

報 文

薄層クロマトグラフィー及び高速液体クロマトグラフィーによるたばこエキス中のソラネソールの定量

出来三男*

展開溶媒として, n - ヘキサン - 1, 2 - ジクロルエタン - アセトン (9 : 1 : 0.5v/v), 固定相にシリカゲル板を用いる TLC 法では, ソラネソールの R_f 値は 0.45 であり, 内部標準に用いた - トコフェロールとの分離も良好であった。各種濃度のソラネソールとスポットの面積との間には原点を通る直線関係があり, 变動係数は 0.65 ~ 5% であった。TLC の検出限界は 0.2 μg である。溶離液として, n - ヘキサン - イソプロピルエーテル (70 : 30v/v), 固定相に Zorbax - Sil(25cm × 2.1mm) を用いる HPLC 法では, ソラネソールの R_t は 12.9min であり, 対称性のよいピークとして現われる。 - トコフェロールを内部標準とした場合, 濃度比とピーク面積比との間には原点を通る直線関係があり, 絶対検量線法によると試料の前処理なしに定量できる。この方法による検出限界は 0.5 μg であった。実際試料についてソラネソールを定量し, TLC 法と HPLC 法の比較を行った。

1 諸 言

たばこ葉を溶剤抽出して得られるたばこエキスは, たばこレジノイドとしても知られており, 香料原料のほか, 医薬品製造用原料としての用途があり, わが国への輸入も多くなっている。このようなたばこエキスのなかには, 精油成分のほかニコチンを含むものもあるので, 關税率表分類上これらの成分の確認が必要な場合がある。

たばこ葉の化学成分については, たばこ香気への寄与の面から主として揮発性物質について研究されており, 多数の化合物が確認されている。^{1~9)}

ソラネソールはたばこエキスの不揮発性中性物質として, Rowland ら¹⁰⁾によって分離された非環式テルペノンアルコールであり¹¹⁾非共役のイソプレン単位はビタミン K 同族体の合成における原料として重要である。¹²⁾このイソプレン単位は化学的合成によても可能であるが, 経済的な面から最近ではほとんどたばこ葉に含まれているソラネソールに依存している。たばこ葉のソラネソール含有量は 1 ~ 2% といわれているが, この数値はソラネソールの定量法によってかなりの差がみられる。

Rowland ら¹⁰⁾はシリカゲル及びアルミニウムカラムクロマトグラフィーにより定量し, Flue - Cured Tobacco 中のソラネソール含有量を 0.4% としており, Ivanou ら¹³⁾も同様な方法により, ブルガリア産たばこ葉中に 0.3% 含有していると報告しているが, Billinsky ら¹⁴⁾はアルミニウムカラムクロマトグラフィーで分別後, 赤外分光法により定量し, ソラネソール類似物質として約 1 ~ 2.5% の値を示している。たばこエキスには, 脂質, ステロイド類をはじめとして, 多数の成分が含まれているのでこれらをカラムクロマトグラフィーにより完全に除去し, ソラネソールのみを単離することは困難であり, 赤外分光法を併用しても共存成分の影響を無視することはできない。薄層クロマトグラフィー (以下 TLC と略称) は, 多くの生体成分の分離定量法として広く利用されている方法であり, Woollen ら⁵⁾もこの方法によりソラネソールを迅速に定量できると報告している。一方, 高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC と略称) は, 不揮発性化合物の微量分析法として広く利用されるようになり,

* 大蔵省關稅中央分析所 271 千葉県松戸市岩瀬 531

とくに従来ガスクロマトグラフィーの利用が制限されていた生体成分及び医薬品分析の領域において、その有用性は高く評価されている。

ここでは、たばこエキス中の不揮発性化合物であるソラネソールを迅速に定量するため、TLC と HPLC による定量法について二・三検討し、得られた知見を報告する。

2 実験方法

2・1 試薬及び試料

ソラネソールは、たばこエキスから Rowland らの方法により調製し、メタノールにより再結晶を繰り返し精製した。精製したソラネソールの赤外吸収スペクトル、PMR 及び質量スペクトルは Fig.1 に示した。

