

生薬のでんぷん消化酵素におよぼす影響について
ケイヒのでんぷん消化酵素活性阻害について¹⁾

村田康治*, 余越真由美, 吉田昭義, 林 信一

ロート製薬(株)研究開発部

Studies on Effect of Crude Drugs on Amylase Activity Effect of Cassia
Bark on Amylase Activity¹⁾

KOOJI MURATA,* MAYUMI YOKOSHI, AKIYOSHI YOSHIDA and SHINICHI HAYASHI

*The Research and Development Department of Rohto Pharmaceutical Co., Ltd.
Tatsumi Nishi 1-chome, Ikuno-ku, Osaka 544*

(Received July 18, 1983)

Crude drugs which were commonly prescribed in gastroenteric medicines were tested for their effect on various amylases. Cassia bark and clove powder strongly inhibited amylase activity. The extent of inhibitory effect of cassia bark on amylase was found to vary depending on the origins of amylases. Activity of amylase from filamentous fungus was scarcely inhibited whereas that of amylases from barley, yeast and *Bacillus subtilis* was seriously inhibited. The amylase inhibitor contained in those crude drugs was considered to be a water-soluble substance with a molecular weight of 1,000–10,000.

Keywords—amylase inhibitor; amylase; β -amylase; Cassia bark; clove

でんぷん消化酵素は、しばしば胃腸薬中に健胃生薬や制酸剤などと配合されて用いられ、制酸剤との配合によるでんぷん消化酵素の安定性については多くの報告がある。しかしながら、他の共存成分、特に健胃生薬のでんぷん消化酵素活性に対する影響についての報告は少ない。このため、処方設計上も重要な要因であることから健胃生薬のでんぷん消化酵素活性に対する影響を検討した。

繁用される健胃生薬のうち、ケイヒ、チョウジに顕著なアミラーゼ活性阻害効果が認められた。そこで、最も阻害効果の大きいケイヒについて各種アミラーゼへの影響を調べたところ、 β -アミラーゼ活性を最も阻害することが明らかになったが、その阻害効果は、アミラーゼの起源により異なっていることがわかった。このケイヒ中のアミラーゼ活性阻害作用物質は、水溶性物質であり、水または 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液で効率よく抽出される分子量 1,000～10,000 の範囲に分布する物質であった。

材料および方法

健胃生薬 生薬はすべて局方適合品で下記(産地)に示す。ケイヒ(中国)、チョウジ(ザンジバル)、ウイキョウ(中国)、ニクズク(インドネシア)、シュクシャ(タイ)、リョウキョウ(中国)、センブリ(日本、長野)。生薬は粉碎したのち 100 メッシュ(149 μ m)で篩過したものを用いた。

アミラーゼ剤 局方ジアスターゼ(from Barley; 岩城製薬), ジアスメン(from *Bacillus amylosolvens*; 大和化成), ピオジアスターゼ(from *Aspergillus oryzae*; 天野製薬), α -アミラーゼ(from *Bacillus subtilis*; Sigma), α -アミラーゼ(from Pancreas; Merck), β -アミラーゼ(from Barley; Sigma), α -アミラーゼ(from Filamentous fungus; Sigma), アミラーゼ(from Yeast; Sigma)を用いた。

アミラーゼ活性測定 Somogyi-Nelson 法を準用した。乾燥可溶性でんぷん(石津製薬) 4.3 g を 100 ml の共栓フラスコに入れ、これに 40° の温水 15 ml を加え、振り混ぜながら熱湯 45 ml を加え沸騰水浴中で 30 分間加熱したのち、55° に冷却する。この糊状の液に 0.02 M リン酸クエン酸緩衝液(pH 5.2) 15 ml を加え全量 100 ml とした。この液 10 ml を試験管にとりアミラーゼ剤を入れ、37° で 1 時間振盪後、Somogyi-Nelson 法に従ってアミラーゼ活性を測定した。なお、それぞれの酵素については、酵素活性値基質-濃度が直線関係にあるような酵素濃度を取り試験

TABLE I. Effect of Various Crude Drugs on Amylase Activity

	Residual activity (%)		
	Diastase	Biodiastase	Diasmen
None	100	100	100
Cassia bark	22	54	36
Clove	40	80	58
Fennel	91	93	91
Nutmeg	81	87	78
Amomum seed	93	100	86
Alpinia	92	95	95
Swertia herb	100	97	100

Crude drugs were added to the reaction solution at a concentration of 2.0 mg/ml.

Each value represents an average of 5 experiments.

