ケシ科植物アルカロイドの研究 (第 21 報¹⁾) *Corydalis speciosa* MAXIM
の塩基性成分について その 1 D.C.C.C. と Multi-buffer Solution
との組み合わせによる三級塩基の分離

谷 千秋, 永倉直敬, 杉山信子
神戸女子薬科大学²⁾

Studies on the Alkaloids of Papaveraceous Plants. XXI.¹⁾ Alkaloids of
Corydalis speciosa MAXIM. (1). The Isolation of the Tertiary
Bases by the Multi-buffered D.C.C.C.

CHIAKI TANI, NAOTAKA NAGAKURA and NOBUKO SUGIYAMA
Kobe Women's College of Pharmacy²⁾

(Received January 6, 1975)

With the droplet countercurrent chromatography, using the multi-buffered solution as the moving phase, tertiary bases were isolated from *Corydalis speciosa* MAXIM. and identified as corypalline, protopine, α -allocryptopine, capaurimine, capaurine, and *dl*-tetrahydropalmatine.

従来三級塩基の分離は、カラムクロマトグラフィーや preparative 薄層クロマトグラフィー (以下 TLC) などシリカゲルやアルミナなどの吸着剤を用いるクロマトグラフィーにより行なわれてきた。しかしこれらの方法では吸着が多く特に極性の高い化合物ではかなりの損失があると思われる。

そこで著者らは谷村ら³⁾により開発された吸着剤を全く用いない新しい液-液クロマトグラフィーの一種である Droplet Countercurrent Chromatography (以下 D.C.C.C.) による三級塩基の分離を試みた。しかし D.C.C.C. を用いて三級塩基の分離を行なう場合遊離塩基の形での分離は D.C.C.C. に用い得る溶媒系への溶解度の低さや、

Fig. 1. Elution Diagram of Scoulerine (I), Capaurimine (II), and Corydalmine (III)

-----: pH value
solvent; CHCl_3 : MeOH : H_2O = 5: 5: 3 (pH 7—
pH2), ascending method

またたとえ少量の試料を用いて D.C.C.C. を試みても溶出時間が長くかかり過ぎ分離能も決して良くはないことなどから塩基を塩の形として分離することを試みた。すなわち multi-buffer solution⁴⁾ と D.C.C.C. とを組み合わせで分離を行ないほぼ満足すべき結果を得ることができたので報告する。

水層に multi-buffer solution を用いる D.C.C.C. はその例が現在まで報告されていないのでその可能性を検討するため予試験として scoulerine (I), capaurimine (II), および corydalmine (III) の混合物を次のような方法で分離してみた。溶媒系は CHCl_3 : MeOH : H_2O = 5: 5: 3 を用い固定相をクロロホルム層、移動相を水層とする上昇法により行なった。なお移動相は pH 7 から pH 2 まで連続的に変化させた。溶出液の各フラクションの 280 nm における吸光度を測定したものが Fig. 1 のグラフである。ピーク ①は scoulerine (I) と capauri-

- 1) 第 20 報: C. Tani, N. Nagakura, S. Hattori, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **23**, 313 (1975).
- 2) Location: Motoyamakitamachi, Higashinada-ku, Kobe.
- 3) T. Tanimura, *Farumashia*, **7**, 628 (1971); Y. Ito, R.L. Bowman, *Anal. Chem.*, **43**, 69A (1971); T. Tanimura, J.J. Pisano, Y. Ito, R.L. Bowman, *Science*, **169**, 54 (1970).
- 4) 富田真雄, “実験化学講座 22 巻 天然有機化合物取扱い法,” 第 3 版, 日本化学会編, 丸善, 東京, 1966, p. 421; E. Fujita, K. Bessho, Y. Saeki, M. Ochiai, K. Fuji, *Lloydia*, **34**, 306 (1971).

mine (II) との混合物であり、ピーク ②は corydalmine (III) であることがわかったが、(I) と (II) は pH の変化する速度や流速を変えても全く分離できないことがわかった。しかし corydalmine (III) は他の二成分とは完全に分離されており、これらすべての塩基の回収率は 100% であった。

