

リサイクル分取HPLCによる天然物の分離例



Jai Korea On-Line Service www.jaikorea.co.kr

編集：(株)韓国 JAI

—— 高分子分析の未来と取り組む！ ——

Jai 日本分析工業株式会社

〒190-12 東京都西多摩郡瑞穂町武蔵208
電話 (0425)57-2331(代) FAX (0425)57-2331



目 次

| | |
|---------------------------------|----|
| 1. 一般の分取LCとJAI製リサイクル分取HPLCとの相違点 | 2 |
| 2. リサイクル分取HPLCでは運転費用が大幅に節減 | 3 |
| 3. リサイクル分取HPLCによる分析例 | 4 |
| 1) オリゴ糖KFA溶液 | 4 |
| 2) オリゴ糖A | 5 |
| 3) Ecdysteroid系試料 | 6 |
| 4) 凍蟲夏草 | 7 |
| 5) 一般天然物（生理活性物質） | 8 |
| 6) Saponin（薬用人参抽出物） | 9 |
| 7) シベリヤ産薬用人参（Araliaceae果）1 | 11 |
| 8) シベリヤ産薬用人参（Araliaceae果）2 | 12 |
| 9) Ethaboxam | 13 |
| 10) Taxol | 14 |
| 11) 淫羊草 | 15 |
| 12) Tagatose, Galactose の重合体 | 17 |

1. 一般の分取LCとJAI製リサイクル 分取HPLCとの相違点

Table 1. 一般の分取LCとJAI製リサイクル 分取HPLCの比較

| 内容 | 一般の分取LC | JAI製リサイクル 分取HPLC |
|----------------------|--|---|
| リサイクル回数 | グラジエント法による分離の向上を主体としている。ただ1回だけリサイクルが可能 | Isocratic法による分離及びリサイクル法による分離の向上 リサイクル回数無制限 |
| 溶媒消費量(流速) | 100~300 ml/min | 3~5 ml/min |
| カラムの寿命 | 2~3 年 | H-seriesカラムでは1年間の段数保障 |
| 理論段数 | 一般的に7,000段 | 一般的に 15,000段 |
| 検出器の使用状況 | UV又はRI検出器を単独で使用 | UVとRI検出器を同時使用 |
| 検出器の検出範囲 | 分取時だけ可能 | 分取及び分析スケールにも使用可 |
| リピートインジェクタ及びオートリサイクラ | オートサンプラー装着可能 | 両者を装着可能 |

- 1) JAIによる独創的なリサイクル技術を利用して、目的の化合物を同一カラム内を再循環させることで、それを完璧に分離・分取をすることができます。すなわち、再循環させることでよりカラム長の長いカラムに注入したと同一の分離結果が得られ、しかも低圧下で分離が行えます。他社の場合、リサイクル中に検出器セルが破損したり、試料の拡散が大きすぎるため、リサイクル回数はただ1回だけしか行えません。数十回のリサイクルを行えば位置異性体が分離できます。
- 2) 容質で300 mgの試料を分離する場合、分離を犠牲とすることなく分離することが可能です。無理をすれば、1日 最大 20 g までの分取が可能です。
- 3) JAIのH-Seriesカラムは吸着力が弱いので、注入した試料はカラム内に残留しないことから、その寿命が2倍以上で、通常は6年から10年間のご使用いただけます。
(例 ソウル大学 生物工学科:10年, 延世大学 化学科:14年, Dong Sung 化学:11年間使用中)
- 4) 分取 カラムは分析カラムより4倍以上の分離能を持っていて、UV及びRI検出器のダイナミックレンジが広いから、本システムは分析用HPLCとしても兼用が可能です。
- 5) 理論段数が高いポリマー充填剤を主に使っておりますので、既存の分取LCより1/10程度の溶媒使用量で運転ができ、他社のLCと比べると、1年間約300万円以上の溶媒が節減できます。
- 6) リピートインジェクター, オートリサイクラ等を装備することで、人手が要らない時間とその費用が節減されます。
- 7) RI 検出器でしか検出できない糖類等の分析のときは、既存の分取LCによるグラジエント法ではRI 検出器が使えないから分離・精製が困難でしたが、リサイクル法ではRI 検出器が使えることから、糖類等を検出しながら精製することができます。

2. リサイクル分取HPLCでは運転費用が大幅に節減

1) リサイクル分取HPLCは理論段数が高くなるポリマー充填剤が使われるので、従来からの分取LCと比べ分離が良いために、溶媒使用量が少なくなります。

Table 2. 他社のLCとJAIの分取HPLCにおける溶媒使用量の比較

| | 溶媒流量 | 溶媒の消費量 | 溶媒費用 毎日24時間一年間使用 | 溶媒費用 週15時間一年間使用 |
|-----|--------------|-------------|---------------------|--------------------|
| 他社 | 100.0 ml/min | 144.0 l/day | Yen 45,990,000 | Yen 3,780,000 |
| JAI | 3.0 ml/min | 4.3 l/day | Yen 1,373,312 | Yen 113,400 |
| 差 | 97.0 ml/min | 139.7 l/day | Yen 44,616,687 | Yen 3,666,600 |

(メタノールの価格がYen 3,500として計算)

Table 2に示したように、毎日24時間1年間使用すると仮定すると、JAIのリサイクル分取HPLCの場合、1年間の溶媒費用が約1,373,312円、他社の場合は、45,990,000円の溶媒費用が必要です。また、1週間に15時間づつ1年間を使用した場合では、113,400円、他社の装置では、3,780,000円が必要です。

2)分取LC用のカラムは、2年程度で新しいものに交換するのが一般的です。しかし、JAI カラムはポリマー系充填剤を使用するので、他社のカラムより吸着力が弱いことからその寿命が他社より2倍以上長くなります。このことから6年以上使用可能であるとされており、また、カラムの理論段数が著しく低下した場合でも、低価格で再充填することが出来ます。

3) リピートインジェクター、オートリサイクラーなどの自動化装置は、最初の分取条件を設定するだけで、自動注入及びリサイクルが進行しますので、時間を浪費いたしません。また、無人化状態で夜間連続運転が可能です。

