薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
111 (11) 665-671 (1991)

ヒドロキシアントラキノン誘導体を含有する天然医薬品のメカノケミカル固相反応

葛谷昌之,* 坂田秀哉, 近藤伸一, 野口章公

岐阜薬科大学

Mechanochemical Solid State Reactions of Natural Products for Medicinal Use Containing Hydroxyanthraquinone Derivatives

Masayuki KUZUYA,* Hideya SAKATA, Shin-ichi KONDO,
and Akihiro NOGUCHI

Gifu Pharmaceutical University, 5-6-1, Mitahora-Higashi
Gifu 502, Japan

(Received May 27, 1991)

In commercial powdered natural products for medicinal use containing various combined forms of hydroxyanthraquinone derivatives such as *Sennae Folium*, *Cassiae Semen*, *Rhei Rhizoma* and *Aloe* a considerable amount of stable free radicals (*ca.* 10^{17} — 10^{18} spin/g) was found to be contained by use of electron spin resonance (ESR) spectral measurements. It was also found that the vibratory milling of such powders in a metallic vessel enhanced the ESR spectral intensities, demonstrating the occurrence of mechanoradical formation. Separate experiments also demonstrated that the vibratory milling of various kinds of powdered hydroxyanthraquinone derivatives mixed with calcium oxalate has produced the mechanoradicals effectively, but they decayed gradually on standing at room temperature.

It was suggested, therefore, that the mechanoradicals formed in the above natural products are metal complexes of the corresponding semiquinone anion radicals induced by solid state one electron transfer mechanism from the active metal surface, part of which is further immobilized in polymeric fibers or the like in the plant tissues.

Keywords—mechanoradical; solid state one electron transfer; semiquinone anion radical; hydroxyanthraquinone; vibratory milling; electron spin resonance (ESR)

著者らはかねてより、プラズマ照射医薬品添加物を利用する新規な乾式 drug delivery system (DDS) に関する研究¹⁻³⁾との関連から各種のプラズマ照射高分子表面に生成する固相ラジカルの electron spin resonance (ESR) スペクトル研究を報告してきた。⁴⁻¹⁰⁾一方、高分子は機械的エネルギー(粉碎、摩擦、高速振動、圧縮等)によっていわゆる“メカノラジカル”を生成することが知られており、汎用高分子の生成メカノラジカル構造に関しては多くの報告例がある。¹¹⁾

医薬品の製造工程においても、主薬やその添加物の粉碎(粉末化)操作は生物学的利用度の向上や混合操作上の観点から広く行われてきており、その粉末物性についても多くの薬学的に貴重な研究報告例がある。¹²⁾しかしながら、粉碎時の化学反応、すなわち、メカノケミカル反応自身の分子レベルでの研究は、現象論的なラジカル生成に関する二、三の報告¹³⁻¹⁵⁾を除いて、見当たらない。粉末物性変化はかかるメカノラジカル生成とその反応が大きく関与していることを考える時、その真の理解には分子レベルでの研究が極めて重要である。

著者らは上記のプラズマ照射法の相補的研究として、現在まで数種の医薬品添加物も含め、高分子メカノラジカル生成特性に関する独自の ESR 速度論を含めた詳細な動力学的研究並びにメカノケミカル重合による高分子プロドラッグの新構築法の研究に至る一連のメカノケミカル固相反応について報告してきた。¹⁶⁻¹⁹⁾

ところで、ヒドロキシアントラキノン (HAQ) は、種々の高等植物、地衣類、菌類など自然界に様々な誘導体の形で広く分布している。²⁰⁾また、近年、生理活性物質(抗癌性など)としても注目されているパイ電子系化合

Fig. 1. Schematic for an Electron Transfer Reaction of Anthraquinone (A) and Mechanochemical Solid State Polymerization of Vinyl Monomer (B)

物の1つであるが、その作用機序や構造活性相関については不明点も多く残されている。一方、河合らは最近、ペニシリウム属から単離された数種の1,8-ジヒドロキシAQ誘導体(emodin, chrysazin, skyrin等)が発癌性を示すことを見いだした。²¹⁻²³⁾ かかる両面性の興味から、著者らは各種HAQのヒドロキシ置換基効果に関して、モデル化合物を用いた分子軌道計算に基づく電子構造特性と生理活性発現との相関性について報告した。²⁴⁾

