

紫根の成分研究 (第2報)¹⁾軟紫根と硬紫根の脂溶性画分の含量, 成分, および抗菌性²⁾

京極 和旭, 寺山 博行, 館 安英, 鈴木 堯, 小松 曼蒼

大正製薬株式会社研究部³⁾Studies on the Constituents of "Shikon". II.¹⁾Comparison of Contents, Constituents, and Antibacterial Effect of
Fat soluble Fraction between "Nanshikon" and "Kōshikon"²⁾KAZUAKI KYŌGOKU, HIROYUKI TERAYAMA, YASUhide TACHI,
TAKASHI SUZUKI, MANKI KOMATSUResearch Laboratory, Taishō Pharmaceutical Co., Ltd.³⁾

(Received February 26, 1973)

The ether extracts [A] of "Nanshikon" (*Macrotomia euchroma* PAULS) and "Kōshikon" (*Lithospermum erythrorhizon* SIEB. et ZUCC.) were submitted on column chromatography to yield petroleum ether soluble fraction [B]. Frac. [B] was extracted with acetone [C], which was column chromatographed to elute shikonin derivatives. Each content of [A], [B], [C] in "Nanshikon" was twice than those of "Kōshikon". The total contents of shikonin derivatives in "Nanshikon" were three times higher than those of "Kōshikon". Frac. [B] was treated with NaOH and extracted with petroleum ether, in which paraffins and alcohols were found.

Each [A], [B], [C] and shikonin derivatives except for anhydroalkannin inhibited the growth of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, but not that of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Each [A], [B], [C] and some shikonin derivatives inhibited a little the growth of *Saccharomyces cerevisiae*.

第8改正日本薬局方によると, 紫根はムラサキ (*Lithospermum officinale* L. var. *erythrorhizon* MAXIM.) の根と規定されているが, 現在市場では軟紫根, 硬紫根の2種類の紫根が流通している. これらの原植物は明らかに異なるものであるが, 用途については全く同一であるため, 著者らは軟紫根, 硬紫根の類似点および相異点を明らかにする目的でこれらの研究を行なった.

和紫根 (*Lithospermum officinale* L. var. *erythrorhizon* MAXIM.) からは shikonin⁴⁾ [Ia], acetylshikonin⁴⁾ [Ib] が単離され, また粗脂肪⁵⁾ が検出されている. 硬紫根 (*Lithospermum erythrorhizon* SIEB. et ZUCC.) から $\beta\beta$ -dimethylacrylshikonin^{6a)} [Ic], isobutylshikonin^{6a)} [Id], β -hydroxyisovalerylshikonin^{6b)} [Ie], deoxyshikonin¹⁾ [II] が単離され, isovalerylshikonin¹⁾ [Ig] と α -methyl-*n*-butylshikonin¹⁾ [Ih] とが混合物として得られ, また軟紫根 (*Macrotomia euchroma* PAULS)⁷⁾ から teracrylshikonin^{6b)} [If], II¹⁾, anhydroalkannin¹⁾ [III] が単離され, その構造が明らかにされているが, 軟紫根と硬紫根の中に含まれる shikonin 誘導体の量的比較

1) 京極和旭, 寺山博行, 館安英, 鈴木堯, 小松曼蒼, 生薬, 27, 24 (1973).

2) 日本生薬学会長崎大会 (1972 年 11 月) 発表.

3) Location: 3-34-1, Takada, Toshima-ku, Tokyo.

4) T. Majima, C. Kuroda, *Acta Phytochem.*, 1, 43 (1922).

5) 三浦三郎, 生薬, 17, 45 (1963).

6) a) ; I. Morimoto, T. Kishi, S. Ikegami, Y. Hirata, *Tetrahedron Letters*, 1965, 4737. b) ; I. Morimoto, Y. Hirata, *ibid.*, 1966, 3677.7) 中薬誌では *Lithospermum euchroma* ROYLE としても記載されている.

