

黄芩フラボノイドの水抽出液中の分解

相楽和彦^{*,a}, 伊藤裕二^a, 大島俊幸^a, 村山 普^a, 糸川秀治^b^a大正製薬株式会社, ^b東京薬科大学Degradation of Flavonoids of *Scutellariae Radix* in Water Extract SolutionKAZUHIKO SAGARA,^{*,a} YUJI ITO,^a TOSHIYUKI OSHIMA,^a HIROSHI MURAYAMA^a
and HIDEJI ITOKAWA^b^aTaisho Pharmaceutical Co. Ltd.,
403, Yoshino-cho 1-chome, Ohmiya-shi, Saitama 330^bTokyo College of Pharmacy,
1423-1, Horinouchi, Hachioji, Tokyo 197-03

(Received July 13, 1985)

Studies were conducted on enzymatic degradation of flavone glucuronides in a water extract prepared from *Scutellariae Radix*. In most samples, baicalin was hydrolyzed to baicalein quantitatively. However the amounts of wogonin and oroxylin-A converted from their glucuronides were 16–32% and 13–21% higher than the respective theoretical values. When six *Scutellariae Radix* samples were kept in water for 3 hr, the glucuronides contained in the radix were hydrolyzed to their aglycones completely in 4 samples, and at the rates of 62.5–75.6% and 87.5–93.7% in two samples.

Keywords—baicalein; baicalin; wogonin; wogonin glucuronide; oroxylin-A; oroxylin-A glucuronide; *Scutellariae Radix*; enzymatic degradation

黄芩は、シソ科コガネバナ (*Scutellaria baicalensis*) の周皮を除いた根を乾燥したものであり、主成分である baicalin やそのアグリコンである baicalein のほか、多くのフラボノイドを含む重要な生薬である。黄芩については、胆汁排泄促進作用¹⁾、利尿作用²⁾、抗炎症作用^{3–7)}、抗アレルギー作用^{8–13)}、脂質代謝改善作用^{14,15)}、アラキドン酸代謝系に対する作用^{16–18)} など多くの薬理作用の研究がなされており、その活性はフラボノイドによることが判明している。しかしながら、脂質代謝改善作用については baicalin が強い作用を示すと報告されているのに対し、抗アレルギー作用や抗炎症作用など、多くの作用はそのアグリコンである baicalein のほうが強いと報告されている。

生薬のなかには、桃仁・杏仁¹⁹⁾に代表されるように、水またはそれに準ずる溶媒で抽出した場合、その植物自身の酵素によって配糖体成分が加水分解されることが知られているが、黄芩も同様、バイカリナーゼによって baicalin が baicalein に加水分解されるといわれており²⁰⁾、江田らは¹³⁾、この酵素反応を利用して得た baicalein の豊富なエキスを通常の baicalin 含量の多いエキスの薬理効果の差について報告している。

このように、黄芩のフラボノイドがその水溶液中で加水分解されていくことが知られているものの、この加水分解反応の精査は行われていない。著者らは、すでにイオンペーククロマトグラフ法による baicalein, wogonin, oroxylin-A およびそれらのグルクロナイドの同時定量法を報告しているが²¹⁾、本法を用いることによって、黄芩フラボノイドの水溶液中における経時的な変化について、baicalin のみならず、wogonin glucuronide, oroxylin-A glucuronide についても定量的に調査したので報告する。

実 験 の 部

1. 標 準 品

Baicalein (B), baicalin (BG), wogonin (W), wogonin glucuronide (WG), oroxylin-A (O) および oroxylin-A glucuronide (OG) はすべて当室において単離精製し、HPLC により純度 95% 以上のものを用いた。

2. 試 薬

tetra-*n*-amylammonium bromide および CH_3CN は、それぞれ和光純薬工業株式会社製試薬特級および液体クロマトグラフ用を用いた。抽出に用いた精製水は、日本ミリポアリミテッド社製ミリ-Q 5 本型超純水装置により精製し、pH は 5.5 付近であった。

3. 試 料

黄芩は、市販の日本薬局方適合品を用いた。

4. 検 量 線

B, BG, W, WG, O および OG の標準溶液をおおの 10~100, 10~100, 5~50, 5~50, 1~25 および 1~25 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で調製し、おおの 10 μl ずつを HPLC に注入して得られたピーク高さより検量線を作成した。