HAQ誘導体(chrysophanol, frangulaemodin, emodin-monomethylether, alocemodin, rhein等)を含有主成分とする天然医薬品(生薬)にはセンナ(*Sennae Folium*), ケツメイシ(*Cassiae Semen*), ダイオウ(*Rhei Rhizoma*), アロエ(*Aloe*)等があり、その多くは粉末として用いられている。²⁵⁾ アントラキノン系は、その低い還元電位のため、容易に一電子還元を受けアニオンラジカルが生成することはよく知られているが(Fig. 1), そのメカノケミカル固相反応については未開拓の分野である。また、金属製ミル中での粉碎による固相ビニルモノマーのメカノケミカル重合反応における重合開始時の活性種は、活性金属表面からのビニルモノマーへの固相一電子移動によって生成するアニオンラジカルである事実(Fig. 1)¹⁸⁾ からも、HAQ誘導体含有生薬及びHAQ自身のメカノケミカル反応は興味ある問題点を含んでいる。

かかる背景から、本報告においては、メカノケミカル反応の研究の一環として、HAQ誘導体含有生薬及び構造関連HAQ誘導体のメカノケミカル固相反応を種々の条件下での粉碎によって検討した。

実験の部

試料及び材料 センナ, ケツメイシ, ダイオウ, アロエは市販粉末を五酸化リン上で減圧乾燥し、恒量となったものを用いた。アントラキノン(AQ)(ナカライテスク), 1,8-dihydroxyanthraquinone(1,8-DHAQ)(半井化学), シュウ酸カルシウム一水和物(ナカライテスク), メチルビオローゲン(東京化成)は市販品をそのまま使用し, 1,4-DHAQ(ナカライテスク)は、再結晶(エタノール)により, 1-HAQ, 1,5-DHAQ(東京化成)は昇華(160°C以下)により精製した。

実験操作 粉碎操作は遮光下、試料(総量100mg)をステンレス製金属容器(金属ミル)に入れ、パイプレーティング・ボールミル(島津製作所)により所定時間行った。ESRスペクトルは電子スピン共鳴装置(JES-RE1X, 日本電子)を用いて測定した(磁場変調100kHz, 共振周波数9.220±0.005GHz, 変調幅0.1mT, マイクロ波出力2—10mW)。ラジカル量の算出はスペクトルをデジタル化(Graphtec KD 4030)し、その2回積分(マイクロコンピュータ(NEC PC-9801RA))により求めた。

結果及び考察

1. 市販HAQ含有粉末生薬のESRスペクトル

HAQ誘導体含有粉末生薬(センナ, ケツメイシ, ダイオウ, アロエ)のESRスペクトルをFig. 2に示した。いずれのスペクトルも0.4—0.7mTのピーク・ピーク幅(ΔH_{msl})をもち、1g当り 10^{17} — 10^{18} のスピン数を含む一重線のスペクトルを示した。4種の粉末のスピン濃度/gはアロエ粉末が最も多く、ケツメイシ粉末が最も少ないことが分かる。また、これらのラジカルは、種々の溶媒(水, メタノール)中や加熱下(100°C, 10h)で

Fig. 2. ESR Spectra of Stable Free Radicals Observed in Commercial Powdered Samples

も極めて安定であることが認められた。

さらに、センナについて水溶性、不溶性成分を分離し（ソックスレー抽出約 10 h），それぞれの乾燥粉末の ESR スペクトルを測定した。Fig. 3 に示すようにセンナ中の ESR スペクトルは水溶性、不溶性成分のほぼ等量のスペクトルより構成されていることが分かる。また、両スペクトルの比較により、不溶性成分のスペクトルは、水溶性成分のスペクトルに比べ、ピーク幅が広くかつわずかな g -異方性 ($g_1=2.0014$, $g_2=2.0058$, $g_3=2.0069$) をもつことが分かる。しかしながら、等方性 g 値 (g_{iso}) は共に 2.0040—2.0050 付近（水溶性成分; $g_{iso}=2.0041$: 不溶性成分; $g_{iso}=2.0047$ ）であることより、両者とも類似の構造をもち、かつ、完全な炭素中心ラジカルでないことを示唆している。

一方、本生薬粉末をボールミルによって 5 分間粉砕すると Table I に示すように、いずれの粉末生薬においても、ラジカル量が増加することが認められた。この事実は、粉砕操作によってメカノラジカルが生成したことを示している。しかしながら、増加したラジカル量はいずれも室温放置によりほぼ初期のラジカル量まで徐々に減衰し（例えば、センナの場合で約 1 か月）、再び定常化した。また、粉砕前後における ESR スペクトルパターンには、差異が認められないことより、市販生薬粉末中に観測されたラジカルもその粉末化の粉砕操作により発生していたメカノラジカルと考えられ、その一部が安定化し、長期間にわたって存在しているものと推測される。

一般に、植物中には種々の金属塩が含まれていることが知られている。事実、元素分析の結果、本生薬中には、それぞれ Table I に示すような含有率で灰分が存在している。これら灰分の含有率と新たに粉砕操作によって生

Fig. 3. ESR Spectra of Water-Soluble and Water-Insoluble Components of Sennae Folium

—, ESR spectrum of commercial sample; ----, water-soluble component (ΔH_{msl} 0.41 mT); - · - · -, water-insoluble component (ΔH_{msl} 0.65 mT).

