薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
101 (10) 883-890 (1981)

抗炎症剤に関する研究 (第 2 報¹⁾) 黄連の抗炎症活性成分²⁾

大塚紘司,^{*,a} 藤村 一,^b 沢田徳之助,^c 後藤 實^a

武田薬品工業株式会社中央研究所生薬研究所,^a 岐阜大学医学部,^b 京都薬科大学^c

Studies on Anti-inflammatory Agents. II.¹⁾ Anti-inflammatory Constituents from Rhizome of *Coptis japonica* MAKINO²⁾

HIROSHI OTSUKA,^{*,a} HAJIME FUJIMURA,^b TOKUNOSUKE SAWADA,^c and MINORU GOTO^a

Pharmacognostic Research Laboratories, Central Research Division, Takeda Chemical Industries, Ltd.,^a Ichijoji-Takenouchi-cho, Sakyo-ku, Kyoto, Gifu University, School of Medicine,^b Tsukasamachi, Gifu, and Kyoto College of Pharmacy,^c Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto

(Received March 16, 1981)

Berberine-containing plants are fairly widely distributed in the plant kingdom. From old times, they have been used for Chinese medicine or folk medicine.

The Coptidis Rhizoma is especially prescribed in Chinese medicine for the purpose of antiphlogistic, analgesic, sedative, antidotal, hemostatic, and stomachic effects. Among efficacies of the medicine, the antiphlogistic effect has not been evidenced pharmacologically. We have investigated the anti-inflammatory active constituents in the rhizomes of *Coptis japonica* MAKINO by tracing the activity by means of the fertile egg method. Consequently, the active principles have been proved to be berberine, coptisine, jateorrhizine, and palmatine.

Activity of berberine was also confirmed by means of cotton-pellet method, croton oil-granuloma pouch method, and punch method.

Keywords—anti-inflammatory constituents; *Coptis japonica* MAKINO; berberine; coptisine; jateorrhizine; palmatine; fertile egg method; cotton-pellet method; croton oil-granuloma pouch method; punch method

ベルベリン系アルカロイドはメギ科 Berberidaceae をはじめキンポウゲ科 Ranunculaceae, ミカン科 Rutaceae, ツツラフジ科 Menispermaceae など植物分類学的にかなり広く分布することが知られている。これら植物から得られる生薬には古来、本草あるいは漢方で賞用されてきた漢薬も含まれ、黄連、黄柏などはその代表的な生薬である。また熱帯地方にはコロンボ根 (*Jateorhiza columba* MIEBS の根) のほか *Fibraurea chloroleuca* MIEBS が知られ、早くから薬用に供されている。これら生薬は苦味健胃、整腸、止血、鎮咳、解毒などを目的として用いられるほか漢方薬にも処方され、あるいは民間薬では洗眼薬としても重宝されてきた。殊に本草、漢方的な薬効面から考察すると消炎を期待していることが共通した効能であると推察される。例えば瀉心湯類 (三黄瀉心湯、半夏瀉心湯、生姜瀉心湯など) 黄連解毒湯類 (黄連解毒湯、温清飲、柴胡清肝湯など) は炎症性諸症状に対し、消炎を大きな目的として用いられ、外用薬の代表的な民間療法としては黄柏末が打撲、捻挫などの消炎に賞用され、あるいは黄連、小蘗が点眼薬として用いられてきた。

ところがこれら生薬に共通した消炎に関する生物学的研究についてはまだ適確な報告がみられていない。殊に黄連は神農本草経をはじめとする各時代の本草書に収録され、漢方では消炎、鎮痛、鎮静、止瀉、健胃整腸を目的として多くの漢方処方に賞用され、また民間でも健胃、洗眼、打撲の治療などに広く用いられているにも拘らず、重要な薬能の 1 つである消炎の薬理作用については明らかにされていない。

そこで黄連を取り上げ生理活性ならびに成分と作用の関係¹⁾ などを明らかにするため本研究を行ない、2, 3 の知見を得たので報告する。

試料としたメギ *Berberis thunbergii* DC. (Berberidaceae), ナンテン *Nandina domestica* THUNB. (Berberidaceae), ホソバヒイラギナンテン *Mahonia fortunei* FEDDE (Berberidaceae), オウレン *Coptis japonica* MAKINO

(Ranunculaceae), キサントリーザ *Xanthorhiza simplicissima* MARSH. (Ranunculaceae), キハダ *Phellodendron amurense* Rupr. (Rutaceae) をそれぞれ部位別として 50% メタノールエキスをつくり受精卵法³⁾ により検討したところ, オウレンの根茎 (生薬黄連), メギの根, ナンテンの根, ホソバヒイラギナンテンの葉はいずれ

