薬物の極微弱化学発光に関する研究 (第 10 報¹⁾) 大黃の極微弱化学発光抑制成分

佐藤秀昭,^a 黒崎雄一郎,^a 平山秀樹,^b 水柿道直*,^a

東北大学医学部附属病院薬剤部,^a 株式会社ツムラ^b

Extra-Weak Chemiluminescence of Drugs. X.¹⁾ Extra-Weak Chemiluminescence Quenching Component of Rhubarb

Hideaki SATO,^a Yuichiro KUROSAKI,^a Hideki HIRAYAMA,^b
and Michinao MIZUGAKI*,^a

Department of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University Hospital,^a

1-1 Seiryō-machi, Aoba-ku Sendai 980, Japan and Research

Department of Quality Control & Evaluation, Tsumura Co.,

Ltd.,^b 3586 Yoshiwara, Ami-machi, Inashikigun,

Ibaraki 300-11, Japan

(Received August 28, 1989)

Active components contained in rhubarb (*Rhei Rhizoma*) that show a quenching effect of extra-weak chemiluminescence (CL) arising from Maillard reaction, had been studied. As the result of fractionation and purification of rhubarb, CL quenching activity was found to exist mainly in the fraction of quinone derivatives as emodin, aloemodin or rhein. The authentic samples of these quinones showed high CL quenching activities.

Keywords—rhubarb; extra-weak chemiluminescence; quenching; emodin; aloemodin; rhein

著者らは先に、甘草の抽出時に観察される極微弱化学発光 (extra-weak chemiluminescence, CL) は、メイラード反応に起因し、大黃 (*Rhei Rhizoma*) を添加することにより著しく抑制されることを報告した。^{2,3)}

大黃は、anthraquinone, anthrone, dianthrone 等の anthracene 誘導体, stilbene 誘導体, naphthalene 誘導体, chromanone 等の chromone 誘導体, lindleyin 等の phenylbutanone 誘導体, catechin, procyanidin, Rhatannin 等の Rhatannin 誘導体及び gallic acid, cinnamic acid 等の多くの成分を含有し、瀉下作用,⁴⁾ 血中尿素窒素低下作用,⁵⁾ 抗炎症作用⁶⁾等の多彩な生理活性を持つことが知られている。

今回著者らは、メイラード反応のモデル系を用い、CL を抑制する大黃成分について検討した結果を報告する。

実験の部

試料 錦紋大黃及び雅黃, (+)-catechin (Sigma), rhein, chrysophanol, aloemodin (Extrasynthese), emodin (Fluka AG), sennoside A, sennoside B (ROTH), gallic acid, L-lysine free base, D (-)-arabinose (和光純薬) を使用した。

大黃成分の分画 西岡ら⁷⁾の方法に準じて分画した (Chart 1)。

極微弱化学発光の測定 Chemiluminescence Analyzer OX-70 (Tohoku Electronics Ind. Co., Ltd.) を用い測定した。L-Lysine と D-arabinose を各々 50 mM ずつ含む混合液 10 ml を直径 53 mm 高さ 13 mm 石英ガラス製蓋付きセルに入れ、試料を加えた。大気下、100°C、1 秒間隔で連続的に CL を計測し、最大値を各試料添加時の CL 値として採用した。本実験を通じ dark count は 60—70 counts/s であった。

大黃抽出画分 (Fr. II-3) の含有成分の定性 野中⁸⁾らの方法に準じて、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により成分の定性を行った。カラムとして Nucleosil 5C₁₈ (4.6 mm i.d. × 150 mm) を用い、アセトニトリル及び 50 mM リン酸 2 水素ナトリウム溶液を用いて非直線濃度勾配法により CH₃CN 8% (0 min)—15% (20 min)—35% (50 min)—80% (65 min) にて、流速 1.0 ml/min で溶出させた。検出波長は 280 nm とした。

結 果

大黃水製エキス末の影響

メイラード反応時に発生する CL は、時間経過と共に上昇し約 60 分後に最大値 (48000 counts/s) に達し、その後徐々に減少するパターンを示す。³⁾ この反応系に大黃水成エキス末を添加した場合の CL 値を Table I に示した。大黃配合時の CL は、添加量に比例して抑制された。また、雅黃水成エキス末と錦紋水成エキス末は同様な CL 抑制効果を示した。

