ベクトル共に前記化合物に一致する。

(3) 前記 1,4,5-thiadiazepine を熱 propylene glycol にて 1 mg/cc の液とし第3報¹⁾に準じ *Staph. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*, *Aspergillus niger*, *Trychophyton mentagrophytes*, *Mycobact. tuberc.* 607 および *Mycobact. tuberc.* H 37 Rv について抗菌力を検したがいずれも 100 γ /cc では抑制を示さなかつた。

第一製薬株式会社高槻工場

UDC 547.918 : 582.951.6 : 544.65-1

117. 笹川義郎：ジギタリスに関する研究（第4報*） ジギタリス・プルブレアの B 系配糖体と Jensen の蛍光定量用試薬¹⁾ の反応成績体 その 1
 沕紙クロマトグラフィーによる研究

Yoshio Sasakawa : Studies on Digitalis. IV. Products in the Reaction of B Series Glycosides in *Digitalis purpurea* L. with Jensen's Reagent for Fluorescence Determination. (1). Studies by Paper Partition Chromatography.

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

Determination of glycosides having no deoxysugar, such as digitalinum verum and strosposide, with Jensen's reagent always gives a value higher than the theoretical one for the first several hours. To make the cause clear, gitoxigenin, strosposide, purpurea glycoside B, digitalinum verum, and gitorin were allowed to react with Jensen's reagent, and the products were investigated by paper chromatography at regular intervals during the reaction.

(Received October 16, 1958)

Jensen は 1951 年 gitoxigenin (Gg) の蛍光定量法を発表し¹⁾, その後数年間に沕紙クロマトグラフィーと蛍光定量法とを併用するジギタリス配糖体相互の分離定量法を確立した²⁻³⁾. その際 B 系配糖体の代表として Gg, gitoxin (G), purpurea glycoside B (PB) の 3 者を用い, これらについて定めた条件を B 系一般の配糖体の定量条件とし, かつその蛍光は dianhydrogitoxigenin ($\Delta^{14,16}$ -Gg) によつて生ずるものとした^{1,2)}. 著者は digitalinum verum (Dv) を定量する必要に迫られ, 上記の条件にならつて定量したが, Dv および Strosposide (S) では Gg, G, PB らの場合とややその趣きを異にすることに気付いた。

すなわち後 3 者の場合 20° で 15 分ぐらいから定量値が一定値を示すのに反し (Fig. 1)[†], Dv および S では Fig. 2 に示すごとく定量値は 6~7 時間後になつてはじめて一定する。その反応物質がその後 16~17 時間安定なことは Jensen が後 3 者について述べている^{1,2)} のと一致している。一般に配糖体において 2-deoxysugar をもつたものはケン化され易く, 持たないものはケン化され難い傾向を示すことが知られているので, 定量値が一定となるまでに, $\Delta^{14,16}$ -Gg に至る中間物質の生成が予想される。

そこで著者は 2-deoxysugar を持つた配糖体 PB, それを持つた配糖体 S, Dv, gitorin (Gr) ならびにゲニン (Gg) が Jensen の B 系配糖体定量用試薬によつて生成する物質を, 沕紙クロマトグラフィーで時間的に検討した結果, 一般に考えられていることとはやや異つた結果を得た。

まず最初に Jensen の B 系配糖体定量用試薬を検討した。Jensen は種々検討の結果アルコール類ことにグリ

* 第3報：本誌 75, 946(1954)。

** Juso-nishino-cho, Higashi-yodogawa-ku, Osaka.

1) K.B. Jensen : Acta pharmacol. et toxicol. 8, 101(1952).

2) K.B. Jensen : Ibid. 8, 110(1952).

3) K.B. Jensen : Ibid. 9, 66, 99, 275(1953); 10, 69, 347(1954); 12, 11, 20, 27(1956); 13, 381(1957).

† gitorin は 2-deoxysugar を含まぬ糖であるが Fig. 1 型の定量曲線を示す。この点についてはさらに後報で詳しく報告する。

Curves of the Change of Determination Values

Fig. 1.

Fig. 2.