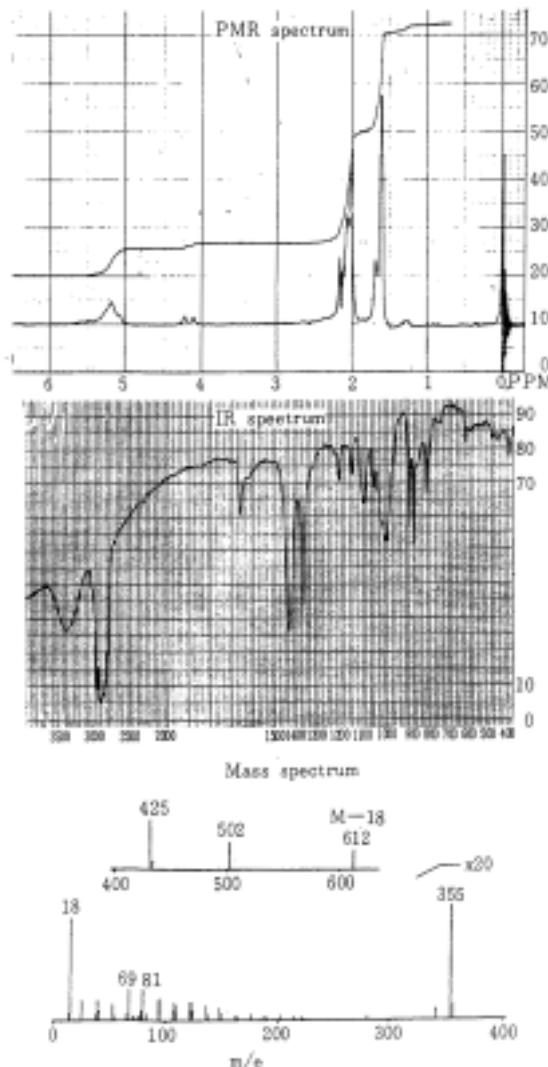


Fig. 1 IR, PMR and Mass spectra of solanescin

たばこエキス及びたばこレジノイドは、いずれも輸入品を用いた。

たばこエキス：タイワン産及びインド産のもので、ソラネソール採取を目的に n - ヘキサンで抽出したものである。

たばこレジノイド： Tobacco flavour , Tobacco Blond absolute , Tobacco turkish absolute

2・2 装置及び操作

高速液体クロマトグラフは、島津デュポン 830 型を用いた。カラムは内径 2.1mm、長さ 25cm のもので、充てん剤として Zorbax - Sil を用いた。ピークの検出は RI 法で行い、検知器の温度は 35 ℃、カラム槽温度は室温とした。

TLC では、シリカゲル薄層板（市販品、メルク製）を用い、展開溶剤は n - ヘキサン - 1, 2 - デクロロエタン - アセトン (9 : 1 : 0.5 v/v) を用いて上昇法により約 15cm 展開後、風乾したのち 5% 硫酸液を噴霧し、140 ℃、5 分間加熱して顕色させた。スポットの面積は島津二波長クロマトスキャナ CS910 を用いてジグザグスキャンして測定した。