したがって本手法を用いれば、植物中に含まれている三級塩基の分離が収率よく達成されるものと予想し、いまだ成分研究の行なわれていない *Corydalis speciosa* MAXIM. エゾキケマンのフェノール性および非フェノール性三級塩基の分離に本法を応用した。

エゾキケマンは北海道地方に自生する越年草であり、開花期に採集、風乾した植物を Chart 1 に示す方法により抽出処理しフェノール性三級塩基部と非フェノール性三級塩基部とに分離した。なお水溶性四級塩基はライネッカーとして捕捉した。

Chart 1

得られたフェノール性および非フェノール性三級塩基部は TLC 上数種の塩基を含んでいるので、これらの粗塩基を上記の方法を用いて D.C.C.C. による分離を行なった。

最初にエーテル可溶部のフェノール性三級塩基部の分離を行なった。Sampling は 8.8 g, 流速は 0.36 ml/min とした。Fig. 2 がその溶出曲線であり、それぞれのピークを Base A, Base B,⁵⁾ Base C および Base D とした。各ピークは溶媒留去後アンモニアアルカリ性とし、クロロホルムで抽出した。

次にエーテル可溶部の非フェノール性三級塩基部の分離は、Sampling を 5.4 g, 流速を 0.41 ml/min として行なった。その溶出曲線 (Fig. 3) のピークをそれぞれ Base B, Base D,⁶⁾ Base E および Base F とした。

以上のように分離した各ピークは TLC 上ほぼ one spot を示し、各塩基はほとんど完全に分離された。すなわち D.C.C.C. と multi-buffer solution とを組み合わせる本手法は三級塩基の分離上きわめて有効であることがわかった。

従来 D.C.C.C. の欠点の一つとして比較的少量の試料しか処理できないとされていた³⁾ が、移動相に multi-buffer solution を用いる本手法では capacity が飛躍的に増大し、約 9 g を sampling しても約 0.5 g で D.C.C.C. を行なった場合と同様な分離状態を示し、また流速も 0.2 ml/min から約 0.4 ml/min の間では分離能には全く関係のないことがわかった。すなわち multi-buffer solution を用いて D.C.C.C. を行なうと比較的多量の試料が、あまり時間をかけずに全く損失なしに処理できるわけである。

5) Base B はフェノール性塩基部に混入した非フェノール性塩基である。

6) Base D は非フェノール性塩基部に混入したフェノール性塩基である。

Fig. 2. Elution Diagram of the *tert.* Phenolic Bases Fraction of *Corydalis speciosa*

-----: pH value
solvent; CHCl_3 : MeOH : H_2O = 5: 5: 3 (pH7—pH2), ascending
method flow rate; 0.36 ml/min

Fig. 3. Elution Diagram of the *tert.* Non-phenolic Bases Fraction of *Corydalis speciosa*

-----: pH value
solvent; CHCl_3 : MeOH : H_2O = 5: 5: 3 (pH7—pH2), ascending method flow rate; 0.41 ml/min

Base A は mp 165—166° の無色針状晶で、マスペクトルにおいて親イオンが m/e 193 に現われ、紫外線吸収 (以下 UV) スペクトルにおいて 224 nm および 283 nm に極大吸収を示しアルカリ添加により bathochromic shift する。また赤外線吸収 (以下 IR) スペクトルにおいて 3400 cm^{-1} にフェノール性水酸基が存在することから本塩基はフェノール性の tetrahydroisoquinoline 系アルカロイドであることが推測される。⁷⁾ また本塩基は Gibbs' test が陰性であることから本塩基の水酸基は 7' 位に存在することが推定される。⁸⁾ これらのデータは本塩基が corypalline (IV) であることを示唆する。標品との混融, TLC により Base A は corypalline (IV) と同定した。

Base C は mp 210°, $[\alpha]_D -280^\circ$ の無色プリズム晶で、UV スペクトルにおいて 224 nm および 275 nm に極大吸収を有することにより本塩基は tetrahydroprotoberberine 系アルカロイドであることが推定される。⁷⁾ マスペクトルにおいては親イオンが m/e 357 に現われさらに tetrahydroprotoberberine 型塩基に特徴的な retro Diels-Alder 型解裂により生じたイオンが m/e 208, 150 に現われるので,⁹⁾ A 環に 2 個の methoxy 基と 1 個の水酸基, D 環に 1 個の methoxy 基と 1 個の水酸基が存在する capaurimine (II) が推定された。標品との混融 IR スペクトル, NMR スペクトルおよび TLC より本塩基は capaurimine (II) と同定した。