セリンで薄めた塩酸を用いているが、著者はグリセリン・塩酸 (1:1) とメタノール・塩酸 (1:1) を併行して用いてその生成物を検討した。反応後の処理からみるとメタノール・塩酸 (1:1) の方が便利であることを知った。

なおここで用いた配糖体はすべてジギタリス・プルブレア乾燥葉から分離した単一品であつた。Dv はさきに著者によりジギタリス・プルブレア種子からはじめて結晶状に取り出され⁴⁾、その後宮武等によつて確認されたが⁵⁾、今回これをジギタリス・プルブレア葉からはじめて結晶状に得ることができた。

また Gr の融点は Tschesche⁶⁾ によれば 205~212° であるが、著者の精製して得たものは 239~241° で、希アセトンから球状に析出したが、結晶化するには至らなかった。

Gg, PB, Dv, S, Gr の各配糖体 1 mg ずつをグリセリン・塩酸 (1:1) の各 1.5 cc ずつにおのおの別々に溶かして 20° に保ち、種々の時間経過後の内容を薄紙クロマトグラフィーで検べた。

Gg は直ちに $\Delta^{14,16}$ -Gg を生じ、PB ははじめの数分間に Gg となり PB の存在を示さなくなり同時に $\Delta^{14,16}$ -Gg を生じその量を増してゆく。定量の結果では 10~15 分後に一定となつているのにこの試験の結果で 20 分後にもなお Gg の存在が認められるのは、定量の際の濃度とこの試験の時の濃度に差があるためと思われる。このことは Gg そのものの反応結果を検べた場合も全く同様であつた。

なお Gr は 2-deoxysugar を含め管であるのに薄紙クロマトグラフィーの結果は PB の場合に近似し、定量曲線が Fig. 1 型を示す事実と一致した。

Dv, S の場合ははじめの数分間でごく一部 Gg の生成を示すが、大部分は $\Delta^{14,16}$ -Gg に至る中間物質と認められる物質を生じ、その後徐々に $\Delta^{14,16}$ -Gg を生成することがわかつた。

なおこの中間物質は検出試薬で処理する以前から $\Delta^{14,16}$ -Gg と同様紫外線によつて螢光を発する。

すなわちジギタリス配糖体には Jensen の B 系配糖体定量用試薬により

1) はじめにケン化を受けて Gg となり、つぎに脱水を受けて $\Delta^{14,16}$ -Gg になるもの (deoxysugar を持つた配糖体ならびに Gr)。

2) はじめに中間体を生じ、つぎにケン化を受けて $\Delta^{14,16}$ -Gg になるもの (deoxysugar をもたぬ配糖体、ただし Gr を除く) の 2 群があり、後者が $\Delta^{14,16}$ -Gg になりきるまでに相当の時間を要することがわかつた。

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朝比奈泰彦先生、石館守三教授、当社桑田研究所長、立岡第 2 部長に深甚の謝意を表するとともに、本研究に協力された当研究所員今井俊司、岡堀 潤阿氏に感謝の意を表する。

実 験 の 部

I) 乾燥ジギタリス葉末から結晶状 Dv の製造 1) 粗ジギタリス配糖体混合物の製造：乾燥ジギタリス葉末 1 kg を MeOH 5 L で 2 回温浸して MeOH エキスを作り、EtOH 300 cc と 50° に加温溶解し、これに 50° に加温した AcOEt 2.7 L を加える。冷後析出する物質を傾斜して分離、沈殿にはさらにもう 1 回同じ操作を施して上澄液を集める。無水 Na_2SO_4 で脱水後減圧下で濃縮乾固、最後に真空乾燥。つぎに 5 倍量の無水 Et_2O を用い、 Et_2O が着色しなくなるまで数回 Et_2O で洗浄し最後に真空乾燥してデンケーター中に保存する。得量 30 g。本品 200 g を 10% NaHCO_3 溶液 5 L に溶解し、 Et_2O 4 L で 4 回抽出して Et_2O 可溶部を除去。これに活

4) 笹川：本誌 74, 474(1954)。

5) K. Miyatake, A. Okano, K. Hoji, T. Miki: Pharm. Bull. (Tokyo) 5, 157(1957)。

6) R. Tschesche, G. Grimmer, F. Neuwald: Chem. Ber. 85, 1103(1952)。

性炭を 300 g 加え、配糖体を吸着させて母液を除去し、10% NaHCO_3 溶液および水でよく洗浄する。つぎに MeOH および $\text{MeOH} \cdot \text{CHCl}_3$ (1:1) を用い配糖体を抽出、抽出液を減圧下で濃縮乾固。得量 70 g。

