[薬 学 雑 誌
YAKUGAKU ZASSHI
87 (6) 712 ~ 718 (1967)]

UDC 547.92.04 : 543.544.2

125. 小松曼者,*¹ 岡野定輔*²: シリカゲルの溶出乾式カラムクロマト
グラフィーによるブホステロイドの分離

Manki Komatsu*¹ and Teisuke Okano*²: Separation of Bufo-steroids
by Eluting Dry Column Chromatography on Silica Gel.

(Research Laboratory, Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.*¹ and Pharmaceutical
Institute, Tohoku University School of Medicine*²)

Column chromatography of bufo steroids over silica gel by the dry method was examined. The use of acetone-cyclohexane mixture, which showed good separability in thin-layer chromatography, as the developer effected much better and faster separation than by the hitherto used wet method. Column chromatography of bufo steroids was found to be much better over silica gel than alumina from the point of stability. Recovery rate of resibufogenin from dried toad venom by the present method was approximately quantitative.

(Received October 13, 1966)

ブホステロイドの分離には、一般にアルミナによる湿式カラムクロマトグラフィー^{1,2)}が用いられ有効な手段となっているが、センソ抽出物のように多成分の類似体混合物を分離するためには、粗分画の後さらにクロマトグラフ分画を繰り返して目的物を単離しなければならず、また溶出剤を切り換え勾配展開する必要があり、その適切な操作については熟練を要し、しかも分画完了までに長時間を要し、装置・操作を一定条件に保持しなければならないなどの欠点がある。

また Iseli 等³⁾は、日本産蟾蜍外皮のブホステロイドを、部分的にベンゼン、クロロホルム、2-プロパノールなどの溶剤を用いるシリカゲルの湿式法により分画しているが、その分離は悪く適切な方法とはいえない。

さきに著者等^{3,4)}は、ブホステロイドの薄層クロマトグラフィー (以下 TLC と略す) を検討し、適当な分離能を与える展開剤としてアセトン-シクロヘキサン系および酢酸エチル-*n*-ヘキサン系を報告したが、今回この TLC における溶剤系を用いてシリカゲルによる溶出カラムクロマトグラフィーを試みたところ、乾式法を採用することにより、従来のアルミナおよびシリカゲルの湿式法のいずれにもまさる迅速かつ良好なブホステロイドの分離が得られたのでここに報告する。

吸着剤量の検討 TLC の分離条件を溶出乾式カラムクロマトグラフィーに適用するためには、予備的な検討が必要であるが、分離に適当な吸着剤量については、いまだ明確な結論は得られていない。Loev 等⁵⁾は、この問題を取り上げ、乾式カラム上アゾベンゼン混合物をベンゼンで展開・分離することを試みた結果、試料に対して吸着剤は、300~500 倍必要であると報告している。著者等も、熱検出自動液体クロマトグラフィーによる resibufogenin と bufalin の分離・定量を検討⁷⁾した際、TLC でブホステロイドの全分離に有効なアセトン-クロロホルム-シクロヘキサン (3:3:4) を用い、約 500 倍の吸着剤を要することを認めた。しかし、多成分混合物の分画における適用性については未検討であるため、試料にセンソのクロロホルム抽出物 7.5~15 mg. を用い、含有量も多くしかも薬学的に興味のある resibufogenin, cinobufagin, bufalin, bufotalin, cinobufotalin, gamabu-

*¹ Takada-3-chome, Toshima-ku, Tokyo.

*² Kita-4-bancho, Sendai.

1) K. Meyer: Pharm. Acta Helv., **24**, 222 (1949); J.-P. Ruckstuhl, K. Meyer: Helv. Chim. Acta, **40**, 1270 (1957); P. Hofer, K. Meyer: *Ibid.*, **43**, 1495 (1960).

2) 大野, 大本: 本誌, **81**, 1341 (1961); 大野, 小松, 大本: *Ibid.*, **81**, 1345 (1961).

3) 小松, 釜野, 鈴木: 分析化学, **14**, 1049 (1965).

4) 小松, 岡野: 分析化学, **15**, 1115 (1966).

5) E. Iseli, M. Kotake, Ek. Weiss, T. Reichstein: Helv. Chim. Acta, **48**, 1093 (1965).

