

最近の天然生理活性物質の研究とリサイクル 分取液体クロマトグラフによる試料調整

京都薬科大学

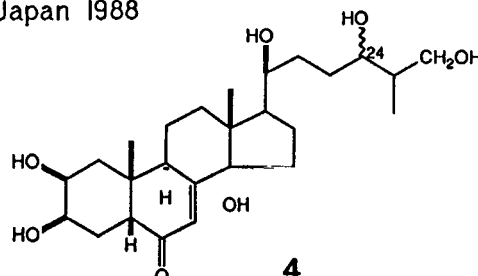
小塚睦夫

物質の混合物から各成分を単離することは物質を取り扱う科学において極めて重要である。特に天然物の研究においては、互いに構造が極めて類似する天然有機化合物の混合物から各成分を単離することが必要で、これに対して、様々な方法が工夫されているが、一般に長い時間と多大の労力及び費用を必要とし、研究の律速段階となっていることが多い。また、時にはその試みが不成功に終り、この段階の成否が研究そのものの成否を決定する場合もしばしばみられる。我々は効率の良い、天然有機化合物の単離、分析法の樹立による研究能率の向上を目指して、既にフシグロセンノウ中に含まれる ecdysteroid 類や、ユーカリ属植物中の euglobal 類、一般に単離が困難である低極性ステロイドの効率の良い単離操作の検討を行った。

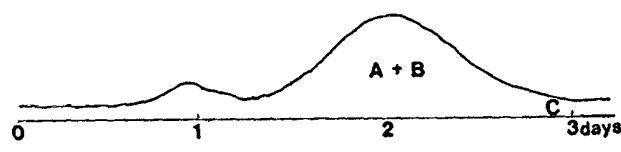
1 ecdysteroid

我々はフシグロセンノウ *Lychnis miqueliana* の根部から常法により得られた ecdysteroid 画分 (1.1 g) を DCCC (クロロホルム-メタノール-水=13:7:4 上昇法) に付し化合物 C (43.2 mg) を得た。主画分は混合物のため HPLC (JAI GS 320 メタノール リサイクル 7 回) を行ない化合物 A (489.4 mg) と B 画分を得た。本画分は更に HPLC (JAI I 15 ODS 水 アセトニトリル-メタノール=85:15:2) により化合物 B (38.5 mg) と化合物 D (4.8 mg) に分離された。上述の方法で困難な類似構造を有する化合物相互の単離を短時日で行なうことかできた。特に HPLC は日本分析工業製の LC 09 を使用して、1 回の試料注入量約 180 mg DCCC で得られた ecdysteroid 混合画分から全収率 93.7% の高収率で各成分に単離し得た。リサイクルを行なうことにより溶媒も大量を必要とせず。また分取スケールの分離を行なった為、微量成分の化合物 D も単離することができた。上記の化合物のうち化合物 B 及び D は新化合物で、それぞれ lychsterone epilychsterone と命名しスペクトルデータ。特に 2D NMR (H-H COSY, C-H COSY) により 4 式 (a pair of 24 epimer) と決定した。化合物 A 及び C はそれぞれ 20-hydroxyecdysone (1) polypodine B (3) の標品と比較して確認した。

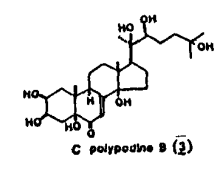
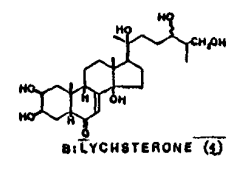
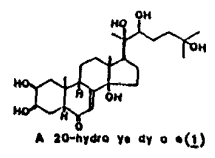
小塚睦夫 木島孝夫 高崎みどり 浅香征洋 久保伊佐夫 日本生薬学会第 33 回年会講演要旨 72 頁 (1986) M. Kozuka, M. Takasaki, T. Konoshima, T. Shingu, M. Saitoh, Y. Asaka, G. de Boer, I. Kubo. Abstracts of Papers, p. 143. 16th International Symposium on the Chemistry of Natural Products, Kyoto, Japan, 1988.



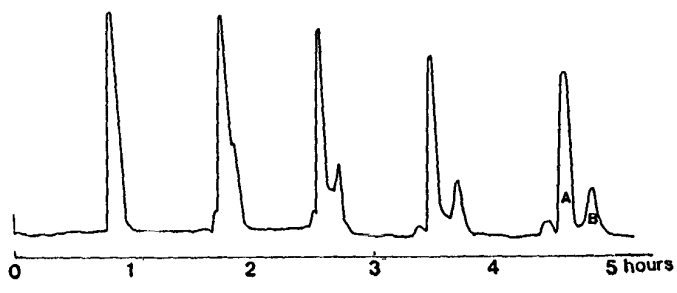
DCCC of the Ecdysteroids



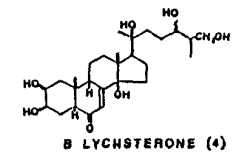
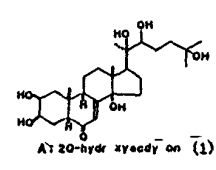
CHCl₃ MeOH H₂O (13 7 4) flow rate 4 ml/hr
ascending mode detection UV 254nm



