

紫雲膏の薬学的研究 (第2報<sup>1)</sup>) 紫雲膏作製時の紫根抽出条件について

田中 康雄, 小谷 功, 金谷 友成

近畿大学薬学部<sup>2)</sup>Pharmacodynamic Study on "Shiunko" (II) Extractive  
Condition of Shikon in making Shiunko

YASUO TANAKA, TSUTOMU ODANI and TOMONARI KANAYA

Faculty of Pharmacy, Kinki University

(Received June 21, 1974)

The analysis of antibacterial naphthoquinone derivatives,  $\beta, \beta$ -dimethylacryl-shikonin (I), acetyl-shikonin (II), teracryl-shikonin (III), shikonin (IV) and  $\beta$ -hydroxyisovaleryl-shikonin (V) in Shikon (Nanshikon, Koshikon and Washikon), one component in an ointment "Shiunko", effective for skin diseases, was carried out.

It was found that the best condition for the extraction of colouring matters for making Shiunko was at 130—140° for 10—15 min. in mixed oil of *Oleum Sesami*, *Cera Flava* and *Adeps Suillus*, that Nanshikon showed highest component of colouring matters, and that powdered sample showed better yield than the cut sample.

著者らは軟紫根中に含まれる naphthoquinone 系色素6種を単離し、そのすべてが *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea* に対し抗菌性をもつことを報告した<sup>3)</sup>。紫根を主剤として作られ、古来皮膚疾患などに著効をもつと云われる紫雲膏を更に科学的立場から解明する目的で、今回は各種紫根および紫雲膏中の抗菌性物質(色素)の定量を行ない、若干の知見を得、これが紫雲膏製造法の新たな基準になるものと考えられるので報告する。

紫雲膏の製法は春林軒膏方便覧<sup>4)</sup>に「先ズ香油ヲニテ当帰ヲ煎シ枯浮スルヲ候テ家猪油蜜蠟ヲ下シ烱消シテ又紫根ヲ下シ須臾ニ火ヲ離シ漉シテ去滓収メ貯フ」と記載されているが、現在ではゴマ油を加熱してミツロウ、豚脂を溶解させた液で当帰を抽出し、その滲液で紫根を抽出して得た液を自然冷却して軟膏にするのが一般的製法のようである。当帰の抽出条件は古くはゴマ油だけで抽出されていたが、現法の大部分では混合油脂(ゴマ油、ミツロウ、豚脂)で抽出される点で異り、紫根の場合は両製法とも混合油脂で抽出し変りはない。しかし紫雲膏は紫根の他の抽出条件(温度、時間など)によって品質が可成り異り、これらの条件を明確に述べた文献<sup>6~10)</sup>は少く、一般に紫根の抽出時の色調および製品の色調などを目標にしているに過ぎない。渡辺ら<sup>5)</sup>は種々の条件でつくられた紫雲膏から naphthoquinone 系色素を抽出し、これを加水分解して shikonin (IV) とし、その比色定量を行った結果、紫根の抽出条件は 140°, 5 分間では温度が高く、120~130°, 5 分間の抽出で最も多量の色素が抽出され適当であると述べ、また有機溶媒中殊にエーテル抽出による新しい方法をも提案している。大塚ら<sup>6)</sup>は木村<sup>7)</sup>の経験に基づいて紫根抽出の温度は 140° ぐらいがよいと云い、矢数ら<sup>8)</sup>はゴマ油を 142° に加温し、この温度を保たせながら当帰を抽出した後紫

1) 日本薬学会91年会で発表, 福岡, 1971年4月。

2) Location: *Kowakae 321, Higashiosaka, Osaka*3) 第1報. 田中康雄, 小谷功, 薬誌, **92**, 525 (1972).

4) 華岡青洲: 春林軒膏方便覧.

5) 渡辺武, 後藤実, 日本東洋医学会誌, **5**, 19 (1955).

6) 大塚敬節, 矢数道明, 清水藤太郎共著“漢方診療の実際”6版 南山堂, 東京, p.384 (1961).

7) 木村長久, 漢方と漢薬, **1**(6), 99 (1934).8) 矢数道明, 高橋国海, 漢方と臨床, **18**(4・5), 359 (1971). 矢数道明著“漢方処方解説”初版. 創元社, 大阪, p.195 (1966).