6) B. Loev, K. M. Snader: Chem. & Ind. (London), **1965**, 15.

7) 小松, 岡野: 分析化学, **16**, 118 (1966).

fotalin および telocinobufagin の7種の分離に重点をおいて、シリカゲルおよび TLC の展開剤による検討を行なった。試料に対し、500, 1000 および 2000 倍量の吸着剤を用い、TLC において比較的分離のよいアセトン-シクロヘキサン (3:7) で展開した時の分離状態は Fig. 1 のとおりである。

Fig. 1. Separation of Bufo-steroids by Eluting Dry Column Chromatography Elution with Acetone-Cyclohexane (3:7)

Column: $0.8\phi \times 109$ cm., Sample: chloroform-extract of toad cake (7.5, 15, 30 mg.).
Adsorbent: WAKOGEL C-200 15 g., 1 fraction: 3 ml.
S: sterol, R: resibufogenin, C: cinobufagin, B: bufalin, Cbt: cinobufotalin, Bt: bufotalin, T: telocinobufagin, G: gamabufotalin.

すなわち、500 倍では明らかに分離不良であるが、1000 倍ではやや良好となり、2000 倍では cinobufagin と bufalin とが 1 フラクションだけ重なるのみで他は完全に分離する。TLC でも cinobufagin と bufalin とは重なるから、アセトン-シクロヘキサン (3:7) における適当な吸着剤量は 1000 倍以上といえる。また Rf 値は

Fig. 2. Separation of Bufo-steroids by Eluting Dry Column Chromatography Elution with Acetone-Chloroform-Cyclohexane (3:3:4)

Column: $0.8\phi \times 109$ cm., Sample: chloroform-extract of toad-cake (7.5 mg.)
Adsorbent: WAKOGEL C-200 15 g., 1 fraction: 1 ml.
symbols for bufo-steroids are the same as in Fig. 1.

接近するが全ブホステロイドの分離に適するアセトン-クロロホルム-シクロヘキサン (3:3:4) では、Fig. 2 に示すように 2000 倍で TLC と同じような分離が得られ、Rf 値は大きくなるが bufotalin と cinobufotalin とがよく分離する酢酸エチル-*n*-ヘキサン (9:1) でも、Fig. 3 に示すように 2000 倍で TLC と同じ結果が得られた。すなわち、TLC における展開剤をそのまま用いて市販のシリカゲルによる溶出乾式クロマトグラフィーを行なう場合、ブホステロイドにおいては、約 2000 倍量の吸着剤が必要であることがわかった。

Fig. 3. Separation of Bufo-steroids by Eluting Dry Column Chromatography Elution with Ethyl Acetate-*n*-hexane (9:1)

Fraction, column, sample, adsorbent: the same as in Fig. 1.
symbols for Bufo-steroids are the same as in Fig. 1.

Fig. 4. Separation of Bufo-steroids by Eluting Dry Column Chromatography Elution with Acetone-Cyclohexane (1:4) and Acetone-*n*-hexane (1:4)

Fraction, column, adsorbent: the same as in Fig. 1.
Sample: chloroform-extract of toad-cake (60, 150, 300 mg.).
symbols for steroids are the same as in Fig. 1.

つぎに、これを実用的にするため、溶剤の混合を変え、吸着剤の倍率をさげる検討を行なったところ、アセトン-シクロヘキサン (1:4) では 50 倍量の吸着剤でよく分離した (Fig. 4). しかしこの場合、アセトンの減量に

より R_f 値の小さい極性ステロイドがテーリングを起こすから、漸次アセトンを増量することが望ましい。また TLC でアセトン-シクロヘキサン系とほとんど同様の分離を与えるアセトン-*n*-ヘキサン (1:4) 系による結果を

Fig. 5. Separation of Bufo-steroids through Column of Various Lengths

Fraction, adsorbent: the same as in Fig. 1.
sample: chloroform-extract of toad-cake (300 mg.)
symbols for bufo-steroids are the same as in Fig. 1.

