最後に本研究に当たり終始御鞭撻を賜わった、所長 於勢真輔博士ならびに本実験の一部を担当した中田 実氏、元素分析の労をとられた元素分析室の諸氏に感謝します。

大日本製薬株式会社中央研究所

〔薬 学 雑 誌〕
YAKUGAKU ZASSHI
85 (7) 570 ~ 578 (1965)

UDC 615.78[582.677]-092.259

88. 木村正康, 吉崎正雄, 室 郁子, 志甫伝逸: 和漢薬作用に関する薬学的基礎研究
(第1報) 漢薬辛夷抽出分画の薬理効果とその薬理活性による
同類生薬との比較について

Masayasu Kimura, Masao Yoshizaki, Ikuko Muro, and Den-itsu Shiho:
Fundamental Research for the Pharmacological Activity of Oriental
Drugs. I. On the Pharmacological Effect in Every Fractional
Extract of Chinese "Shin-i" and by Their Activity on the
Comparison with the Family Kinds.

(Research Institute of Oriental Drug, University of Toyama^{*1})

Pharmacological activity of various fractions of the aqueous extract of a Chinese drug, "Shin-i" was examined by the Magnus method, with that of "Shin-i" on the rectus abdominis of a frog as the index, comparing drugs prepared in Japan and in China. In general, there was no pharmacological difference between these two kinds of preparations in any of the fractions. The only crystalline component obtained from the phenolic base of both products was an alkaloid of m.p. 208°, with empirical formula of $C_{17}H_{18}O_3N$, which was found to have a curare-like action by experiment with nerve muscle preparation. Aqueous extract, corresponding to the decoction in Oriental medicine, showed a marked acetylcholine-like action and it was proved by comparative examination of various methods of extraction that the predominant active component in this fraction cannot be obtained by the usual method of alkaloid extraction in order to find the cause of such action. It was also revealed that the pharmacological activity of the aqueous extract was the cumulative result of additive and cancellative action of each fraction.

(Received December 26, 1964)

和漢薬研究における薬理学的有効成分の探索研究は非常に多いが、成分の化学的検討が優先して薬理学的試験が追従してゆく方式がとられてきた。薬理学的活性を標的にして天然物成分の探索という研究方法論は必ずしも積極的に試行されていなかったと推測できる。著者等はこのような立場から再検討の重要性を痛感し、和漢薬の生薬単味成分に限定せず、漢方薬複合剤をも積極的に研究対象にし和漢薬作用の本質を究明する目的で一連の研究課題として着手した。

まず、研究課題の最初に選んだ漢薬辛夷¹⁾は日本薬局方には現在収載されていないが、中国では川芎と配合して常用される生薬であり著者等の一人吉崎等²⁾がすでに生薬学的検討を加えていて、形態学的立場から中国産辛夷 *Magnolia fargesii* CHENG は日本産の同類植物のいずれにも一致しないことを明らかにしている。同時に日本産辛夷はすべて、タムシバ *Magnolia salicifolia* MAXIM. に一致していることを見いだしているの、中国産辛夷と日本産辛夷との薬理学的相違を検討した。

辛夷は現代、中国および日本において漢方の鎮静・鎮痛薬として、ことに鼻炎および蓄膿症に辛夷湯として賞

*1 Gofuku-3190, Toyama.

1) 秦: 漢方研究, 198 (1963).

2) 木村, 秦, 吉崎: 生薬, 15, 50 (1961).

用されているが, 一方同属植物のコブシ *Magnolia kobus* DC. の樹皮中の有効成分 *magnoliacurare* にクラーレ様作用があることが明らかにされているので,³⁾ 骨格筋の神経筋接合部作用を中心に探索した。

他方, 本研究では, 抽出方法は漢方薬がおもに煎剤として繁用されている点を重視し, 温湯抽出を優先にし, 必ずしも従来の有機性物質を対象にした抽出方法に拘泥せずに薬理活性を指標にした系統分画法を採用したので, この点従来の抽出方法と比較検討し, より合目的であることを実証せんとしたのが本実験の第2の目的である。

実験の部

薬理活性検定法 成長トノサマ蛙の腹直筋を用いて Magnus 法に準じて, 各分画の効果を測定した。非可溶性分画は約 $\frac{1}{4}$ の CMC 補助剤を使用した。腹直筋収縮用に使用された薬物は *acetylcholine* (以下 ACh と略記する) で, 各分画の反応前後に ACh の同一用量を反応させて, 作用の可逆性・非可逆性を検討した。各分画の作用点の確認実験には縫匠筋坐骨神経標本を用いて, 電気刺激装置で筋直接刺激と神経を経た間接刺激との効果の差で判定した。

Chart 1. A and B Procedures

Chart 2. C procedure

3) 佐々木: 医学中央雑誌, 21, 343 (1922).

