て AcOEt で抽出を行い, 5% NaOH で洗浄し水洗して Na_2SO_4 乾燥後溶媒を留去. 残渣 5.8 g を得. これを EtOH 36 cc, KOH 2.7 g と共に水浴上 3 時間加熱還流後溶媒を留去し, Et_2O 抽出を行い, 2% HCl に転溶し, 再び K_2CO_3 アルカリ性として, Et_2O 抽出. K_2CO_3 上乾燥後溶媒を留去して, 粘稠油 216 g を得. 収率 58%. picrolonate: EtOH から再結. mp 172° ; 黄色短針状晶. $\text{C}_{34}\text{H}_{33}\text{O}_5\text{N}_5$. 計算値 C 63.84, H 5.20, N 10.95, 実験値 C 64.04, H 5.32, N 11.05.

3,4,5,6-Tetrahydro-8,9-dibenzoyloxy-1,5-methano-1H-2,5-benzoxazine (X') (IX') 油状物 1.2 g を無水 EtOH 1 cc に溶解し, HCl-EtOH を加えて HCl 塩とする. 溶媒を留去して, 水 10 cc に溶解し, 35% ホルマリン 5 cc を加え水浴上に 1.5 時間加熱後減圧下水分を留去し, 再び水にとかして K_2CO_3 アルカリ性で Et_2O 抽出を行う. K_2CO_3 で乾燥後溶媒を留去し, 固い飴状物 0.8 g を得. 減圧蒸留し, bp_{0.01} $195\sim 200^\circ$ の粘稠油 0.4 g を得. EtOH に溶解し, picrate とする. EtOH から再結. mp 145° の黄色針状晶. 0.38 g. $\text{C}_{31}\text{H}_{28}\text{O}_{10}\text{N}_4$. 計算値 C 60.38, H 4.58, N 9.09, 実験値 C 60.41, H 4.72, N 8.75. この picrate を水に浮べ Et_2O を加え NH_4OH で遊離塩基とする. Et_2O 層を乾燥後 Et_2O を留去して, 0.16 g の粘稠油を得.

3,4,5,6-Tetrahydro-8,9-dihydroxy-1,5-methano-1H-2,5-benzoxazine (XII) (X') picrate より得た遊離塩基 0.5 g を 50% EtOH 20 cc に溶解し, 10% Pd-C 0.5 g を加え常圧接触還元を行う. 2 mol の H_2 を吸収して止む. 濾過して溶媒を留去し, 水と加して NaHCO_3 アルカリ性で AcOEt 抽出を行い, 溶媒を Na_2SO_4 乾燥後留去して油状物 0.3 g を得. 暫時にして結晶化する. mp $104\sim 108^\circ$. HCl 塩結晶化困難. picrate: EtOH から再結. mp 210° , 黄色針状晶. $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_{10}\text{N}_4$. 計算値 C 46.79, H 3.70, N 12.84, 実験値 C 47.15, H 3.98, N 13.08.

田辺製薬株式会社大阪研究所

UDC 547.94.05 : 582.675.1 : 545.84

44. 岡本敏彦, 満岡珪太郎*: イオン交換クロマトグラフィーによる トリカブト塩基の分離¹⁾

Toshihiko Okamoto and Keitaro Mitsuoka*: Separation of Aconite Alkaloids
by Ion Exchange Chromatography.

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo**)

Various aconite alkaloids were successfully separated with the use of ion exchanger, Amberlite IRC-50, by stepwise elution with phosphate-acetate-borate buffer of different pH. It was thereby clarified that the adsorption of a base on this ion exchange resin was not in parallel with the pK value of the base and there is a certain amount of non-ionic adsorption.

(Received July 14, 1958)

先に著者等はトリカブト塩基のイオン交換樹脂による抽出法について報告したが²⁾, さらに各種トリカブト塩基を単離する目的でイオン交換クロマトグラフィーを行い, その粗塩基より良好な結果でそれぞれの成分塩基の分離に成功した.

