これについてはステアリン酸の二つの酸素原子が二つの Al に配位することにより, disoap または monosoap を Chart 2a, b のようにつなぐために溶液粘度が増大することが考えられる. この効果は配位原子を一つだけ有するアルコールやアミンでは期待できない. また酢酸の場合にこの効果が認められないことから考えて, 脂肪酸の炭化水素鎖間の凝集力がこのような結合を助長するものと考えられる. ステアリン酸添加による効果は Chart 2 の状態によっていったん溶液粘度が増大した後, Chart 1 の過程で粘度が低下していくものと考えられる. また Fig. 1 のように $[\eta_N]$ の値が $St/Al=2.0\sim 2.5$ 付近であまり変化しないのはステアリン酸の粘度増大作用と低下作用がこの領域で拮抗するためではないかと考えられる.

実 験 の 部

試 料 Al-di-St および Al-mono-St: 第 3 報¹⁾ と同じくして合成. $St/Al=1.96$ および 1.05.

ステアリン酸: 市販品 (日本油脂, 高純度単体脂肪酸 NAA 180) をエタノールで再結晶. m.p. $69.5\sim 70^\circ$.

エタノール: 金属 Na で乾燥後蒸留.

オクタデシルアルコール: 日本油脂製, m.p. $58\sim 58.5^\circ$ ガスクロマトグラフィーによる分析結果. $C_{16}H_{33}OH$ 0.3%, $C_{18}H_{37}OH$ 98.7%, $C_{20}H_{41}OH$ 1.0%.

酢酸: P_2O_5 にて乾燥後蒸留.

p-トルイジン: 市販品 (特級) を P_2O_5 上で乾燥.

溶液調製 混合試料溶液: Al-di-St と Al-mono-St, または Al-di-St とステアリン酸の混合物 0.5 g. を用い, 第 3 報¹⁾ と同様にして調製.

添加剤-disoap 溶液: 0.3 g. Al-di-St/100 ml. ベンゼンを原溶液とし, 添加剤を加えてベンゼンの沸騰温度で加熱溶解.

粘度測定 第 2 報⁷⁾ におけると同じ粘度計を用いて構造粘性を測定. 添加剤-disoap 溶液は一定時間加熱溶解後, 溶液の一部をとり, 25° に 1 hr. 放置後の構造粘性を測定.

京都大学薬学部

7) 中垣, 西野: 本誌, 83, 185 (1963).

〔薬 学 雜 誌〕
YAKUGAKU ZASSHI
84 (12) 1166 ~ 1171 (1964)

UDC 547.993.3 : 615.32 : 543.544.25

181. 桜井謙之介, 吉井英一, 久保喜一: “センソ” ステロイドの

ガスクロマトグラフィー

Ken-nosuke Sakurai, Eiichi Yoshii, and Kiichi Kubo: Gas Liquid Chromatography of Steroids of Ch'an Su.

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Toyama^{*1)})

Five kinds of bufadienolide shown in Chart 1 were analyzed by gas chromatography of trimethyl silyl ethers on a packed column of SE-30 (1.5%) at 235° . Their retention time and chromatogram are shown in Table I and Fig. 1. After simple pretreatment by column chromatography on alumina, cinobufagin content of Ch'an Su (Chinese drug, Tō-Senso) was estimated by gas chromatography as $7.2\pm 0.2\%$.

γ -Sitosterol previously isolated from hexane-soluble part of Ch'an Su extract was shown to be a mixed crystal comprising of cholesterol, campesterol, and β -sitosterol, from the result of gas chromatograph and infrared spectral measurement.

(Received July 8, 1964)

古来より強心利尿薬として賞用されているセンソは現在も家庭薬製剤六神丸などの貴重な原料である. かかるセンソの薬理作用を代表するものはいわゆる bufadienolide と総称される一群のステロイドである. それらの純

*1 Gofuku, Toyama-shi.