この他、日立 225 型赤外分光器、島津 LKB - 9,000 質量分析計を用いた。

2・3 試料の前処理

たばこエキスには多数の成分が含まれているので、予め試料を鹹化し、ソラネソールを不鹹化物画分として抽出したのち、これをさらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分別した。すなわち、たばこエキス約 2g に 5% KOH - アルコール溶液 25ml を加え、これにベンゼン 25ml を加え逆流冷器をつけて沸騰浴中で 3 時間加熱したのち冷却し、約 50ml の水を加える。これを分液ろ斗に移し、n - ヘキサン 50ml ずつで 3 回抽出する。n - ヘキサン抽出物は窒素気流中で濃縮、乾固させ、残留物は n - ヘキサンに溶かし、10ml に定容する。つぎに、この 2ml をシリカゲルカラム（内径 1cm のガラス柱にシリカゲル 15g を n - ヘキサンを用いて湿式法により充てんしたもの）上に取り、はじめに n - ヘキサン、ついで 4 種類の n - ヘキサン - イソプロピルエーテル混液 (95 : 5, 90 : 10, 85 : 15, 80 : 20 v/v) の 20ml ずつで順次溶出し、これらの画分は捨てる。つぎに n - ヘキサン - イソプロピルエーテル (70 : 30 v/v) 混液 40ml で溶出し、この画分を分取する。これを窒素気流中で乾固したのち、n - ヘキサン - プロピルエーテル (70 : 30 v/v) 混液で 10ml に定容し検体とした。標準のソラネソールを用いて、この前処理による回収率を検討した結果、

98.9%であった。

3 結果と考察

3・1 TLCによる分離

たばこエキスでは、炭化水素、フィトール、ニコチンなど多数の成分が、ソラネソールのスポットと近接して現われ、Woollen ら¹⁵⁾の方法ではこれらの妨害成分とソラネソールとの分離は充分でない。そこで種々の展開溶媒について検討した結果、n-ヘキサン-1,2-ジクロロエタン-アセトン(9:1:0.5v/v)が最も良好な分離を示し、混在する成分とソラネソールのスポットとの重なりはないことを知ったので、以下の実験ではこの

溶媒を用いた。

香料原料として使用されているたばこレジノイドと医薬品製造用原料のたばこエキスのクロマトグラムは、よく類似しており、いずれの試料からも炭化水素、ステロイド類のほか、ニコチン及びソラネソールに相当するスポットが検出される。Fig.2 に示したように、試料を鹼化後、不鹼物について分離すると、スポットの数は減少するが、ソラネソールに近接するスポットは試料を直接分離した場合とそれほど差はない。不鹼化物をシリカゲルクロマトグラフィーにより n-ヘキサン-イソプロピルエーテル(70:30v/v)混液で溶出した画分では、炭化水素、脂質、ステロイドなどが除去されており、比較的単純なクロマトグラムを示している。

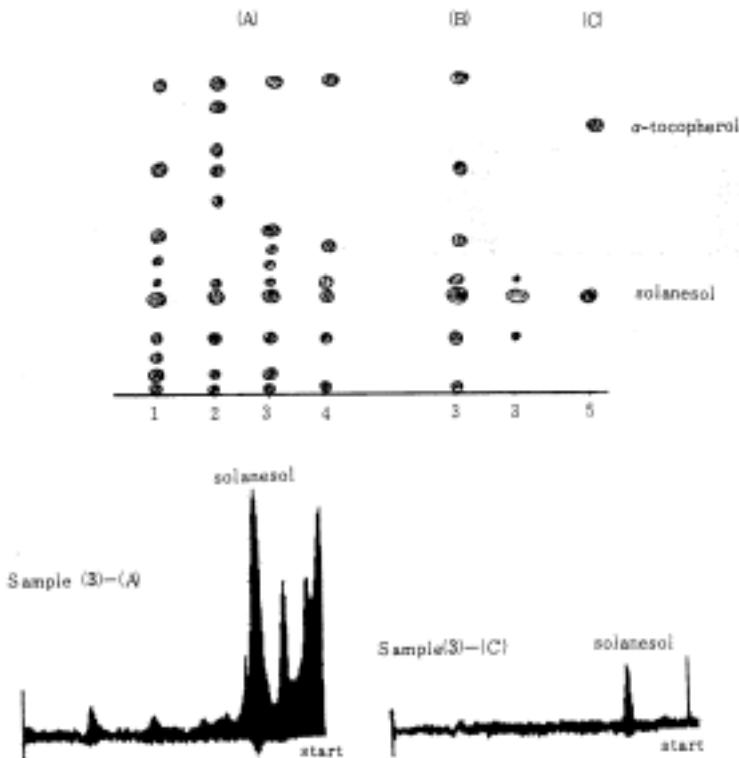


Fig.2 Chromatograms and their densitograms of tobacco extracts by TLC

(A): tobacco extracts, (B): unsaponifiable substance extracted from tobacco extract(3), (C): effluent fractionated from(B) by silica gel liquid chromatography.

