

ラット及びヒトへの葛根湯 (Ge-Gen-Tang) 経口投与による尿中排泄成分について

安田 高明^{a)} 鹿野 美弘^{b)} 齊藤 謙一^{b)} 大澤 啓助^{*a)}

^{a)}東北薬科大学生薬化学教室, ^{b)}北海道薬科大学漢方薬物学教室

Urinary compounds after oral administration of Ge-Gen-Tang in rats and human

Takaaki YASUDA,^{a)} Yoshihiro KANO,^{b)} Ken-ichi SAITO,^{b)} Keisuke OHSAWA^{*a)}

^{a)}Department of Phytochemistry, Tohoku College of Pharmacy,

^{b)}Department of Kampo Medicinal Science, Hokkaido Institute of Pharmaceutical Sciences

(Received October 24, 1994. Accepted December 16, 1994.)

Abstract

Each peak of urinary compounds after oral administration of Kakkon-to in rats and humans was identified by HPLC equipped with a photodiode array detector. The urinary compounds after oral administration of extracts of pueraria roots and Kakkon-to in rats were identified as puerarin (M-I), daidzein 7, 4'-di-O-sulfate (M-II), daidzein 7-O-β-D-glucuronide (M-III), daidzein 4'-O-sulfate (M-IV), and daidzein (M-V) by the comparison of the retention times of HPLC and UV spectral data with those of authentic samples.

On the other hand, the urinary compounds after oral administration of decoction of Pueraria roots and Kakkon-to in humans were identified as M-III and M-IV. Furthermore, phytoestrogenic equol, a possible metabolite of daidzein, was also investigated.

Key words Pueraria root, Kakkon-to, urinary metabolite, human, equol, daidzein.

Abbreviations Kakkon-to (Ge-Gen-Tang), 葛根湯; HPLC, high-performance liquid chromatography; EI-MS, electron impact mass spectroscopy; CMC, carboxymethyl cellulose.

緒 言

著者らはこれまで、葛根の主要成分でイソフラボン誘導体である daidzin, daidzein 及び puerarin をラットに経口投与して得られた尿及び胆汁から、それらの代謝物を単離し、それらの構造決定を行ない報告した。^{1,2)} 今回は、葛根単味熱水抽出エキス及び葛根が配合された代表的な方剤である葛根湯エキスをラットに経口投与し、その尿中代謝物を HPLC によりそれぞれ同定した。さらに、これまでの実験結果をもとにヒトへの投与についても試み、葛根単味熱水抽出液及び葛根湯投与後の尿中代

謝物についても同様に HPLC を用いて各成分を同定した。

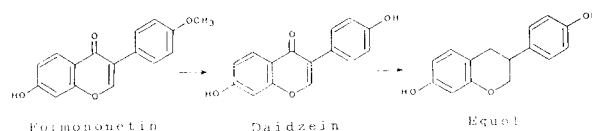


Chart 1 The chemical structures of formononetin, daidzein and equol and their metabolic interrelations.

*〒 981 仙台市青葉区小松島4-4-1
4 1 Komatsushima 4 chome, Aoba ku, Sendai,
Miyagi 981, Japan

また, daidzein がエストロゲン作用を有する equol の前駆体であり (Chart 1), この equol がヒトの尿中に排泄されることが知られていることから,^{3, 11} 葛根湯投与後のヒト尿中に equol が排泄されているか検討を加えたので併せて報告する。

材料と方法

(1) 標準品及び試薬: HPLC での同定のために用いた daidzein はフナコシ製を, puerarin は和光純薬 (株) 製の生薬試験用標準品を用いた。M-I-M-IV は前報¹¹ で単離したものを用いた。(±)-equol の合成のための daidzein は葛根から単離したものを用いた。10 % パラジウム-活性炭素 (Pd/C) は和光純薬 (株) 製の 1 級品を, その他の試薬は全て特級品を用いた。 β -グルクロニダーゼ (Type H-2) は Sigma 社製を, Extrelut カラム (No. 11737) は Merck 社製を, そして Sep-Pak C₁₈ カートリッジは Waters 社製を使用した。

