

紫雲膏中のシコニンの定量法

新井哲也^a, 趙長崎^a, 水上元^a, 小島啓介^a, 安井敏洋^b, 古橋司朗^b,
岡田節子^c, 佐竹元吉^c, 荻原幸夫^{a*}

名古屋市立大学薬学部^a, 大晃生薬有限会社^b, 国立医薬品食品衛生研究所^c

Quantitative Determination of Shikonin in Shiunko

Tetsuya ARAI,^a Changqi ZHAO,^a Hajime MIZUKAMI,^a Keisuke
KOJIMA,^a Toshihiro YASUI,^b Shirou FURUHASHI,^b Setsuko SEKITA,^c
Motoyoshi SATAKE^c and Yukio OGIHARA^{a*}

^aFaculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1 Tanabe-dori,
Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan.

^bDaikoh Shohyaku Co., LTD., 1 shoken, Chikusa-ku, Nagoya 464-0084, Japan.

^cNational Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-, Japan

(Received January 21, 2000)

"Shiunko" is a purple-colored ointment used for curing skin diseases in Japanese traditional medicine. One of the major ingredient crude drugs in Shiunko is Lithospermum Root (Shikon) which contains red naphthoquinone pigments, shikonin and its fatty acid esters. Shikonin derivatives have been reported to exhibit antimicrobial, antiinflammatory and antitumor activities.

A simple and efficient method for quantitative determination of shikonin derivatives in Shiunko was established. Shikonin pigments extracted with CHCl₃ from Shiunko were alkali-hydrolyzed to shikonin, which was in alkaline water, and other substances which remained in CHCl₃ layer. Shikonin was then extracted with CHCl₃ after acidification, and subjected to HPLC analysis. The present method was shown to be applicable to chemical evaluation of Shiunko and Lithospermum Root on the market.

Keywords: Shiunko; determination; HPLC; Lithospermum Root; shikonin

紫雲膏は、江戸末期の名医華岡青州が処方した漢方の軟膏で、解毒、抗菌、抗炎症作用があり、肉芽形成を促進する低刺激性の軟膏として、やけどや外傷などに効果があるといわれている¹⁾。

紫雲膏は肌を潤し解熱及び鎮痛作用がある当帰と、抗炎症及び殺菌の効果があるといわれる紫根をゴマ油、ミツロウ、豚脂で熱抽出したものである。紫根 (Lithospermum Root) は、日本薬局方

はムラサキ *Lithospermum erythrorhizon* SIEB. et ZUCC.の根 (硬紫根) と規定されており、種々のシコニン誘導体を含有している。これらのシコニン誘導体には抗菌²⁾、抗炎症³⁾、肉芽増殖の促進⁴⁾、腫瘍細胞の増殖抑制⁷⁻⁹⁾、トポイソメラーゼ I の阻害¹⁰⁾ ならびにヒドロキシラジカル生成の抑制¹¹⁾ など種々の生理活性が報告されており、紫根の有効成分であると考えられている。これらシコニ

ン類は紅紫色から暗紫色を呈する naphthoquinone 系色素で脂溶性であり、紫雲膏の紫紅色はこの色素によるものである。したがって紫雲膏中のシコニン類の定量は、紫雲膏の品質の評価には欠かせないものと言える。紫雲膏の基剤はゴマ油、ミツロウ、豚脂であり、紫雲膏中のシコニン類の定量で最も大きな問題となるのはこれら油脂と脂溶性の高いシコニン類の分離である。

紫雲膏中のシコニン類の定量については、すでに田中らにより¹²⁾、薄層クロマトグラフィーによって油脂とシコニン類を分離させる方法が報告されている。しかしこの方法は薄層のかき取りという煩雑な操作が含まれるために、結果の再現性という点で問題があり、また微量色素の場合薄層への吸着、薄層上での分解が顕著である。従ってより簡便で信頼性の高い定量法の開発が望まれてきた。

我々は、ほとんどのシコニン類がシコニンのエステル体として存在すること、またこれらシコニン類がアルカリ水中に青色を呈して溶解することを利用し、紫雲膏中のシコニン類をシコニンへ加水分解すると同時にアルカリで抽出し、油脂と分離するという手法を考案した。つまりこの方法なら簡単な分配操作だけでシコニン類をシコニンとして定量できると考えた。

現在、硬紫根はそのほとんどが中国、韓国からの輸入品であり、その中でも野生品と栽培品が存在し、栽培品の品質は野生品に比べてやや劣るといわれている。今回我々は、市場より入手した中国産硬紫根の野生品と栽培品にシコニン含有量に極めて大きな差があることを確認したのであわせて報告する。