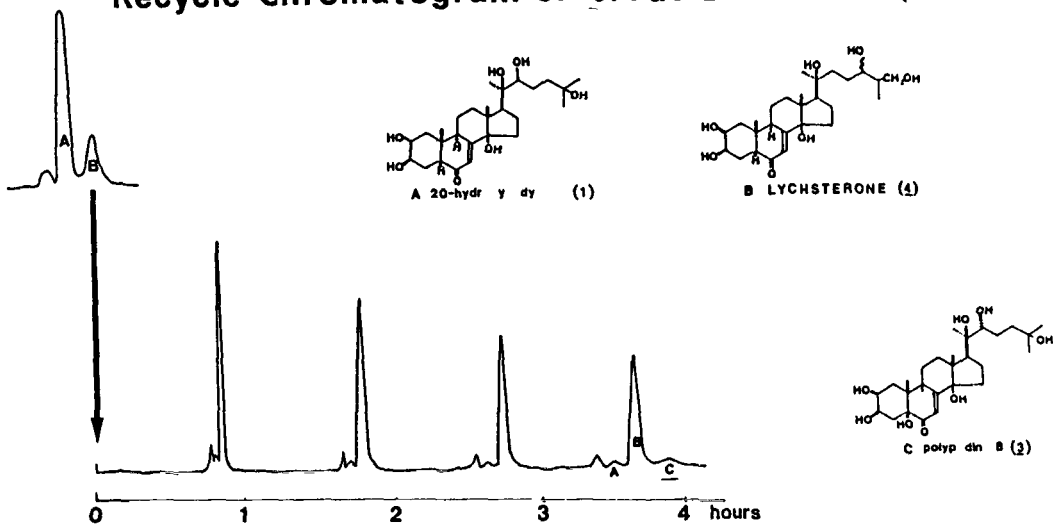
Recycle Chromatogram (LC 09)



column JAI-GS320 22.5 X 500 mm
solvent CH₃OH
flow rate: 2.4 ml/min
detector RI

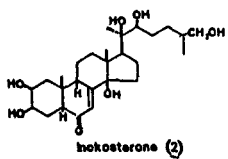
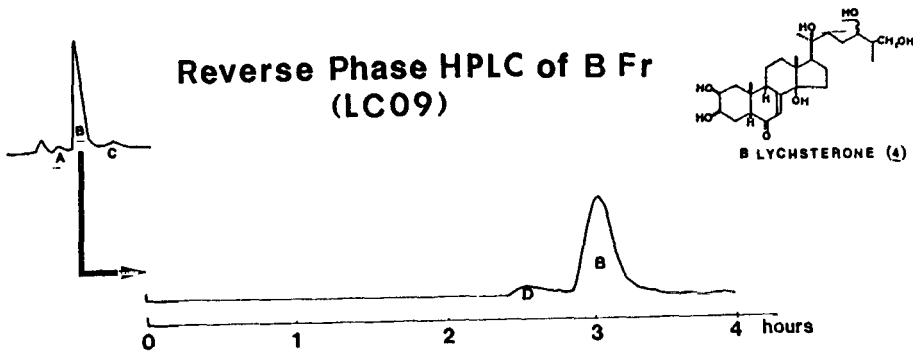


Recycle Chromatogram of crude B Fraction (LC 09)



column: JAI-GS320 22 5X500mm
 solvent CH₃OH flow rate: 2.4 ml/min
 detector: RI

Reverse Phase HPLC of B Fr (LC09)

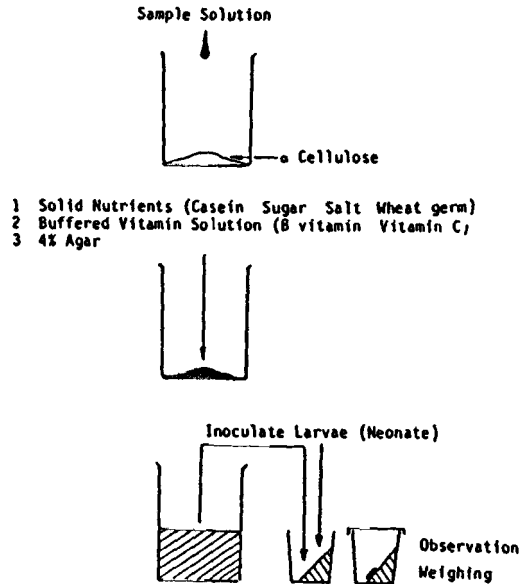


column JAI GEL-ODS, I-15 20X250mm
 solvent H₂O-CH₃CN-CH₃OH (85:15:2)
 flow rate 2.4 ml/min
 detector UV at 254 nm

D EPLICHSTERONE

BIOACTIVITY

The No-choice Artificial Diet Feeding Assay



Effects of three phytoecdysteroids
on the growth and development of larvae
of *Pectinophora gossypiella* (pink bollworm)

Compound	ED ₅₀ (ppm in diet)
20-Hydroxyecdysone	18
Polypodine B	8
Inokosterone	72