根を加えて抽出し、その後にミツロウと豚脂を加えるのがよいと記している。また紫根の色素成分としては naphthoquinone 系色素の shikonin (IV) および acetyl-shikonin (II) が含まれていることが知られていたが、近時森本ら<sup>12)</sup>は同系色素の  $\beta, \beta$ -dimethylacryl-shikonin (I), teracryl-shikonin (III),  $\beta$ -hydroxyisovaleryl-shikonin (V) および isobutyl-shikonin (VI) が存在することを報告し、京極ら<sup>13)</sup>は軟紫根から新たに deoxy-shikonin と anhydro-shikonin, 硬紫根から deoxy-shikonin を単離, isovaleryl-shikonin と  $\alpha$ -methyl-*n*-butyl-shikonin を混晶として分離, また得られた化合物の抗菌性を検定し著者らと略同様の結果を得たことを報告している。

著者らは国内市場品の中で宮崎県産と云われる和紫根<sup>14)</sup>, 中国産軟紫根<sup>15)</sup>と硬紫根<sup>15)</sup>およびこれらの紫根を用いてつくった各紫雲膏から I, II, III, IV, V の各色素を薄層クロマトグラフィー (TLC) のかきとり法<sup>17)</sup>で分取し, 各色素化合物の可視部吸収スペクトル (VL) の最大吸収波長における吸光度を測定して定量を行なった。

## 実験方法

### 実験材料

- 1) 中国産軟紫根: 1969年12月横内製薬株式会社から入手
- 2) 中国産硬紫根: 1970年6月横内製薬株式会社から入手
- 3) 和紫根: 1970年6月栃本天海堂から入手した宮崎県産紫根
- 4) 北海道帰(大和産): 1969年12月横内製薬株式会社から入手
- 5) ゴマ油(局方品): 1969年12月丸石製薬株式会社から入手
- 6) ミツロウ(局方品): 1969年12月八洲薬品株式会社から入手
- 7) 豚脂(局方品): 1969年12月八洲薬品株式会社から入手

### 検量線の作成

前報<sup>3)</sup>で分取した単一色素化合物 I~V をそれぞれ 2 mg 精秤し, エタノールに溶解して正確に 20 ml とし, その 0.25 ml, 0.50 ml, 0.75 ml……2.25 ml をとり, メスフラスコで正確に 5.0 ml とし, 5  $\mu$ g/ml~50  $\mu$ g/ml の10ケの標準検液とし, IV は 510 m $\mu$ , I, II, III, V は 515 m $\mu$  で吸光度を測定<sup>18)</sup>して検量線を作成する。

### 回収率

各色素 2 mg を精秤し, 少量のクロロホルムに溶解して薄層 (20 cm×20 cm) に帯状にスポットし, クロロホルムで展開する。溶媒の先端が約 15 cm に達した時展開をやめ, 着色部をすばやくかきとり, 綿栓したロートに移し, クロロホルム約 50 ml で色素を溶出する。クロロホルム留去後エタノールに溶解させ一定量とし, 吸光度を測定して検量線から色素量を求め, 回収率を算出する。

### 紫根中の色素の定量

各紫根の粗末を 40°で24時間乾燥し, この 5.0 g を精秤し, ソックスレー抽出器を用いて*n*-ヘキサンで水浴上5時間抽出し, naphthoquinone 系色素の混合エキスを作る。これをクロロホルムに溶解させて正確に 10 ml とした後, その 0.2 ml をとり, 薄層に帯状にスポットしてクロロホルムで展開する。分離した着色部をすばやくかきとり, クロロホルム約 50 ml を用い各色素を溶出する。クロロホルムを留去後エタノールを加えて一定量とし, 吸光度を測定し検量線および回収率から含量を求める。