3. リサイクル分取HPLCの分析の例

1) オリゴ糖KFA溶液

★分析日： 2000年 11月 22日

★試料： KFA 溶液

★分取目的： KFA溶液中の化合物の分離/分取

★分析装置： リサイクル分取HPLC (Model : LC-908)

★分析条件： カラム - JAIGEL W-252 カラム (20Φ × 500 mm)

ポンプ流速 - 3.5 ml/min

溶媒 - Water (HPLC grade)

試料注入量 : 200 mg/3 ml

検出器 : RI検出器 (× 500 Range)

★結果： 上記の試料3 mlを注入して、リサイクル分析を4回続け、Fig. 1のクロマトグラムが得られました。

分取物は A, B, C, D, Eとして、5個のフラクションに採取しました。

分取物のフラクション番号Eと標準試料との保持時間及びNMRスペクトルが一致したことから、同一化合物であると確認されました。

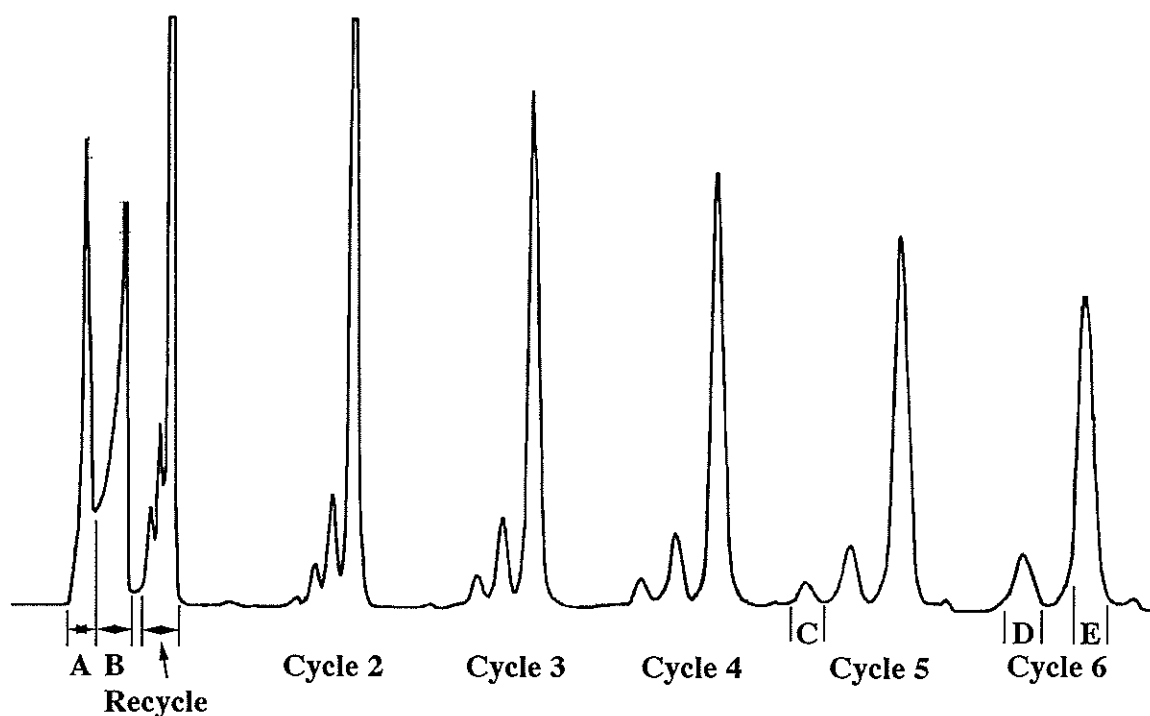


Fig. 1オリゴ糖(KFA溶液)のリサイクル分取クロマトグラム

2) オリゴ糖A

★分析日： 2001年 12月 12日

★試料： オリゴ糖A

★分取目的： オリゴ糖の完全分離/分取

★分析装置： リサイクル分取HPLC (Model : LC-908)

★分析条件： カラム - JAIGEL W-252 カラム (20Φ × 500 mm)

ポンプ流速 - 3.0 ml/min

溶媒 - Water (HPLC grade)

試料注入量 : 約3 ml

検出器 : RI検出器 (× 500 Range)

