液ともに G として 50 μ g 相当量を注入し, 分離した G 成分の分取を試みた. 50 μ g 注入すると若干テーリング気味となるが, G と他成分との分離はよい. G として約 350 μ g 相当量分取し, 濃縮乾固後 50% EtOH 溶液に溶かしてそれぞれの紫外線 (UV) 吸収カーブを測定すると, Fig. 2 に示すように分取した試料の G の UV スペクトル (対照液は 50% EtOH/磷酸緩衝液 (pH 5.2)) は標準品のスペクトルと全く同一の吸収を示し, かつそれぞれの TLC⁹⁾ も完全に 1 スポットであった.

一方, TLC 法および DEAE 法はそれぞれ吸着クロマトグラフィー, イオン交換クロマトグラフィーで分離した G 画分の UV 吸収の強さを測定するものであるが, それぞれの定量法に従って得られる G 画分¹⁰⁾ を濃縮して本法の HLC 条件で分析を行なってみると Fig. 3 に示すようなクロマトグラムが得られた.

TLC 法および DEAE 法で分離した G 画分はいずれも G のピーク以外に t_R 4 min と 6 min にかなり大きなピークを示し, 明らかに G 以外の成分が共存していることがわかる. G と G 以外のピークの比は約 7:3, したがって TLC 法による細切品の定量値は 7.36% の 7/10, すなわち 5.15% となり, HLC 法の値とほぼ一致する. すなわち, TLC 法, DEAE 法では他成分との分離が不完全のために HLC 法に比べ細切で約 2%, 粉末で約 1.5% 高い定量値を与えたといえることができる.

GC 法の値はほぼ HLC 法と近く, HLC 法とともに最も真値に近いものと考えるが, 就中甘草抽出液から直接に定量が行なえ, さらに簡易さ, 精度, 分析時間等の点ですぐれた HLC 法が最も望ましい方法と考える.

謝辞 本研究発表の機会を与えられたロート製薬株式会社社長 山田輝郎氏に感謝致します.

9) 薄層クロマトグラフィー (TLC) は Merck 社製 pre-coated Kieselgel 60F₂₅₄ を使用. 展開溶媒: *n*-BuOH: 4*N* NH₄OH: EtOH=5: 2: 1, *R_f* 値: 0.15.

10) TLC 法では展開後 G のスポット部分を 50% EtOH で抽出した液, DEAE 法では 0.3*M* NaCl 液で溶出した溶出液をいう. 両法ではこの 50% EtOH 液, 0.3*M* NaCl 液の UV 吸収を測定して G の含量を求める.