

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460118

研究課題名(和文) 漢方製剤の多面的分析による新規品質評価法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a new quality assessment method of Kampo based on multilateral analysis.

研究代表者

谷口 抄子 (Shoko, TANIGUCHI)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：20243488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：幅広い極性の芳香族化合物の一斉分析が可能である分析条件を確立し、相互作用による煎液中の成分の変化に着目し実験を進め、芍薬と他の生薬組み合わせによる、加水分解性タンニンの挙動の変化について検討した。また沈殿形成の挙動について、紫外可視スペクトル分析による比較を行い、要因としてカウンターイオンの影響や疎水性相互作用を示唆する基礎的データを得た。さらに補骨子からはモデルとなりうる化合物を単離し、その構造と活性を明らかにした。一方、高分子ポリフェノールの分析には、GPCによる分析が有効であり、これら高分子成分が他の生薬との沈殿形成に関与していることが示された。

研究成果の概要(英文)：Constituents in decoctions of a representative Kampo prescription and related formulations were analyzed quantitatively. HPLC conditions for simultaneous analyses of those constituents with a wide range of polarities including hydrolysable tannins were established. Particularly, we focused on the interactions between the constituents affecting the compositional changes in the constituents. Precipitations in the decoctions were also analyzed using UV-visible spectral analyses. Participation of the electrostatic and hydrophobic interactions in forming the precipitations were suggested. We found that GPC analyses are effective for the behaviors of polymeric polyphenols of rhubarb, a representative crude drug, and precipitations are formed as a result of interactions between those polyphenols of rhubarb and constituents derived from some other crude drugs in respective Kampo prescriptions.

研究分野：生薬化学

キーワード：漢方処方 ポリフェノール 相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えた現在、各種慢性疾患や不定愁訴など合成医薬品のみでの治療では完治しない病気が増加している。このような状況の中、漢方治療は治療の選択の多様化の観点からますます期待される。本来漢方製剤に使用される生薬は天然産物であるため、その品質は産地や気候、採集時期により大きく影響を受ける。そのため日本薬局方においては種々の規定を設け、使用される生薬ならびに同方収載漢方エキスについて、一定の品質を規定している。また、生薬の輸入・加工メーカーならびに漢方製剤メーカーは、日本薬局方の規格の適合の確認だけでなく、それぞれ独自の規格を設け、それらの生薬および漢方エキス剤の品質の維持をはかっている。その際、指標成分の定性、あるいは定量的な確認を行っているが、指標成分だけの評価が生薬全体の品質を示しているのか？という問題点がある。これまでの生薬研究では個別の薬効成分を単離、探求する手法が一般的であったが、漢方薬の効果はむしろ複合、多成分系としての総合的な働きの結果であり、処方全体を評価する必要があると考えられる。実際に服用される処方中にどのような成分がどの程度含有されているのについても特定成分以外については不明であった。また、漢方処方を煎じる際には、生薬成分間の相互作用の結果、生薬の組み合わせによっては、沈殿が生じたり、あるいは溶出される分量に変化があることが予想されるが、このような観点からの報告も少ない。

## 2. 研究の目的

(1) 実際に流通、利用されている生薬(官能試験での品質において良品とされる生薬と通常生薬)、ならびに漢方製剤(医療用漢方エキス剤および一般用漢方エキス剤)、また刻みの生薬から調製した湯液について、網羅的に分析、評価し、同一処方で、どの程度の差異があるのかを明らかにする。また、加減法などにより溶出される成分に差があるのかを明らかにする。

(2) 漢方処方を煎じて投与・服用する場合と漢方エキス製剤を利用する場合の大きな成分の差異としてエキス剤製造時に取り除かれる沈殿が挙げられる。

沈殿形成にかかわる因子を明らかにする。実際の相互作用の影響を受けた分子を特定する。

## 3. 研究の方法

### (1) 基本処方の選定

現代医療で使用される漢方処方の多くは、いくつかの基本処方の加減方であると見なすことができること、また、生薬間相互作用を検討す

るにあたり、生薬数が多くなるほど複雑化することが予想されることから、基本処方(麻黄湯、桂枝湯、四君子湯、人参湯、五苓散、小柴胡湯、半夏瀉心湯、黄連解毒湯、四物湯、六味丸、麦門冬湯)について解析を行った。これらの処方および関連処方とみなしうる処方により医療用漢方製剤の8割以上をカバーできる。したがってこれらの処方について得た基礎的データを関連処方と比較することにより、生薬の加味や抜き取りにより、どのような成分が大きく変化しているかを検討した。