★結果： 同様に約3 mlの試料を注入して、リサイクル分析を4回続けました。

そのクロマトグラムをFig. 2に示します。

リサイクルによってオリゴ糖Aを完全に分離・分取することができました。

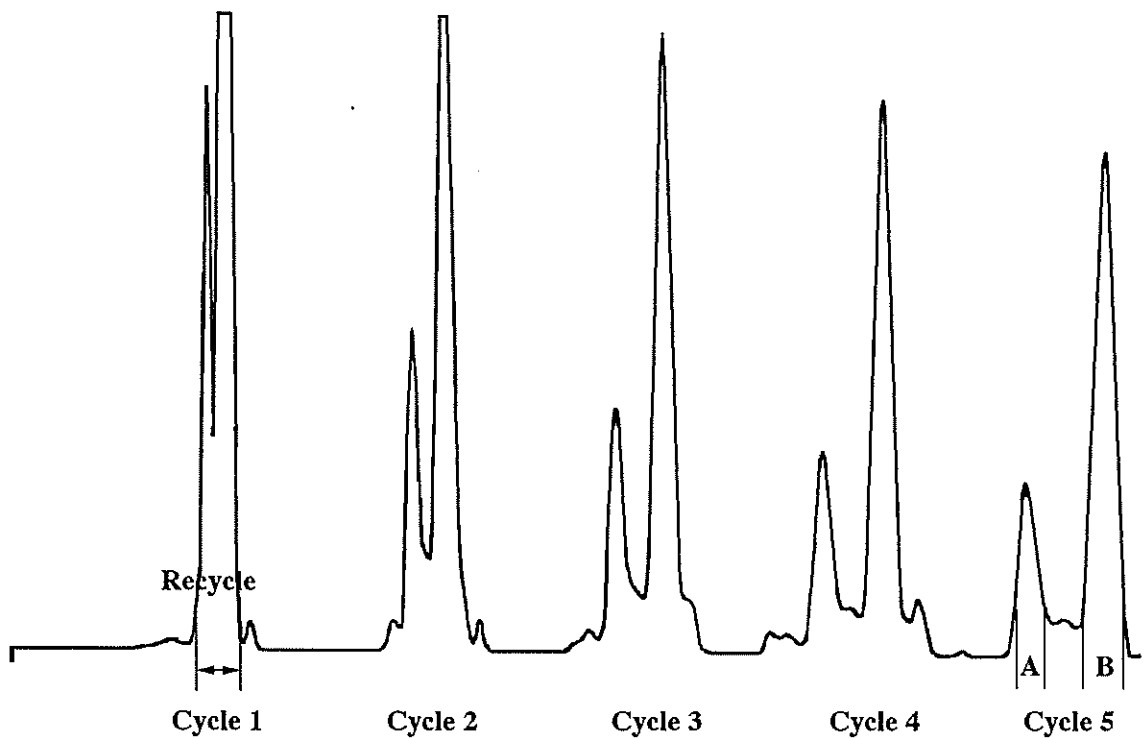


Fig. 2 オリゴ糖 A のリサイクル分取クロマトグラム

3) Ecdysteroid系試料

- ★分析日： 2001年 6月 7日
- ★試料： Ecdysteroids
- ★分取目的： Ecdysteroidの分離/分取
- ★分析装置： リサイクル分取HPLC (Model : LC-918W)
- ★分析条件： カラム - JAIGEL W-252 × W-253 カラム (20φ × 500mm)
ポンプ流速 - 3.5 ml/min
溶媒 - MeOH + MeCN : 6 + 4 (HPLC grade)
試料注入 : 40 mg/3 ml
検出器 : UV 検出器
- ★結果： リサイクルを18回続行することで、A, B二つのフラクションとして分離/分取することができました (Fig. 3)。

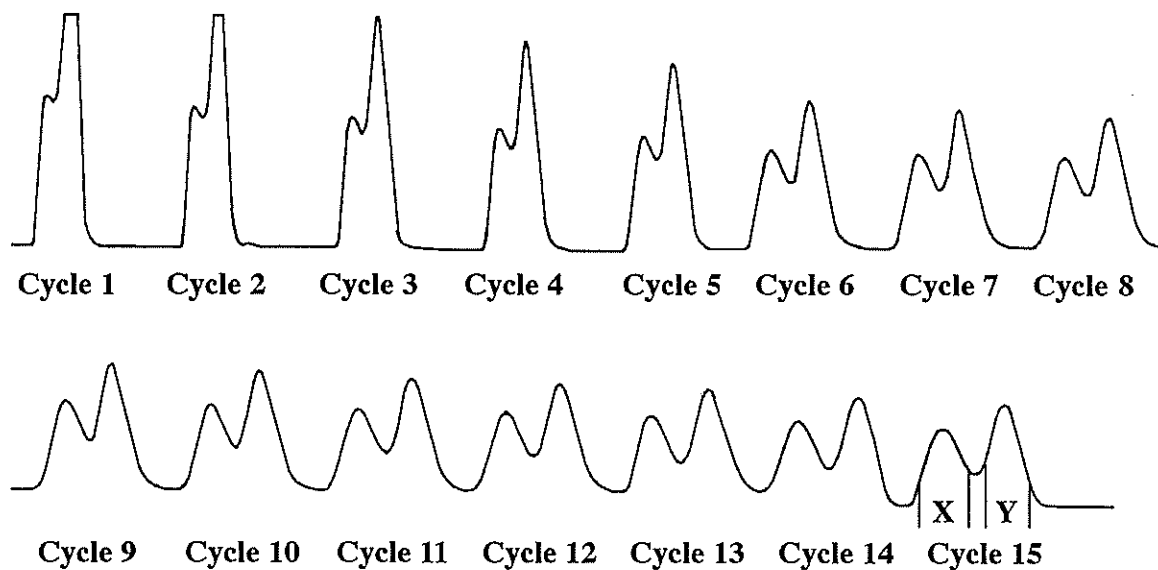


Fig. 3 Ecdysteroids のリサイクル分取クロマトグラム

4) 凍蟲夏草

- ★分析日： 2001年 4月 6日
★試料： 凍蟲夏草(黄金蟲)の抽出物
★分取目的： 分離/分取
★分析装置： リサイクル分取HPLC (Model : LC-918)
★分析条件： カラム - JAIGEL 1H × 2H カラム (20Φ × 500 mm)
ポンプ流速 - 3.5 ml/min
溶媒 - CHCl₃ 100% (HPLC grade)
試料注入 : 800 mg/3 ml
検出器 : UV 検出器
- ★結果： リサイクルを1回するだけで、A, Bの二つのフラクションに分離/分取することができました。そのクロマトグラムをFig. 4に示します。
標準試料と分取物のA, B フラクションをそれぞれ再注入することで、目的の化合物であることが確認されました。

