トリカブト根中の強心成分に関する研究 (第 1 報¹⁾) Higenamine の単離およびその構造

小菅卓夫, 横田正実,^{2a)} 長沢道男^{2b)}
静岡薬科大学,^{2a)} 株式会社津村順天堂^{2b)}

Studies on Cardiac Principle in Aconite Roots. I.¹⁾ Isolation and Structural Determination of Higenamine

TAKUO KOSUGE, MASAMI YOKOTA^{2a)} and MICHIO NAGASAWA^{2b)}
Shizuoka College of Pharmacy^{2a)} and Tsumura Juntendo Co., Ltd.^{2b)}

(Received April 13, 1978)

Aconite root (Bushu in Japanese) from *Aconitum japonicum* THUMB. has long been used as one of the most important herbs as a heart stimulant, diuretic agent, and anodyne in Chinese medicine. Isolation and identification of the cardiac principle predicted by Yakazu are described. In the isolation process, the Yagi-Hartung method using frog heart was found to be useful for pharmacological measurement of cardiac activity of the material. The material was water soluble and was fairly unstable, especially in a basic medium, and was tightly adsorbed on charcoal, alumina, silica gel, and cellulose powder, indicating that these agents are not useful for the separation. Isolation of the material was finally achieved by the limited combination of gel filtration through Sephadex LH-20 and counter current distribution, and colorless plates, mp 260°, were obtained as HCl salt. This principle stimulates frog heart even 1:10⁻⁹ dilution, and it was designated as Higenamine. Higenamine was identified as *dl*-demethylcoclaurine (II) from the spectral data and by comparison with synthesized authentic sample.

Keywords—aconite root; *Aconitum japonicum*; cardiac principle; isolation; Yagi-Hartung method; gel filtration and counter current distribution; tetrahydroisoquinolines; Higenamine; *dl*-demethylcoclaurine

トリカブトはキンポウゲ科 (Ranunculaceae) に属する多年草植物である。漢方ではその母根を烏頭、子根を附子と称し強心、利尿、興奮、鎮痛等の作用を有するとされている漢方必須の生薬であり、アイヌの矢毒に代表される猛毒植物としても有名である。トリカブト根の成分研究は有毒成分であるジテルペンアルカロイドに関するものが大半を占め、現在までに数十種のアルカロイドが単離構造決定されている³⁾が、その有効成分に関する化学的な研究はなされていない。矢数⁴⁾は附子中の強心成分の検索を行い、そのメタノールエキスをよりアルカロイドを除いた水可溶部中の“クロロホルム不溶物質”と称した分画にガマ蛙の摘出心臓に対して活性を示す物質が存在することを明らかにし、これがトリカブト根の有効成分の本態であることを指摘した。饒⁵⁾も中国産の附子が各種動物に対し強心作用を有することを報告している。しかしながらその後この強心作用成分の化学的な研究はほとんど行われず、わずかに高橋⁶⁾による、シリカゲルクロマトグラフィーおよびイオン交換樹脂による分離の試みがなされているが、その単離、構造決定に関する報告は皆無である。

著者らはトリカブト根の生薬としての重要性に注目し、矢数らの指摘した強心作用物質の単離、構造決定を志した。

本報では Higenamine と命名された強心作用物質の単離およびその構造について報告したい。

1) 本報の速報は *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **24**, 176 (1976).

2) Location: a) 2-2-1, Oshika, Shizuoka; b) 2-1-1, Nihonbashihoncho Chuoku, Tokyo.

3) 総説として、岡本敏彦, 化学と工業, **14**, 792 (1961); 一戸良行, 化学の領域, **32**, 111 (1978).

4) 矢数四郎, 日薬理誌, **54**, 880, 890, 906 (1958).

5) 饒 曼人, 薬学学報, **13**, 195 (1966).

6) 川瀬 清, 角倉 一, 高橋真太郎, 東薬研究年報 **12**, 180 (1962).