TABLE I. Spin Concentration of Commercial and Mechanically Fractured Samples, and the Ash Content

	Spin concentration of commercial powder S_0/g	Spin concentration of fractured powder S_t/g	S_t/S_0	Ash content (%)
Sennae Folium	0.33×10^{17}	2.00×10^{17}	6.06	7.00
Cassiae Semen	0.22×10^{17}	1.63×10^{17}	7.41	5.50
Rhei Rhizoma	2.10×10^{17}	9.00×10^{17}	4.28	3.30
Aloe	10.00×10^{17}	12.00×10^{17}	1.20	0.46

成するメカノラジカルの増加率との関係を見てみると、Fig. 4 に示されるように、両者には明らかな相関性が認められた。室温でのメカノラジカル生成と安定性は種々の因子によって支配されることが考えられるが、上記の結果は、少なくとも灰分（金属塩類）の存在が本メカノラジカル生成に大きく関与していることを強く示唆している。

2. HAQ 誘導体のメカノラジカル生成とその金属塩効果について

植物中に存在する金属塩の中で、本生薬中にはシュウ酸カルシウムが多く集積されていることが知られている。²⁵⁾ そこで、Table I に示す生薬粉末中のメカノラジカルの生成及び安定性に対する金属塩効果を検討するために、シュウ酸カルシウムの存在下、センナ、ケツメイシ、ダイオウ、アロエに共通成分の基本 HAQ である 1,8-DHAQ をはじめ、数種の HAQ 誘導体との混合粉碎を行った。

Fig. 5 に種々の HAQ 誘導体とシュウ酸カルシウム (1:1, w/w) の混合粉碎 (15 分間) により生成したメカノラジカルの ESR スペクトルを HAQ 誘導体の単独粉碎によるものと比較して示した。Fig. 5 から明らかなように、シュウ酸カルシウム不在下の粉碎におけるメカノラジカル生成は極微量であるが、混合粉碎においては、AQ を除いて、有効に HAQ メカノラジカルが生成していることが分かる。本ラジカルの ESR スペクトルは、いずれもわずかながら超微細構造と g -異方性を示し、本質的に互いに類似した特性をもち、かつ、粉末生薬中のラジカルとも類似の等方性 g 値 ($g=2.0040-2.0045$) を示した。しかしながら、スペクトルパターンは明らかに異なっており、かつ、本ラジカルは室温下経時的に減衰し (40—50 時間で消失)、特に高温、高湿雰囲気下では極めて不安定であることが示された。

一方、Fig. 6 には、シュウ酸カルシウムと 1,8-DHAQ との混合粉碎 (30 分間) により生成するラジカル量

Fig. 4. Relationship between S_1/S_0 and Ash Content

●, Sennae Folium; ○, Cassiae Semen; ○, Rhei Rhizoma; ●, Aloe.

Fig. 5. ESR Spectra of Mechanoradicals Produced in Anthraquinone Derivatives by Vibratory Milling for 15 min

(a) Mechanical fracture of HAQ, (b) mechanical fracture of HAQ and calcium oxalate (1:1).

(1,8-DHAQ の g 単位当りのスピンの数) とその混合比の関係を示した。Fig. 6 は明らかに、シュウ酸カルシウムの混合率の増加に伴い、生成ラジカル量が指数関数的に増加することを示している。この事実、Fig. 4 に示された生薬中の灰分の含有率とラジカル量の増加率の関係とも一致しており、金属塩類が本メカノラジカル生成に関与しているとの考えを支持した。

また、生成ラジカル量は粉碎時間とともに増加するが、いずれも一定量で定常化する傾向が認められた。ESR スペクトルの強度比の比較より、1,5-DHAQ は 1,4-DHAQ や 1,8-DHAQ に比べて、より多くのラジカルが生成することが認められるなど (初期生成速度は 1,5-DHAQ が $k \approx 3.3 \times 10^{16}$, 1,4-DHAQ が $k \approx 1.2 \times 10^{16}$, 1,8-DHAQ が $k \approx 0.3 \times 10^{16}$ spin/g·min), 本メカノラジカル生成におけるヒドロキシ置換基効果が示され、Fig. 5