TABLE I. Inhibitory Effect of Berberine-containing Plants on the Granulation Tissue Formation in Fertile Egg Method

Species (Family)	Part ^{a)}	Dose ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	Granulation tissue		Chick embryo	
			Dry wt. (mg)	Inhibition (%)	Wet wt. (g)	Survival ratio (%)
Control		—	8.2 $\pm$ 1.5	—	5.4	19/20
<i>Berberis thunbergii</i> DC. (Berberidaceae)	R	400	3.1 $\pm$ 0.6 ^{b)}	62.2	5.3	14/20
	S	400	4.8 $\pm$ 0.6 ^{b)}	41.5	5.3	17/20
	P	400	5.0 $\pm$ 1.1 ^{b)}	39.0	5.1	18/20
	L	800	5.5 $\pm$ 0.9 ^{b)}	32.9	5.4	19/20
<i>Nandina domestica</i> THUNB. (Berberidaceae)	R	400	3.0 $\pm$ 0.5 ^{b)}	63.4	5.2	18/20
	X	400	5.1 $\pm$ 0.8 ^{b)}	37.8	5.4	16/20
	F	400	5.4 $\pm$ 0.9 ^{b)}	34.1	5.2	14/20
	L	400	4.9 $\pm$ 0.9 ^{b)}	40.2	5.3	19/20
<i>Mahonia japonica</i> THUNB. (Berberidaceae)	R	400	2.9 $\pm$ 0.4 ^{b)}	64.6	5.0	15/20
	B	400	3.9 $\pm$ 0.8 ^{b)}	52.4	5.2	17/20
	X	400	3.4 $\pm$ 0.6 ^{b)}	58.5	5.1	18/20
<i>Mahonia fortunei</i> FEDDE (Berberidaceae)	B	400	3.9 $\pm$ 0.8 ^{b)}	52.4	4.9	13/20
	X	400	3.5 $\pm$ 0.6 ^{b)}	57.3	4.9	16/20
	L	400	2.8 $\pm$ 0.4 ^{b)}	65.9	5.2	15/20
<i>Coptis japonica</i> MAKINO (Ranunculaceae)	Rh	400	3.1 $\pm$ 0.7 ^{b)}	62.2	5.3	14/20
	S and L	400	5.5 $\pm$ 1.3 ^{b)}	32.9	5.4	19/20
	Se	800	8.1 $\pm$ 1.4	1.2	5.6	17/20
<i>Xanthorhiza simplicissima</i> MARSH. (Ranunculaceae)	R	400	4.0 $\pm$ 0.9 ^{b)}	51.2	5.2	16/20
	S and L	800	5.0 $\pm$ 1.1 ^{b)}	39.0	5.4	15/20
<i>Phellodendron amurense</i> Rupr. (Rutaceae)	R	400	4.7 $\pm$ 1.1 ^{b)}	42.7	5.3	15/20
	B	400	3.8 $\pm$ 0.7 ^{b)}	53.7	5.4	14/20
	F	800	7.0 $\pm$ 1.4	14.6	5.5	18/20
	L	400	4.9 $\pm$ 1.0 ^{b)}	40.2	5.3	16/20

a) R: root, S: stem, P: pericarp, L: leaf, X: xylem, F: fruit, B: bark, Rh: rhizome, S and L: leaf and stem, Se: seed.

b) Significant at 5% level in comparison with the control ($p < 0.05$).

TABLE II. Inhibitory Effect of Extracts from the Rhizome of *Coptis japonica* MAKINO on the Granulation Tissue Formation in Fertile Egg Method

Test material	Dose ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	Granulation tissue		Chick embryo	
		Dry wt. (mg)	Inhibition (%)	Wet wt. (g)	Survival ratio (%)
Control	—	8.2 $\pm$ 1.3	—	5.4	20/20
Ether ext.	100	7.7 $\pm$ 1.2	6.1	5.3	14/20
Chloroform ext.	100	4.5 $\pm$ 0.7 ^{a)}	45.1	5.4	18/20
Ethanol ext.	100	4.1 $\pm$ 0.8 ^{a)}	50.0	5.2	19/20
Water ext.	100	7.4 $\pm$ 1.3	9.8	5.4	19/20
5% Hydrochloric acid ext.	100	7.3 $\pm$ 1.0	11.0	5.5	16/20
2% Sodium bicarbonate ext.	100	8.1 $\pm$ 1.1	1.2	5.3	15/20

a) Significant at 5% level in comparison with the control ($p < 0.05$).