の報告⁸⁾は少ない。

一方、紫根のアセトンエキス⁹⁾, shikonin¹⁰⁾, あるいは軟紫根より単離¹¹⁾された shikonin および [Ib], [Ic], [Ie], [If] の抗菌力検定より, 抗菌力は, 供試検体すべてにみられている。

これら脂溶性成分に関し, さらに精査する目的で, 本報では軟, 硬紫根のエーテルエキスの石油エーテル可溶部について, 細分画を加え, 組成と成分を比較するとともに, 得られた画分と単離した shikonin 誘導体の抗菌力試験を行なった。

結果および考察

1. 画分 [A], [B], [C], [D] の重量比較

軟, 硬両紫根とも Chart 1. のごとく, エーテルエキスを比較的吸着力の弱いセルローズ末を担体とするカ

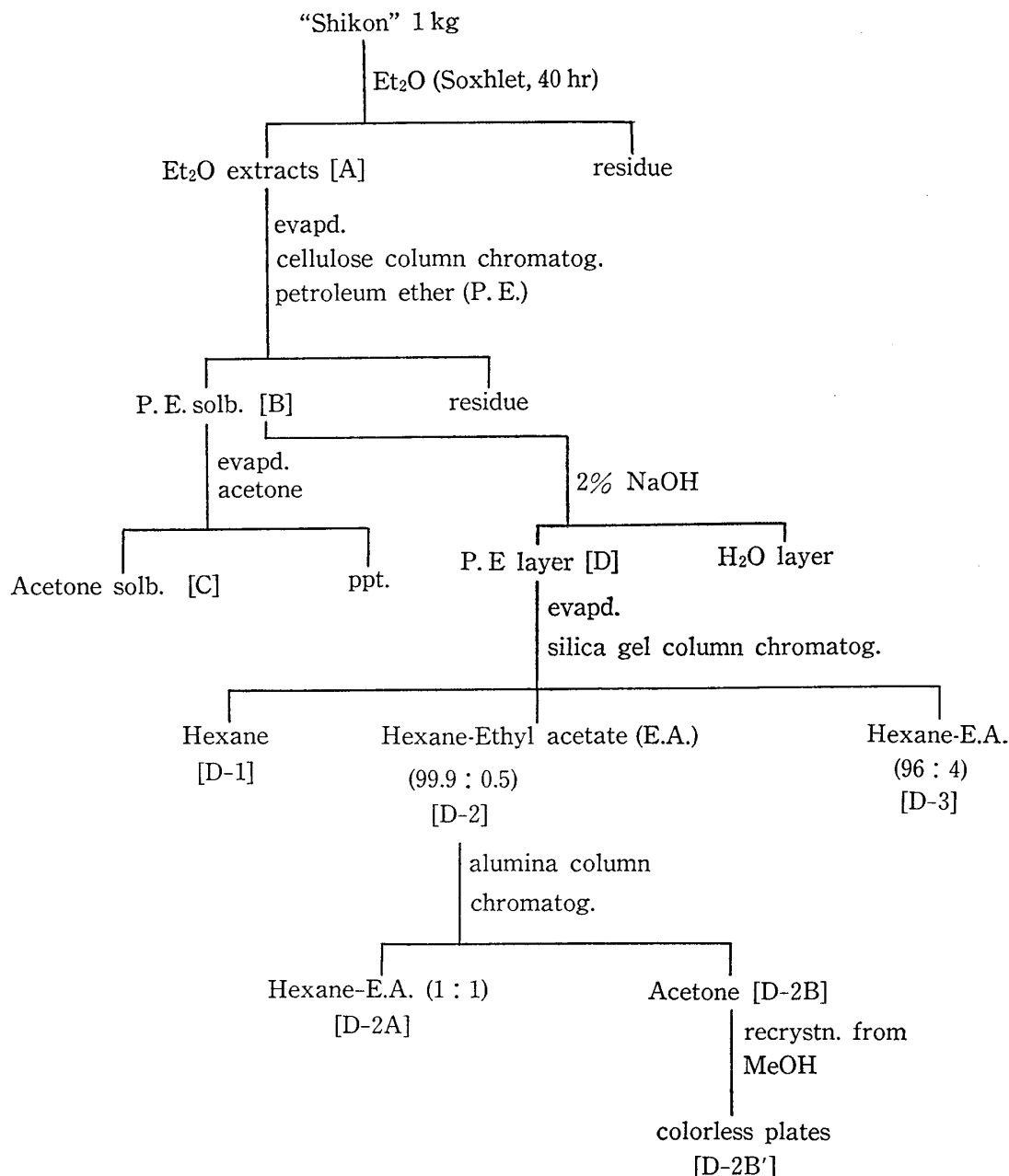


Chart 1. Fractionation

8) 田中康雄, 小谷功, 金谷友成, 日本薬学会第 91 年会 (福岡 1971 年 4 月) 講演要旨集, p. 716.