従来イオン交換クロマトグラフィーによる分離はアミノ酸等については種々報告されているが³⁾, 植物塩基の純粋分離に応用した例はみられない. 一般にトリカブト塩基はそのアルカミンの水酸基がアセチル, ベンゾイル基等によりアセチル化されたエステル型塩基がかなりの数を占めており, これらの塩基は強酸性樹脂により加水分解するおそれがあるので, 本報においては弱酸性樹脂 Amberlite IRC-50 を使用して実験を行つた. 本樹脂はその交換容量の大きい点[†]も本目的にかなつたものである. 溶出方法は段階的に pH を変えた緩衝液を用いて分離

* Present address: Sato Pharmaceutical Company, Oh-i, Shinagawa-ku, Tokyo.

** Motofuji-cho, Bunkyo-ku, Tokyo.

1) Aconitum-Alkaloids 第 22 報.

2) 岡本, 他: 本誌 74, 1405(1954).

3) C. H. W. Hirs, W. H. Stein, S. Moore: J. Biol. Chem., 200, 493(1953); E. Lederer, M. Lederer: "Chromatography", 184, (1954) Elsevier Publishing Company.

† 最大交換能: 10.0~10.2 m.e./g.(乾燥樹脂).

するいわゆる step wise 法により行つた。即ち遊離型の Amberlite IRC-50 に塩基を少量の 3% 酢酸に溶解しさらにリン酸-酢酸-硼酸緩衝液⁹⁾にて pH を 5.8 付近に調製した試料溶液を流しこんだ後、pH を 5, 4, 3, 2 と順次段階的に変えたリン酸-酢酸-硼酸緩衝液で溶出した。溶出液は一定量ずつとりそれぞれ炭酸ソーダにてアルカリ性とした後クロロホルム・メタノール混液で抽出して得られた塩基は直接秤量により定量した。

先ず基礎実験として溶出の状況を見るため、緩衝液にエタノールを含有させあるいは溶出時加温する等条件を変化させて検討した。Fig. 1 に *mesaconitine*⁵⁾ および *songorine*⁹⁾ について行つた結果を示す。この結果より緩衝液のエタノール含量を増大すると溶出は良好となるがその peak が高 pH 域にずれ分離操作上好ましくなことが判つた。また溶出時の温度をあげることは明らかに溶出を良好にし好結果をあたえる。しかしながらエステル型の塩基に対しては溶出時温度をかけることは加水分解が問題となつてくる。この点最も危険性のあるエステル型の *mesaconitine* について 50° における溶出液の全フラクションをそれぞれペーパークロマトグラフィーによつて検討したが、加水分解物である *benzoylaconine* あるいは *aconine* は認められなかつたので、少なくともこの程度の温度では加水分解の心配ないことがわかつた。本報においては以下緩衝液のエタノール含量 10%, 溶出時の温度 50° の条件を使用した。

Fig. 1. Elution Curves of Meseaconitine and Songorine eluted by Phosphate-Acetate-Borate Buffer (containing EtOH)

本邦産トリカプトの成分塩基は落合等⁷⁾によりアルミナクロマトグラフィーを用いてすでに多数の成分が分離されている。Fig. 2 は落合等によつて分離された各種のトリカプト塩基についてそれぞれの溶離曲線を示したものであり、塩基の種類によりその peak にかんがりの差があることが認められる。本溶離曲線よりみて一般に次のことがいえる。即ち Shimoburo base-II,⁸⁾ Ashio base-I,⁹⁾ songorine⁹⁾, Kajigamori base⁹⁾, Takao base¹⁰⁾, kobusine¹¹⁾ の如きアルカミン型の塩基は溶出しやすく、ignavine⁵⁾, hypognavine^{3,9)}, isohypognavine^{6,10)} の如くモノベンゾイル型のは溶出がかなり強い酸性域においておこなわれる。この二種の型の塩基は溶出が完全であり良好な結果を与えている。これに対して *aconitine*⁹⁾, *mesaconitine* の如くアセチルベンゾイル型塩基は本条件では溶出があまり良好でない。