再生シリカゲルの分離能 シリカゲルの再生には、使用済みのものをメタノールで洗い、ついで減圧下メタノールを留去後乾燥した。試料に resibufogenin と cinobufagin の混合物を用い、アセトン-*n*-ヘキサン (1:5)

Fig. 6. Separation of Bufo-steroids on Regenerated Silicagel

Adsorbent: WAKOGEL C-200, 15 g. ①=new silicagel, ③=regenerated silicagel (three times), ⑤=regenerated silicagel (five times)
Sample: mixture of resibufogenin and cinobufagin (300 mg.)
Column: 0.8 φ × 109 cm.
Solvent: acetone-*n*-hexane (1:5)
symbols for bufo-steroids are the same as in Fig. 1.

による分離能を再生3回および5回のシリカゲルと新しいものについて比較したのが Fig. 6 である。すなわち、再生5回の場合も両者はよく分離し新しいシリカゲルとほぼ同等の分離能を示した。

吸着剤の種類とブホステロイドの安定性 ブホステロイドは、ステロイド骨格の 17 位に α, β -不飽和 δ -ラクトン環 (α -ピロン環) を有するためにとくにアルカリに弱い、シリカゲルは酸性であるが、resibufogenin, cinobufagin, bufalin の3種を選び、クロロホルム-ベンゼン (1:1) およびアセトン-シクロヘキサン (1:5) 中でシリカゲルおよび中性アルミナを吸着剤とした場合のブホステロイドの安定性を試験した。その結果、シリカ

Fig. 4 に示す。すなわち、シクロヘキサンおよび *n*-ヘキサンのいずれを用いてもさしつかえない。

カラムの長さが分離に与える影響 以上はいずれも径 0.8 cm. × 長さ 109 cm. のカラムを用いての分離検討であるが、このカラムの長さは分離に影響を与え、 $\frac{3}{4}$ 程度に短縮しても分離はさして変化しないが、 $\frac{1}{2}$ にすると resibufogenin, cinobufagin および bufalin の3者が重なるなど、明らかに悪影響が現われた (Fig. 5).

一般に乾式法では吸着帯が斜めになったり波状になったりするために、溶出にあたってそれが影響し、結果的には湿式法に劣るとされているが、以上の検討結果からは分離良好な展開・溶出剤および一定以上の長さのカラムを使用すれば、ブホステロイドの分画に十分利用できることが示された。

Fig. 7. Thin-Layer Chromatograms of Decomposition Products of Bufo-steroids by Suspending Aluminum Oxide in Organic Solvent

Sample: symbols of bufo-steroids are the same as in Fig. 1, C'=decomposition products of cinobufagin (C-1: reddish purple, C-2: pinkish purple), R'=decomposition products of resibufogenin (R-1: light blue, R-2: brown), B'=decomposition products of bufalin (B-1: brown, B-2: brown).

Solvent system: acetone-chloroform-cyclohexane (3:3:4).

Plate: silicagel G.

Indicator: conc. H_2SO_4 .

ゲルでは 10 日間の観察で上記 3 種の プホステロイドは安定で、なんら変化を受けないが、アルミナの場合は resibufogenin および bufalin が 1 日で、cinobufagin は 3 日目で変化を受け、分解生成物が検出された。分解生成物の TLC を Fig. 7 に示す。

すなわち、プホステロイドは、シリカゲルに対しては安定であるが、アルミナでは変化を受けることが明らかであり、したがって TLC のように短時間の操作にアルミナを用いるのはさしつかえないが、溶出カラムクロマトグラフィーには不適當で、従来のアルミナ・カラムクロマトグラフ分画による プホステロイドの成分研究なども再検討を要するものと思われる。

センソ・クロロホルム抽出物の溶出乾式カラムクロマトグラフィーによる分離 基礎的条件の検討で得られた以上の結果をもとにして、センソのクロロホルム抽出物 10 g. を用い、溶出乾式カラムクロマトグラフィーを行なった。その結果を Table I に示す。なお各溶出区分は既報³⁾の TLC により判定した。

TABLE I. Separation of Bufo-steroids of Chloroform-extract of Toad-cake by Eluting Dry Column Chromatography