生薬分画抽出法 本実験に用いた材料は大阪市場より 1962 年に購入したつぎの 2 種である。

日本産辛夷市販品 (*Magnolia salicifolia* MAXIM.)

中国産辛夷輸入品 (*Magnolia fargesii* CHENG)

分画抽出は A. 水浸エキスを対象とした方法, B. おもに含有アルカロイドを分離目的とした方法, C. 両方法の差を検討するため両者を組み合わせた方法, 以上 3 抽出法を試みた。これらの抽出過程および略号は Chart 1, 2 に示す。つぎに抽出法 A にしたがって, 両国産辛夷の各分画抽出率を比較した結果を Table I に, 抽出法 C にしたがった場合の日本産辛夷の各分画抽出率を Table II に示す。

TABLE I. Volume of Fraction of *Magnolia salicifolia* MAXIM. (MS) and *Magnolia fargesii* CHENG (MF) extracted by A Procedure

	MS (%)	MF (%)
W ₁	10.7	12.8
A ₅	0.09	0.08
A ₁₁	0.02	0.05
A ₁₃	0.01	0.02
E ₉	0.06	0.04

TABLE II. Volume of Fraction of *Magnolia salicifolia* MAXIM. (MS) extracted by C Procedure

	MS (%)
W ₁	27.3
M ₃	16.6
M ₄	10.7
A ₅	0.28
A ₆	10.4

各分画の抽出結果は以下のとおりである。

i) 水浸エキス: 各材料 1 kg. を細割し, 10 倍量の蒸留水を加えて 5 hr. 水浴上で加熱温浸して汙別する。残渣は同操作をくりかえし, 汙液を合わせて減圧濃縮し日本産辛夷からエキス W₁ 107 g., 中国産辛夷から 123 g. を得た。以下 2 種ともに同操作が施された。

ii) MeOH エキス: 日本産材料 1 kg. を細割し, MeOH で 3 回温浸し汙別して, MeOH エキスを。以下水浸エキスと同様に処理して各分画を得る。

iii) 塩基性部の抽出: エキスを 2% 酒石酸酸性溶液にして抽出し, 減圧濃縮して約 1.5 L. の黒褐色溶液を得る。

iv) 酸中性部分離: iii) で得られた酒石酸酸性溶液をエーテルで抽出し, 無水 Na₂SO₄ で脱水後, 溶媒を留去してやや酸味のある黄褐色粘稠エキスを。得る。

v) 塩基性部の分離: iv) で酸・中性物質を除いた酒石酸水溶液をアンモニア水で塩基性 pH 10 とし, エーテルで抽出する。このエーテル抽出液を 2% NaOH 液で抽出し, 10% HCl 液で酸性 pH 2 としふたたびアンモニア水で塩基性にしてエーテルで抽出する。このエーテル部を脱水後溶媒を留去し黄褐色エキス A₁₁' を得る。2% NaOH 液で抽出したのちのエーテル溶液は 2% HCl 液で抽出後, アンモニア水で塩基性としふたたびエーテルで抽出し, 脱水後溶媒留去して黄褐色エキス A₁₃ を得る。

vi) 水溶性塩基部の分離: v) でエーテルに移行しない塩基性物質を含むアンモニア塩基性水溶液は酢酸酸性 pH 4 とし, アンモニウムライネッケ塩の飽和水溶液を加え, 生ずる沈殿を汙別して約 10 g. の日本産の場合は淡桃色粉末, 中国産の場合は桃色粉末を得る。本品を無水アセトン約 500 ml. で処理し, 約 1/10 に濃縮してのち, Ag₂SO₄ 飽和水溶液を加えてライネッケ塩を分離する。この沈殿の汙別した溶液に 2% BaCl₂ 水溶液を適量加えて生ずる BaSO₄ の沈殿を汙別し, 溶液を減圧濃縮して黄褐色エキスを。得る。これをアルコールで抽出し, 溶媒留去して無機物質を除き, 黄褐色エキス E₉ を得る。本エキスは吸湿性でマイヤー反応陽性である。これを 20 倍量の水で処理し水溶液を酢酸酸性 pH 4 とし, ふたたびアンモニウムライネッケ塩の飽和水溶液で塩基性物質を分離し, 汙別して得られた桃色沈殿を乾燥し桃色粉末約 7 g. を得た。本品を無水アセトンで前記同様に操作し, EtOH で抽出して淡黄色のエキス E₁₃ を得る。