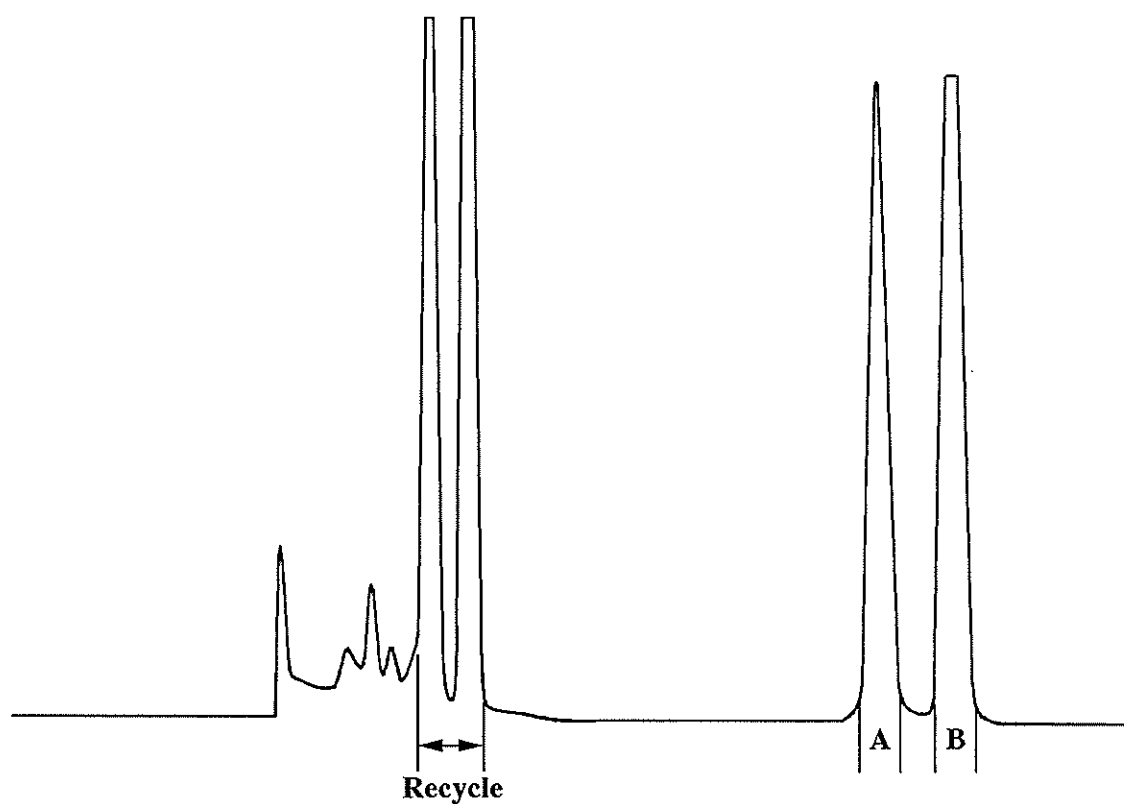


Fig. 4 凍蟲夏草(黄金蟲)の抽出物のリサイクル分取クロマトグラム

5) 一般天然物 (生理活性物質)

- ★分析日: 1999年10月13日
- ★試料: 生理活性物質
- ★分取目的: 天然物で活性を持った化合物の完全分離による精製/分取
- ★分析装置: リサイクル分取HPLC (Model: LC-908)
- ★分析条件: カラム - JAIGEL GS-320 カラム (20Φ × 500 mm)
ポンプ流速 - 5.0 ml/min
溶媒 - MeCN : MeOH = 1 : 1
試料注入 : 52.75 mg/3 ml
検出器 : UV 検出器 (254 nm)
RI 検出器
- ★結果: 上記の試料を105.5 mg、6 mlの移動相に溶解後、0.45 ulのフィルターに
る過の後、3 mlを注入しました。
3回のリサイクルによって、4個のピーク分離することができました(Fig. 5)。
これらもピークはそれぞれ純品と保持時間が完全に一致しました。

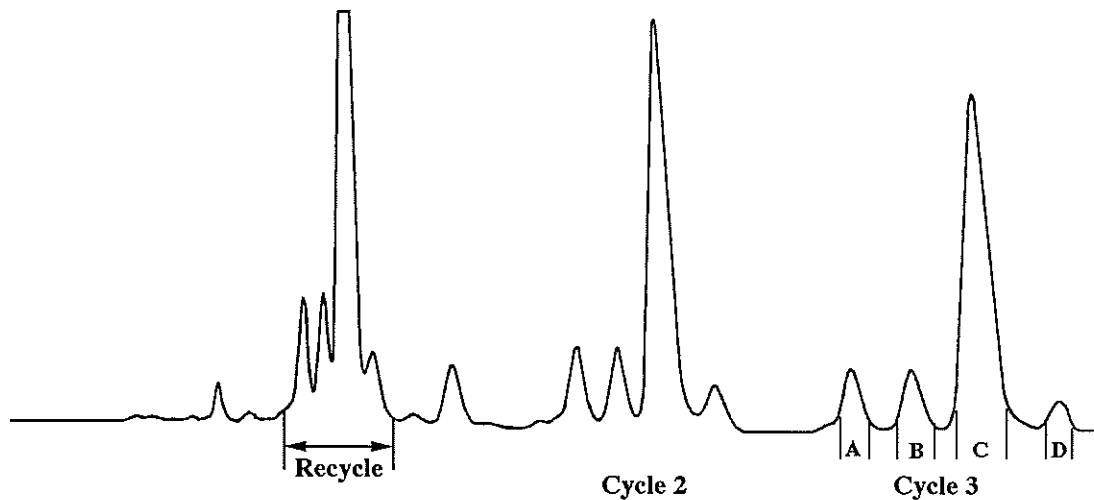


Fig. 5 生理活性物質のリサイクル分取クロマトグラム

6) Saponin (薬用人参抽出物)

★分析日： 2001年2月5日
★試料： 薬用人参抽出物 (0.45ulのフィルターでろ過)
★分取目的： Saponinの完全分離による精製/分取
★分析装置： リサイクル分取HPLC (Model : LC-908)
★分析条件： 分取カラム - JAIGEL GS-310 カラム × 2 (20Φ×500 mm)
分析カラム: NH₂ (4.6 × 200 mm)
ポンプ流速 - 5.0 ml/min
溶媒 - MeCN : MeOH = 1 : 1
試料注入 : 52 mg/3 ml
検出器 : UV 検出器 (203 nm)

★結果： Fig. 6 にこの試料のNH₂カラムによるHPLCクロマトグラムを示します。
上記の試料の104 mgを 6 mlの移動相に溶解後、JAIGEL GS-310 カラムを二つ
連結して、リサイクル分取HPLC-908型に3 mlの試料溶液を注入しました。
Fig. 7 に紫外検出器によるリサイクル分取クロマトグラムを示します。
試料から分離しようとする成分を効果的に分取するために区間別分取を実行し
て、次に、区間Cの部分を2回のリサイクルすることで、完全に精製/分取がで
きました。また、HPLCのクロマトグラム (Fig. 6) よりもリサイクル分取クロ
マトグラム (Fig. 7) の方がより分離が良いことが分かります。

