

漢方製剤の薬剤学的品質評価に関する研究 (第1報)¹⁾
黄連のアルカロイドと甘草および大黃の成分との漢方湯液中での沈殿反応について

野口 衛^{2a)}, 久保道徳^{2b)}, 林 輝明^{2b)}, 小野明二^{2b)}

国立衛生試験所大阪支所^{2a)}

近畿大学東洋医学研究所^{2b)}

**Studies on the Pharmaceutical Quality Evaluation of the Crude
Drug Preparations Used in Orient Medicine "Kampoo" (I)¹⁾
Precipitation Reaction of the Components of Coptidis Rhizoma and These
of Glycyrrhizae Radix or Rhei Rhizoma in Decoction Solution**

MAMORU NOGUCHI,^{2a)} MICHINORI KUBO,^{2b)} TERUAKI HAYASHI^{2b)}
and MEIZI ONO^{2b)}

*Osaka Branch^{2a)}, National Institute of Hygienic Sciences
Institute of Oriental Medicine, Kinki University^{2b)}*

(Received December 14, 1977)

Precipitation was found to be formed during the preparation of decoction from a mixture of Coptidis Rhizoma and Glycyrrhizae Radix or Rhei Rhizoma according to the prescription of Shookan-ron and Kinki-yoryaku, commonly used in the oriental medicine, Kampoo. By the survey of bitter taste, antibacterial activity and precipitation formation with Mayer reagent, the alkaloids in the Coptidis Rhizoma was shown no longer to exist in the supernatant of the decoction.

Chromatographic separation of the components which precipitated with saturated solution of berberine chloride showed that glycyrrhizin in Glycyrrhizae Radix and tannin-like substances in Rhei Rhizoma were responsible for this precipitation reaction.

Berberine-precipitation reaction was conducted using 19 kinds of commercial rhubarb specimens and it was found that the quantity of precipitate was in proportion to the commonly accepted commercial grade thereof based on the sensory test. Thus, the berberine-precipitation reaction may be used for the evaluation of Rhei Rhizoma.

漢方医学の薬物療法の特徴は、二種以上の生薬を、患者の証に合わせて一定量ずつ組み合わせ、煎剤、散、丸剤などとし用法に従って使用するところにあるが、個々の生薬の薬効、作用本体、作用機序が不明なものが多く、多種類の生薬を配合することの意義についても、二、三の研究があるのみで、ほとんど明らかにされていない。

一方、合成医薬品による薬害事故が多発する中で、漢方療法への関心が深まり、多種多様の漢方製剤が市販されるようになってきたが、その品質を確保するための研究は著しく立ち遅れ、厚生省が指定した常用漢方処方210品目についても、原料生薬の配合量のみが定められ、エキス散その他の製剤の品質に関する規制は何ら行なわれていない³⁾。

著者らは、さきに、生薬製剤中に残留する有機塩素剤⁴⁾、南天製剤⁵⁾、黄連製剤⁶⁾の分析を行ない、生薬製剤の品

1) 日本薬学会第96年会(名古屋, 1976年4月)に発表。

2) Location: a) 6, Hoenzaka-cho, Higashi-ku, Osaka, 540; b) 380, Nishiyama, Sayama-cho, Minami-kawachi, Osaka, 589

3) 日本公定書協会編, 医薬品承認審査事例集, 薬業時報社, 東京, 1974, p.63.

4) 野口 衛, 金田吉男, 持田研秀, 生薬, 26, 19 (1972).

5) 野口 衛, 持田研秀, 生薬, 29, 31 (1975).

6) 野口 衛, 持田研秀, 生薬, 30, 47 (1976).

質規格は原料生薬中の成分含量のみでなく、それらの製剤加工過程における動態の研究を抜きにしては行ない得ないことを明らかにしたが⁷⁾、今回、構成生薬数がすくなく、浸剤、煎剤、丸剤、生薬末散剤などの異なった剤型を患者の症状に応じて使い分ける瀉心湯類をモデルとして選び、その構成生薬、黄連のアルカロイドと、甘草および大黄の成分との湯液中での沈殿反応について検討した。

実験結果と考察

1. 黄連配合漢方処方湯液の苦味テスト

漢方古典医学書『傷寒論』⁸⁾ および『金匱要略』⁹⁾ に記載される黄連配合剤は12種類で、これらは、その配合生薬の組み合わせから、黄連と大黄を含むもの、黄連と甘草を含むもの、大黄および甘草を含まないものの3つのグループに大別される。