(2) (±)-equol の合成: Lamberton らの方法¹² に従い, あらかじめ酸素下で氷酢酸 (14 ml) に懸濁させた Pd/C を 3 日間攪拌後, 氷酢酸 (31 ml) に懸濁させた daidzein (118 mg) 中に素早く加え, 常圧で水素下 30 分間攪拌した。この溶液をセライト (和光純薬 (株) 製) に通導して濾過し, さらに熱酢酸 (24 ml) で洗浄後, 濾液と洗液を合わせ減圧濃縮した。得られた残渣をクロロホルムで抽出し, 5 % NaHCO₃ 水溶液で洗浄後クロロホルム溶液を減圧濃縮した。この残渣は NaOH (180 mg) をエタノール (1 ml) 及び水 (0.2 ml) に溶解させた溶液に懸濁後, 100°C で 5 分間加熱し, 濃 HCl で酸性とした後少量の熱水を加えて白色粉末の (+) equol (50 mg) を得た。mp 157-159°C (lit.⁶⁾ 158°C), EI-MS m/z 242 (M⁺), Exact mass determination: 242.0932 (Calcd. for C₁₅H₁₄O₃: 242.0943)。

(3) 生薬及び投与試料の調製: 葛根 *Pueraria lobata* OHwi 及びその他の生薬は市販 (松浦漢方製) の日本薬局適合品を用いた。葛根単味熱水抽出液は, 葛根 (8 g) に 160 ml の水を加え, また葛根湯は, 成書⁷⁾ に従い各生薬 1 日量 (葛根 8, 麻黄 4, 大棗 4, 桂枝 3, 芍薬 3, 甘草 2, 乾生姜 1) を取り, 1 日量に対し 500 ml の精製水を加え, それぞれ約半量となるまで煎じ, ガーゼで熱時濾過し, 投与用試料とした。さらにこの投与用試料を, 冷後凍結乾燥して得られた粉末を各エキスとして保存した。(葛根単味熱水抽出エキス: 約 1.8 g, 葛根湯エキス: 約 7.6 g)

(4) 実験動物及び被験者: 体重 160-180 g の SD 系雄性ラットを 18 時間絶食後実験に用いた。ただし水は自由

に摂取させた。ヒトでの代謝の検討は, 年齢 26 歳 (身長 168 cm, 体重 67 kg) 及び 22 歳 (身長 175 cm, 体重 58 kg) の健康成人男子 2 名で行なった。実験中は通常の食事を摂らせた。

(5) 実験方法: ラット尿: 葛根単味熱水抽出エキス (0.47 g/kg) または葛根湯エキス (2 g/kg) を 0.5 % CMC-Na に懸濁し, 5 匹のラットに経口投与後メタボリックケージを用いて投与後 24 時間までの尿をそれぞれ採取した。またコントロールの尿は, 5 匹のラットを 18 時間絶食後メタボリックケージを用いて絶食後 24 時間までの尿をそれぞれ採取した。ヒト尿: 葛根単味熱水抽出液 (1 日相当量, 約 80 ml) または葛根湯 (1 日量, 約 250 ml) を経口投与後 24 時間までの尿をそれぞれ採取した (1 人当り約 1.2-1.8 l)。コントロールの尿は, 各試料投与前の尿をそれぞれ採取した (1 人当り約 1.0-1.5 l)。採取した各個体ごとの尿をそれぞれ一緒にし, 実験に使用するまで -20°C 以下で保存した。

(6) 装置及び HPLC: 質量分析スペクトル (MS) は JEOL JMS-DX303/JMA DA 5000 SYSTEM high resolution mass spectrometer により測定した。HPLC 装置は前報¹¹ と同様のものを用い, カラムは ODS 120 T (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μ m) を使用した。