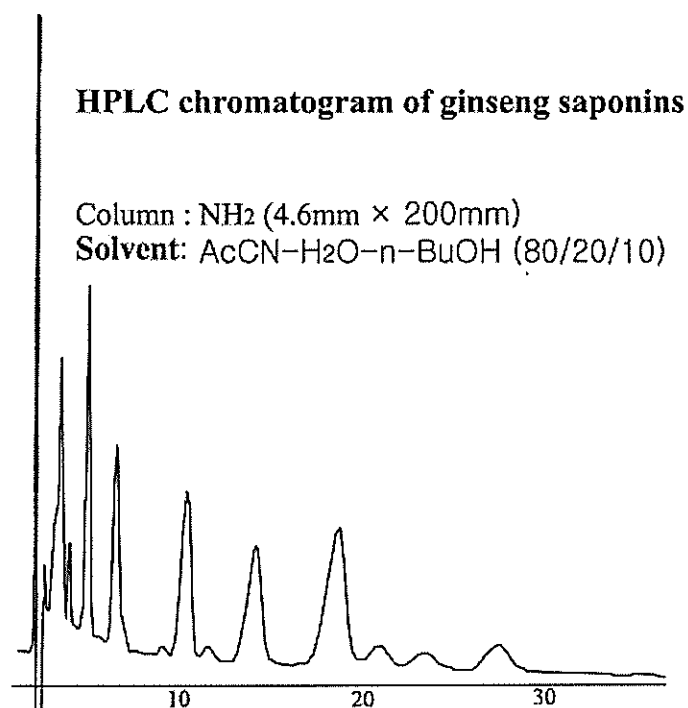


Fig. 6 薬用人参抽出物のNH₂カラムによるHPLCクロマトグラム

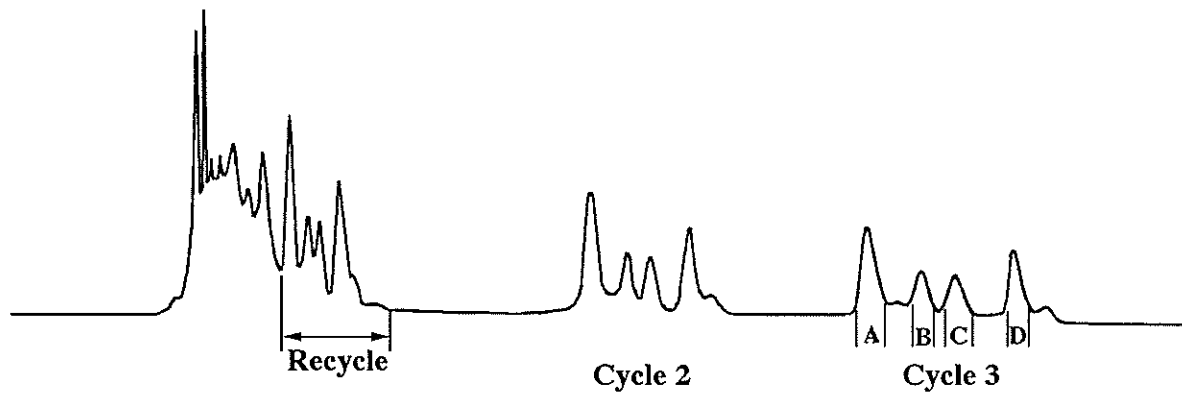


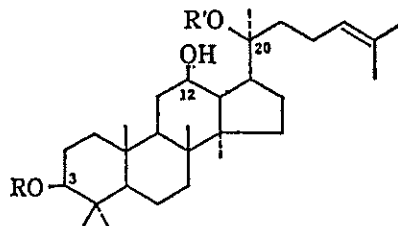
Fig. 7 薬用人参抽出物(1)のリサイクル分取クロマトグラム

参考資料：ジンセンサポニンの基本骨格

Ginenoside Rx

- Rb₁ R = D-Glc β(1→2)D-Glc
R' = D-Glc β(1→6)D-Glc
- Rb₂ R = D-Glc β(1→2)D-Glc
R' = L-Ara(pyr) α(1→6)D-Glc
- Rc R = D-Glc β(1→2)D-Glc
R' = L-Ara(fur) α(1→6)D-Glc
- Rd R = D-Glc β(1→2)D-Glc
R' = D-Glc

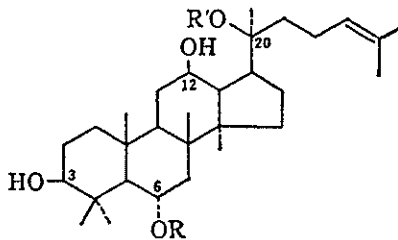
(20S)-Protopanaxadiol 類



R=R'=H (20S)-Protopanaxadiol

- Re R = L-Rha α(1→2)D-Glc
R' = D-Glc
- Rf R = D-Glc β(1→2)D-Glc
R' = H
- Rg₁ R = D-Glc
R' = D-Glc
- Rg₂ R = L-Rha α(1→2)D-Glc
R' = H

(20S)-Protopanaxatriol 類



R=R'=H (20S)-Protopanaxatriol

7) シベリヤ産薬用人参 (Araliaceae果) 1

- ★分析日： 2001年 4月 3日
- ★試料： シベリヤ産薬用人参 (1) (Araliaceae果)の抽出物
- ★分取目的： 完全分離による精製/分取
- ★分析装置： リサイクル分取HPLC (Model : LC-908W)
- ★分析条件： カラム - JAIGEL GS-310 カラム (20Φ×500 mm) × 2本
ポンプ流速 - 3.5 ml/min
溶媒 - MeOH = 100%
試料注入 : 3 ml/300 mg
検出器 : UV 検出器 (200 nm)、 RI 検出器
- ★結果： 上記の試料の300 mgを3 mlの移動相に溶解後, 0.45ulのフィルターでろ過した後, JAIGEL GS-310 カラム [2本] を装備したリサイクル分取HPLC-908型に3 mlの試料を注入しました。
区間別分取を実行して、2回のリサイクルによって目的のピークを完全に精製/分取することができました (Fig. 8, RI 検出器による検出)。

