21. 宮崎道治, 渡邊久禮, 中野 浩, 高野忠義, 森本 明: 海人草成分の研究* (第1報)

駆虫成分カイニン酸の構造に就いて その1

Michiharu Miyasaki, Hisanori Watanabe, Hiroshi Nakano, Tadayoshi Takano,
and Akira Morimoto: Studies on the Components of *Digenea simplex* Ag. I.
Studies on the Structure of Kainic Acid, the Anthelmintic Component. (1).

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

前報¹⁾で著者等は海人草中に、脂肪、脂肪酸、精油、糖類、配糖体、アミノ酸、寒天質等の外に、ニンヒドリンで黄色を呈する未知の物質が存在することを報告した。すなわち海人草水浸液を減圧濃縮したものに就いて、ペーパークロマトグラフを行つた結果、プロリン、オキシプロリン等の泳動値と異なつた、ニンヒドリンで黄色を呈する spot を発見した (Table I)。次にこの部分を汚紙から切り取り、その抽出液に就いて電気泳動を行つたと、陽極側に泳動する酸性物質であることを認めた。(Fig 1)

Table I

Developer	Sample	Proline	Hydroxy-proline
BuOH-AcOH (4:1)	0.49	0.32	0.17
4-Ethylpyridine-BuOH (2:1)	0.50	0.34	
Pyridine-BuOH (2:1)	0.09	0.20	
BuOH-HCOOH (100:1)	0.28		
PhOH-H ₂ O (4:1)	0.56	0.80	

Fig 1

ここで著者等はこの未知の物質が或いは海人草の有効成分ではないかと考え、之を多量に含むフラクションを作りシマミズ筋標本に依る薬理試験²⁾を行つたところ、他のフラクションに比し、遙かに強い作用のあることが分つた。この結果、有効成分は著者等の予期したごとくこのフラクションに多量に含まれ、しかも上記ニンヒドリンで黄色を呈する酸性物質であるとの確信を得るに到つた。故に本物質の単離を行つた結果、mp 253~254° (decomp) の無色針状晶が得られた。取量は使用した原料に依つて異なるが、大体 0.02~0.06%であつた。次ぎにこの結晶に就いての薬理³⁾及び臨床試験⁴⁾の結果は、前記フラクションと同様の作用を示すが、効力はそれより遙かに強力なことが認められた。

また本物質が村上等⁴⁾が海人草から発見されたカイニン酸と同一物質であることが同定の結果明らかにされた。

カイニン酸は、元素分析値及び結晶水測定の結果、C₁₀H₁₅O₄N·H₂O なる組成を有する。各種展開剤に依る Rf 値は、Table III に示す通りである。

Table III

Developer	Rf
BuOH-AcOH (5:1)	0.54
Pyridine-BuOH-H ₂ O (5:10:10)	0.22
" (5:10:5)	0.20
PhOH-NH ₄ OH (100:1)	0.85~0.87

Fig. 2

* 本誌 74, 215 (1954) 参照。

** Kashima-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka.

3) 田村, 田中: 本誌 74, 454 (1954).

1) 渡辺, 高野, 本誌 73, 529 (1953).

2) 未発表

4) 村上, 竹本, 清水: 本誌 73, 1026 (1953).

本物質は熱湯には易溶, 水に可溶なるも, エタノール, アセトン, エーテル, 及びベンゾール等の有機溶媒には難溶であるか不溶である. $[\alpha]_D^{25}$: -12.7° (水, $c=1$) 水溶液は酸性を呈し, 滴定値から算出される分子量は, 212 で (理論値 213) その組成に良く一致する. PK' は 2.16, 4.57, 10.42 である. 鉛, 銅, バリウム等と, 水に難溶性の塩を形成する. また本物質はニンヒドリン溶液で λ_{max} 429 $m\mu$ の黄色色素を形成する. (Fig. 2) Folin 反応は橙色を呈し, プロリン, オキシプロリンに類似する. 過クロル鉄溶液では赤褐色を呈する. ニトロプルシッドソーダあるいはニトロソ化による 2 級アミンの反応は陽性. メトキシ基, エトキシ基は存在しない. カルボニル試薬によるカルボニル試験は陰性である. 乾留及び Se 脱水素により炭酸ガスを発生し, 松材反応及びエールリッヒ反応陽性の油状物を伴ない, $C_{16}H_{18}O_2N_2$ なる mp 140° の針状晶を僅かみ生ずる.