1) M-I-M-V ピークの同定: 前報¹¹ と同様の測定条件に従い, カラム温度 40°C, 流速 1.0 ml/min, 注入量 20 μ l, 検出波長 250 nm で行った。

2) Equol の同定: 移動相: 40 % メタノール (10 mM リン酸ナトリウム緩衝液, pH 6.5), カラム温度, 室温, 流速 1.0 ml/min, 注入量 30 μ l, 検出波長 280 nm で行った。

(7) 尿試料の調製: M-I-M-V ピークの同定: 前報¹¹ と同様, 実験方法の項で得られた各尿の一部を取り, 5 倍量のメタノールを加え, 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過したものを試料溶液とした。Equol の同定: 実験方法の項で得られたヒト尿 5 ml を取り, 0.2 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) 5 ml 及び β -グルクロニダーゼ 50 μ l を加えて 37°C, 16 時間インキュベーションを行った。この溶液に 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 10 ml を加え, Extrelut カラムに通導後, 酢酸エチル 60 ml で抽出し, この液を濃縮した。得られた残渣は酢酸エチル 0.5 ml に溶解し, さらに酢酸エチル 0.5 ml で 3 回洗浄し, 洗液と合わせて濃縮し, 得られた残渣にエタノール 2 ml, 水 8 ml 及び 1 N 塩酸 200 μ l を加えて酸性とした。この溶液 5 ml を取り, Sep-Pak C₁₈ カートリッジにチャージさせ, 水 2 ml で洗浄後 80 % メタノール 2 ml で溶出したものを試料溶液とした。

結 果

葛根単味熱水抽出エキスをラットに経口投与後の尿中には葛根湯由来の成分と思われる5つのピークが確認され、これらを保持時間(t_R)の早い順に M-I, M-II, M-III, M-IV そして M-V と仮称した (Fig. 1)。これらの各ピークは前報^{1,2)}での daidzin 及び daidzein 又は puerarin をラットに経口投与後の尿中から単離・構造決定した各化合物との HPLC での t_R 及びフォトダイオードアレイ検出器による UV スペクトルがよく一致していたことから、M-I は puerarin, M-II は daidzein 7, 4'-

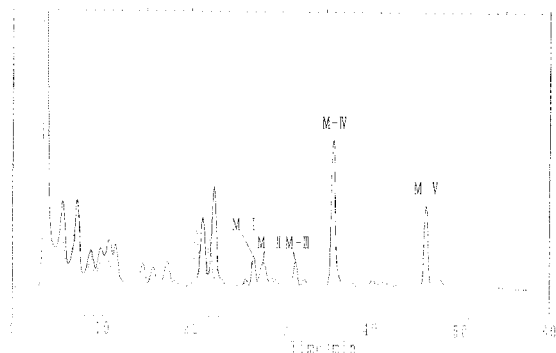
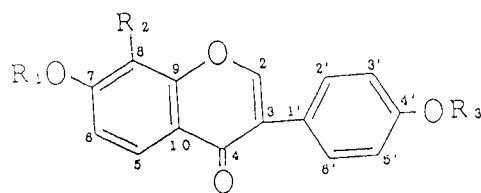


Fig. 1 HPLC chromatogram of urine excreted during 24h after oral administration of "Kakkon" extract to rat —; metabolic urine, ---; control urine.



