

高速液體 Chromatography法에 의한 醫藥品の 分析(第一報)

地黃含有 生藥製劑中の Mannitol 定量

梁基淑 · 尹源庸 · 吳世宗* · 朴在柱

藥品化學科 *機器分析科

High-pressure Liquid Chromatographic Analysis of Drugs I.

Estimation of Mannitol in Rehmanniae Radix Preparations.

Yang Ki Sook, Yoon Won Yong, Oh Sea Jong and Park Chae Joo

Pharmaceutical Chemistry Division *Instrumental Analysis Division

= Abstract =

A rapid determination of mannitol in crude drugs by the use of high speed liquid chromatography is described.

Mannitol is separated by a column of Aminex, using liquid chromatography of Waters with H₂O as the eluent solution and the separation is completed within thirty minutes.

Mannitol dissolves in water and the aqueous extract is injected into the column. The content of Mannitol was calculated from the calibration curve previously prepared using a standard.

緒 論

地黃은 藥典에 수재되어 있는 生藥으로 보혈, 강장, 진정, 해열제로서 빈혈,吐血, 下血, 子宮出血등에 쓰이며¹⁾ 乾地黃은 당뇨병, 디프테리아, 편도선염에 有效하다²⁾고 하여 한방치방에서 가장 많이 배합되는 藥材中の 하나로 쓰이고 있다. 이 地黃은 조제하는데 따라 3종류로 나눈다.

1. 生地黃

생뿌리를 그늘진 곳의 모래에 저장한 것으로 바깥면은 황적색을 띤다.

2. 乾地黃

뿌리를 陽乾한 것으로 바깥면은 회백색, 회갈색을 띠고 냄새는 없으며 단맛이 나고 약간 쓰다.

3. 熟地黃

生地黃에 술을 뿌려 쪄서 말린 것이다. 여러번 전것으로 바깥면이 아주 검고 윤기있는 것이 品質이 좋은 것이다.(九蒸九曝)

成分에 있어서는 뿌리에 Catalpol³⁾, Mannit를 함유

하며 수용성 부분에 mannitol 2%, stachyose 32%, glucose 9%외에 amino acid 11종이 報告²⁾되어있다. 地黃中の mannitol의 定量法에 관해서는 Amberlite column을 이용한 發色法이 利用되고 있으나 이의 前處理나 定量操作의 繁雜性, 再現性 및 分析에 長時間이 要하는 등의 문제점이 있다고 생각된다. 著者등은 이러한 점을 考慮해서 生藥 및 그의 抽出物中の mannitol의 迅速簡便한 定量法으로서 HPLC를 적용한 것을 報告하고자 한다.

實 驗 方 法

標準物質

Mannitol(NF), Pioneer Chemical Co. Inc.

試 料

市販品 ① 地黃 powder(KP III) ② 六味錠(複方...지황, 산수유, 산약, 복령, 목단피, 택사) ③ 雙和湯과립(複方...지황, 작약, 황기, 당귀, 천궁, 계피, 감초)

試料液의 調製

上記의 試料를 mannitol로서 1g해당량을 取하여 물

로 가온 추출하여 여과하고 여액에 10% lead acetate 를 가하여 생성된 침전을 여과하고 여액에 H₂S gas를 통하여 여과한 여액을 Et₂O로 추출하였다. 추출액은 버리고 수욕상에서 농축하여 전량을 50ml로 하였다.

使用機器

Waters 244 High Pressure Liquid Chromatography Column; Aminex 15Q-S
 Flow rate; 0.7ml/min
 Chart speed; 2.5cm/min
 Recorder; spectra physics minigrator
 Eluent solution; distilled water
 Detector; RI detector
 Column temp.; 85°C

定量法

만니톨 표준품 1g을 정평하여 증류수 50ml에 용해하여 10~20μl를 column에 注入해서 얻어진 chromatogram의 mannitol peak 높이로 回歸直線의 방정식을 이용해서 행했다. 試料液은 10~20μl를 注入했다.