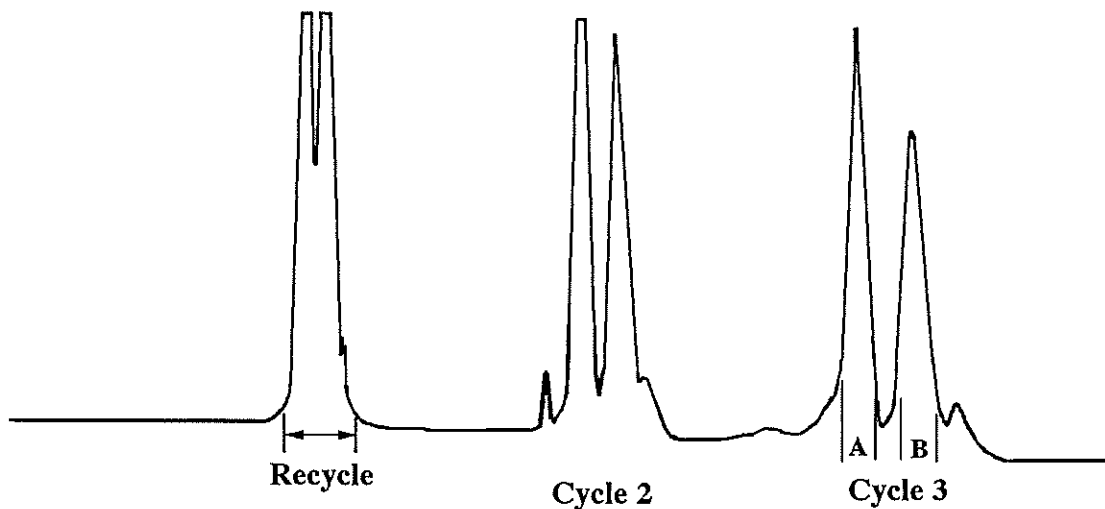


Fig. 8 シベリヤ産薬用人参抽出物(1)のリサイクル分取クロマトグラム

8)シベリヤ産薬用人参(Araliaceae果) 2

- ★分析日： 2002年3月20日
- ★試料： シベリヤ産薬用人参(2) (Araliaceae果)の抽出物
- ★分取目的： 完全分離/分取
- ★分析装置： リサイクル分取HPLC (Model: LC-918)
- ★分析条件： カラム - JAIGEL ODS カラム (20Φ × 500 mm)
 ポンプ流速 - 5 ml/min
 溶媒 - H₂O : MeOH : MeCN = 80 : 6 : 14
 試料注入： 推定 不可
 検出器： UV 検出器 (210 nm)
 RI 検出器

★結果： 上記試料の3 mlを移動相に溶解した後、0.45ulのフィルターでろ過した後、JAIGEL ODS カラムを2本連結したリサイクル分取HPLC-918型に3 mlの試料溶液を注入しました。A stepで、純度約8%のSiberian GinsengのAcanthoside Dを分取した後、B stepとして分取したフラクションを再注入して、純度93%のAcanthoside Dを精製/分取することができました (Fig. 9)。

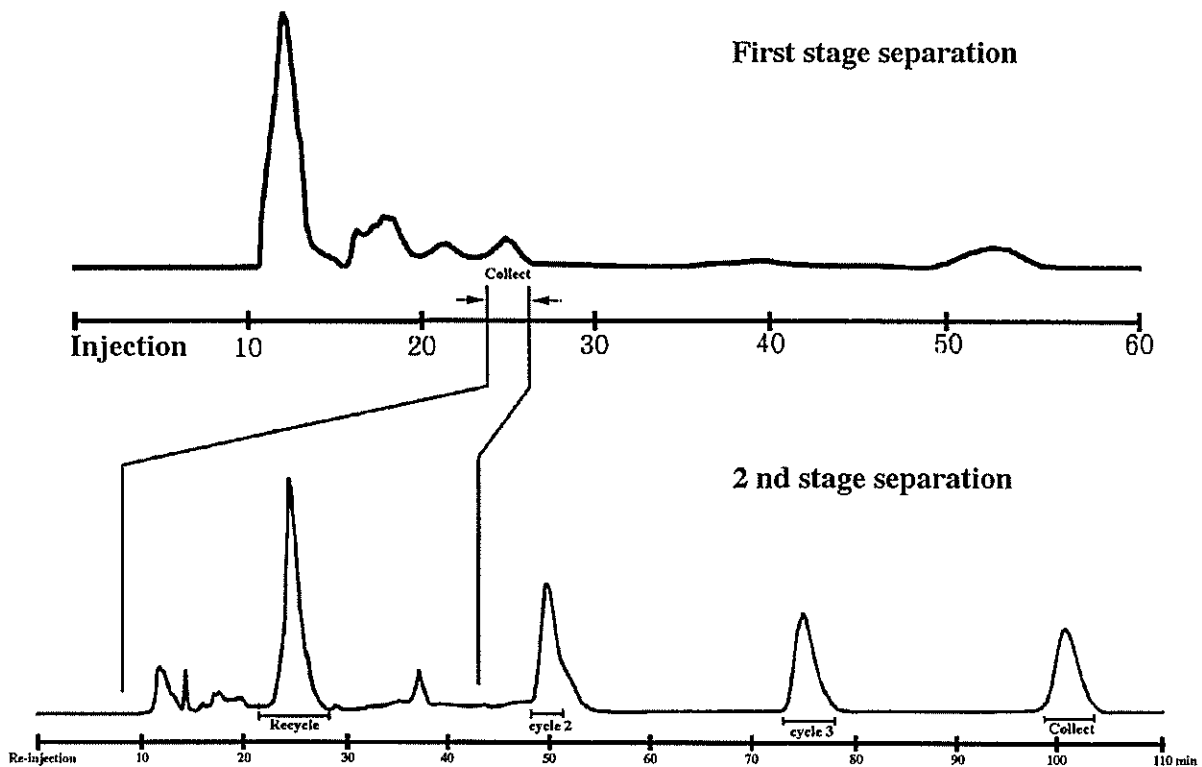


Fig. 9 シベリヤ産薬用人参抽出物(2)のリサイクル分取クロマトグラム

9) Ethaboxam

- ★分析日： 2001年 9月 7日
- ★試料： Ethaboxam
- ★分取目的： 殺菌性の效能確認のための精製/分取
- ★分析装置： リサイクル分取HPLC (Model : LC-908)
- ★分析条件： カラム - JAIGEL W-252 カラム × 2 (20φ × 500 mm)
ポンプ流速 - 3.5 ml/min
溶媒 - Water : Acetonitril = 7 : 3
試料注入 : 3 ml/900 mg
検出器 : UV 検出器 (310 nm)

