(c) ψ -methyl 6-acetyl-2-methoxybenzoate [(IX) $R=CH_3$, $R'=CH_3$] (mp 119°) 0.3 g, 水 15 cc, 3%ナトリウムアマルガム 8.3 g で (a) 同様に処理. mp 73~75°, 得量 0.18 g.

(a), (b), (c) の製品と第1報の 7-methoxy-3-methylphthalide と混融して融点降下を認めず.

大阪大学医学部薬学科

Summary

In the course of synthetic studies on degradation products of Terramycin, a series of amino- or hydroxy-substituted derivatives of 3-methylphthalide were prepared and their antibacterial effect was assayed against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia typhosa*, *Brucella melitensis*, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae*, B. C. G., and *Mycobacterium tuberculosis* typus *hominus*. The compounds prepared are presented in the accompanying table together with data on their antimicrobial activities.

(Received February 25, 1954)

122. 笹川義郎：ジギタリスに関する研究 (第1報) ジギタリス・プルブレア葉から Digitalinum verum の分離について

Yoshio Sasakawa : Studies on Digitalis. I. Separation of Digitalinum verum from *Digitalis purpurea* Leaves.

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.*)

さきに著者は石館、岡田と共にジギタリス・プルブレア乾燥葉から得られる水溶性配糖体中に (1) digitalinum verum, (2) purpurea glycoside B および (3) gitoxigenin を母体とする 1 種の配糖体が存在すると予報したが¹⁾, その後石館、岡田²⁾により (3) の配糖体は Tschesche 等³⁾がジギタリス・ラナータの乾燥葉中に発見した gitorin に一致することが証明された. 上記石館、岡田および著者等の報告中 Fraction (以下 Fr. と略) II₄ と呼ばれた部分は最も重要な部分と見られたので, Fr. II から Fr. II₄ に至る精製法として著者は前報¹⁾と異つた方法を行い, その中に digitalinum verum が含有されることを更に確認した. なおジギタリス・プルブレア種子からも digitalinum verum を製造して比較に用いたが, この際始めて本品の結晶化に成功したのでこの事実をも併せて報告する.

Fr. II の主配糖体に Keller-Kiliani 反応を施すと硫酸層はピンク色となり, 酢酸層は無色で gitoxigenin と全く同じ呈色を示すが, Svendsen, Jensen の第1条件 (クロロホルム:メタノール:水=10:2:5, 以下特に断らぬ限り配糖体類の汚紙クロマトグラフィーは本条件によつて行われたものとする.)⁴⁾による汚紙クロマトグラフィーでは原点にのみ螢光を認めるので, この主配糖体は gitoxigenin ではない. Fr. II はこの外配糖体として前報における Fr. III 中の主配糖体 purpurea glycoside B を一部含有している. そこで著者は Fr. II の精製に当り Keller-Kiliani 反応で硫酸層がピンク, 酢酸層が無色, 汚紙クロマトグラフィーで原点にのみ螢光を示す物質を目標に精製した. 炭末クロマトグラフィーによつて分離した Fr. II に慣用の水酸化鉛処理を施した後, サポニン類の混在を顧慮しコレステリンで処理し, さらにアルミナ吸着クロマトグラフィーに2回掛けたが, purpurea glycoside B の微量がどうしても除去できなかつた. そこでメタノール・エーテルによる再洗脱法を繰返し, つ

* Juso-nishino-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka.

1) M. Ishidate, M. Okada, Y. Sasagawa : Pharm. Bull. (Japan) **1**, 186 (1953); 岡田 : 本誌 **73**, 1118 (1953).

2) M. Ishidate, M. Okada : Pharm. Bull. (Japan) **1**, 304 (1953); 岡田 : 本誌 **73**, 1123 (1953).

3) R. Tschesche, G. Grimmer, F. Neuwald : Ber. **85**, 1103 (1952).

4) Anders B. Svendsen, Kjell B. Jensen : Pharm. Acta Helv. **25**, 241 (1950).

