液状のものは無色透明，固体は白色をしており，そのまま精製しないで使用した。

血球サスペンション：ヘパリンを添加して凝固を防止した犬の血液を遠心分離 (3000 r.p.m., 10 min.) して血球を分離し，等張緩衝液 (pH 7.1, リン酸塩-食塩) で3回洗浄してからこの緩衝液中に血球を分散させ 2.5% (v/v) サスペンションとした。サスペンションの濃度を変える場合にもやはり同じ緩衝液を用いた。

溶血の測定 赤血球サスペンション 2 ml. を試験管にとり，これに等張緩衝液に溶かした界面活性剤溶液の同体積を注射器を用いてすみやかに加え，はげしく攪拌する。これを 30° の恒温槽中で 15 min. 反応させ，ただちに遠心分離 (1500 r.p.m., 10 min.) によって未溶血の血球を除く。ついで上澄液中のヘモグロビン量を Bausch & Lomb 分光光度計により 540 mμ の光を用いて決定した。なおあらかじめサスペンション中の全ヘモグロビン量を求めておき，反応終了後の上澄液の吸光度から溶血の度合いがただちにわかるようにした。

表面張力の測定 離合社 du Nouy 表面張力計を用いて界面活性剤溶液の表面張力を室温 (25±2°) において測定した。

薄層クロマトグラフィー 溶血をおこさない程度の低濃度の界面活性剤溶液と血球サスペンションを混合反応させ，上澄液を凍結乾燥して後，CH₃OH-CHCl₃=1:1 (v/v) 混液で約 6 hr. 抽出し，この抽出液を減圧下で濃縮，乾固させる。乾固物を C₂H₅OH-C₂H₅OC₂H₅ (3:1 (v/v)) 混液に溶解し，この溶液をガラス板上に約 250 μ 厚に拡げたシリカゲル薄層上にスポットして CHCl₃-CH₃OH-H₂O (75:25:4 (v/v/v)) を展開溶媒として分別した。発色剤⁶⁾ はコレステロールに対しては SbCl₃，ケファリンに対しては ニンヒドリン，レシチンに対しては Dragendorff 試薬を用いた。

終わりに犬の血液を絶えず提供していただいた本学生理化学教室 守屋 寛教授に深謝する。また実験の一部を担当された井上隆子，佐藤淳子両嬢に感謝の意を表する。

東京理科大学薬学部

6) H. Wagner, L. Horhammer, P. Wolff: Biochem. Z., 334, 175 (1961).

[薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
86 (3) 253 ~ 256 (1966)]

UDC 547.94:582.675.4

古川 宏：防已科植物アルカロイド研究 (第217報^{*1}) ハスノハカズラ
Stephania japonica MIERS のアルカロイド (補遺 14^{*2})
Epistephanine の還元について

Hiroshi Furukawa: Studies on the Alkaloids of Menispermaceous
Plants. CCXVII. Alkaloids of *Stephania japonica* MIERS.
(Suppl. 14) Hydrogenation of Epistephanine.
(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University^{*3})

Following earlier reports on the reduction of hypoepestephanine (I) and epistephanine (II) by Tomita and Watanabe,^{1,2)} reduction of II with zinc dust in dil. sulfuric acid was carried out. From the isolation of diastereomeric dihydroepistephanine-A (IV-A) and dihydroepistephanine-B (IV-B) as its product, the reduction was found to progress in two directions, as was the case with hypoepestephanine (I).

(Received June 9, 1965)

渡辺¹⁾ はさきに hypoepestephanine (I) をメタノール溶媒中 NaBH₄ で還元を行なうときは立体特異的に反応が進行し，唯一の反応生成体である dihydrohypoepestephanine-B (III-B) が高収率で得られることを見いだ

*1 本研究は富田真雄：“防已科植物アルカロイド研究”(M. Tomita: Studies on the Alkaloids of Menispermaceous Plants)の一部である。第216報。富田，新宮，富士谷，古川：Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 13, 921 (1965).

*2 補遺 13. 富田，井深，犬伏，武田：Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 13, 704 (1965).

*3 Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto.

1) 渡辺：本誌，80, 166 (1960).

