UDC 547.993 : 597.82

271. 大野節郎, 大本太一: 蟾酥の成分(第 20 報^{*1}) 日本産蟾毒成分の研究
その 2 卵巣毒成分について

Setsuro Ohno and Taichi Ohmoto: Chemical Constituent of Toad Venom.

XX. Studies on the Components of *Bufo vulgaris formosus*. (2).

Studies on the Toxic Components of the Ovary.

(Faculty of Pharmacy, Toho University^{*2})

Components of the ovaries of Japanese toad (*Bufo vulgaris*), 2~3 days after being caught, were examined by paper chromatography by the Zaffaroni system and gamabufotalin, γ -sitosterol, and palmitic acid were isolated. Paper chromatography with the Zaffaroni system indicated the presence of desacetylcinobufagin, desacetylcinobufotalin, cinobufotalin, telocinobufagin, and hellebrigenin. Water-soluble components appeared as three spots on paper chromatogram but they could not be isolated and identified.

(Received February 3, 1961)

蟾分泌物としてのセンソおよび蟾皮についての報告は Adolf-Casali により 19 世紀末期に始まり現在までに 10 数種のブホゲニンの単離を見るに至つたが, 卵巣については峰下¹⁾により *Bufo bufo asiaticus* で主としてその薬理学的見地より研究がなされ, 血圧および呼吸に顕著な影響を与える bufovarin が単離された報文があるのみである. この bufovarin について峰下はブホタリン, ブファギンに化学的性質および薬理作用において類似点少なからずと報告している. 著者等はその点について化学的見地より再検討を試み, 新鮮な日本産蟾卵巣からレジブホゲニン, ガマブホタリン, γ -シトステロール, パルミチン酸を単離し, 他数種のブホゲニンをペーパークロマトグラフィー (PPC) により確認した.

Table I. Chromatographic Separation of CHCl_3 Extract (I, 19.731 g.) on Al_2O_3

Fraction No.	Solvent	Yield (g.)	PPC ^{a)}
1~10	Benzene	14.218	Negative
11~17	Benzene	0.299	S, R
18~19	Benzene	0.047	S, R
20~23	Benzene· CHCl_3 (95 : 5)	0.105	R
24~27	Benzene· CHCl_3 (9 : 1)	0.089	R
28~31	Benzene· CHCl_3 (4 : 1)	0.059	R
32~42	Benzene· CHCl_3 (7 : 3)	0.266	R
43~51	Benzene· CHCl_3 (3 : 2)	0.082	R
52~56	Benzene· CHCl_3 (1 : 1)	0.024	R
57~60	CHCl_3	0.009	R
61	CHCl_3 ·MeOH (9 : 1)	0.971	A, B, Ct, G, H, T, X
62~71	CHCl_3 ·MeOH (9 : 1)	1.428	A, B, G, T, X
72	MeOH	0.353	G, H, B, X
Total		17.950	

a) A: Desacetylcinobufotalin B: Desacetylcinobufagin Ct: Cinobufotalin
G: Gamabufotalin S: γ -Sitosterol R: Resibufogenin H: Hellebrigenin
T: Telocinobufagin X: Unknown substance

Chart 1 における卵巣のメタノール抽出物は殆んど油脂および類脂体からなる油状物で, これを石油エーテル, 50% メタノール, アセトン による抽出分離を繰返して大部分の油脂類を除去し, クロロホルムで抽出した. このクロロホルム抽出物 (I) を Table I に示すようにアルミナカラムおよび混合溶剤を用いて分画し, 各溶出区

^{*1} 第 19 報: 本誌 81, 1339(1961).

^{*2} Ohkubo-cho, Narashino, Chiba-ken.

1) 峰下: 満州医学雑誌 27, (1937).

Chart 1. Process of Extraction

Ovary of *Bufo vulgaris formosus*

Chart 2. Treatment of Petroleum Ether-soluble Partion (II)

分 (以下 Fr) は Zaffaroni system²⁾ による PPC を併用して判定した。Table I の Fr 24~60 を集め再びア
 ロルミナ層を通して油状物を除きレジブホゲニンを得た。Fr 61 の赤褐色油状物はアセトンで数回抽出してレン
 チンその他類脂体を分け、抽出液は蒸発乾固したのち、さらに石油エーテルで油脂類を除去し、Table II にした
 がつてアルミナクロマト分画を行ない、Fr 3~10 よりガマブホタリンを得た。Table I の Fr 62~72 はアセト
 ンで抽出し濃縮すれば帯黄色無晶物となる。これを Table III にしたがつてアルミナクロマト分画を行ないブホ
 ゲニンの単離につとめたが目的を達せず、Fig. 1 の PPC における R_f, 三塩化アンチモンによる呈色の変化、紫

2) A. Zaffaroni, *et al.*: J. Biol. Chem. 177, 109(1949).