もディスク当たり 400 μg (50% メタノールエキス) の用量で約 60% の肉芽抑制がみられ、ベルベリン系アルカロイドを含有するこれらの植物には共通して活性のあることが認められた (Table I).

ついで、黄連をエーテル、クロロホルム、エタノール、水、5% 塩酸溶液、2% 炭酸水素ナトリウム溶液で順次抽出し、得られた各抽出画分の活性ならびに薄層クロマトグラフィー (TLC) で検討したところ、アルカロイド含量の高いクロロホルムエキス、エタノールエキスはディスク当たり 100 μg の用量で約 50% の肉芽抑制が認められた (Fig. 1, Table II).

これらの知見から黄連の活性成分の単離を試みた (Fig. 2). すなわち、黄連のメタノールエキスをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、A-F の 6 画分を得た。A-C の画分はドラージェンドルフ陰性の非アルカロイド画分で、ディスク当たり 500 μg の用量でも肉芽抑制はみられなかった。D-F の画分はドラージェンドルフ陽性のアルカロイド画分で、殊に D 画分はディスク当たり 50 μg の用量で約 40% の肉芽抑制が認められた。そこで本画分をポリアミドカラムクロマトグラフィーに付し、1.0% アンモニア水で溶出し、D-1 画分ならびに D-2 画分を得た。

D-1 画分を 20% ヨー化カリウム溶液でヨード塩とし、

Fig. 1. Thin-layer Chromatogram of Extracts of *Coptis japonica* and Berberine Chloride

Solvent system: $\text{AcOH}-n\text{-BuOH}-\text{H}_2\text{O}$ (7:1:2).

Adsorbent: Silica gel HF₂₅₄-D-O (1:1).

A: ether ext. of *Coptis japonica*.

B: chloroform ext.

C: ethanol ext.

D: water ext.

E: 5% hydrochloric acid ext.

F: 2% sodium bicarbonate ext.

G: berberine chloride.

Fig. 2. Isolation of Anti-inflammatory Active Constituents from Rhizome of *Coptis japonica* MAKINO

^{a)} Inhibition ratio (%) of granulation tissue formation at a dose of 50 μg per disc.

実験の部に記載した方法によって精製し、メタノール性塩酸溶液から再結晶し、ベルベリン塩化物 (I), mp 204°C (dec.) を得た。I の理化学的性状は文献記載⁴⁾のそれと一致し、また標品と混融して融点降下を示さないことから同定した。

D-2 画分は D-1 画分と同様の方法で精製し、ヤテオリジン塩化物 (II), mp 206°C (dec.) を得た。II の理化学的性状は文献記載のそれ^{4a, b, 5)}と一致し、またコロソ根から得たヤテオリジン塩化物と混融し、融点降下を示さないことから同定した。また D 画分を NaBH₄ で還元し、テトラヒドロベルベリン^{4a, 6)} mp 163—165°C, ならびにテトラヒドロヤテオリジン,^{4a, 5)} mp 213—215°C, が得られたことから、それぞれを確認した。

E 画分はディスク当たり 50 μ g の用量で約 40% の肉芽抑制を示した。本画分も前記同様ヨード塩として精製したのちメタノール性塩酸溶液から再結晶し、コプチシン塩化物 (III), mp >300°C, を得た。III の理化学的性状は文献記載のそれ^{4a, 7)}と一致し、混融によって融点降下を示さないことから同定した。

F 画分はアルカロイド画分にも拘らず、ディスク当たり 500 μ g の用量でも作用が認められなかった。本画分の主成分はマグノフロリン塩化物の標品と TLC 上 R_f 値が一致し、紫外線照射 (2537 Å) 下で同じ色調を示すこと、および Gibbs 試薬で同呈色を示すことからマグノフロリン (V) と推定した (Fig. 2)。V は受精卵法により活性が認められなかったことから特に精査はしなかった。

- I : R¹, R² = -CH₂-, R³ = R⁴ = CH₃
 II : R¹ = R³ = R⁴ = CH₃, R² = H
 III : R¹, R² = R³, R⁴ = -CH₂-
 IV : R¹ = R² = R³ = R⁴ = CH₃

Fig. 3. Alkaloids from Rhizome of *Coptis japonica* MAKINO

Fig. 4. Anti-inflammatory Activity of Alkaloids of *Coptis japonica* in Fertile Egg Method

- : berberine chloride.
 ○—○: coptisine chloride.
 ○—○: palmatine chloride.
 ▲—▲: jateorrhizine chloride.

