検量曲線の作製：P-I 水溶液（濃度 $\sim 300\gamma/\text{cc}$ ）1.5cc をとり定量法に準じて操作し，別に蒸留水 1.5cc を同様に処理した液を対照とし $E_{450\text{m}\mu}$ （層長 10mm）を測定し，常法により検量曲線を作製（Table I）。

定量法の検討 （i） P-I 分解物の酸処理アルミナによる吸着：P-I の分解物中ピラジン酸及び INA は添加した EtOH の影響を受ける事なく酸処理アルミナに吸着除去される。なお洗浄菌体浮游液の調製に際して pH 4.0 $\sim$ 9.0 にわたる Clark-Lubs 緩衝液を使用し，その一部を直接酸処理アルミナに通じているので，その試料 pH 及び塩類の本法に及ぼす影響を検討するため，P-I を pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 の Clark-Lubs 緩衝液に溶かして各 20mg % 溶液とし，定量操作に準じて処理した液に就て測定を行つたが何れも影響は認められなかつた。

（ii） ニトロプルシドナトリウムによる P-I の呈色：ニトロプルシドナトリウムによる P-I の呈色は Fig. 6 のく $450\text{m}\mu$ に吸収の極大を有し比較的安定である。

京都大学医学部薬学科

UDC 547.99 : 582.677

245. 河野信助, 松尾明美：シキミ有毒成分の研究（第1報）

Nobusuke Kawano and Akemi Matsuo: Studies on
the Toxic Components of *Illicium Anisatum* L. I.

(Pharmaceutical Faculty, University of Nagasaki*)

Of the four kinds of crystals reported as poisonous component of Japanese star anise (fruit of *Illicium Anisatum*) (Table I), Lane's anisatin alone seems to be a unity and others must be a mixture. Extraction of anisatin is best effected by using the fruits from which seeds have been removed. A good result was obtained by the counter-current distribution method with water and ethyl acetate in isolating pure anisatin and pseudoanisatin from crude crystals (Fig. 1). Toxicity of various parts of this plant was compared by measuring LD_{50} with mice (Table II).

(Received April 17, 1958)

シキミ果実が生薬の大茴香と混同されて屢々中毒事件を起した事は周知の事実であり，有毒成分に関する研究もかなり多いが¹⁾，結晶状に単離されたのは比較的少なく Table I に示される4種に過ぎない。著者らは従来の抽出法を再検討して二三の知見を得た。

Table I.

Name of toxin	m.p.	Formula
Sikimin ²⁾ (Eijkmann)	175°	$\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_5$
Hananomin ³⁾ (Misaki)	185°	$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$
Anisatin ⁴⁾ (Lane)	215 $\sim$ 220°	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_8$
Shikimin ⁵⁾ (Kajimoto)	213°	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_8$

先ず Lane 等の実験を追試して mp 219 $\sim$ 220° の針状晶を得，その $[\alpha]_D$, CH 分析値，赤外部吸収スペクトル及び毒性等からこれが anisatin である事を確認した。次に Hananomin はシキミの種子のみを抽出して得られた物質であるが，これを追試して mp 206 $\sim$ 213° の結晶少量を得た。物質少量の為更に精製する事が出来なかつたが $[\alpha]_D$, 赤外部吸収スペクトル及び anisatin との混融試験の結果本品は不純な anisatin であると考えられた。更に果被のみについて anisatin の抽出を試みたがこの場合は脱脂の必要がなく 0.037% の収量で

* Showa-machi, Nagasaki.

1) 文献 3) の緒論に詳なり。

2) J. F. Eijkmann: Pharm. J. and Trans. **11**, 1046 (1881).

3) 三崎：愛知医 **39**, 1123 (1932).

4) J. F. Lane, W. T. Koch, N. S. Leed, G. Gorin: J. Am. Chem. Soc. **74**, 3211 (1952).

5) Y. Kajimoto, H. Fujimori, K. Hirota: Tokushima J. Exptl. Med. **2**, 104 (1955).

anisatin を得る事が出来た。これは Lane 等の方法によつて得られた 0.022% の収量よりかなりよく、果実中果被の量は 88.5% であるから anisatin の抽出には予め種子を除き果被のみについて行う方が得策である事を知つた。なお古い果実では収量が劣るがこれについては別に報告する。

Lane 等は無毒成分として co-anisatin mp 279~282° $[\alpha]_D^{25} -24^\circ$ $C_{13}H_{18}O_8$ 及び pseudoanisatin mp 200~210°, $[\alpha]_D^{25} +59^\circ$, $C_{21}H_{32}O_8$ の存在を報告しており特に前者は anisatin の不純物として混晶をつくる為に純粋の anisatin を得る事が困難な点及び再結晶法によると粗結晶から anisatin の収量が甚だ悪い点を指摘している。著者等は anisatin 再結晶母液から得られる不純な結晶について向流分配 (C.C.D.) 法による分離を試みた。即ち水と酢酸エチルとを用いて行えば不純物の含有率によつてその曲線は異なるが Fig. 1 に示される様に 2 つの山があり K (分配係数) = 3.3~3.5 の部分から anisatin を回収する事が出来、K = 1.0 附近を酢酸エチルから再結晶すると mp 207~208°, $[\alpha]_D^{13} +43^\circ$ の結晶を得る。その性状は co-anisatin ではなくてむしろ pseudoanisatin の性質に一致している。更に co-anisatin を分離する為に anisatin の粗結晶について向流分配法を繰返して行つて見たがそれに相当するものを分離し得なかつた。また pseudoanisatin の分析値及び分子量は Lane 等の $C_{21}H_{32}O_8$ よりもむしろ $C_{23}H_{34}O_8$ に近くその赤外部吸収スペクトルは Fig. 2 に示される様に anisatin に