(1): Tobacco blond absolute, (2): Tobacco flavour, (3): Tobacco extract, (4): Tobacco turkish absolute, (5): Authentic samples.

Solvent : n - hexane - 1, 2 - dichroloethane - acetone (9:1:0.5v/v) Colour development : 5% H₂SO₄ solution spray, 140°, 5 min.

3・2 TLCによる定量

絶対検量線法による定量は、薄層板に添加する試料の量、発色条件などの再現性に問題があるので、ここでは内部標準添加法による定量法を検討した。内部標準として種々の化合物について検討したが、 α -トコフェロールが使用できることを知ったソラネソールを 5~80mg の範囲で、それぞれ n -ヘキサン - イソプロピルエーテル (70 : 30v/v) 混液に溶かし、これに内部標準として α -トコフェロールの 40mg ずつを加え、全量を 20ml と

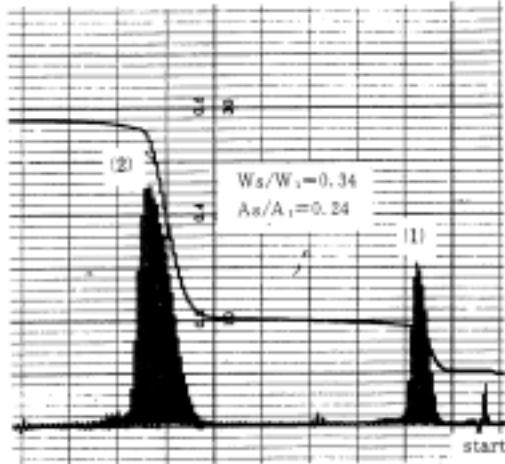


Fig.3 Densitogram of solanesol and α -tocopherol.
(1): solanesol, (2): α -tocopherol.
Conditions are same as cited in Fig.2.

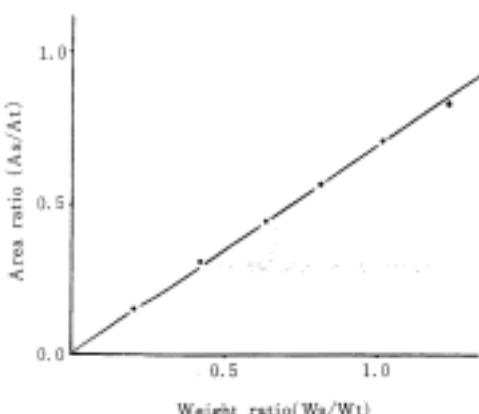


Fig.4 Calibration curve of solanesol by TLC
Conditions are same as cited in Fig.2.
As=area of sample, At=area of
 α -tocopherol, Ws=weight of sample,
sample, Wt=weight of α -tocopherol.

して標準液を調製した。このようにして調製した標準液を薄層板上に滴加し、 n -ヘキサン - 1, 2 - ジクロルエタン - アセトン (9 : 1 : 0.5v/v) を展開溶媒として約 15cm 展開させたのち、5% 硫酸液を均質に噴霧し、140°C, 5 分間加熱して発色させた。

Fig.3 に示したように、この条件によりソラネソール (R_f 0.45) と α -トコフェロール (R_f 0.80) の分離は良好であった。スポットの面積は二波長 (λ_{400nm} , λ_{700nm}) ジグザグスキャンナーによる積分曲線の高さから求めた。

5 回の繰り返し実験による平均値から、濃度比と面積比との関係をみると、濃度比 1.0 までは直線関係があった。また、各濃度比における再現性はよく、変動係数として 0.65%~5% の範囲である。実際試料について、この方法により定量した結果を Fig.4 に示した。