いに digitoxose 反応全く陰性の物質を捕捉し得た。本品をクロロホルム：メタノール：水=10：8：5 の溶媒系による counter-current distribution に付し、各部を沝紙クロマトグラフィーで追跡し、前述条件による沝紙クロマトグラフィーでは全く純品と思われる部分を得た。本品をメタノール・エーテルで再沈殿し、さらに希メタノールから再結晶し、これを Fr. II_A 相当部とした。本品は mp 224.2~225.2° (decomp) で後述の種子から製造した digitalinum verum と混融の結果融点降下を起さない。本品は $[\alpha]_D^{18} : +6.5 \pm 0.8^\circ$ (0.612% in CH₃OH) で、毒力は蛙4時間法で 0.0006 mg/kg, 猫法 (ハッチャー・マグヌス法) で 0.7 mg/kg, 鳩法で 0.75 mg/kg である。緩やかな加水分解 (0.3%塩酸を含有する 50%アルコールで 30 分ずつ 2 回加熱) で本品は殆んど反応を受けず、強力な条件 (3%塩酸を含有する 50%アルコールで 8 時間加熱) で始めて加水分解される。反応成績体中ゲン部を希メタノールから再結晶すれば mp 211° の針状晶となり、dianhydrodigitoxigenin であることを混融で明らかにした。その糖部を種々の条件で沝紙クロマトグラフィーにかけ、glucose の他に今 1 つの糖を検出した。後者は東洋沝紙 No. 50 を用い、ブタノール：酢酸：水=4：1：5, 18° で Rf 0.387 を示す。当時平行実験を行っていた岡田氏から送付された Fr. II_A についても同様の条件で加水分解を試みた結果、沝紙クロマトグラフィー上で全く同一の加水分解成績体を得た。なおこれ等加水分解成績体は後述の種子から得た digitalinum verum の加水分解成績体と沝紙クロマトグラフィー上同一であることが判つた。即ち著者ならびに岡田の得た Fr. II_A は糖部として digitalinum verum と同じ glucose および digitalose をもっている。Fr. II_A をアセチル化し、クロロホルム・エーテルから再結晶すると針状晶が得られる。本品の融点は特異で mp 116~169°/226~229°, すなわち二重融点を示し、digitalinum verum hexaacetate のそれに極めて近似し、分析値もまたこれに極めて良く似ている。本品を後述の種子から得た digitalinum verum の hexaacetate と混融したが融点降下は認められなかつた。また 84%硫酸に対する呈色も特異で orange-yellow→orange→rose と時間的に変化し、 $[\alpha]_D^{17} : -15.8 \pm 3.9^\circ$ (0.3165% in CHCl₃) を示し、この点も digitalinum verum hexaacetate と極めて良く一致する⁵⁾。以上の事実から前報¹⁾で述べたようにジギタリス・プルブレア乾燥葉末から得られる水溶性配糖体の 1 割分である Fr. II_A には digitalinum verum が存在することは確実である。なお比較に用いた digitalinum verum は種子から製造したが、その製造方法に関しては Reichstein 等の報告⁶⁾があるが、その後同氏等はこの報告に記載された結晶が digitalinum verum の monoacetate で、digitalinum verum そのものは結晶として捕捉し得なかつた旨の訂正報告⁶⁾を出しているのので、著者は種子から直接 digitalinum verum を得るために、同法を一部次のように変更して目的を達した。すなわちジギタリス・プルブレアの種子 500 g を粉碎、脱脂、抽出、水酸化鉛処理、コレステリン処理に付した後アセチル化して精製する代りにおのおの異つた条件で 3 回アルミナ吸着クロマトグラフィーにかけ、さらにクロロホルム：メタノール：水=10：8：5 を用いて counter-current distribution にかき各フラクションを沝紙クロマトグラフィーで試験した。counter-current 法における 17)~25) の部は沝紙クロマ

digitalinum verum
mp 243.3~244° (decomp)
 $[\alpha]_D^{26} : 1.5 \pm 1.2^\circ$ [Me]
毒力 (鳩法) 1.24mg/kg,
1.30 mg/kg.