### (2) 標準的な煎液の調製方法の検討

選ばれた刻み生薬を使用してマイコン煎じ器で加熱条件をコントロールしてサンプル(煎液)を調製する。また市販のエキス剤については、賦形剤が添加されており、賦形剤の除去が問題となることから、前処理について検討を加えた。

### (3) HPLC による分析

溶離液をグラジエント条件で送液し、ダイオードアレイ検出器(DAD)による逆相系3D-HPLC分析による一斉分析を行った。必要に応じてアイソクラティックな逆相および順相HPLC分析も併用した。

### (4) 高分子成分の分析

通常のHPLC分析では溶出されない、あるいはブロードなピークとして溶出されるために分析が困難な高分子成分の混合物については、TSK-Gel Super AW3000カラムを使用してGPC分析を行って分子量分布を測定した。

### (5) 紫外可視スペクトル分析

沈殿物はエキス剤調製時に取り除かれることからエキス剤と煎じた場合の大きな差異として挙げられる。そこで代表的な生薬および成分について、沈殿を形成する条件下で、単独の溶液と成分の変化の比較を紫外可視スペクトル分析法により行った。

### (6) モデル化合物の単離

分子内にカルボキシル基を有する化合物や疎水性相互作用を示す化合物を生薬から単離し、その構造を確認した。

## 4. 研究成果

### (1) 標準的な煎じ方の確立とバラツキの要因の解析

刻み生薬を利用して標準的な煎じ方の検討を進めた。用いる生薬量と煎じ方などを変更して、バラツキを確認した。同一ロットの生薬を利用して漢方調剤指針(じほう社)による生薬量を標準として、煎じ方を検討した。その結果、60分ではほぼ半量に煎じることができる条件を基準として採用した。土瓶やガス

による加熱などで煎じる場合は、かなりその煎液の最終的な量に差(バラツキ)が見られ、濃度に差があることが示された。一方、マイコン煎じ器を使用し、ガラス容器を電氣的に加熱した場合でも、そのふたの形状により煎液量に差が生じることが判明した。同一機器を利用して差があることから、結果として成分の濃度としてはかなりバラツキのある煎液を服用していることが示された。

#### (2) 一斉分析条件の確立

いずれの生薬および処方も多様な成分を含むため、効率的な分析条件を確立する必要があった。今回、まずは逆相 HPLC に使用するカラムおよびグラジエント条件を種々検討した結果、汎用される標準的な ODS 系カラム(4.6 × 150 mm)を使用し、リン酸緩衝液とアセトニトリルの混合溶媒による組み合わせのグラジエント条件での分析により、幅広い成分を比較的分離良く一斉分析が可能であることを確認した。HPLC による分析条件を検討した際、メンブランフィルターのろ過操作により特定の成分の吸着が見られ煎液の状態を反映せず、penta-*O*-galloylglucose (penta-GG)は前処理にフィルター処理により吸着されることから、これまでの報告では分析対象から排除されていた可能性も示された。そこで遠心ろ過による前処理を行い、フィルター型ガードカラムを使用することにより、同一ロット間の定量値のバラツキが低減できることが明らかとなった。また、エキス剤についても熱湯で溶解しメスアップ後に遠心することで、再現性のよい HPLC サンプルが調製できることを確認した。しかし、確立した条件は、1 検体ごとに 1 時間程度の分析時間が必要であり、多数の検体を同時に分析するには、必要に応じて、リン酸緩衝液とアセトニトリル・メタノールのアイソクラティックな分析、さらに順相 HPLC を組み合わせることで利用することとした。またサポニン含有生薬については個別の成分の評価が困難であったことから別途評価系を確立する必要があり、この点は今後の課題となる。8 つの基本処方について、市販の生薬標品との比較により、主要成分の同定は比較的迅速に行う事ができた。また、3D-HPLC を利用することにより、未同定ピークについてもその 3D クロマトグラム上の UV スペクトルパターンから化合物のタイプを推定可能であった。