Fraction No.	Solvent	Yield (g.)	TLC ^{a)}
1	acetone-cyclohexane (1 : 5)	0.373	S
2~4	"	0.100	x_1
5~10	"	2.735	R
11~13	"	0.453	C
14~15	"	2.636	C, B
16~20	"	0.793	B
21~25	"	0.005	x_4
26~30	"	0.334	Cbt
31~32	"	0.307	Cbt, x_6 , Bt
33~35	"	0.296	Bt
36~42	"	0.268	T
43~46	"	0.162	T, G, Dbt
47~48	"	0.084	Dc, G
49~54	acetone-cyclohexane (1 : 3)	0.477	G
55~57	acetone	0.388	G, H
58~63	MeOH	0.899	Dcbt, x_{12} , etc.
Total		9.707	
Recovery		97.07%	

a) symbols for bufo-steroids are the same as in Fig. 1.

x_1 , x_4 , x_6 and x_{12} =unknown compounds⁸⁾ Dc=desacetylcinobufagin,

Dbt=desacetylbufotalin, Dcbt=desacetylcinobufotalin, H=hellebrigenin.

Fr. 5~10 の resibufogenin を少量のアセトンに溶かし、*n*-ヘキサンを加えて放置すれば板状結晶が析出する。2~3 回再結晶を繰り返すことにより、m.p. 157~160°, ²⁵[α]_D -0.4° (c=1.5, CHCl₃) を示し、Meyer⁸⁾ の報告の融点 (m.p. 113~140°/155~168°) と比較して純度が高いと思われる。このほか、cinobufagin, bufalin, cinobufotalin, telocinobufagin, gamabufotalin および未知物質 x_1 , x_4 さらに sterol を単離し得たが、このように 1 回のクロマト分画により高純度のプホステロイドが単離された例はみられない。しかし、極性の強い hellebrigenin, desacetylcinobufagin, desacetylbufotalin, desacetylcinobufotalin などの単離はなお検討の余地がある。

乾式法と湿式法の比較 同じ条件下で行なった乾式法と湿式法の溶出状態を Fig. 8 に示す。すなわち、湿式法は溶出に長時間を要するに反し、乾式法は短時間で分画が完了し、しかも分離がよい。湿式法の場合、当然勾配展開式に溶出剤を切り換える必要があるが、乾式法ではアセトン-シクロヘキサンの比率を (1 : 5) から (1 : 3) にかえる程度で十分である。また分画中溶剤が切れても分離に支障をきたさない。すなわち適当な条件さえ十分

*3) すべてこの実験で測定した融点は未補正。

8) H. Linde, K. Meyer: Pharm. Acta Helv., **33**, 327 (1958).

Fig. 8. Elution Curves of Bufo-steroids

— Dry column. ---- Liquid-flow column.

a, a': sterol; b, b': resibufogenin; c, c': mixture of cinobufagin and bufalin;
 d: cinobufotalin; e, d': mixture of cinobufotalin and bufotalin; f: bufotalin;
 g: mixture of telocinobufagin and gamabufotalin.

に選択できれば、アルミナの場合を含めた湿式法にまさる分離が、乾式法によって迅速かつ良好に得られる。

乾式法によるブホステロイドの回収率 Table II は、乾式法により分離された各ブホステロイドの収量と、センソ・クロロホルム抽出物の薄層クロマトグラムを直接デンストメトリーによって定量した結果とを比較したものである。このうち、resibufogenin の収量は、デンストメトリーによる結果によく一致し、5.5% も含有していることは興味ある事実である。

TABLE II. Yields of Bufo-steroids of Toad-cake in Eluting Dry Column Chromatography

Bufo-steroids	Yields (%)	Yields by densitometry ^{a)} (%)
Sterol	0.74	1.0
Resibufogenin	5.5	4.8
Cinobufagin	0.91	5.6
Cinobufagin and bufalin	4.1	—
Bufalin	1.6	2.4
Cinobufotalin	0.67	0.7
Cinobufotalin and bufotalin	0.6	—
Bufotalin	0.59	1.0
Telocinobufagin	0.54	0.26
Telocinobufagin and gamabufotalin	0.32	—
Gamabufotalin	1.1	0.6

a) results by direct densitometry on thin-layer chromatograms⁴⁾

センソから直接ブホステロイドの分離 つぎに、センソの微粉末を直接試料として充填し、そのままクロマトグラフ分画することによる抽出操作の省略、迅速な分離を検討した。まず板状センソの微粉末(200メッシュ以下)とシリカゲルの混合物をシリカゲルのカラム上に充填し、アセトン-シクロヘキサン(1:5)で展開し、さらに(1:3)で溶出したのが Fig. 9 (a) である。Fr. 55 付近までかすかに resibufogenin, cinobufagin, bufalin の各スポットが検出され完全分離しない。これは、おそらくセンソ粉末からブホステロイドが抽出される時間が長く、テーリングを起こしているものと思われるため、つぎに試料として板状センソの粉末をシリカゲルと混ぜ