7 days feeding at 28 C in dark

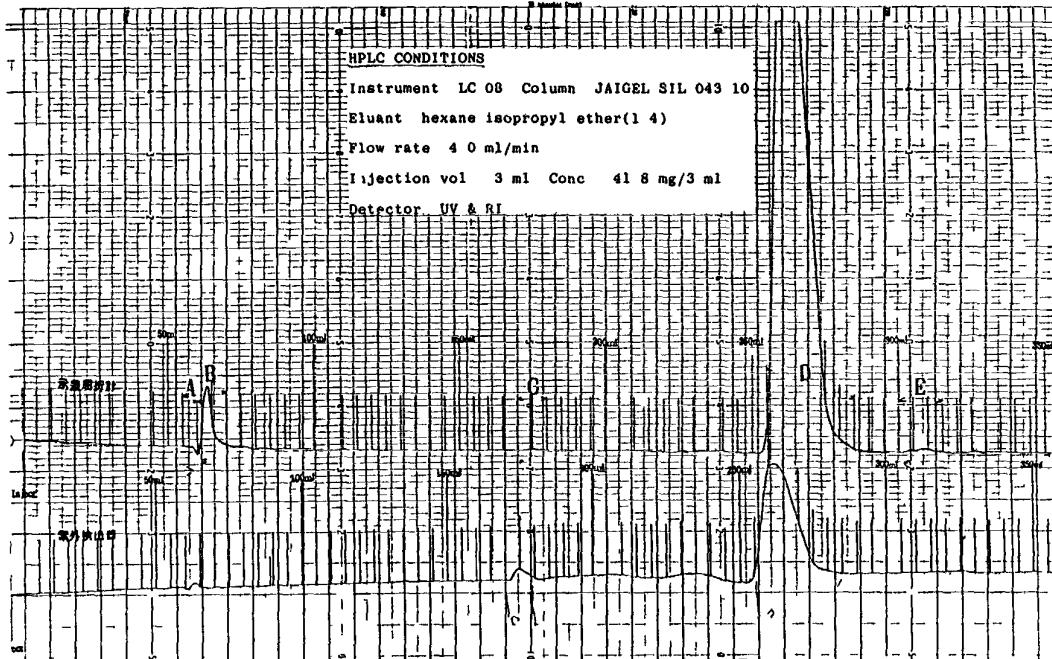
2 sterol

生理活性試験及びNMRの研究用試料にするsterolの調製を行なった
低極性steroidは一般に単離が困難であるので効率のよい単離法を検討した

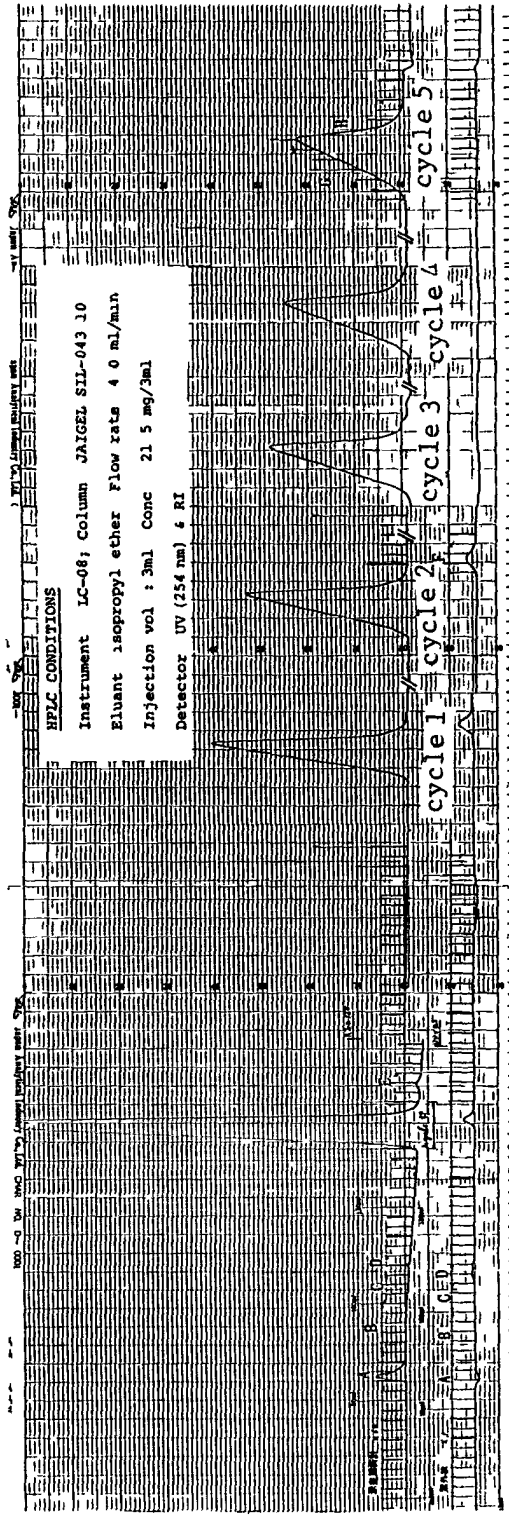
小塚睦夫 橋本圭二,高崎みどり 木島孝夫 内野茂己 日本生薬学会第35回年会講演要旨
103頁 (1988)

検討の対象としたステロイドは天然に広く分布する cholesterol β -sitosterol stigmasterol で それぞれ 市販品を原料として用いた。原料中の各化合物の含量は BSTFA によりトリメチルシリル化後 GC (capillary column cross linked methylsilicone 0.25 mm x 30 m temp 290 N₂ 0.8 ml/min FID Hewlett-Packard 5880A) により cholesterol 97% β -sitosterol 70% stigmasterol 94% であった。単離は リサイクル分取液体クロマトグラフ (JAISD-8) を用いて行った。液クロ条件は ノリカゲルカラム (20 mm x 250 mm) 溶離液 isopropylether RI 検出器を用い 各化合物3-6回のリサイクル分析を行った。主ピークの各分画はトリメチルシリル化後 前記GC条件で分析したところ cholesterol 99% β -sitosterol 92% stigmasterol 98% の純度で得られた。なお 各ピークはGC/MS (GC column cross linked methylsilicone 0.25 mm x 20 m temp 230-280 昇温 5 /min MS Hitachi M-80 003-data analyser electron voltage 20 EV ion source temp 230) により分析して確認した。本分析は 所要時間 約5-6時間 溶媒の消費量は 毎回約1Lで時間的並びに経済的に効率の高い方法と考えられる。現在 それぞれの化合物と共存する少量成分の分取分析について実験中である。