粹分離, および構造研究は Meyer 等, 近藤等, 小竹等によって長年にわたり積極的に行なわれてきた.¹⁾ その結果, 10 数種類におよぶ bufadienolide の化学構造が解明され, それとともに岡田等の研究によって構造と薬理作用, とくに強心作用, 知覚麻痺作用との関連がほぼ確立されるにいたった.²⁾

一方, bufadienolide の定性確認法として, Reichstein 等,³⁾ Meyer 等⁴⁾ はペーパークロマトグラフィー (PPC) の手法を確立し, 新 bufogenin の探索, 純度確認に効果的に応用された. 最近になって石川等,⁵⁾ Zelnik 等,⁶⁾ 小松等⁷⁾ は薄層クロマトグラフィー (TLC) によってセンソ中の bufadienolide 類の迅速定性確認法を試み, PPC とほとんど同一の分離結果の得られたことを報告しているがそのうち小松等が, 展開溶媒を改良することにより, 従来分離不可能であった cinobufagin (I) と resibufogenin (II) の分離に成功したことは興味深いものがある. しかしながら bufadienolide の系統的な定量分析法についての報告はほとんど見られず, Meyer 等⁴⁾ がセンソ抽出エキスよりカラムクロマトおよび再結晶法により, 純結晶とした 11 種の bufadienolide の収率をあげているほか, 小松等の TLC による cinobufagin の回収率の実験,⁷⁾ および稲垣によって行なわれた, 共通の官能基である α -pyrone 環をヒドロキサム酸に導き, その第二鉄塩による発色比較法⁸⁾ があるのみで, いずれも満足すべき方法とはいえない. TLC 法によるセンソ中の個々の bufadienolide の定量は可能であろうが混合物となると個々の成分の Rf 値が近接している上に再現性に難点があるため斑点面積比較法, デンシトメトリー法, 溶出法などの定量的応用についての信頼性に限界があるように推察される.

Chart 1.

ここにおいて著者等はガスクロマトグラフィー (GLC) を応用してセンソ中の bufadienolide の定性ならびに定量を目的として, とくにアルミナカラムクロマトにより比較的容易に得られる cinobufagin (I), resibufogenin (II), bufalin (III), bufotalin (IV), cinobufotalin (V) を対象として検討したところ定性分離について一応満足すべき結果を得, さらに主成分の cinobufagin について定量分析を行なったので報告する.

1) L. Fieser, M. Fieser: "Steroids," p. 787, (1959) Reinhold Publ. Co.

2) 岡田, 須賀, 松本: 乙卯研, 11, 75 (1960).

3) H. R. Urscheler, Ch. Tamm, T. Reichstein: Helv. Chim. Acta, 38, 883 (1955).

4) Jean-Pierre Ruckstuhl, K. Meyer: Ibid., 40, 1270 (1957).

5) 石川, 宮坂: 東京医歯科材料研究所報告, 2, 397 (1962).

6) R. Zelnik, L. M. Ziti: J. Chromatog., 9, 371 (1962).

7) 小松, 釜野, 鈴木: 日本薬学会第84年年会で発表 (1964).

8) 稲垣: 日本薬学会第73年年会生薬植物化学部会で発表 (1953).

水素炎イオン化検出器に低液相カラムを用い、Chart 1 に示す bufadienolide 類を遊離水酸基のまま GLC にかけたが当然予想されるように高温操作時における分解、顕著なテーリングのため実用上の価値がなかった。trifluoroacetyl 化法⁹⁾ および trimethylsilylether 化法^{9,10)} について検討した。trifluoroacetyl 化後の GLC で bufalin は単一のピークを示すが cinobufagin では少なくとも 3 個のピークが観察された。後者の場合、操作温度を変えてもピーク比が変化しないことから熱分解したためとは考えがたく、使用した trifluoroacetic anhydride

Fig. 1. Gas Chromatogram of Trimethylsilylethers of Toad Bufadienolides

Condition

Column: stainless steel 1.5 m.×4 m. m.φ
Packing: 1.5% SE-30 on silanized Chromosorb W 80/100 mesh
Temperature: Column and detector 235°, flash heater 290~320°
Carrier gas: Nitrogen 40 ml./min. at 3.05 kg./cm²
Settings: Sensitivity 1000 MQ; Recorder range 1.6 v.
Apparatus: Shimadzu GC-1B HFD-1

