リンドウ科植物を基源とする生薬の研究 (第 1 報) ゲンチアナ,
リュウタン中の苦味成分 Gentiopicroside の定量¹⁾

林 輝明

小城忠治商店株式会社研究部²⁾

Studies on Crude Drugs originated from Gentianaceous Plants. I.
Determination of Gentiopicroside, the Bitter Principle of
Gentianae Radix and Gentianae Scabrae Radix¹⁾

TERUAKI HAYASHI

Research Laboratory, Koshiro Chuji-Shōten Co., Ltd.²⁾

(Received August 26, 1975)

Two new methods for the determination of gentiopicroside in gentian radix and *Gentiana scabra* radix were developed by the combination of thin-layer chromatography (TLC) and spectrophotometry. In the preparative TLC-ultraviolet (UV) method, gentiopicroside contained in the methanol extract of samples is quantitatively separated by preparative TLC (detection by a PAN UV lamp) and the amount is determined from the absorbance at 270 nm by using a calibration graph. In the TLC-densitometer (DM) method, the methanol extract containing gentiopicroside is developed on the TLC plate, and the amount of gentiopicroside ($R_f = ca. 0.4$) is measured by TLC densitometry using a dual-wavelength TLC scanner. By these two methods, the content of gentiopicroside was determined as 1—2% in gentian radix (Osaka market product), 1—3% in *Gentiana scabra* radix (Osaka market product), and 7—10% in the fresh root of *Gentiana scabra* BUNGE.

ゲンチアナは *Gentiana lutea* L. (Gentianaceae) の根および根茎であり, リュウタン (竜胆) は *Gentiana scabra* BUNGE (Gentianaceae) またはその同属植物の根茎および根であると, 日本薬局方では規定しており, ともに古くより苦味健胃薬として, 常用され, 痛風, 解熱, 鎮痛にも利用される要薬である。

したがって, その苦味成分の分離, 構造については, 早くより研究がなされており, 主成分である gentiopicroside (gentiopicrin) は, 1862 年 Kromeyer³⁾ によってゲンチアナより単離されており, リュウタンよりは朝比奈⁴⁾ により分離され, Korte,⁵⁾ Canonica,⁶⁾ 井上⁷⁾ によって, Chart 1 のごとき構造を有するセコイリド配糖体であることが明らかにされている。この gentiopicroside は, *Gentiana* 属および *Swertia* 属植物にかなり共通して含有されている。^{7c)} またゲンチアナ中には, 他に微量のセコイリド配糖体 amarogentin, swertiamarin が見出されている。^{5b, 7c, 8)}

しかし, その苦味成分の定量に関しては, 従来検討がなされておらず, 殊にゲンチアナの場合, 日局のみでなくほとんどの国の薬局方に収載されながら含量規定がなく, 品質評価の上で大きな問題を残している。そこでゲンチアナおよびリュウタンに共通する苦味主成分の gentiopicroside の定量法を確立すべく, 薄層クロマトグラ

1) 日本薬学会第 95 年会発表, 西宮 1975 年 4 月。

2) Location: 3-5, Doshō-machi, Higashi-ku, Osaka.

3) A. Kromeyer, *Arch. Pharmaz.*, **160**, 27 (1862).

4) 朝比奈泰彦, 照山秀太郎, 薬誌, **382**, 1175 (1913); Y. Asahina, J. Asano, Y. Weno, *Chem. Ber.*, **69**, 771 (1936).

5) a) F. Korte, *Chem. Ber.*, **87**, 512, 769, 780 (1954); b) *Idem, ibid.*, **88**, 704 (1955).

6) L. Canonica, F. Pelizzoni, P. Manitto, G. Tommi, *Tetrahedron*, **16**, 192 (1961).

7) a) H. Inouye, Y. Nakamura, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **18**, 1856 (1970); b) H. Inouye, S. Ueda, Y. Nakamura, *Tetrahedron Letters*, **1967**, 3221; c) 井上博之, 中村有伸, 薬誌, **91**, 755 (1971).