Fig. 1. C.C.D. of Anisatin (I), Pseudoanisatin (II) and Mixed Samples (III, IV)

Dotted lines show the substance contained in upper layer (AcOEt).

Fig. 2. Infrared Absorption Spectra of Anisatin (I) and Pseudoanisatin (II) (in Nujol)

見られる 5.49μ (酸無水物) の吸収がない. anisatin の粗結晶を分離した母液にはかなり多量の無晶形粘稠物があり強い毒性を有している. この部分についても向流分配法による分離を試みたが先の場合の様に anisatin 部 (結晶状に得られるものは少い) と pseudoanisatin 以外のものは認め難く僅かに $K>4$ の部分にその臭気から safrole その他精油の存在が考えられた. 著者らは純粹の anisatin を濃硫酸に溶解させても殆んど発色しないが pseudoanisatin は赤色を呈して溶解し両者の混合物ではその割合に応じて淡赤色～紅色を呈する事実を見出した. 先に種子から得た結晶を濃硫酸中に投入すると淡紅色を帯びて溶解し果被から得た不純 anisatin も同様であつた. 従つて種子から得た結晶の不純物は pseudoanisatin と考えられ梔本等の shikimin についても同じ事が推察される. これは結晶の炭素分析値が anisatin と pseudoanisatin との中間にある事からも察せられる. anisatin と pseudoanisatin とが混晶を作り易い事は picrotoxin が有毒の picrotoxinin と無毒の picrotin との混晶である事とよく似ており興味ある事実と思われる.

シキミの樹皮や根にも強い痙攣毒が含有されている事は既に知られているが⁶⁾, 著者らはその毒性を比較する為に各部の流動エキスをつくりマウスに対する LD_{50} を測定した. 比較のため anisatin 及びこれと分子式並びに薬理作用の酷似する picrotoxin 及び coriamyrtin についても同様に測定しその結果を Table II に示した.

Table II. LD_{50} (mouse-Behrens)

	mg./kg.
Fruit without Seed	510
Seed	2,170
Root bark	3,500
Leaf	4,600
Bark	5,100
Anisatin	0.7
Picrotoxin ⁷⁾	4.0
Coriamyrtin	1.1

使用した果実は採集後半年経過したもの, 樹皮, 葉, 根皮は4月採集したものについて測定した. これによると果実の毒性は主として果被にある事は明らかで果被と種子との重量比 (88.5 : 11.5) から果実全体の LD_{50} を算出すると 701mg/kg となる. 果実の毒性が anisatin のみに基くとすれば毒性から考えて果実中 anisatin の含量は 0.1% となる. pseudoanisatin の毒力を知る為に 100mg/kg を与えてみたが殆んど異常は認められなかつた.

終りに本研究に対し多大の御援助を与えられた学部長高取治輔教授に深謝する. また本学学生山口邦子, 井上節子, 深田弘治の諸君は実験に協力され, 元素分析は太田久子嬢によつて行われた. なお本研究費の一部は文部省科学試験研究費を以つてこれに当てた. 併せて謝意を表する.

実 験 の 部

果実から Anisatin の分離 10月採集した長崎県五島産の材料を半年～1年後に使用した. 果実 3.0 kg を用い Lane 等の報告通りに処理してシキミ酸粗結晶約 200g を分離した後 AcOEt エキス 14g を得. これを酸処理したアルミナ (Brockmann) を用いてクロマト分離し析出した粗結晶を iso-PrOH から再結晶し mp 214～219° の anisatin の針状晶 640mg を得. 更に再結晶母液から混合結晶 140mg (mp 188～195°, $[\alpha]_D^{15} +17^\circ$, 分析値 C 58.81, H 7.33) を得. 先に粗結晶を分離した母液からも同様 580mg (mp 180～193°, $[\alpha]_D^{15} +14^\circ$, 分析値 C 58.20, H 6.79) 及び 140mg (mp 179～187°) の結晶を分離. anisatin 結晶 (mp 214～219°) を更に iso-PrOH から2回再結晶し mp 219～220° の無色針状晶を得. $C_{15}H_{20}O_8$ (anisatin) 計算値 C 54.87, H 6.14 実験値 C 55.28, H 6.47. $[\alpha]_D^{27} -28^\circ$ (1% AcOEt). I.R. λ_{max}^{Nujol} 2.89, 3.40, 3.51, 5.49, 5.79, 6.81 μ . LD_{50} 0.7 mg/kg.

