

移動相・固定相交互変換向流クロマトグラフィーの バルバロイン精製への応用

桃沢洋三^{®*1}, 中澤裕之^{*2}, 山本政利^{*3}, 谷村憲徳^{*4}

(1988 年 6 月 23 日受理)

移動相・固定相交互変換向流クロマトグラフィーは、分離管内に保持した混ざり合わない二液相を、反対側から交互に送液して移動相にし、溶質を管内で往復させながら分離を促進させる手法である。内径 12 mm、長さ 90 cm のガラス管に、中央に 1 mm の穴をあけた仕切りを 12 mm 間隔に詰め、テフロンチューブで 8 本を直列に連結し、市販アロイン 1 ないし 3 g を添加してバルバロイン (BA) の精製を行った。溶媒系にはクロロホルム：メタノール：1-プロパノール：水 (9:12:1:8) を振り混ぜた後分液した上相と下相を用い、BA とイソバルバロインは移動相 3 回の切り換えで分離され、25 回の切り換えにより BA が単離された。本法は極性の高い天然物などを調製レベルで取り扱う分離・精製法として有効である。

1 緒 言

移動相・固定相交互変換向流クロマトグラフィー (counter alternative current chromatography, CACC) は、スケールアップした rotation locular countercurrent chromatography (RLCC)¹⁾ の分離管を使用して可能になった向流クロマトグラフィーの手法である。向流クロマトグラフィーは、固定相を保持するのにその担体となる固体を用いなくて液-液分配クロマトグラフィーを行い、物質を分離精製する方法である。RLCC では Fig. 1 のようにして分離管内に二液相を保持し、この管を回転させながら軽、重二液相のいずれか一方を送液して展開溶出するが、CACC では軽、重の二液相を交互に反対側から送液して移動相にし、送液しない方の液相を固定相として、溶質を管内で往復させながら分離する手法である。分離の原理を Fig. 2 に示す。例えば、試料を管の下端に添加し、まず上相で展開して A を分離溶出した後、移動相を下相に切り換えて管の上端から送液し、まだ分離していない B と C を、同じ分離の場を反対方向に移動させながら分離する。ここで分離係数の小さい場合には必要に応じて二液相の切り換え回数を増やし

て、分離管を延長せずに分離の目的を達成するものである。

CACC による DNP-アミノ酸の分離やグラミシジンの精製などを報告した²⁾が、極性の高い天然物に対して

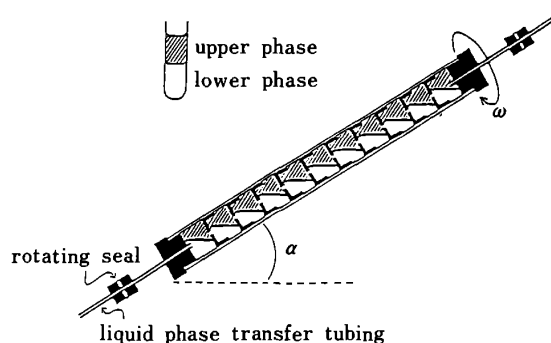


Fig. 1 Schematic diagram of column for CACC

Column: glass tube, 12 mm i.d. × 90 cm L., 74 loculi; Transfer tubing: Teflon, 0.5 mm i.d.; Disk: Teflon, central hole 1 mm

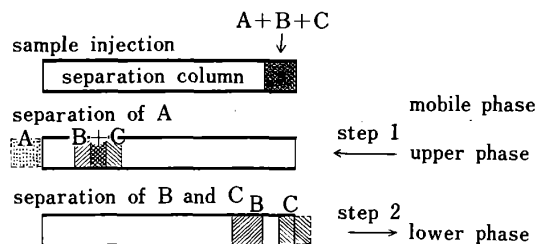


Fig. 2 Illustration of separation by CACC

*¹ 日本大学理工学部薬学科: 101 東京都千代田区神田駿河台 1-8
 *² 国立公衆衛生院: 108 東京都港区白金台 4-6-1
 *³ 静岡県衛生環境センター: 420 静岡県静岡市北安東 4-27-2
 *⁴ 富山医科薬科大学薬学部: 930-01 富山県富山市杉谷 2630

