

大黄の煎液調製時におけるセンノシドA含量と瀉下活性

岡村 信幸,* 安保 尚美, 青野 未和, 江口 倫由, 吉井 久乃, 小野 行雄, 八木 晟

福山大学薬学部生薬学教室

Variation of sennoside A content and purgative activity during preparation of rhubarb decoction

Nobuyuki OKAMURA,* Naomi ABO, Mio AONO, Tomoyori EGUCHI, Hisano YOSHII, Yukio ONO and Akira YAGI

Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University, Sanzo 1, Gakuen-cho, Fukuyama, Hiroshima, 729-0292, Japan.

(Received January 18, 2002. Accepted March 25, 2002.)

Abstract

Daio-kanzo-to is a Kampo medicine for acute and chronic constipation which consists of a combination of rhubarb and glycyrrhiza. The contribution of rhubarb is to provide a purgative effect, due to the presence of sennosides. Sennoside A is known to decompose on heating during decoction. Therefore, it is said that Kampo decoctions containing rhubarb rather do not have to be boiled for a long time when targeting the purgative activity of sennoside A. This study was performed to clarify the relationship between decocting times of rhubarb and purgative activity. The variation of sennoside A content in rhubarb during the decocting times of 5 to 240 min was shown to be almost the same as that of Daio-kanzo-to. Compared to sennoside A content between powder and cut rhubarb during the period of decoction, the time when the maximum dissolution was reached had significant differences (powder: 10 min, cut: 40 min). Each purgative activity of powder and cut rhubarb decoctions was in proportion to sennoside A content. Kampo decoctions are generally prepared with cut crude drugs. Therefore, we concluded that usual decoction (40 min) is most suitable for Kampo medicines containing rhubarb to use for constipation.

Key words rhubarb, sennoside A, purgative activity, Kampo decoction, HPLC.

緒 言

大黄甘草湯は大黄と甘草の2種の生薬からなる代表的な大黄剤で、二重盲検臨床比較試験によって便秘症への有効性が報告されている。¹⁾ この薬効には大黄に含まれるセンノシド類が主に関与していることがよく知られており、高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法によるセンノシドAおよびBを指標成分とした定量によって、大黄を含む製剤の品質評価がなされている。

大黄は煎出方法や煎出時間によって瀉下活性が低下することが明らかにされており、²⁾ 大黄を長時間煎じるこ

とによるセンノシド類の熱分解に起因すると報告されている。³⁾ これらのことから、瀉下作用を期待して大黄剤を調製する場合、大黄の煎出時間はなるべく短時間で終わることが望ましいと考えられるようになった。一方、古典の煎出法によると、大黄以外の生薬を先に煎じ、大黄を煎出途中で加えるもの(後煎)は、柴胡加竜骨牡蠣湯や大承気湯などの限られた大黄剤だけである。⁴⁾

本実験では大黄と大黄甘草湯ならびに大黄の粉末と刻みについて、煎液調製時における経時的なセンノシドA含量の変動を調べた。さらに大黄の粉末と刻みの5、40、180分の煎液における瀉下活性を比較し、大黄剤の適正な煎出法について検討を行った。

*To whom correspondence should be addressed. e-mail: okamura@fupharm.fukuyama-u.ac.jp

材料と方法

(1) **実験動物**：5週齢の ddY 系雄性マウス（清水実験材料）は、約1週間予備飼育をした後、実験に用いた。動物は $23 \pm 4^\circ\text{C}$ 、12時間の明暗サイクルの環境下で飼育し、実験開始まで飼料及び水は自由に摂取させた。