不純物をそのまま分離した場合は、シリカゲルクロマトグラフィーにより分別したものに比較してやや高い値を示している。シリカゲルクロマトグラフィーにおける回収率を考慮すれば、両者の定量値は近似している。この方法による検出限界は 0.2 μg であった。

3・3 HPLCによる分離

3・3・1 分離条件の検討

HPLCにおいて、カラム充てん剤の種類及び溶離液の選択は分析条件を決めるうえで重要なもののひとつである。たとこエキスのように多数の複雑な成分を含むものでは、試料の前処理はカラムの劣化を最少にするうえからも考慮すべきことである。ここでは、先の TLC の実験結果から、カラム充てん剤としてシリカゲル系の Zorbax-Sil を用い、溶離液には、試料の前処理において使用した n -ヘキサン - イソプロピルエーテル混液を用いて分

Table 1 Variation of capacity factor K' and HETP of solanesol and α -tocopherol as a function of the solvent composition

Solvent (% of isopropiylether in n -hexane)	K'		HETP	
	solanesol	α -tocopherol	solanesol	α -tocopherol
40	1.14	0.18	0.098	0.542
30	1.29	0.22	0.045	0.390
20	2.78	0.44	0.046	0.271
10	5.29	5.29	0.032	0.138
5	8.48	8.48	0.017	0.053

Column: Zorbax-Sil(25 cm X 3.1 mm), flow rate: 30 kg/cm²

析条件を検討した。

n-ヘキサンとイソプロピルエーテルの混合比が異なる溶離液によるソラネソールの溶出状態を Table1 に示した。イソプロピルエーテルの混合割合が高いものほど溶出速度は遅くなり、キャパシティー比 K' は大きくなる。また、理論段高さ (HETP) は *n*-ヘキサンの割合が多くなるほど小さくなる。一方、溶離液の流速とソラネソールの K' 及び HETP の関係をみると、Fig.5 に示したように、 $0.1\text{ml}/\text{min}$ 以上の流速ではいずれも、ほぼ一定の値を示している。このような傾向は、内部標準として用いた - トコフェロールについても認められた。このような結果をもとにして、分析条件を次のように設定した。すなわち、溶離液に *n*-ヘキサン - イソプロピルエーテル ($70:30\text{v/v}$)、流速 $0.1\text{ml}/\text{min}$ ($50\text{kg}/\text{cm}^2$)、検知器 RI (16×10^{-5})、検知器の温度 35、カラム槽温度は室温とした。この条件でソラネソールの保持時間は $R_t = 12.4\text{min}$ であり、- トコフェロール ($R_t = 7.0\text{min}$)との分離はよく、いずれも対称性のよいピークを示した。

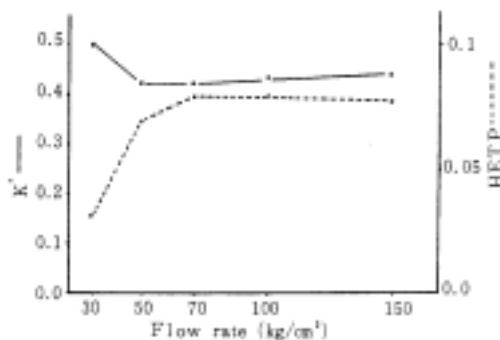


Fig.5 Effect of flow rate on K' and HETP for solanesol

Column : Zorbax - Sil (25cm X 2.1mm), Solvent : *n* - hexane - isopropylether ($70:30\text{v/v}$).