Fig. 1. Digitalinum verum
from CH₃OH+H₂O

トグラフィーで純品であることを示した。この部分をメタノール・エーテルで処理後希メタノールから再結晶して針状晶を得た。元来 digitalinum verum は極めて結晶し難い物質で、文献上これを確実に結晶状に得た例を見出し得ない。著者は Reichstein 等の報告にかんがみ、本品が monoacetate または desgluco 体ではないかを疑い種々データを検討したが、本品は digitalinum verum の結晶体でなければならない。本品は mp 243.3~

5) T. Reichstein, K. Mohr : Pharm. Acta Helv. 25, 246 (1949).

6) T. Reichstein, A. Hanger, W. Rittel : Helv. Chim. Acta 35, 434 (1953).

244° (decomp), Keller-Kiliani 反応: 硫酸層はピンク, 酢酸層は無色, $[\alpha]_D^{25}$: $+1.5 \pm 1.2^\circ$ (1.073 % in CH_3OH), 毒力: 猫法 (ハッチャー・マグヌス法) 1.206 mg/kg, 浮紙クロマトグラム: Rf 0.00, 元素分析値は digitalinum verum に 2 分子水の入ったものに一致する. hexaacetate の融点は $164\sim 165^\circ/228\sim 230^\circ$ で Fr. II_A の hexaacetate のそれに近似し, 84%硫酸による呈色および $[\alpha]_D^{20}$: $-16.3 \pm 4.2^\circ$ (0.305% in CHCl_3) であることは総て文献⁷⁾の記載に一致し, 分析の結果も digitalinum verum hexaacetate のそれに完全に一致した.

種子から得た digitalinum verum を既述の強力条件で加水分解するとゲニン部として mp 211° の結晶が得られる. 本品は混融の結果 dianhydrodigitoxigenin に一致し, 糖部を浮紙クロマトグラフィーにかけ glucose および東洋浮紙 No. 50, ブタノール: 酢酸: 水 = 4:1:5 を用い 18° で Rf 0.387 を示す糖を得たが, 後者は明かに digitalose である. 前述したように Fr. II_A は化学的に見て digitalinum verum を含有することは確実であつたが, 唯一の疑問はその毒性で, digitalinum verum に比し前述の如く約 2 倍の毒力を示した. この問題で行き悩んでいたが, 前述のように岡田がこの問題と取組み, gitorin の共存を証明してこの問題が解決されたのであつた.

終りに臨み終始御懇篤なる御指導ならびに御激励を賜つた石館, 小林, 戸木田各教授, 当社三宅専務, 三木常務, 桑田研究所長, 立岡部長に深甚の謝意を表すると共に, 当社ジギタリス関係諸氏特に本研究に協力された今井氏, 生物試験を担当された荒蒔, 萩原両氏, 分析を担当された鈴木, 管, 小林, 中田, 柏木の諸氏, 比旋光度を測定された神尾, 伊藤両氏およびサンプルを分与された岡田氏に感謝の意を表する.

実 験 の 部

I) Fr. II から Fr. II_A の製造 1) 水酸化鉛処理 Fr. II 10 g を 50%アルコール 300 cc に溶かし, 常法に従い新製水酸化鉛で処理し, 母液を約 100 cc に濃縮後, クロロホルム: アルコール = 2:1 で充分抽出する. 抽出液を少量の水, アルカリ, 水で順次洗浄し脱水芒硝で脱水し, 減圧下に濃縮した. 得量 3.0 g.

2) コレステリン処理 上記物質 3.0 g を熱メタノールに溶かし, 1.0 g のコレステリンを 40 cc の熱メタノールに溶かしてこれに加え, さらに水 8 cc を加えて良く振りまぜ, 析出する沈澱を濾過し, 残留物を 80%メタノールで数回洗浄, 洗液を母液に合し減圧下で 50 cc に濃縮し, 水 50 cc を加え, エーテルで 3 回洗浄し, 過剰のコレステリンを除去後, クロロホルム: アルコール = 2:1 で抽出し, 抽出液を脱水後減圧下に濃縮した. 得量 2.573 g.