8) H. Wagner, K. Vasirian, *Apoth. Ztg.*, **114**, 1245 (1974).

Chart 1. Gentiopicroside

フィー (以下 TLC) による定量について検討を行った。

Gentiopicroside は MeOH 溶液において 270 nm に吸収極大を有し, 50 $\mu\text{g/ml}$ 以下で Lambert-Beer の法則が成立する。また二波長クロマトスキャナーによるデンシトメトリーでもその検量線は直線となる。これらの性質を利用して, gentiopicroside を TLC (Fig. 1) で分離し, 剥離後その抽出液の 270 nm における吸光度を測定する TLC かきとり-UV 法 (以下 Prep. TLC-UV method) と, 直接二波長クロマトスキャナーによって測定する TLC-デンシトメーター法 (以下 TLC-DM method) の二定量法の検討をおこない, 回収率, 精度等で両法とも良好な結果を得たので報告する。

また本法を用いて, gentiopicroside の市場ゲンチアナ, リュウタン中の含有量, 熱, 日光の影響等を検討し新しい知見を得た。

実験結果および考察

I. 定量

Gentiopicroside の標品 Korte,^{5a)} 井上^{7c)} の方法に準じて, ゲンチアナより抽出精製し, AcOEt より再結晶して得た。mp 191°, Anal. Calcd. $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_9$: C, 53.93; H, 5.66. Found: C, 53.91; H, 5.67. $[\alpha]_D^{20} -198.5^\circ$ ($c=1.0$, EtOH). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) 270 (3.96). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ cm^{-1} : 3450, 1710, 1617.

実験材料 ゲンチアナ *Gentianae Radix*—大阪市場品 (スペイン産 2 種, フランス産, ウガンダ産, 産地不明品それぞれ 1 種) 5 種を試供品とした。

リュウタン *Gentianae Scabrae Radix*—大阪市場品 (北鮮産, 韓国産, 台湾産, 中国産それぞれ 1 種, 産地不明 1 種) 5 種および採集品 (大阪府高安山, 長野県御嶽山, 三重県尾鷲市で *Gentiana scabra* BUNGE 採取後 1 週間以内の新鮮根を 40° 以下で減圧乾燥) 3 種を実験材料とした。

A. Prep. TLC-UV Method Gentiopicroside の濃度と吸光度の関係—Gentiopicroside の吸収極大波長部位は MeOH 溶液で 270 nm にあり, 島津 QV 50 型分光光度計を用いてその各種濃度 MeOH 溶液の液層の 10 mm の各吸光度を測定すると 50 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度範囲内で, 濃度と吸光度は次式の回帰方程式で表わされる直線となり Lambert-Beer の法則を満足する。

$$x = 40.5013 y + 0.2399$$

$$x = \text{濃度 } (\mu\text{g/ml}), y = \text{吸光度}$$

TLC による Gentiopicroside の分離—ゲンチアナおよびリュウタンの MeOH 抽出液を担体: Wakogel B-5FM, 厚さ 0.25 mm, 110° 1 時間加熱, 展開溶媒: $\text{CHCl}_3 \cdot \text{MeOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (30: 10: 1), 展開距離: 15 cm, 検出: PAN-UV-Lamp (250—400 nm, 東京光学製) 照射の条件で TLC に付すと, Fig. 1 のごとくゲンチアナ, リュウタンともに分離よく R_f 約 0.4 に赤紫色スポットとして gentiopicroside が認められる。