Base D は mp 164°, $[\alpha]_D -286^\circ$ の無色柱状晶で、UV スペクトルより本塩基は tetrahydroprotoberberine 系アルカロイドであることが推定される。⁷⁾ マスペクトルにおいては親イオンが m/e 371 に現われ、他に特徴的なピークが m/e 206, 164 に現われるので⁹⁾ 本塩基は capaurine (V) と推定された。混融, IR スペクトル, NMR スペクトルおよび TLC より本塩基は capaurine (V) と同定した。

Base E は mp 160—162° の無色プリズム晶で、UV スペクトルにおいては 284 nm に極大吸収を有する。マスペクトルにおいては親イオンが m/e 369 に現われ、IR スペクトルにおいては 1650 cm^{-1} にカルボニル基に基づく吸収が現われる。また本塩基は酢酸と硫酸とによる protopine 型呈色反応が陽性であり、NMR スペクトルにおいては δ 1.87 に N-methyl 基, δ 3.78 と δ 3.85 に 2 個の methoxy 基, δ 5.92 に 1 個の methylenedioxy 基の signal が存在する。このことより本塩基は α -allocryptopine (VI) と推定され、標品との混融により融点降下を示さず TLC においても R_f 値が一致したので本塩基は α -allocryptopine (VI) と同定した。

Base B は本植物の主塩基で、mp 206—208° の無色柱状晶であり呈色反応および UV スペクトルは本塩基が protopine 型塩基であることを示している。マスペクトルにおいては親イオンが m/e 353 に現われ、NMR スペクトルより 2 個の methylenedioxy 基の存在がわかる。すなわち本塩基は protopine (VII) と推定され、混融, IR スペクトルおよび TLC より同定した。

Base F は mp 145—146°, $[\alpha]_D \pm 0^\circ$ の無色針状晶で、UV スペクトルより tetrahydroprotoberberine 系アルカロイドであることが推定される。^{*} NMR スペクトルより 4 個の methoxy 基の存在が示されたことより本塩基は

7) A.W. Sangster, K.L. Stuart, *Chem. Rev.*, **65**, 69 (1965).

8) H. Inouye, Y. Kanaya, Y. Murata, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **7**, 573 (1959).

9) C.Y. Chen, D.B. MacLean, *Can. J. Chem.*, **46**, 2501 (1968).

dl-tetrahydropalmatine (VIII) と推定され、標品との混融、IR スペクトルおよび TLC より同定した。

以上 6 種の塩基を充填剤を用いる通常のカラムクロマトグラフィーを用いずに分離同定した。本植物にはまだ数種の塩基を含んでいるが、(例, Fig. 2 の*) これらについては現在さらに分離を進めている。

Chart 2

実験の部¹⁰⁾

D.C.C.C. の条件 カラムは内径 1.8 mm, 長さ 400 mm のガラス管 250 本 (予試験) または 500 本を内径 0.65 mm, 長さ 530 mm のジュンフロンチューブで連結したもの, 固定相をクロロホルム層, 移動相を水層とする上昇法により行なう。溶媒系; S₁, CHCl₃: MeOH: H₂O (pH 2, McIlvain buffer solution, double strength)=5:5:3.¹¹⁾ S₂, CHCl₃: MeOH: H₂O (pH 7, McIlvain buffer solution, double strength)=5:5:3. S₂ のクロロホルム層をカラム全体に充填。Sampling を行なったのち, S₁, S₂ の水層をサイホンにより連結し pH 7 から pH 2 まで連続的に変化させながらカラム下端より送液して展開。流出液は 8—10 g ずつ分割し 280 nm の吸光度を測定。その時の pH の変化を点線で示した。(Fig. 1, 2 and 3). Elution diagram を作製し各ピークごとにまとめて溶媒を減圧留去, 残渣に H₂O を加えてアンモニアアルカリ性とし, クロロホルムで抽出, 水洗後無水 MgSO₄ で乾燥。溶媒留去後それぞれの溶媒より再結晶。