芍薬、当帰、桂皮など汎用生薬について、グレードの異なる生薬を入手し、確立した条件で比較を行った。今回の分析条件では、その成分パターンに生薬のグレードによる大きな差は認められなかった。当帰や桂皮については精油成分が保存状態により異なることが予想されるため、精油成分については個別に極性の異なる分析条件での検討がさらに必要である。

次に、加法による成分変化を確認するため桂枝湯と葛根湯の差をみたところ、葛根と麻

黄の両生薬が加わることにより、甘草の glycyrrhizin 量が減少することが確認されたが、その差はわずかであった。実際、glycyrrhizin 量については、先の煎じ方の違いの方が、最終的な煎液中の濃度に大きな影響を与えたことから、生薬間相互作用による減少というよりというよりむしろ生薬残渣への吸着などの影響が推察された。

#### (3) 芍薬甘草湯を中心とした分析

常用される生薬である芍薬の煎液中の成分の挙動については、主にモノテルペン配糖体の paeoniflorin の解析が中心であり、タンニン成分については報告が少ない。今回主要なタンニン成分である penta-GG について、生薬の加減により煎液中の含有量に変化があるかを検討した。まずは、生薬間相互作用の検討のため、生薬の組み合わせの少ない芍薬と甘草のみから構成される芍薬甘草湯について分析を進めた。芍薬および甘草の主要成分である、paeoniflorin, glycyrrhizin, liquiritin について煎出時間ごとの溶出量を逆相のグラジエント HPLC 分析により、確認したところ、いずれの成分についても 60 分まで徐々に溶出量が増え、その際の溶出量や増加の割合は、それぞれの生薬を単独で煎じた時と処方として煎じた時では大きな差は認められなかった。また、今回着目した penta-GG については、関連の化合物との比較も含め、順相 HPLC 分析が有効であり、比較的短時間で分析できることを確認した。その結果、芍薬に含有される hexa-, hepta-GG は、有機溶媒では抽出されるが、通常の煎じ方では煎液中には検出されないことを確認した。

さらにタンニン成分は共存他成分との相互作用が想定されたことから、附子を加えた芍薬甘草附子湯、および芍薬単独との比較を行ったところ、penta-GG の溶出量に大きな変化はなく、相互作用は小さいことが確認できた。他方、温清飲には芍薬と黄連、黄柏などのアルカロイド生薬が配合されることから、これらの生薬との相互作用についても検討を進め、芍薬の penta-GG 量が、黄柏および黄連のいずれの生薬との共存によっても煎液中で減少することを認めた。また、黄柏および黄連の berberine 含有量も単独で煎じた時に比べ減少したことから、penta-GG と berberine の相互作用が示唆された。

#### (4) 紫外・可視吸収スペクトル分析による沈殿形成時の変化

さらに三黄瀉心湯の構成生薬の相互作用を調べるために、紫外・可視吸収スペクトルによる分析を行った。各生薬の単独の溶液と混合溶液でのスペクトルを比較した。黄連と大黃の組み合わせにより黄連が示す 350nm 付近のスペクトル吸収が低下することが示された。そこで、標品の berberine, baicalin, sennoside A の各標品を使用して、その吸収スペクトルパターンを生薬あるいは生薬を

組み合わせた場合のものと比較した。その結果, berberine に由来する吸収が減少していることが示された。一方, sennoside A の吸収については大黄中での含量が低いことから, 吸収スペクトルによる比較での影響の確認は困難であるが, 大黄が示す短波長の吸収が全体に低くなることが示された。以上の他, 黄芩中の baicalin や汎用生薬の甘草の glycyrrhizin についても berberine との相互作用を検討したところ, 溶液の液性の変化によりスペクトルパターンに変化があり, これら化合物イオン間での塩形成の影響が示唆された。また, 大黄に含まれるタンニン類については, 他の生薬との沈殿形成に影響を与えていることを確認し, 疎水性相互作用を示す基礎的データを得た。