Fig. 3 は 2 種の塩基を混合した場合の溶離曲線であり各塩基はそれぞれ 50 mg, 樹脂は 11×200 mm のカラムを使用したものである。a (Ashio base-I, hypognavine) および b (songorine, isohypognavine) の場合は非常によい結果を示しているが c (songorine, Shimoburo base II) の場合は peak は一つであり混合した部分

4) E. B. R. Prideaux: Proc. Roy. Soc. (London) A **92**, 463(1916).

5) 落合, 他: 本誌 **72**, 816(1952).

6) 落合, 他: 本誌 **75**, 638(1955); 菅沢: Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) **4**, 6(1956); K. Wiesner, et al.: Experientia **14**, 167(1958). (Shimoburo base-I, songorine および napelonine は同一物).

7) 落合, 他: Aconite alkaloids, (第 1 報~第 18 報), 本誌および Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 1952~1957.

8) 落合, 他: 本誌 **75**, 1436(1956).

9) 落合, 他: 本誌 **76**, 1423(1956).

10) 落合, 他: 本誌 **76**, 551(1956).

11) 杉野目, 他: Ann. **545**, 220(1940).

a) Ashio base + Hypnognavine

- ① Ashio base
 $C_{19}H_{23}(N-C_2H_5)(OH)_2(OCH_3)_3$
- ② Kajigamori base
 $C_{23}H_{37}O_6N$
- ③ Kobusine
 $C_{20}H_{25}N(OH)_2$
- ④ Shimoburo base-II
 $C_{18}H_{20}(N-C_2H_5)(OH)_2(OCH_3)_3(C=O)$
- ⑤ Songorine
 $C_{19}H_{24}(N-C_2H_5)(OH)_2(C=O)$
- ⑥ Takao base
 $C_{19}H_{24}(N-C_2H_5)(OH)_4(OCH_3)_3$
- ⑦ Aconitine
 $C_{19}H_{19}(N-C_2H_5)(OH)_8(OCH_3)_4(OBz)(OAc)$
- ⑧ Hypnognavine
 $C_{20}H_{23}N(OH)_3(OBz)$
- ⑨ Ignavine
 $C_{20}H_{22}N(OH)_4(OBz)$
- ⑩ Isohypnognavine
 $C_{20}H_{23}N(OH)_3(OBz)$
- ⑪ Mesaconitine
 $C_{19}H_{19}(N-CH_3)(OH)_8(OCH_3)_4(OBz)(OAc)$

Fig. 2. Elution Curves of Aconite Alkaloids
Sample, 50 mg., Amberlite
IRC-50, 11 × 100 mm.

c) Songorine + Shimoburo base-II

b) Songorine + Isohypnognavine

d) Songorine + Shimoburo base-II

Fig. 3. Separation of Alkaloid Mixtures (Alkaloid, 50 mg., Amberlite IRC-50, 11 × 200 mm.)

の量が多い。しかしながらこの場合も同一 pH の緩衝液即ち pH 5 のもののみを使用してクロマトグラフィーを行えば d に示すように良好な結果を与え, Fig. 2 においてかなり接近した溶離曲線を示すものでも充分分離が可能である。