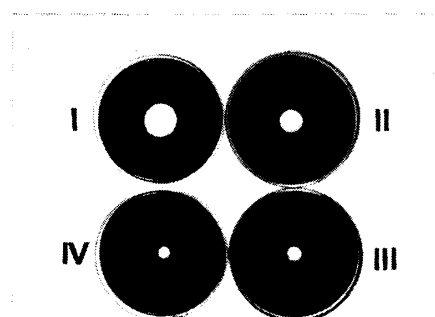


Fig. 1. Effect of Cassia Bark on Amylase Activity of Diastase by Digestive Disk Method

Digested area was not stained by a iodine solution.
Concentration of cassia bark in the test solution.

I, Cassia bark was not added; II, 1.0 mg/ml; III, 2.0 mg/ml; IV, 5.0 mg/ml.

TABLE II. Relation between Somogyi-Nelson Method and Digestive Disk Method

Concentration of Cassia bark	Inhibitory activity (%)					
	Somogyi-Nelson method			Digestive disk method		
	Diastase	Biodiastase	Diasmen	Diastase	Biodiastase	Diasmen
Control	0	0	0	0	0	0
1.0 (mg/ml)	68.9	0.7	46.6	39.6	4.1	24.9
2.0 (mg/ml)	78.2	6.9	63.6	49.0	6.0	28.3
5.0 (mg/ml)	83.3	17.8	80.0	55.9	10.2	75.7

Control: Cassia bark was not added.

The value of digestive disk method was calculated by the following equation.

$$\text{Inhibitory activity} = [(C - A) - (S - A)] / (C - A)$$

C: diameter of non-stained area of control.

A: diameter of a cup.

S: diameter of non-stained area of the tested sample.

The value of digestive disk method represents an average of 10 experiments.

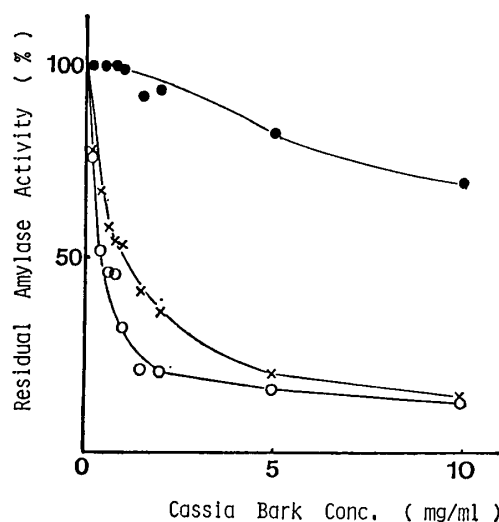


Fig. 2

Fig. 2. Effect of Cassia Bark on Various Crude Amylases

- , Diastase from barley;
●, Biodiastase from *Aspergillus oryzae*;
×, Diasmen from *Bacillus amylosolvens*.

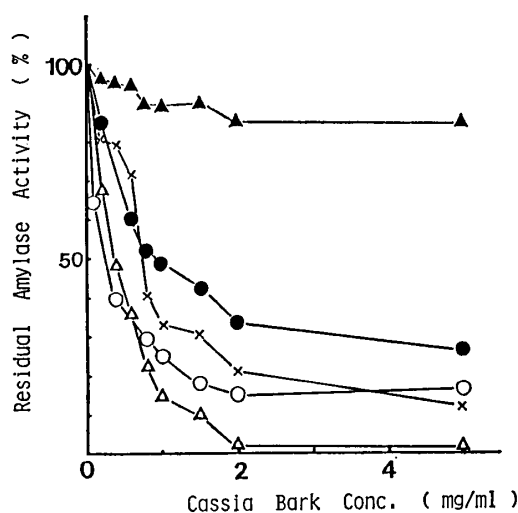


Fig. 3

Fig. 3. Effect of Cassia Bark on Various Purified Amylases

- △, Amylase from *Filamentous fungus*;
○, Amylase from Yeast;
●, α-Amylase from *Bacillus subtilis*;
×, α-Amylase from Pancreas;
▲, β-Amylase from Barley.

を行った。一方、各酵素には至適 pH 域があるが、pH を変えて測定することによる生薬中の酵素活性阻害物質の活性変化を避けるため、同一 pH で測定を行った。なお、用いた pH 5.2 はそれぞれの酵素の至適 pH 域にある。

カップ法による測定 岡崎らの方法²⁾に準じて行った。シャーレにケイヒ末を加えたでんぷん溶液（寒天 1.5%）10 ml を注入し、凝固後、さらに 10 ml を重層しカップを立てる。凝固後、カップの中に酵素溶液 0.2 ml を注入する。37°, 24 時間後、カップを取り去り、水洗し 0.1 N ヨード溶液を添加し、未消化のでんぷんを呈色させて生じた無色の消化円の直径を測定する。