### 紫雲膏の製法

ゴマ油 20 g を油浴上で 160~180°, 約1時間加熱し, ミツロウ 7.6 g, 豚脂 0.5 g, を加え15~20分間 160°前後で

- 
- 9) 高橋真太郎, 西岡一夫共著“明解漢方処方”, 浪速社, 大阪, p.76 (1966).
  - 10) 海老塚吉次, 漢方の臨床, **12**, 472 (1965).
  - 11) T. MAJIMA, C. KURODA, *Acta Phytochem.*, **1**, 43 (1922); H. BROCKMANN, *Ann.*, **521**, 1 (1936).
  - 12) ICHIRO MORIMOTO, TOKIKO KISHI, SHIGERU IKEGAMI, YOSHIMASA HIRATA, *Tetrahedron Letters* **52**, 4737 (1965), ICHIRO MORIMOTO, YOSHIMASA HIRATA, *Tetrahedron Letters*, **31**, 3677 (1966).
  - 13) 京極和旭, 寺山博行, 館安英, 鈴木堯, 小松曼耆, 生薬, **27**, 24 (1973); 生薬, **27**, 31 (1973).
  - 14) 和紫根の剖見の結果藤田ら<sup>16)</sup>が報告したムラサキ *Lithospermum officinale* L. var. *erythrorhizon* MAXIM. (*L. erythrorhizon* SIEB. et ZUCC.) の根の内部形態と一致した。
  - 15) 中国産硬紫根, 軟紫根の原植物は現時点では決定し難い。
  - 16) 藤田直市, 吉田裕, 薬誌, **57**, 368 (1937).
  - 17) 原昭二, 田中治, 滝谷昭司編, “薄層クロマトグラフィー第1集”, 第三版, 南江堂, 東京, p.146 (1968).
  - 18) 吸光度の測定は日立分光光度計 124 型を使用した。

加熱し、当帰 2.0 g を加えて 150~160°, 15~20 分間抽出してガーゼ 4 枚でろ過する。ろ液 24 g に紫根 2.0 g を加えて各種時間および各温度で抽出後、ガーゼ 5 枚でろ過し、攪拌しながら自然冷却して軟膏とする。

#### 紫雲膏中の各色素の分離および定量

紫雲膏 0.3 g を精秤して少量のクロロホルムに溶解させ、薄層 (20 cm×20 cm) に帯状にスポットしたものを、まずクロロホルム・シクロヘキサン (3:2) の混合溶媒で、ゴマ油中の  $R_f$  値が 0.8 より大きい物質と、 $R_f$  値が 0.5 以下にとどまる色素を分離し、一度自然乾燥させた後、この薄層を再度クロロホルムで展開すると、各色素は完全に分離する。分離した各色素をかき取り、クロロホルムで溶出し、クロロホルムを留去後エタノールを加えて溶解させ、メスフラスコで I, II は 10 ml, III~V は 5 ml として吸光度を測定して含量を求める。

#### 結果および考察

##### 1. 定量法の検討

各色素の可視部の最大吸収波長は I, II, III, V は 515 m $\mu$ , IV は 510 m $\mu$  で、これらの波長における吸光度を測定した結果、各色素の 50  $\mu\text{g/ml}$  以下の濃度では濃度と吸光度は直線関係にあり、これに従ってそれぞれの回帰方程式を求め (Fig. 1), 検量線を作成した。各色素の薄層からの回収率は I: 93.20 $\pm$ 0.84%, II: 91.36 $\pm$ 2.98%, III: 94.13 $\pm$ 0.69%, IV: 91.98 $\pm$ 1.70%, V: 91.20 $\pm$ 3.04% でいずれも 90% 以上の値を示し定量可能であると認めた。

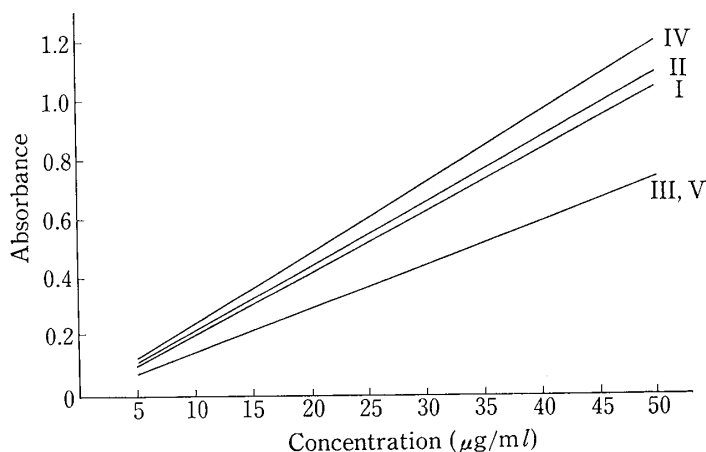


Fig. 1. Standard Curves of Naphthoquinone Derivatives

$$\begin{aligned} \text{I: } y &= (0.021 \pm 0.004)x + 0.001 && (\text{in } 515 \text{ m}\mu) \\ \text{II: } y &= (0.022 \pm 0.002)x - 0.002 && (\text{in } 515 \text{ m}\mu) \\ \text{III: } y &= (0.015 \pm 0.001)x - 0.006 && (\text{in } 515 \text{ m}\mu) \\ \text{IV: } y &= (0.024 \pm 0.003)x + 0.005 && (\text{in } 510 \text{ m}\mu) \\ \text{V: } y &= (0.015 \pm 0.004)x - 0.006 && (\text{in } 515 \text{ m}\mu) \end{aligned}$$