(2) **大黄煎液および大黄甘草湯の調製**：大黄（西寧・錦紋：*Rheum palmatum* L., *R. tanguticum* MAXIMOWICZ, ロット番号：260400）と甘草（東北：*Glycyrrhiza uralensis* FISHER, ロット番号：070499）は栃本天海堂（大阪）より購入した。大黄の粉末は同じロットの刻みを粉末化し、100メッシュのふるいを通したものをを用いた。大黄（4 g）の煎液は刻みおよび粉末をナス型フラスコ（500 ml）に入れ、精製水250 mlを加えてマントルヒーターで還流抽出し、5, 10, 20, 40, 60, 120, 180, 240分ごとに煎液を約1 ml ずつ採取した。大黄甘草湯の煎液は、刻み生薬1日量（大黄4 g, 甘草1 g）⁵⁾を大黄の煎液と同様の方法で調製した。採取した煎液は直ちにメンブランフィルター（0.22 μm , マイレックス-GP25：ミリポア）でろ過後、氷冷した。

(3) **センノシドAの加熱分解**：センノシドA（9 mg）を0.01Mリン酸塩緩衝液（pH 7.4）0.3 mlに溶かし精製水100 mlを加え、メンブランフィルター（マイレックス-GP 25）でろ過した標準溶液と、大黄の刻み（4 g）に精製水250 mlを加え40分間還流抽出後、温時吸引ろ過し氷冷した煎液について、それぞれ加熱還流処理を行い、5, 10, 20, 40, 60, 120, 180, 240分ごとに加熱処理液を約1 ml ずつ採取した。採取した加熱処理液は直ちにメンブランフィルター（0.45 μm , マイレックス-LH：ミリポア）でろ過後、氷冷した。

(4) HPLC 条件

1) **HPLC 装置**：HPLC 装置には、HP ケミステーション、HP1100型バイナリポンプ、HP1100型ダイオードアレイ、HP1100型オートサンブラ、HP1100型カラム恒温槽、HP1100型オンラインデガッサ（以上、Agilent製）を使用した。カラムは Wakosil-II5C18HG（5 μm , 150 x 4.6 mm i.d.：和光純薬）を用いた。

2) **定量条件**：試料は、注入量5 μl 、検出波長265 nm、流速1 ml/min、カラム温度35°Cで、0.017%リン酸水溶液とアセトニトリルのリニアグラジエントで測定した。グラジエントプログラムはアセトニトリル濃度18%（0分）→20%（5分）→25%（9分）→29%（15–18分）→39%（18分）→43%（26分）→65%（34分→40分）を用いた。⁶⁾

(5) 瀉下実験

1) **投与試料の調製**：刻みおよび粉末の大黄（4 g）に精

製水500mlを加え、マントルヒーターで5, 40, 180分間還流抽出した煎液を、直ちに吸引ろ過ならびに氷冷した後、凍結乾燥した。5, 40, 180分の凍結乾燥エキス重量は、それぞれ粉末で1.60, 1.80, 2.06 g, 刻みで0.74, 1.76, 1.98 gであった。投与容量がマウス体重10 gあたり0.2 mlになるように、凍結乾燥エキスを精製水に溶かして全量20mlとした。さらにその液と2, 4, 8倍の希釈液を調製して、マウス体重kgあたり4, 2, 1, 0.5 g 大黄の投与量に相当する投与試料とした。

2) **投与方法および判定方法**：鶴見らの方法⁷⁾に準じ、マウスを試料投与2時間前からビーカー（直径12cm）をかぶせたる紙上に放置し、下痢をしていない正常便排出マウスのみを使用した。実験中は絶食絶水とし、経口投与後、6時間にわたって毎時間ごとに便の状態を観察した。判定方法は正常便（硬い便）、膨潤便（やや柔らかい便）、軟便（ろ紙に付着する便）、泥状便、粘液便に分類し、軟便から粘液便をすべて下痢便とみなし、1個でも下痢便の認められたものは瀉下活性陽性と判定した。瀉下活性の強さは投与マウス数に対する下痢便排泄マウスの下痢有効率（%）であらわした。統計学的処理はカイ二乗検定で群間の比較を行い、危険率5%以下を有意とした。

