〔薬 学 雑 誌〕
YAKUGAKU ZASSHI
85 (9) 832 ~ 835 (1965)

UDC 581.19 : 582.547.1 : 547.466

126. 村上孝夫, 長沢元夫, 糸川秀治, 稲富秀夫: 生薬の水溶性成分に関する研究
(第1報) 半夏およびムサシアブミ塊茎の遊離アミノ酸について

Takao Murakami, Motoo Nagasawa, Hideji Itokawa, and Hideo Inatomi :
Studies on the Water-soluble Constituents of Crude Drugs. I.
On the Free Amino Acids isolated from Tuber of *Pinellia*
ternate BREITENBACH and *Arisaema ringens* SCHOTT.

(Department of Pharmacy, Tokyo College of Science*1)

Ornithine, citrulline, arginine, γ -aminobutyric acid, glutamic acid, aspartic acid, and leucine were isolated and identified from the rhizome of *Arisaema ringens* SCHOTT. Serine, glycine, alanine, tyrosine, valine, and phenylalanine were identified further by two-dimensional paper chromatography.

β -Aminobutyric acid was isolated as crystals and identified as a new natural amino acid from the pinellia tuber. The tuber also yielded γ -aminobutyric acid, glutamic acid, aspartic acid, and arginine, which were isolated, and the presence of ornithine, citrulline, lysine, serine, glycine, alanine, tyrosine, valine, and leucine were identified by paper chromatography.

(Received April 13, 1965)

ムサシアブミ *Arisaema ringens* SCHOTT はサトイモ科に属し, 地下に塊茎を有する多年生草木である。日本および中国では, 本属植物の塊茎を天南星と称し, 脳溢血による神経および筋肉の麻痺, 痙攣, 小児のひきつけ, てんかんなどの治療に用い, 鎮静, 鎮痙の効がある。またその他去痰, 利尿, 鎮痛などの効もあるといわれる。ムサシアブミ塊茎の内部構造学的研究は, 藤井, 高橋¹⁾ 等によって行なわれているが, その化学成分についての報告はない。

また半夏は同じくサトイモ科のカラスビシタ *Pinellia ternate* BREITENBACH の塊茎であって, 漢方処方では常に生薑とともに使われ, 特に悪阻の薬として有名である。本生薬の成分については, 尾関²⁾ が, β -sitosterol, β -(β -sitosteryl)-D-glucoside および choline を, 長谷川等³⁾ が, homogentisic acid の存在を報告しているが, 水溶性成分特に遊離アミノ酸についての報告はない。

著者等は, 大分県別府近辺^{*2} で採集したムサシアブミの塊茎および半夏の遊離アミノ酸について検討した。すなわち, 実験の部に記載したように, 各種イオン交換樹脂を利用して, アミノ酸フラクションをそれぞれ, 酸性, 中性, 塩基性アミノ酸の各フラクションに分別した。

ムサシアブミの酸性アミノ酸フラクションからは m.p. 246~249°(decomp.) の針状晶および m.p. 268~270° の針状晶を得たが, これらはそれぞれ glutamic acid, aspartic acid と同定した。なお酸性アミノ酸としては, glutamic acid, aspartic acid 以外には含まれていないことを, 二次元のペーパークロマトグラフィー (PPC) で確認した。

塩基性アミノ酸フラクションからは, m.p. 264~266°(decomp.) および m.p. 209~211°(decomp.) の塩酸塩をそれぞれ無色針状晶として得たが, これらは, ornithine, arginine と同定した。なお塩基性アミノ酸としては, ornithine, arginine 以外には認められなかった。

中性アミノ酸フラクションからは, m.p. 192~194°(decomp.) の長針状晶, m.p. 219~221°(decomp.) の無色針状晶および m.p. 292~294° の白色薄板状晶を得たが, これらはそれぞれ, γ -aminobutyric acid, citrulline お

*1 Funakawara-cho, Shinjuku-ku, Tokyo.