また本物質はブロム, 過マンガン酸カリを消費し不飽和性を示す. 故に酸化白金を触媒として還元を行くと, 1 mol の水素を吸収して, mp 285° (decomp), $[\alpha]_D^{25}$: -37° (水, $c=1$,) の無色針状晶が得られ, 元素分析値はジヒドロカイニン酸 $C_{10}H_{17}O_4N$ に一致する. 故にカイニン酸には, 二重結合 1 個が存在することが判明した. ジヒドロカイニン酸はカイニン酸同様ニンヒドリンで黄色を呈し, Fig. 1 に示すごとく 426 $m\mu$ に吸収極大がある. 乾留により松材反応, エールリッヒ反応共に陽性の物質を生成する. 酸性を示し, 滴定に依る分子量は 216 で理論値 215 にほぼ一致する. PK' は, 2.12, 4.23, 10.62 である.

カイニン酸を無水酢酸でアセチル化すると, $C_{12}H_{19}O_4N$ なる組成を有する mp 186° , 無色針状の N-アセチルカイニン酸無水物が得られる. 同様にジヒドロカイニン酸からも $C_{12}H_{17}O_4N$, mp 183° , 無色針状の N-アセチルジヒドロカイニン酸無水物が得られる.

次に常法によりメタノール塩酸でカイニン酸及びジヒドロカイニン酸をエステル化すると, カイニン酸から mp 126° のジメチルエステルの塩酸塩 $C_{12}H_{19}O_4N \cdot HCl$, bp 133° のジエステル $C_{12}H_{19}O_4N$, 及び mp 180° (decomp) のジメチルエステルメチルメチオダイド $C_{14}H_{24}O_4NI$ が, ジヒドロカイニン酸から, mp 157° のジメチルエステル塩酸塩 $C_{12}H_{21}O_4N \cdot HCl$, bp 140° のジメチルエステル $C_{12}H_{21}O_4N$, 及び mp 158° (decomp) のメチルメチオダイド $C_{14}H_{26}O_4NI$ が得られる. ジアゾメタンによつても同様カイニン酸ジメチルエステル, ジヒドロカイニン酸ジメチルエステルが得られる. カイニン酸, ジメチルエステルの氷点降下法に依る分子量は 243 である.

カイニン酸及びジヒドロカイニン酸は紫外部には特異なる吸収は認められない. 赤外部には Fig. 2 に示すごとく, イミド基, カルボニル基の吸収が認められる. すなわちカイニン酸では, 2.84 μ , (NH), 5.90 μ (COOH), 6.18 μ (COO $^-$) に, ジヒドロカイニン酸には 5.80 μ , (COOH), 6.18 μ (COO $^-$) に吸収がある. ジエステルでは 6.18 μ の吸収は消失する.

以上の結果, カイニン酸は $[C_8H_{12}]$, COOH, COOH, NH, F, H_2O なる構造を有する一種の不飽和イミド酸なることが推定された.

本研究に当り終始御指導御鞭撻を賜つた刈米教授, 同定の労をとられた村上教授に謝意を表すると共に発表を許可された藤沢友吉社長, 結晶製造に御協力された中原栄三工場長に厚く感謝の意を表する. 赤外分析を担当された大阪市立大学山口正夫氏, 実験の一部を担当された京大生物薬品化学の方々, 当研究所の紙谷 孝, 刈米和夫の両氏, 元素分析を担当された岩田秀子, 太田茂輝両氏に厚く謝意を表する.

Fig. 2

Fig. 3

実 験 の 部

有効フラクションの製造 海人草 1.5 kg を約 10 倍量の水で 2 回 浸出し浸液を合せ可及的に 60° 以下の温度で濃縮し、エキス状となし、これをメタノールで温浸すること 2 回、抽出液を合せこれを蒸発して得たエキスを 60% エタノールに溶解し、濾過して不溶物を除去し濾液を活性アルミナを充填した塔を通過させ、吸着物を先ず、70% エタノールで脱着して可溶分を除去後、50% エタノールで脱着し、これを濃縮して 13 g の淡黄色粉末を得。