2) Dv 分離用原料の製造：上記粗ジギタリス配糖体混合物を 50% MeOH 1.5 L に溶解し、常法により酢酸鉛処理を行う。母液を常法にしたがい H_2S で脱 Pb 後減圧下で濃縮。析出物を aq. MeOH および AcOEt から交互に再結晶して微黄色の粉末を得。得量 8 g。

3) 粉末母紙を用いた分配クロマトグラフィーによる精製：粉末母紙：310 g. column：径 5.9 cm, 高さ 33 cm. 溶媒系： $\text{AcOEt} \cdot \text{MeOH} \cdot \text{水}$ (8:2:5)。粉末母紙を塔に固く充填し、はじめに溶媒系の下層を流し、つぎに流出液に完全に上層が現われるまで上層を流し続ける。その後上記原料 900 mg を上層 100 cc に溶かしたものを添加し上層で溶出を行う。溶出液を各 30 cc フラクションコレクターで分取し、分取した液について同じ溶媒系を用いた母紙クロマトグラフィー（上昇法，17°，飽和 16 時間以上，展開距離 20 cm 以上，使用母紙東洋母紙 No. 51，検出薬 トリクロル酢酸，90° で 10 分間加熱，紫外線下で螢光検出，Dv は Rf 0.39。本原料には他に S Rf 0.8, Gr および PB Rf 約 0.62 らを含んでいる）で追跡し，Dv のみを含む部分を合し，減圧下で濃縮乾固。得量 60 mg。

本品を繰返し同様の処理に付し，母紙クロマトグラフィー検出で完全に分別帯 1 個のみを示す物質 30 mg を得。これを aq. MeOH から数回再結晶し以前に著者がジギタリス・プルブレア種子から得たものと全く同じ針状晶 12 mg を得⁷⁾，mp 243.5~244°(decomp)。

Fig. 3.

Digitalinum verum from
Methanol-Water

m.p. 243.5~244°(decomp.)

II) 定量法 1) 方法：Jensen の方法による¹⁾。2) 装置：Lumetron Photo-Electric Fluorescence Meter Mod. 402 EF，フィルター付属 B_1 定量用フィルター。または八木式微量螢光光度計 UM 型，励起用フィルター UV-D₂，選択用フィルター FL-73+UV-O₂。3) 試薬類：グリセリン—和光純薬製試薬特級，塩酸—和光純薬製試薬特級，Gg—mp 233~234°，母紙クロマトグラフィーで単一の分別帯を示すもの，対照—0.5 γ /cc 硫酸キニーネ溶液。

III) 母紙クロマトグラフィー 1) 方法：著者ジギタリスに関する研究 第2報⁷⁾，第3報⁸⁾の方法による。なお $\Delta^{14,10}$ -Gg および Dv, S と Jensen の試薬との反応中間成績体は試薬をかけなくとも紫外線を当てるだけで螢光を発する。2) 条件：ベンゼン・水 (1:1)；ノルマルヘキサン・ $\text{MeOH} \cdot \text{水}$ (8:4:5)；ベンゼン・ $\text{MeOH} \cdot \text{水}$ (5:3:2)；ベンゼン・ $\text{AcOEt} \cdot \text{水}$ (8:5:4)；ベンゼン・*iso*- $\text{PrOH} \cdot \text{水}$ (10:2:3)； $\text{AcOEt} \cdot \text{ベンゼン} \cdot \text{EtOH} \cdot \text{水}$ (86:14:2:50)； $\text{AcOEt} \cdot \text{MeOH} \cdot \text{水}$ (8:2:5)。溶媒系以外の条件は上記 Dv 分離の際に述べたのと同様である。

IV) Dv の Jensen 試薬中における螢光光度の時間的变化 Dv 結晶 6.46 γ をグリセリン・ HCl (1:1) 10 cc に溶かして 20° に保ち，その螢光光度の時間的变化を検べた。標準物質—Gg；対照—0.5 γ /cc 硫酸キニーネ溶液。

1.5 時間 (113.3%)，2.5 時間 (117.2%)，5 時間 (107.2%)，6 時間 (105.8%)，7.5 時間 (99.7%)，8.5 時間 (101.8%)，19 時間 (98.5%)，24 時間 (102.6%)。

V) S の Jensen 試薬中における螢光光度の時間的变化 S 4.2 γ をグリセリン・ HCl (1:1) 10 cc に溶かして 20° に保ち，その螢光光度の時間的变化を検べた。

