高速液体クロマトグラフ法による医薬品の分析 (第6報¹⁾) リュウタンおよび
ゲンチアナ中のゲンチオピクロサイドの迅速定量

赤田良信, 河野貞子, 山岸正治, 棚瀬弥一郎

徳島文理大学薬学部²⁾High-speed Liquid Chromatographic Analysis of Drugs. VI.¹⁾ Rapid Estimation
of Gentiopicroside in Gentianae Scabrae Radix and Gentianae Radix

YOSHINOBU AKADA, SADAKO KAWANO, MASAJI YAMAGISHI and YAICHIRO TANASE

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima University of Arts and Science²⁾

(Received May 10, 1979)

A method for the rapid estimation of gentiopicroside in crude drugs, Gentianae scabrae radix and Gentianae radix, was established by the use of high-speed liquid chromatography. Gentiopicroside is separated on the 25 cm column of Zorbax ODS, using a liquid chromatograph (Shimadzu-Du Pont Model LC-3A) with 5% tetrahydrofuran as the desorption solution, and the separation is completed within 8 min.

Gentiopicroside in the crude drugs is extracted with water and the aqueous extract is injected into the column. The content of gentiopicroside was calculated from calibration curves previously prepared using the standard. Precision of the determination is about $\pm 1\%$ and detection limit is 2 ng (S/N ratio, 3). This method is considered to be useful for the evaluation of these crude drugs.

Keywords—high-speed liquid chromatography; gentiopicroside; gentianae radix; gentianae scabrae radix; Zorbax ODS; pharmaceutical analysis

リュウタン (竜胆) およびゲンチアナは、共に苦味健胃薬として古くより知られており、さらに痛風、解熱、鎮痛作用を有する日本薬局方収載の重要な生薬の一つである。その有効成分であるゲンチオピクロサイド (以下 gen. と略す) は、朝比奈等³⁾ によりリュウタンから、また Kromeyer⁴⁾ によりゲンチアナからそれぞれ単離され、Korte,⁵⁾ Canonica 等,⁶⁾ 井上等⁷⁾ によりその構造が明らかにされた。一方その定量法に関しては、あまり検討が加えられておらず、わずかに林⁸⁾ の報告があるにすぎない。そこで著者等は、高速液体クロマトグラフィー (以下 HLC と略す) を用いるリュウタンおよびゲンチアナ中の gen. の迅速簡便な微量定量法の検討を行い、所期の目的を達したので報告する。

実 験 の 部

標準物質および試料 標品: 井上等⁷⁾ の方法に準じてリュウタンから分離精製したものを用いた。mp 103—105° (無色無晶形粉末), Anal. Calcd. $C_{16}H_{20}O_9 \cdot H_2O$: C, 51.34; H, 5.92. Found: C, 51.55; H, 5.76. また、その赤外吸収 (IR), 紫外線吸収 (UV) は共に文献値^{7,8)} とよい一致がみられ、かつ常法によりこれをアセチル化し

1) 第5報: 赤田良信, 河野貞子, 棚瀬弥一郎, 薬誌, 99, 858 (1979).

2) Location: Yamashiro-cho, Tokushima.

3) 朝比奈泰彦, 照山秀太郎, 薬誌, 382, 1175 (1913); 朝比奈泰彦, 依田四郎, 薬誌, 390, 911 (1914); 朝比奈泰彦, 浅野順太郎, 棚瀬弥一郎, 上農義雄, 薬誌, 56, 997 (1936); Y. Asahina, Y. Weno, Chem. Ber., 69, 771 (1936).

4) A. Kromeyer, Arch. Pharmaz., 160, 27 (1862).

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

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

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

8) 林 輝明, 薬誌, 96, 356 (1976).