##### 2. 紫根中の色素の定量

各紫根の粗末をソックスレー抽出器により  $n$ -ヘキサンで水浴上 5 時間抽出した。 $n$ -ヘキサンはこの場合主として naphthoquinone 系色素を抽出し、糖、ろう状物質などの他物質はほとんど抽出せず、本定量には最適と考えられた。 $n$ -ヘキサン抽出残渣をベンゼンで抽出し、抽出液を TLC によりクロロホルムで展開したが、I~V のスポットは全く認められなかった。各紫根の含有色素の定量結果を TABLE I に示す。

各紫根の I~V の総量では軟紫根が最も多く、硬紫根の約 2 倍、和紫根の約 1.5 倍含有されている。三者を各色素別に比較すると、I は軟紫根に最も多く、総色素量の約 63% 含有され、硬紫根 I の 3 倍、和紫根の約 2 倍に相当する。肉芽増殖作用<sup>19)</sup>が認められている II と IV は軟紫根と和紫根を比較すると大差はないが、硬紫根中の II と IV は共に軟紫根、和紫根に比べて僅かに少ない。また IV は各紫根とも総色素量の 6% 以下である。III は軟紫根のみに含有されている。V は軟紫根中に IV と同程度含有されているが、和紫根では IV のおよそ 4 倍に達する。

##### 3. 紫雲膏作成時における紫根の抽出条件の検討

三種の紫根のうち軟紫根のみが I~V の色素をすべて含有しているので、抽出条件の検討には軟紫根の粗末を材料とした。軟膏の色調は 5~10 分間抽出では 150~160° 以上、15 分間抽出では 140~150° になると紅紫色ないし濃紫紅色

19) 林元英, 鶴見介澄, 藤村一, 日薬理, 65(5), 195 (1969).

TABLE I. Contents of Naphthoquinone Derivatives in "Shikons" (%)

|       |      | Nanshikon(Chin.) | Koshikon(Chin.) | Washikon(Jap.) |
|-------|------|------------------|-----------------|----------------|
| I     | 1    | 2.28             | 0.69 *          | 0.96           |
|       | 2    | 1.99             | 0.67 *          | 1.03           |
|       | 3    | 2.18             | 0.70 *          | 0.93           |
|       | mean | 2.15             | 0.69            | 0.97           |
| II    | 1    | 0.75             | 0.56            | 0.82           |
|       | 2    | 0.75             | 0.55            | 0.76           |
|       | 3    | 0.88             | 0.48            | 0.80           |
|       | mean | 0.79             | 0.53            | 0.79           |
| III   | 1    | 0.33             | 0.00            | 0.00           |
|       | 2    | 0.32             | 0.00            | 0.00           |
|       | 3    | 0.32             | 0.00            | 0.00           |
|       | mean | 0.32             | 0.00            | 0.00           |
| IV    | 1    | 0.09             | 0.09            | 0.10           |
|       | 2    | 0.10             | 0.10            | 0.10           |
|       | 3    | 0.11             | 0.11            | 0.10           |
|       | mean | 0.10             | 0.10            | 0.10           |
| V     | 1    | 0.09             | 0.44            | 0.48           |
|       | 2    | 0.09             | 0.43            | 0.46           |
|       | 3    | 0.09             | 0.44            | 0.42           |
|       | mean | 0.09             | 0.44            | 0.45           |
| total |      | 3.45             | 1.76            | 2.31           |

\*: This substance has been related as mixture<sup>13)</sup>, but they are the values by way of I.

