晶 40 mg. を得た. m.p. 280~282°(decomp.). $C_5H_9O_4N$ Anal. Calcd.: C, 40.81; H, 6.17; N, 9.52. Found: C, 40.41; H, 5.93; N, 9.75. 本品は I と混融して融点降下を示さず, IR も I と一致.

本研究実験は著者らが大阪大学薬学部在籍中に実施したものである. 元素分析を施行された大阪大学薬学部元素分析室ならびに IR スペクトルを測定して頂いた赤外分析室の方々に深謝する. またハナヤナギの提供を仰いだ白石製薬株式会社に対しても厚く御礼申し上げる.

東北大学医学部薬学科

〔薬 学 雑 誌〕
YAKUGAKU ZASSHI
85 (1) 37 ~ 40 (1965)

UDC 612.14:582.272.4

6. 竹本常松,*¹ 醍醐皓二, 高木信也*²: 海藻の降圧性成分に関する研究 (第3報*³)
コンブ科海藻中の Laminine の分布調査*⁴

Tsunematsu Takemoto, Koji Daigo, and Nobuya Takagi: Studies on the
Hypotensive Constituents of Marine Algae. III. Determination of Laminine in Laminariaceen.

(Pharmaceutical Institute, Tohoku University School of Medicine,*¹
Shiraishi Seiyaku Co., Ltd.*²)

Free amino acids of *Laminaria angustata* (Jap. Name Mitsuishi Kombu) were determined by amino acid analyzer quantitatively, and glutamic acid, aspartic acid, alanine and proline were found in a larger amount. After an purification of 19 kinds of water extracts from seaweeds through Amberlite IR-120 and IRC-410, laminine content was determined by ion-exchange chromatography of Amberlite IRC-50. As it is strong alkali, laminine was not completely eluted from Amberlite IR-120, giving such a rate of recovery, in 64~70%. The results of the determination were shown in Table II. Laminine was isolated and identified also from *Ecklonia cava* (Jap. Name Kajime).

(Received August 14, 1964)

著者等は第1報¹⁾においてコンブの新成分 laminine およびその他の塩基性成分について報告した. 本報ではコンブ科 Laminariaceae 海藻中における laminine の分布について定性定量的な検討を加えた結果について述べる. 本研究では瀬川²⁾のもちいた分類および学名にしたがった. これによると日本産のコンブ科には 14 属, 32 種の海藻が記載されている.

まずはじめにミツイソコンブ中に含まれている遊離アミノ酸について検討した. コンブの水浸エキスは大量の塩類, 多糖類その他を含んでいるので, Amberlite IR-120 にアミノ酸を吸着させた後アンモニア水で脱着して濃縮した試料について Spinco Amino Acid Analyzer で分析した. ここに得られた溶出曲線より 17 種のアミノ酸についてコンブ 1g. 当たりの含量を算出してみると Table I のようになる.

もっとも多く含まれているものは glutamic acid で全アミノ酸の 57% を占め, ついで aspartic acid 13%, alanine 11%, proline 8% の順で他はいずれも少量であった. これらのアミノ酸含量は大石等³⁾がコンブエキス中の 16 種のアミノ酸について微生物定量した結果と大体同じ傾向にあるものといえる. laminine については全アミノ酸中わずか 0.68% にすぎず, コンブ中の含量に換算すると 0.0067% に相当するが, これは後で述べるよ

*¹ Kita-4-bancho, Sendai-shi, Miyagi-ken.

*² Oyodocho, Oyodo-ku, Osaka.

*³ 第2報: 本誌, 84, 1180 (1964).

*⁴ 日本薬学会東北支部例会で発表 (1963, 6, 20).

1) 竹本, 醍醐, 高木: 本誌, 84, 1176 (1963).

2) 瀬川: “原色日本海藻図鑑,” 39 (1959), 保育社.

3) 大石, 田村, 金井, 親松, 奥村, 村田: 日水誌, 27, 601 (1961).