PREPARATIVE HPLC OF CRUDE CHOLESTEROL

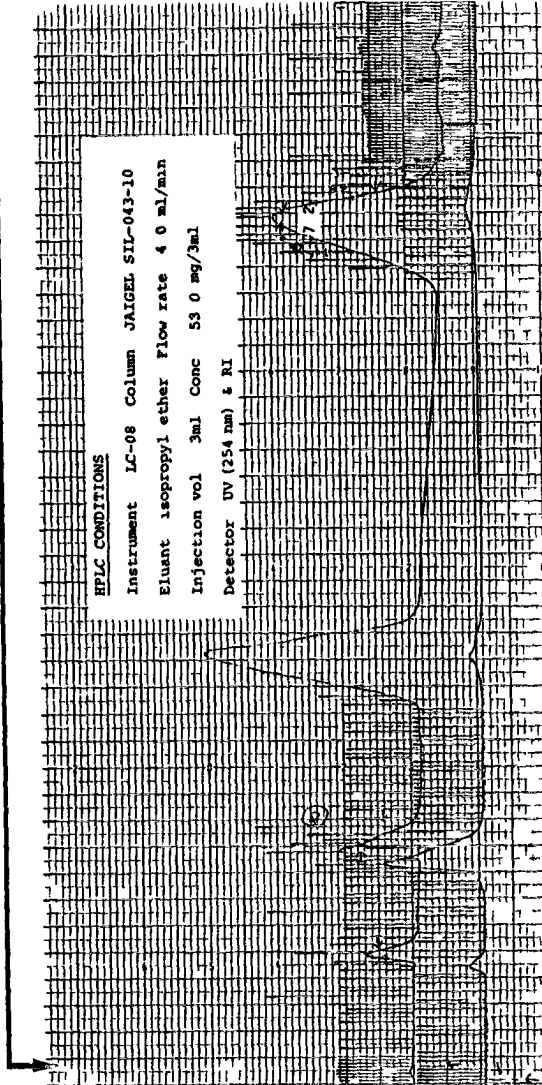
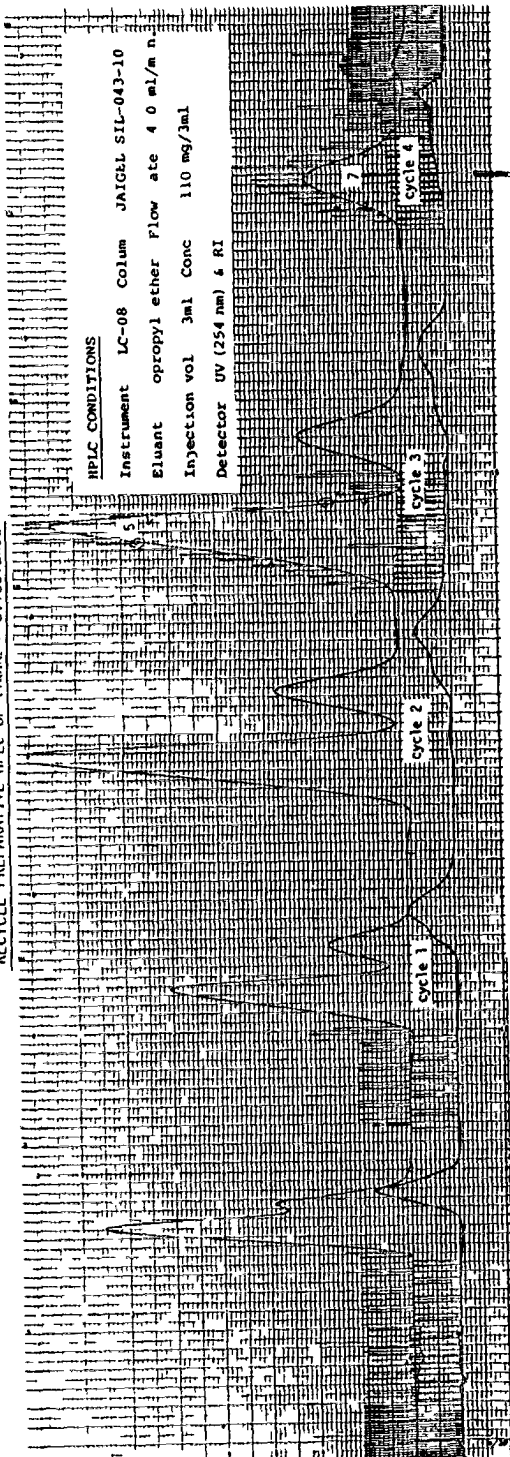


Recycled Preparative HPLC of Crude Stigmasterol



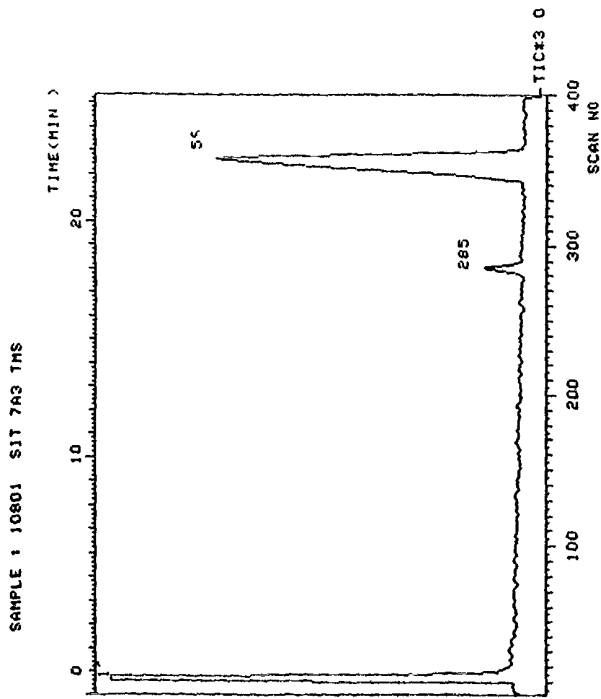
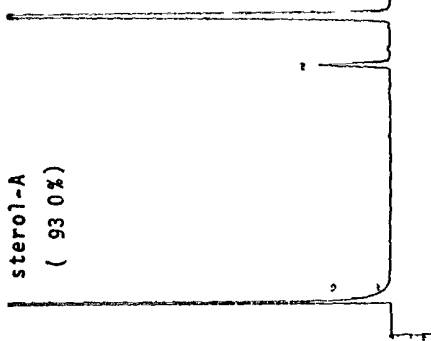
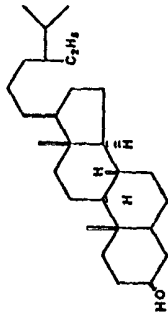
化合物	市販品	再結晶品	HPLC分取
cholesterol	97.7%	97.9%	99.0%
stigmasterol	94.0%	95.6%	98.4%
β -sitosterol	70.2%	71.4%	92.7%