() indicates yield, [] indicates minimum active concentration (g/ml)

Chart 1. Isolation Procedure of Higenamine HCl

Higenamine の単離

著者らは天然物より生理活性成分を分離する方法として、ある分離操作で得られたすべての分画について生物試験を行い、そのうち最も強い活性を有する分画のみを次段階の分離に供するという手法をとり、有意の活性を有する物質を見逃さないようにした。本報で用いた生物試験はトノサマ蛙の摘出心臓を用いる Yagi-Hartung⁷⁾法を採用し、蛙心の収縮力を明らかに増強する最少有効濃度、(minimum active concentration, 以下、M.A.C. と略記す) g/ml を測定し強心活性度とし、活性成分分離の指標とした。

新潟県佐渡郡で 6 月に採用したオクトリカブト (*Aconitum japonicum* THUMB.)⁸⁾ の塊根を用い予備的な分離を行ったところ、本活性成分は以下に示す性質を有することが明らかになった。i) 水、メタノール、酢酸、ピリジン等に可溶、クロロホルム、酢酸エチル、アセトン等に不溶。ii) アルカリに対して非常に不安定であり瞬時に失活する。iii) アルミナ、シリカゲル、活性炭、セルロース末等、繁用されている分離剤に強く吸着され、効果的な溶出が困難であるが、Sephadex LH-20 を用いるゲルろ過のみが効果的に活性成分を溶出する。以上の諸性質より使用可能な分離手法として Sephadex LH-20 を用いるゲルろ過法および向流分配法を採用した。この 2 つの手法を効果的に組合せることにより、Chart 1 に示す分離法を確立した。Chart 1 中 () 内に得量を [] 内に強心活性度 M.A.C. g/ml を示す。

佐渡にて 6 月に採集したトリカブト根 700 kg を乾燥 (150 kg)、粉碎し、メタノールで還流下抽出し、抽出液を減圧下濃縮し、メタノールエキス (25 kg) を得る。メタノールエキスのうち水可溶部 (17 kg) [M.A.C. ... 10⁻⁴ g/ml] を溶媒系 *n*-ブタノール-水で移行回数 10 回の向流分配法で分離し、*r*=1-9 (5 kg) [10⁻⁵ g/ml] を得た。この分画を水で調整した Sephadex LH-20 のカラムを用いゲルろ過により精製する。最初水で溶出し次いでメタノールで溶出する。強心活性はメタノール溶出部 I (120 g) [M.A.C. ... 2 × 10⁻⁷ g/ml] に集中した。これは通常の

7) 津田恭介, 野上 寿, 編集代表, “医薬品開発基礎講座,” V, 薬効の評価 (I) 薬理試験法 (中), 地人書館, 東京, 1971, p. 530.

8) 斎木保久, 北陸の植物, 15, 22 (1966) の分類にしたがった。

Fig. 1. Counter Current Distribution of MeOH, Fraction I (10 g)

Solvent system, *n*-BuOH-H₂O (10 ml).
●—● distribution curve.
○—○ M.A.C. g/ml.

Fig. 2. Gel Filtration of Active Fraction II (6.6 g) through Sephadex LH-20

Effluent solvent: MeOH.
●—● chromatogram.
○—○ M.A.C., g/ml.

ゲルろ過により分離されたのではなく、本活性成分が強い吸着性をもつため Sephadex のもつ弱い吸着現象によりうまく分離されたものと考えられる。この操作で活性は 50 倍に増強された。なおこの分離で水による溶出を行わず最初からメタノールで溶出したところ mp 268° の塩素を含むジテルペンアルカロイド C₂₀H₂₉O₄Cl および adenosine の 2 種の結晶を得ることができたが活性成分の効果的な分離はできなかった。メタノール溶出部 I をさらに溶媒系 *n*-ブタノール-水で移行回数 25 の向流分配により精製する。