て得られたアセテートの性状は、井上等⁷⁾の報告と一致した。試料：リュウタンおよびゲンチアナは共に徳島市場品を用い、ガラス製乳ばちで均一な粉末とし、シリカゲルデシケーター中で乾燥恒量としたものを用いた。

試料液の調製 試料粉末約 50 mg を 10 ml の共栓付き遠沈管に精密に秤取し、抽出溶媒として水 5 ml を加え、室温で 30 分間振とう後遠心分離し得られた上澄液をそのまま試料液とした。

HLC 条件 装置：島津 Du Pont LC-3 A, カラム：Zorbax ODS (4.6 mm i.d. × 25 cm), 検出：UV 検出器 (254 nm), 移動相：5% THF, 流量：1.0 ml/min, カラム温度：40°。

定量法 Gen. 標品約 2 mg を精密に秤取し、水に溶かして 10 ml としたものを 1—5 μ l カラムに注入、得られたクロマトグラムの gen. ピーク高さをもとにして作成した回帰直線の方程式を用いて行った。試料液は、その 2—5 μ l を直接カラムに注入した。

結果および考察

HLC 測定条件の検討

充填剤は、逆相用高分離能充填剤である Zorbax ODS を用いた。移動相について種々検討を加えた結果、5% THF を用いると、約 8 分以内に良好な再現性をもつシャープなピークとして gen. を溶出させることができた。検出は、標準検出波長である 254 nm を用いたが、その検出限界は、S/N 比 3 程度において約 2 ng であった。

検量線および定量精度

Gen. 標品のカラムへの絶対注入量 (μ g) とピーク高さ (cm) は、良好な直線関係 (相関係数 0.999) を有し、最小自乗法により求めた回帰直線の方程式を用いて、種々の量の gen. 標品を注入して得られたクロマトグラムのピーク高さより gen. 量を算出しその定量精度を求めたが、ほぼ 1% 以内の誤差で定量できることがわかった (Table I)。内部標準法については、ピークの再現性がすぐれており、かつ添加回収実験の結果からも明らかなように、同一試料についての抽出率は一定しており、ほぼ 100% に近い回収率をもっているため特に必要としないと考えられる。

Fig. 1. Chromatogram of Gentiopicroside in *Gentianae Scabrae Radix* H₂O Extract by HLC on Zorbax ODS using 5% Tetrahydrofuran as an Eluent

試料中の Gen. の抽出条件の検討

抽出溶媒：種々の溶媒について、その抽出されやすさにつき検討を加えた結果、水を用いるのが最も良いことがわかったので、これを抽出溶媒とした。Table II に、リュウタン (試料 1) についての各抽出溶媒による抽出率を示したが、他の試料についてもこれと同様の結果が得られた。抽出回数および抽出時間の検討：同一試料について、1 回、2 回、3 回と順次振とう抽出をくり返し、その抽出率を検討したが、試料中の gen. は 1 回の抽出操作でほぼ完全に抽出されることがわかった。次に、抽出溶媒を加えてその振とう時間を 15 分間、30 分間および 1 時間まで検討したが、gen. の抽出量はいずれの試料についても 30 分以内の抽出時間で一定値に達し、それ以上時間を長くしても抽出量に増加は認められなかった。

Gen. 添加回収実験

各試料につき、一定量の gen. を添加しその回収率を求めたが、いずれの試料についてもほぼ 100% の良好な回収率が得られた。Table III には、リュウタン (試料 1) についての結果のみを示したが、他の試料についてもこれと同様の結果が得られ、試料の相違による gen. の回収率の変動は認められなかった。

リュウタンおよびゲンチアナ中の Gen. の定量

Fig. 1 に示したように、gen. のピークが 7 分前後

TABLE I. Precision of the Quantitative Determination obtained with Different Amounts of Gen.^{a)} by HLC^{b)} Method

Amount of taken (μg)	Amount of found (μg)	Error (%)
0.420	0.419	-0.24
0.840	0.836	-0.48
0.880	0.880	± 0.00
1.260	1.265	+0.40
1.320	1.324	+0.30
1.680	1.670	-0.60
1.760	1.762	+0.11

^{a)} Gentiopicroside.^{b)} High-speed liquid chromatography.TABLE II. Recovery Rates of Gen.^{a)} in Gentianae Scabrae Radix (Sample 1) by Various Extraction Solvents