RECYCLE / REPLICATIVE HPLC OF (RUDN) α SITOSTEROL

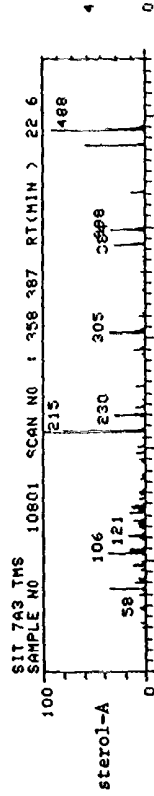
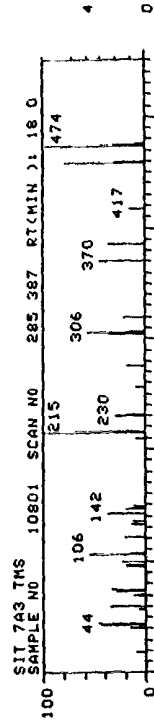
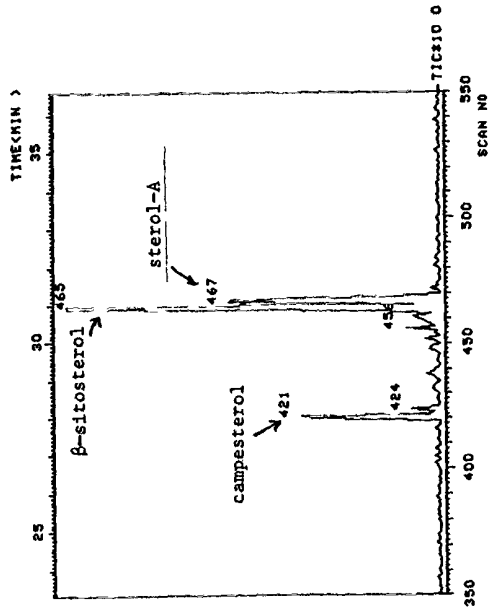


GC AND GC/MS DATA OF STEROL A (FRACTION 7-2)

sterol-A $\xrightarrow{\text{BSTFA}}$ TMSi-deriv



SAMPLE : 43007 SIT ORIG TMS SP LESS



3 chromones

薫香料及び漢方の医薬として用いられる沈香は特異成分として多種のphenylethyl chromone類を含有している 本生薬にはpolymer成分の含有が予想され それらの成分について検索した

References and Notes

- 1) a) Y Shimada and S Kiyosawa Shoyakugaku Zasshi, 38 313 (1984); b) Y Shimada and S Kiyosawa ibid, 38, 321 (1984) c) Y Shimada T Tominaga and S Kiyosawa Yakugaku Zasshi, 106, 391 (1986)
- 2) E Yoshii T Koizumi and T Oribe, Tetrahedron Lett, 41, 3921 (1978)
- 3) a) Y Shimada T Tominaga T Konishi and S Kiyosawa, Chem Pharm Bull 30 3791 (1982) b) Y Shimada, T Konishi, S Kiyosawa M Nishi, K Miyahara, and T Kawasaki, ibid, 34 2766 (1986) c) Y Shimada, T Konishi and S Kiyosawa, ibid, 34 3033 (1986); d) K Iwagoe T Konishi, S Kiyosawa, Y Shimada K Miyahara and T Kawasaki ibid 34 4889 (1986); e) K Iwagoe S Kodama T Konishi S Kiyosawa Y Fujiwara, and Y Shimada ibid, 35 4680 (1987); f) K Iwagoe, T Konishi, S Kiyosawa, Y Shimada K Miyahara, and T Kawasaki ibid, 36 2417 (1988)
- 4) A pyridine extract (300 g) from residue-2^{3a}) was refluxed with MeOH to obtain a viscous extract (56.5 g) The MeOH extract was subjected to the silica gel column chromatography (CHCl₃-MeOH-H₂O, 9:1:0.1 V/V) to give four fractions with monitoring by thin layer chromatography on the detection under UV light The fractionated one (8.57 g) was successively chromatographed on silanized silica gel (MeOH-H₂O 4:6 V/V) and further on silica gel (CHCl₃-MeOH-H₂O, 10:1:0.1 V/V) to give two fractions of A (543 mg) and B (1.18 g) Fraction B was followed again by the column chromatography on LiChroprep Rp-8 (MeOH-H₂O 65:35 V/V) and preparative HPLC (NOVA-PAK C₁₈-Radial Pak acetonitrile-H₂O 48:52 V/V) to yield AH₁₉^{*}) (70.3 mg) as a white powder from n-hexane-AcOEt (1:1 V/V) AH₁₉ was subjected to the recycle preparative gel partition chromatography (column JAIGEL-310 elution MeOH 4.0 ml/min) to separate it into two constituents AH_{19a} (4) and AH_{19b} (5) Isolated 4 (14.3 mg) and 5 (17.4 mg) were obtained as a white powder from AcOEt-MeOH (1:1 V/V)
- *) It turned out that AH₁₉ was a mixture of two compounds of tri-2-(2-phenylethyl)chromones in the ¹H-NMR spectrum, showed six signals of singlet (3-H) at δ 6.0 to 6.2
- 5) K Iwagoe T Konishi, S Kiyosawa Y Fujiwara, and Y Shimada Abstracts of Papers the 108th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Hiroshima April 1988 p 343