その分配曲線および強心活性度を Fig. 1 に示す。

Fig. 1 より明らかなように活性は $r=5-18$ の分画、活性部 II (36 g) [M.A.C. $\cdots 10^{-7}$ g/ml] に認められた。本フラクションの分配係数は約 1.0 である。この分離で量的に多くしかも活性のない部分を分配係数の大きいフラクションとして除去することができた。活性部 II をメタノールで調整した Sephadex LH-20 のカラムを用いるゲルろ過により精製する (溶出溶媒, メタノール)。そのクロマトグラムおよび強心活性度を Fig. 2 に示す。

強心活性は K_d 値約 1.2 (溶出溶媒量 1480—1560 ml) の分画、活性部 III (7 g) [M.A.C. $\cdots 2 \times 10^{-8}$ g/ml] に集中した。Higenamine の単離に成功する以前に行った抽出分離の際ここで得られた活性部 III と同じ分画につき、Sephadex LH-20 によるゲルろ過を繰り返し Yokonoside と命名した成分を分離 (40 mg) し [M.A.C. $\cdots 2 \times 10^{-8}$ g/ml], その構造を [I] のようなベンズアニリド骨格をもつ配糖体と決定した。⁹⁾ しかしながら合成された Yokonoside¹⁰⁾ には何らの強心活性もなく、真の活性成分はこの分画に含まれる微量成分であることが明らかとなった。

I

前述のように活性部 III は Yokonoside をはじめ配糖体を多く含有すると考えられたのでこの分画をアセテートに誘導し脂溶性にしたのち分離せんとした。すなわち活性部 III (300 mg) を無酢-ピリジンで処理し、クロロホルム可溶部 (200 mg) をシリカゲルカラムクロマトで分離すると、クロロホルムで溶出するフラクション Ac-A (131 mg) と 10% メタノールクロロホルムで溶出するフラクション Ac-B (14 mg) とに分離できた。活性は Ac-A には全くなく、Ac-B にわずかに認められた [M.A.C. $\cdots 10^{-3}$ g/ml]。さらに各分画をそれぞれ 1N 塩酸で加水分解すると、Ac-A 加水分解物より多量のグルコースを確認したが、Ac-B 加水分解物にはグルコースは認められなかった。また Ac-A 水解物には活性はなく、Ac-B 水解物には Ac-B と同程度の活性を認めた。これらの結果から真の活性成分は配糖体ではなく活性部 III 中 10% 以下であり、また酸に対し相当に安定な成分であることが推定された。即ち活性部 III に 90% 以上含有されると考えられる非活性配糖体を効果的に除去することができれば活性成分の分離が容易となる。活性部 III を塩酸加水分解すれば含有される配糖体はアグリコンと糖となる。アグリコンの分配係数 (溶媒系, ブタノール-水) は一般には配糖体より大

9) 小菅卓夫, 横田正実, 第 16 回天然有機化合物討論会, 大阪, 1972 年 10 月講演要旨集, p-335.

10) 成戸俊介, 水田泰之, 西村温樹, 横田正実, 薬誌, 96, 945 (1976).

Fig. 3. Counter Current Distribution of Hydrolyzed Active Fraction III (600 mg)

Solvent system, *n*-BuOH-H₂O (10ml).
 ●—● distribution curve.
 ○---○ M.A.C., g/ml.

となり、糖の分配係数は 0.1 以下であり、活性成分の分配係数は約 1.0 であるから活性成分が酸により変化を受けないとすれば、アグリコン、糖、活性成分の 3 成分は向流分配により分離可能である。活性部 III (600 mg) を塩酸で加水分解したのち、溶媒系 *n*-ブタノール-水、移行回数 20 の向流分配で分離した。その分配曲線および強心活性度を Fig. 3 に示す。

予想されたように活性部 III の大半を占める配糖体は水解されて分配係数の小さい分画と大きい分画に 2 分され、強心活性は $r=4-6$ の分画、活性部 IV に集中した。更に活性部 IV を放置したところ無色の板状晶 (8 mg) を得ることができた。活性部の IV 分配係数は約 0.5 であり活性部の 1.0 より小さくなっている。このことは活性成分が塩酸により変化を受けたものがなお活性を保持しているのか、または活性成分が塩基性物質であり塩酸塩となったためのいずれかであることを示している。そこでこれを確認するために活性部 III (1.2 g) を溶媒系 *n*-ブタノール-0.1 N HCl, 移行回数 20 の向流分配を行った。その分配曲線および強心活性度を Fig. 4 に示す。