もしくはきわめて近接した Rf 値を示す resibufogenin, cinobufagin は完全に分離されている上に他のクロマト法における溶出順序, cinobufagin (I), resibufogenin (II), bufalin (III), bufotalin (IV) cinobufotalin (V) がこの GLC では II, III, I, IV, V の順で検出されることは興味がある。

TABLE I. Retention Time of Trimethylsilylethers

	Rt ^{a)} (min.)	R. Rt ^{b)}		Rt ^{a)} (min.)	R. Rt ^{b)}
Progesterone	5.1	0.39	Bufalin	36.0	2.73
Cholesterol	13.2	1.00	Cinobufagin	47.5	3.59
Campesterol	17.0	1.29	Bufotalin	66.0	5.00
β-Sitosterol	21.7	1.64	Cinobufotalin	75.5	5.72
Resibufogenin	30.3	2.29			

a) Retention time

b) Relative retention time

ついでセンソ中の bufadienolide の含量、とくに主成分であり、強心、知覚麻痺作用の顕著な cinobufagin の定量を目的として実験をすすめた。GLC を行なうに際して、センソ中にアミノ酸などの水溶成分、賦形剤、対象外の bufadienolide 類などが含まれているので試料の適切な前処理が必要であるが Meyer 等の報告⁴⁾ にならって、センソのクロロホルムエキスをアルミナのカラムに吸着させ、TLC で溶出成分を調べながらクロロホルムで溶出することにより手際よく短時間で cinobufagin を定量的に集めうることがわかった。この際、resibufogenin, bufalin および少量の bufotalin, 僅少量の cinobufotalin などが付随する。このように前処理したものを trimethylsilylether 化後 GLC を行なったところ、Fig. 2 に示すようなクロマトグラムが得られたが、この図から明らかなように cinobufagin を対象とする定量分析には以上の前処理は満足すべきものである。

ここにおいて、cinobufagin の検量線を作成し Fig. 3, 4 を得た。また Fig. 4 には bufotalin, cinobufotalin

*2 R. W. Jelliffe, D. H. Blankenhorn はこの方法により digitoxigenin と digoxigenin を分離して好結果を得たと報告している。J. Chromatog., 12, 268 (1963).

9) E. C. Horning, W. J. A. Vanden Heuvel, B. G. Creech: "Methods of Biochemical Analysis," (D. Glick) Vol. 11, p. 69, Interscience, New York, 1963.

10) C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita, W. W. Wells: J. Am. Chem. Soc., 85, 2497 (1963).

Fig. 2. Gas Chromatogram of Ch'an Su Extract obtained after Alumina Chromatography and Subsequent Trimethylsilylation

Same conditions as for Fig. 1

Fig. 3. Simple Calibration Curve of Cinobufagin (as trimethylsilylethers)

Fig. 4. Relative Responses of Bufadienolide Trimethylsilylethers

センソ(東蟾酥^{*3})の cinobufagin の定量を行ない、内部標準法で $7.2 \pm 0.2\%$ 、絶対検量線法では $6.9 \pm 0.4\%$ (おのおの3回測定の平均値) の値を得た。著者等は本法にしたがい品種の異なるセンソについても cinobufagin の定量を検討中であり、また他成分たとえば bufotalin, cinobufotalin などの簡易定量法も研究中である。

Fig. 5. Calibration Curve of Cinobufagin (as trimethylsilylether) Employing Internal Standard Technique

$$\text{ratio} = \frac{\text{cinobufagin}}{\text{progesterone}}$$

Fig. 6. Gas Chromatogram of γ -Sitosterol

Same gas chromatographic conditions as for Fig. 1

^{*3} 中国山東、河北産の大形で、円板状をなし、底面がくぼみ、上面が少しもり上って中心にひもを通した小孔がある。

11) D.K. Bloomfield: Anal. Chem., 34, 737 (1962).