そこで、これらの処方の湯液を前述文献に記載されたとおりの方法で調製し、味覚を調べたところ、大黄あるいは甘草の含まれるグループでは苦味が消失するが、これらを含まないグループでは、ベルベリン型アルカロイドの強い苦味が感じられた(TABLE I)。

また、処方を構成する生薬一つずつを黄連と組み合わせ、前述文献に従って湯液を調製したところ、大黄、甘草、黄芩との組み合わせで湯液の苦味が消失し、沈殿を形成することが明らかとなった。

2. 黄連と甘草の湯液中での反応

黄連および甘草それぞれ10gをとり、水300mlと1時間加熱し、ガーゼ濾過したのち減圧下に100mlに濃縮したもの¹⁰⁾を種々の割合で混合し、苦味を調べたところ、TABLE IIに示すように、黄連水浸液(A)、甘草水浸液(B)の混合比1:3以上で苦味が消失し、1:4以上で遠沈上澄部のマイヤー試料反応が陰性となった。これは、(A)中のアルカロイドが(B)中の成分と反応して沈殿を生成し、溶液中から除去されたためと考えられる。

そこで、このことをさらに確かめるため、*Staphylococcus aureus* 209 Pを被験菌として、ペーパーディスク法で(A)(B)混液の上澄部の抗菌性を調べたところ、その比5:4以上でベルベリン型アルカロイドに由来する抗菌性が

TABLE I. 傷寒論・金匱要略(明刊)の黄連配合剤

	黄連	大黄	黄芩	甘草	人参	半夏	乾姜	大棗	その他	
大黄 黄連瀉心湯	○	○								苦 味 な し
瀉心湯	○	○	○							
附子瀉心湯	○	○	○						附子	
半夏瀉心湯	○		○	○	○	○	○	○		苦 味 あ り
生姜瀉心湯	○		○	○	○	○	○	○	生姜	
甘草瀉心湯	○		○	○	○	○	○	○		
葛根 黄芩黄連湯	○		○	○					葛根	
黄連湯	○			○	○	○	○		桂皮	
白頭翁加 甘草阿膠湯	○			○					白頭翁, 阿膠 奏皮, 柏皮	
乾姜 黄芩 黄連人参湯	○		○		○					
小陷胸湯	○					○			括呂仁	
白頭翁湯	○								白頭翁, 奏皮 黄柏	

7) 野口 衛, 第9回和漢薬シンポジウム報告, p.115 (1976).

8) 明, 趙開美刊本, “傷寒論”, 燎原, 卷四, p.177, 卷十, p.437.

9) 明, 俞子木刊本, “金匱要略”, 燎原, 卷中, p.158.

10) 漢方処方では一般に黄連1~3g, 甘草3g程度を配合し, 600mlの水を加え約300mlに濃縮するものが多いが, モデル実験であるため, 高濃度条件を採用した。

TABLE II. Reaction of Aqueous Extracts of Glycyrrhizae Radix and Coptidis Rhizoma

Exp. No.	Mixing Ratio		Bitterness	Mayer Reag.
	Copt. Ext.	Glycyrrh. Ext.		
1	1	1	+	+
2	1	2	+	+
3	1	3	-	+
4	1	4	-	-
5	1	5	-	-

TABLE III. Antibacterial Activity of the Supernatant Obtained by Mixing of Glycyrrhizae and Coptidis Extracts

No.	Control			Sample		
	Copt. Ext.	Water	Activ.	Copt. Ext.	Glycyrrh. Ext.	Activ.
1	5	1	卅	5	1	卅
2	5	2	卅	5	2	卅
3	5	3	卅	5	3	+
4	5	4	+	5	4	-
5	5	5	+	5	5	-

消失した (TABLE III).

3. 甘草中のベルベリン沈殿反応陽性物質の分離

甘草をエーテルで脱脂し、難波らの方法¹¹⁾でポリアミドカラムクロマトグラフィー (展開溶媒はアンモニア性 MeOH) を行ない、glycyrrhizin (G) 含有分画と非含有分画に分け、塩化ベルベリン (Ber. Cl) 飽和水溶液を滴加すると、両分画とも沈殿を生じた。

同様に、Fig. 1 に示す方法で分画を行なったところ、ブタノール層 (II)、50% エタノール層 (III) とともに沈殿反応陽性で、薄層クロマトグラフィー (TLC) (Kieselgel G, *n*-BuOH-3 N NH₄OH-EtOH (5:2:1), 10% H₂SO₄) により (G) は分画 (III) に移行していることが確認できた。