TABLE III. Inhibitory Effect of Berberine and Extract from the Rhizome of *Coptis japonica* on the Granulation Tissue Formation by Means of Cotton-Pellet Method

Test material	Daily dose ^{a)} (mg/kg)	Body weight ^{b)} (g)			Granulation tissue ^{b)}	
		Initial	Final	Gain	Dry wt. $\pm$ S.E. (mg)	Inhibition (%)
Control		113.3 $\pm$ 1.9	142.7 $\pm$ 2.3	29.4	50.1 $\pm$ 7.8	
MeOH ext.	50	108.2 $\pm$ 4.1	130.0 $\pm$ 12.7	21.8	35.2 $\pm$ 2.8 ^{c)}	29.7
Berberine chloride	50	111.4 $\pm$ 3.2	141.2 $\pm$ 3.9	29.9	39.7 $\pm$ 2.2 ^{c)}	20.8
Phenylbutazone	100	99.2 $\pm$ 1.0	120.0 $\pm$ 3.5	20.8	34.9 $\pm$ 2.2 ^{c)}	30.3
Prednisolone	1	105.3 $\pm$ 2.2	125.8 $\pm$ 6.5	20.5	40.7 $\pm$ 2.5	18.8

a) Administration route: *per os*.

b) Average of 12 pellets.

c) Significant at 5% level in comparison with the control ($p < 0.05$).

TABLE IV. Inhibitory Effect of Berberine and Extract from the Rhizome of *Coptis japonica* on the Granulation Tissue Formation and on the Exudation into the Pouches by Means of Croton-Oil Granuloma Pouch Method

Test material	Daily dose ^{a)} (mg/kg)	Mean body wt. ^{b)} gain (g)	Granulation tissue ^{b)}		Exudate ^{b)}	
			Wet wt. $\pm$ S.E. (mg)	Inhibition (%)	Volume $\pm$ S.E. (ml)	Inhibition (%)
Control		14.1	3.37 $\pm$ 0.32		11.2 $\pm$ 1.22	
MeOH ext.	50	19.4	2.45 $\pm$ 0.17 ^{c)}	27.3	8.2 $\pm$ 0.78 ^{c)}	26.8
Berberine chloride	50	25.8	2.52 $\pm$ 0.38 ^{c)}	25.2	10.1 $\pm$ 1.19	9.8
Phenylbutazone	100	15.2	2.72 $\pm$ 0.34	19.3	9.8 $\pm$ 0.95	12.5
Prednisolone	1	1.4	2.27 $\pm$ 0.43 ^{c)}	32.6	7.1 $\pm$ 1.78 ^{c)}	36.6

a) Administration route: *per os*.

b) Average of 12 pellets.

c) Significant at 5% level in comparison with the control ($p < 0.05$).

TABLE V. Inhibitory Effect of Berberine and Extract from the Rhizome of *Coptis japonica* on the Edema Formation by Means of Punch Method

Test material	Dose ^{a)} (mg/kg)	Edema intensity ^{b)} increased (%)	Inhibition ^{b)} (%)
Control		118.4 $\pm$ 6.1	
MeOH ext.	50	83.7 $\pm$ 5.9 ^{c)}	28.5
Berberine chloride	50	72.9 $\pm$ 6.4 ^{c)}	38.4
Phenylbutazone	100	79.5 $\pm$ 5.4 ^{c)}	32.9

a) Administration route: *per os*.

b) Average of six rats.

c) Significant at 5% level in comparison with the control ($p < 0.05$).

TABLE VI. Inhibitory Effect of Known Alkaloids on the Granulation Tissue Formation in Fertile Egg Method