9) 岡崎寛蔵, 加藤宏, 若田部武男, 薬誌, 71, 101 (1951).

10) 稲垣勲, 山崎 (神田) 光恵, 高橋 (勝見) 章子, 大江和子, 柴田 (松村) 聡子, 高田ソノ, 名古屋市立大学研究年報, 15, 27 (1967).

11) 田中康雄, 小谷功, 薬誌, 92, 525 (1972).

ラムクロマトグラフィーに通導し、石油エーテルで溶出する画分を集め、石油エーテル可溶部 [B] を得た。画分 [B] の一部は石油エーテルを留去後、アセトンを加え、アセトン不溶のワックス成分を除き、shikonin 誘導体を主成分とするアセトン可溶部 [C] とした。一方、画分 [B] の一部は石油エーテル含有のまま、苛性ソーダ溶液を加えて shikonin 誘導体をアルカリ層に移行し、画分 [D] を得た。画分 [A], [B], [C] および [D] の紫根に対する重量比 (TABLE I.) を求めたところ、軟紫根は硬紫根に比し、画分 [A], [B], [C] は 2 倍、画分 [D] は 5 倍以上の含有量を示した。

TABLE I. Yield (w/w %) of each Fraction of Chart 1. for "Shikon"

	for "Nanshikon"	for "Kōshikon"
Fr. [A]	8.88	4.95
Fr. [B]	5.97	3.41
Fr. [C]	3.25	1.55
Fr. [D]	2.12	0.38

2. 画分 [C] 中の shikonin 誘導体の重量比較

画分 [C] をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画し、軟紫根から II, III, Ic, Ib, If, Ia, Ie を、また硬紫根から II, Ib, Ia, Ie および Ig, Ih, Id, Ic 4 成分の混合物を得、おのおの紫根に対する重量%を TABLE II. に示した。

これによると、II, Ic, Ia, Ie¹²⁾ および Ib は両紫根とも含有しているが、Id, Ig および Ih は軟紫根には含まれておらず、また If は硬紫根には含まれていなかった。III は硬紫根では未検討である。また、主成分は軟紫根では Ic であるが硬紫根では Ib, および Ic, Id, Ig, Ih 4 成分の混合物であり、TABLE II. の shikonin 誘導体の合計重量は、軟紫根の方が硬紫根の 3 倍にも達している。以上の様に、両紫根の shikonin 誘導体の組成と含有量には大きな差がみられた。

TABLE II. Yield (w/w %) of Shikonin Derivatives for "Shikon"

Compounds	for "Nanshikon"	for "Kōshikon"
deoxyshikonin [II]	0.066	0.016
anhydroalkannin [III]	0.002	(?)
isovalerylshikonin [Ig]	(-)	(+)
α -methyl- <i>n</i> -butylshikonin [Ih]	(-)	(+)
isobutylshikonin [Id]	(-)	(+)
$\beta\beta$ -dimethylacrylshikonin [Ic]	1.89	(+)
acetylshikonin [Ib]	0.72	0.403
teracrylshikonin [If]	0.26	(-)
shikonin [Ia]	0.154	0.096
β -hydroxyisovalerylshikonin [Ie]	(+)	0.053
Total	3.092	1.049

3. 画分 [D] の細分画物の比較

画分 [D] は石油エーテル留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画し、展開溶媒に応じての溶出物質の紫根に対する重量比を求め、TABLE III. に示した。

次に TABLE III. のうち、画分 [D-1], [D-2], [D-3] の成分を若干検討した。画分 [D-1] は両紫根とも、赤外線吸収スペクトル (IR), 核磁気共鳴スペクトル (NMR) からパラフィン類と思われる。画分 [D-2] は Chart 1 のごとくさらに細分画した。軟紫根の [D-2B] は IR, ガスクロマトグラフィー (GLC) (Fig. 1.), 質量分析 (MS)

12) 田中ら¹¹⁾ は軟紫根より分離しているが、著者らは軟紫根のエーテルエキス [A] の TLC¹⁾ で、スポットとして認めたので TABLE II. では (+) とした。