さらに本分離の方法を各地産トリカブトより抽出した粗塩基について応用した例を東京都浅川城山産¹⁰⁾のものおよび京都府芦生産⁹⁾のものについて Fig. 4 に示す。a は城山産トリカブト粗塩基 324 mg., IRC-50, 11×200 mm, b は同塩基 9.596 g, IRC-50, 20×320 mm について行つた例であり, いずれも Shimoburo base-II, Takao base-I, isohypognavine を好収量で得た。c は芦生産トリカブト粗塩基 447 mg について IRC-50, 11×200 mm のカラムで行つた結果であり, Ashio base-I および hypognavine を得た。これらの結果は全く従来の分析結果に一致し, 本方法はその分離能の優秀なことおよび大量処理し得る点でアルミナクロマトグラフィーによる分離法に優るとも劣らぬ方法である。しかしながら aconitine, mesaconitine 等を含有する粗塩基の分離に関してはなおその条件を多少検討する必要がある。

a) Shiroyama (城山) base, 324 mg.
IRC-50, 11×200 mm.

b) Shiroyama (城山) base, 9.596 g.
IRC-50, 20×320 mm.

c) Ashio (芦生) base, 447 mg. IRC-50, 11×200 mm.

Fig. 4. Separation of Crude Alkaloids

上に指摘した如くアルカミン型の塩基は比較的溶離されやすく即ち域 pH において溶離され, これに反してエステル型のものは溶離し難いがこの溶離結果を示した Fig. 2 と次の Table I に示した pK 値を比較するに特に相関関係のないことが明らかである。即ち本分離法においては非イオ的な吸着¹²⁾が相当大きな役割を演じていることが考えられる。なお aconitine, mesaconitine 等の場合溶離が困難となるのはその分子の大なるため樹脂の網目構造よりの離脱が困難となることも同時に推測される。

12) D.E. Weiss: Nature **166**, 66(1950).

Table I. pK Values of Aconite Alkaloids.

		in 50% MeOH	in 50% Methylcellosolve
1	Ashio base	8.90	9.02
2	Kajigamori base	7.36	—
3	Kobusine	8.20	8.98
4	Shimoburo base-II	5.81	5.41
5	Songorine	8.19	7.91
6	Takawo base-I	6.49	6.12
7	Aconitine	7.60	7.50
8	Hypognavine	7.64	7.72
9	Ignavine	7.73	7.79
10	Isohypognavine	7.99	8.21
11	Mesaconitine	7.51	7.20

本研究に当り御鞭撻を頂いた落合英二教授に深く感謝致します。

実 験 の 部

リン酸-酢酸-ホウ酸 緩衝液¹⁾ A 液 H_3PO_4 (90%) 46.14 g. AcOH 24.00 g. H_3BO_3 24.74 g に蒸留水を加えて全量 1000 cc とする。

B 液 2N NaOH

上記の A 液および B 液を下記の比に混合し、さらに EtOH 40 cc および蒸留水を加えて全量 400 cc とする。EtOH 含量により最後に A 液あるいは B 液を加えて pH を調節する。

pH	5	4	3	2
A 液 (cc.)	200	200	200	200
B 液 (cc.)	63	53	45	30

操 作 試料一定量を取り可及的少量の 3% AcOH に溶解した後 pH 6.5 の上記緩衝液を加えて pH 5.8 に調節する。これを 10% EtOH 含有蒸留水で予かじめ洗った遊離型 Amberite IRC-50 のカラムに流し込み、ついで 10% EtOH 含有蒸留水で洗った後、pH を段階的に変化させながら上記の緩衝液で溶出す。溶出液は一定量あてフラスコにとり、各フラクションはこれに Na_2CO_3 を加えてアルカリ性とし、さらに食塩を飽和した後 CHCl_3 (MeOH 含有) にて抽出する。 CHCl_3 留去後残渣を乾燥秤量して定量した。各成分の同定はそれぞれ純品と混融あるいはペーパークロマトグラフィーにより行つた。溶離時の温度は樹脂管に外套をつけてこれに恒温槽よりの一定温度の水をまわして調節した。

pK 値の測定 試料各約 20 mg をとり 50% MeOH あるいは 50% メチルセロソルブ 20 cc に溶解し、0.02N HCl 液にて滴定して半中和点を求めた。

東京大学薬学部