も有効と考え、今回、市販アロイン中の主成分であるバルバロイン(BA)の精製に応用してその分離能を調べた。市販の試薬アロインにはシリカゲル TLC により十数個のスポットが認められ、HPLC による定量では BA の含量は約 17% であった。この市販アロインを試料にして、ほぼ同量含まれている BA の立体異性体であるイソバルバロイン (IB) との相互分離及び BA の単離を試みた結果を報告する。

2 実 験

2・1 試料及び試薬

2・1・1 標準バルバロイン 山本ら³⁾によって調製されたものを用いた。

2・1・2 アロイン 市販試薬アロイン (Aloin) 半井化学薬品製。

2・1・3 試 薬 市販の特級品又は一級品をそのまま用いた。

2・2 装 置

HPLC 装置: 島津製作所製 LC-4A, クロマトパック: 島津製作所製 C-R 2A, 送液ポンプ: 協和精密製 Mini Micro Pump, 切り換えタイマー: 古江サイエンス製二連式, 切り換えバルブ: 協和精密製四方二連式, 回転架台: 日本大学理工学研究所製, フラクションコレクター: 東洋科学産業製 SF-160K, ロータリーエバポレーター: 東京理化器械製。

2・3 分離管の作製

内径 12 mm, 長さ 90 cm の標準パイレックス製ガラス管の内側に、中央に 1 mm の穴をあけたテフロン製の外径 12 mm, 厚さ 1 mm のコの字型に成型した隔壁を 12 mm 間隔に詰め込んで 74~75 個の隔室 (loculus) を作る。この管 8 本をそろえて回転軸に固定し、各管の両端にテフロン製の栓をして、内径 0.5 mm のテフロン製チューブで直列に連結する。

2・4 溶媒系の充てん

分離に用いた二相系は、クロロホルム: メタノール: 1-プロパノール: 水 = 9:12:1:8 から成る溶媒系で、振り混ぜた後放置すると上相対下相 = 1.7 対 1.0 に二相分離する。この溶媒系は、Stool らが droplet counter-current chromatography によるフェノール性配糖体センノサイドの相互分離⁴⁾に用いた組成を一部変更したものである。まず分離管を固定した回転軸を垂直に立て、管の下端から溶媒系の下相を空気が残らないように充てん

した後、回転軸を水平に保ち上相を送液すると各隔室内に一定の比率で下相を残しながら充てんされ、管内に二液相が保持される。充てん量は上相が 322 ml, 下相は 290 ml であった。

2・5 CACC の操作条件

所定量の試料に上相及び下相を加えて溶かし、最終的に上相 15 ml, 下相 15 ml の 1 対 1 の溶液とする。この試料溶液の下相、次いで上相を毎分 0.5 ml で分離管の下端へ送液する。このとき分離管は 25° の傾斜に保ち毎分 100 回転させ、フラクションコレクターを稼働させる。管の傾斜は、移動相を切り換えても固定相が流出しない角度とし、回転数はかき混ぜ効果と、管内における二液相の位置及びその界面の維持などを考慮して設定した。これらの実験条件を Table 1 に示す。試料を負荷した後、上相を移動相にして毎分 0.46 ml で 15 時間送液し、次に移動相を下相に切り換えて分離管の上端から毎分 0.50 ml で 20.5 時間送液する。再び上相に切り換えて上、下相の所定の時間交互に移動相にする alternative current を行う。試料の負荷はポンプを通して行い、移動相の切り換えはタイマーに連動した切り換えバルブを用いた。

Table 1 Conditions of CACC for purification of BA and IB

Column	glass tube × 8, 595 loculi
Capacity	total 612 ml, lower phase 290 ml
Rotation speed	100 r.p.m.
Column angle	25°
Flow rate	upper phase 0.46 ml/min lower phase 0.50 ml/min
Sample size	aloin 1~3 g in 30 ml of upper phase and lower phase = 1:1
Sample injection	to bottom of column
Fractionation	30 min/fraction

Table 2 HPLC conditions for analysis of BA and IB

HPLC	Shimadzu LC-4A
Chromatopack	Shimadzu C-R 2A
Column	TSK-Gel ODS 120 T 4.6 mm i. d. × 25 cm
Mobile Phase	57% MeOH
Flow rate	1.0 ml/min
Temperature	room temperature
Detection	300 nm
Sample size	20 µl

2・6 溶離液の分画

分離管からの溶離液は、管内二液相の比重差により、移動相が上相の場合は管の上端から、又下相が移動相の場合は下端から流出する。溶離液はフラクションコレクターで 30 分間ごとに分画採集した。