また、黄連のメタノールエキスをシリカゲルクロマトグラフィー (BuOH-AcOH-H₂O (4:1:2)) で berberine 分画, coptisine および jateorrhizine 分画, 未同定アルカロイド分画, 非アルカロイド分画に分け¹²⁾, それぞれに (G) カリウム塩水溶液を加えると、アルカロイド分画はすべて沈殿するのに対し、非アルカロイド分画は沈殿を生じなかった。

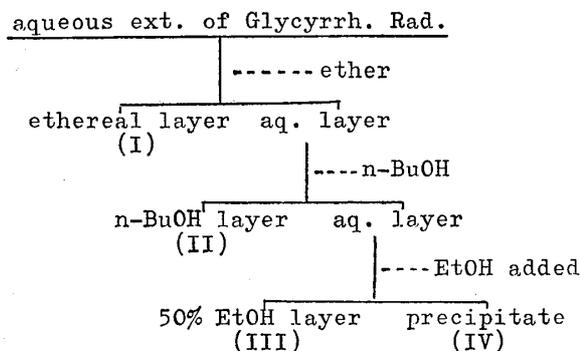


Fig. 1. Fractional Dissolution of Aqueous Extract of Glycyrrhizae Radix

11) 難波恒雄, 吉崎正雄, 富森 毅, 坪井正彦, 加藤公代, 薬誌, **95**, 809 (1975).

12) 水野瑞夫, 久保道德, 山口真由, 谿 忠人, 小野明二, 内田景博, 有地 滋, 日本生薬学会第 24 回年会講演要旨集, p.6 (1977).

以上の実験の結果から、甘草中にはベルベリン型アルカロイドと反応する物質が2種以上存在すると考えられる。

そこで、さきのブタノール可溶部についてシリカゲルクロマトグラフィー (CHCl₃: MeOH=5:1) を行ない、沈殿反応陽性フラクションを集め、同じ溶媒系で分取 TLC をくり返し、少量のベルベリン沈殿反応陽性物質 (m.p 193~196°) を得ることができた。その構造については別に報告する。

4. 黄連と大黃の湯液中での反応

『傷寒論』の「大黃黄連瀉心湯」、『金匱要略』の「瀉心湯」をはじめ、多くの処方において大黃と黄連は2:1の割合で配合されている。

そこで、大黃 2g, 黄連 1g に熱湯 100 ml を加えて3分間煮沸したところ、湯液の苦味が消失するのみでなく、黄色~黄褐色のコロイド状沈殿を形成し、その量および形状は、用いる大黃の種類により著しく異なった。

大黃の熱湯浸出液に Ber. Cl 飽和水溶液を加えても、同様に沈殿を生成するが、同浸出液に皮粉 (Haut Pulver, Merck 社製) を加え、かくはんし、濾過したものではもはや沈殿を生じないことから、大黃中のタンニン様物質が沈殿反応に関与していると考えられる。

この沈殿を水-アセトン (1:1) 混液に溶かし、アンバーライト IRC-50 で Ber. Cl を吸着させ、Fig.2 に示す方法で分画したフラクション I (Fr. I) は FeCl₃ 試液により緑色を帯びた青灰色を呈し、タンニン定量法に準じて皮粉を加えかくはんしたろ液は、Ber. Cl 飽和水溶液で沈殿を生じなかった。この Fr. I と、一般に大黃中のタンニン様物質として広く知られる glucogallin をペーパークロマトグラフィー (展開溶媒 BuOH-AcOH-H₂O (4:1:5)) の上層に 10% ethyleneglycol を添加、FeCl₃ 試液で検出) で比較したが、両者は一致しなかった。また、Kieselgel G を用いた TLC (展開溶媒 C₆H₆-HCOOC₂H₅-HCOOH (75:24:1) アンモニア蒸気で検出) で、chrysofanol, rhein, emodin, aloe-emodin 標品と比較したが、Fr. I 中にはこれらは含まれていないことが明らかとなった。