★結果： 上記試料の 900 mgを3 mlの移動相に溶解後、0.45ul フィルターでろ過した後、JAIGEL W-252 カラム〔2本〕をリサイクル分取HPLC-908型に接続して、900 mg/3 mlの試料を注入しました。
3回のリサイクルによって目的化合物を精製/分取することができました (Fig. 10)。
分取した試料を使って2次の臨床実験まで行なうことができました。

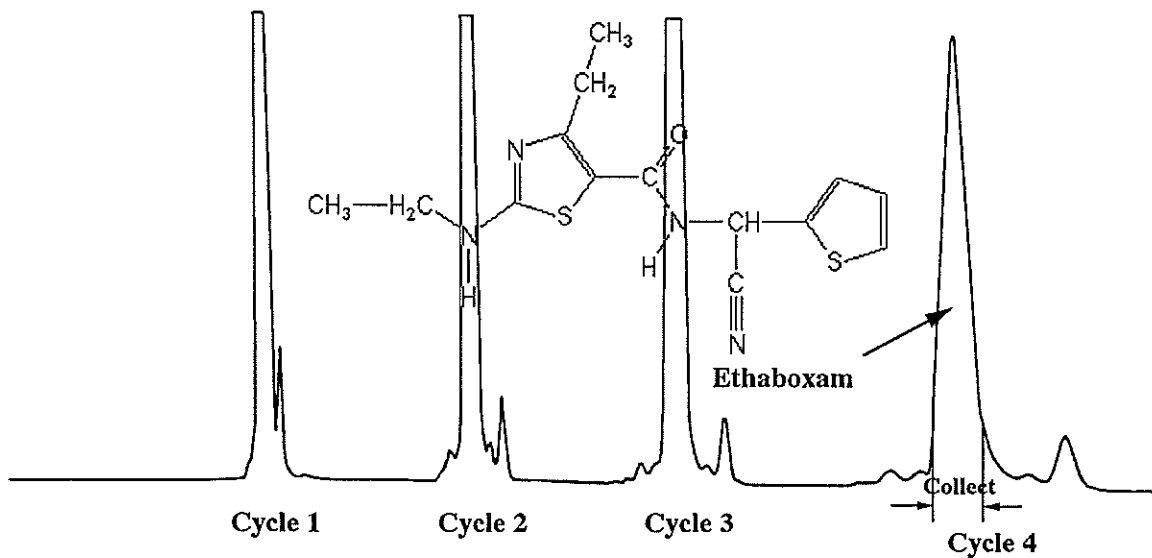


Fig. 10 Ethaboxamの精製

10) Taxol

- ★分析日： 1996年 12月 18日
- ★試料： 松の木の抽出物
- ★分取目的： Taxolの精製/分取
- ★分析装置： リサイクル分取HPLC (Model: LC-908)
- ★分析条件： カラム - JAIGEL GS-320 カラム (20Φ × 500 mm)
(A step) ポンプ流速 - 4 ml/min
溶媒 - MeOH
試料注入： 80 mg / 3 ml
検出器： UV 検出器 (229 nm)
- ★分析条件： カラム - JAIGEL ODS カラム (20Φ × 500 mm)
(B step) ポンプ流速 - 6 ml/min
溶媒 - MeCN : Aceton = 1 : 1
試料注入： A step 分取物をすぐLoading(20 mg 推定)
検出器： UV検出器 (229 nm)
- ★結果： 上記 試料の80 mgを3 mlの移動相に溶解し、0.45ul のフィルターでろ過した後、JAIGEL GS-320 カラムに注入してFig. 11A-step のクロマトグラムが得られました。Fig. 11A-stepのTaxolの部分を区間分取して、JAIGEL ODS カラムを装備したJC-908型に再注入して、2サイクルめでTaxolを分取をしました(Fig. 11B-step)。純度測定の結果 95%以上の純度であることが分かりました。

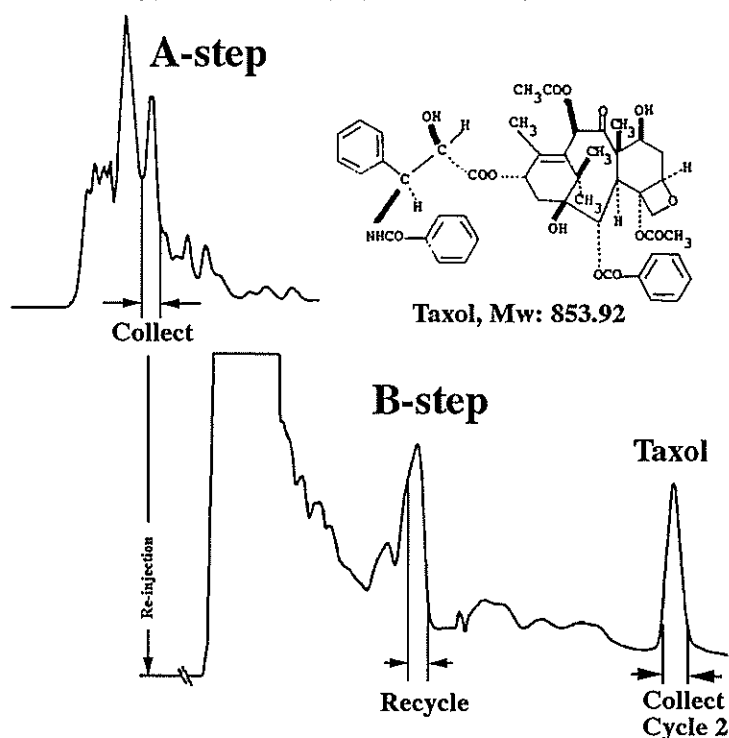


Fig. 11松の木の抽出物のクロマトグラム (A-step) 、再注入によるリサイクル分取クロマトグラム (B-step)