2・7 検出及び回収

各分画について、必要な場合はエタノールで希釈しそれぞれ 20 μ l を試料として Table 2 に示す条件で HPLC を行い、その結果に基づいて所定の分画を集め、約 50°C で溶媒を留去して分離成分を回収した。

3 実験結果

3・1 RLCC による溶出曲線

市販アロイン 1 g を分離管の下端に負荷し上相を移動相にして、切り換えずにそのまま溶出させる RLCC 展開を行った各分画について HPLC を行い、その結果に基づいて作成した溶出曲線を Fig. 3 に示す。BA よりも IB が早く溶出し両者の保持時間の差は分画にして約

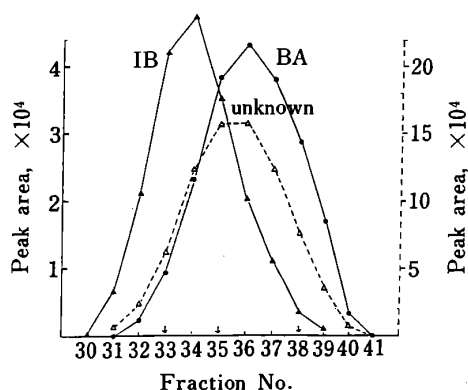


Fig. 3 Elution curves of samples by RLCC with upper phase

2.5 フラクションで、分離係数は約 1.3 である。この溶出曲線による分離度は約 0.35 で、分離度 1 を得るための分離管の長さを予測すると約 6 倍必要となる。又未知物質による破線の曲線は、BA の約 5 倍の吸収を示し多量の混在が考えられ、溶出は BA と接近し分画で 0.5 フラクションの差があるとしても分離係数は約 1.05 と小さく、分離の困難が予想される。

3・2 バルバロインとイソバルバロインの分離

移動相の切り換え回数及び試料添加量による BA と IB の分離度を Table 3 に示す。移動相の切り換えは、上相による溶出では IB の、又下相では BA の溶出が認められた時点とし、収量は最終溶出における BA~IB の全分画を合わせたものである。上相で 15.0 時間展開後、移動相を下相に切り換えて溶出させた No. 2 では分離度は 0.57 に、又、切り換え 3 回の No. 4 では 1.03 にそれぞれ改善され、CACC の分離効果が認められる。更に No. 5 では BA と IB はほとんど完全に分離しており、そして試料を 3 倍に増加しても No. 6 及び 7 に見られるように再現性もあり、分離度の大きな低下はない。しかし、試料を 5 g 添加すると管内の二液相はエマルジョンを生成する。

3・3 バルバロインの単離

Table 3 に示した実験結果で、BA と IB とは分離されたが、この BA にはまだ未知物質が混在している。この未知物質を除去するために、まず上相による展開を 13 時間行った後、下相 12 時間-上相 9 時間を繰り返す切り換えを 25 回行った各ステップの溶出液の分析結果を Fig. 4 に示す。横軸はフラクション番号で、上段は上相の溶出液、下段は下相溶出液についての結果である。縦軸はクロマトパックの打ち出す各ピークの面積百分率

Table 3 Effect of switchover on resolution of BA and IB

No.	Sample / g	Duration (h) of elution by mobile phase						Resolution	Recovery [†] / g					
		Upper	Lower	Upper	Lower	Upper	Lower							
1	1	elution						0.35						
2	1	15.0	elution						0.57					
3	1	15.0	20.5	elution						0.66	0.523			
4	1	15.0	20.5	11.5	elution						1.03	0.441		
5	1	15.0	20.5	11.5	13.0	9.0	elution						1.31	0.406
6	3	15.0	20.5	11.5	elution						0.93	1.287		
7	3	15.0	20.5	11.5	13.0	9.0	elution						1.02	1.185