Fig. 4 中 $r=10$ のピークは配糖体のものであり、活性は $r=4-6$ の分画、活性部 IV (90 mg) [M.A.C. $\cdots 2 \times 10^{-9}$ g/ml] に集中し本分画より前述と同じ結晶 (20 mg) を得た。

したがって本活性成分はアミンであり塩酸により変化を受けることなく塩酸塩として分離されたことになる。本結晶をメタノールで再結晶すると mp 260° (dec.) の塩素を含んだ無色板状晶である。上記向流分配の溶媒系中塩酸の代わりに臭化水素酸を用いた場合にも、同様にして mp 267° (dec.) の臭素を含んだ無色板状晶を得ることが出来た。すなわち前者は塩酸塩であり後者は臭化水素酸塩である。同様の操作で活性部 III より塩酸塩を合計 100 mg を得た。本結晶は Fig. 5 に示したように 10^{-9} g/ml で活性を示し、再結晶を繰り返しても活性に変化のないことより、トリカブト根中の矢数らの指摘した強心活性成分と決定し、Higenamine と命名した。

Higenamine·HCl の構造

Higenamine·HCl は mp 260° (dec.) の無色板状晶で水、メタノール、エタノールに可溶、ベンゼン、クロロホルム等に不溶であり、塩化第二鉄試液で暗青色を呈する。また酸に対して安定であるがアルカリに対しては非常に不安定で、苛性、炭酸アルカリでは瞬時に失活し、リンゲル液 (重炭酸ソーダを含む) 中でさえ 20° 24 時間後にその活性は 1/100 に低下する。Higenamine·HCl の各種スペクトルデータを Table I に示した。

Fig. 4. Counter Current Distribution of Active Fraction III (1.2 g)

Solvent system *n*-BuOH-0.1N HCl (10 ml).
 ●—● distribution curve.
 ○---○ M.A.C., g/ml.

Fig. 5. Cardiac Action (Yagi-Hartung Method) of Higenamine·HCl on 10^{-9} g/ml and 10^{-8} g/ml

TABLE I. Spectral Data of Higenamine·HCl

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ m μ (ϵ),	227(17000), 286(5300)
MS m/e (%),	271(0.01), 164(100), 149(60), 119(15), 109(40), 91(60)
NMR in D ₂ O ppm	7.16, 6.85(A ₂ B ₂), 6.74(S. 1H), 6.68(S. 1H), 2.70, 3.60(mult., 6H)
IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm ⁻¹	3400, 3250, 2950, 1595, 1515, 1450, 1400, 1380, 1300, 1230, 1195, 1160, 1120, 880, 860, 840, 800
[α] _D ²⁰ = 0° (c = 0.5, in MeOH)

Chart 2

Higenamine·HCl の分子式は元素分析値, マススペクトルより C₁₆H₁₇NO₃·HCl と決定した. 核磁気共鳴スペクトル (以下 NMR と略記) は ppm 7.16, 6.86 に A₂B₂ タイプの芳香環プロトンによるシグナルが ppm 6.74, 6.68 に各々 1H 分の芳香環プロトンによる singlet, ppm 2.70—3.60 に 6H 分のメチレンプロトンによる multiplet が認められた. これらの NMR のデータ, 分子式および旋光性のないことより, Higenamine·HCl は *dl*-1-(4-hydroxybenzyl)-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroiso-

quinoline hydrochloride (*dl*-demethylcoclaurine hydrochloride) と推定された.

またこの推定はマススペクトルのフラグメンテーション¹¹⁾ (Chart 2) によっても支持された.