に示したように非置換体のアントラキノンや 2-ヒドロキシ体の粉碎においてはラジカル生成がほとんど認められないことより、とくに、1 位のヒドロキシ置換基がメカノラジカル生成に大きく関与していることが示された。

さらに、その他の金属塩との混合粉碎によるメカノラジカル生成を検討したところ、1 価の金属塩 (KCl, NaCl) との混合粉碎ではラジカル生成は認められなかったのに対し、2 価、3 価の金属塩・金属酸化物 (CaO, Ca(OH)₂, MgCl₂, ZnO, Fe₂O₃, Al₂O₃ etc.) との混合粉碎では、生成効率は異なるものの、メカノラジカル生成の有効性が認められた。

このように、本メカノラジカル生成は 1-ヒドロキシ HAQ 誘導体に固有の特性であり、かつその生成と安定化には 2 価以上の金属塩・金属酸化物との混合粉碎が極めて有効であることが明らかになった。

3. HAQ メカノラジカル構造とその生成機構

各種の HAQ 誘導体は非金属性ミル (テフロン) 中での同様の混合粉碎によってはメカノラジカルを生成しなかった事実や、¹⁸⁾ 金属製ミルを用いる固相ビニルモノマーのメカノケミカル重合反応において、活性金属表面からのビニルモノマーへの固相一電子移動が進行する事実¹⁸⁾ などから、HAQ 誘導体とシュウ酸カルシウムの金属ミル中での混合粉碎によって生成するメカノラジカルは、活性金属表面から HAQ への一電子移動がシュウ酸カルシウムの存在によって促進され、有効に対応するセミキノンアニオンラジカルを生成したのち、金属塩といわゆるメタルコンプレックスを形成して、安定化したものと考えられる。さらに、生薬メカノラジカルの一部は植物組織中に存在する水溶性、不溶性繊維を含む高分子マトリックス中にトラップされ、長期間にわたり存在可能になったものと考えられる。したがって、経時的な減少を示す生薬メカノラジカルや HAQ メカノラジカルは、そのような安定化を受けなかった結果と理解される。

さらに、このような固相一電子移動が金属製ミル中での粉碎によって進行する事実は、還元電位が極めて低く、容易に一電子還元を受けることが知られているメチルビオローゲンを用いた粉碎試験によっても確認された。すなわち、Fig. 7 に示したように窒素雰囲気下でのメチルビオローゲン単独の粉碎によっても明らかにメカノラジカル生成は認められるが、シュウ酸カルシウムとの混合粉碎 (1:1, w/w) によっては同様のメカノラジカル生成が極めて有効に進行する (生成速度 $ca. 10$ 倍) ことが ESR スペクトルの測定によって示された (等方性一重線, $\Delta H_{msl} = 0.7-0.8$ mT, $g = 2.0041$)。同時に、粉碎試料は無色から青紫色への色変を示すことより、生成メカノラジカルは明らかにメチルビオローゲンのモノカチオンラジカルに帰属され、固相一電子移動が進行することが確認された。

一方、本メカノラジカル生成が 1-ヒドロキシ HAQ 誘導体に特有である事実は、AQ 誘導体のうち、1-ヒドロキシ置換基はその還元電位を大きく下げる (電子親和力を上げる) ことが知られていることから理解される。

Fig. 6. Spin Concentration of Mechanoradical of 1,8-DHAQ with Various Calcium Oxalate Content

Fig. 7. Progressive Changes in Mechanoradical Formation in Methylviologen (MV) in the Course of Vibratory Milling

○, MV; ●, MV-calcium oxalate.

したがって、類似の部分構造をもつ、アセチルアセトンカルシウム塩の粉碎や、クエルセチン（フラボノール誘導体）とシュウ酸カルシウムとの混合粉碎によってはラジカルの生成は認められなかった。

結 論

各種の基本 HAQ 誘導体の粉碎によるメカノラジカル生成特性に関する知見から粉末生薬中に観測されるメカノラジカルはセミキノンアニオンラジカルのメタルコンプレックスと考えられ、その一部が植物組織中に存在する水溶性、不溶性繊維を含めて、高分子マトリックスにトラップもしくは複合体を形成し、長期間にわたり存在可能になったものと考えられる。したがって、経時的な減少を示す生薬メカノラジカルや HAQ メカノラジカルは、そのような安定化を受けることなく、徐々に放電による HAQ の再生あるいはハイドロキノン（アニオン）型まで還元が進行し、ラジカル性を失う結果と考えられる。このように、総量的比率は多量ではないものの、HAQ 誘導体を含有する粉末生薬中のメカノラジカルの存在が初めて明らかにされた。