#### (5) モデル化合物による沈殿形成に関する分析

紫外吸収スペクトルで検討した黄芩の baicalin や甘草の glycyrrhizin などは, 副作用の点からも関心を高めている生薬成分であるが, この2つの成分は, 分子内にカルボン酸を有する。フェノール性化合物に比べイオン化しやすく, 塩を形成しやすいことから, 溶液の液性によっては沈殿形成に関与することが推定された。そこで, 生薬の艾葉から単離したカフェタンニンの1種の 1,5-di-O-caffeoylquinic acid について NMR 分析によりその溶解性との関係を検討した結果, 文献上, 異なる化合物として提唱されている構造は, 単に塩の形成によりケミカルシフト値が変化したとして説明できることを認めた。またシソ科植物に広く分布する関連化合物のカフェタンニンの単離を進める目的でシソ科植物の成分研究を進めた, その結果, 新規なセスキテルペン化合物の構造を明らかにした。さらに, 分子内にカルボン酸を有するフラボノイド配糖体を単離した。今回単離した化合物はモデル化合物として, 黄芩中の baicalin と構造の関連する化合物として今後利用が可能である。一方, 強い抗菌活性を有する生薬の補骨子から, 疎水性の高い成分を単離した。

#### (6) 高分子成分の解析

漢方処方に配合される生薬の多くに含有されるタンニン類は金属やタンパク質との相互作用により難溶性の沈殿を形成することが基本的・共通の性質である。大黄は繁用される重要生薬であり多様な成分を含有しているが, 高度にガロイル化された縮合型タンニンを多く含む生薬でもある。その基原とされる植物により, 縮合型タンニンの組成に違いがあるとされることから, 本研究で粗分画により高分子タンニン類を効率的に単離する方法を確立し, 分解反応によりそれらの構成単位を明らかにした。入手可能であった基原の異なる大黄や修治された大黄について GPC による高分子成分の成分分析を行った

ところ, それぞれ異なる分子量分布を示した。これら成分の組成の違いが沈殿形成に与える影響についても今後検討する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

Yanmei Cui, Shoko Taniguchi, Teruo Kuroda, Tsutomu Hatano, Constituents of *Psoralea corylifolia* Fruits and Their Effects on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Molecules* 2015, **20**(7), 12500- 12511; doi:10.3390/molecules 200712500, 査読有

[学会発表](計 6件)

松本 幸子, 青山 弘枝, 崔 艶梅, 谷口 抄子, 波多野 力; 大黄の高分子ポリフェノールの修治処理による変化; 日本薬学会第134年会(熊本); 平成26年3月28日  
崔 艶梅, 谷口 抄子, 黒田 照夫, 波多野 力; 補骨脂の成分(第1報); 日本薬学会第134年会(熊本); 平成26年3月28日  
崔 艶梅, 谷口 抄子, 黒田 照夫, 波多野 力; 補骨脂成分の研究(第2報); 日本生薬学会第61回年会(福岡); 平成26年9月14日  
門田 明子, 谷口 抄子, 崔 艶梅, Joshua RUNTUWENE, 鄭 凱駿, 乾 明夫, 波多野 力; *Coleus atropurpureus* の成分研究; 日本薬学会第135年会(神戸); 平成27年3月27日  
崔 艶梅, 谷口 抄子, 黒田 照夫, 波多野 力; 補骨脂成分の構造とメチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する抗菌作用; 第6回食品薬学シンポジウム; 平成27年10月31日  
崔 艶梅, 谷口 抄子, 黒田 照夫, 波多野 力; 呉茱萸の成分研究(第1報)ポリフェノール成分; 日本薬学会第136年会(横浜); 平成28年3月29日

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

谷口 抄子 (TANIGUCHI Shoko)  
岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科  
准教授  
研究者番号: 20243488

##### (2) 研究分担者

波多野 力 (HATANO Tsutomu)  
岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科  
教授  
研究者番号: 50127578