結 果

1. 大黄および大黄甘草湯の煎液調製時におけるセンノシドA含量の経時的変動

大黄および大黄甘草湯を5~240分間還流抽出し、その主成分含量の経時的変動を分析した（Fig. 1）。大黄の煎液では、センノシドA含量は煎出20分から40分にかけて高い値を示し、最高煎出量を示した40分以降は経時的に減少した。一方、レインやその他のアントラキノン類（アロエエモジン、エモジン、クリソファノール：データ省略）は経時的な増加傾向を示した。大黄甘草湯のセンノシドAならびにアントラキノン類の経時的な変動は、大黄の結果とよく一致した。また、甘草の主成分であるグリチルリチンは経時的に増加した。

2. センノシドAの加熱分解

予め調製した大黄の煎液ならびに同濃度のセンノシドAを含む標準溶液を5~240分間加熱還流し、煎液ならびに標準溶液中のセンノシドAの加熱による経時的変動を分析した（Fig. 2）。煎液中のアントラキノン類は全く減少傾向を示さなかったが、煎液ならびに標準溶液中のセンノシドAは加熱10分後から経時的に減少し、それぞれ20分後に94%と90%、40分後に81%と74%、60分後に69%と62%、120分後に42%と42%、180分後に28%と

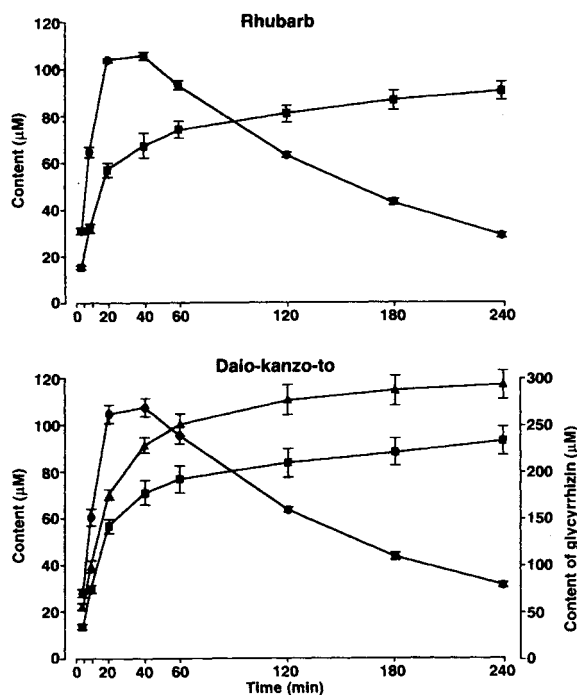


Fig. 1 Content-time profiles of sennoside A, rhein and glycyrrhizin in rhubarb and Daio-kanzo-to cut-decoction by boiling.

● Sennoside A, ■ rhein, ▲ glycyrrhizin.

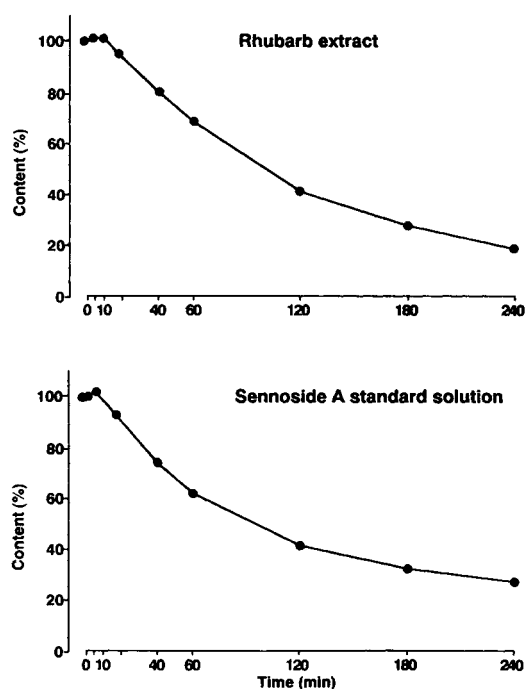


Fig. 2 Degradation of sennoside A in rhubarb extract and sennoside A standard solution by heating.