結 果

1. 各種健胃生薬によるアミラーゼ活性阻害効果

胃腸薬中で繁用される健胃生薬 7 種を選び、局方ジアスターゼ、バイオジアスターゼ、ジアスメンの 3 種のアミラーゼ剤を作用させた時の酵素活性を調べた。その結果、TABLE I に示すように、センブリ、シュクシャではほとんど酵素活性阻害効果は認められないが、ケイヒ、チョウジでは、ジアスターゼ活性をそれぞれ 78%, 60% 阻害した。これら 3 種の酵素では、酵素活性阻害の程度に差は認められるが傾向は一致しており、また各種生薬末添加によるでんぷん溶液の pH 変化、沈殿などは観察されなかった。そこで、酵素活性阻害効果の最も大きかったケイヒについて検討を加えた。

2. カップ法による測定

Somogyi-Nelson 法では、生薬を添加した際にその量に比例してブランク値の増加がみられる。これは、生薬中の還元物質の存在などによるものと考えられる。そこで、Somogyi-Nelson 法の妥当性を調べるため、生薬中の物質の影響を除外できる岡崎らの消化円法を準用し、Somogyi-Nelson 法との比較を行った。その結果を Fig. 1 および TABLE II に示す。Somogyi-Nelson 法と消化円法とはよい相関性を示すことから、以後の実験においても酵素活性測定法として Somogyi-Nelson 法を用いることにした。

3. 各種酵素のアミラーゼ活性におよぼすケイヒの影響

TABLE I に示すように 3 種のアミラーゼ剤で、活性阻害効果に差異が認められた。このため、各種酵素に対するケイヒ末の活性阻害効果を調べた (Fig. 2, Fig. 3)、局方ジアスターゼ、ジアスメンは、ケイヒ濃度 1.0 mg/ml で

TABLE III. Inhibitory Effects of Each Fraction Obtained by Distillation, 6 hr, of Cassia Bark on Amylase Activity of Diasmen

Fraction	Inhibitory activity (%)
Control	0
Cassia Bark	75.0
Volatile oil	8.0
Residue	34.5

Cassia bark and residue were added to the reaction solution at a concentration of 2.0 mg/ml.

Volatile oil corresponding to 20 mg of cassia bark was added to the reaction solution of 10 ml.

TABLE IV. Inhibitory Effects on Amylase Activity of Cassia Bark Which Was Extracted by Various Solvents and Treated with Sulfuric Acid

Solvent	Inhibitory activity (%)		
	Diastase	Biodiastase	Diasmen
Water	85.4	1.6	21.2
0.1 M Acetate buffer (pH 5.2)	77.7	0	16.4
Ethanol	77.1	0	23.0
Ether	0	0	1.1
Ethyl acetate	7.6	0	0.2
Chloroform	7.6	0	0
Acetone	61.8	4.2	4.3
0.1 N NaOH	84.1	0	36.0
1.0 N H ₂ SO ₄ ^{a)}	16.2	—	—
Powder	85.6	11.5	43.3

^{a)} Boiled for 1 hr in sulfuric acid.

TABLE V. Inhibitory Effects of Each Fraction Obtained by Dialysis of Cassia Bark Aqueous Extract

Fraction (Molecular weight)	Inhibitory activity (%)
10,000 —	14.3
3,500 — 10,000	73.0
1,000 — 3,500	61.3
0 — 1,000	22.7

2.0 ml of each fraction was tested for inhibitory activity against diastase, which contained the extract corresponding to 20 mg of cassia bark.

50%以上の活性阻害が認められたのに対し、ビオジアスターゼ酵素活性は、わずかの減少にとどまった。また精製された酵素では、麦芽由来の β -アミラーゼへの阻害が顕著であり、 α -アミラーゼがそれに次いだ。これらに対し、糸状菌由来のアミラーゼに対しては活性阻害効果も小さく、ケイヒ濃度 1.0 mg/ml でも91%の活性を維持していた。

4. ケイヒ中の酵素活性阻害物質についての検討

ケイヒ末を局方生薬試験のうち精油定量法に従い、6時間蒸留し精油と残渣に分け、それぞれの酵素活性阻害効果を調べた。TABLE III に示すように、阻害効果は、その大部分が残渣に認められ、ケイアルデヒドを含む精油には認められなかった。

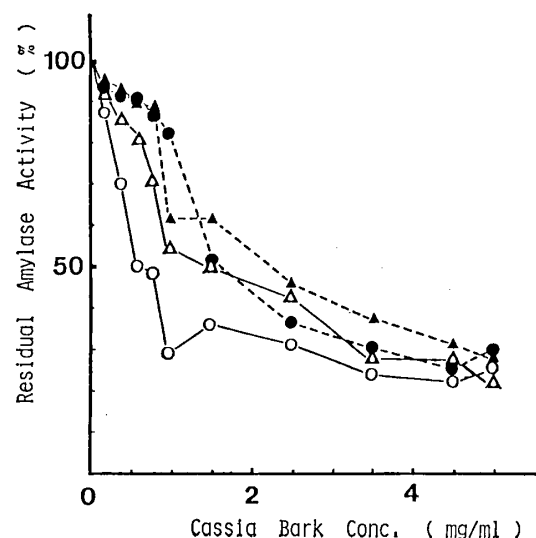


Fig. 4. Effect of Gelatin on Amylase Activity

- , Diastase activity with gelatin;
- , Diastase activity without gelatin;
- ▲, Diasmen activity with gelatin;
- △, Diasmen activity without gelatin.