TABLE II. Contents of Naphthoquinone Derivatives "Shiunko<sup>a)</sup>" (%)

| Temp.<br>Min.<br>Comp. | 100—110° |       |       | 110—120° |       | 120—130° |       | 130—140° |       |       | 140—150° |       | 150—160° |       |       |
|------------------------|----------|-------|-------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|-------|----------|-------|----------|-------|-------|
|                        | 5        | 10    | 15    | 5        | 10    | 5        | 10    | 5        | 10    | 15    | 5        | 10    | 5        | 10    | 15    |
| I                      | 0.123    | 0.159 | 0.162 | 0.132    | 0.163 | 0.138    | 0.162 | 0.146    | 0.163 | 0.164 | 0.152    | 0.159 | 0.143    | 0.159 | 0.145 |
| II                     | 0.046    | 0.046 | 0.055 | 0.053    | 0.053 | 0.053    | 0.053 | 0.054    | 0.056 | 0.058 | 0.050    | 0.055 | 0.042    | 0.054 | 0.049 |
| III                    | 0.021    | 0.027 | 0.027 | 0.027    | 0.027 | 0.027    | 0.027 | 0.027    | 0.027 | 0.027 | 0.025    | 0.026 | 0.024    | 0.024 | 0.022 |
| IV                     | 0.007    | 0.009 | 0.008 | 0.008    | 0.008 | 0.009    | 0.008 | 0.009    | 0.009 | 0.008 | 0.007    | 0.007 | 0.008    | 0.008 | 0.007 |
| V                      | 0.006    | 0.007 | 0.009 | 0.007    | 0.008 | 0.008    | 0.008 | 0.008    | 0.008 | 0.008 | 0.006    | 0.007 | 0.007    | 0.009 | 0.008 |
| total                  | 0.203    | 0.248 | 0.261 | 0.227    | 0.259 | 0.235    | 0.258 | 0.244    | 0.263 | 0.265 | 0.240    | 0.254 | 0.224    | 0.254 | 0.231 |

a) This "Shiunko" was made of Nanshikon powder.

から漸次暗紫褐色となるが、この暗紫色の物質は *n*-ヘキサンに難溶で、メタノール、エタノール、クロロホルムに易溶である (TABLE II).

各色素の総量は各温度とも5分間抽出にくらべて10分間、15分間の抽出量が多いが、10分間抽出と15分間抽出を比較すると大差はなく、低温では15分間抽出、高温では10分間抽出がわずかに多い。最も多く抽出される条件は130～140°、15分間であった。IVおよびVは微量であるがほぼ100%抽出された。I～IIIを図示すればFig.2となる。

Iは10分間抽出と15分間抽出を比較すると大差はないが、5分間抽出は他に比べて各温度とも少なく、100～110°のような低温ではかなりの差がある。II, IIIは各時間、温度とも大差はない。I, II, IIIとも140°以上になれば減少する傾向にあるが、これは加熱によって色素が変性するか、あるいは分解するものと考えられる。

#### 4. 各種紫根の粗末および粗切によりつくられた各紫雲膏中の色素の定量

紫根中の色素の抽出条件の検討には、定量値のバラツキを小さくするため今回は粗末を用いてきたが、通常紫雲膏の製造には粗切あるいは中切、場合によってはそのまま<sup>10)</sup>用いられている。したがってこの点を検討するため、軟紫根、硬紫根、和紫根の粗末および粗切を用い、130～140°、10分間および15分間抽出してつくられた各紫雲膏中の色素の定量を行った (TABLE III)。

対応する各条件における軟膏の色調を比較すると、軟紫根によるものは紅紫色～紫色を呈し、硬紫根は紅色～紅紫色、和紫根は淡紅色～紅色で紫の色調はほとんど認められない。

紫雲膏中の総色素量を比較すると、粗末、粗切とも軟紫根のものが最も多く、粗末の場合は軟膏のおよそ 0.26% 含まれ、硬紫根の 2～2.5 倍、和紫根の 1.5～2 倍であり、粗切の場合は約 0.18% で硬紫根のおよそ 8 倍、和紫根のおよそ 2.5 倍抽出されている。各紫根の粗末を 10 分間抽出してつくられた紫雲膏と 15 分間抽出の場合の総色素量を比較すると、軟紫根および和紫根は大差ないが、硬紫根は 15 分間抽出がわずかに多い。また粗末と粗切の 10 分間抽出したものの総色素量を比較すると、粗切のものは各紫根とも粗末より少なく、軟紫根によるものは粗末の約 66%，硬紫根