*2 大分県速見郡日出町。

1) 藤井, 高橋: 日本薬学会第83年年会で発表 (1963年11月)。

2) 尾関: 本誌, 81, 1706 (1961); 82, 766 (1962)。

3) 長谷川, 市原, 坂本: Proc. Jap. Acad., 35, 246 (1959)。

よび leucine なることを確認した。なお中性アミノ酸としては, 上記 γ -aminobutyric acid, citrulline, leucine のほかに二次元 PPC によって, serine, glycine, alanine, tyrosine, valine, phenylalanine の存在を確認した。

ornithine, arginine, citrulline は ornithine cycle のメンバーで, とくに citrulline は各種植物から結晶として分離されているが, ornithine は PPC によって証明された⁴⁾ ほかは, 結晶として分離された例として, Coleman⁵⁾ が *Linum usitatissimum* (アマ科) から, 2,4-dinitrophenyl ornithine として分離証明した報告があるだけである。ムサシアブミの塊茎から, これら三アミノ酸が結晶として分離されたことは, 植物中における ornithine cycle の存在⁶⁾ を支持するものとして興味あるものと考えられる。

半夏の酸性アミノ酸については, glutamic acid, aspartic acid を単離同定し, 二次元 PPC によって, glutamic acid, aspartic acid 以外の酸性アミノ酸は認められなかった。

塩基性アミノ酸フラクションについては, arginine を結晶として単離同定したほか, EDTA を impregnate した濾紙⁷⁾ を使用し, *m*-cresol-phenol (169:190) の溶媒系で PPC を行ない, ornithine, lysine を同定した。

中性アミノ酸フラクションについては, 二次元 PPC によって, serine, glycine, alanine, tyrosine, valine, leucine, citrulline を同定し, なお γ -aminobutyric acid と同じ Rf 値の位置に, spot を認め, ムサシアブミの場合と同じように Cu 塩に導き, γ -aminobutyric acid を分離しようとしたが, 期待に反して γ -aminobutyric acid

Fig. 1.

Solvent system: 2,4-lutidine-water (8:2)

を分離することができなかった。そこで銅塩溶液から, citrulline の銅塩を分離後, 硫化水素で分解した液を, BAW (4:1:5) および 2,4-lutidine-H₂O (4:1)⁸⁾ の溶媒系を使用して, preparative paper chromatography を行なって, 未知フラクションを精製し, 2,4-lutidine 系溶媒を使用して PPC を行なったところ, Fig. 1 に示すように β -aminobutyric acid の Rf 値と全く一致した。そこで, さらに大量の半夏 (6 kg.) から得た約 2 g. の中性アミノ酸フラクションについて, Amberlite CG-400 (chloride form) (200~400 mesh) を使って, カラムクロマトグラフィーを行ない, 溶出液を 5 ml. ずつ分取し, 365~435 ml. のフラクションから, γ -aminobutyric acid を, 440~475 ml. のフラクションから m.p. 207~209°(decomp.) の針状晶をそれぞれ, 純粋に分離することができた。m.p. 207~209° の針状晶は 2,4-lutidine による Rf 値が, β -

Synthetic β -aminobutyric acid Natural β -aminobutyric acid

Fig. 2.

- 4) A.I. Virtanen, J.K. Miettinen: *Nature*, **170**, 283 (1952); M.W. Philpott: *J. Am. Leather Chemists' Assoc.*, **46**, 248 (1951)(C.A., **45**, 9292 (1951)); W.O. James: *New Phytol.*, **48**, 172 (1949).
- 5) R.G. Colemann: *Nature*, **1958**, 777.
- 6) H. Reinbothe, K. Mothes: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **13**, 129 (1962).
- 7) I. Stewart: *J. Chromat.*, **10**, 404 (1963).
- 8) L.J. Reed: *J. Biol. Chem.*, **183**, 451 (1950); J. Awapara, J. Landua, R. Fuerst, B. Seale: *Ibid.*, **187**, 35 (1950).

aminobutyric acid と全く一致し、赤外線吸収スペクトルも Fig. 2 に示すように、合成 β -aminobutyric acid と全く一致する。なお β -aminobutyric acid は Ninhydrin 反応陽性で、 β -amino acid にもかかわらず、銅塩をつくる。

aminobutyric acid の異性体中、天然から分離されたものは、 γ -aminobutyric acid のほかに、 α -aminobutyric acid,⁹⁾ β -aminoisobutyric acid¹⁰⁾ などが知られているが、 β -aminobutyric acid が植物からはもちろん、天然から分離されたのは始めてである。