3) アルミナ吸着クロマトグラフィー a) 第 1 回: 試料 上記コレステリン処理物質 2.573 g, アルミナ (Reichstein の方法で造つた中性アルミナ⁷⁾) 100 g, 筒径 3.5 cm, 筒高 9 cm, 流速 100 cc/20~30 min. 最初試料はこれを 2%アセトン溶液として使用し, 溶媒には順次メタノール含量をふやし, 溶出液は Keller-Kiliani 反応で追跡し, 硫酸層ピンク, 酢酸層無色, 浮紙クロマトグラム Rf 0.00 の物質を目標に分別を行つた. 得量 1.88 g. b) 第 2 回: 試料 上記物質 1.88 g, アルミナ (上記同様) 60 g, 筒径 3.5 cm, 筒高 5 cm, 流速 100 cc/20~30 min. 最初試料は 10%メタノール含有アセトンに溶かして使用し, 順次メタノール含量を増しつつ溶出したが, その方法は第 1 回に全く同様である. 得量 1.3797 g.

4) 再沈澱 上記アルミナ吸着クロマトグラフィーのみでは極く微量の digitoxose 反応を有する物質の完全除去が困難だつたので, メタノールに溶かしエーテルを加えて沈澱させる方法を繰り返し, ついに digitoxose 反応が全く陰性の白色粉末を得た.

5) Counter-current distribution 試料は上記の白色粉末 87 mg, 装置: H.O. Post Scientific Instrument Co. 製 30 本立, 溶媒: クロロホルム: メタノール: 水 = 10:8:5, 13~14°. 5 分間振りまぜ, 5 分間静置後分離を繰り返した. 浮紙クロマトグラフィーによる検査の結果 14~24) は本条件による浮紙クロマトグラフィーで純品であることが判つた. peak 17). 得量 75.3 mg. 本法を反復して得た物質を合し, メタノール・エーテルから再沈澱させ, これをさらに希メタノールから再結晶した. 本品の諸性質は前述の通りである. アセチル体: Reichstein の方法⁷⁾に従つて製造した. 本品は mp $166\sim 169^\circ/226\sim 229^\circ$, $[\alpha]_D^{17}$: $-15.8 \pm 3.9^\circ$ (0.3165 % in CHCl_3) である. 80%硫酸に対する呈色: orange-yellow→orange→rose. $\text{C}_{48}\text{H}_{68}\text{O}_{30}$ (digitalinum verum hexaacetate) 計算値 C 59.73, H 7.12, OCH_3 3.25, 実験値 C 59.38, H 7.09, OCH_3 3.58 (P_2O_5 上 100° , 0.2 mm/Hg, 1 hr 乾燥). 加水分解: 本品 50 mg を 3%塩酸を含む 50%アルコール 10 cc と水浴上で 8 時間加熱した後アルコールを減圧下に除去し, クロロホルムで抽出する. 抽出液を水洗し, 洗液を母液に合し, 脱水後濃縮する. ゲニン部の得量は 25.1 mg で希メタノールから再結晶すると mp $209\sim 211^\circ$ の針状品を得る. dianhydrodigitoxigenin と混融したが融点降下を起さない. 母液を炭酸銀で中和し, 生成する塩化銀を除去後硫化水素で脱銀し, 濃縮乾涸し, さらにメタノールを加えて濾過後再び蒸発乾涸した. 糖部の得量 27.4 mg. 本品を種々

7) T. Reichstein, C. Shoppee: Chromatographic Analysis (a General Discussion of the Faraday Society No. 7) p. 305 (1949).

の条件で汙紙クロマトグラフィーに掛けたが, その 2, 3 を示すと次のごとくである. 東洋汙紙 No. 50, 18°, 試薬: アニリン・ハイドロジェン・フタレートまたは *p*-アニシジン塩酸塩. ブタノール: 酢酸: 水=4:1:5 (下降法) の場合: Rf 0.179 (対照 glucose 0.181), Rf 0.387. 酢酸エチル: ピリジン: 水=2:1:2 (上昇法) の場合: Rf 0.209 (対照 glucose 0.208), Rf 0.387. ブタノール: アルコール: 水=5:1:4 (下降法) の場合: Rf 0.168 (対照 glucose 0.167), Rf 0.355.