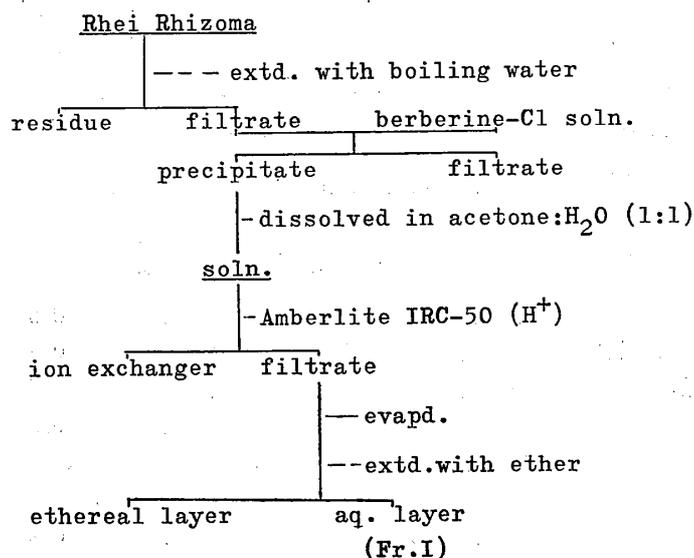


Fig.2. Fractionation of Rhei Rhizoma

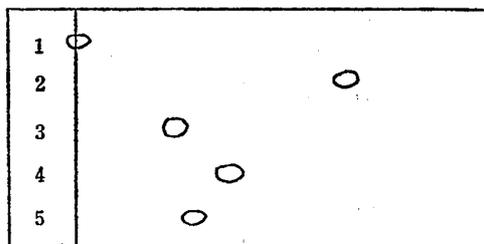


Fig.3. Thin-Layer Chromatogram of Oxyanthraquinones in Rhei Rhizoma

1, Rhei extract Fr. I; 2, chrysofanol; 3, Rhein; 4, Emodin; 5, Aloe-emodin. Plate, Kieselgel G; solvent, C₆H₆-HCOOC₂H₅-HCOOH (75:24:1); detect, NH₃ vapor.

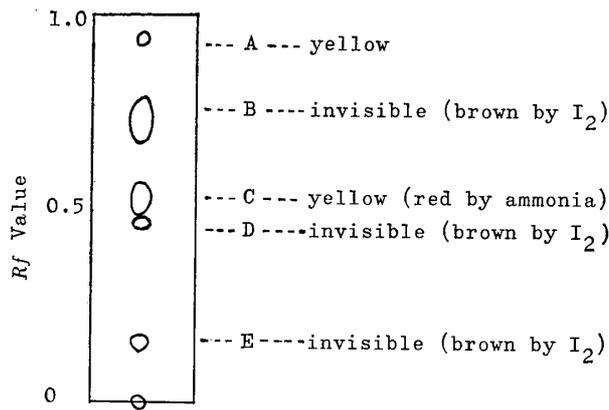


Fig. 4. TLC Pattern of Rhei Components Which was Precipitated with Berberine Chloride

(4物質とも Ber. 沈殿反応は陰性である)(Fig. 3). さらに, この Fr. I をアビセル SF を用いた TLC (展開溶媒 *iso*-PrOH-H₂O (2:1)) で分離すると, 5個のスポット A, B, C, D, E が検出された (Fig. 4). スポット A, C は肉眼で淡黄色, スポット B, D, E は無色で, I₂ の CHCl₃ 溶液を噴霧すると褐色となった. 各スポットともニンヒドリン試液, 塩化第二鉄試液, リンモリブデン酸試液で呈色せず, スポット C のみはアンモニア蒸気で橙色となった. しかし, これらの中のいずれが沈殿反応に関与するかは, 今回の実験では明らかにできなかった. Fig. 4 にそのクロマトパターンを示す.

5. ベルベリン沈殿反応の大黃の品質評価への応用

大黃の品質試験法としては, 第9改正日本薬局方の raponticin の TLC のほか, 高速液体クロマトグラフィーによる sennoside 類の定量¹³⁾, 遊離型アントラキノンと結合型アントラキノンの比色法による分別定量¹⁴⁾, 瀉下作用による bioassay¹⁵⁾ などが知られているが, 漢方医学書では, 大黃を瀉下の目的のみに用いることはすくないところから, 古来の経験的な外部形態学的な鑑別法と対応する試験法が必要となる.