Alkaloids	Dose (μ g/disc)	Granulation tissue		Survival ratio of chick embryo
		Dry wt. (mg)	Inhibition (%)	
Control		7.3 $\pm$ 1.6		20/20
Berberine chloride	50	2.4 $\pm$ 0.3 ^{a)}	67.1	18/20
L-Adrenaline	50	6.4 $\pm$ 1.5	13.3	16/20
Arecoline hydrochloride	50	7.4 $\pm$ 1.4	—	18/20
Betaine hydrochloride	50	7.4 $\pm$ 1.5	—	19/20
Cinchonine hydrochloride	50	5.7 $\pm$ 1.3	21.9	16/20
Emetine hydrochloride	50	5.4 $\pm$ 1.4 ^{c)}	26.0	17/20
Histamine hydrochloride	250	7.5 $\pm$ 1.4	—	19/20
Hydrastine hydrochloride	50	6.8 $\pm$ 1.5	—	14/20
L-Nicotine bi-D-tartrate	50	7.2 $\pm$ 1.4	—	17/20
Papaverine hydrochloride	50	6.0 $\pm$ 1.0	17.8	18/20
Pilocarpine hydrochloride	50	7.9 $\pm$ 1.6	—	13/20
Quinine hydrochloride	50	6.5 $\pm$ 1.4	11.0	14/20
Scopolamine hydrobromide	50	7.0 $\pm$ 1.6	—	13/20
Strychnine sulfate	50	7.0 $\pm$ 1.5	—	15/20
D-Tubocurarine chloride	50	6.8 $\pm$ 1.2	—	11/20

a) Significant at 5% level in comparison with the control ($p < 0.05$).

なお黄連アルカロイドの1つであるパルマチン(IV)については黄連から得られなかったため、コロンボ根から単離した。本品の理化学的性状は文献記載のパルマチン塩化物のそれ^{4a,5)}と一致し、また NaBH_4 で還元してテトラヒドロパルマチン, mp 148—149°C, を得、文献値⁵⁾と一致したことから確認した。

これら黄連アルカロイドを受精卵法により検討した結果、いずれも dose-response 関係がみられ、ベルベリン、コプチシン、パルマチンおよびヤテオリジンが強い肉芽抑制を示すことを認めた (Fig. 4)。

ついで cotton-pellet 法,⁸⁾ croton-oil granuloma pouch 法,⁹⁾ punch 法¹⁰⁾ によって検討し、黄連メタノールエキスをおよびベルベリンにはいずれも抗炎症活性が認められ、フェニルブタゾンに匹敵する作用のあることが確認された (Table III, IV, および V)。

ついでベルベリン系アルカロイド以外のアルカロイドについても同様検討した (Table VI)。すなわち、アレコリン塩酸塩、パパベリン塩酸塩など 14 種類のアルカロイドについて受精卵法により検討した結果、エメチン塩酸塩、シンコニン塩酸塩など 2, 3 種のアルカロイドに弱い活性が認められたにすぎず、他のアルカロイドにはほとんど作用がみられなかった。したがって本実験の範囲内ではベルベリン系アルカロイドの抗炎症活性は特異的なものと推察される。

以上の実験を総括すると、黄連の薬理作用に関しては従来、抗菌作用,¹¹⁾ 鎮座作用,¹²⁾ 胆汁ならびに膵液分泌促進作用,¹³⁾ 血清コレステロール低下作用¹⁴⁾ などが知られているが、抗炎症に関しては報告されていない。本草書や漢方医書には薬効として「目痛、傷、腫痛、腹痛を治す」とされ、消炎に結びつく解釈される記載がみられるが今回著者らの得た実験成績によってこれらの一部が明らかにされたものと考えられる。

実 験 の 部¹⁵⁾

実験材料 武田薬品生薬研究所京都試験農園植栽のメギ *Berberis thunbergii* DC., ナンテン *Nandina domestica* THUNB., ヒイラギナンテン *Mahonia japonica* THUNB., ホソバヒイラギナンテン *Mahonia fortunei* FEDDE, オウレン *Coptis japonica* MAKINO, *Xanthorrhiza simplicissima* MARSH., キハダ *Phellodendron amurense* Rupr. の各部位の乾燥品ならびに市販の黄連 (因州黄連, 丹波黄連, 越前黄連), コロンボ根を用いた。また、薬物は市販の L-アドレナリン, アレコリン塩酸塩, エメチン塩酸塩, L-ニコチン酒石酸塩, D-ツボクラリン塩酸塩 (以上東京化成製), ベタイン塩酸塩, ヒスタミン塩酸塩, パパベリン塩酸塩, キニーネ塩酸塩 (以上和光純薬製), シンコニン塩酸塩, ヒドラスチン塩酸塩, ピロカルピン塩酸塩, スコポラミン塩酸塩 (以上半井化学社製), ストリキニーネ硫酸塩 (E. Merck 社製), フェニルブタゾン (ブタゾリジン®錠-藤沢薬品-から抽出単離), プレドニソロン (武田薬品製), およびベルベリン塩化物 (アルプス薬品製) を用いた。