	R ₁	R ₂	R ₃
Puerarin :	H	Glc	H
Daidzin :	Glc	H	H
Daidzein :	H	H	H
M-I :	H	Glc	H
M-II :	SO ₃ ⁻	H	SO ₃ ⁻
M-III :	GlcUA	H	H
M-IV :	H	H	SO ₃ ⁻
M-V :	H	H	H

Glc : glucose
GlcUA : β-glucuronic acid

Fig. 2 Structures of puerarin, daidzin, daidzein and urinary metabolites.

di-*O*-sulfate, M-III は daidzein 7-*O*-β-D-glucuronide, M-IV は daidzein 4'-*O*-sulfate そして M-V は daidzein とそれぞれ同定した (Fig. 2)。また、葛根湯エキスを同様に投与した5匹のラットのいずれの尿中にも Fig. 3 に示すように、再現性の良好なクロマトグラムが得られ、M-I-M-V に相当するピークが認められた。これらの各ピークについても前述と同様に t_R 及び UV スペクトルがよく一致していたことからそれぞれを同定した。なお、この HPLC の測定条件では、他の生薬由来の成分は検出されなかった。

次に著者らは葛根熱水抽出液を投与した2人のヒト尿中に M-III 及び M-IV を確認し (Fig. 4)、また、葛根湯を投与した両被験者のクロマトグラムにおいても、再現性よく両成分を確認した (Fig. 5)。

さらに HPLC を用いて葛根湯投与後のヒト尿中における equol ピークの同定を試みた。Equol は尿中では主に抱合体として存在していることが予想されたので、尿

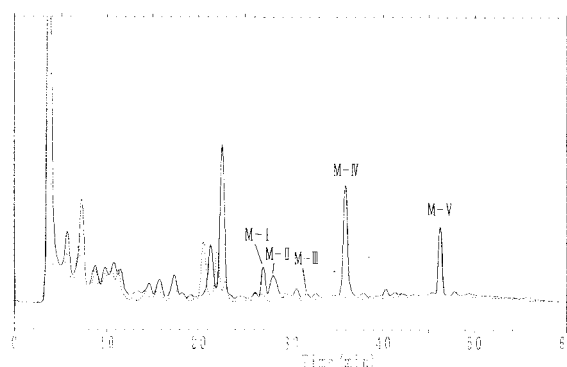


Fig. 3 HPLC chromatogram of urine excreted during 24h after oral administration of "Kakkon to" extract to rat —; metabolic urine, ---; control urine.



Fig. 4 HPLC chromatogram of urine excreted during 24h after oral administration of a solution of "Kakkon" to human —; metabolic urine, ---; control urine.

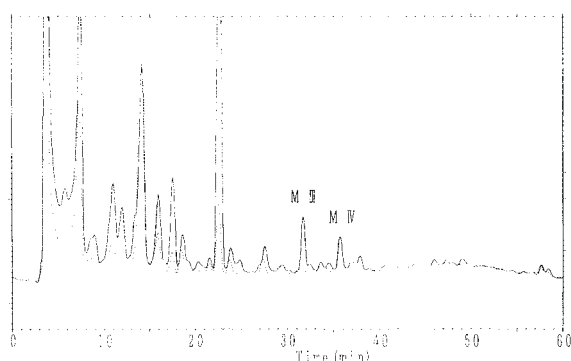


Fig. 5 HPLC chromatogram of urine excreted during 24h after oral administration of "Kakkon-to" to human — ; metabolic urine, --- ; control urine.

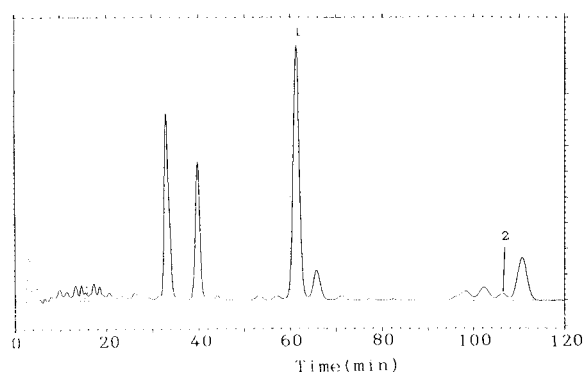


Fig. 6 HPLC chromatogram of urine excreted during 24h after oral administration of "Kakkon to" to human — ; metabolic urine, --- ; control urine.
1, daidzein, 2, (±)-equol.

