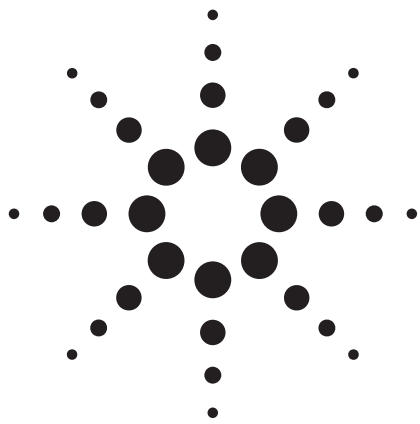




Agilent ZORBAX ソルベントセーバ HT (1.8 μ m) カラムによるサンソウニンに 含まれるサポニンの分析

アプリケーションノート

食品および漢方医学

著者

Rongjie Fu
Agilent Technologies, Inc.
412 Ying Lun Road
Pu Dong, Shanghai 200131
China

概要

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 LC カラムを使用して、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) により、サンソウニンの 2 つの主要な有効成分サポニンのジュジュボシド A および B を抽出し分析しました。まず従来の 4.6 mm $\times$ 150 mm、5 μ m カラムでメソッドを開発し、ZORBAX Eclipse Plus ソルベントセーバハイスループット (1.8 μ m) C18 カラム、3.0 mm $\times$ 50 mm、1.8 μ m 用にメソッドを変換しました。ソルベントセーバ HT カラムには、溶媒の消費量が少なく、分析が高速であるという利点があります。2 つの化合物の発色基は少ないので、エバポレーティブ光散乱検出器 (ELSD) を使用しました。これによる分析の結果、UV 検出器に比べ、感度が高くベースラインがきれいであることが分かりました。



Agilent Technologies

はじめに

2,500 年以上もの間、ナツメは食品や漢方薬として使用され、中国では肝機能を高める強壮剤として用いられています。ナツメは栄養価が高く美味でもあります。果実には、ビタミン A、B2、および C、サポニン、フラボノイド、糖分、ゴム糊、カルシウム、リン、および鉄が含まれています。17 世紀から欧州ではナツメが人体の各部、特に肺や腎臓に効果のある強壮剤であることが知られていましたが、西側諸国では薬効がないとしてナツメを捨てていました。[1]

ナツメの種子 (英語名 Spine Date Seeds) は、薬として使用されています。また、サポニン化合物は、チョウセンニンジンやサンシチニンジンなど多くの植物に含まれており、長年研究対象となっています。サポニン化合物はトリテルペン構造を持ち、トリテルペン類の多くには治療効果があることが実証されています。

動物実験により、ジュジュボシドには、抗不安作用と催眠作用があることが分かっており、条件反射の鈍化、多動抑制、および血圧低下の効果があります。[1] そのため、神経過敏、不眠症、不安症、浮腫、うっ血性心不全、喘息、および喉の病気の治療に使用されます。

サンソウニンに含まれる 2 つの主要なサポニン化合物ジュジュボシド A および B の構造式を図 1 に示します。これらの化合物には発色基が欠けており、紫外線 (UV) 検出器に対して十分なシグナルを生成できないため、このメソッドでは一般的検出器の ELSD を使用しました。

本アプリケーションノートでは、ZORBAX ソルベントセーバ RRHT カラム (3.0 mm × 50 mm、1.8 μm) によるジュジュボシドの分離を従来の ZORBAX カラム (4.6 mm × 150 mm、5 μm) での分離と比較しました。