TABLE I. Amino Acid Composition of the Water Extract of *Laminaria angustata*

Glu	5.642	Met	0.042
Asp	1.286	Lys	0.041
Ala	1.060	Leu	0.037
Pro	0.774	Tyr	0.025
Ser	0.250	Ileu	0.018
Phe	0.092	His	0.013
Val	0.066		
Thr	0.058	Lam	(0.067)
Gly	0.042	Arg	(0.022)

(mg. per 1g. of dried material)

うに arginine と同じくやや低い値を示している。

塩基性アミノ酸の分離定量は Dowex 50 塔のかわりにカルボン酸型樹脂を使用し、一種類の緩衝液で短時間に簡便に行なうことができる⁴⁾ので、Amberlite IRC-50 塔による塩基性アミノ酸の溶出クロマトグラフィーについて検討を加えた。塔の調製、操作は文献記載の方法に準じて行なったが、溶出用緩衝液には 0.2M クエン酸ナトリウム緩衝液 3 容と 0.2M リン酸ナトリウム緩衝液 2 容 (pH 5.95~6.00) をもちい、流速 8.6 ml./hr., 溶出

Fig. 1. Ion-Exchange Chromatography of the Basic Amino Acids

Analyzed by means of Amberlite IRC-50 Column

Fig. 2. Ion-Exchange Chromatography of Laminaria Extract treated with Amberlite IR-120

Fig. 3. Ion-Exchange Chromatography of Laminaria Extract treated with Amberlite IR-120, and Amberlite IRA-410

液 0.72 ml. ずつ分割し、ニンヒドリンで発色させた。各 1 μ M 含有の塩基性アミノ酸の合成混合試料についてイオン交換クロマトグラフィーを行なった結果は Fig. 1 のようになり、よく相互分離し得るものであった。laminine の呈色比は leucine を 1.00 とした場合、pH 5 で 1.00, pH 6 で 1.01 を示し、2-aminoethanol はそれぞれ 0.66, 0.66 を示した。

前述のコンプエキス (コンプ 2g. 相当量) についてイオン交換クロマトグラフィーを行なったところ、Fig. 2 に示すように相互分離は完全でなく、定量分析としては難点があった。そこでこのエキスをさらに Amberlite IRA-410 で処理して中、酸性アミノ酸および一部の塩基性アミ

4) 日本化学会編: “実験化学講座,” 23, 119 (1957), 丸善.

ノ酸を吸着除去したところ Fig. 3 のような溶出曲線となり, 共存アミノ酸の影響による障害がなくなった.

laminine の各種濃度の溶出曲線をつくり, これから検量線を求めた. 算出法としては溶出曲線の高さと半値幅との積により, この値を毎回標準品の発色率で補正した. 得られた検量線は約 $\pm 5\%$ の誤差の直線状であり, 十分定量の目的に使用し得るものであった.

ミツイシコンブの水浸液 (コンブ 2 g. 相当量) を前述のように Amberlite IR-120 および Amberlite IRA-410 で処理し, イオン交換クロマトグラフィーを行なった結果は laminine 含量 $0.74 \mu M$ を示したが, 同一のコンブ水浸液に laminine $1 \mu M$ を添加して定量した結果は $1.44, 1.41, 1.38 \mu M$ を示し, laminine の回収率はそれぞれ 70, 67, 64% であった. laminine の Amberlite IRA-410 処理においては定量的に回収されるので, これらの損失は laminine の強塩基性のために arginine と同様に Amberlite IR-120 からの脱着不完全に由来するものと考えられる. このような損失を防ぐためにコンブから Amberlite IR-120 を使用しない分離法などについても検討を加えたが, いずれも満足な結果を得ることができなかった. しかしこのような laminine の回収率を考慮しておけばコンブ中の laminine 含量の近似的な定量分析に応用できるものと思われる.

著者等が入手し得たコンブ科の海藻 19 種について laminine 含量を実測した結果は Table II のようである.