結果 및 考察

HPLC 측정조건의 檢討

초기에는 carbohydrate analysis column (4mm ID×30cm)을 이용하여 여러가지 용매를 사용하여 分離를 시도하였으나 mannitol과 다른 糖이 分離되지 않아 Aminex column (1cm ID×60cm)을 사용했다. 移動相으로 증류수를 사용하여 約 30분만에 良好한 再現性을 가진 mannitol의 peak를 얻었다.

檢量線 및 定量精度

mannitol標準品の column으로의 注入量과 peak의 높이(cm)와는 良好한 直線關係를 나타내므로 回歸直線의 方程式을 이용해서 여러가지 量의 標品을 注入해서 얻어진 chromatogram의 peak높이에 의해 mannitol의 量을 算出해서 定量精度를 구했으며 거의 ±1% 이내의 誤差로 定量할 수 있었다. (Table I)

Table I. Precision of the Quantitative Determination obtained with different amounts of Mannitol by HPLC method

Amount of taken (μg)	Amount of found (μg)	Error (%)
0.200	0.201	+0.50
0.300	0.298	-0.70
0.400	0.399	-0.25
0.500	0.497	-0.6
0.600	0.595	-0.8

Mannitol 添加回收實驗

各 試料에 對해 一定量의 mannitol을 添加해서 그 回收率을 구한結果 거의 100%의 良好한 回收率이 얻어졌다. Table II에서는 sample 1에 對한 結果만을 표시했으며 다른 sample에서도 이와 같은 結果가 얻어져 單一製劑와 複合製劑 및 劑形에 따른 相異점은 나타나지 않았다.

Table II. Recovery of Mannitol after Addition to Rehmanniae Radix (sample 1)

Amount of sample taken(mg)	Amount of mannitol added(mg)	Mannitol amount in sample(mg)	Total mannitol (%)	Recovery of added(%)
40	none	0.800	2.0	—
40	0.200	0.988	2.47	98.5
40	0.200	0.992	2.48	99.0
40	0.200	0.984	2.46	98.0
40	0.200	0.973	2.43	96.6

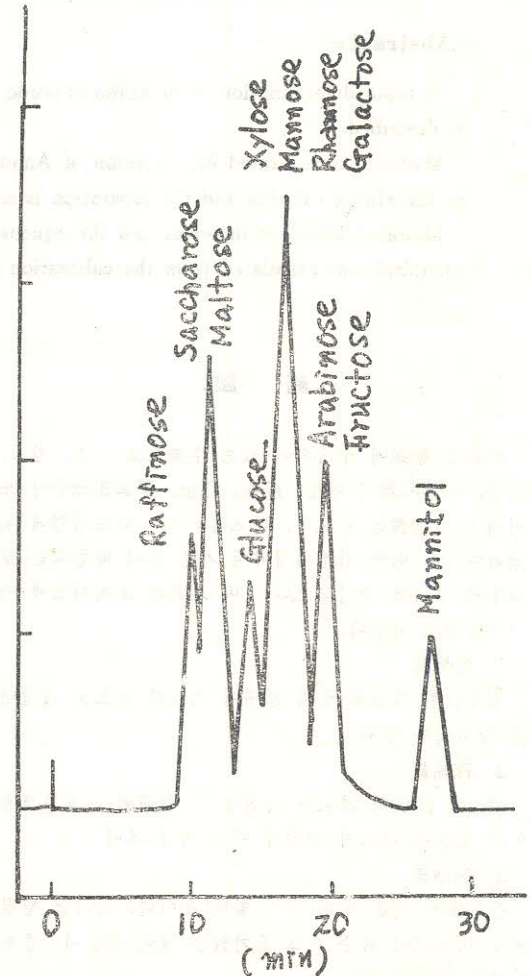


Fig. 1. Chromatogram of Mannitol in mixed standard sugars.