定量法—40° 以下で乾燥し恒量に達したリュウタン末約 2 g, ゲンチアナ末約 5 g を精秤する。まずゲンチアナ末に石油エーテル 100 ml を加えて, 1 時間攪拌脱脂後, 吸引濾過し, ゲンチアナ末を 500 ml の共栓三角フラスコにとり, 濾紙に付着せる末は 200 ml の MeOH で完全に洗い込む。リュウタン末は脱脂せず, MeOH 200 ml を加え, それぞれ 1 時間ずつ常温で攪拌抽出する。この抽出を 3 回行ない, 最後に 100 ml の MeOH で洗浄する。濾液と洗液を合し, 50° 以下で減圧濃縮し, メスフラスコに移し, MeOH で正確に 20 ml とする。(もし濁りあれば一夜静置しその上澄液を用いる)。次にその 50 μl を正確に薄層の原点に線状に吸着させ, 前記

Fig. 1. Thin-Layer Chromatogram of *Gentianae Radix* (1) and *Gentianae Scabrae Radix* (2) (MeOH ext.)

plate: Wakogel B-5FM
solvent: $\text{CHCl}_3 \cdot \text{MeOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (30: 10: 1)
detection: PAN-UV-Lamp (250—400 nm)
(a) red-purple: gentiopicroside
(b) blue-purple: amarogentin

TABLE I. Recovery Rates of Gentiopicroside in the Prep. TLC-UV Method

Sample (μg/ml)	Absorbance	Concentration of gentiopicroside (μg/ml)	Recovery of gentiopicroside (%)
8.01	0.185	7.73	95.50
	0.189	7.89	98.54
	0.190	7.95	99.24
			average 98.09
16.02	0.375	15.41	96.20
	0.380	15.63	97.56
	0.381	15.67	97.80
			average 97.19
24.03	0.566	23.16	96.40
	0.569	23.28	96.88
	0.582	23.81	99.08
			average 97.45
32.04	0.750	30.60	95.50
	0.756	30.85	96.30
	0.770	31.43	98.10
			average 96.63

TABLE II. Recovery Rates in the Addition Test (Prep. TLC-UV Method)

No. of Exp.		Added amount of gentiopicroside (mg)	Expected concentration (μg/ml)	Observed (μg/ml)	Recovery (%)
Gentianae Radix ^{a)}	(1)	20.21	5.053	4.886	96.30
	(2)	10.04	2.510	2.446	97.41
	(3)	20.41	5.103	4.900	96.02
Gentianae Scabrae Radix ^{b)}	(1)	20.44	5.110	4.913	96.61
	(2)	30.12	7.530	7.178	95.33
	(3)	15.23	3.803	3.693	97.11

a) content of gentiopicroside: 1.39%

b) content of gentiopicroside: 2.16%

TLC 条件で上昇法展開し, PAN-UV-Lamp で赤紫色を呈する gentiopicroside 部分 (R_f 約 0.4) をかきとり, これを共栓小試験管あるいは, 共栓遠沈管にとり, 正確に 10 ml の MeOH を加え, 密栓して, 50° の水浴中にて, ときどき振りまぜながら 1 時間加温抽出する. 冷後遠心分離に付し, その上澄液を 270 nm で, 紫外部吸光度を測定する. Blank 値を差引き, 次式により, 生薬中の含有量を算出する.

$$\text{gentiopicroside \% (w/w)} = (16.20 y + 0.096) / W$$

W = 試料重量 (g) y = 吸光度

Gentiopicroside の回収率——Gentiopicroside の MeOH 定濃度希釈液を前述の定量法に基づき薄層に吸着せしめ, 展開し, 抽出を行ない, 吸光度を測定して Table I の結果を得た. いずれも 95% 以上の回収率を示した.

Gentiopicroside の添加試験——Gentiopicroside 含量既知のゲンチアナ末ならびにリュウタン末に一定量の gentiopicroside を正確に添加し, 定量法に準じて定量を行ない, 添加物の回収率を検したが, Table II の結果のごとくいずれも 95% 以上の回収率を示した.

精度——本法の精度を検するため, 同一試料末を用いて 5 回繰返し定量を行ない変動係数 (C.V.%) を求めた.