TABLE II. Determination of Laminine in Laminariaceen

Plant name	Collected		Laminine $\mu M^{a)}$ 1 g. Laminariaceen
	Locality	When	
<i>Laminaria japonica</i> マコンブ	Muroran	Aug '63	0.07
<i>L. japonica</i> var. <i>ochotensis</i> ヤヤンコンブ	Rishiri	"	0.10
<i>L. fragilis</i> リシリコンブ	Muroran	"	0.10
<i>L. religiosa</i> ホソメコンブ	Shyakotan	"	0.04
<i>L. angustata</i> ミツイシコンブ	Erimo	"	0.34
<i>L. angustata</i> var. <i>longisima</i> ナガコンブ	Kaigara	"	0.11
<i>L. cichorioides</i> チヂミコンブ	Nemuro	"	0.13
<i>L. yezoensis</i> ゴヘイコンブ	Nosappu	"	0.18
<i>L. diabolica</i> オニコンブ	Nemuro	"	0.11
<i>Kjellmaniella gyrate</i> トロロコンブ	Nemuro	"	0.08
<i>K. crassifolia</i> ガゴメ	Muroran	"	0.02
<i>Costaria costata</i> スジメ	Muroran	"	0.04
<i>Arthrothamnus bifidus</i> ネコアシコンブ	Nosappu	"	0.06
<i>Eisenia bicyclis</i> アラメ	Shima	Apr '63	—
<i>Eckloniopsis radicata</i> アントクメ	Tanegashima	Aug '63	—
<i>Ecklonia cava</i> カジメ	Shimoda	"	0.16
<i>Undaria pinnatifida</i> ワカメ	Kesennuma	Feb '64	0.02
<i>U. undarioides</i> ヒロメ	Shima	Apr '62	0.01
<i>Alaria crassifolia</i> チガイソ	Muroran	Aug '63	—

a) The recoveries of laminine were 64~70%.

コンブの種類, 生育地域, 採集時期などと品質との関係はきわめて複雑であるが, 実験にもちいたコンブ試料の間にも laminine 含量に著しい相違が認められた. 大体 laminine はコンブ属の海藻に多く, そのうちとくに多かったのはミツイシコンブであり, 他属ではカジメを除いてはいずれも量は少ないか, または確認できなかった. カジメ中の laminine は単離して同定確認した.

定量値の低い種類に関してはさらに薄紙クロマトグラフィー (PPC) による定性で確認した. アミノ酸の PPC および薄紙電気泳動 (PEP) において laminine は他のアミノ酸とくに塩基性アミノ酸と区別が困難で, また Dragendorff 反応による検出では感度に難点があったので, laminine の dinitrophenyl (DNP) 化を試みた. すなわち laminine を常法にしたがって 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) で DNP 化した後, 水溶性 DNP-アミノ酸のみを分離し, *tert*-アミルアルコール-フタル酸塩系での PPC⁵⁾ を行なうと Rf 0.08 を示し, arginine

5) 日本化学会編: “実験化学講座,” 23, 183 (1957), 丸善.

Rf 0.20 と完全に分離できた。他に水溶性 DNP-アミノ酸としては DNP-cysteic acid, DNP-histidine が考えられるが、いずれも妨害とはならなかった。コンブ科海藻の水浸液の Amberlite IR-120 および Amberlite IRA-410 処理エキスについて実施した結果、ホソメコンブ、ネコアシコンブ、トロロコンブ、ガゴメ、カジメ、スジメ、ヒロメに DNP-laminine の明らかなスポットを認めたが、チガイソ、アントクメ、ワカメ、アラメについては確認にいたらなかった。

クロマトグラム上に分離された DNP-laminine は水で定量的に溶離し、吸収極大 360 m μ を示し、この波長における吸光度を測定すると Table III に示すように 0.3 μ M/4 ml. 以下の濃度で Beer の法則にしたがい、吸光度と濃度は直線関係にあり、比色定量の可能であることがわかった。

TABLE III. Relation between Concentration of Laminine and Absorbancy

Concentration of laminine ^{a)} (μ M)	Absorbancy at 360 m μ			
0.05	0.245	0.198	0.222	0.210
0.1	0.413	0.435	0.423	0.435
0.2	0.770	0.890	0.920	0.875
0.3	1.28	1.30	1.30	1.33

a) Laminine was treated with 2,4-dinitrofluorobenzene, and DNP-laminine was separated by paper chromatography. The spot was cut out and eluted with 4 ml. of water.