Table II. Chromatographic Separation of "Fr. 61" (0.1425 g.) on 4 g. of Al_2O_3

Fraction No.	Solvent	Yield (mg.)	PPC ^{a)}
1	CHCl_3	52.6	T, Ct
2	CHCl_3	25.5	H, T
3~4	CHCl_3	17.4	G, H
5~8	CHCl_3	8.8	G, H
9~10	$\text{CHCl}_3 \cdot \text{Me}_2\text{CO}$ (98 : 2)	0.9	G, H
11~12	$\text{CHCl}_3 \cdot \text{Me}_2\text{CO}$ (95 : 5)	2.3	G, H, X
13~14	$\text{CHCl}_3 \cdot \text{Me}_2\text{CO}$ (9 : 1)	1.4	A, G, H, T
15~16	$\text{CHCl}_3 \cdot \text{Me}_2\text{CO}$ (1 : 1)	3.5	A, G, H, T
17~19	Me_2CO	3.5	G, H, T
20~25	$\text{CHCl}_3 \cdot \text{MeOH}$ (99 : 1)	21.2	G, H
Total		136.9	

a) See footnote for Table I.

Table III. Chromatographic Separation of "Fr. 62-71" (427.3 mg.) on 8 g. of Al_2O_3

Fraction No.	Solvent	Yield (mg.)	PPC ^{a)}
1~2	CHCl_3	201.1	negative
3	CHCl_3	5.9	A, B, X
4	CHCl_3	3.2	A
5	CHCl_3	4.2	B, X
6	CHCl_3	3.1	T
7~8	$\text{CHCl}_3 \cdot \text{Me}_2\text{CO}$ (95 : 5)	11.9	A, Ct, H, T, X
9~10	$\text{CHCl}_3 \cdot \text{Me}_2\text{CO}$ (9 : 1)	2.2	G, A, H, X
11~12	$\text{CHCl}_3 \cdot \text{Me}_2\text{CO}$ (1 : 1)	3.1	A, G, T
13~15	Me_2CO	3.1	G, T
16~17	$\text{CHCl}_3 \cdot \text{MeOH}$ (99 : 1)	2.4	G, T
18~25	$\text{CHCl}_3 \cdot \text{MeOH}$ (98 : 2)	135.9	negative
Total		376.1	

a) See footnote for Table I.

Fig. 1. Paper Chromatography of Bufogenin and γ -Sitosterol

benzene· CHCl_3 (1 : 1)/propyleneglycol· H_2O
 (4 : 1) 2 hr. 10 min.
 1 : cinobufotalin 2 : telocinobufagin
 3 : Fr 61 (Table I) 4 : gamabufotalin

benzene· CHCl_3 (1 : 1)/propyleneglycol· H_2O
 (4 : 1) 4 hr. 50 min.
 5 : desacetylcinobufotalin
 6 : hellebrigenin
 7 : Fr 61 (Table I)
 8 : desacetylcinobufagin

benzene· CHCl_3 (6 : 4)/formamide 3 h. 30 min.
 9 : hellebrigenin
 10 : Fr 2 (Table II)
 11 : Fr 15~16 (Table II)
 12 : telocinobufagin

Ethylene glycol monoethyl ester : propanol:
 MeOH : water (35 : 10 : 35 : 25) liquid paraffin
 13 : γ -sitosterol
 14 : γ -sitosterol and cholesterol
 15 : cholesterol

外線による螢光を標品と比較して desacetylcinobufagin, desacetylcinobufotalin, cinobufotalin, hellebri-genin, telocinobufagin を確認した。なおそのほかに, telocinobufagin より Rf 大で緑黄色を呈するものが認められたが, 既知ブホゲニン中に該当するものなく未知物質と思われる。また Chart 1 の石油エーテル可溶部(II)は Chart 2 にしたがって処理し, パルミチン酸および動物中にはまれな γ -シトステロールを単離した。なお水溶部(III)からは PPC により *p*-dimethylaminobenzaldehyde 陽性のスポット 3 個を認めたが, その後 3 回の追試において確認できなかつた。

以上のことから峰下の得た bufovarin はこれら数種のブホゲニンの混合物であることが推定される。但し峰下の得た bufovarin の薬理作用から, さらにインドール核を有するブホテニン, ブホテニン作用物質の存在が予想され, また蟄卵巣を食してニコチン様中毒を起こした症例もあり, 卵巣毒の中心物質には時期的に消長のある serotonin 系毒物も否定できないようである。