黄連の系統抽出 黄連末 100 g にエーテル 500 ml を加え、soxlet 抽出器で 5 h 抽出し、エーテル溶液を濃縮してエキス 0.89 g (収率 0.89%) を得た。ついで残渣にクロロホルム 500 ml を加え、2 h 温抽出し、クロロホルムエキス 2.05 g (収率 2.05%) を得た。以下同様にエタノール, 水, 5% 塩酸溶液, 2% 炭酸水素ナトリウム溶液で順次抽出し、それぞれエタノールエキス 4.86 g (収率 4.86%), 水製エキス 1.84 g (1.84%), 5% 塩酸抽出エキス 3.0 g (3.0%), および 2% 炭酸水素ナトリウム抽出エキス 2.59 g (2.6%) を得た。

黄連から抗炎症活性成分の単離 黄連末 200 g にメタノール 1 l を加えて加温抽出し、メタノール溶液を濃縮してエキス 56 g (収率 28%) を得た。本エキスをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、*n*-BuOH-AcOH-H₂O (3:1:1) の混合溶媒で溶出し、A—F の 6 画分を得た。収量 (収率) A 画分: 1.8 g (0.9%), B 画分: 7.5 g (3.8%), C 画分: 5.0 g (2.5%), D 画分: 17.0 g (8.5%), E 画分: 4.0 g (2.0%), および F 画分: 2.7 g (1.4%)。非アルカロイド画分 (ドラージェンドルフ陰性) は A—C 画分で、アルカロイド画分 (ドラージェンドルフ陽性) は D—F 画分である。D 画分をポリアミドカラムクロマトグラフィーに付し、1.0% アンモニア水で溶出し、D-1 画分 (ベルベリン含有) ならびに D-2 画分 (ヤテオリジン含有) を得た。これら含有溶液のそれぞれに 20% ヨー化カリウム溶液を加えてヨード塩とし、得られた懸濁液を 5000 rpm, 15 min 遠心分離し、沈でんを 2.0% ヨー化カリウム溶液で 2 回洗い、遠心分離を繰り返えし、沈でん物を得た。沈でん物それぞれに 1.0% NaOH 溶液を加え、懸濁させ 1/3 量のアセトンを加温しながら徐々に加えて溶かし、一夜放置すると結晶が析出する。本結晶を 5.0% 塩酸溶液で加温しながら溶かし、析出する結晶を 5% 塩酸-メタノール (1:1) 溶液から再結晶して塩化物を得た。ベルベリン塩化物 (I): mp 204°C (dec.). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm: 267, 352. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 1603, 1506 (C=C), 1275, 1235, 1034 (C-O-C)。ヤテオリジン塩化物 (II): mp 206°C (dec.). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm: 265, 352。両成分 I, II は文献記載の理化学的性状^{4,5)}と一致、かつ標品との混融により融点降下を示さな

かった。ついで E 画分を前記同様ヨード塩として精製し、5% 塩酸-メタノール (1:1) 溶液から再結晶し、コプチシン塩化物 (III), 黄褐色針状晶, を得た。mp $>300^{\circ}\text{C}$, UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$: 242, 268, 352. III は文献記載の理化学的性状^{4a,7)}と一致し, 標品との混融により融点降下を示さなかった。F 画分の主成分は TLC 上マグノフロリン塩化物の標品と R_f 値が一致し, 紫外線照射 (2537 Å) 下で同じ色調を示すこと, および Gibbs 試薬で同呈色を示すことからマグノフロリン (V) と推定した。

テトラヒドロベルベリンならびにテトラヒドロヤテオリジンの生成 D 画分 2.0 g をメタノール 30 ml に溶かし, 氷冷下に NaBH_4 0.4 g を加えると激しく発泡するとともに黄色溶液から無色透明溶液に変わり, 一部結晶が析出する。本反応液をエーテルで振り, エーテル層を 5% NaOH 溶液, ついで水で洗い, 乾燥したのち濃縮乾固してアセトンから再結晶し, テトラヒドロベルベリン, mp $163\text{--}165^{\circ}\text{C}$, を得た。NMR (CDCl_3) δ : 3.50 (1H, d, $J=16$ Hz, C-8-H), 3.82 (3H, s, OCH_3), 3.85 (3H, s, OCH_3), 4.25 (1H, d, $J=16$ Hz, C-8-H), 5.90 (2H, s, $-\text{OCH}_2\text{O}-$), 6.58—6.82 (4H, arom. H $\times 4$). NMR データは文献記載¹⁶⁾のそれと一致した。テトラヒドロヤテオリジンは 5% NaOH 層をクエン酸酸性とし, エーテルで抽出, 水洗, 乾燥, 溶媒留去, 残留物をアセトンから再結晶して得た。mp $213\text{--}215^{\circ}\text{C}$. NMR (CDCl_3) δ : 3.52 (1H, d, $J=16$ Hz, C-8-H), 3.85 (6H, s, $\text{OCH}_3 \times 2$), 3.87 (3H, s, OCH_3), 4.26 (1H, d, $J=16$ Hz, C-8-H), 6.65—6.85 (4H, arom. H $\times 4$). NMR データは文献記載¹⁷⁾のそれと一致した。