各成分の回帰直線式は次のとおりであった。

$$\text{B} : y = 0.150x - 0.645 \quad (r = 0.999)$$

$$\text{BG} : y = 0.158x + 0.139 \quad (r = 0.999)$$

$$\text{W} : y = 0.172x + 0.024 \quad (r = 0.999)$$

$$\text{WG} : y = 0.150x + 0.036 \quad (r = 0.999)$$

$$\text{O} : y = 0.132x - 0.007 \quad (r = 0.999)$$

$$\text{OG} : y = 0.143x + 0.035 \quad (r = 0.999).$$

5. 試料溶液の調製および定量

黄芩を薬研を用いて粉末 (48 mesh 以下) とし、その 0.1 g ずつを 50 ml の遠心沈澱管に入れ精製水 30 ml を加え、各 10, 20, 30, 60, 120 および 180 分間室温 (22°C) で放置した後、沸騰水上で 30 分間加熱し、酵素を失活させた。また、冷浸を行わないもの (0 分) については、熱湯 30 ml を加えた直ちに沸騰水浴上で 30 分間加熱した。冷後、遠心分離し、上澄液を 100 ml のメスフラスコに移した。残渣に CH_3CN 30 ml を加え、10 分間振り混ぜたのち遠心分離し、上澄液をさきの 100 ml メスフラスコに合わせた。さらに、液体クロマトグラフィーに用いる溶離液 30 ml を用いて同様に操作し、上澄液をさきの 100 ml メスフラスコに合わせ、溶離液を加え試料溶液とした。その 10 μl を液体クロマトグラフに注入し、標準溶液より得られた回帰直線式にしたがい定量値を算出した。なお、水を用いた後、 CH_3CN および溶離液で順次抽出を行ったのは、いったん加熱抽出したものを冷却していることから、水

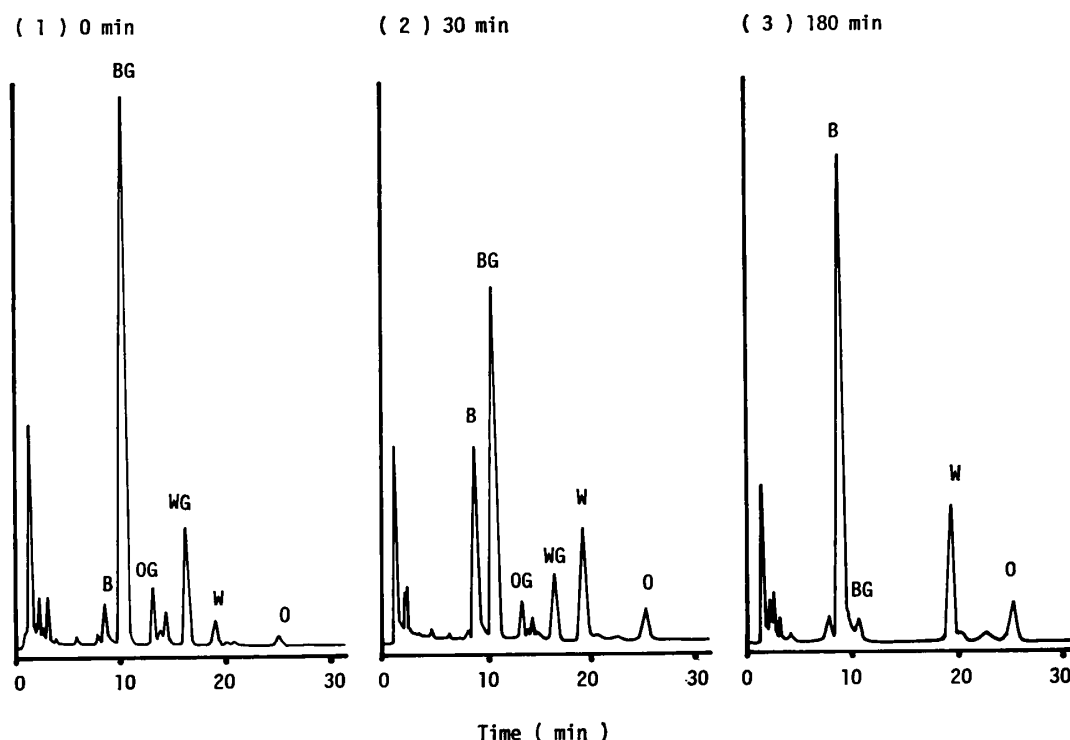


Fig. 1. Time Course of Chromatogram

Peaks: B, baicalein; BG, baicalin; OG, oroxylin-A glucuronide; WG, wogonin glucuronide; W, wogonin; O, oroxylin-A