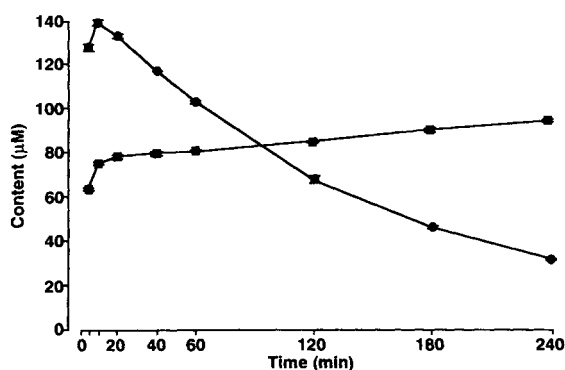


Fig. 3 Content-time profiles of sennoside A and rhein in rhubarb powder-decoction by boiling.

● Sennoside A, ■ rhein.

32%, 240分後に19%と27%になった。

3. 大黃の粉末を用いた煎液調製時におけるセンノシドA含量の経時的変動

同じロットの刻みを粉末化した大黃について5~240分間還流抽出し、センノシドAの経時的変動を分析した (Fig. 3)。刻みは煎出40分に最も高いセンノシドA含量を示すのに対し、粉末では10分で最高煎出量を認め、それ以降は経時的に減少した。一方、rheinは煎出10分で240分後の煎出量の79%に達し、経時的な増加傾向を示した。

4. 大黃の形状の違いによる瀉下活性の比較

大黃の粉末ならびに刻みの5, 40, 180分間還流抽出した凍結乾燥エキスについて、マウス体重kgあたりの大黃の投与量0.5, 1, 2, 4gに調製し瀉下活性を検討した。下痢の発現は主に試料投与3時間後から観察され、経時的に増加した。高濃度を与えた群では、2~3時間で下痢を発現するマウスもわずかながら認められた。粉末では1および2g/kg投与量において、煎出5分の煎液が180分の煎液に対し有意な下痢有効率を示した (Fig. 4)。一方、刻みでは煎出40分の煎液が1g/kg投与量で5分と180分の煎液に対し、2g/kg投与量で5分の煎液に対し、それぞれ有意な下痢有効率を示した (Fig. 5)。

考 察

大黃は漢方における重要な生薬の一つであり、各種漢方処方用いられている。大黃に甘草を組合わせた大黃甘草湯とこれに芒硝を加えた調胃承気湯が大黃剤の基本処方で、主に便秘を適応症としている。そのため、大黃の主瀉下活性成分であるセンノシドAが大黃剤の品質評価の指標として用いられる。煎液調製時における大黃ならびに大黃甘草湯の煎液中の主要成分について定量した結果、両煎液中のセンノシドA含量は煎出20分から40分

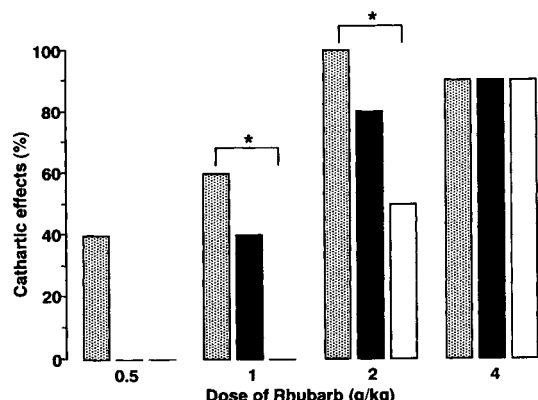


Fig. 4 Cathartic effect of powder rhubarb decoction. Statistical significance: * $p < 0.05$ (X^2 test), $n = 10$.
 ▨ 5 min, ■ 40 min, □ 180 min.

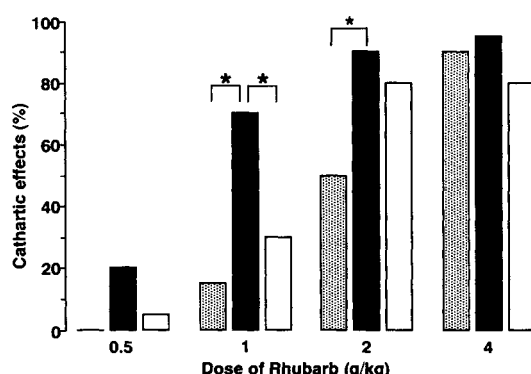


Fig. 5 Cathartic effect of cut rhubarb decoction. Statistical significance: * $p < 0.05$ (X^2 test), $n = 20$.
 ▨ 5 min, ■ 40 min, □ 180 min.