テトラヒドロコプチシンの生成 E 画分を前記同様に NaBH_4 で還元し, アセトンから再結晶してテトラヒドロコプチシン, mp $219\text{--}220^{\circ}\text{C}$, を得た。NMR (CDCl_3) δ : 3.50 (1H, d, $J=16$ Hz, C-8-H), 4.12 (1H, d, $J=16$ Hz, C-8-H), 5.92 (4H, s, $-\text{OCH}_2\text{O}- \times 2$), 6.58—6.72 (4H, arom. H $\times 4$). NMR データは文献記載¹⁶⁾のそれと一致した。

コロンボ根からパルマチン (IV) ならびにヤテオリジン (II) の単離 コロンボ根末 500 g を 2.5 l のメタノールで室温抽出し, 抽出液の大部分を留去して得られた濃縮液をアルミナカラムクロマトグラフィー (Al_2O_3 : 20—300 mesh, 1 kg) に付し, メタノールで溶出した黄色画分を濃縮し, パルマチン含有の黄色粘稠液を得た。これに 1N 酢酸を加えて加温し, 不溶部を除き, ろ液に 20% ヨー化カリウム溶液を加えてヨード塩とし, その懸濁液を 5000 rpm, 15 min 遠心分離し, 得られた沈殿を 50% メタノールに溶かし, イオン交換クロマトグラフィー (Amberlite IRC-50, NH_3 型) に付し, 1N NH_4OH で溶出し, 少量のヤテオリジン画分を得た。ついで 1N 塩化アンモニウム溶液で溶出するとパルマチン画分が得られ, 本画分を *n*-ブタノールに転溶し, 60°C 以下で濃縮乾固したのち, 再び水に溶かし, 5% 塩酸溶液を加えて析出する黄色結晶をメタノールから再結晶し, パルマチン塩化物 (IV), mp 204°C (dec.), を得た。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm: 267, 352. IV はコプチシン (III) とほぼ同じ R_f 値を示し, 文献記載のパルマチン塩化物の理化学的性状^{4a,5)}と一致し, パルマチン塩化物の標品と混融して融点降下を示さなかった。ついで 50% メタノールで溶出すると赤紅色画分を得, 本画分をパルマチンを得た方法と同様にイオン交換クロマトグラフィーに付し, 1N NH_4OH で溶出し, 溶媒を留去すると橙色の結晶が析出, 5% 塩酸-メタノール (1:1) から再結晶し, ヤテオリジン塩化物 (II) を得た。mp 206°C (dec.). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm: 265, 352. 本品 II は黄連から得られたヤテオリジン塩化物と混融して融点降下を示さなかった。

生物試験法

受精卵法 既報^{1,3)}に準じた。

Cotton-Pellet 法⁹⁾ Wistar 系ラット (体重: 95—115 g, ♀) をエーテル軽麻酔下に背部を除毛し, 消毒後正中線で小切開し, 予め秤量, 滅菌した 30 ± 1 mg の綿球を両腋下部皮下に挿入する。切開部にペニシリンを塗布後縫合する。綿球挿入後 8 日目にラットを屠殺し, 肉芽組織付着綿球を剝離後, $80\text{--}100^{\circ}\text{C}$ で 48 h 乾燥し, 秤量する。肉芽組織乾燥重量は計測値から 30 を減じる。薬物の投与は綿球挿入日から 7 日間, 1 日 1 回経口的に行なった。

Croton-Oil Granuloma Pouch 法⁹⁾ Wistar 系ラット (体重: 120—130 g, ♀) をエーテル軽麻酔下に頸背部を除毛し, その皮下に 20 ml の空気を注入して air sac を作る。この air sac に 1% croton-oil (ゴマ油で稀釈) 0.5 ml を注入し, 約 2 min ゆっくりとラットを回転させ, croton-oil が air sac 全面にいきわたらせる。48 h 後に空気を 12 ml 抜きとる。Air sac を作成後, 11 日目に屠殺し, 肉芽嚢を上面の皮膚とともに剝離し, 嚢を破って滲出液量を計測したのち, 肉芽組織を皮膚から剝離し, 肉芽組織重量 (湿重量) を秤量する。薬物の投与は air sac 作成日から 10 日間, 1 日 1 回経口的に行なった。