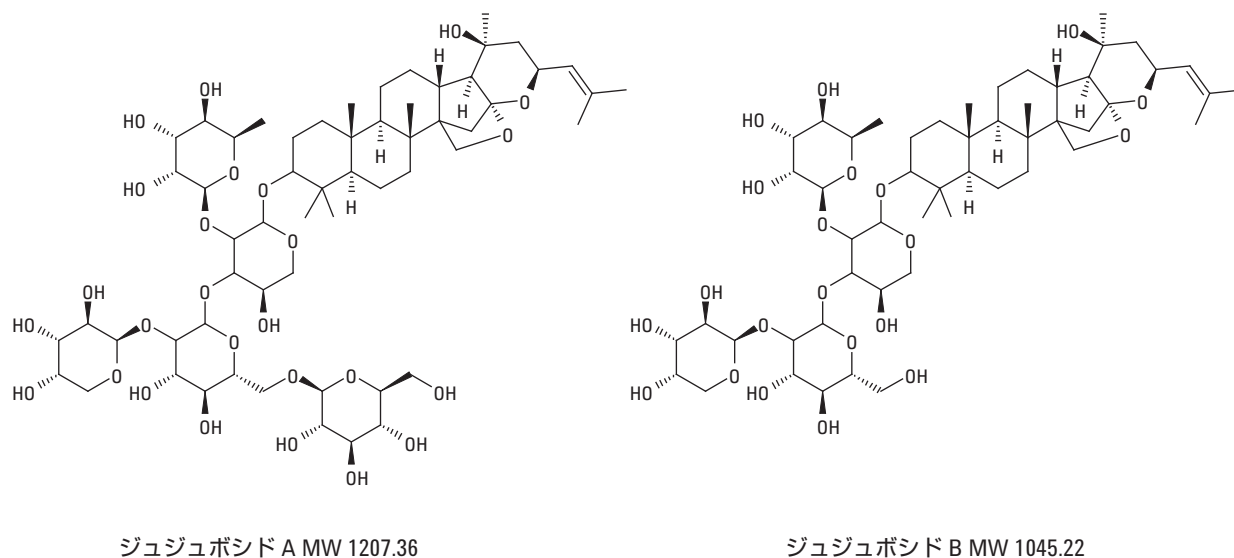


図 1. ジュジュボシドの構造式

実験

サンプル調製

サンソウニンは薬局 (Qun-Li TCM Pharmacy) で購入しました。サンプルは以下のように処理して、分析対象化合物を抽出しました。[2]

- 乾燥粉末 5.0 g を計量
- ソックスレー抽出器で 50 mL のエチルエーテルを使用して 4 時間脱脂
- 冷却後、ろ過して液相を捨て、残留物を乾燥
- 残留物を 250 mL の丸底フラスコに入れ、50 mL のメタノールを加えて、2 時間抽出
- 同じ手順を繰り返し、抽出物を混合
- 真空でメタノールを回収し、残留物に 20 mL の水を加えて溶解
- 15 mL の水飽和 n-ブタノールを使用して 3 回抽出し、抽出物を混ぜ合わせて、真空で乾燥
- 残留物を最大 5.0 mL のメタノールで溶かします。この最終サンプルを 0.45 µm の再生セルロース膜フィルタ (部品番号 5064-8221) でろ過してから、HPLC に注入して分析

HPLC 条件

HPLC 分析には、G1312B バイナリポンプ SL、G1376C オートサンプラ SL (ALS)、G1316B カラム恒温槽 SL (TCC)、G1316C ダイオードアレイ検出器 SL (DAD)、および G4218A 蒸発光散乱検出器 (ELSD) 等で構成された Agilent 1200 シリーズ Rapid Resolution LC (RRLC) システムを使用しました。

移動相:	35 % 水、65 % メタノール
流量:	1 mL/min (4.6 mm × 150 mm、5 µm の場合)、 0.4 mL/min (3.0 mm × 50 mm、1.8 µm の場合)
注入量:	5 µL (4.6 mm × 150 mm、5 µm の場合)、 2 µL (3.0 mm × 50 mm、1.8 µm の場合)
カラム:	ZORBAX Eclipse Plus C18、4.6 mm × 150 mm、 5 µm (部品番号 959993-902) および 3.0 mm × 50 mm、1.8 µm (部品番号 959941-302)
UV:	210 nm
TCC 温度:	30 °C
ELSD 温度:	40 °C
ELSD 圧力:	3.5 bar
ELSD ゲイン:	7
ELSD フィルター:	5s (4.6 mm × 150 mm の場合) および 2s (3.0 mm × 50 mm の場合)