II] ジギタリス・プルブレア種子から *Digitalinum verum* の製造 Reichstein の方法⁷⁾ に準じジギタリス・プルブレア種子 500 g を粉碎, 脱脂し, 50% アルコールで抽出後, 水酸化鉛処理しコレステリン処理を行い, その後の精製を次のように行つた.

1) アルミナ吸着クロマトグラフィー a) 第1回: 試料 上記の処理を経た物質 2.648 g, アルミナ (Reichstein の方法で造つた中性アルミナ⁷⁾) 100 g, 筒径 4.5 cm, 筒高 8 cm, 流速 100 cc/20~30 min. 試料はこれをメタノールに溶かして用いた. 展開液は当初メタノール, その後徐々に水を加え最後に 90% メタノールとした. 途中 Keller-Kiliani 反応で追跡し, 硫酸層ピンク, 酢酸層無色で汙紙クロマトグラム Rf: 0.00 の物質を目標にしたことは Fr. II_A 製造の際と全く同じである. 得量 1.7606 g. b) 第2回: 試料 上記の操作で得た物質 1.7606 g, アルミナ (上記同様) 40 g, 筒径 2.5 cm, 筒高 8.5 cm, 流速 100 cc/20~30 min. 試料をアセトン: メタノール=3:1 に溶かし, 展開液には順次メタノール含量を増し, 最後に純メタノールを経て 80% メタノールにまで薄めていつた. 溶出液の集め方は第1回と同様である. 得量 1.2296 g. c) 第3回: 試料 上記の操作で得た物質 1.2296 g. アルミナ (上記同様) 36 g, 筒径 2.5 cm, 筒高 8.3 cm, 流速 100 cc/10~30 min. 上記の試料 1.2296 g をアセトン 240 cc に溶かし, 順次メタノール含量を増し, 以下第2回と同様にして目的物を集めた. 得量 0.6073 g. 本品は Keller-Kiliani 反応では最早 digitoxose 反応を認めないが, 汙紙クロマトグラフィーにより僅かに他種配糖体の混在を知つた.

2) Counter-current distribution 条件は大抵 Fr. II_A 製造の際と同様である. 試料 200 mg, 26°. 汙紙クロマトグラフィーによる試験の結果 17~25) は純品であることが判つた. peak 20). 得量 166.1 mg. 本品についてさらにメタノール・エーテルによる再沈澱法を行い, 希メタノールから再結晶し華麗な針状品を得た. 本品の諸性質は既述通りである. C₃₅H₅₆O₁₄ (*digitalinum verum*) 計算値 C 60.66, H 7.92; C₃₃H₅₆O₁₄·2H₂O (*digitalinum*+2H₂O) 計算値 C 57.67, H 8.01, 実験値 C 57.51, H 7.90 (P₂O₅ 上 100°, 0.2 mm/Hg, 12 hrs. 乾燥). アセチル化: Reichstein の方法⁷⁾ による. mp 164~165°/228~230°. $[\alpha]_D^{20}$: -16.3±4.2° (0.305 in CHCl₃). 84% 硫酸による呈色: orange-yellow→orange→rose. C₄₈H₈₈O₃₀ (*digitalinum verum* hexaacetate) 計算値 C 59.73, H 7.12, OCH₃ 3.25, 実験値 C 59.70, H 7.16, OCH₃ 3.53 (P₂O₅ 上 100°, 0.2 mm/Hg, 1 hr 乾燥). 加水分解: 加水分解の条件は Fr. II_A の場合と全く同様である. ゲニン部: mp 209~211°, 既知 dianhydrodigitoxigenin と混融の結果融点降下を認めない. 糖部: 種々の条件で汙紙クロマトグラフィーを行つた結果, Fr. II_A の場合と全く同様な 2 種の糖を得た. 従つて Fr. II_A は糖として glucose および digitalose を持つと推定される.

武田薬品工業株式会社研究所

Summary

1) Presence of *digitalinum verum* in the water-soluble glycosides obtained from the dried leaves of *Digitalis purpurea* was confirmed by a method different from that given in the previous paper¹⁾.

2) For comparison, *digitalinum verum* was prepared from the seeds of *Digitalis purpurea*, and in this case the substance was obtained in crystalline form for the first time so far as is known.

(Received March 4, 1954)