TABLE III. Column Chromatography of Fr. [D] on Silica Gel

Eluent*	“Nanshikon” (w/w %)		“Kōshikon” (w/w %)	
	Eluted Weight	Yield for “Shikon”	Eluted Weight	Yield for “Shikon”
100 ^{a)}	2.4	0.050	5.9	0.033
99.5—0.5 ^{b)}	62.4	1.323	17.2	0.066
99—1	0.6	0.012	12.2	0.047
98—2	3.1	0.066	39.6	0.152
96—4 ^{c)}	15.4	0.327	4.7	0.018
95—5	2.6	0.055	8.8	0.034
90—10	7.1	0.150	5.8	0.022
CHCl ₃	1.6	0.034	2.9	0.011
MeOH	4.9	0.104	2.9	0.011
Total	100.1	2.121	100.0	0.384

* Hexane-Ethyl acetate (v/v %) a); [D-1], b); [D-2], c); [D-3]

から hexacosenol ($C_{26}H_{51}OH$), octacosenol ($C_{28}H_{55}OH$), triacontenol ($C_{30}H_{59}OH$) の3種の高級不飽和第1アルコールの混合物とみなされ, [D-2B'] は元素分析, IR, MS および接触還元の結果から, *n*-triacontenol ($C_{30}H_{59}OH$) と同定されたが, 硬紫根の [D-2] の GLC¹³⁾ ではこれらの成分を検出できなかった. 両紫根とも [D-2A] はこれ以上は検索しなかった.

画分 [D-3] には軟紫根では, IR, NMR, GLC (Fig. 1.), MS から4種の高級飽和アルコールの docosanol ($C_{22}H_{45}OH$), tetracosanol ($C_{24}H_{49}OH$), hexacosanol ($C_{26}H_{53}OH$), octacosanol ($C_{28}H_{57}OH$), および高級不飽和第1アルコール3種, hexacosenol ($C_{26}H_{51}OH$), octacosenol ($C_{28}H_{55}OH$), triacontenol ($C_{30}H_{59}OH$) の混在が認められたが, 硬紫根の画分 [D-3] にはこれら成分は検出されなかった.

以上の様に画分 [D] の組成, 成分とも, 軟紫根と硬紫根との間には, かなりの差がみられた.

4. 抗菌力試験

TABLE I. の画分, および TABLE II. の単離成分を主体に抗菌力試験を行なった. 被検菌はグラム陽性菌, グラム陰性菌, 酵母とし, また試験方法は各検体が脂溶性であり, これらの相対的な比較を行なうためには寒天希釈法で

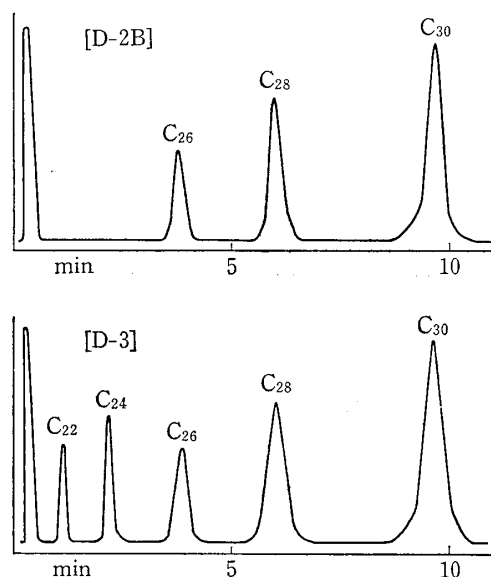


Fig. 1. GLC of Fr. [D-2B] and [D-3] from “Nanshikon” (1.5% OV-17 on Chromosorb G, 60—80 mesh, stainless steel column: ϕ 3.0 mm \times 1 m. column temp.: 240°, N_2 : 60 ml/min, atten. 2×10^3 , FID)

13) a); recorded in Fig. 1. b); 1.5% SE-30 on Chromosorb W (60—80 mesh), stainless steel column ϕ 3.0 mm \times 1 m, column temp.: 240°, N_2 60 ml/min, atten. 1×10^3 , FID.

TABLE IV. Minimum Inhibiting Concentration (mcg/ml) by Paper Disk Method
 (N: "Nanshikon," K: "Kōshikon")