カイニン酸の製造 海人草水浸エキスをメタノールで抽出して不溶物を除去したメタノール浸液を、活性アルミナをつめた塔を通過させ、吸着物を 60~70% エタノールで洗滌、40% エタノールで溶出する。溶出液からエタノールを留去しこれに塩基性酢酸鉛液を加えて生ずる沈澱をとり、水に浮遊させ硫化水素で脱鉛後、減圧濃縮するに結晶析出。これを 80% エタノール、水等から再結晶を行い mp 253~254° (decomp) の無色針状品を得。 $C_{10}H_{15}O_4N \cdot H_2O$ 計算値 C 51.9, H 7.4, N 6.1, 実験値 C 51.78, H 7.69, N 6.35。

カイニン酸の結晶水の測定 恒量になる迄風乾したカイニン酸 185.5 mg を無水磷酸上減圧で 110° に恒量になる迄乾燥する (4 時間)。減失量 14.5 mg 故に減失% $14.5/185.5 = 7.82\%$ 、結晶水 1 mol としての理論値 7.79%。

カイニン酸の分子量 カイニン酸 84.7 mg を 50 cc の水に溶解し、フェノールフタレンを指示薬として 0.1N -NaOH (F=0.9814) で滴定する。NaOH の消費量 1.10 cc、故にモノカルボン酸とすると、その分子量は

$$\frac{0.0847 \times 1000}{1.10 \times 0.09814} = 212.8 \quad (\text{計算値 } 213)$$

カイニン酸の熱分解 カイニン酸 700 mg を、250~300° に少時保ち、冷後赤褐色残渣をエーテルで数回抽出。抽出液を合わせ芒硝で乾燥後、エーテルを留去。残存せる赤色の油分は冷却すると直ちに結晶化する。これを 95% エタノールから再結晶すると mp 140° の淡黄色の結晶を得。本結晶は有機溶媒に可溶なるも水に不溶で、ニンヒドリン反応、エーデルリッヒ反応、過クロル鉄反応、イサチン反応共に陰性、松材反応陽性。 $C_{16}H_{18}O_2N_2$ 計算値 C 71.01, H 6.66, N 10.04, 実験値 C 71.30, H 6.72, N 10.03。

ヒドロカイニン酸 カイニン酸 0.5 g を 500 cc の水に溶解し酸化白金を触媒として接触還元を行うと、速やかに 1 mol の水素を吸収する (計算値 49.8 cc, 実験値 51.2 cc)。還元後、減圧下に濃縮すると結晶析出。

濾取して水、80% エタノールから再結晶すると mp 284° (decomp) の無色針状品を得。 $C_{10}H_{17}O_4N$ 計算値 C 55.8, H 7.9, N 6.52, 実験値 C 55.93, H 7.72, N 6.62。

ジヒドロカイニン酸の分子量測定 ジヒドロカイニン酸 51.2 mg を 50 cc の水に溶解し、フェノールフタレンを指示薬として 0.1N NaOH (F=0.9814) で滴定すると、NaOH の消費量 2.405 cc。故にモノカルボン酸とするとその分子量は $\frac{0.0512 \times 1000}{0.09814 \times 2.405} = 217$ 計算値 215)。

N-アセチルカイニン酸無水物 カイニン酸に 10 倍量の無酢を加え、110° に 1 時間加温後、減圧濃縮すると結晶を析出。これを濾取し 95% エタノールで洗滌し、無酢から再結晶すると mp 186° の無色顆粒状の結晶を得。本物質は水に冷時不溶なるも温時徐々に分解して溶解する。その水溶液は酸性を呈する。エーテル、エタノールに不溶。エーデルリッヒ反応、イサチン反応、ニンヒドリン反応何れも陰性。 $C_{12}H_{15}O_4N$ 計算値 C 60.07, H 6.33, N 5.91, 実験値 C 60.06, H 6.35, N 6.08。

N-アセチルジヒドロカイニン酸無水物 ジヒドロカイニン酸をカイニン酸と同様アセチル化して、mp 183° の結晶を得。本物質は冷時水に不溶なるも、温時徐々に分解して溶解し酸性を呈する。 $C_{12}H_{17}O_4N$ 計算値 C 60.2, H 7.1, N 5.8, 実験値 C 60.43, H 7.39, N 5.77。

カイニン酸ジメチルエステル塩塩塩 カイニン酸 1.5 g を 5% HCl 含有無水メタノール 30 cc に溶解しこれを水浴上に 3 時間加温後、可及的低い温度で濃縮して得た粘稠な油分を無水メタノールに溶解し、これに無水

エーテルを加えて放置すると細針状晶を析出。これをメタノール・エーテルより再結晶, mp 126° 本物質はニンヒドリンで黄色を呈する。C₁₂H₁₉O₄N·HCl 計算値 C 51.8, H 7.2, N 5.04, 実験値 C 51.59, H 7.32, N 5.28.