[†]: Sum of BA, IB and unknown substance

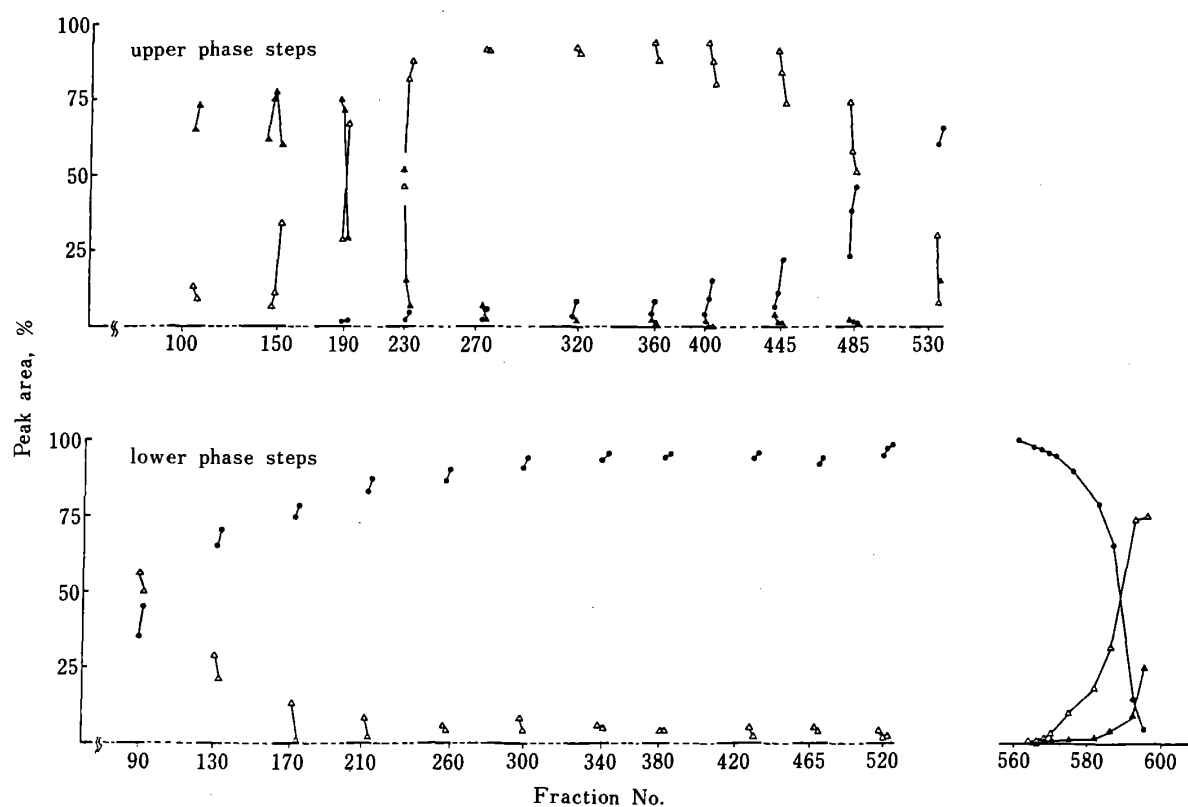


Fig. 4 Elution of samples by CACC

● : barbaloin; ▲ : iso-barbaloin; △ : unknown peak

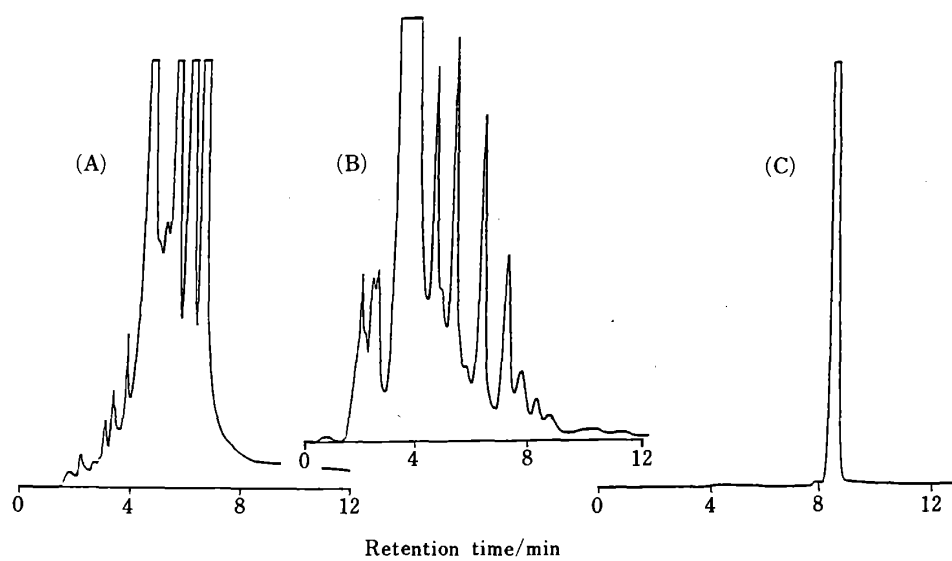


Fig. 5 HPLC chromatograms of fractions obtained by CACC

(A) : fraction No. 50 (lower phase step); (B) : fraction No. 80 (upper phase step); (C) : fraction No. 565 (lower phase step)