し、また hypoe pistephanine (I) を希硫酸中亜鉛末を用いて還元を行なうときは、2 方向に反応が進行し、dihydrohypoe pistephanine-A (III-A) および dihydrohypoe pistephanine-B (III-B) が得られることを報告している。一方これよりさき富田、渡辺²⁾は hypoe pistephanine (I) の O-methyl ether に相当する物質 epistephanine (II) を NaBH_4 で還元するときは、hypoe pistephanine (I) の場合と同様に立体特異的に還元反応が進行し、dihydroepistephanine-B (IV-B) が得られることを報告している。しかしながら epistephanine (II) を希硫酸中亜鉛末で還元するときは、hypoe pistephanine (I) の同じ試薬による還元の場合と異なり、ただ1つの成績体 dihydroepistephanine-A (IV-A) のみを単離し報告している。

今回著者は epistephanine (II) の希硫酸中亜鉛末による還元反応を、薄層クロマトグラフィー (TLC)^{*4} を用いて詳細に検討した結果、たがいに diastereomer である2個の反応成績体、dihydroepistephanine-A (IV-A) および dihydroepistephanine-B (IV-B) を単離し、epistephanine (II) の希硫酸中亜鉛末による還元においても、hypoe pistephanine (I) の場合と同様、2 方向に反応が進行することを認めた。

すなわち実験の部に詳述するように epistephanine (II) をエタノール溶媒中亜鉛末と希硫酸を加え加熱攪拌し反応を行ない得られる総反応成績体は TLC でほぼ等量の2個の塩基の存在を示す。まず本反応物を塩酸塩に導くとエタノール溶液より m.p. 253~256°(decomp.), $[\alpha]_D + 272^\circ$ (メタノール) の無色針状結晶が得られ、本物

*4 Thin Layer Chromatography. Aluminiumoxid G nach Stahl. Acetone, Chloroform (1:1) で展開。Dragendorff 試薬で顕色。以下同様にして行なう。

2) 富田、渡辺: Pharm. Bull. (Tokyo), 4, 124 (1956).

質の遊離塩基は TLC で 1 spot を示し, NMR スペクトル*5 は Fig. 1 (A) に示すように 7.42 τ に methylimino 基, 6.79, 6.34, 6.21, 6.11 τ に 4 個の methoxyl 基に対応する signal を有し, また 7.83 τ に重水の添加により消失する 1 個の proton の signal を示す. つぎに本物質をホルマリン, NaBH₄ により N-methyl 化

Fig. 1-A. NMR Spectrum of Dihydroepistephanine-A (IV-A) (in CDCl₃ solution)

Fig. 1-B. NMR Spectrum of Dihydroepistephanine-B (IV-B) (in CDCl₃ solution)

を行ない m.p. 136~139°, $[\alpha]_D^{25} +310^\circ$ (クロロホルム) の無色針状結晶を得た. 本塩基はその IR (クロロホルム) および NMR スペクトルより obaberine (O-methyloxyacanthine) (V) であることを確認した. したがってさきに塩酸塩, m.p. 253~256°(decomp.) として得た物質は dihydroepistephanine-A (IV-A) であることが明らかとなった.

一方 epistephanine (II) の亜鉛末-希硫酸還元成績体より上記の dihydroepistephanine-A (IV-A) の塩酸塩の結晶を分離した母液を遊離塩基とし, アルミナクロマトグラフィーで分離精製し, さきの dihydroepistephanine-A (IV-A) とは TLC で異なった spot を示す物質を単離した. 本塩基の NMR スペクトルは Fig. 1 (B) に示すように 7.43 τ に methylimino 基, 6.95, 6.52, 6.24, 6.05 τ に 4 個の methoxyl 基の signal を示し, さきに得た dihydroepistephanine-A とは明らかに異なっている. 本塩基はさきに渡辺が報告したように,¹⁾ epistephanine (II) を NaBH₄ により還元するときに得られる dihydroepistephanine-B (IV-B) とその IR (クロロホルム), および NMR スペクトルを直接比較の結果完全に同一物質であることを確認し, さらにそれらの N-methyl 化体についても IR (クロロホルム), NMR スペクトルおよび旋光度により同定確認した.

したがってここに epistephanine (II) を希硫酸中亜鉛末により還元するときは, 2 方向に反応が進行し, dihydroepistephanine-A (IV-A) および dihydroepistephanine-B (IV-B) を生成することが明らかとなった.