結果と考察

図 2 に示すように、ZORBAX Eclipse Plus C18 カラム (4.6 mm × 150 mm、5 µm) を使用した ELSD 検出により、優れたピーク形状が得られ、2 つの化合物がうまく分離されました。このような複雑なサンプルマトリックスの場合、多くの潜在化合物の吸収は 210 nm 未満であるため、きれいなベースラインを得るのが困難です。UV 210 nm で検出した 2 つのターゲットピークは、マトリックス化合物から十分には分離できておらず、定量結果の潜在的なエラーとなってあらわれます。ELSD は UV 検出に比べて感度が高く、マトリックス分析対象物の影響が少ないきれいなベースラインが得られました。対象の 2 つのピークはベースライン分離されました。

ELSD は、UV 検出器に比べ、感度が高くきれいなベースラインが得られます。

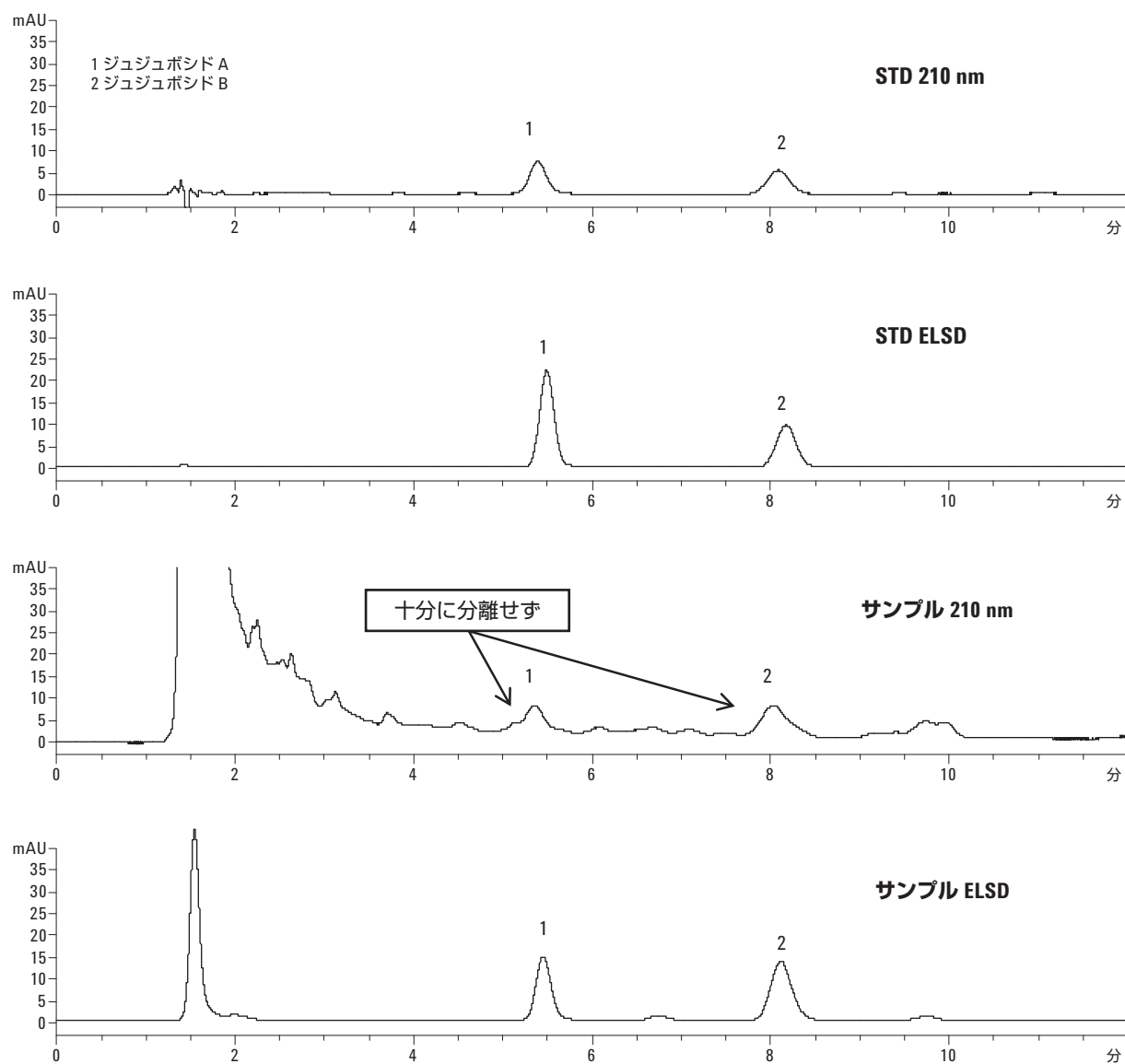


図 2. Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、4.6 mm × 150 mm、5 μm を用いた UV 210 nm/ELSD による標準試料およびサンプルのクロマトグラム

この分析で開発したメソッドは、分析時間が約 12 分で 1 回の注入で消費する溶媒量が 12 mL の通常のメソッドです。このメソッドは、ソルベントセーバ HT カラムに簡単に適用できるので、分析時間と溶媒消費量を節約できます (図 3)。