vii) フェノール性塩基部の精製: v) で得た A₁₁' エキスは少量の EtOH に溶かし, 10% HCl 1~2 滴を加え, 器壁を十分にこすると白濁して沈殿を生ずる。これを汙別し EtOH で再結晶し, m.p. 245~247° 淡黄色, 小柱状晶の塩酸塩 A₁₁ を得る。本品は過クロル鉄反応で黄緑色を示す。これを粉末にしアンモニア水に浮遊させエーテル抽出し, 無水 Na₂SO₄ で乾燥して, 溶媒を留去し無色小針晶を得る。本品は遊離塩基にして m.p. 208°, 実験式 C₁₇H₁₉O₃N Anal. Calcd.: C, 71.57; H, 6.66; N, 4.91. Found: C, 71.31; H, 6.67; N, 5.11. 分子量 290.5 (ラスト法), 理論分子量 285. UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ m μ : 287, $\lambda_{\min}^{\text{EtOH}}$ m μ : 254. 薄層クロマトグラフィー (メルク・アルミナ G), 溶媒: MeOH-28% NH₄OH (94:6), R_f=0.48 にドラージェンドルフ試薬で 1 斑点が顕色。

実験結果

I. 抽出法 A による辛夷の各分画の蛙腹直筋に対する薬理活性にもとづく日中両国産の比較 水浸エキス W₁ では中国産と日本産とともに, d-tubocurarine に抑制される筋収縮作用を示すが, 中国産の方が比較的強い。また濃度が薄くなると, ACh に対する抑制作用も現われてくる。(Fig. 1 参照。MF は中国産, MS は日本産の略号である。)

酸性不溶性分画の W_4 には抗 ACh 作用を認め得たが非常に弱い程度のものである。

酸・中性部分画のエキス A_{5s} および A_{5ph} は日本産でともに ACh の筋収縮作用を抑制するが, その作用は Ringer 液で洗浄後も回復時間が非常に長く, ことに A_{5s} の抑制作用は非可逆的である. (Fig. 2 参照. 10' 等の数字記号は洗浄後の同一 ACh 濃度による反応までの時間である).

Fig. 1.

Fig. 2.

Fig. 3

Fig. 4.

Fig. 5.

Fig. 6.

Fig. 1~6. The Kymographic Recording of Pharmacological Activity of Each Fraction extracted by A and B Procedures of *Magnolia salicifolia* MAXIM. (MS) and *Magnolia fargesii* CHENG (MF), tested on the Isolated Rectus Abdominis Muscle of Frog

In the figures, the concentration is g./ml. unit.

塩基性物質である結晶 A_{11} , およびエキス A_{13} は両国産とも同程度の抗 ACh 作用を示すが, 両国産ともにエキス A_{13} の方が強力である. しかもその ACh 抑制作用は可逆的である. (Fig. 3, 4 参照.)

水溶性塩基部分画のエキス E_9 では日本産の筋収縮作用が非常に弱いのに反して, 中国産では著しく強く, 作用回復も日本産より非常に遅い, 同時にエキス E_9 には抗 ACh 作用も共存しているが, この程度は両国産にはほとんど差がない. (Fig. 5 参照) 日本産のエキス E_9 から分画される残渣 W_{12} には抗 ACh 作用のみ現われるが, エキス W_{11} には抗 ACh 作用のほかに ACh 様作用を示すが, それ自体の濃度では筋収縮作用を示さないゆえ, 抗 cholinesterase 作用と考えられる. W_{11} から処理されて得られるエキス E_{13} には抗 ACh 作用のみ確認される. (Fig. 6 参照)

以上の結果を一括して表にすると Table III のようになる. Table III で矢印の数は効果程度を示し, 2 個がほぼ 50% 前後である.