おわりに、センソ中に含まれるといわれている γ -sitosterol についてのべる。著者等は文献⁹⁾にしたがって、センソより m.p. 152° (文献値 150~152°) の無色針状結晶の γ -sitosterol を単離した。本品は TLC では 1 スポットしか与えないが、GLC では Fig. 6a に示すように、すくなくとも 3 成分よりなることがわかる。最近、いわゆる γ -sitosterol なるものは GLC および IR スペクトルの検討の結果、2 ないし 3 種の sterol の混晶であることがいわれている。¹²⁾ そこで混晶形成の可能性のある sterol の標品と GLC で比較検討したところ、Fig. 6a の 3 個のピークは cholesterol, campesterol, β -sitosterol に一致することがわかった。またこの γ -sitosterol の IR スペクトルは cholesterol と 959 cm^{-1} の吸収の肩がやや異なるほかは全く一致しており、該波数における campesterol と cholesterol の合成スペクトルがセンソ γ -sitosterol の 959 cm^{-1} の形になることが期待される (Fig. 6b)。したがって、センソより単離されている γ -sitosterol は cholesterol, campesterol, β -sitosterol の混晶であり、Fig. 2 において resibufogenin の前に現われるピークはそれらによるものである。

実 験 の 部

Trimethylsilylether 化 試料 10 mg. を tetrahydrofuran 0.5 ml. に溶かし、hexamethyldisilazane 0.1 ml., trimethylchlorosilane 0.03 ml. を加えて 24 hr. 放置して反応させる。GLC を行なう際にはその 2~5 μL . をハミルトン社製マイクロシリンジにとって注入する。その際ははじめマイクロシリンジに Me_2CO 1 μL . をとり、ついで試料液をとって注入する方法¹¹⁾ を用いた。

Cinobufagin の検量線 i) direct calibration: 精度を検討するため Fig. 4 の linear range のほぼ中央であり、クロマトグラムの面積計算に都合がよく実用上の注入量 21.3 μg . について測定を行ない Table II の結果を得た。

TABLE II. Precision of Direct Calibration

Application No.	Cinobufagin peak area (cm^2)	Application No.	Cinobufagin peak area (cm^2)
1	38.2	6	39.2
2	39.0	7	38.3
3	38.5	8	40.5
4	38.7	9	39.0
5	39.0		
Average 38.9 cm^2		Std. dev. 0.68 cm^2 c. v. 1.75%	

ii) internal standard calibration: progesterone に対する cinobufagin の重量比 4.25 につき 5 回測定し、Table III に示す面積比変動を得た。

TABLE III. Variance of Peak Area Ratio

Application No.	Progesterone peak area (cm^2)	Cinobufagin peak area (cm^2)	Peak area ratio (cinobufagin/progesterone)
1	8.3	23.7	2.86
2	8.0	23.0	2.87
3	6.9	20.0	2.90
4	9.4	27.3	2.91
5	8.2	23.5	2.88
Average 2.88		Std. dev. 0.016 c. v. 0.55	

Cinobufagin の定量 粉末 (80 mesh 以上) とした東センソを正確に 15 g. を秤取、同量の海砂と十分まぜ合わせソックスレー抽出器を用いて 1% EtOH を含む CHCl_3 70 ml. で 2 回 2 hr. 抽出。抽出液を合し溶媒を留去、残分を CHCl_3 に溶かしてメスフラスコに移し正確に 25 ml. とする。その 5 ml. をビベットでとり、中性アルミナ (Woelm 製, Activity 1) 6 g. を充填したカラム (内径 8 mm.) に吸着させ、精製 CHCl_3 で溶出。cinobufagin の溶離する状態を TLC⁵⁻⁷⁾ で検出。溶出量 50 ml. で cinobufagin が完全に溶離することを確認。

CHCl_3 を留去し残分を真空乾燥後無水 tetrahydrofuran 5 ml. に溶解, その 1 ml. を常法によって trimethylsilylether 化. GLC を行なって各検量線より cinobufagin の含量を求めた.