大黃水製エキス末画分の影響

大黃成分中の CL 抑制物質を明らかにするため、Chart 1 に示す大黃の分画 Fr. I, II, III, IV, V を各々 1 mg 添加し、CL を測定した結果を Table II に示した。Fr. II は、最も強い抑制作用を示し、添加量 1 mg で 73%, 5 mg で 50%, 10 mg で 35% と用量依存的に CL 抑制作用が認められた。更に、Fr. II を MCI GEL CHP-20P カラムクロマトグラフィーで Fr. II-1—3 に分画し、各々のフラクションについて CL 抑制作用を測定した。

TABLE I. Effect of Extracted Powder from Rhei Rhizoma on Extra-Weak Chemiluminescence Arising from Maillard Reaction

Species	Amount (mg)	Residual CL	
		(counts/s)	(%)
Control	0	48000	100
Gao-extracts	1	46100	96.1
Gao-extracts	5	31000	64.5
Gao-extracts	10	27300	56.8
Kinmon-extracts	1	43700	91.1
Kinmon-extracts	5	31200	65.1
Kinmon-extracts	10	22800	47.7

Kinmon or Gao extracts were added to a mixture containing each 50 mM of D-arabinose and L-lysine in 10 ml of water and heated at 100°C. Dark count was about 60 counts/s.

TABLE II. Effect of Fractions Isolated from Rhei Rhizoma on Extra-Weak Chemiluminescence Arising from Maillard Reaction

Sample	Amount (mg)	Residual CL	
		(counts/s)	(%)
Control	0	48000	100
Fr. I	1	38100	79.4
Fr. II	1	35100	73.1
Fr. III	1	38700	80.6
Fr. IV	1	39200	81.7
Fr. V	1	48000	100

Each sample was added to a mixture containing each 50 mM of D-arabinose and L-lysine in 10 ml of water and heated at 100°C. Dark count was about 60 counts/s.

Fig. 1. Chromatogram of Fraction II-3

1,2'-*O*-cinnamoyl glucogallin; 2, rhein; 3, emodin 8-*O*-glucoside; 4, aloe-emodin; 5, emodin.

TABLE III. Effect of Fractions Isolated from Fraction II on Extra-Weak Chemiluminescence Arising from Maillard Reaction

Sample	Amount (mg)	Residual CL	
		(counts/s)	(%)
Control	0	48000	100
Fr. II-1	1	44600	92.9
Fr. II-2	1	43900	91.5
Fr. II-3	1	27200	56.7

Each sample was added to a mixture containing each 50 mM of D-arabinose and L-lysine in 10 ml of water and heated at 100°C. Dark count was about 60 counts/s.

その結果, Table III に示すように Fr. II-3 が最も高い抑制作用を示し, 添加量 1 mg で 57%, 5 mg で 40%, 10 mg で 20% と添加量に依存した CL 抑制作用が認められた。

大黃抽出画分 (Fr. II-3) の含有成分の検討

Fr. II-3 の逆相 HPLC による溶出パターンを

Fig. 1 に示す. 野中⁸⁾らの報告した HPLC の溶出パターンと比較した結果, rhein, emodin-8-*O*-glucoside, aloe-emodin, emodin 等の anthraquinone 誘導体の存在を予測した. また, rhein, aloe-emodin, emodin については標準品を用い同定した.

大黃含有成分の CL 抑制効果

大黃含有成分の標準品を各々 1 mg を添加し, CL 抑制効果を測定した. Table IV に示すように, anthraquinone 誘導体の rhein, aloe-emodin 及び emodin で各々 35%, 44%, 52% と強い CL 抑制効果が認められた。

TABLE IV. Effect of Authentic Sample on Extra-Weak Chemiluminescence Arising from Maillard Reaction

Sample	Amount (mg)	Residual CL	
		(counts/s)	(%)
Control	0	48000	100
Sennoside A	1	33000	68.7
Sennoside B	1	30000	62.5
Gallic acid	1	37000	77.1
(+)-Catechin	1	46000	95.8
Emodin	1	25000	52.1
Chrysophanol	1	48000	100.0
Aloe-emodin	1	21000	43.8
Rhein	1	17000	35.4

Each sample was added to a mixture containing each 50 mM of D-arabinose and L-lysine in 10 ml of water and heated at 100°C. Dark count was about 60 counts/s.