にかけて高い値を示した後、1次反応に従って熱分解を受けて減少を続けた。煎出5分と180分のセンノシドA含量は最高煎出量（40分）に対し、それぞれ大黄で29%と40%、大黄甘草湯で26%と40%であった。瀉下作用を期待する大黄剤の煎液調製において、大黄の煎出時間はなるべく短時間で終わることが望ましいとされている。この根拠はセンノシド類が熱に不安定で分解するため、長時間煎じると瀉下活性が低下することにある。しかしながら、古典では大黄甘草湯や調胃承気湯などにおける大黄の煎出法に特別な指示は見受けられない。また、本実験における大黄や大黄甘草湯のセンノシドAの定量結果とも矛盾する。そこで、大黄の煎液調製時におけるセンノシドAならびにその他の指標成分の変動が大黄甘草湯とよく一致することから、大黄を用いた煎出法の違いによるセンノシドA含量ならびに瀉下活性について検討を行った。

大黄の煎液ならびにセンノシドA標準溶液の加熱還流処理において、いずれも加熱10分後からセンノシドAは減少し、240分後にはセンノシドAは煎液で19.1%、標準溶液で27.1%にまで減少した。センノシドAの分解が加熱10分まで起きない理由として、沸騰までの昇温時間（10分前後）の影響が考えられる。センノシドAの分解は加熱120分まで標準溶液の方が煎液に比べてやや速く、2次反応に従って熱分解を受けて減少したが、煎液においては1次反応に基づいた分解が認められた。前述の大黄や大黄甘草湯が煎出40分で最も高いセンノシドA含量を示し、その後は煎液の加熱還流処理と同じ1次反応に従って熱分解を受けることから、センノシドAの溶出は40分ではほぼ終わっていると考えられる。また、これらのセンノシドAの加熱分解が標準溶液と反応速度論的に違いが観察され、煎液中の共存物質などによってセンノシド

Aの加熱分解が若干抑制されていると推測される。

煎出時間と瀉下活性に関する前述の報告²⁾では、大黄の粉末を用いた還流抽出によって検討がなされている。そこで、本実験では大黄の粉末と刻みにおける煎出時間とセンノシドA含量を比較した。刻みでは煎出20分から40分にかけて最も高い含量を示すのに対し、粉末では5分で既に最高煎出量の92%に相当する含量に達し、10分で最高煎出量を示した。粉末と刻みを冷浸振盪抽出（30℃、120回/分：データ省略）すると、粉末からのセンノシドAの溶出は速く、振盪5分で240分後のセンノシドA抽出量の89%が溶出した。散剤である四逆散や排膿散の溶出実験において、主要成分のほとんどが5分以内に溶出するという報告⁸⁾にみられるように、粉末では溶媒との接触面積の広いことで抽出効率が向上する。一方、刻みの冷浸振盪抽出では振盪5分で240分後の抽出量の18%、40分で59%とセンノシドAの溶出は遅く、240分で粉末の抽出量とほぼ同じになった。粉末の還流抽出において、最大煎出量の後に1次反応に基づいた熱分解を受けることから、センノシドAは10分以内にほぼ全量溶出していると考えられる。すなわち、粉末から短時間で溶出しセンノシドAが早い段階で熱分解を受けるのに対し、刻みからは比較的緩やかに溶出するため、生薬の形状によって最高煎出量を示す煎出時間に差が生じることになる。したがって、一般に刻み生薬を用いて煎液の調製が行われることから、センノシドA含量を指標に考えると、通常の煎出時間に相当する40分が適していると考えられる。