たのち、数倍量のクロロホルム・メタノール(95:5)を加え、湯浴上で5時間煮沸後溶媒を留去し、十分乾燥した混合物を用い、前記と同一条件で展開・溶出したところ、Fig. 9 (b) に示すように、センソのクロロホルム抽出物 (Fig. 4, 8) におけると同様良好な分離結果が得られた。したがって、センソの抽出物を作製する必要はなく、数時間の溶媒処理だけで試料が準備できる。

以上の結果より、この方法は、センソの品質管理および各種属毒の成分研究に応用できると考えられる。

実験の部

溶 剤 カラムクロマトグラフィー、TLC の溶剤は、すべて市販の特級品を用いた。

吸着剤 シリカゲルはワコーゲル C-200 (和光純薬, 100~200 メッシュ, pH 5.3) を使用し、アルミナはメルク製 Brockmann アルミナ (100 メッシュ, pH 9.6) を下記のごとく脱アルカリして用いた。精製水で数回洗浄後 5~10% の HNO_3 で pH 6.5~7.0 とし、繰り返し熱精製水で十分洗って1夜放置。pH に変動のないことを確かめてから、汙過、MeOH 洗浄、風乾し、油浴上減圧下に 150~180°, 60~90 min. 活性化。かくして得られたアルミナは、Brockmann の検定法で活性度 III を示し、pH 6.8。

試 料 センソ抽出物は、市販の板状センソの粉末をソックスレー装置にて CHCl_3 抽出 (センソに対し 20% 得られる).⁴⁾ 200 メッシュのふるいで篩過してセンソ微粉末とした。

TLC すべて既報³⁾ と同様に操作し、ブホステロイドを同定。

Fig. 1). Column

Fig. 9. Direct Separation of Toad-Cake by Eluting Dry Column Chromatography

Sample: (a) powder of toad-cake, (b) powder of toad-cake treated with chloroform-methanol (95:5).

Fraction, Column, Adsorbent: the same as in Fig. 1.

Solvent: acetone-cyclohexane (1:5)

Symbols for steroids are the same as in Fig. 1.

溶出乾式カラムクロマトグラフィー Fig. 10 のごとき簡単な装置を組み立て、ワコーゲル C-200 をごく軽たく程度につめる。試料は少量の CHCl_3 またはアセトンに溶かし、その 1~3 倍量のワコーゲル C-200 を加えてよく混合し、常圧で溶媒を留去させ、十分乾燥させたものをシリカゲル・カラムの上部に平らに充填した。吸着剤の検討には、径 0.8 cm. × 長さ 109 cm. のカラムを、分画には径 4.5 cm. × 長さ 60 cm. のカラムを用いた。本実験では夜間上部に溶剤のない状態で放置し、翌朝あらたに溶剤を加えるようにした。

溶出湿式カラムクロマトグラフィー 常法に従い、シリカゲルと溶剤の懸濁液をクロマト管に充填し、試料液を静かに加えて展開・溶出した。乾式法との比較のため夜間は滴下を止め静置した。カラムは径 4.5 cm. × 長さ 60 cm. を使用し、試料液はセンソのクロロホルム抽出物 10 g. をアセトン-*n*-hexane (1:5) 2.5 L. に溶解した。

センソから直接ブホステロイドを分離する方法 板状センソの微粉末 (200 メッシュ以下) 600 mg. を同量のワコーゲル C-200 と混ぜ、数倍量の CHCl_3 -MeOH (95:5) を加え湯浴上 5 hr. 煮沸。そのまま常圧で溶媒を留去後減圧下に十分乾燥した混合物を試料とした。これをワコーゲル C-200 15 g. で準備したカラム (0.8 φ × 長さ 109 cm.) の上部に平らに充填し、アセトン-*n*-hexane (1:5) を用いて、上記溶出乾式カラムクロマトグラフィー法に従って溶出。