本研究にあたり, 有益な御助言をいただいた富山大学薬学部 飯田武夫教授, 御援助いただいた株式会社 広貫堂 塩井社長, 高桑工場長の各位に深謝します. また本研究に用いた bufotalin, cinobufotalin は K. Meyer 教授, campesterol, β -sitosterol は九大薬学部 西岡助教授より御恵与いただいたものであわせて感謝いたします.

なお本研究費の一部は昭和 37 年度文部省科学研究費によったので付記し, 謝意を表します.

富山大学薬学部

[薬 学 雑 誌]
YAKUGAKU ZASSHI
84 (12) 1171 ~ 1175(1964)

UDC 543.422.5[547.56]

182. 梅田益雄：フェノール類の呈色反応(第8報^{*1}) 1,2-ナフトキノン-4-スルホン酸ナトリウムによるフェノール類の呈色反応およびそのレゾルシンの比色定量法への応用

Masuo Umeda : Color Reaction of Phenols. VIII. Color Reaction of Phenols with Sodium 1,2-Naphthoquinone-4-sulfonate and its Application to Colorimetric Determination of Resorcinol.

(Shinagawa Factory, Sankyo Co., Ltd.^{*2})

A color reaction of phenol derivatives by sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate was investigated. Among about 40 kinds of phenols, those substituted by a positive group at a *o*-position gave much better coloration, while no color or at least only faint color was observed in case of *m*- or *p*-substituted one by the same group. Phenols substituted by a negative group gave negative results without exception. As to polyphenols resorcinol alone gave good color and others generally showed brown coloration perhaps due to air oxidation. Similar results were obtained, even when sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate was replaced by 1,2-naphthoquinone. Then this color reaction was applied for the colorimetric determination of resorcinol successfully. Limit of measurement, 20~180 $\mu\text{g./ml.}$, and $\hat{r}=0.84\%$ ($n=6$). One ml. sample solution (water solution containing 20~180 $\mu\text{g./ml.}$, of resorcinol) was taken exactly in 10 ml. measuring flask, 1 ml. of 0.2% sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate solution and 2.5 ml. of pyridine were added and shaken well. After kept standing for 5 min. at 15° 1 ml. of 0.45*N* sodium hydroxide solution was added, shaken well and kept standing at the same temperature for 15 min. Then water was added to make 10 ml. exactly and the absorbance at 680 $\text{m}\mu$ was measured. As a reference solution for the measurement 1 ml. of water was treated in the same manner.

(Received July 17, 1964)

1,2-ナフトキノン-4-スルホン酸ナトリウムは従来アミン類,¹⁻⁷⁾あるいは活性メチレン化合物⁸⁻¹¹⁾の呈色試薬として用いられてきた.

*1 第7報：本誌, 84, 846 (1964).

*2 Hiromachi, Shinagawa-ku, Tokyo.

- 1) M. X. Sullivan, *et al.* : J. Am. Chem. Soc., 58, 47 (1936).
- 2) E. I. Short : Lancet., 1954, 656; *Idem* : Anal. Abstr., 1, 1349 (1954).
- 3) W. Dihlmann : Biochem. Z., 325, 295 (1954); *Idem* : Anal. Abstr., 1, 2123 (1954).
- 4) W. Troll : J. Biol. Chem., 202, 479 (1953).
- 5) D. H. Rosenblatt, *et al.* : Anal. Chem., 27, 1290 (1955).
- 6) H. Boser : Hoppe-Syl. Z., 298, 145 (1954).
- 7) E. G. Schmidt : J. Biol. Chem., 122, 757 (1938).
- 8) F. Sachs, *et al.* : Ber., 38, 3685 (1905).
- 9) F. Feigl, *et al.* : Anal. Chem., 29, 1522 (1957).
- 10) L. R. Jones, *et al.* : *Ibid.*, 28, 1493 (1956).
- 11) F. Turba, *et al.* : Angew. Chem., 61, 74 (1949).