実 験 の 部

昭和 34 年 2~3 月に得た日本産蟾 137 匹の卵巣を乳濁状にすりつぶし, MeOH 700 cc を用いて 24 hr ずつ 2 回冷浸, さらに 55° で 4 hr ずつ 4 回温浸, 抽出液を合して CO₂ 気流中減圧濃縮し, 淡黄色油状物 482 g を得。この MeOH 抽出物を Chart 1 にしたがって処理し黄褐色油状の CHCl₃ 抽出物 19.731 g を得。これをベンゼンに溶かし, 脱アルカリの Al₂O₃ (メルク) 90 g を用いクロマトグラフィーを行なう。

Resibufogenin Table I において benzene-CHCl₃, CHCl₃ で溶出した Fr 24~60, 529 mg を Me₂CO 抽出し, Me₂CO 可溶部 367 mg を得。これをベンゼンに溶かし, 同量の石油エーテルを和して Al₂O₃ 層を通して, 溶剤を留去し淡黄色泡沫状の無晶物 302 mg を得。この無晶物を乾燥後常法により無水ピリジン, Ac₂O 中 22° に 26 hr 放置してアセチル化し, 反応液を氷水中に注加, 析出する結晶を濾取, 得量 312 mg。Me₂CO-Et₂O より再結, mp 208~217°, 標品の resibufogenin acetate と混融して融点降下せず。また PPC における SbCl₃ による呈色は淡黄褐色, conc H₂SO₄ では黄色→暗褐色で標品と一致。

Gamabufotalin Table I の Fr 61 142.5 mg を Al₂O₃ 4 g を用いて分画し, CHCl₃ および CHCl₃•Me₂CO (98:2) で溶出した 27 mg (Table II, Fr 3~10) を Me₂CO に溶かし, デシケーター中に放置して無色柱状晶 14 mg を得。mp 251~259°。標品の gamabufotalin と混融して融点降下せず。また PPC における SbCl₃ による呈色は暗紫青色, conc H₂SO₄ では黄色→青緑色で標品に一致。

Bufogenin の PPC 濾紙: ワットマン No. 1 (12×45 cm)。溶媒: 固定相 formamide の場合, 移動相 CHCl₃•benzene(3:2)。固定相 propylene glycol•H₂O (4:1) の場合, 移動相 CHCl₃•benzene (1:1)。下降法。Rf 小なるものは 3~8 hr 展開対照する。呈色試薬 20% SbCl₃•CHCl₃ 溶液。

γ -Sitosterol 石油エーテル可溶物 (Chart 1 の (II)) 50 g に 10% EtOH 性 KOH 300 cc を加え, 水浴上 3 hr 加熱水解, EtOH を可及的に除去して 1.5 L の水中に投入。Et₂O 抽出液を Na₂SO₄ 乾燥, 溶媒留去して淡黄色粗結晶 1.4 g (2.7%) を得。MeOH より繰返し再結, mp 146~147°。標品の γ -sitosterol と混融して融点降下せず。常法どおりピリジン, Ac₂O でアセチル化。mp 133~135°。標品の acetate と混融して融点降下せず。acetate 0.5 g を Et₂O 5 cc に溶かし Br₂ 0.2 g を AcOH 6.5 cc に溶解した液を加え一夜放置。沈殿した白色結晶を EtOH に溶かし NaI 0.6 g を加えて 30 min 還流, 冷後反応液を NaHSO₃ 冷溶液中に投入して白色沈殿 0.51 g を得。EtOH より再結して mp 124~126° の白色針状晶 0.26 g を得。acetylcholesterol dibromide と混融, mp 109~115° を示し明らかに降下。標品 γ -sitosterol のそれと混融して降下せず。

γ -Sitosterol の PPC Kodicek-Ashby 法³⁾ による。濾紙: ワットマン No. 1 (2×40 cm)。溶媒: 固定相流動パラフィンの 5%石油エーテル液。移動相 A; ethylene glycol monomethyl ester•PrOH•MeOH•H₂O (35:10:30:25) B; BuOH (水飽和)。上昇法。7~10 hr (14~23°) 展開。呈色試薬: 3%クロラミン水溶液・トリクロル酢酸 25% EtOH 液 (2:8) (使用前調製)。試薬噴霧後 120° で 10 min 加熱, UV により黄色螢光を發す。

Solvent A	Rf	
	Cholesterol	γ -Sitosterol
B	0.65	0.00
B	0.64	0.85

Palmitic acid Chart 2 における 10% KOH 水解液を HCl でリトマス酸性とし, Et₂O 抽出液を Na₂SO₄ 乾燥, 溶媒留去して粗結晶 25.5 g (51%) を得。EtOH より再結して粒状晶。mp 59~61°。標品のパルミチン酸と混融して融点降下せず。パルミチン酸 0.1 g にアニリン 0.5 cc を加え, 封管中 200°, 8 hr 加熱。冷後結晶を Et₂O および MeOH より再結して mp 87~88° 白色鱗片状の anilide を得。標品と混融して融点降下せず。C₁₆

$H_{31}O \cdot C_6H_6N$ (パルミチン酸アニライド) Anal. Calcd. C 79.64, H 11.16, N 4.24. Found C 80.48, H 11.54, N 4.57.