を酵素加水分解後 HPLC で定性を行なった。その結果、Fig. 6 に示すように脱抱合された遊離の daidzein (t_R 61.5 min) のピークが認められ、さらに equol (t_R 106.5 min) に相当するピークが確認された。Daidzein 及び equol ピークの同定はフォトダイオードアレイ検出器を用いて各ピークの UV スペクトルを測定した。その結果、ヒト尿中の daidzein のピークは 249.8 と 305.7 nm に、また equol のピークは 281.0 nm に極大吸収値を示し、標準品のそれらと一致した。

考 察

以上の実験結果から、ラットに葛根中のイソフラボン誘導体の daidzin や daidzein 又は puerarin を投与した場合^{1,2)}と同様、葛根単味及び葛根湯エキスの状態におい

ても後者 2 成分が消化管から吸収され、さらに daidzein は抱合体へと代謝を受け、尿中へ排泄されていることが明らかとなった。

さらに著者らは現代の医療の場において漢方薬が高頻度で使用されているにもかかわらず、その成分代謝に関する知見についてはあまり検討されていないことから、これまでの結果をもとに葛根熱水抽出液及び葛根が配合された代表的な方剤である葛根湯をヒトに投与し、その尿中代謝物についても検討を行なった。その結果、葛根熱水抽出液を投与したヒト尿中に M-III 及び M-IV を確認した。しかし、M-I, M-II そして遊離型の M-V ピークは本法では確認されなかった。著者らは前報で puerarin をラットに経口投与後の尿中主代謝物として未変化体の puerarin を確認し、C-配糖体の puerarin はラットの生体内で加水分解を受けにくいことを報告した²⁾。しかしながらヒト尿中には M-I が確認されず、主として M-III 及び M-IV のピークが認められた。今回葛根湯を投与したヒト尿中から puerarin が検出されなかった理由として、ヒトに puerarin 500 mg を経口投与した場合、投与後 36 時間までの尿中へは 0.78 % しか排泄されないという報告⁸⁾と、*in vitro* でヒト腸内細菌により C-配糖体の homoorientin は一部開裂することが知られている例⁹⁾などを考え併せると、puerarin の尿中への低い排泄率及び腸内細菌による開裂が主な原因であると考えられた。これらの結果から葛根湯を投与したヒトの尿中へは、daidzein のグルクロン酸抱合体 (M-III) 及び硫酸抱合体 (M-IV) として主に排泄されていることが明らかとなった。またこれらの両成分は再現性よく認められることから、臨床の分野において葛根湯のみならず葛根が配合された漢方方剤におけるマーカー化合物として有用であると思われる。

次に著者らは daidzein が非ステロイド型の phytoestrogen である equol の前駆体であり、この equol がこれまでに種々の動物の尿中から単離され、¹⁰⁻¹⁶⁾ また近年になってヒトの尿中からも発見され、^{3,4)} 閉経後の女性や乳癌の女性との因果関係について関心がもたれていることに着目し、HPLC を用いて葛根湯投与後のヒト尿中における equol ピークを同定した。これまでの人体における報告⁴⁾によると菜食者及び通常の食事を摂らせた閉経後の女性を対象とした結果において、daidzein に比べ equol の方が非常に高い割合で尿中へ排泄されている。それに対し男性を対象とした今回の結果では equol がごく僅かなのに対し、daidzein のピークは顕著に認められていた。このことは漢方方剤である葛根湯投与においては daidzein から equol への代謝が進行しにくいことや性差或いは病態時と正常時との違いなど様々な要因が考え