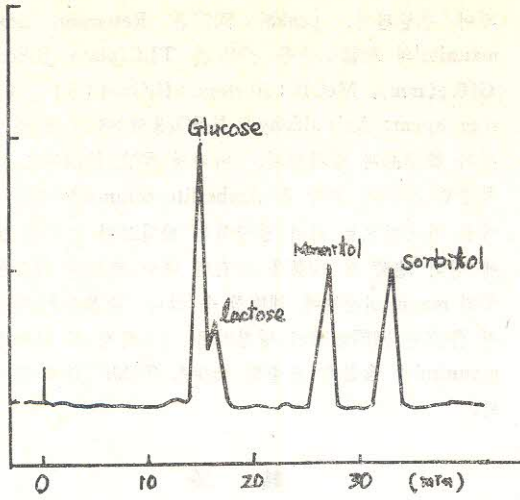


Fig. 2. Chromatogram of Mannitol in mixed sugars.

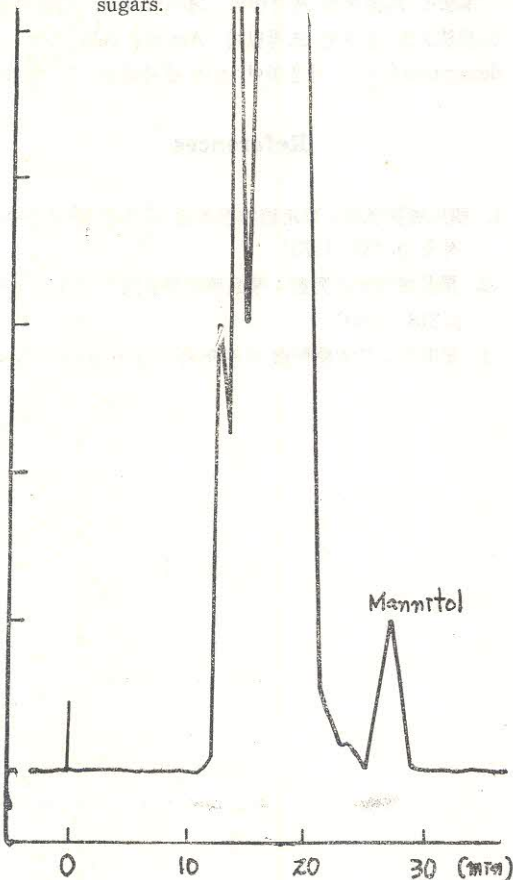


Fig. 3. Chromatogram of Mannitol in *Rehmanniae Radix* powder.

試料中の Mannitol의 定量

Fig. 1과 Fig. 2는 standard糖類를 혼합해서 injection

Table III. Determination of Mannitol contents in *Rehmanniae Radix* Preparations

Sample No.	Amount of sample taken(mg)	Amount of Mannitol in sample(mg)	Mannitol content (%)	Average (%)
1	50	0.99	1.98	2.01
	50	0.985	1.97	
	50	1.00	2.00	
2	50	0.90	1.8	1.83
	50	0.95	1.9	
	50	0.90	1.8	
3	50	1.05	2.1	2.03
	50	0.95	1.9	
	50	1.07	2.1	