合成された *dl*-demethylcoclaurine HCl¹²⁾ は Higenamine·HCl と各種スペクトルが完全に一致し, また強心活性度も天然物のそれと同等であることより, Higenamine は *dl*-demethylcoclaurine と同定された. なお Higenamine hydroaromide の X 線結晶解析は著者らと真崎らとの共同研究で行われ, その詳細な分子構造が明らかにされている.¹³⁾

dl-Demethylcoclaurine はすでに山口¹⁴⁾ により合成されており, また H. Koshiyama¹²⁾ らによりハス (*Nelumbo nucifera*) の胚乳中より, 平滑筋および子宮筋弛緩作用物質として *R*(+) 体が単離されている. 一般にこの種の環状カテコールアミン類は adrenergic β -stimulant 作用をもつことが知られているが, その生理活性は *S*(-) 体において強いと言われており, トリカブトより分離されたものがラセミ体であったことは強い活性をもつ demethylcoclaurine の天然における最初のものと言ひ得る. ハスに弱い活性をもつものしか存在せず, トリカブトに強い活性をもつものを含有していたことはトリカブトが重要な生薬であることを考え合せると興味深い. また, トリカブト属植物よりベンジルイソキノリンアルカロイドが分離されたのは magnoflorine¹⁵⁾ に次ぐものであり chemotaxonomy の上からも興味深い.

またテトラヒドロイソキノリン化合物の薬理作用については Y. Iwasawa ら¹⁶⁾ がその化学構造と adrenergic β -

- 11) M. Ohashi, J.M. Wilson, H. Budzikiewicz, M. Shamma, W.A. Slusarchyk, C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2807 (1963).
- 12) H. Koshiyama, H. Ohkuma, H. Kawaguchi, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **18**, 2564 (1970).
- 13) N. Masaki, H. Iizuka, M. Yokota, A. Ochiai, *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1977, 717.
- 14) 山口秀夫, 薬誌, **78**, 692 (1958).
- 15) M. Nijland, *Pharm. Week. blad.*, **98**, 623 (1963).
- 16) Y. Iwasawa, A. Kiyomoto, *Japanese J. Pharm.*, **17**, 143 (1967).

作用との相関性につき詳細な検討を行っているが、これらの化合物のいくつかのものは強い adrenergic β -stimulant であると報告している。今回得た *dl*-demethylcoclaurine の強心作用も adrenergic β -stimulant の一部と考えられる。

実験の部

生物試験 トノサマ蛙 (*Rana nigro maculata*) の心臓を用いる Yagi-Hartung 法で実施した。常法により摘出心臓標本を作製しキモグラフにより心筋収縮力をばい紙上に記録する。被験試料はリンゲル液に溶解したものを適用し、蛙心の収縮力を明らかに増強する最少有効濃度 (M.A.C. g/ml) を測定し強心活性度とした。

トリカブト根の抽出 6月、佐渡で採集したトリカブト根を乾燥し、その 150 kg を粉碎し 300 l の MeOH で還流下 6 時間 3 回抽出し、抽出液は減圧下 40° 以下で濃縮し、MeOH エキス 25 kg を得。MeOH エキスを 5 倍量の水に溶し、同量の CHCl_3 で抽出し、水層を減圧下 40° 以下で濃縮し水エキスを 17 kg を得。

水エキスの向流分配による分離 水エキス 300 g を 5 l の分液ロートを用い *n*-BuOH- H_2O の各層 2 l ずつで移行回数 10 回の向流分配を行う。 $r=1-9$ の分画を集め減圧下濃縮し暗褐色粘稠物 80 g を得。同様に全水エキスより本分画 5 kg を得 [M.A.C. $\cdots 10^{-5}$ g/ml]。

$r=1-9$ 分画のゲルろ過による分離 230 g の Sephadex LH-20 を MeOH で十分膨潤させ、次いで H_2O で洗浄し、脱気後カラムに充てんする (90 mm $\times$ 150 mm)。 $r=1-9$ 分画のうち 125 g を H_2O に溶かしカラムにセットし H_2O で溶出す。1700 ml 溶出後、溶出溶媒を MeOH に換え 1500 ml 溶出す。MeOH 溶出部より溶媒を留去し、MeOH 溶出部 I 3.0 g を得。同様に全 $r=1-9$ 分画より本分画 120 g を得 [M.A.C. $\cdots 2 \times 10^{-7}$ g/ml]。