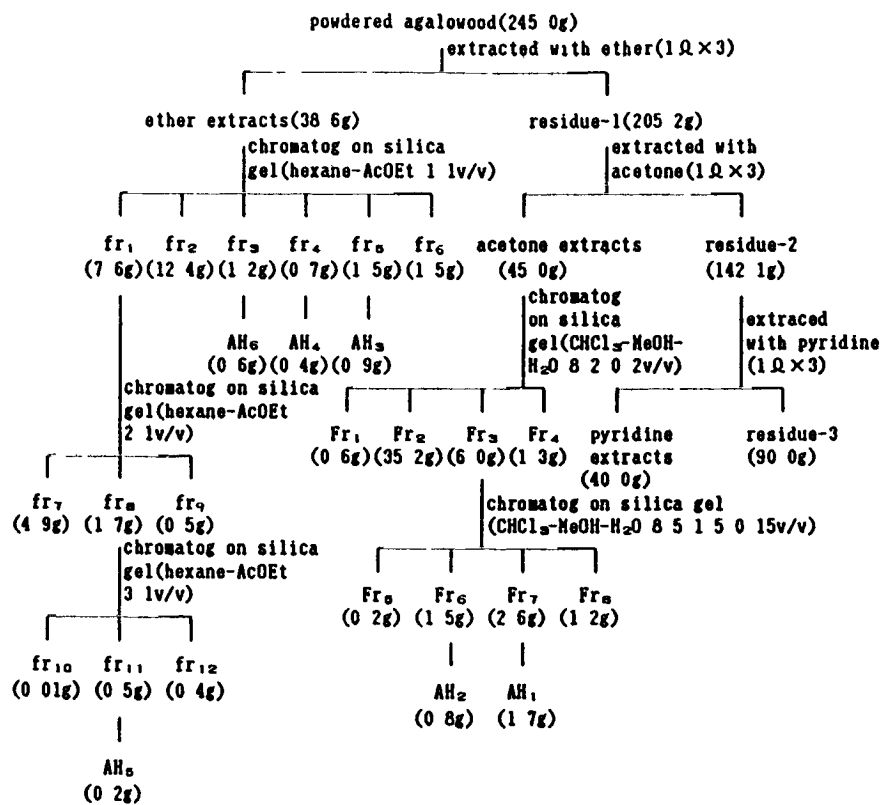
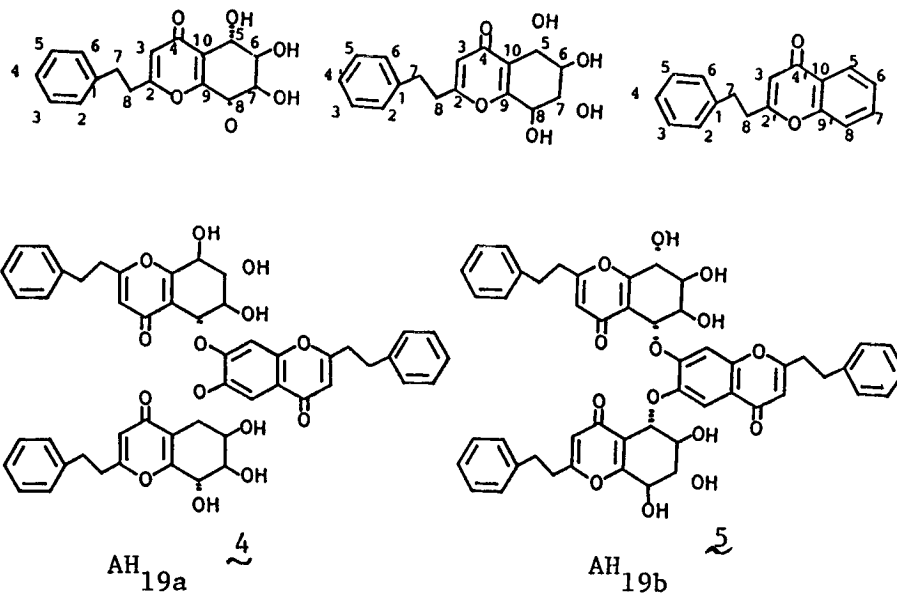
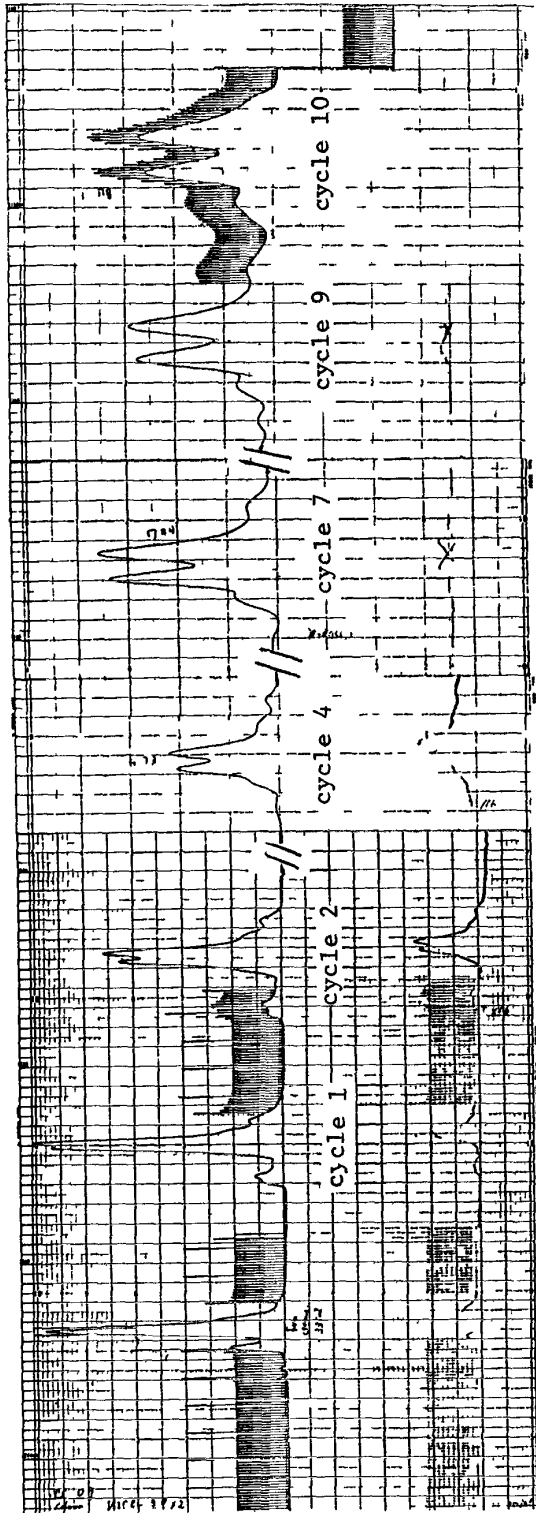


Chart 2



Recycled Preparative HPLC of Crude AH 19



HPLC Conditions
Instrument LC-09, Column JAIGEL 310 (20x500 mm) x2
Eluant MeOH, Flow Rate 4.0 ml/min
Injection Vol 3 ml Conc 70 mg/3 ml
Detector UV(210 nm) and RI