種子から Anisatin の分離 種子 3.5kg を粉碎後 trichloroethylene で脱脂し残査を風乾後更に微粉末と

6) 高橋: 岡山医 40, 1991 (1928); 吉田, 林田: 長崎医 12, 239 (1934).

7) picrotoxin の約半分は無毒の picrotin であるから picrotoxinin については約 2.0 と考えられる.

し同様に2回脱脂する。各回室温で3時間振盪後濾別洗浄, 種子油約1kgを分離, 脱脂残査を風乾後95% EtOHで5回抽出, 毎回室温で5時間振盪後濾別洗浄, 抽出液を減圧濃縮して赤褐色ゼリー状物質を得, これを100ccずつの石油エーテルで2回温浸した後(混入油脂の除去)温湯400ccを加えて振盪溶解させ, 不溶分を濾去し冷後濾液に100ccずつの CHCl_3 を加えて数回抽出を繰返す。 CHCl_3 層を集め溶媒を留去すると結晶析出。少量の*iso*-PrOHから再結晶し mp 190~195°の針状晶約100mgを得。 $[\alpha]_D^{23} -31^\circ$, 分析値 C 56.26, H 6.77. 更に*iso*-PrOHから2回再結晶し mp 206~213°. I.R. $\lambda_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ 2.94, 3.42, 3.50, 5.58, 5.83 μ . 本品を anisatin (mp 219~220°) と混融して mp 210~215°.

果被から Anisatin の分離 果被粉末 (30 mesh) 2.5kg を毎回 6L. の 95% EtOH で2回室温にて抽出。以下果実の場合と同様に行い AcOEt エキス 16g を得。これを AcOEt 320cc に溶解後酸処理したアルミナ (Brockmann) 280g を用いてクロマト分離。(i) 320cc, (ii) 340cc, (iii) 180cc, (iv) 180cc, (v) 300cc の AcOEt を順次加えて展開し対応する流下液を集め溶媒を留去し放置すれば (ii), (iii), (iv) から結晶析出。(ii) の結晶を濾取し CHCl_3 で洗浄して 1.9g を得。分離した無晶形部分は約 3g. 結晶を*iso*-PrOH から再結晶し mp 205~212°の anisatin 粗結晶 680mg と mp 210~217°のもの 260mg を得。再結晶母液に CHCl_3 を加え放置すれば mp 175~190°の結晶 770mg を得。(iii) からは mp 186~197°の結晶 700mg を得たが本品は conc H_2SO_4 により赤色を呈す。

向流分配法による分離 互いに飽和した水と AcOEt 各 10cc を用い30本立で行う。毎回50回振り30本に2~3時間を要す。操作後各管毎に分液し水浴上に溶媒を留去して重量法により測定。anisatin 90mg を用いた場合 Fig. 1 (I) の曲線を, pseudoanisatin 160mg から同 (II) を得た。前項 (ii) より得た結晶 (mp 175~190°) 400mg について行い (III) の結果を得。無晶形部分の内 450mg について行い (IV) の結果を得た。何れも点線は上層 (AcOEt) 中に溶存していた量を示す。(III) の22, 23, 24 の結晶を集め*iso*-PrOH から再結晶し mp 209~215°の anisatin 結晶 20mg を得。

Pseudoanisatin (III) の13~19の7本から粗結晶を集め AcOEt から再結晶して mp 200~203°の無色砂晶状 150mg を得。更に2回再結晶し mp 207~208°. $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_9$ (pseudoanisatin) 計算値 C 60.78, H 7.54, 分子量 454.5, 実験値 C 60.67, 60.72, H 7.24, 7.44. 分子量 (Rast 法) 447, 452. $[\alpha]_D^{13} +43^\circ$ (1% AcOEt) I.R. $\lambda_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ 2.29, 2.78, 2.96, 3.30, 5.82, 6.78 μ (Fig. 2).

シキミ流動エキス作製法 風乾した生薬粉末 (30 mesh) 20g を秤取し 95% EtOH で3回室温にて抽出。毎回 100cc の新溶剤と共に3時間攪拌後濾別し残査を EtOH 20cc で洗浄し濾液に合す。以上3回の EtOH 浸出液を合せ約 60°水浴上で減圧濃縮し EtOH 及び水分(精油の大部分も)を完全に留去してエキスとする。これに約 60°の温湯 20cc を加え30分間攪拌溶解させ冷後 Hyflosuper-cel (Johns-Manville) 1g を加え乾燥濾紙を用いて濾過しこれを原液とする。本原液及び其の希釈液が濁った場合は上澄液を用う。原液 1cc は生薬 1g に相当する。

毒性試験 前項の原液を適宜希釈し1回に5匹のマウスを用いて, その 0.02cc/g を腹腔内に注射し 3~4時間観察後 Behrens 法によつて LD_{50} を算出した。マウスは 15~20g のものを用い気温 15~25°, 湿度55~85%で行った。