ゲンチアナは各回の定量値 (%) 1.37, 1.29, 1.40, 1.33, 1.36 となり平均値 1.35% で変動係数は 2.50% となった。リュウタンは各回の定量値 (%) 2.09, 2.06, 2.11, 2.18 で平均値 2.12% となり変動係数は 2.30% である。両者とも良結果を示し gentiopicroside のプレートよりの回収率、標品添加試験結果とあわせ本法は十分実用に供し得られると考えられる。

B. TLC-DM Method Gentiopicroside の TLC による分離——ゲンチアナおよびリュウタンの MeOH 抽出液を担体: kieselgel 60F₂₅₄ (Merck), 展開溶媒: CHCl₃·MeOH·H₂O (30:10:1), 展開距離: 15 cm の条件下に TLC 展開し, UV 270 nm の照射を行なうと, gentiopicroside は R_f 約 0.4 の位置に Fig. 1 と同一のパターンで, 他成分と完全に分離して出現し, 定量可能である。

濃度と吸光度積分値との関係——下記定量法に準じ, 同一プレートの原点に gentiopicroside が 4 μg, 8 μg, 12 μg 吸着するよう定濃度希釈液を添付し, TLC 展開し, その吸光度積分値を島津二波長クロマトスキャナー CS-900 で測定すると濃度と吸光度積分値の関係を示す検量線は直線となり定量可能である。ただしプレートをかえて測定すると, その吸光強度にわずかに差が認められ, 検量線作成は定量するプレートごとに必要である。

定量法——A. の定量法と全く同一の方法で, ゲンチアナおよびリュウタンを抽出し, 全容 20 ml の MeOH 試料液を作成する。次に担体: kieselgel 60F₂₅₄, 展開溶媒: CHCl₃·MeOH·H₂O (30:10:1), 展開距離: 15 cm の条件下, プレートに試料液を正確に 5—10 μl 添付し, TLC 展開する。このとき, 検量線作成のため同一プレート上に標準 gentiopicroside 約 2 mg/ml の MeOH 溶液を正確に 5 μl, 10 μl, 20 μl 添付し, 同時に展開を行なう。乾燥後, 分離せる gentiopicroside スポットの吸光度積分値を下記条件下に二波長クロマトスキャナーによって測定, 同時に作成した検量線よりその含有量を算出する。

装置: 島津二波長クロマトスキャナー CS-900 (検量線リニアライザー LIN-53, バックグラウンド補正装置 Bu-1 付)

λ_S: 270 nm, λ_R: 400 nm, スリット幅: 1.25×1.25 mm, スキャンニング方法: シグザグスキャンニング, リニアライザー: SX-3

Gentiopicroside の添加試験——含量既知のゲンチアナ末, リュウタン末に一定量の gentiopicroside をそれぞれ添加し, 定量法に従って, 定量し, 添加量の回収率を検した。Table III に示すがごとく 96—103% の回収率を示した。

精度——同一試料を用いて 5 回繰返し定量を行ない, 変動係数を求めた。ゲンチアナは各回の定量値 (%) 1.31, 1.33, 1.41, 1.55, 1.33 となり平均値 1.39% で変動係数 0.65% となった。リュウタンは各回の定量値 (%) 2.23, 2.28, 2.12, 2.04, 2.13 で平均値 2.16% となり, 変動係数 3.80% である。両者とも良結果を示し, 標品添加試験結果とあわせ十分実用に供し得られると考えられる。

C. 定量結果 本定量法を用いてゲンチアナおよびリュウタンの市場品, 採集品中の gentiopicroside の定量結果は Table IV に示す。両定量法間の定量法に大差は認められないが, TLC-DM-method の方が簡便で, 定量時間の短縮がはかれる利点がある。市場品リュウタンの gentiopicroside の含量は約 1—3% であるが採集新鮮品⁹⁾ はいずれも 7% 以上の含量を示した。このことはセコイリド配糖体である gentiopicroside が経日変化