Frac. No and Compounds	<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	<i>S. aureus</i> TPR 27	<i>S. epidermidis</i> TPR 25	<i>Sarcina lutea</i> NIH	<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	<i>Escherichia coli</i> 055	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> P 32	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 4500
Frac. [A]—N	40	20	80	40	40	>5000	>5000	320
Frac. [A]—K	80	40	80	40	40	>5000	>5000	320
Frac. [B]—N	80	40	80	40	80	>5000	>5000	320
Frac. [B]—K	80	40	80	80	80	>5000	>5000	640
Frac. [C]—N	20	20	20	20	40	>5000	>5000	80
Frac. [C]—K	20	20	40	40	40	>5000	>5000	320
[II]	80	80	40	20	40	>5000	>5000	320
[III]	>5000	>5000	>5000	80	>5000	>5000	>5000	>5000
[Ic]	160	160	160	160	160	>5000	>5000	>5000
[Ic]+[Id]+[Ig]+[Ih]	20	20	40	20	20	>5000	>5000	>5000
[Ib]	20	20	10	20	40	>5000	>5000	160
[If]	80	20	40	40	80	>5000	>5000	>5000
[Ia]	80	80	80	40	40	>5000	>5000	80
[Ie]	20	20	20	20	80	>5000	>5000	320

は適当でないで、ペーパーディスク法を用い、阻止円が認められる最低希釈濃度を求め、TABLE IV. に結果を示した。

これによると、各検体は共通してグラム陽性菌には活性を示し、グラム陰性菌には不活性であった。酵母には5種の shikonin 誘導体を除いて、やや活性がみられた。画分 [A], [B], [C] での軟、硬紫根の差はみられなかった。また shikonin 誘導体を主成分とする画分 [C] が画分 [A], [B] に比して活性が強く画分 [A] と [B] との差は少なく、このことは shikonin 誘導体の含有量に由来していると考えられる。グラム陽性菌のみを考察すると、*Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis* に対する最低阻止濃度は Ia と Ib が 50—125 mcg/ml で、Ic, If, Ie は 125—500 mg/ml と報告¹¹⁾ されているが、TABLE IV. のエステルでは Ib, Ie および Ic, Id, Ig, Ih の4成分混合物、If の順で活性が強く、Ic が劣り、同様な傾向がみられた。新物質 Ig¹⁾ と Ih¹⁾ の活性は強いと想定される。非エステルでは Ia と新物質 II¹⁾ がエステルと同様に活性を示し、カルボン酸部あるいは側鎖 α 位の水酸基の欠除の影響は少ないが、同じ非エステルの新物質 III¹⁾ は、活性を示さずこれは共役二重結合が影響しているのではないかと考えられる。酵母の *Saccharomyces cerevisiae* には含量の多い Ib と Ia とが活性を示した。

以上の様に、shikonin 誘導体の個々の成分の抗菌力には相異がみられるものの、これらの混合物より成る画分 [C] は、軟紫根と硬紫根との間に抗菌力の差が無いので、画分 [C] の含量の多い軟紫根の方が、用途によっては有利な生薬と考えられる。

実験の部

融点はすべて未補正。IR は日本分光 DS-301 型赤外分光光度計、GLC は日立 K-53 型、MS は日立 RMS-4 型マススペクトルメーター、NMR は日立 R-20 型核磁気共鳴スペクトルメーター (60 MHz) にて内部標準に TMS を用いて測定し、chemical shift は δ 値を示す。カラムクロマトに用いたセルローズ末、シリカゲル、アルミナはそれぞれ、東洋ろ紙 cellulose powder, 和光純薬 Wakogel C-200, 同じく活性アルミナ (300 mesh)。

画分 [A], [B], [C] 細切した軟紫根と硬紫根のおおの 1 kg をソックスレー抽出器 (100 g×10 回) で 40 時間エーテル抽出し, エーテルエキスを (画分 [A]) を得, これを 30 倍量のセルローズ末のカラムクロマトにて石油エーテル溶出分 (画分 [B]) を得, これにアセトンを加えてろ過し, ろ液を画分 [C] とする.

画分 [C] のカラムクロマト 画分 [C] のアセトンを留去し, 50 倍量のシリカゲルのカラムクロマトに通導し, 順次展開溶媒 (hexane, benzene, CHCl_3)¹⁾ を変えて溶出, TLC¹⁾ の R_f 値を指標とし, 単一スポットを示すまで 50 倍量のシリカゲルカラムクロマトに通導し, 単一画分として TABLE II. を得た.

画分 [D] 画分 [B] の石油エーテル溶液に 2% NaOH を等量加え 2 時間攪拌し, 1 昼夜放置後石油エーテル層を分液し, 水洗, 芒硝乾燥, 石油エーテル留去し画分 [D] を得る.

画分 [D] のカラムクロマト 50 倍量のシリカゲルにて, benzene-AcOEt および CHCl_3 , MeOH を展開溶媒とする.