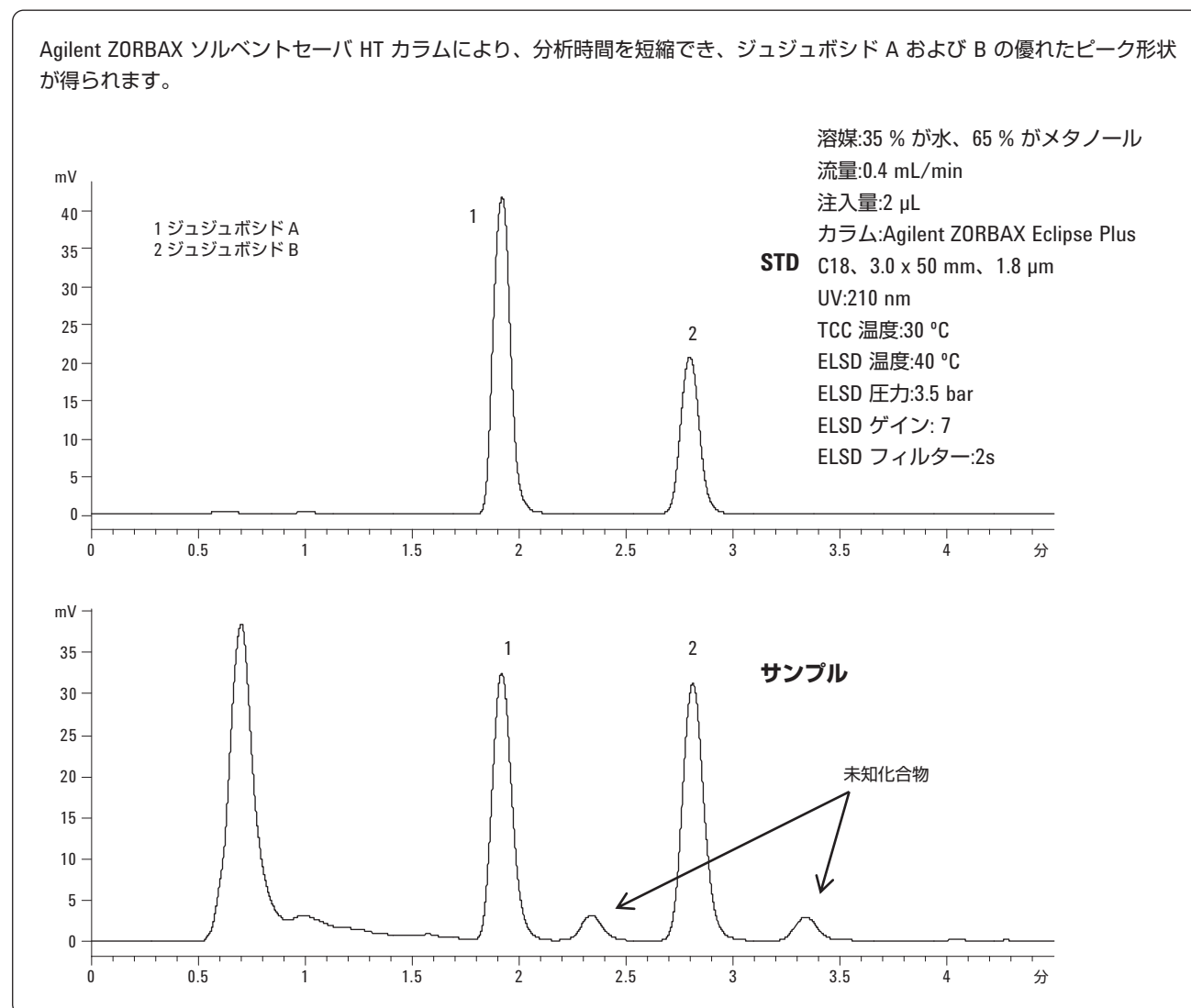


図 3. Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、3.0 mm $\times$ 50 mm、1.8 μ m を用いた ELSD による標準試料およびサンプルのクロマトグラム

図 4 は、4.6 mm × 150 mm および 3.0 mm × 50 mm のカラムに対する分析時間と溶媒消費量を比較したものです。4.6 mm × 150 mm で粒径 5 μm のカラムを 3.0 mm × 50 mm で粒径 1.8 μm のカラムに取り替えると、溶媒を 87 %、分析時間を 67 % 節約できます。ピーク 1 および 2 は、未知のサンプル化合物と同じ分離能を示しています。

3.0 mm × 50 mm カラム用のメソッドは、標準の LC 機器でも実行できますが [3]、余分なカラムボリュームを最小化するために、最適化が必要な場合があります。ELSD 検出器のパラメータも最適化が必要です。このメソッドのカラムを最初に 3.0 mm × 50 mm、1.8 μm のカラムに切り替える際、ELSD のパラメータはすべて変更しませんでした。ただし、3.0 mm × 50 mm のカラムを使用した場合の 2 つのターゲットピークの高さは、

4.6 mm × 150 mm、5 μm のカラムで得られたピーク高さと同じではありませんでした。その結果、ピーク 1 の理論段数は 2000 を超える程度の小さい値となり、ピーク 2 の理論段数は 4000 を超える値が得られました。そこで、ELSD の 2 つのパラメータを最適化しました。ELSD のサンプリングスピードを 2.5 Hz から 30 Hz に変更したところ、改善はわずかでした。ただし、フィルターの値を OFF、2、5、および 8 の間で調整すると、フィルターの値が小さいほど、理論段数が大きく増加しました。それと同時に、ベースラインノイズも増加しました。理想的な S/N 比を決定するために、フィルターの値は 2 に設定しました。この場合、ピーク 1 の理論段数は 5000 を超え、ピーク 2 では 8000 を超えます。図 4 に示すように、2 つのカラムの間で 2 つのピークの高さの一貫性が得られました。