に難溶なアグリコン等が沈澱物として除かれてしまうことが考えられるので、これらの溶媒を用いて完全に全成分の抽出を行った。

6. HPLC 装置および測定条件

日立 655 型ポンプ, UVILOG-5IV 型 UV 検出器および SIC 7000A インテグレイターを接続し, カラムは東洋曹達工業株式会社製 TSK GEL LS-410 ($5\mu\text{m}$) をステンレス製カラム ($4\text{mm}\phi\times 150\text{mm}$) にスラリー法を用いて

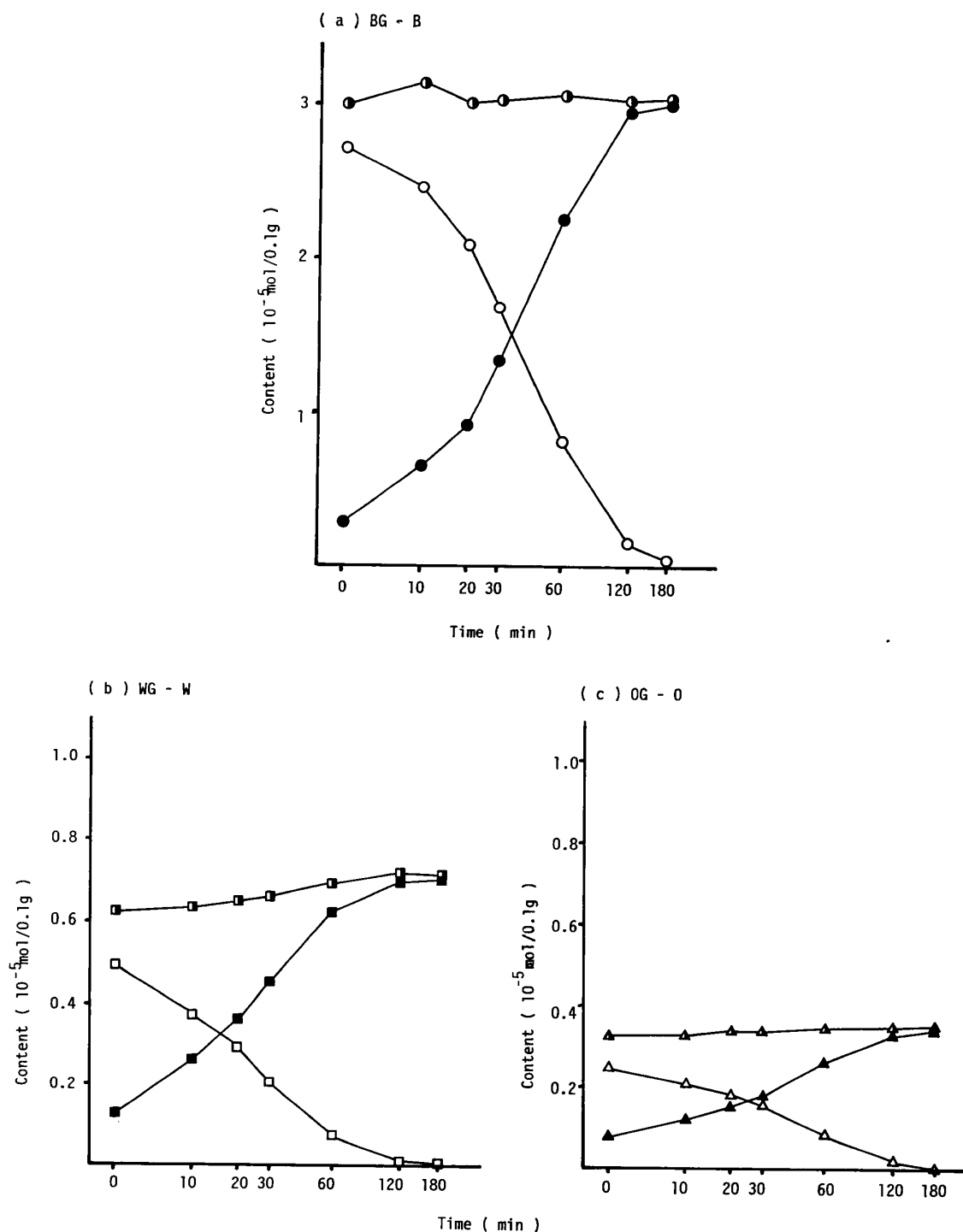


Fig. 2. Enzymatic Degradation of Flavonoides

○: baicalin, ●: baicalein, ◐: baicalin + baicalein, □: wogonin glucuronide, ■: wogonin, ◻: wogonin glucuronide + wogonin, △: oroxylin-A glucuronide, ▲: oroxylin-A, ◄: oroxylin-A glucuronide + oroxylin-A.