の値で示した。まず下相の溶出を見ると、しだいに未知物質が減少し純度の高い BA が溶出していることが分かる。Fig. 5 に示すようにフラクション No. 565 は HPLC クロマトグラム上では単一ピークであった。一方、上相の溶出液には No. 270 で IB の溶出がほとんど終わり、次いで未知物質の溶出が増加して No. 400 付近で最高値を示し、やがて減少している。このとき、本実験条件下では BA の溶出がありこの分は損失となる。これらの分画を集めると純度 95% の BA の回収率は、アロイン中の BA を 17% としてその約 61% であった。又、Fig. 5 のフラクション No. 50 及び 80 は、分離操作において早いステップで分離管の両端から溶出除去された混在物の HPLC チャートである。

4 考 察

向流クロマトグラフィーは、クロマトグラフィーのシステムから固体相の保持体を除いたものであり、従って保持体への不可逆的な吸着による試料の損失がなく、保持体の溶出による汚染もない。又、CACCには次のような特長がある。(1)与えられた分離の場を繰り返し使用することにより、分離管を延長せずに分離の目的を達成する。(2)リサイクル方式との違いは、いったん分離した溶質が追いつき現象によって再び混合することがなく、又、使用する溶媒が平均化されて無駄が少ない。(3)切り換えのタイミングを調節して、目的物質を分離管内に残し不要の成分を先に溶出させることができるので、特に混合比の片寄った試料中の微量成分の精製に有効である。(4)試料の処理量が多い。

今回の実験では、(1)の効果は移動相の切り換え 4~5 回で、又、(3)の効果は Fig. 5 のように見られる。これらの利点を生かして、極性の高い天然物や合成化合物などの分離、精製に有効と思われる。

文 献

- 1) Y. Ito, R. L. Bowman : *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 315 (1973).
- 2) 日本薬学会第 96 年会講演要旨集第 IV 分冊 p.38 (1980).
- 3) M. Yamamoto, M. Ishikawa, T. Masui, H. Naka-

zawa, Y. Kabasawa : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 493 (1985).

- 4) A. Stoll, B. Becker : *Helv. Chim. Acta.*, **32**, 1897 (1949).

☆

Application of counter alternative current chromatography for purification of barbaloin.

YOZO KABASAWA^{*1}, HIROYUKI NAKAZAWA^{*2}, MASATOSHI YAMAMOTO^{*3} and TAKENORI TANIMURA^{*4} (*1 Department of Pharmacy, College of Science & Technology, Nihon University, 1-8, Kandasurugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101; *2 National Institute of Public Health, 4-6-1, Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108; *3 Shizuoka Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, 4-27-2, Kitaando, Shizuoka-shi, Shizuoka 420; *4 Laboratory of Analytical Chemistry, Toyama Medical and Pharmaceutical University, 2630, Sugitani, Toyama-shi, Toyama 930-01)

The purification of barbaloin(BA) from aloin was examined by counter alternative current chromatography (CACC), which uses the different partition between two immiscible liquids for chromatographic purification of various substances. It is most distinctive feature of CACC that send alternately upper phase and lower phase as mobile phase to the column. Consequently, separation is progressed by going and returning of solutes in the column. The commercially reagent grade Aloin has more than ten spots on silicagel TLC plate and contains ca. 17% of BA as biologically active compounds. The effect of the numbers for switchover of mobile phase and the amount of sample on separation of BA and *iso*-barbaloin(IB), and on purification of BA were investigated. The phase system used for purification is composed of chloroform : methanol : 1-propanol : water (9 : 12 : 1 : 8). The separation of BA and IB was made by three time switchovers of mobile phase, and pure BA could be separated from aloin by twenty-five switchovers. The present method is applicable with the high efficiency to the preparative purification of natural products, particularly polar compounds, using the liquid two phase system.

(Received June 23, 1988)

Keyword phrases

counter alternative current chromatography; counter current chromatography; liquid-liquid partition chromatography; chromatographic purification of barbaloin from aloin.