4 euglobals

我々はユーカリノキ, *Eucalyptus globulus* から生理活性を有する12種の新規化合物 euglobal類を単離し 構造を決定した 活性画分は構造が極似している物質の混合物のため 各化合物の単離は困難を極めたが 結局 中圧の逆相カラムを用いて二分画した後 各画分はODSカラムを用いたHPLCを繰り返して 今までに12種のeuglobal類を得ている 最近 我々は他のユーカリ属植物に含まれるeuglobal類をLC/MSを用いて効率良く分析する方法を発表した 更にその分析結果から新物質の効率の良い単離法を検討中である

M Kozuka T Sawada E Mizuta, F Kasahara T Amano, T Komiya, M Goto Chem Pharm Bull 30, 1964 (1982)

T Amano T Komiya, M Hori, M Goto M Kozuka T Sawada J Chromatogr 208 347 (1981)

M Kozuka K Hashimoto, M Takasaki T Konoshima Y Katoh T Amano Abstracts of Papers p 205 The Japanese United States Congress of Pharmaceutical Sciences Honolulu Hawaii 1987

M Takasaki, K Hashimoto, M Kozuka T Konoshima, Y Katoh, Abstracts of Papers International congress on Natural Products Research Park City, Utah 1988

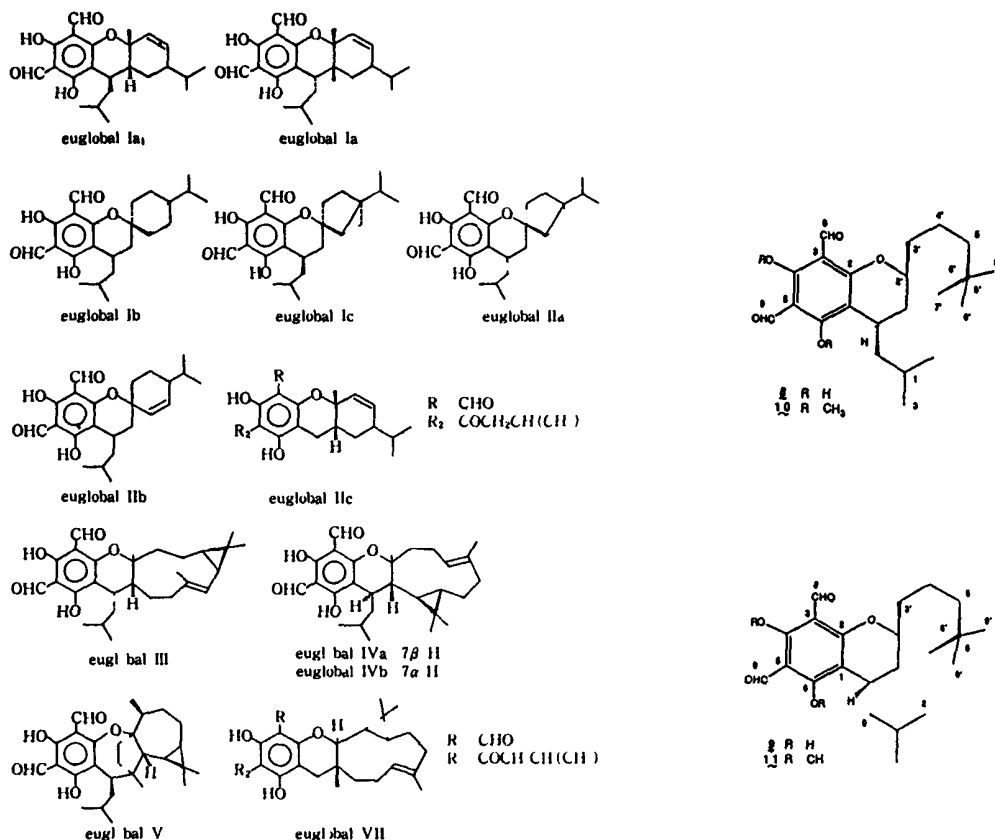


図 4 18 Euglobal 類の構造

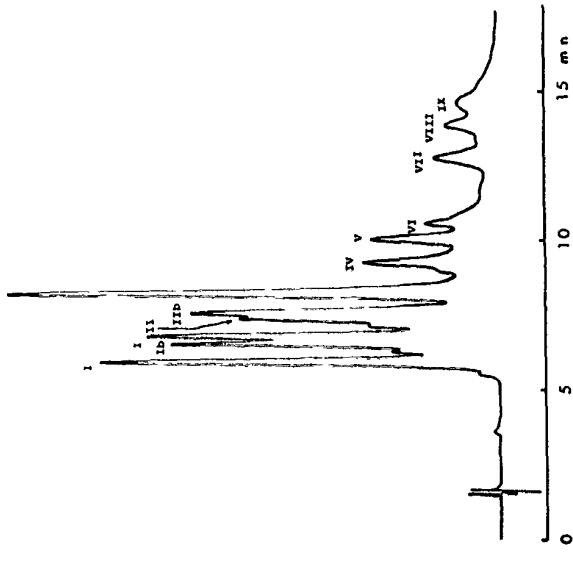


Fig. 1 High performance liquid chromatogram of fraction 18-21. Column Zorbax-ODS (250 x 4.6 mm) mobile phase: methanol-acetic acid-water (100:5:3) flow rate 1.7 ml/min sample 20 µg of fraction 18-21 in 5 µl of methyl acetate-methanol (1:1) detector UV (280 nm) 0.05 a.u.f.s.