ところで、現在、粉末医薬品の分包には自動分包機が広く用いられている。ダイオウ、センナのような HAQ 誘導体含有粉末生薬は、金属製自動分包機の使用時に、大きな付着性を示し問題となっている。²⁰⁾ そのような特異的性状の一因として、本報告で示したような粉碎時に生成した固相セミキノンアニオンラジカルの混在による金属表面との強い静電的相互作用に起因している可能性も示唆される。また、このようなラジカル種の生体への影響も含め、生理活性等是不明であるが、それらは、今後明らかにされるべき問題であろうと思われる。

引 用 文 献

- 1) 葛谷昌之, 表面, **27**, 885 (1989).
- 2) 葛谷昌之, 野口章公, 伊藤英樹, 石川正直, *DDS*, **6**, 119 (1991).
- 3) 葛谷昌之, 伊藤英樹, 野田菜穂子, 山川一郎, 渡辺純男, *DDS*, in press.
- 4) M. Kuzuya, A. Koide, A. Ito, A. Noguchi, *Chem. Lett.*, **1989**, 555.
- 5) M. Kuzuya, A. Noguchi, H. Ito, S. Kondo, N. Noda, *J. Polym. Sci., Polym. Chem.*, **29**, 1 (1991).
- 6) M. Kuzuya, A. Noguchi, M. Ishikawa, A. Koide, K. Sawada, A. Ito, N. Noda, *J. Phys. Chem.*,

- 95, 2398 (1991).
- 7) M. Kuzuya, M. Ishikawa, A. Noguchi, K. Sawada, S. Kondo, *J. Polym. Sci., Polym. Chem.*, in press.
 - 8) M. Kuzuya, M. Ishikawa, A. Noguchi, H. Ito, K. Kamiya, T. Kawaguchi, *J. Mater. Chem.*, **1**, 387 (1991).
 - 9) M. Kuzuya, "Trend in Physical Chemistry," Council of Science Research Integration, India, in press.
 - 10) M. Kuzuya, H. Ito, S. Kondo, N. Noda, A. Noguchi, *Macromolecules*, in press.
 - 11) J. Sohma, M. Sakaguchi, *Adv. Polym. Sci.*, **20**, 109 (1976), and references cited therein.
 - 12) 仲井由宣, 薬誌, **105**, 801 (1985).
 - 13) 横井秀輔, 柏木 寛, 榎本三郎, 高橋 浩, 薬誌, **99**, 914 (1979).
 - 14) H. Kashiwagi, H. Yokoi, S. Enomoto, *Chem. Lett.*, **1979**, 815.
 - 15) H. Kashiwagi, S. Enomoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 17 (1982).
 - 16) M. Kuzuya, S. Kondo, A. Noguchi, N. Noda, *J. Polym. Sci., Polym. Chem.*, **29**, 489 (1991).
 - 17) M. Kuzuya, S. Kondo, A. Noguchi, N. Noda, *J. Polym. Sci., Polym. Phys.*, (in press).
 - 18) M. Kuzuya, S. Kondo, A. Noguchi, *Macromolecules*, **24**, 4047 (1991).
 - 19) M. Kuzuya, S. Kondo, *Chem. Pharm. Bull.*, in press.
 - 20) R. H. Thomson, "Naturally Occurring Quinones," 2nd ed., Academic Press, Inc., London and New York, 1971.
 - 21) K. Kawai, Y. Nozawa, Y. Maebayashi, M. Yamazaki, T. Hamasaki, *Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol.*, **18**, 35 (1984).
 - 22) K. Kawai, Y. Nozawa, Y. Maebayashi, M. Yamazaki, T. Hamasaki, *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 481 (1984).
 - 23) K. Kawai, T. Kato, H. Mori, J. Kitamura, Y. Nozawa, *Toxicol. Lett.*, **20**, 155 (1984).
 - 24) M. Kuzuya, A. Noguchi, K. Kawai, Y. Mori, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **13**, 185 (1991).
 - 25) 長沢元夫, 野呂征男, 萩原幸夫, 木村孟淳 編集, "新訂生薬学," 南江堂, 東京, 1984.
 - 26) 山崎 太博士 (高山赤十字病院薬剤部長), 私信.