カイニン酸ジメチルエステル カイニン酸ジメチルエステル塩酸塩を少量の水に溶解し水で冷却しながら, 重曹液にてアルカリ性となしエーテルで抽出, 抽出液を芒硝で脱水後, 減圧蒸留を行う。bp₃ 133° 本物質はニンヒドリンで黄色を呈する。

カイニン酸ジメチルエステルの分子量測定 カイニン酸ジメチルエステル 50 mg を 1.75 g のベンゾールに溶解し, 氷冷するに氷点降下 0.6° を示す。

$$5120 \times \frac{0.05}{0.6 \times 1.75} = 243 \quad (\text{理論値 } 241)$$

カイニン酸ジメチルエステルメチルメチオダイド カイニン酸ジメチルエステル塩酸塩 0.4 g を NaOH 50 mg を溶解したメタノール 4 cc に溶解し, これにヨードメチル 4 cc を加え水浴上に 1 時間加温後, 更にヨードメチル 2 cc, NaOH 50 mg を含むメタノール 4 cc を加えると液はアルカリ性となる。冷時振盪し液がアルカリ性を呈しなくなつた後, 水浴上に 30 分間加温。これを濃縮すると黄色の油状物を得。本物質は直ちに固化する故, アセトンより再結晶すると mp 180° (decomp) の細針状晶 0.2 g を得。C₁₄H₂₄O₄NI 計算値 C 42.3, H 6.05, N 3.53, 実験値 C 42.19, H 6.26, N 3.79.

ジヒドロカイニン酸ジメチルエステル塩酸塩 ジヒドロカイニン酸 1.6 g をカイニン酸と同様, エステル化すると mp 158° の結晶 1.4 g を得。本物質はニンヒドリンで黄色を呈する。C₁₂H₂₁O₄N·HCl 計算値 C 51.51, H 7.93, N 5.01, 実験値 C 51.52, H 8.24, N 5.12.

ジヒドロカイニン酸ジメチルエステル ジヒドロカイニン酸ジメチルエステル塩酸塩からカイニン酸の場合と同様にして, bp₃ 140° の油状物質を得。本物質はニンヒドリンで黄色を呈する。

ジヒドロカイニン酸ジメチルエステルメチルメチオダイド ジヒドロカイニン酸ジメチルエステル塩酸塩 0.2 g を無水メタノール 4 cc に溶解し, これにヨードメチル 2 cc を加え, 1.5 時間加温後, 更に 1/2 mol に相当するナトリウムメトオキサイドのメタノール液及びヨードメチル 1 cc を加え 2 時間加温した後, 減圧濃縮し残渣を無水クロロホルムで抽出して無機物を除去後, クロロホルムを留去。ここに得た残渣をアセトンから再結晶して無色柱状晶 0.2 g を得。mp 155~157° (decomp) C₁₄H₂₀O₄NI 計算値 C 42.1, H 6.55, N 3.51, 実験値 C 42.38, H 6.79, N 3.65.

カイニン酸ジメチルエステル (ジアゾメタンによる) カイニン酸 2 g を粉末となし氷水で冷却下に, ジアゾメタンのエーテル液⁹⁾ (2 mol) の半量を加えると共に, 2~3 滴の水を加えて攪拌すると激しく窒素を発生しつつ 2~3 分後に脱色する。次に残余のエーテル液を 4 回に分けて加え, 2 時間攪拌を続けると結晶は殆んどエステル化されエーテルに溶解。このエーテル液を脱水芒硝で乾燥, 減圧蒸留し, bp₃ 133~135° の無色の油を得。本油分のメチルメチオダイドは mp 180° を示す。C₁₄H₂₄O₄NI 計算値 C 42.3, H 6.05, N 3.53, 実験値 C 42.40, H 6.08, N 3.36.