考 察

大黃は産地, 形態等により錦紋大黃, 雅黃, 馬蹄大黃等に分類され, 各成分の含量や組成に差異のあることが知られている. しかし, 今回試料とした錦紋エキス末及び雅黃エキス末は共に強い CL 抑制効果を示し, 種類による差異は認められなかった. 今回試料とした大黃画分の CL 抑制効果は Fr. V 以外で一様に認められ, CL 抑制成分は単一化合物に起因するのではなく, 種々の化合物に起因することが示唆された (Table II). 強い抑制効

果を示した Fr. II を Fr. II-1—3 に分画し, CL 抑制効果を検討した結果, Fr. II-1 及び Fr. II-2 では CL 抑制効果がほとんど認められなかった (Table III). これに対し, Fr. II-3 添加後の CL 残存率は 56.7% で, Fr. II の CL 残存率 73.1% と比較して, 強い抑制効果を示した. この事実から Fr. II に含まれる CL 抑制成分はほとんど Fr. II-3 に存在していることが示唆された. Fr. II-3 には aloe-emodin, emodin, rhein 等の anthraquinone 誘導体が主な成分であることを Fig. I より同定した. したがって, これらの物質が CL 抑制効果の本体である可能性が示唆されたので, aloe-emodin, emodin 及び rhein 等の標品を用い CL 抑制効果を検討した. その結果, Table IV に示すように aloe-emodin, rhein 及び emodin に高い CL 抑制効果が認められた. この結果, CL 抑制成分の本体は aloe-emodin 及び emodin 等の anthraquinone 誘導体であることが明らかになった.

メイラード反応の過程で観察される CL は, 酸化還元反応過程で生成する活性酸素由来であり, アスコルビン酸等の抗酸化剤の添加により抑制されることを既に報告している.^{9,10)} 今回の実験で CL 抑制作用が確認された aloe-emodin, emodin 及び rhein 等のキノン化合物は, 一般に段階的な一電子還元を受けセミキノンラジカル及びヒドロキノンの還元型を生成し, これらの還元型分子は分子状酸素を酸化剤として自動酸化反応を引き起こすことが知られている. 一方, 過酸化ラジカルやアルコキシラジカルの消去作用を持ち, 抗酸化作用を示す報告もある.¹¹⁾

最近, 多くの生体蛋白, 例えばヘモグロビン,¹²⁾ 赤血球膜蛋白,¹³⁾ 眼球レンズのクリスタリン,¹⁴⁾ 結合組織に存在するコラーゲン,¹⁵⁾ 血清アルブミン¹⁶⁾等の中に, メイラード反応に起因したメラノイジンの存在することが明らかにされ, 種々の病態との結び付きが示唆されている. したがって, このメイラード反応を抑制する大黃中の anthraquinone 誘導体の CL 抑制作用についてさらに検討を加えている.

引用文献

- 1) 第 9 報: K. Edo, K. Saito, M. Kato, Y. Akiyama-Murai, H. Sato, M. Mizugaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 4603 (1988).
- 2) 佐藤秀昭, 江戸清人, 水柿道直, 薬誌, **104**, 394 (1984).
- 3) 佐藤秀昭, 黒崎雄一郎, 江戸清人, 水柿道直, 薬誌, **107**, 891 (1987).
- 4) H. Oshio, S. Imai, S. Fujioka, T. Sugawara, M. Miyamoto, M. Tsukui, *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 823 (1974).
- 5) 大浦彦吉, 医学のあゆみ, **126**, 837 (1983).
- 6) G. Nonaka, I. Nishioka, T. Nagasawa, H. Oura, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 2862 (1981).
- 7) T. Yokozawa, N. Suzuki, H. Oura, G. Nonaka, I. Nishioka, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 4718 (1986).
- 8) 野中源一郎, 西沢 信, 山岸 喬, 和漢医薬学会誌, **2**, 89 (1985).
- 9) Y. Kurosaki, H. Sato, M. Mizugaki, *J. Biolumi. Chemilumi.*, **3**, 13 (1989).
- 10) Y. Kurosaki, H. Sato, H. Isizawa, M. Mizugaki, in preparation.
- 11) 寿野正廣, 永岡明伸, 武田研究所報, **44**, 30 (1985).
- 12) R. J. Koenig, S. H. Blobstein, A. Cerami, *J. Biol. Chem.*, **252**, 2992 (1977).
- 13) J. A. Miller, E. Gravalles, H. F. Bunn, *J. Clin. Invest.*, **65**, 896 (1980).
- 14) A. Pande, W. H. Garner, A. Spector, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 1260 (1979).
- 15) A. J. Bailey, S. P. Robins, *Front. Matrix Biol.*, **1**, 130 (1973).
- 16) J. F. Day, S. R. Thorpe, J. W. Baynes, *J. Biol. Chem.*, **254**, 595 (1979).