軟紫根の画分 [D-1] 無色油状. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{film}} \text{cm}^{-1}$: 2910, 2850, 1464, 1378, 720. NMR (CDCl_3): 0.86 (CH_3), 1.25 (singlet, CH_2).

硬紫根の画分 [D-1] 無色油状. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{film}} \text{cm}^{-1}$: 2910, 2850, 1459, 1377, 757. NMR (CDCl_3): 0.86 (CH_3), 1.25 (CH_2).

画分 [D-2] のカラムクロマト 白色ロウ状の画分 [D-2] を Fig. 2. のごとく 50 倍量のアルミナを用いてカラムクロマト.

軟紫根の画分 [D-2A] 無色ロウ状. mp 65—67° (EtOAc). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$: ca 2900, ca 2850, 1739, 1465, 1175, 727, 718.

軟紫根の画分 [D-2B] 無色粉末. mp 48.5—49.5°. IR は Fig. 1. MS: 436, 408, 380 (M^+); 418, 390, 362 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$); 390, 362, 334 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4$) より $\text{C}_n\text{H}_{2n-1}\text{OH}$ ($\text{C}_{30,28,26}$) の混合物を支持.

軟紫根の画分 [D-2B'] [D-2B] を MeOH で再結晶し, GLC¹³⁾ で単一のピークを得る. 無色板状晶, mp 59—60° (MeOH). Anal. Calcd: $\text{C}_{30}\text{H}_{60}\text{O}$; C, 82.49; H, 13.85. mol. wt., 436.78. Found; C, 82.73; H, 13.32. M^+ 436. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$: 3220 (OH), 2900 and 2835 (CH_2), 1460 (CH_3), 1120 and 1073 (C—OH). MS: 418 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$), 390 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4$). 10 mg の [D-2B'] を Et_2O (20 ml) に溶解し Pd-C 5 mg で 4 時間攪拌して白色粉末, mp 87.5—88.5° (Me_2CO) の *n*-triacontanol ($\text{C}_{30}\text{H}_{61}\text{OH}$) を得, この MS は 438 (M^+), 420 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$), 392 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4$).

硬紫根の画分 [D-2] 無色油状. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{film}} \text{cm}^{-1}$: ca 2900, 1733, 1460, 1377, 1175, 716. GLC¹³⁾ では顕著なピークは無い.

軟紫根の画分 [D-3] 無色粉末. mp 68° (Me_2CO). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$: 3300 (OH), 2910 and 2840 (CH_2), 1462 (CH_3), 1120 (C—O), 1061, 1071, 1060, 727, 717. NMR (CDCl_3): 0.86 (CH_3), 1.26 (CH_2), 3.57 (OCH_2), 5.30 (OH). MS: M^+ の 326, 354, 382, 410, ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$) の 308, 336, 364, 392, ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4$) の 280, 308, 336, 364 の値は $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{OH}$ ($\text{C}_{22,24,26,28}$) を支持. MS: M^+ の 380, 408, 436, ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$) の 362, 390, 418, ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4$) の 334, 362, 390 の値は $\text{C}_n\text{H}_{2n-1}\text{OH}$ ($\text{C}_{26,28,30}$) を支持.

抗菌力試験法

被検菌 *Staphylococcus aureus* 209 P, *Staphylococcus aureus* TPR 27, *Staphylococcus epidermidis* TPR 25, *Sarcina lutea* NIHJ, *Bacillus subtilis* PCI 219, *Escherichia coli* 055, *Pseudomonas aeruginosa* P 32, *Saccharomyces cerevisiae* 4500.

ペーパーディスク法 被検菌をハートインフュージョン培地 9 ml (酵母には 0.1% グルコース添加) に植菌し, 37° (酵母は 30°) にて 24 時間培養後, その 1 ml を 100 ml のハートインフュージョン寒天培地 (酵母には 0.1% グルコース添加) に混和し, 径 9 cm の滅菌シャーレに 10 ml ずつ分注し, 試験菌プレートを作成, 各希釈段階のディスクを乗せ, 37° (酵母は 30°) にて 24 時間培養し阻止帯を観察する.

謝辞 紫根の鑑定をしてくださいました東京理科大学薬学部長沢元夫教授に厚く御礼申し上げます. また終始御激励いただきました井川俊一常務, 田中一郎研究部長に感謝します. 抗菌力試験に助力をいただきました微生物研究室の諸氏に謝意を表します.