	Amount of sample taken (μg)	Gen. ^{a)} amount in sample (μg)	Gen. ^{a)} content (%)
Water	14.91	0.809	5.426
	14.91	0.819	5.493
	14.91	0.813	5.453
Methanol	15.12	0.794	5.251
	15.12	0.799	5.284
	15.12	0.796	5.265
Ethanol	30.06	0.843	2.804
	30.06	0.847	2.818
	30.06	0.834	2.774
Acetone	50.40	0.308	0.611
	50.40	0.295	0.585
	50.40	0.299	0.593
Tetrahydrofuran	100.20	0.131	0.131
	100.20	0.130	0.130
	100.20	0.132	0.132
Dioxane	100.06	0.358	0.358
	100.06	0.357	0.357
	100.06	0.356	0.356
Acetonitrile	100.80	0.276	0.274
	100.80	0.282	0.280
	100.80	0.292	0.290

For keys, see in Table I.

に認められ、抽出液中に共存する他の成分のそれとは完全に分離して溶出する。ピークの同定は、gen. 相当ピーク部分を分取後、UV 吸収および TLC [プレート: Wakogel B-5, 展開溶媒: CHCl_3 -MeOH- H_2O (30:10:3, v/v), R_f 0.45; CHCl_3 -MeOH (5:1, v/v), R_f 0.15, 発色剤: 濃硫酸] より調べた結果、標品のそれと完全に一致した。従ってなんらめんどろな前処理をすることなく、抽出液をそのまま一定量カラムに注入することにより、リュウタンおよびゲンチアナ中の gen. が分離定量できることがわかった。標品を用いて作成した回帰直線の方程式をもとにして、各試料中の gen. の含量を算出した結果を Table IV に示した。

TABLE III. Recovery of Gen.^{a)} after Addition to Gentianae Scabrae Radix (Sample 1)

Amount of sample taken (μ g)	Amount of gen. ^{a)} added (μ g)	Gen. ^{a)} amount in sample (μ g)	Total gen. ^{a)} (%)	Recovery of added (%)
10.000	None	0.541	5.41	—
10.000	0.190	0.726	7.26	97.37
10.000	0.190	0.735	7.35	102.11
10.000	0.190	0.730	7.30	99.47
10.000	0.190	0.731	7.31	100.00
10.000	0.190	0.728	7.28	98.42
10.000	0.190	0.733	7.33	101.05
10.000	0.190	0.731	7.31	100.00

For keys, see in Table I.

TABLE IV. Determination of Gen.^{a)} Content in Gentianae Scabrae Radix and Gentianae Radix

Sample No.	Amount of sample taken (μ g)	Amount of Gen. ^{a)} in sample (μ g)	Gen. ^{a)} content (%)	Average (%)
1	25.00	1.349	5.396	5.441
	15.00	0.823	5.487	
	15.00	0.816	5.440	
2	35.00	0.733	2.094	2.103
	35.00	0.738	2.109	
	15.00	0.316	2.107	
3	40.00	1.072	2.680	2.681
	40.00	1.077	2.693	
	40.00	1.068	2.670	
4	25.00	0.851	3.404	3.409
	25.00	0.855	3.420	
	25.00	0.851	3.404	
5	50.00	0.968	1.936	1.933
	50.00	0.966	1.932	
	50.00	0.965	1.930	
6	40.00	0.868	2.170	2.169
	40.00	0.871	2.178	
	40.00	0.863	2.158	
7	30.00	0.840	2.800	2.803
	30.00	0.846	2.820	
	30.00	0.837	2.790	

Sample 1—5: Gentianae Scabrae Radix found on Tokushima market.

Sample 6, 7: Gentianae Radix found on Tokushima market.

For keys, see in Table I.

結 論

本法は、リュウタンおよびゲンチアナ中の gen. の迅速簡便な微量分析法としての利点を持ち、なんらめんどろな前処理をすることなくその抽出液をそのまま試料液とし、かつ、一定組成の溶離液を使用しているなどその実用性も充分と考えられるので、当該生薬の品質評価の一助になろう。