実 験 の 部

Amberlite IRC-50 塔による海藻中の laminine の定量 全藻を 20 倍量の水に浸漬して一夜室温で抽出、抽出液の一定量 (海藻 2~5 g. 相当量) を Amberlite IR-120 (H⁺) 20 ml. 塔に通導し、塔を水 10 ml. で洗い、吸着物を 5% NH₃ 100 ml. で脱着、脱着液を減圧濃縮、残留物を水 10 ml. に溶かし、Amberlite IRA-410 (OH⁻) 15 ml. 塔に通し、塔を水 90 ml. で洗浄、流出液を減圧濃縮、残留物を 0.2M クエン酸ナトリウム緩衝液 (A) 3 容と 0.2M リン酸ナトリウム緩衝液 (B) 2 容の混合液 (pH 5.95~6.00) 1 ml. に溶かし、定量的に Amberlite IRC-50 塔 (pH 5.95~6.00 に緩衝化、6×300 mm., 外とう管に 30° の水を循環) に注入、前記緩衝混合液で 1 hr. 約 8.6 ml. の流速で展開、溶出液は 0.72 ml. (12 滴) ずつコレクター上の試験管約 80 本に分割捕集、各試験管にはそれぞれ 2% ニンヒドリン溶液 (使用前に 0.2% SnCl₂·2H₂O 添加) 1 ml. を加え、沸騰水中 15 min. 加熱、5 min. 流水で冷却、水 3 ml. を加えて希釈、フォトコン光電比色計、フィルター 567 m μ で吸光度を測定。

Laminine の dinitrophenyl および定量的ペーパークロマトグラフィー laminine 標準溶液 0.05 ml. (0.5~3.0 μ M 含有) に 5% NaHCO₃ 0.15 ml., 5% DNFB EtOH 溶液 0.30 ml. を混じ、ときどき振りまぜながら室温に放置、2 hr. 後 N₂ 気流中で約 0.10~0.15 ml. まで濃縮、水を加えて約 0.5 ml. とし、Et₂O 0.5 ml. ずつで 2 回抽出、水層に conc. HCl 1 滴を加えて酸性とし、Et₂O 0.5 ml. ずつで 2 回抽出、水層を N₂ 気流中で濃縮し、全量を 0.2 ml. とした。この溶液 20 μ L. について *tert*-AmOH-フタル酸塩系の PPC をおこない、スポットを含む濾紙 (15×25 mm.) を切りとり、水 4 ml. の中に入れてときどき振りまぜながら 15 min. 室温に放置、溶離液の吸光度を日立分光光度計 EPU-2A、波長 360 m μ , 1 cm. のセルで測定。

カジメより laminine の単離 カジメ 2 kg. より第 1 報¹⁾ で述べた操作によって紅色針状晶のライネッケ塩 54 mg. を分離、これより製したシュウ酸塩 22 mg. を水-EtOH から再結晶、m.p. 123~125° の無色針状晶 15 mg. を得た。PPC, PEP および IR は laminine シュウ酸塩の標品と一致。

終わりに海藻の採集、鑑定にご指導とご援助を賜った鹿児島大学水産学部 田中 剛教授、北海道大学海藻研究所 中村義輝博士、アミノ酸分析にご支援をいただいた武田薬品工業株式会社研究所に深謝いたします。

東北大学医学部薬学科、白石製薬株式会社