吸着剤の種類によるブホステロイドの安定性 resibufogenin, cinobufagin および bufalin の各 50 mg. を 2 ml. のアセトン-cyclohexane (1:5) に懸濁、それぞれにシリカゲルまたはアルミナを加え静置、TLC により本文中の Fig. 7 のごとき結果を得。benzene- CHCl_3 (1:1) の場合も同様に操作。

Sterol^{*1} Table I の Fr. 1 を MeOH で1回再結晶すると m.p. 144~146° となり、常法どおりアセチル化すると m.p. 133~135° を示す。

Resibufogenin Table I の Fr. 5~10 をアセトンで集め、*n*-hexane を加えて放置、板状晶を得。この方法で数回再結晶したものは、m.p. 157~160° を示し、本文に述べたごく Meyer の報告⁸⁾ のものより純粋であると思

*1 この sterol は, campesterol, β -sitosterol および cholesterol の混合物である。桜井, 吉井, 久保: 本誌, 84, 1166 (1964)。

われる。 $[\alpha]_D^{25} -0.4^\circ$ ($c=1.5$, CHCl_3). 常法により無水ピリジン, Ac_2O でアセチル化, m.p. $222\sim 225^\circ$ のアセテートを得. いずれも標品と混融, 融点降下を示さず, また TLC も一致.

Cinobufagin Table I の Fr. 11~13 を集め, アセトンから再結, m.p. $213\sim 215^\circ$. 常法によりアセチル化して m.p. $205\sim 206^\circ$. いずれも標品と混融して融点降下を示さず, TLC も一致.

Bufalin TLC で単一なフラクションは結晶で得られ m.p. $230\sim 235^\circ$ を示す. アセトンから再結後さらに MeOH から再結し, m.p. $230\sim 242^\circ$ のきれいな針状晶を得. アセテートは m.p. $235\sim 237^\circ$. いずれも TLC および混融で標品と一致.

Bufotalin Table I の Fr. 33~35 をアセトンで集め, アセトン-エーテルから再結後さらに MeOH から再結, m.p. $223\sim 225^\circ$ の針状晶. アセテートは m.p. $255\sim 258^\circ$. TLC および混融により標品と一致.

Cinobufotalin Table I の Fr. 26~30 はアマルハス, 少量のアセトンに溶解し数滴のエーテルを和し, デシケーター中に放置, 無色板状晶を得. 少量のアセトンから再結を繰り返して m.p. $260\sim 265^\circ$ の結晶を得. 常法どおりアセチル化して m.p. $216\sim 218^\circ$ の針状晶を得. いずれも TLC および混融により標品と一致.

Telocinobufagin Fr. 36~42 をアセトンで集めると結晶となり, 数回アセトンから再結を繰り返すことにより m.p. $150\sim 155^\circ/203\sim 209^\circ$ の針状晶を得. 常法どおりアセチル化して得られる結晶は m.p. $270\sim 275^\circ$ を示し, いずれも標品と混融し融点降下を示さず, TLC も一致.

Gamabufotalin Fr. 49~54 から結晶として得られる. 数回アセトンで洗い, MeOH から再結して m.p. $256\sim 260^\circ$ の板状晶を得. 常法どおりアセチル化して m.p. $252\sim 257^\circ$ の無色プリズム状晶を得. いずれも標品と混融して融点降下を示さず, TLC も一致.

x_1, x_4 Fr. 2~4 の未知物質は x_1 はアマルハス, TLC でさらに3つのスポットを示す. Fr. 21~25 の未知物質 x_4 は単一スポット (濃硫酸噴霧により黄色) を示す. いずれも既報³⁾の未知物質に一致.

本研究に当たり終始御鞭撻いただいた大正製薬株式会社常務取締役 井川俊一博士, 同社研究部長 田中一郎博士に深謝いたします. また実験に御助力願った同社研究部 釜野徳明, 山本博の両氏に謝意を表します.

大正製薬株式会社