次に、各種溶媒による抽出を試みた (TABLE IV). 極性の弱い有機溶媒では阻害物質は抽出されず、水および 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液で最も効率よく抽出された。また、塩基には強いが、硫酸などの鉱酸で 1 時間煮沸し処理すると酵素活性阻害効果は認められなくなる。

ケイヒ抽出物 (酢酸緩衝溶液) を透析膜, Spectrapor Membrane[®] で濾過し各分子量に大きく分けた。それぞれの酵素活性阻害効果を調べたところ、阻害作用物質は分子量 1,000~10,000 の範囲に大部分分布していることが認められた (TABLE V)。

さらに、TEAE-セルロース、セファデックス G-50 などでの酵素活性阻害物質の分離を試みたが、カラム上部に吸着され溶出は困難であった。

考察および結論

健胃生薬は、薬理的な裏付けが乏しいものが少なくない。そこで、健胃生薬の効果についての検討の一環としてアミラーゼ活性阻害について検討した。

その結果、ケイヒ、チョウジはアミラーゼ活性を著しく低下させることが認められ、センブリ、ウイキョウ、リョウキョウ、シュクシャ、ニクズクには阻害活性がないことが明らかになった。また、各種アミラーゼに対するケイヒの影響をみたところケイヒ中のアミラーゼ活性阻害物質は、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼの酵素反応機構の差によるものではなく、それらアミラーゼの起源によるものであることが明らかとなった。Fig. 2 における *Aspergillus oryzae* 由来のピオジアスターゼ、および Fig. 3 に示した *Filamentous fungus* 由来のアミラーゼはケイヒによる酵素活性阻害をほとんど受けないのに対して、Yeast, *Bacillus subtilis*, Pancreas, Barley 由来のものは、*Bacillus amylosolvans* 由来のジアスメンおよび Barley 由来の局方ジアスターゼと同様に酵素活性阻害を大きく受けた。

アミラーゼインヒビターの存在も多く報告³⁾ されているが、TABLE III に示したように 6 時間蒸留後の残渣に酵素活性阻害効果が認められることは、ケイヒ中の酵素活性阻害物質は蛋白でないことを強く示唆している。このケイヒ中の酵素活性阻害物質を検討中であるが、カラムクロマトで分離の際、この物質が常に褐色の色素とともに挙動すること、酢酸鉛液で沈殿すること、1,000~10,000 という幅広い分子量分布を持つことなどからタンニン関連物質であることも考えられる。山崎らは、ケイヒ中のプロテアーゼ活性阻害物質について報告⁴⁾ している。その物質はフォリン反応陽性であり、本実験のアミラーゼ活性阻害物質と同一物質である可能性も考えられる。

一方、ケイヒのアミラーゼ活性阻害作用はゼラチンを加えることによって抑制された。Fig. 4 で示すように反応溶液あるいは酵素溶液中にゼラチンを添加しておくで酵素活性に回復が認められた。これは、ケイヒ中の酵素活性阻害物質がゼラチンと結合するためと考えられる。この結果も酵素活性阻害物質がタンニンである可能性を支持するもの

であるが、これに関しては現在検討中である。

なお、一般の胃腸薬中に含まれるケイヒの量は本実験で用いた量よりも少なく、多くの製剤において無視できるものである。しかしながら、本研究により生薬配合の胃腸薬にアミラーゼ剤を配合する場合、処方設計上留意すべき問題点と考えられる。

謝 辞：本研究に発表の機会を与えられたロート製薬株式会社社長 山田安邦氏に深謝いたします。また、有益な討議に加わってくださった大阪府立公衆衛生研究所 山崎勝弘氏に感謝いたします。

引用文献および注

- 1) 日本薬学会 101 年会（熊本，1981）にて一部発表。
- 2) 岡崎寛蔵，薬剤学，**23**，151（1963）。
- 3) 青柳高明，酵素阻害物質（共立全書），共立出版，東京，1978，No. 224。
- 4) 山崎勝弘，横山 浩，布浦由樹，梅沢智佐江，米田該典，生薬，**36**，11（1982）。