11) 淫羊草

- ★分析日： 2002年 2月 28日
★試料： 淫羊草 の抽出物
★分取目的： 完全分離/分取
★分析装置： リサイクル分取HPLC (Model : LC-908)
★分析条件： カラム - JAIGEL ODS カラム (20Φ × 250 mm)
ポンプ流速 - 5 ml/min
溶媒 - MeOH : Water = 7.5 : 2.5
試料注入 : 40 mg/3 ml
- ★結果： 上記 試料の40 mgを3 mlの移動相に溶解後, 0.45ul フィルターでろ過した後, JAIGEL W-252 カラムを装備したLC-908に注入してIcarrin 部分とEpidomis A 部分を分取し、それをJAIGEL ODS カラムに再注入して、Fig. 12のリサイクル分取クロマトグラムを得た。
得られたIcarrin とEpidomis Aの純度測定の結果、それぞれ純度95%以上物であった。

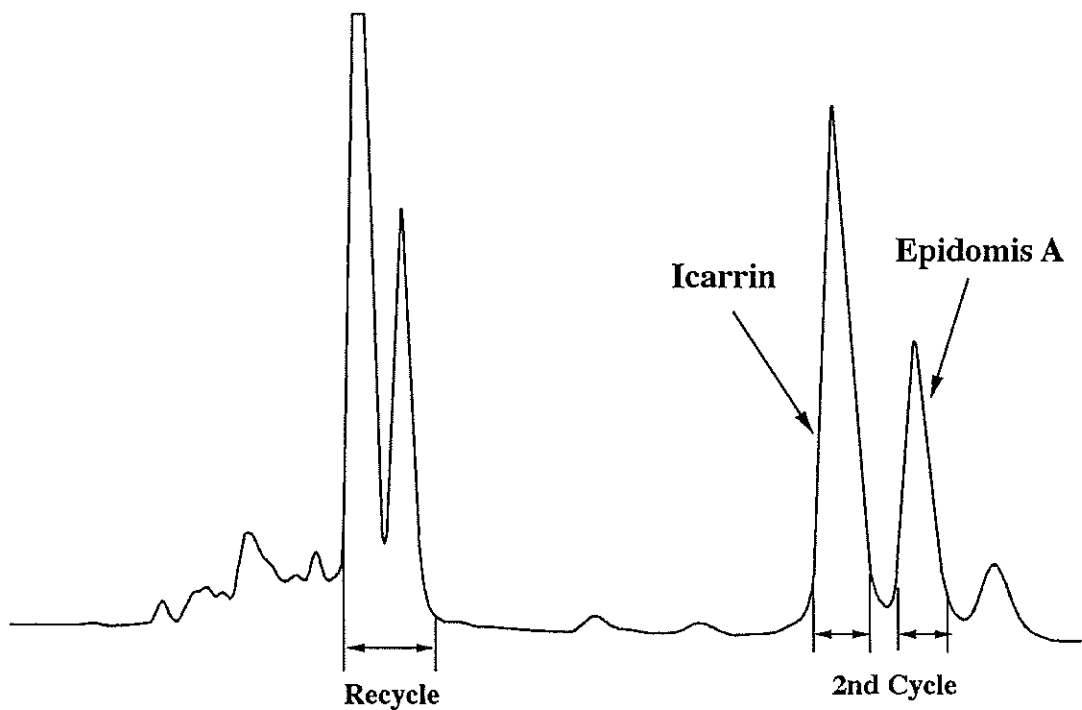


Fig. 12淫羊草抽出物のリサイクル分取クロマトグラム

12) Tagatose, Galactose の重合体

- ★分析日： 2003年3月19日
- ★試料： Tagatose, Galactose 重合体
- ★分取目的： 精製/分取
- ★分析装置： リサイクル分取HPLC (Model: LC-908)
- ★分析条件： カラム - JAIGEL W252 カラム (20Φ × 500 mm)
 ポンプ流速 - 3 ml/min
 溶媒 - Water
 試料注入： 3 ml
- ★結果： 上記 試料をを3 mlの移動相に溶解後、0.45ul フィルターでろ過した後、
 JAIGEL W-252 カラムを装備したLC-908に注入して、完全に分離分取することができました(Fig. 13)。

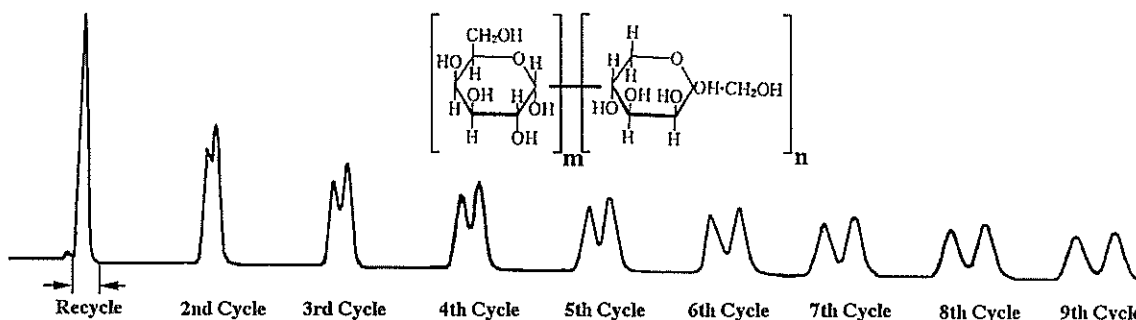


Fig. 13 Tagatose, Galactose 重合体のリサイクル分取クロマトグラム

(完)