実験の部

実験材料 紫雲膏は大見生薬の製品を、また硬紫根は同社の紫雲膏製造に使用されている中国遼寧省産の硬紫根（野生品および栽培品）を用いた。大見生薬製紫雲膏はこの野生品と栽培品を1対1の割合で配合して製造されている。

使用した生薬は標本として名古屋市立大学薬学部生薬学教室に保管している。

紫雲膏は経時的なシコニン量の変化を測定するため1998年製、1992年製、1987年製のものについて検討した。

定量方法 シコニンの定量はHPLCを用いた絶対検量線法によって、以下のように行った。

紫雲膏 紫雲膏約100mgをキャップ付き試験管に精密に秤取しクロロホルム4.0mlに溶解した。この溶液に1M NaOH 4.0mlを加えボルテックスミキサーで1分間攪拌後、10分間遠心(800g)した。青色を呈する水層2.0mlをとり、これに1M HCl 2.0mlおよびクロロホルム4.0mlを加え再びボルテックスミキサーで1分間攪拌した。10分間遠心(800g)後、赤色を呈するクロロホルム層2.0mlをとって濃縮乾固した。残渣をメタノール100 μ lに溶解したものを検液とした。

紫根 紫根の粉末約10mgをキャップ付き試験管に精密に秤取し、クロロホルム4.0mlを加えて、30分間超音波抽出した。10分間遠心(800g)した後、上清2.0mlに1M NaOH 4.0mlを加えてボルテックスミキサーで1分間攪拌後、10分間遠心(800g)した。青色を呈する水層2.0mlに1M HCl 2.0mlおよびクロロホルム4mlを加え再びボルテックスミキサーで1分間攪拌した。10分間遠心(2000rpm)後、赤色を呈するクロロホルム層2.0mlを濃縮乾固し、残渣をメタノール100 μ lに溶解したものを検液とした。

上記定量操作によるシコニンの回収率は98.2 \pm 2.3%であった。

HPLC 条件

紫雲膏 column, TSKgel ODS-80Ts 4.6x250mm; solvent, 45% acetonitrile, 0.1% tetrahydrofuran; column temperature, 40 °C; detection, UV 214nm; sample size, 10 μ l.

紫根 column, TSKgel ODS-80Ts 4.6x250mm; solvent, 60% acetonitrile, 0.1% tetrahydrofuran; column temperature, 40 °C; detection, UV 214nm; sample size, 10 μ l.

結果

1. 紫根中のシコニン類の同定および加水分解後の全シコニンの定量

紫雲膏中のシコニン類をアルカリ処理後、シコニンとして定量するために、まず紫根中のシコニン類の同定および、加水分解後のシコニン量の確認を行った。硬紫根（野生品および栽培品）をクロロホルムで抽出後、HPLCにより分析したところ、Fig. 1. に示すように5本のメインピークが確

認された。ピーク1は標品のRtと一致することからシコニンと同定した。ピーク2~5を分取しNMRによって構造を確認したところ、ピーク2~4はそれぞれ、 β -hydroxyisovalerylshikonin, acetylshikonin, isobutylshikoninであり、ピーク5は isovalerylshikonin および α -methyl-*n*-butylshikoninの混合物であった (Fig. 2)^{12,13}。shikonin (1)に相当するピークは非常に小さく紫根中のシコニン類はそのほとんどがアシル体として存在していることを確認した。

この赤色の紫根抽出エキスに1M NaOHを加えるとクロロホルム層は無色になり水層は青色となった。シコニン類はアルカリで水層に移行すると同時にシコニンへと加水分解されたと考えられた。さらにこの水層に1M HCl およびクロロホルムを加えるとシコニンは再び赤色を呈してクロロホルム層に溶解した。クロロホルム層を濃縮後HPLCにより分析したところ、Fig. 1Bに示すようにシコニン類がすべてシコニンへと変換されていることが確認できた。標品添加実験によって求めたこれらの分配操作の回収率は98%であり、シコニンは定量的に回収されていることがわかった。

これらの結果より、シコニンの定量にこのアルカリ処理法が有効であることが明らかになった。アルカリ処理後のシコニン量、すなわち紫根中の全シコニン量をHPLCを用いて算出したところ、野生品では1.15%、栽培品 (Table 1) で0.14%とその間に約8倍の開きが見られた。また今回用いた野生品と栽培品ではシコニン類1~5の存在比はほぼ同じであった。