TABLE IV. 各種大黃の黄化ベルベリンとの反応

名	称	水浸液の色調	水溶液の濁度	Ber. Cl との沈でんの状態	Ber. Cl 加30分の沈でん量	同沈でん密度	湯液の色調
1	唐大黃	茶褐色	+	綿状	0.5	粗	黄色
2	大黃 (湖南省香港市場品)	赤褐色	+	"	0.4	"	黄色
3	大黃 (香港市場品)	黄褐色	-	粒子状	0.5	中	"
4	中国産2級大黃	"	-	綿状	0.3	中	"
5	中国産等外大黃	やや赤褐色	-	にごる	にごるのみ	-	黄褐色
6	朝鮮大黃	"	+	"	にごる	-	"
7	韓国産大黃	黄褐色	+	綿状	0.2	粗	黄色
8	韓国産大黃	黄色	-	澄明	0.05	"	"
9	和大黃	赤褐色	+	綿状	0.3	中	"
10	和大黃	"	+	"	0.2	密	"
11	籽黃	黄色	-	"	0.2	中	"
12	芋大黃	黄褐色	+	"	0.2	"	"
13	芋大黃	"	+	"	0.1	"	"
14	馬蹄大黃	"	+	"	0.2	粗	淡茶色
15	古渡り馬蹄大黃	黒褐色	+	"	0.5	-	茶色
16	古渡り大黃	"	+	綿状	0.5	粗	茶褐色
17	錦紋大黃	黄色	-	"	0.5	密	黄色

13) 栗山政道, 高橋 惇, 井上建三, 村松管幸, 佐渡哲夫, 川合憲治, 岩田昭夫, 昭和 49 年度厚生科学研究報告, p.235 (1975).

14) 鈴木信夫, 栗木武男, 辻山 毅, 昭和 48 年度厚生科学研究報告, p.247 (1974).

15) 松岡敏郎, 生薬, 15, 113(1961); 藤村 一, 代謝, 10, 716 (1973).

そこで、大黃市場品 17 種について、上述の沈殿反応を行ない、沈殿の量、形状を比較した。その結果は TABLE IV に示すとおりで、錦紋大黃や中国産市場品で良品とされるものでは、一般に沈殿の生成量が多く、劣品とされる等外大黃、芋大黃、和大黃、馬蹄大黃などは沈殿の生成量がすくなく、また、古渡り品は、馬蹄大黃でも沈殿の量は多くなっていた。

試料溶液を試験管に取り、Ber. Cl 飽和水溶液を加え、30 分放置後の沈殿層の液の深さとの比をとると、データが数値化され、判別が容易となった。

以上の結果から、タンニン様物質を対象にした本沈殿反応は、古来の経験的な方法と一致した成績を与える、簡便な品質鑑定法といえよう。

6. 湯液中における生薬成分の沈殿反応の臨床的意義について

黄連と甘草の湯液調製時に生成した沈殿は、人工胃液 (JP VIII) には溶けにくい¹⁶⁾、人工腸液 (JP VIII) にはそれよりやや溶けやすいので、生薬を煎じてそのまま服用する時には、沈殿を生成しても、けんたく状態の沈殿をも同時に摂取できるので、薬効上支障はないが、濾過操作を加えると沈殿が除去され、また、結合状態の物質を解離させる操作を加えないと、製剤の定量値が減少する。

ところが、黄連と大黃の沈殿物は人工胃液、人工腸液に難溶であり、消化管内で解離して berberine の抗菌性をはじめとする薬効を発現しないと考えられる。

主要漢方医学書に記載される大黃、黄連を主剤とする処方 TABLE V に示すとおりで、傷寒論、金匱要略では浸剤、煎剤のみが記載されているのに対し、後世になると、散剤あるいは丸剤(圓)が煎剤と同一文献中に現れ、煎剤の薬効として“大便秘結”があげられ、生薬末をそのまま用いる場合と煎剤を用いる場合を意識的に区別するようになったと考えられる¹⁷⁾。すなわち先に述べたように、煎剤中で大黃中のタンニン様物質と黄連中のベルベリン型アルカ