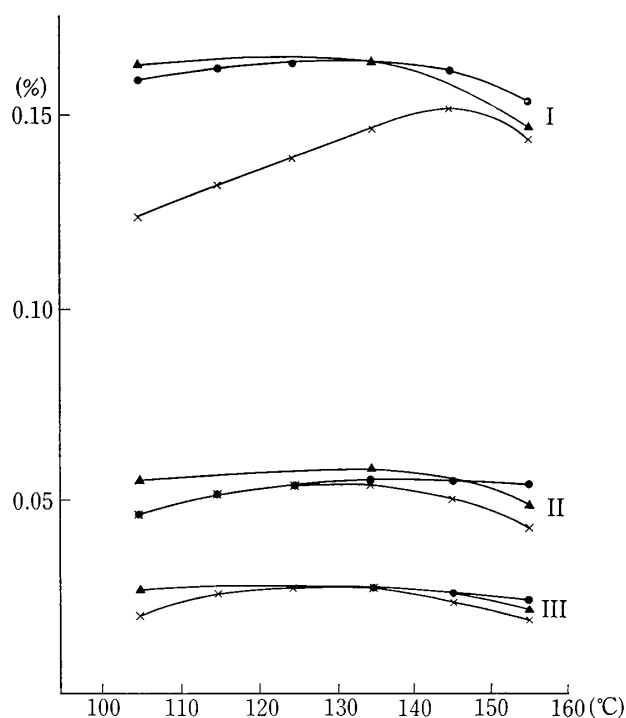


Fig. 2. Relationship between the Concentration of Colouring Substances and Extracting Temperatures

—x—: 5 min. extract.      —●—: 10 min. extract.  
—▲—: 15 min. extract.

TABLE III. Contents (%) of Naphthoquinone Derivatives in each "Shikon" (extracted on 130—140°)

| Comp. | time(min.) | Nanshikon (Chin.) |       |       | Koshikon (Chin.) |       |       | Washikon (Jap.) |       |       |
|-------|------------|-------------------|-------|-------|------------------|-------|-------|-----------------|-------|-------|
|       |            | powder            | cut   | 10    | powder           | cut   | 10    | powder          | cut   | 10    |
| I     |            | 0.163             | 0.164 | 0.107 | 0.044            | 0.053 | 0.023 | 0.057           | 0.056 | 0.023 |
| II    |            | 0.056             | 0.058 | 0.032 | 0.031            | 0.043 | 0.016 | 0.047           | 0.049 | 0.022 |
| III   |            | 0.027             | 0.027 | 0.022 | 0.000            | 0.000 | 0.000 | 0.000           | 0.000 | 0.000 |
| IV    |            | 0.009             | 0.008 | 0.007 | 0.007            | 0.007 | 0.004 | 0.007           | 0.008 | 0.004 |
| V     |            | 0.008             | 0.008 | 0.007 | 0.028            | 0.030 | 0.016 | 0.027           | 0.028 | 0.018 |
| Total |            | 0.263             | 0.265 | 0.175 | 0.110            | 0.133 | 0.059 | 0.138           | 0.141 | 0.067 |

では約53%, 和紫根では約48%に過ぎない.

## 結 論

紫雲膚は外用薬として用いられる軟膏剤であり抗菌性の高い品質のものをつくるためには, 紫根中の naphthoquinone 系色素を成可く多量抽出することが望ましい.

1. 紫根の品種中, 軟紫根, 硬紫根, 和紫根の色素含量の比較を行ったが, 今回の材料では軟紫根が最も高く, 次いで硬紫根, 和紫根の順序となった.
2. 紫根の抽出には一般に粗切あるいは中切した材料で行われるが, 今回の実験では粗末の場合の50~60%にとどまる. 高色素含量の軟膏をつくるためには粗末を用いることが望ましい.
3. 軟紫根粗末の抽出条件を種々検討した結果, ゴマ油, ミツロウ, 豚脂の混合油脂の温度は 130~140° で10~15分までで抽出を止めるべきであり, これ以上の高温や抽出時間延長では却って含量は減少する. この場合色素の種類により多少異なるが, 一般に分解されるかまたは変性する様に思われる. その色調も暗紫色を帯び, 有機溶剤への溶解性も減少し, 特に *n*-ヘキサンには溶解されにくくなる.
4. 有機溶媒による紫根の抽出は今後検討されるべきであると考えるが, 今回の実験ではベンゼン, クロロホルム, エーテル, *n*-ヘキサンの何れもほぼ100%抽出できる. しかし *n*-ヘキサンは他物質の抽出をさけ, 色素のみを抽出する点で最も適当な溶媒であると考える.

謝 辞 本研究を行うにあたり, 定量法について御助言を頂いた岡崎雄交博士に深謝致します.