終りに臨み終始御激励下さった学長 額田 晋博士, 小松助教授に感謝します。また研究費の一部は文部省試験研究費によるもので謝意を表します。

東邦大学薬学部

UDC 547.993 : 597.82

272. 大野節郎, 小松曼香, 大本太一: 蟾酥の成分 (第 21 報^{*1}) 日本産蟾毒成分
の研究 その 3 蟾皮毒成分について

Setsuro Ohno, Manki Komatsu, and Taichi Ohmoto: Chemical Constituents
of Toad Venom. XXI. Studies on the Components of *Bufo vulgaris*
formosus. (3). Studies on the Toxic Components of the Skin.

(Faculty of Pharmacy, Toho University^{*2})

Reexamination was made on the components of the skin of domestic toad (*Bufo vulgaris*) and the following were isolated and identified: Gamabufotalin, resibufogenin, cinobufagin, cinobufotalin, bufalin, hellebrigenin, telocinobufagin, desacetylcinobufagin, desacetylcinobufotalin, and γ -sitosterol. A new bufogenin was isolated which corresponded to molecular formula of $C_{26}H_{36}O_6$, with one each of acetyloxyl, secondary hydroxyl, and tertiary hydroxyl groups, and not having an epoxide ring at 14-15. Its acetate had the molecular formula of $C_{28}H_{38}O_7$, and the bufogenin was named gamabufotalininol.

(Received February 3, 1961)

第 19 報¹⁾で報告したように, 日本産蟾皮については gamabufotalin, bufotalin など二, 三の bufogenin が単離されたのみであるが, センソあるいはヨーロッパ, アフリカ産の蟾皮成分として単離された bufogenin は数種におよんでいる。

著者等は日本産蟾皮成分を再検討し, gamabufotalin の他新たに resibufogenin $C_{24}H_{32}O_4$, cinobufagin $C_{26}H_{36}O_6$, cinobufotalin $C_{26}H_{32}O_7$, bufalin $C_{24}H_{34}O_6$, hellebrigenin $C_{24}H_{32}O_6$, telocinobufagin $C_{24}H_{34}O_5$, desacetylcinobufagin $C_{24}H_{34}O_5$, desacetylcinobufotalin $C_{24}H_{34}O_6$, γ -sitosterol $C_{29}H_{50}O$ を単離確認し, さらに未知の bufogenin $C_{26}H_{36}O_6$ を単離した。しかし小竹²⁾報告の bufotalin は単離し得なかつた。なお本研究資料は著者の一人大野がかつて岐阜薬学専門学校研究室において入手した 4 万匹の蟾皮 (一部に黴を生じていたが, 塩をまぶし半乾燥状態で保管されたもの) を Chart 1 の抽出順序で gamabufotalin を除去した残部である。

Chart 1 におけるクロロホルム抽出物 (I) およびアセトン抽出物 (II) をそれぞれ前処理後 Al_2O_3 カラムと混合溶剤による分画を繰り返し, 各溶出区分 (以下 Fr) は Zaffaroni-system³⁾ によるペーパークロマトグラフィー (PPC) (Fig. 1) を併用して成分の単離につとめた。すなわちクロロホルム抽出部をまず粗分画し (Table I), Fr 1~2 をさらに Al_2O_3 分画 (Table II) して γ -sitosterol, resibufogenin, cinobufotalin, 未知物質を, Table I の Fr 6~11 および Fr 12~18 より gamabufotalin を, またそれぞれの Fr を PPC により分離して telocinobufagin, hellebrigenin を得た。アセトン可溶部も同様 Al_2O_3 分画して (Table III, IV, V), cinobufagin, desacetylcinobufagin, desacetylcinobufotalin を得, gamabufotalin を除去したメタノール抽出液

*1 第 20 報: 本誌 81, 1341(1961).

*2 Ohkubo-cho, Narashino, Chiba-ken.

1) 大野, 大本, 小松: 本誌 81, 1339(1961).

2) 小竹: 理研報 7, 790, 1244(1928).

3) A. Zaffaroni, et al.: J. Biol. Chem. 177, 109(1949).