MeOH 溶出部 I の向流分配による分離 MeOH 溶出部 I のうち 10 g を 200 ml の分液ロートを用い *n*-BuOH- H_2O の各層 100 ml ずつで移行回数 25 の向流分配を行う。各分画より溶媒を留去。各々秤量し分配曲線を作製す (Fig. 1)。 $r=5-18$ の分画を集め活性部 II 3 g を得。同様に全 MeOH 溶出部 I より本分画 120 g を得 [M.A.C. $\cdots 10^{-7}$ g/ml]。

活性部 II のゲルろ過による分離 400 g の Sephadex LH-20 を MeOH で膨潤、脱気しカラムに充てんする (45 mm $\times$ 1100 mm)。活性部 II のうち 6.6 g を MeOH に溶解しカラムにセットし MeOH で溶出す。(流速 0.57 ml/min) 溶出量 1000 ml 以後 20 ml, ずつ分取し、各分画より溶媒を留去し秤量し、クロマトグラムを作製す (Fig. 2)。溶出溶媒量 1480-1560 ml, の分画を集め活性部 III 1.32 g を得。同様に全活性部 II より本分画 7 g を得 [M.A.C. $\cdots 2 \times 10^{-8}$ g/ml]。

活性部 III 加水分解物の向流分配による分離 活性部 III のうち 600 mg を 1N HCl 10 ml と封管中沸騰水浴上 3 hr 加水分解後減圧乾固する。反応物を分配管容積 50 ml の向流分配装置 (三田村理研製) を用い、*n*-BuOH- H_2O の各層 10 ml ずつで移行回数 20 の向流分配を行う。各分画より溶媒を留去し秤量し分配曲線を作製する (Fig. 3)。 $r=4-6$ の分画を集め活性部 IV 43 mg を得 [M.A.C. $\cdots 2 \times 10^{-9}$ g/ml]。本分画に少量の MeOH を加え放置すると結晶析出。MeOH より再結晶し mp 260° (dec.) の無色板状晶 10 mg を得 [M.A.C. $\cdots 10^{-9}$ g/ml]。Anal. Calcd. $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$, C, 62.44; H, 5.89; N, 4.55; Cl, 11.52; Found, C, 62.16; H, 5.90; N, 4.59; Cl, 11.18 本品のスペクトルデータは Chart 2 に示した。

活性部 III の向流分配による分離 i) 活性部 III 1.2 g を分配管容積 50 ml の向流分配装置を用い、*n*-BuOH-0.1N HCl の各層 10 ml ずつで移行回数 20 の向流分配を行う。各分画より溶媒を留去、秤量し分配曲線を作製す (Fig. 4)。 $r=4-6$ の分画を集め活性部 IV 90 mg を得。同様に全活性部 III より本分画 500 mg を得。[M.A.C. $\cdots 2 \times 10^{-9}$ g/ml]。本分画より mp 260° (dec.) の無色板状晶を得 [M.A.C. $\cdots 10^{-9}$ g/ml]。本品の IR スペクトルは前述の結晶のそれと完全に一致した。

ii) 活性部 III 500 mg を溶媒系 *n*-BuOH-0.1N HBr で i) と同様な向流分配を行い。 $r=4-6$ の分画より mp 267° (dec.) の無色板状晶 10 mg を得 [M.A.C. $\cdots 10^{-9}$ g/ml]。Anal. Calcd. $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_3 \cdot \text{HBr}$, C, 54.56; H, 5.15; N, 3.98; Br, 22.69; Found C, 54.56; H, 5.15; N, 3.96; Br, 22.50。

謝辞 本研究を遂行するに当り終始有益な御助言御激励をたまわり、本活性成分の命名をして下さいました東京大学薬学部 岡本敏彦教授に深謝いたします。また有益な御助言をたまわりました矢数四郎博士に感謝いたします。また本学分析センターの諸氏に感謝いたします。