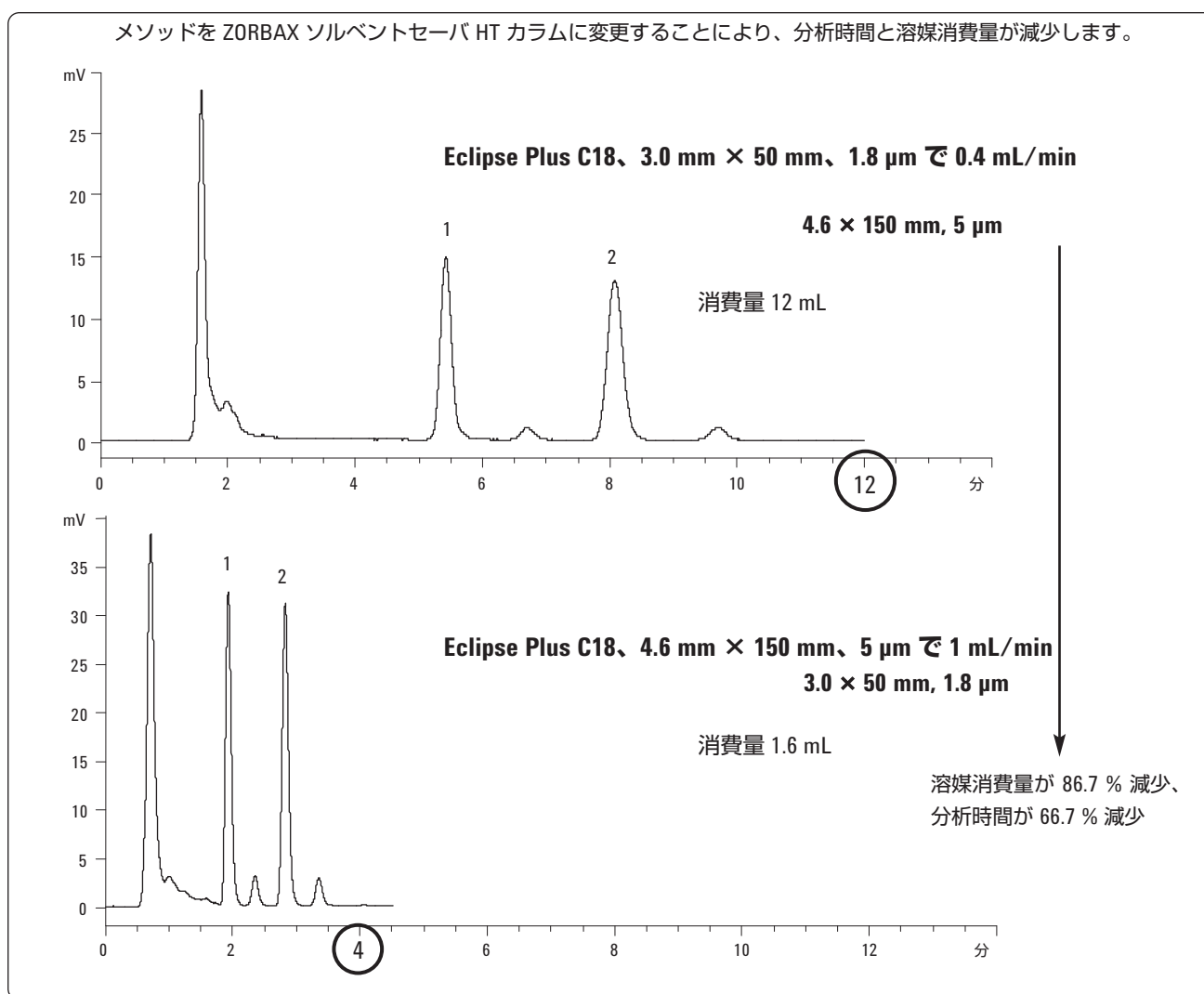


図 4. Eclipse Plus C18、4.6 mm × 150 mm、5 μm および Eclipse Plus C18、3.0 mm × 50 mm、1.8 μm で開発したメソッドの比較。

結論

ZORBAX Eclipse Plus C18 により、サンソウニンに含まれる分析対象の 2 つのサポニンのジュジュボシド A および B を簡単に分離でき、対称的なピークが得られます。3.0 mm (内径) のソルベントセーバカラム向けに開発したメソッドでは、溶媒消費量と分析時間を劇的に減少でき、サンプル処理数が増加しました。これらのサポニンを ELSD を使用して分離すると、きれいなベースラインと高い感度が得られるので、漢方医学などのマトリックスが複雑な化合物に最適な検出が実現できます。

参考文献

1. <http://www.mdidea.com/products/new/new029.html>, spine date seed
2. Li Huijun and Li Ping, "Determination of Jujuboside A and Jujuboside B in Spine Date Seed by HPLC-ELSD," Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2000,20(2): 82-84.
3. "LC Column for Reducing Solvent Use and Waste," Agilent Technical Overview, 5990-3972EN

詳細情報

アジレントの製品およびサービスの詳細は、弊社ウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Published in Japan
June 16, 2009
5990-4176JAJP



Agilent Technologies