実 験 の 部

赤外線吸収スペクトルは、日立赤外分光光度計 SPI-S₂ 型を使用し、KBr 錠剤法で測定した。また文中特に記載のない PPC の Rf 値は、東洋濾紙 No. 50 (40×40 cm.) を使用し、温度 20° において、二次元法 (上昇距離各 35 cm.) による Rf 値である。なお展開溶媒としては一次元 BuOH-AcOH-H₂O (4:1:2)、二次元 phenol-H₂O (5:1) を使用した。

ムサシアブミ塊茎からアミノ酸フラクションの抽出分離 ムサシアブミの塊茎 (末乾燥) 16 kg. を、50% EtOH で数回抽出。約 2 L. に減圧濃縮後、Amberlite IR-120 (H⁺ 型) (5×50 cm.) に通導し、約 30 L. の蒸留水で洗浄後、吸着部を *N* NH₄OH 約 4 L. で溶出。溶出液を約 700 ml. に減圧濃縮後、Amberlite IR-4B (acetate 型) (6×50 cm.) に通導後、蒸留水で洗浄。洗浄液は約 1 L. に濃縮し、Amberlite IR-120 (NH₄⁺ 型) に通導し、蒸留水で洗浄。洗浄液は濃縮する (中性アミノ酸フラクション)。吸着部は 2*N* NH₄OH 4 L. で溶出。溶出液は濃縮する (塩基性アミノ酸フラクション)。

酸性アミノ酸フラクションから, aspartic acid, glutamic acid の分離 Amberlite IR-4B (acetate 型) 吸着部は、0.05*N* 酢酸約 3 L. で溶出。溶出液を濃縮乾固し、水から再結晶。m.p. 246~249°(decomp.) の針状晶 0.1 g. を得る。Rf 値, IR スペクトルともに標品 glutamic acid と一致。さらに 0.5*N* 酢酸 1 L. で溶出。溶出部は PPC によって glutamic acid, aspartic acid を検出。さらに *N* 酢酸 3 L. で溶出。溶出部を水から再結晶。m.p. 268~270° の針状晶 70 mg. を得る。Rf 値, IR スペクトルともに標品の aspartic acid と一致。

塩基性アミノ酸フラクションから arginine, ornithine の分離 塩基性アミノ酸フラクションを約 50 ml. に濃縮後、常法により picrate をつくり、picrate を MeOH 可溶部と不溶部に分ける。MeOH 不溶の picrate を水に溶かし、常法により 6*N* HCl で分解後、ピクリン酸を除き、濃縮後 EtOH を加え放置すると、無色針状晶が得られる。希 EtOH から 3 回再結晶を行ない、m.p. 264~266°(decomp.) の無色針状晶 0.2 g. を得る。Rf 値, IR スペクトルともに標品 ornithine 塩酸塩に一致する。MeOH 可溶の picrate を常法により分解後、Amberlite IR-4B (NH₄⁺ 型) に通導して、塩酸を除き、少量の希 MeOH から再結。m.p. 209~211°(decomp.) の無色針状晶 2 g. を得る。坂口反応陽性。Rf 値, IR スペクトルともに標品 arginine に一致。

中性アミノ酸フラクションから, γ -aminobutyric acid, citrulline, leucine の分離 中性アミノ酸フラクション 1.7 g. を約 50 ml. の水に溶解し、常法により Cu 塩をつくる。反応液、洗液を合わせて、濃縮し、silica gel 少量にまぶし、中性 Woelm Al₂O₃ のカラム (2×32 cm.) に添加し、80% EtOH で展開する。溶出液は減圧で濃縮乾固後、90% EtOH で 3 回再結晶を繰り返えし、m.p. 192~194°(decomp.) の針状晶 20 mg. を得る。Ninhydrin 反応陽性。銅塩をつくらぬ。Rf 値: 2,4-lutidine-H₂O (4:1); 0.26 (γ -aminobutyric acid : 0.26); 10% 含水 BuOH : 0.28 (γ -aminobutyric acid : 0.28) IR スペクトルも標品に一致。