TABLE III. Summary of Effect of the Fraction of Shin-i: *Magnolia salicifolia* MAXIM. (MS) and *Magnolia fargesii* CHENG (MF) on Muscle Contraction ($\uparrow$) or Acetylcholine Inhibition ($\downarrow$)

	1×10^{-3} g./ml.				1×10^{-4} g./ml.			
	M	S	M	F	M	S	M	F
W_1	$\uparrow\uparrow$	rev.	$\uparrow\uparrow\uparrow$	rev.				
W_4	$\downarrow$	rev.						
A_{5S}	$\downarrow\downarrow$	irr.			$\downarrow$	irr.		
A_{5ph}	$\downarrow\downarrow$	rev.			$\downarrow\downarrow$	rev.		
A_{11}	$\downarrow\downarrow$	rev.	$\downarrow\downarrow$	rev.				
A_{13}	$\downarrow\downarrow\downarrow$	rev.			$\downarrow\downarrow$	rev.	$\downarrow\downarrow\downarrow$	rev.
E_9	$\uparrow$	rev.	$\uparrow\uparrow$	rev.	$\downarrow\downarrow$	rev.	$\uparrow$ & $\downarrow\downarrow$	rev.
W_{12}	$\downarrow\downarrow$	rev.						
W_{11}					$\downarrow$ & $\uparrow$	rev.		
E_{13}					$\downarrow\downarrow$	rev.		

The number of arrow mark shows the potency of reversible (rev.) or irreversible (irr.) response.

II. A_{11} および E_{13} の神経筋接合部への作用

両国産の結晶 A_{11} および日本産の E_{13} が単一成分あるいはそれに近い状態で得られたので, これらの作用点を決定する目的で, 蛙の坐骨神経と縫匠筋とからなる神経筋標本によって検討した結果を Fig. 7 に示す. Fig. 7 は電気刺激で筋直接刺激と神経間接刺激とを交互に切りかえて得られる筋収縮反応を遮断する薬物の効果を記録したキモグラフである. 電気刺激は頻度 $\frac{1}{5}$ c.p.s. の矩形波で, 次最高強度を与えた. その結果, 両国産 A_{11} および E_{13} はそれぞれ間接刺激のみ遮断し, 作用点が神経筋接合部であることを証明した.

III. 抽出法 B による日本産辛夷の各分画の蛙腹直筋に対する薬理活性 メタノールエキス M_1 には弱い抗 ACh 作用を認め得たが, 筋収縮作用はまったく現われない. M_1 の酸性不溶性分画から得られるメタノールエキス M_5 は強い抗 ACh 作用のみ認め得るが, 筋収縮性は認められない. しかし, M_1 の酸性分画 W_3 には明らかに筋収縮性作用が認め得られ, 同時に

Fig. 7. The Comparison of the Responses induced by A_{11} Fraction of MS and MF, and E_{13} Fraction of MS tested on the Frog Nerve-muscle Preparation

Record of the semiisotonic contraction of the sartorius muscle to direct submaximal faradic stimulation ($\frac{1}{5}$ c.p.s.) and indirect by the sciatic nerve was observed alternately.

Fig. 11.

Fig. 8~11. The Responses induced by the each Fraction of MS extracted by B Procedure, tested on the Isolated Rectus Abdominis Muscle of Frog

In the figures the concentration is g./ml. unit.

TABLE IV. Summary of Effect of the Fraction of Shin-i on Muscle Contraction (↑) or ACh Inhibition (↓)

	MS					
	1×10^{-3} g./ml.		1×10^{-4} g./ml.		1×10^{-5} g./ml.	
M ₁	↓	rev.				
M ₅	↓↓↓	irr.	↓↓	irr.	↓↓	irr.
W ₃	↑ & ↓↓					
E' ₉	↑↑	irr.	↑	rev.		
A ₁₁	↓	rev.				
A ₁₃	↓↓↓		↓↓	rev.		