充填したものを使用した。溶離液は 5 mM の tetra-*n*-amylammonium bromide (TAA) を含む $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}$ 混液 (68 : 32) で、リン酸により pH を 4.0 に調整したものを、カラム温度 30°C、流量 1 ml/min、検出波長 280 nm で行った。

結果および考察

Fig. 1 に冷浸時間 0, 30 および 180 分としたときの市場品 -1 のクロマトグラムを示した。即座に加熱を行ったものは、3 種のグルクロナイドのピークが高く、それぞれに対応するアグリコンのピークは低いことがわかるが、冷浸 30 分後では各グルクロナイドが減少し、それに伴いアグリコンのピークが高くなっており、さらに 180 分後では各グルクロナイドのピークはほとんど消失し、アグリコンのピークのみが検出された。Fig. 2 にはこの量的な変化をモル数で示した。B と BG の関係 (Fig. 2a) については、即座に加熱したものでは BG が 2.7×10^{-5} mol, B が 0.3×10^{-5} mol で、合計 3.0×10^{-5} mol である。冷浸時間が長くなるにしたがいグルクロナイドである BG 量はほぼ直線的に減少し、それに伴い B の量が増加したが、両者のモル数の合計は、冷浸時間のどの点においてもほぼ 3.0×10^{-5} mol と一定であり、BG が等量的に B に変換されていた。また、これは OG と O の関係 (Fig. 2c) についても同様に等量的な変換であったが、WG と W (Fig. 2b) では時間の経過に伴い合計量が増加し、180 分後では初期値より約 16% 高い値となった。同様の検討を定量用の抽出溶媒として用いる溶離液および CH_3OH ²²⁾ で行ったところ、溶離液では加水分解が進行したが、 CH_3OH では進行しなかった。このことから、黄芩のフラボノイドの酵素加水分解反応は水の存在しない場合には進行しないが、ある程度水が存在した場合は、比較的容易に進行するといえる。

TABLE I には、日局適合の市場品黄芩 5 ロットについて同様の実験を行ったときの変換率を示した。BG-B に関しては、市場品 -3 や市場品 -6 のように高い値を示したのも認められたが、ほとんどが等量的な変換率を示した。しかし、WG-W では 16~32%, OG-O では市場品-1 を除いて 13~21% 程度高い値となった。現在、この点については検討中であるが、黄芩よりグルクロナイドに変わる baicalin および wogonin のグルコサイド^{23,24)}が、また、同様に Scutellaria 属の一種から oroxylin-A のグルコサイド²⁵⁾が単離されていることから考えると、これらのようなグルクロナイド以外の配糖体が存在し、分解されることによってアグリコンが高い値となったものと考えられる。また、各黄芩の 180 分後の加水分解率を調べてみると、市場品 -1, -4, -5 および -6 の 4 検体はほぼ 100% 分解されていたが、市場品 -2 では 62.5~75.6%, 市場品 -3 では 87.5~93.7% と分解反応の進行が遅かった (TABLE II)。このことから黄芩の酵素活性はその生薬個々によって異なっていることがわかるが、この原因の一つとして、生薬の

TABLE I. Conversion Ratio of Glucuronides

Sample	B/BG (%)	W/WG (%)	O/OG (%)
Market 1	103.0	116.3	104.2
Market 2	101.8	116.0	113.3
Market 3	121.1	123.7	117.1
Market 4	100.3	127.3	121.4
Market 5	102.2	132.4	117.1
Market 6	110.2	125.0	114.8

^{a)} Difference of aglycone content (mol) at 0 min and at 180 min/difference of glucuronide content (mol) at 0 min and at 180 min.