Sample 1; *Rehmanniae Radix* powder

Sample 2; 雙和湯

Sample 3; 六味錠

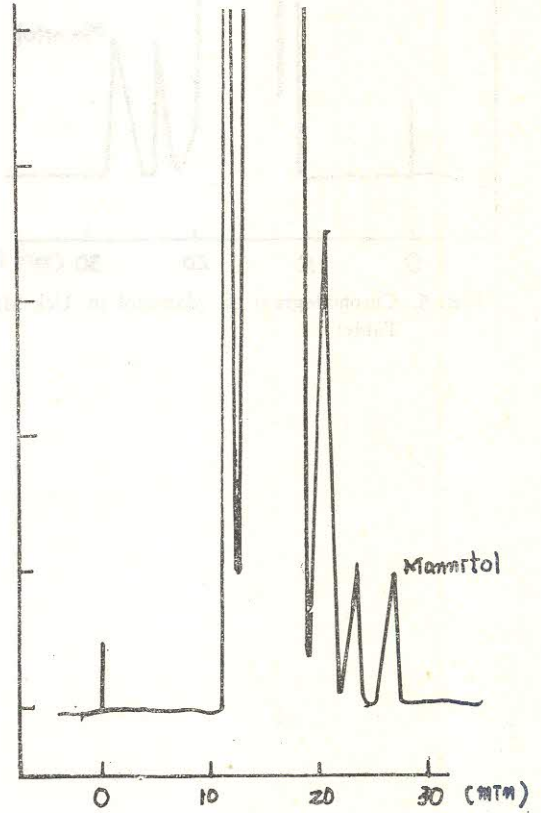


Fig. 4. Chromatogram of Mannitol in Sang Wha Tang Granule

했을 때의 分離된 mannitol의 peak이며 Fig. 3, 4, 5는 sample중의 mannitol의 peak로서 injection後 約25分後에 관찰되며 抽出液中에 공존하는 다른 成分과는 分離

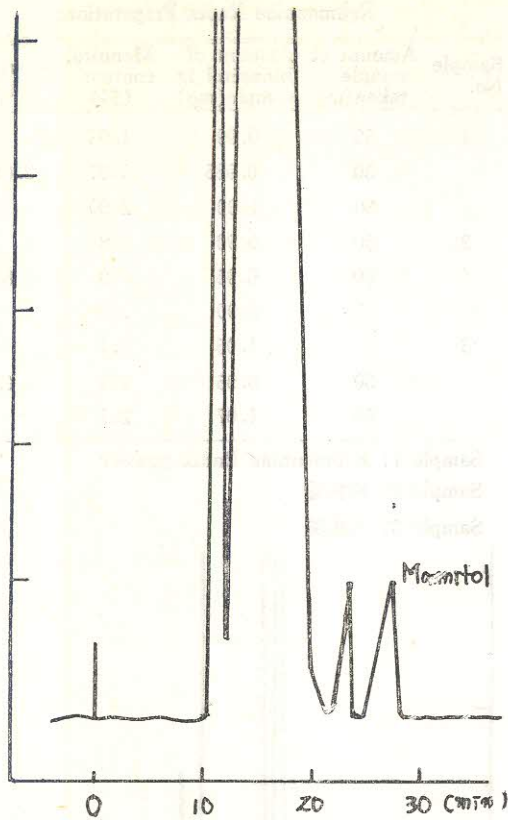


Fig. 5. Chromatogram of Mannitol in Uck Mi Tablet

되어 용출된다. peak의 同定은 Retention time과 mannitol의 相當部分을 分取後 TLC(plate; Silicagel G(0.25mm), MeOH : Acetone : H₂O=4 : 5 : 1, Coloring agent: Anis aldehyde H₂SO₄용액)에 의해 검토한 결과 標準品과 일치했다. 따라서 現在 使用되고 있는 복잡한 전처리 조작 후 Amberlite column을 통과시킨 액을 발색법으로 하여 정량하는 방법보다 간단한 조작에 의해 地黃 및 地黃을 含有한 여러 劑形의 復合製劑 중의 mannitol定량에 利用할 수 있다. 標準品을 利用해서 作成한 回歸直線의 방정식을 利用해서 各 試料 중의 mannitol의 含量을 산출한 結果를 Table III에 표시했다.

結 論

本法은 地黃含有 製劑 중의 Mannitol의 迅速간편한 分析法으로 불편한 조작없이 Aminex column에 물을 desorption용매로 사용하여 신속 精確하게 분리되었다.

References

1. 藥用植物學會 : 藥用植物學各論 제 2 판 진명출판사, 서울 p.283 (1973)
2. 藥品植物學研究會 : 藥品植物學各論 제 3 판 서울 p.318 (1980)
3. 北川등 : 日本藥學會 제89年會 강연집 p.318 (1965)