上記銅塩のカラムクロマトグラフィーにおいて、80% EtOH で溶出されなかった部分は、5% 酢酸で溶出し、溶出液を減圧で乾固し、約 50 ml. の水に溶解して、常法により銅塩をつくり、反応液を濃縮して、氷室中に 1 夜放置すると、難溶性の銅塩が析出する。これを濾過後、H₂S で分解後、濾液を乾固し、残渣を希 EtOH から数回再結晶して、無色針状晶 22 mg. を得た。m.p. 219~221°(decomp.) 本物質は Ehrlich 反応陽性、坂口反応、Pauly 反応陰性。Rf 値, IR スペクトルとも標品 citrulline に一致する。また本物質 5 mg. を 2*N* NaOH 溶液 10 ml. と 2 hr. 加熱後、塩酸で中和。Amberlite IR-120 (H 型) (2×20 cm.) に通導。蒸留水で洗浄後、*N* NH₄OH 約 600 ml. で溶出。溶出液について、PPC を行なった結果、標品の ornithine と全く一致する。

上記 citrulline の銅塩を除いた濾液を、H₂S で分解後、濾液を濃縮して、少量の silica gel にまぶし、silica gel カラムクロマト (3×30 cm.) の上部に添加し、isopropanol-NH₄OH-H₂O (7:1:2) の溶媒で展開。5 ml. ずつ、170 のフラクションに分別する。3~12 のフラクションを集め、乾固後、希 EtOH から数回再結晶して、m.p. 292~294° の白色華状結晶 17 mg. を得る。Rf 値, IR スペクトルとも標品の leucine に一致する。

半夏からアミノ酸フラクションの抽出分離 半夏 3 kg. を、ムサシアブミの場合と全く同様に処理して、酸性アミノ酸フラクション 0.5 g., 塩基性アミノ酸フラクション 1 g., 中性アミノ酸フラクション 1 g. を得る。

酸性アミノ酸フラクションから, aspartic acid, glutamic acid の分離 ムサシアブミの場合と同じように

9) C. E. Dent, W. Stepka, F. C. Steward : Nature, 160, 682 (1947); A. I. Virtanen, J. K. Miettinen : Biochim. biophysica Acta, 12, 181 (1953).

10) S. Asen, J. F. Thompson, C. J. Morris, F. Irreverre : J. Biol. Chem., 234, 343 (1959).

処理して, glutamic acid 0.1 g., aspartic acid 0.2 g. を得る.

塩基性アミノ酸フラクションから arginine の分離 多量の MeOH から再結晶して, 0.7 g. の arginine を単離同定した.

中性アミノ酸フラクションから β -aminobutyric acid の分離, 同定 半夏 6 kg. から分離した中性アミノ酸フラクション 2 g. を Amberlite CG-400 (chloride 型, 200~400 mesh) のカラム (4×50 cm.) を使って, カラムクロマトグラフィーを行なう. 蒸留水で展開, 溶出し, 5 ml. ずつ分取し, 各フラクションを二次元 PPC で検討. 0~200 ml. は Ninhydrin 反応陰性. 205~315 ml. は serine, glycine, threonine, alanine, valine, leucine を含む. 320~360 ml. は, alanine, γ -aminobutyric acid を含む. 365~435 ml. は, γ -aminobutyric acid のみ. 440~475 ml. は, β -aminobutyric acid のみ. 480~2000 ml. は, serine, glycine, alanine, valine, threonine, leucine を含む. 440~475 ml. のフラクションを乾固し, 希 EtOH から再結晶すると, m.p. 207~209° (decomp.) の針状晶 3 mg. を得る. 分子式 $C_4H_9O_2N$ Anal. Calcd.: C, 46.59; H, 8.80; N, 13.58. Found: C, 46.20; H, 8.91; N, 13.56. Rf 値, IR スペクトルとも合成 β -aminobutyric acid に一致する. なお旋光度は, 試料不足のため, 測定不能.

標品の β -aminobutyric acid, β -aminoisobutyric acid, α -aminobutyric acid, α -aminoisobutyric acid を供与された明治大学農学部 犬飼文人教授に感謝の意を表す. また半夏を大量に供与された浅野正義氏に感謝の意を表す.

東京理科大学薬学部