TABLE III. Recovery Rates of Added Gentiopicroside in the TLC-DM Method

No. of Exp.		Added amount of gentiopicroside (mg)	Recovered amount (mg)	Recovery (%)
Gentianae Radix ^{a)}	(1)	20.21	19.54	96.68
	(2)	10.04	9.79	97.51
	(3)	20.41	19.72	96.62
Gentianae Scabrae Radix ^{b)}	(1)	20.44	20.22	98.92
	(2)	30.12	30.54	101.39
	(3)	15.23	15.69	103.02

a) content of gentiopicroside: 1.39% b) content of gentiopicroside: 2.16%

9) 水分を多量含むので 40° で減圧乾燥し, 局方 48 号篩を通過する粉末とし, 以下生薬の場合と同様, さらに乾燥して, 恒量を得たものについて定量を行なった。

を受けやすいことを示唆するものと考えられる。

II. Gentiopicroside 含量に及ぼす熱の影響

生薬中の gentiopicroside 含量に及ぼす熱の影響を検するため、含量既知のゲンチアナ末 (1.39%), リュウタン末 (7.04%), 標準 gentiopicroside の 10 倍散 (賦形剤: 澱粉) をそれぞれ 60°, 80° で 48 時間放置し、その含有量を定量した。その結果は Table V に示すとおりで、大幅な含量低下を示した。このことより、柔軟性に富むゲンチアナの粉末化のため、市場でよく行なわれる長時間高熱乾燥等の前処理はさけるべきであると考えられる。

TABLE IV. Contents of Gentiopicroside

Sample	Prep. TLC-UV method (%)	TLC-DM method (%)
Gentianae Radix in Osaka market		
from France	0.97	1.02
Spain	1.35	1.39
	1.64	1.70
Uganda	2.02	2.10
unknown origin	0.88	0.92
Gentianae Scabrae Radix in Osaka market		
from D.P.R. Korea	1.78	1.80
Korea	3.12	3.20
Formosa	1.12	1.21
P.R. China	2.09	2.20
<i>Gentiana scabra</i> BUNGE, root		
collected in Osaka	7.10	6.91
Nagano	9.80	10.03
Mie	6.97	7.04

TABLE V. Change of Gentiopicroside Contents with Temperature and Time

	Temperature (°C)	Gentiopicroside contents (%)		
		at start	after 24 hr	48 hr
Gentianae Radix	60	1.39	1.18	0.94
	80	1.39	1.10	0.60
Gentianae Scabrae Radix	60	7.04	3.83	3.41
	80	7.04	2.55	1.90
10% Gentiopicroside powder (in starch)	60	10.00	— ^{a)}	6.89
	80	10.00	— ^{a)}	3.40

a) not determined

TABLE VI. Change of Gentiopicroside Contents with the Method for Drying (Gentianae Scabrae Radix)

	Contents (%)		
	at start	7 days (40 hr)	14 days (102 hr)
Dried in the sun	7.04	5.68	3.10
Dried in the shade	7.04	—	6.97

III. Gentiopicroside 含量に及ぼす日光の影響

生薬中の gentiopicroside 含量に及ぼす日光の影響を検するため、採集したてのリュウタン（和歌山県尾鷲，1975年3月2日 *G. scabra* BUNGE）の根をよく混じ，2つに分け，3月に14日間（正味日照時間：102時間）陽干しと陰干しによって乾燥し，含量定量を行なった．定量は各試料とも，40°で減圧乾燥を行なって恒量を得たものについて実施した．その結果は Table VI に示すとおりで，陽干しにより，大幅な含量低下をみた，従ってリュウタンの生薬調製は，直射日光をさけ，陰干しによった方が品質低下が少ない．

謝辞 種々有益な御助言と御鞭撻を賜わった大阪大学薬学部 吉岡一郎教授に深謝するとともに amargentin の貴重な標品を御恵与頂いた京都大学薬学部の井上博之教授および生薬材料の一部御提供と植物の御鑑定を頂いた近畿大学薬学部の久保道徳博士に厚く御礼申し上げます．また実験に協力された松田太郎，東野正行両氏に感謝します．