藤沢薬品工業株式会社研究所

Summary

Kainic acid, C₁₀H₁₅O₄N·H₂O, the anthelmintic principle, was extracted from *Digenea simplex* Ag., in 0.02~0.06% yield. Kainic acid is soluble in water, forming an acid solution, and is sparingly soluble or insoluble in ethanol, acetone, ether, and benzene. Molecular weight, 213; pK', 2.16, 4.57, 10.42; $[\alpha]_D^{25}$: -12.7°. It gives positive reaction for secondary amine, colors yellow with ninhydrin, and this yellow substance possesses the absorption maximum at 429 mμ. The dry distillation of kainic acid resulted in evolution of carbon dioxide, formation of a pyrrole-like substance giving positive pine splinter and Ehrlich reactions, and needle crystals of m.p. 140°, corresponding to the formula C₁₀H₁₈O₂N₂. Kainic acid possesses one double bond and forms dihydrokainic acid, m.p. 285° (decomp.), C₁₀H₁₇O₄N, $[\alpha]_D^{25}$: -37°. Acetylation of kainic acid with acetic anhydride gives N-acetylkainic anhydride, C₁₂H₁₅O₄N, and the same with dihydrokainic acid gives N-acetyldihydrokainic anhydride, C₁₂H₁₇O₄N. Esterification of kainic and dihydrokainic acid respectively yields the dimethyl ester of b.p. 133° and b.p. 140°. Kainic acid does

5). C. A. 46, 1961 (1952).

not show a marked absorption in the ultraviolet region but the absorptions of -NH , -COOH , and -COO^- appear in the infrared region. From the foregoing results, a structure of unsaturated imido acid of $(\text{C}_8\text{H}_{12}) (\text{COOH})_2 \cdot \text{NH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ with one double bond has been proposed.

(Received October 7, 1954)

22. 宮崎道治, 渡邊久禮, 中野 浩, 高野忠義, 森本 明: 海人草成分の研究 (第2報)
 駆虫成分カイニン酸の構造に就いて その2

Michiharu Miyasaki, Hisanori Watanabe, Hiroshi Nakano, Tadayoshi Takano,
 and Akira Morimoto: Studies on the Components of *Digenea simplex* Ag. II.
 Studies on the Structure of Kainic Acid, the Anthelmintic Component. (2).

(Research Laboratory, Fujisawa Pharmaceutical Industries, Ltd.)

先に著者等はカイニン酸に2個のカルボキシル基と1個のイミド基を有する一種の酸性イミド酸を推定したが, カイニン酸の性質がプロリンと可成り類似するため, それが含窒素五員環の骨核を有するものではないかと考えた. 故にその証明として先ず第一に Hofmann 及び Emde 分解に依る開環反応を試みた. 即ちカイニン酸のジメチルエステルメチオダイドを Emde 分解し, 更にヨードメチルでメチル化すると mp 275° (decomp) のカイニン酸メチルメチオダイド Na 塩を得. この結果カイニン酸ジメチルエステルには Emde 分解が行われない事が判つた. 同様にカイニン酸の Emde 分解, ジヒドロカイニン酸ジメチルエステルの Hofmann 分解等を行つたが, 何れも開環は行われなかつた. この事は赤外線吸収スペクトル (Fig. 1) に依つても証明された. 然しカイニン酸及びその誘導体は果して Emde 及び Hofmann 分解が行われないかどうかには他の条件に依り更に検討の余地があると思われる.

Fig. 1

第二にカイニン酸をピロール誘導体に導きそれに依り環の証明を試みた. そのためにカイニン酸のゼレン, 亜鉛, 及び硫黄に依る脱水素反応を試み, 松材反応で紅紫色, Ehrlich 反応紅紫色を呈する油状物を得たが収量悪くこれを原料として研究を進める事が出来なかつた. 又前報に於いて述べた如くカイニン酸を直接熱分解して, この油状物の外に mp 140° , $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N}_2$ (Fig. 4) 組成の物質も得られたが, 何れも収量悪く検討する事が出来なかつた. 最後にソーダ石灰で乾留を行うと, 50%の好収量で前記呈色反応を示す油状物が得られた. 酸性磷酸カリ飽和溶液で塩基性物質を除去後蒸留すると bp₂₅ 67° のピロール体様臭気を有する油状物を 20%の収量で得ることが出来た. 元素分析の結果 $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}$ に良く一致する. 本物質は松材反応, Ehrlich 反応共に陽性にして空氣中に放置すると直ちに着色し除々に樹脂化する. 赤外線スペクトルには示す如くピロール体の吸収を示し且つイソプロピル基を有する事が推定された.