1 時間 54 分 (121.3%)，2 時間 49 分 (117.1%)，4 時間 10 分 (112.6%)，5 時間 25 分 (108.6%)，6 時間 17 分 (103.7%)，7 時間 36 分 (101.6%)，17 時間 17 分 (101.7%)，18 時間 17 分 (102.3%)，19 時間 37 分 (101.9%)，20 時間 51 分 (100.9%)，21 時間 47 分 (101.4%)，24 時間 10 分 (100.9%)。

VI) Gg, PB, Gr, S, Dv のおのおの $\text{MeOH} \cdot \text{HCl}$ (1:1) またはグリセリン・ HCl (1:1) との反応成績体の時間的变化に関する母紙クロマトグラフィーによる検討 各配糖体 1 mg ずつを $\text{MeOH} \cdot \text{HCl}$ (1:1) およびグリセリン・ HCl (1:1) の 1 cc に溶かして一定時間 20° で放置し， $\text{MeOH} \cdot \text{HCl}$ の場合は 5 cc の水でうすめた後 Ag_2CO_3 で中和し，沈殿を母液後そのまま減圧下で濃縮乾固，またグリセリン・ HCl の場合は同様に処理，沈殿を母液後 AcOEt で抽出，抽出液を減圧下で濃縮乾固して試料とした。母紙クロマトグラフィーの方法は著者ジギタリスに関する研究 第2報⁷⁾，第3報⁸⁾に同じである。

7) 笹川：本誌 74, 721(1954)。

8) 笹川：本誌 75, 946(1955)。

1) 濾紙クロマトグラフィーの各溶媒系に対する生成物の Rf 値

Table I. Rf Values of Products and Starting Materials

Solvent system	Gitoxi- genin	Dian- hydro- gitoxi- genin	Intermedi- ate from digitalinum verum	Intermedi- ate from strosipeside	Digital- inum verum	Stros- peside	Gitorin	Purpurea glycoside B
Benzene·water (1:1)	0.03	0.79	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00
Hexane·methanol·water (8:4:5)	0.00	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Benzene·methanol·water (5:3:2)	0.11~ 0.12	0.87	0.00	0.73	0.00	0.04	0.00	0.00
Benzene·ethylacetate· water (8:5:4)	0.65~ 0.67	0.89~ 0.92	0.02	0.77	0.00	0.21	0.00	0.00
Benzene·isopropanol· water (10:2:3)	0.71	0.92	0.34	0.86	0.00	0.42	0.02	0.02
Ethylacetate·benzene· ethanol·water (86:14:2:50)	0.84	0.92	0.41	0.92	0.03	0.67	0.09	0.05
Ethylacetate·methanol· water (8:2:5)	0.88	0.94	0.83	0.90	0.39	0.75	0.57	0.62

Filter paper: Toyo filter paper No. 51, Temperature: $17 \pm 1^\circ$, Method: Ascending method,
Saturating time: Over 16 hours, Distance of development: Over 20 cm.

2) Gg の場合

	30 秒	1 分	3 分	10 分	40 分
Gg	卅	卅	卅	卅	+
$\Delta^{14,16}$ -Gg	+	卅	卅	卅	卅

(一, 卅, 卅 是定性的に見た螢光の強さ, 以下同じ)

3) PB の場合

	30 秒	1 分	3 分	5 分	20 分	40 分
PB	+	±	±	±	—	—
Gg	卅	卅	+	±	±	—
$\Delta^{14,16}$ -Gg	±	+	卅	卅	卅	卅

4) Gr の場合

	30 秒	1 分	3 分	5 分	40 分
Gr	+	±	±	±	—
Gg	卅	卅	卅	卅	±
$\Delta^{14,16}$ -Gg	+	卅	卅	卅	卅

5) Dv の場合

	30 秒	3 分	5 分	40 分	6 時間	8 時間
Dv	卅	卅	卅	±	—	—
中間生成物	+	+	卅	卅	+	±
Gg	±	±	+	+	—	—
$\Delta^{14,16}$ -Gg	±	—	+	卅	卅	卅

6) S の場合

	30 秒	3 分	5 分	40 分	6 時間	8 時間
S	卅	卅	卅	卅	—	—
中間生成物	卅	卅	卅	卅	卅	+
Gg	±	—	—	—	—	—
$\Delta^{14,16}$ -Gg	—	—	+	+	卅	卅