大黄の形状によるセンノシドAの経時的変動の違いが明らかになったことから、粉末ならびに刻みを5、40、180分間還流抽出した凍結乾燥エキスについて、煎出時間と瀉下活性の関係を検討した。粉末では1および2g/

kg投与量において、煎出5分の煎液に180分の煎液に対する有意な下痢有効率が認められた。このことは粉末生薬を用いて煎液を調製する場合、煎出時間の短い方が明らかに瀉下活性の強いことを示しており、前述の報告²⁾とも一致する。一方、刻みでは煎出40分の煎液に、1 g/kg投与量で5分と180分の煎液に対し、2 g/kg投与量で5分の煎液に対し、それぞれ有意な下痢有効率が認められた。したがって、瀉下活性の比較においても短時間の煎出よりも通常の煎出時間である40分で調製した煎液の方がより効果的であることが判明した。

センノシドA含量と瀉下活性を比較すると、粉末生薬から調製した煎液の方がいずれもセンノシドAを多く含んでいるにもかかわらず、煎出40分と180分の煎液において、刻み生薬より下痢有効率は低い傾向にあった。この原因の一つとして、瀉下活性を抑制する成分が、抽出効率の高い粉末生薬を煎じることで、より多く溶出してきた可能性が推考される。

結 論

大黄および大黄甘草湯の煎液のセンノシドA含量は煎出40分で最高となった後、いずれも1次反応に従って熱分解を受け減少を続けた。センノシドA含量が最大となる煎出時間は、煎液を調製する際の大黄の形状により顕著な差が認められた。煎液の調製には生薬の刻みを用いるのが一般的で、煎出時間も40分前後で行われており、通常の煎出法ではセンノシドAの熱分解は無視できると考えられる。大黄甘草湯の煎出5分と10分のセンノシドA含量が、最高煎出量に対し26%と56%であったことから、むしろ10分程度の短時間ではセンノシドAの溶出は不十分と考えられる。そのため、大黄甘草湯などの大黄

剤の瀉下活性を最大限に発揮するためには、通常の煎出法で煎じの方がより効果的であるといえる。

*〒729-0292 福山市学園町1番地三蔵
福山大学薬学部生薬学教室 岡村信幸

References

- 1) Miyoshi, A., Masamune, O., Fukutomi, H., Mori, H., Miwa, T., Kojima, K., Aono, M. and Nakashima, M.: The clinical effect of Tsumura Daio-kanzo-to extract granules for ethical use (TJ-84) by double blind test against the constipation. *Gastroenterology*, **18**, 299-312, 1994.
- 2) Yamauchi, K., Imura, S., Amano, R. and Kuwano S.: Studies on the manufacture of Kampo-extracts. I. Decocting and concentrating procedure. *Shoyakugaku Zasshi*, **22**, 147-150, 1968.
- 3) Ohshima, Y., Takahashi, K., Hiraga, Y. and Shibata, S.: Studies on the evaluation of Chinese drug preparations. Determination of sennosides in the drug preparation containing rhubarb. *Shoyakugaku Zasshi*, **37**, 217-222, 1983.
- 4) Harada, M.: "Kampo Yakubutsu Chiryō-gaku" (漢方薬物治療学). Hirokawa Shoten, Tokyo, pp. 70, 1992.
- 5) Supervision by the Pharmaceutical and Supply Bureau of Health and Welfare Ministry of Japan (ed.): "Ippanyo Kampo Syoho no Tebiki". Yakugyo Jihosha, Tokyo, pp. 171-172, 1976.
- 6) Okamura, N., Abo, N., Aono, M. and Yagi, A.: Simultaneous determination of principal ingredients in Kampo medicines by high-performance liquid chromatography. *Natural Medicines*, **56**, 1-6, 2002.
- 7) Tsurumi, K., Hayashi, M., Hibino, R. and Fujimura, H.: Testing method for cathartic agents in mice. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **65**, 643-648, 1969.
- 8) Okamura, N., Maki, T., Ishida, S., Uraguchi, C., Onishi, Y. and Yagi, A.: Dissolution profiles of principal ingredients in Kampo medicinal powders by high-performance liquid chromatography. *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1782-1785, 2000.