予試験 Scoulerine (I), capaurimine (II), corydalmine (III) をそれぞれ 5 mg ずつ混合したものを分離, 前記の溶媒系で D.C.C.C. を行ない流出液は 8 g ずつ分割。その elution diagram においてピーク ① は TLC (solvent, CHCl₃: MeOH=19:1, benzene: ether=1:1^{11,12)}) より scoulerine (I) と capaurimine (II) の混合物 (10 mg), ピーク ② は corydalmine (III) (5 mg) と同定。

***Corydalis speciosa* MAXIM. の分離** 1972 年および 1973 年 5 月に北海道で採集した本植物の全草を風乾したもの 4.95 kg を熱時 MeOH で抽出。減圧下 MeOH を留去。得られる残渣を 2% 酒石酸で meyer 反応が陰性となるまでくり返し温時抽出。得られた酒石酸エキスを benzene で非塩基性部を除き, 氷冷下アンモニアアルカリ性としエーテルついでクロロホルムで抽出, 水溶液は塩酸性として飽和ライネッケアンモン水溶液を加え, 四級塩基をライネッケカートとして捕捉した。

三級塩基部のエーテルおよびクロロホルム抽出エキスをそれぞれ 5% NaOH で抽出。有機層は水洗後, 無水 Na₂SO₄ で乾燥し濃縮。NaOH 溶液は酢酸性とした後, アンモニアアルカリ性としエーテルついでクロロホルムで抽出。水洗後, 無水 Na₂SO₄ で乾燥し濃縮。粗非フェノール性塩基はエーテルエキスより 9.4 g, クロロホルムエキスより 12.3 g を得。粗フェノール性塩基はエーテルエキスより 16.6 g, クロロホルムエキスより 3.06 g を得。

フェノール性三級塩基の分離 分離に用いたカラムは 500 本。エーテルエキスより得た粗塩基 8.8 g を分離。展開液は pH 7 および pH 2 の buffer solution を 1.4 liter ずつ用いる。流速は 0.36 ml/min 流出液は 10 g ずつ分割。Base A (52 mg), Base B (96.4 mg), Base C (1.35 g) および Base D (1.78 g) を得。

非フェノール性三級塩基の分離 エーテルエキスより得た粗塩基 5.4 g を分離, 流出液の流速は 0.41 ml/min としてフェノール性塩基と同様に分離, Base B (3.08 g), Base D (94.5 mg), Base E (25.4 mg), Base F (1.04 g) を得。

10) 融点はすべて未補正, Büchi の融点測定装置にて測定。D.C.C.C. は石井理化機器製作所のものを使用。UV スペクトルは Hitachi-124, IR スペクトルは Hitachi, EPI-G₂, マススペクトルは JEOL model TMS-01 SG, NMR スペクトルは TMS を内部標準とした。CDCl₃ 溶液中 (corypalline のみ DMSO 中) Varian A60-D (60 MHz), 比旋光度は日本分光 DIP-SL にて測定。

11) 混合比率 % (v/v)。

12) Kiesel gel G nach Stahl (Merck 社製) を使用。カッコ内に展開溶媒を記した。

Base A (Corypalline) mp 165—166° (dil. MeOH), UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 224 sh. (3.83), 283 (3.78). Mass Spectrum m/e : 193 (M^+ , 100), 178, 150. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ cm^{-1} : 3400, 1600. NMR (δ): 2.30 (3H, s, N-CH₃), 3.71 (3H, s, OCH₃), 8.4—8.6 (OH, D₂O により消失), 6.43 (1H, s, aromatic proton), 6.61 (1H, s, aromatic proton). *Anal.* Calcd. C₁₁H₁₅O₂N: C, 68.37; H, 7.82; N, 7.25. Found. C, 68.34; H, 7.67; N, 7.07. 標品との混融, TLC (solvent, CHCl₃: MeOH=4: 1¹¹) により同定.