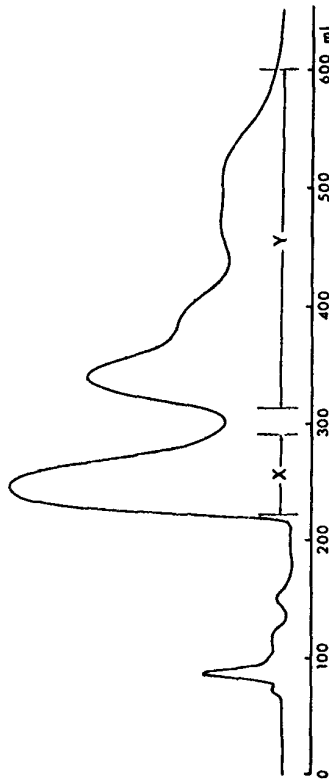


Fig. 2 Rough separation of fraction 18-21. Column, LiChrorep RP-8 (310 x 25 mm) mobile phase acetonitrile flow rate, 2.4 ml/min sample, 50 mg of fraction 18-21 in 1 ml of methyl acetate-acetonitrile (1:1) detector UV (254 nm)

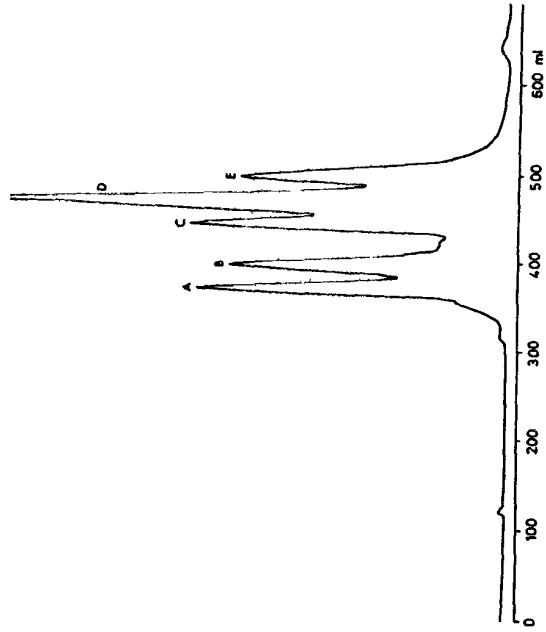


Fig. 3 Preparative liquid chromatogram of fraction X. Peaks: A = euglobal Ia, and Ia₂, B = euglobal Ib, C = euglobal Ic, D = euglobal IIb and IIc, E = euglobal IIa. Column TSK LS410KG (500 x 21.5 mm) mobile phase acetonitrile flow rate 14.9 ml/min sample 30-50 mg of fraction X in 2 ml of methyl acetate-acetonitrile (1:1) detector UV (254 nm) 1.28 a.u.f.s.

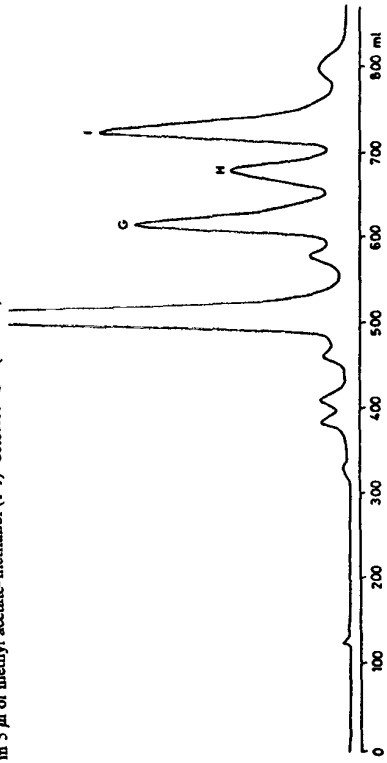
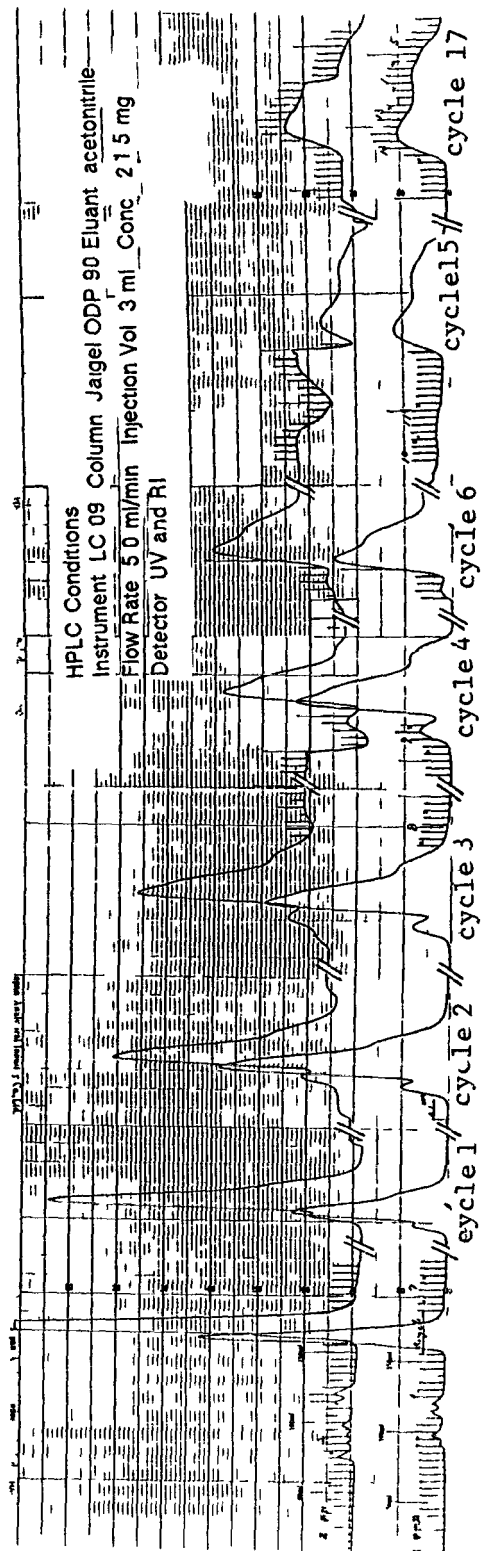


Fig. 4 Preparative liquid chromatogram of fraction Y. Peaks: F = euglobal III, G = euglobal IV, H = euglobal VII and IX, I = euglobal V and VIII. Conditions as in Fig. 3

Recycled Preparative HPLC of Euglobal Ia and Euglobal Ib (1)



Recycled Preparative HPLC of Euglobal Ia and Euglobal Ib (2)