実験の部

Epistephanine (II) の希硫酸中亜鉛末による還元 epistephanine (II) 500 mg. を 99% EtOH 20 ml., 20% H₂SO₄ 9 ml. に溶解. Zn 末 1.0 g. を加え攪拌, 還流. 1 hr. ごとに Zn 末 30 mg., 20% H₂SO₄ 1 ml. を追加し 5 hr. 反応. 温時 Zn 末を除去後, 減圧で EtOH を留去. NH₄OH でアルカリ性とし CHCl₃ で抽出. CHCl₃ 層は水洗, 無水 K₂CO₃ で乾燥, 溶媒留去. 油状物 500 mg. を得る. TLC でほぼ等量の 2 個の spot を示す. EtOH 溶液とし HCl 塩に導く. HCl 塩: EtOH より再結晶. 無色針状結晶 230 mg. を得る. m.p. 253~256° (decomp.), $[\alpha]_D^{25} +272^\circ$ (c=1.45, MeOH). (dihydroepistephanine-A (IV-A)). HCl 塩よりの遊離塩基は TLC

*5 NMR はすべて Varian A-60 High Resolution Spectrometer により測定. 溶媒: CDCl₃, Chemical shift は TMS を内部基準とし, τ 値であらわした.

で 1 spot. NMR signals: 7.42 τ (3H, N-CH₃); 7.83 τ (1H, NH, D₂O 添加により消失); 6.79, 6.34, 6.21, 6.11 τ (12H, 4 $\times$ OCH₃). C₃₇H₄₀O₆N₂ $\cdot$ 2HCl $\cdot$ $\frac{3}{2}$ H₂O. Anal. Calcd.: C, 62.71; H, 6.39. Found: C, 62.81; H, 6.62.

上記塩酸塩結晶を分離した母液は遊離塩基とし, アルミナクロマトにかけ CHCl₃ で展開し, dihydroepistephanine-A とは異なった spot を示す部分を集める. 油状物 200 mg. を得る. (dihydroepistephanine-B (IV-B)). NMR signals: 8.02 τ (1H, NH, D₂O の添加により消失); 7.43 τ (3H, N-CH₃); 6.95, 6.52, 6.24, 6.05 τ (12H, 4 $\times$ OCH₃). 本塩基は IR (CHCl₃), TLC および NMR により dihydroepistephanine-B¹⁾ と同定.

N-Methyldihydroepistephanine-A (V) dihydroepistephanine-A (IV-A) 140 mg. を MeOH 10 ml. に溶解. ホルマリン 3 ml. を加え室温で 30 min. 攪拌. ついで NaBH₄ 500 mg. を少しずつ加えさらに 30 min. 攪拌. 減圧で溶媒留去. 残留物を dil. HCl に溶解. エーテルと振とう後. 水層を NH₄OH アルカリ性としエーテル抽出. エーテル層は水洗, 無水 K₂CO₃ で乾燥, 溶媒留去. 油状物 120 mg. を得る. アルミナクロマトにかけベンゼン, エーテル (1:1) 混液で展開し精製. エーテル溶液より結晶析出. 無色針状結晶. m.p. 136~139°. $[\alpha]_D^{25} +310^\circ$ (c=0.33, CHCl₃). IR (CHCl₃) および NMR は obaberine (O-methyloxyacanthine) (V) と完全に一致.

N-Methyldihydroepistephanine-B (VI) dihydroepistephanine-B (IV-B) 60 mg. を (IV-A) の場合と同様に処理し N-methyl 化. MeOH より結晶析出. 収量 50 mg. MeOH より再結晶. m.p. 210~212°. $[\alpha]_D^{25} +95.8^\circ$ (c=0.58, CHCl₃). IR (CHCl₃) および NMR は N-methyldihydroepistephanine-B (VI) の標品と完全に一致. C₃₈H₄₂O₆N₂ Anal. Calcd.: C, 73.29; H, 6.80. Found: C, 73.00; H, 7.05.

本研究に際し御指導を賜った本学 富田真雄教授に心からお礼申し上げます. また NMR スペクトルを測定下さった本学 新宮徹朗博士, 山本正治氏, および元素分析を担当された本学元素分析センターの方々にお礼申し上げます.

京都大学薬学部