2. 紫雲膏中の全シコニンの定量

アルカリ処理による分配および加水分解を利用したシコニンの定量法が紫根では良好な結果が得ら

れたので、同じ方法を用いて紫雲膏中のシコニンの定量を試みた。

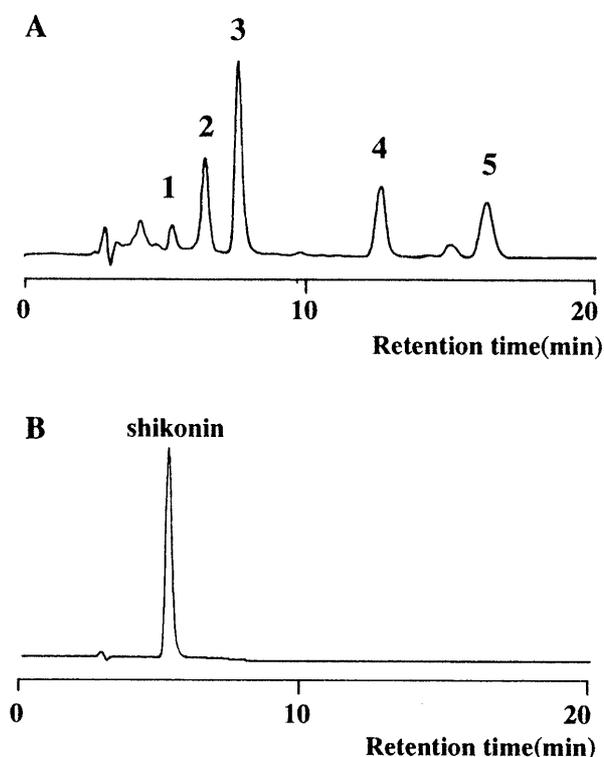


Fig. 1 HPLC chromatograms of the CHCl_3 extract of Lithospermum Root before (A) and after (B) alkali hydrolysis.

1: shikonin, 2: β -hydroxyisovalerylshikonin, 3: acetylshikonin, 4: isobutylshikonin, 5: mixture of isovalerylshikonin and α -methyl-*n*-butylshikonin

Table 1 Shikonin content in Lithospermum Root

Sample	Source plant	Place of production	Shikonin content (% dry wt.) ^a
A	Wild plants	Lioning Province, China	1.15 \pm 0.15
B	Cultivated plants	Lioning Province, China	0.14 \pm 0.03

a) mean \pm sd (n=3)

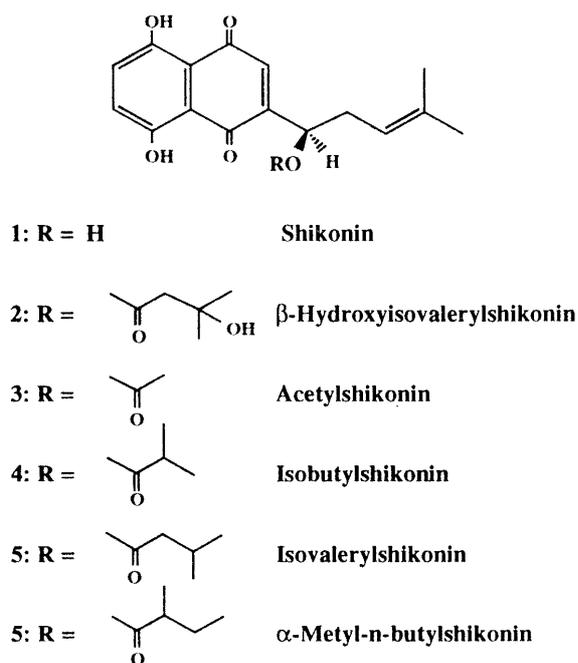


Fig. 2 Shikonin derivatives in Lithospermum Root

まず紫雲膏をクロロホルムに溶解後、1M NaOHを加えると水層は青色となり、シコニン類はアルカリで水層に移行すると同時にシコニンへと加水分解されたと考えられた。さらに1M HClおよびクロロホルムを加えると再びクロロホルム層が赤くなり、濃縮後HPLCにより分析したところ Fig. 3 に示すようにシコニンのピークが確認できた。なお紫雲膏中のシコニンの定量においてはシコニンと夾雑物のピークと重なることを防ぐために、より極性の低い溶媒液を用いてシコニンの溶出を遅らせた。

紫雲膏の保存にともなうシコニン含量の経年変化を検討するために1998年製、1992年製、1987年製の紫雲膏製品についてシコニン含量を定量したところ1998年製では0.0158%、1992年製では