このほか、抽出法 B によっても、抽出法 A による分画 A₁₁, および A₁₃ と相当するものを得て、多少作用強度に差がみられるが、同性質の薬理活性を認め得ている。これらの結果を一括して Table IV に示す。

TABLE V. Summary of Effect of the Fraction of Shin-i. on Muscle Contraction (↑) or ACh Inhibition (↓)

	MS	
	1×10^{-3} g./ml.	5×10^{-4} g./ml.
W ₁	↑↑↑ rev.	
M ₃	↑↑↑ rev.	
M ₄	↓ rev.	
A ₅	↓ rev.	
A ₆	↓↓ rev.	
A' ₅		↓↓
A' ₆		↑↑

IV. 抽出法 C による日本産辛夷の各分画の薬理活性にもとづく抽出法 A と B との比較 水浸エキス W₁ の ACh 様作用を抽出法 A におけるものと同一であることを確かめ得て後、W₁ のメタノールエキス M₃ にも同様の ACh 様作用のみを見いだした。一方のメタノール不溶分画 M₄ には逆に抗 ACh 作用のみを確認し得る。さらに M₄ のエーテルエキス A₅ およびその不溶分画 A₆ とともに抗 ACh 作用のみを認め得たが、その効果は A₆ の方がかなり強い (Fig. 10 参照)。

他方分画 M₃ についても同様に検討した結果、そのエーテルエキス A'₅ には抗 ACh 作用を認め得たが、不溶分画 A'₆ は比較的強力な ACh 作用を示し、d-tubocurarine で確認し得た (Fig. 11 参照)。

これらの結果を一括して Table V に示す。

考察および結論

I. 両国産辛夷の薬理活性の比較 両国産の各対応分画の蛙腹直筋に対する薬理活性は概して中国産の方が作用程度が強く現われる傾向にあるが、質的にはほとんど類似していると結論できる。とくに著しい差は水溶性塩基分画のエクス E_9 の筋収縮性作用で、中国産の方がかなり強い。これは分画 エキスの色に差が認め得られるので、その作用成分の含有量が多いと考えられる。さらに E_9 に相当する抽出法 B における E_9' が日本産で、比較的強い筋収縮性を確認し得ていることから裏づけられる。しかし、 E_9' は作用回復が非常に遅いので、 E_9 とまったく同一視することはできず、これは抽出法の問題としてつぎに考察する。

II. 辛夷各分画の抽出法の検討 いかなる薬効を目的にするにせよ、和漢薬を煎剤として使用する場合は、その状態での薬効が問題にされなければならない。これに相当するのが抽出法 A での水浸エキス W_1 であるが、この分画 W_1 が示す筋収縮作用性はアルカロイドを目的とした抽出法 B での W_3 に現われ、分画 E_9' で一応見いだされる。これは抽出法 A での分画 E_9 に相当するが、いずれも水浸エキス W_1 の筋収縮性作用より決して強くない。このことは抽出法 B によっては水浸エキス W_1 の薬理活性を説明することが困難になることを示す。この水浸エキス W_1 の筋収縮性作用は抽出法 C に従えば、それよりも強力な作用を示す分画 M_3 、さらには A_6' を見だし得ているので W_1 の薬理活性をよく説明し得る可能性が得られる。

つぎに各抽出法の差を容易に比較検討ができるように Fig. 12 を得る。ここで、 W_1 の収縮作用は M_4 の抑制

Fig. 12. Comparison of Different Active Compounds contained by Different Procedure for Extraction

Fraction α is the most potent activity as inhibitor of acetylcholine, but is not always the important component of fraction W_1 in a aqueous extract.
* The sign $\in$ shows that the action of M_4 is masked by M_3 .

作用より M_3 の収縮作用がまさった結果と考えられる。これを記号 $\in$ で示す。すると M_1 の抑制作用は M_3 の収縮作用よりまさっている抑制作用をもつ分画 α に依存していることが推測できる。しかも、水浸エキス W_1 から得られる抑制作用の最強の M_4 より α は強力なはずである。本実験ではその分画 α として、分画 A_{13} を確認し得ているが、和漢薬の薬効的立場から W_1 を説明するには分画 α より分画 M_3 の方が共存作用分画として意義が深いものとする。

III. 辛夷の有効成分と共存成分による複合作用 水浸エキス W_1 の有力な骨格筋収縮作用の薬理活性因子は分画 A_6' に存在していると考えますが現段階では単一成分として得られていない。しかし、その作用効果が純粋な収縮作用性成分にのみ依存していないことは単一成分として得られた A_{11} に神経筋接合部を遮断する *d*-tubocurarine 様作用が証明されることから明らかである。以上のように辛夷のような一生薬にあっても共存成分のそれぞれの作用がたがいに相剰し、あるいは相殺し合って、個有の薬理活性を発揮しているものと結論できる。