TABLE II. Degradation Ratio of Glucuronides after Keeping for 180 min

Sample	BG (%)	WG (%)	OG (%)
Market 1	98.5	100.0	96.0
Market 2	75.6	62.5	68.2
Market 3	91.6	93.7	87.5
Market 4	99.4	98.2	100.0
Market 5	99.5	98.6	100.0
Market 6	98.5	94.9	100.0

調製法も関係しているものと考えられる。また、黄芩の炮制法については、中薬大辞典²⁶⁾に冷浸する方法の他、酒に浸し熱処理する方法、炒黄芩・黄芩炭のように火で表面を焦がす方法などが記載されており、これらの炮制法が酵素活性に及ぼす影響についても興味を持たれる。

以上、黄芩の酵素反応について、イオンペークロマトグラフ法を適用することにより詳細な追跡ができたが、今回の検討より、黄芩の水抽出溶液中における酵素反応は baicalin の他 wogonin glucuronide や oroxylin-A glucuronide においても進行し、さらに、フラボングルクロナイド以外の配糖体においても進行していることが示唆された。

今後は、グルクロナイドに変わる配糖体の定量、酵素分解、および炮制法と酵素活性との関係についても検討する予定である。

引用文献および注

- 1) 熊崎平蔵, 岐阜薬科大学紀要, **6**, 94, 153, 164 (1958).
- 2) 熊崎平蔵, 岐阜薬科大学紀要, **6**, 352 (1958).
- 3) 江崎俊治, 日薬理, **64**, 186 (1968).
- 4) 平井裕子, 高瀬英樹, 古林浩子, 山本道子, 藤岡尚美, 神田博史, 山崎和男, 中島暉躬, 生薬, **37**, 374 (1983).
- 5) H. Nagai, K. Osuga, A. Koda, *Jpn. J. Pharmacol.*, **25**, 763 (1976).
- 6) M. Kubo, H. Masuda, M. Tanaka, Y. Kimura, H. Okuda, M. Higashino, T. Tani, K. Namba, S. Arichi, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 2724 (1984).
- 7) 山原篠二, 山田敏雄, 中西裕子, 沢田徳之助, 藤村 一, 生薬, **35**, 103 (1981).
- 8) 江田昭英, 永井博式, 和田 浩, 日薬理, **66**, 194, 237 (1974).
- 9) 江田昭英, 西依 健, 永井博式, 松浦直資, 土屋博司, 日薬理, **80**, 31 (1982).
- 10) 西依 健, 江田昭英, 谿 忠人, 有地 滋, 和漢薬シンポジウム記録集, **15**, 183 (1982).
- 11) 坂本守正, 角田幸子, 幡井 勉, 和漢薬シンポジウム記録集, **16**, 65 (1983).
- 12) 江田昭英, 永井博式, 吉田洋一, ロー・ホン・キャット, 日薬理, **66**, 471 (1970).
- 13) 江田昭英, 永井博式, 渡辺茂勝, ロー・ホン・キャット, 片山 敏, アレルギー, **21**, 346 (1972).
- 14) Y. Kimura, M. Kubo, T. Tani, S. Arichi, H. Ohminami, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 2308 (1981); Y. Kimura, M. Kubo, T. Tani, S. Arichi, H. Okuda, *ibid.*, **29**, 2610 (1981); Y. Kimura, M. Kubo, K. Kusada, T. Tani, M. Higashino, S. Arichi, H. Okuda, *ibid.*, **30**, 219 (1982); Y. Kimura, H. Okuda, T. Tani, S. Arichi, *ibid.*, **30**, 1792 (1982).
- 15) 青沼 繁, 三村 務, 樽谷正明, 薬誌, **77**, 1303 (1957).
- 16) 三川 潮, 澄谷雅明, 木内文之, 日本生薬学会第27年回(名古屋)講演要旨集, 1980, p. 40.
- 17) 飯島康輝, 河北範夫, 山崎光郎, 炎症, **1**, 101 (1980).
- 18) 関谷敬三, 奥田拓道, 和漢薬シンポジウム記録集, **15**, 58 (1982).
- 19) 赤堀 昭, 香川清水, 生薬, **37**, 241 (1983).
- 20) 章 国鎮, 生薬, **34**, 169 (1980).
- 21) K. Sagara, Y. Ito, T. Oshima, T. Misaki, H. Murayama, H. Itokawa, *J. Chromatogr.*, **328**, 289 (1985).
- 22) 谿 忠人, 勝城忠久, 東野正行, 久保道德, 有地 滋, 第10回生薬分析討論会講演要旨集, 1981, p. 1.
- 23) 富森 毅, 宮一諭起範, 井本吉隆, 木津治久, 田辺良久, 薬誌, **104**, 524 (1984).
- 24) 高木修造, 山木正岐, 井上けい子, 薬誌, **101**, 899 (1981).
- 25) G. Nicollier, A. Thompson, M. Salin, *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 1179 (1981).
- 26) 上海科学技術出版社, “中薬大辞典”, 第一巻, 小学館(編), 小学館, 東京, 1985.