0.0018%、1987年製では0.0010%という結果が得られた。紫雲膏は古くなると赤色から暗赤色に徐々に変化していく。1992年製、1987年製のは新しいものに比べてその赤色が暗くなっていた。このような紫雲膏のシコニン類はそのほとんどが保存にともない分解されていることが明らかとなった (Table 2)。このことは、紫雲膏の保存にともなう赤色から暗赤色への色調の変化とよく一致していた。

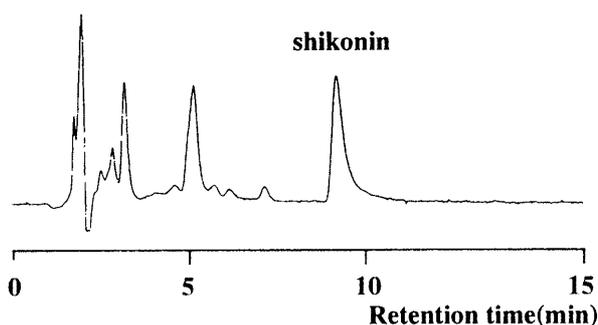


Fig. 3 HPLC chromatogram of the alkali-treated extract of Shiunko

考察

紫雲膏の主要薬効成分の一つと考えられるといわれている naphthoquinone 系色素であるシコニン類の定量法について検討したところ、有機溶媒に溶解した後、アルカリ処理をすることによってシコニン類を水層に分配し油脂と分離させ、同時にシコニン類を加水分解によってシコニンへと変換させることにより簡便に紫雲膏中の全シコニンを定量できた。この方法は紫雲膏の品質基準としてのシコニン定量法として有効である。

Table 2 Shikonin content in Shiunko

Sample Lot No.	Date of production	Shikonin content (mg/g) a)
SI196	September, 1998	0.0158 \pm 0.001
2CO5	March, 1992	0.0018 \pm 0.003
1LO3	December 1987	0.0010 \pm 0.001

a) mean \pm sd (n=3)

日本薬局方ではシコニン含量についての紫根の品質は規定されていないが、紫雲膏製造にあたっては、使用する紫根中のシコニン類の定量が必要であると考えられる。

また古くなって色が変化した紫雲膏では、シコニン類はその殆どが分解していた。従って、これらの紫雲膏ではその効果が著しく減弱していることが予想される。しかし、古い紫雲膏を好んで使う患者も多く存在することから、紫雲膏の薬効とシコニン含量の関係についてはさらなる検討が必要である。

謝辞：本研究は、厚生省厚生科学研究員補助金（医薬安全総合研究事業）の助成を得て実施したものである。

引用文献

- 1) 矢数道明, 漢方処方解説, 創元社, 大阪, pp.195-199, 1966
- 2) 田中康雄, 小谷 功, 薬学雑誌, **92**, 525-530(1972).
- 3) 林 元英, 日薬理誌, **73**, 205-214 (1977).
- 4) 林 元英, 日薬理誌, **73**, 193-203 (1977).
- 5) T. Sekine, K. Kojima, T. Matsumoto, T. Yamamoto, Y. Maitani, T. Nagai, *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 950-952 (1998).
- 6) Y. Ozaki, I. Sakaguchi, M. Tsujimura, N. Ikeda, M. Nakayama, Y. Kato, H. Suzuki, M. Satake, *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 366-370 (1998).
- 7) Y. Yoon, Y.-O. Kim, N.-Y. Lim, W.-K. Jeon, H. J. Sung, *Plant Med.*, **65**, 532-535 (1999)
- 8) S. Hashimoto, M. Xu, Y. Masuda, T. Aiuchi, S. Nakajo, J. Cao, M. Miyakoshi, Y. Ida, K. Nakaya, *J. Biochem.*, **125**, 17-23 (1999).
- 9) T. Hisa, Y. Kimura, K. Takada, F. Suzuki, M. Takigawa, *Anticancer Res.*, **18**, 783-790 (1998).
- 10) Z. F. Plyta, T. Li, V. P. Papageorgiou, A.S.Mellidis, A. N. Assimopoulou, E. N. Pitsinos, E. A. Couladouros, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 3385-3390 (1998).
- 11) 関根隆志, 増水章季, 米谷芳枝, 高山幸三, 河野雅弘, 永井恒司, 薬学雑誌, **118**, 609-615(1998).
- 12) 田中康雄, 小谷 功, 金谷友成, 生薬学雑誌, **28**, 173-178 (1974).
- 13) 京極和旭, 寺山博行, 館 安英, 鈴木 堯, 小松 曼蒼, 生薬学雑誌, **27**, 24-30 (1973).
- 14) S. L. Nickel, T. Carroll, *J. Chromatography*, **295**, 521-525 (1984).