られ、その詳細については今後の課題として残される。

結 論

葛根単味及び葛根湯エキスをラットに経口投与し、その尿中排泄成分 (M I-M V) をフォトダイオードアレイ検出器を備えた HPLC によりそれぞれ同定した。さらにヒトへの投与についても試み、葛根単味熱水抽出液及び葛根湯投与後の尿中代謝物 (M-III 及び M-IV) についても同様に HPLC を用いて同定した。これらのことからエキス及び湯液の状態においても葛根中のイソフラボノイド成分が消化管から吸収され、血流中へ移行後尿中へ排泄されていることが明らかとなった。

また、葛根湯をヒトに投与後の尿中に、エストロゲン作用を有する equol の存在を確認した。

References

- 1) Yasuda, T., Kano, Y., Saito, K., Ohsawa, K.: Urinary and biliary metabolites of daidzin and daidzein in rats. *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 1369-1374, 1994.
- 2) Yasuda, T., Kano, Y., Saito, K., Ohsawa, K.: Urinary and biliary metabolites of puerarin in rats. *Biol. Pharm. Bull.* submitted.
- 3) Axelson, M., Kirk, D.N., Farrant, R.D., Cooley, G., Lawson, A.M., Setchell, K.D.R.: The identification of the weak oestrogen equol [7-hydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)-chroman] in human urine. *Biochem. J.* **201**, 353-357, 1982.
- 4) Baawart, C., Fotsis, T., Heikkinen, R., Adlercreutz, H.: Identification of the isoflavonic phytoestrogen daidzein in human urine. *Clin. Chim. Acta.* **136**, 165-172, 1984.
- 5) Lamberton, J.A., Soares, H., Watson, K.G.: Catalytic hydrogenation of isoflavones. the preparation of (1) equol and related isoflavans. *Aust. J. Chem.* **31**, 455-457, 1978.
- 6) Wessely, F., Prillinger, F.: Die konstitution des equols. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **72**, 629-633, 1939.
- 7) Kouseishou Yakumu kyoku kanshuu, "Ippanyou Kanpou shohou no tebiki" Yakugyoujishusha, Tokyo, 1988.
厚生省薬務局監修, "一般漢方処方の手引き" 薬業時報社, 東京, 1988.
- 8) Xiuyuan, Z., Ghengye, S., Tianli, Y., Xiangzhen, Y., Huailing, W.: The metabolic fate of the effective components of puerariae. *Acta Pharm. Sin.* **14**, 349-355, 1979.
- 9) Hattori, M., Shu, Y., El Sedawy, A., Namba T.: Metabolism of homoorientin by human intestinal bacteria. *J. Nat. Prod.* **51**, 874-878, 1988.
- 10) Marrian, G.F., Haslewood, G.A.D.: Equol, a new inactive phenol isolated from the ketohydroxyoestrin fraction of mares' urine. *Biochem. J.* **26**, 1227-1232, 1932.
- 11) Klyne, W., Wright, A.A.: Steroids and other lipids of pregnant goat's urine. *Biochem. J.* **66**, 92-101, 1957.
- 12) Klyne, W., Wright, A.A.: Steroids and other lipids of pregnant cows' urine. *J. Endocr.* **18**, 32-45, 1959.
- 13) Common, R.H., Ainsworth, L.: Identification of equol in the urine of the domestic fowl. *Biochim. biophys. Acta.* **53**, 403-404, 1961.
- 14) MacRae, H.F., Dale, D.G., Common, R.H.: Formation in vivo of 16-epiestriol and 16-ketoestradiol 17 β from estriol by the laying hen and occurrence of equol in hens' urine and faeces. *Can. J. Biochem. Physiol.* **38**, 523-532, 1960.
- 15) Braden, A.W.H., Hart, N.K., Lamberton, J.A.: The oestrogenic activity and metabolism of certain isoflavones in sheep. *Aust. J. Agric. Res.* **18**, 335-348, 1967.
- 16) Axelson, M., Setchell, K.D.R.: The excretion of lignans in rats: evidence for an intestinal bacterial source for this new group of compounds. *FEBS Lett.* **123**, 337-342, 1981.