Base B (Protopine) mp 206—208° (CHCl₃-MeOH). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 290 (3.93), Mass Spectrum m/e : 353 (M^+), 190, 163, 148. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ cm^{-1} : 1650, 1610. NMR (δ): 1.92 (3H, s, N-CH₃), 5.91 (2H, s, OCH₂O), 5.94 (2H, s, OCH₂O), 6.65 (3H, s, aromatic proton), 6.91 (1H, s, aromatic proton). *Anal.* Calcd. C₂₀H₁₉O₅N: C, 67.98; H, 5.42; N, 3.96. Found. C, 68.16; H, 5.43; N, 3.82. 標品との混融, IR スペクトルおよび TLC (solvent, CHCl₃: MeOH=19: 1) より同定.

Base C (Capaurimine) mp 210°C (HCl₃-MeOH) $[\alpha]_D -280^\circ$ ($c=0.10$, CHCl₃). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 224 sh. (4.32), 275 (3.43). Mass Spectrum m/e : 357 (M^+), 208, 150, 149, 135. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ cm^{-1} : 3500, 1600. NMR (δ): 3.81 (3H, s, OCH₃), 3.87 (3H, s, OCH₃), 3.90 (3H, s, OCH₃), 5.32—6.20 (2×OH, D₂O により消失), 6.29 (1H, s, aromatic proton), 6.78 (2H, s, aromatic proton). *Anal.* Calcd. C₂₀H₂₃O₅N: C, 67.21; H, 6.49; N, 3.92. Found. C, 66.98; H, 6.36; N, 3.63. 標品との混融, IR スペクトルおよび TLC (solvent, CHCl₃: MeOH=19: 1) より同定.

Base D (Capaurine) mp 164° (CHCl₃-MeOH) $[\alpha]_D -286^\circ$ ($c=0.30$, CHCl₃). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 226 sh. (4.32), 275 (3.40). Mass Spectrum m/e : 371 (M^+), 206, 164, 149. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ cm^{-1} : 3400, 1610. NMR (δ): 3.89 (3H, s, OCH₃), 3.86 (9H, s, 3×OCH₃), 4.61—5.32 (OH, D₂O により消失), 6.29 (1H, s, aromatic proton), 6.81 (2H, s, aromatic proton). *Anal.* Calcd. C₂₁H₂₅O₅N: C, 66.83; H, 7.01; N, 3.90. Found. C, 66.99; H, 6.65; N, 3.55. 標品との混融, IR スペクトル, NMR スペクトルおよび TLC (solvent, CHCl₃: MeOH=19: 1) により同定.

Base E (α -Allocryptopine) mp 160—162° (CHCl₃-MeOH). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 284 (3.80). Mass Spectrum m/e : 369 (M^+), 206, 164, 163, 149. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ cm^{-1} : 1650, 1610. NMR (δ): 1.87 (3H, s, NCH₃), 3.78 (3H, s, OCH₃), 3.85 (3H, s, OCH₃), 5.92 (2H, s, OCH₂O), 6.63 (1H, s, aromatic proton), 6.81, 6.91 (2H, AB-quartet $J_{AB}=8$ Hz, aromatic proton), 6.94 (1H, s, aromatic proton). *Anal.* Calcd. C₂₁H₂₃O₅N: C, 68.28; H, 6.28; N, 3.79. Found. C, 68.48; H, 6.28; N, 3.78. 標品との混融, および TLC (solvent, CHCl₃: MeOH=4: 1) より同定.

Base F (*dl*-Tetrahydropalmatine) mp 145—146° (CHCl₃-MeOH). $[\alpha]_D \pm 0^\circ$ ($c=0.30$, CHCl₃). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 224 sh. (4.28), 282 (3.81). Mass Spectrum m/e : 355 (M^+), 190, 164, 149. NMR (δ): 3.87 and 3.86 (12H, s, 4×OCH₃), 6.63 (1H, s, aromatic proton), 6.73. (1H, s, aromatic proton), 6.85 (2H, s, aromatic proton). *Anal.* Calcd. C₂₁H₂₅O₄N: C, 70.96; H, 7.09; N, 3.94. Found. C, 70.90; H, 7.02; N, 3.78. 標品との混融, IR スペクトルおよび TLC (solvent, CHCl₃: MeOH=19: 1) より同定.

謝辞 本植物を採集するにあたり御配慮いただきました北海道大学薬学部 三橋 博教授, 札幌商業高等学校 桑原義晴先生に深謝致します。また corypalline の標品をお送りいただきました Waterloo 大学 R.H.F. Manske 教授に厚く感謝致します。