TABLE V. 古文献にみられる大黃黄連黄芩配合処方

年代	処方名	配合量			薬	効	文献
		大黃	黄連	黄芩			
漢	大黃黄連瀉心湯	2	1		浸	火熱受邪心病生焉苦入心塞除熱	傷寒論
	瀉心湯	2	1	1	煎	心気不足……吐血衄血	金匱要略
唐	大黃散	4	4	4	散	黄疽, 身体面目皆黄	外台秘要
	三黄丸	3	4	4	丸	男子五劳七傷, 洒濁, 不生肌肉, 婦人帶下, 手足寒熱	
		1	7	6			
		2	3	6			
		5	2	3			
大黃黄連瀉心湯	2	1		煎	心下痞之自濡	千金翼方	
三黄散	4	4	4	散	黄疽, 身体面皆黄	備急千金要方	
瀉心湯	2	1	1	煎	吐血, 衄血, 霍乱, 心气不定		
金	三黄丸	2	4	4	丸	五劳七傷, 消渴, 不生肌肉, 婦人帶下, 手足寒熱	儒門事親
		1	1	6			
		2	2	6			
		5	2	3			
宋	三黄丸	1	1	1	丸	三焦積熱, 眼目赤腫, 頭頂腫痛, 下焦有熱小便赤澀	脾胃論
	瀉心三黄湯	1	1	1	煎	傷寒六七日内有燥屎, 大便秘結, 譫語目赤毒氣閉塞	校註婦人良方
明	大黃黄連瀉心湯	5	3	2	煎	傷寒大下後復發汗心下痞按之濡, 胃中有燥屎大便難	奇効良方
	三黄湯	3	3	3	煎	積熱結滯臟腑, 大便秘結, 心膈煩燥	
	三黄丸	1	1	1	丸	小兒積熱, 吐血, 咽膈不利	
清	三黄湯	6	1	1	?	血溢者	温熱経解

16) 続報参照。

17) 久保道徳, 小野明二, 林輝明, 有地滋, 野口衛, 日本薬学会第 97 年会講演要旨集, 第 II 分冊, p.123 (1977).

ロイドが難溶性の沈殿を形成することから、これらの物質の薬効(たとえば収れん作用や抗菌性)を期待する場合には散、またこれらの物質を除いた残りの、たとえば sennoside の瀉下作用などを期待する場合には煎剤を用いるといったように、この沈殿反応を用いて処方薬を変換させているところに、漢方医学の薬物療法の薬剤学的特徴があるといえよう。

このことについては、薬理実験や、他の生薬を組み合わせた場合の沈殿反応を含め、さらに検討を加えたい。

実験の部

1. 抗菌性試験

寒天培地(肉エキス, ポリペプトン各 1%, NaCl 0.5%, 寒天 1.5%, pH 7.2)を 130°, 20分, 2気圧で湿熱滅菌し, 被験菌 *Staphylococcus aureus* 209 P をうえ, 平板にかためたのち, 試料溶液を浸し乾燥した直径 7 mm の濾紙片をおき, 37°, 4時間培養し, 発育阻止円の大きさを測定した。

2. 甘草中のベルベリン沈殿反応陽性物質の分離

甘草 100 g に水 1,000 ml を加え, 1時間ずつ 2回加熱抽出する。濾液を合し, 減圧下に約 100 ml に濃縮し, Fig.1 に示す方法で Et₂O 可液部, n-BuOH 可溶部, 50% EtOH 可溶部, 同不溶部の 4つに分画し, それぞれの分画について Silicagel G 薄層, BuOH:3N アンモニア:EtOH(5:2:1) で TLC を行なった。発色試薬:1% 硫酸セリウム-10% 硫酸, 10% 硫酸。

3. ベルベリン沈殿反応を用いる大黃の品質鑑別法

各種大黃 2 g をこまかく碎き, 熱湯 60 ml を加えよく振とうしたのち, 濾過する。ろ液 10 ml を試験管に取り, 塩化ベルベリン飽和水溶液 10 ml を加え, よく振とうしたのち 30 分間放置した。沈殿量の記載には, 試験管中の液の深さに対する沈殿部分の深さの占める割合を用いた。

4. 大黃中のベルベリン沈殿反応陽性物質の分離

細かく碎いた大黃 50 g を熱湯 300 ml ずつで 2回振り出し, 熱時濾過し, 濾液に熱 Ber. Cl 飽和水溶液を, もはや沈殿が生じなくなるまで加える。一夜放置後生じた沈殿を吸引濾過し, 沈殿をアセトン-水(1:1)混液, 200 ml に溶かし, 水 100 ml を加え, アンバーライト IRC-50(RH 型)30 g を加え, 1時間かくはんし, 淡黄色の濾液を減圧下に 50 ml 濃縮する。この液に再びアンバーライト IRC-50(RH 型)10 g を加え, 1時間かくはんし, 濾過し濾液を Et₂O 抽出し, 水層を濃縮し P.P.C., TLC 用試料とした。

謝辞:本研究にあたり, 有益な指導と助言を頂いた近畿大学医学部東洋医学研究所 有地 滋教授, 国立衛生試験所大阪支所薬品部 持田研秀部長に深謝いたします。また実験に協力された近畿大学薬学部学生 泉圭英子, 貴志佳也子, 森川千鶴子の諸氏に感謝します。