Punch Method¹⁰⁾ Wistar 系ラット (体重: 110—125 g, ♀) を固定して背部を除毛後, 正中線で対称になるように左側には 3 か所, 起炎薬として抗ラット家兎血清 5 mg/site/0.05 ml を皮内注射し, 右側には 3 か所, 生理食塩水を同量注射する。注射後 2 h でラットを屠殺し, 剝離した皮膚の起炎剤および生理食塩水投与部位を

皮革打抜用 punch (直径 12 mm) で打抜き, 秤量して浮腫強度を求める。薬物投与は起炎剤投与 1 h 前に経口的に行なった。

謝辞 本研究に当たり, 御懇篤なる御助言をいただいた京都大学化学研究所藤田栄一教授に深謝します。

引用文献および注

- 1) 大塚紘司, 津久井誠, 松岡敏郎, 後藤 実, 藤村 一, 平松保造, 沢田徳之助, 薬誌, **94**, 796 (1974).
- 2) 藤村 一, 沢田徳之助, 後藤 実, 薬誌, **90**, 782 (1970) [速報]; 日本生薬学会武庫川大会, 兵庫, 1970 年 10 月, および第 11 回和漢薬シンポジウム, 岐阜, 1977 年 9 月, で発表.
- 3) P.F. D'Arcy, E.M. Howard, *Br. J. Pharmac. Chemother.*, **29**, 378 (1967).
- 4) a) M.P. Cava, T.A. Reed, J.L. Beal, *Lloydia*, **28**, 73 (1965); b) K. Jewers, A.H. Manchanda, P.N. Jenkins, *J. Chem. Soc.*, **1972**, 1393; c) T. Furuya, K. Syōno, A. Ikuta, *Phytochemistry*, **11**, 175 (1972).
- 5) F. Schwarz, H. Dohnert, *Pharmazie*, **21**, 443 (1966).
- 6) K. Haisová, J. Slavik, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **40**, 1576 (1975); B. Majumder, S.N. Sarkar, P.C. Dutta, *J. Indian Chem. Soc.*, **33**, 351 (1956).
- 7) S.F. Cooper, J.A. Mockle, J. Beliveau, *Planta Medica*, **19**, 23 (1970).
- 8) R. Meier, W. Shuler, P. Desaulles, *Experientia*, **6**, 469 (1950); C.A. Winter, E.A. Risley, G.W. Nuss, *J. Pharm. Exptl. Therap.*, **41**, 369 (1963).
- 9) A. Robert, J.E. Nezamins, *Acta Endocrinol.*, **25**, 105 (1957); H. Selye, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **82**, 328 (1953).
- 10) 山崎英正, 正田昭夫, 日薬理誌, **60**, 65 (1964).
- 11) N.C. Chang, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **69**, 141 (1948).
- 12) 荻庭丈寿, 原田正敏, 薬誌, **82**, 726 (1962).
- 13) 佐藤一二, 京都府立医科大学雑誌, **13**, 710 (1935).
- 14) 青沼 繁, 三村 務, 樽谷正朗, 薬誌, **77**, 1303 (1957).
- 15) 融点は微量融点測定器 (Reichert 社製) によって測定し, 未補正, 赤外線吸収スペクトルは EPI-G2 型 (Hitachi 社製), 核磁気共鳴スペクトルは tetramethylsilane を内部標準物質として HA-100 型 (Varian 社製), 紫外線吸収スペクトルは EPS-3T (Hitachi 社製) を用いて測定した. TLC はシリカゲル HF₂₅₄ (E. Merck 社製) ならびに D-O (CAMAG 社製) の等量混合物を用い, 検出は紫外線ランプ (2537 Å) 下での吸収, ドラーゲンドルフ反応, Gibbs 試薬による呈色, および 10% 硫酸噴霧後, 加熱による呈色によった. カラムクロマトグラフィーにおける担体にはシリカゲル (E. Merck 社製, 0.05—0.2 mm), アルミナ (和光純薬製), およびポリアミド (和光純薬製) を用いた.
- 16) C.Y. Chen, D.B. MacLean, *Can. J. Chem.*, **46**, 2501 (1968).
- 17) S. Pfeifer, I. Mann, L. Dolejš, V. Hanūs, A.D. Cross, *Tetrahedron Lett.*, **1967**, 83.