たばこエキスから分別した不鹼化物について分離した結果を Fig.6 に示した。いずれの試料からも数個のピークが検出され、ピーク No.3 はソラネソールの R_t と一致し、さらにこのピーク成分を分取し、質量スペクトルを測定して確認した。Tobacco blond absolute, Tobacco turkish absolute のクロマトグラムはよく類似しており、ソラネソールに近接していくつかのピークが現われている。なかでも、 $Rt=6.5\text{min}$ 付近に現われている炭化水素のピークは、内部標準に - トコフェロールを用いる場合には定量を妨害することになる。しかし、これらのピーク成分は、シリカゲルクロマトグラフィーによる前処理を行った試料では、ほとんど除去されていることがわかる。

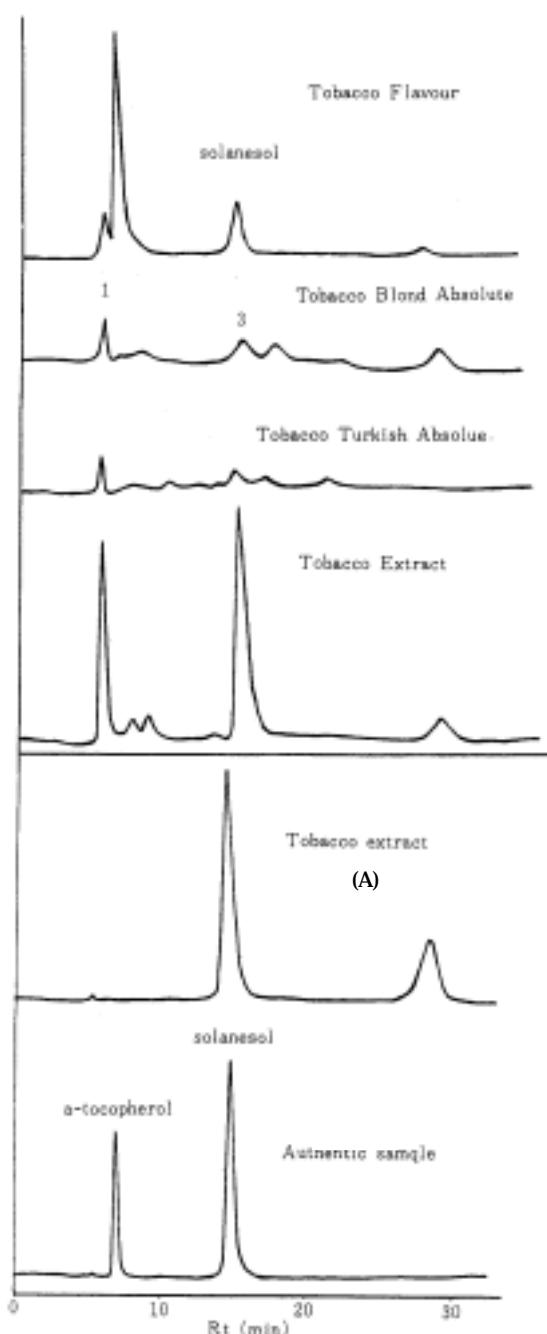


Fig.6 HPL Chromatograms of unsaponifiable substance from tobacco extracts

Column : Zorbax - Sil (25cm X 2.1mm), Solvent : *n* - hexane - isopropylether ($70:30\text{v/v}$), flow rate : $0.1\text{ml}/\text{min}$.

(A): eluate fractionated from tobacco extract by silica gel liquid chromatography.

3・3・2 HPLCによる定量

a) 内部標準法

ソラネソールを5~80mgの範囲で、それぞれn-ヘキサン-イソプロピルエーテル(70:30v/v)混液に溶かし、これに内部標準として-トコフェロール40mgを加えて全量を20mlとし、これを標準液とした。Zorbax-Sil(25cm×2.1mm)をカラムとし、n-ヘキサン-イソプロピルエーテル(70:30v/v)混液を溶離液とし、流速0.1ml/minの条件で各種濃度の標準液について分離した。ソラネソール及び-トコフェロールのピーク面積は半值幅法により求めた。3回の繰り返し測定の平均値について、面積比と濃度比との関係を分散分析法により検討した結果、両者の間には直線関係があり、この直線は原点を通ることを確認した。検量線はFig 7に示した。

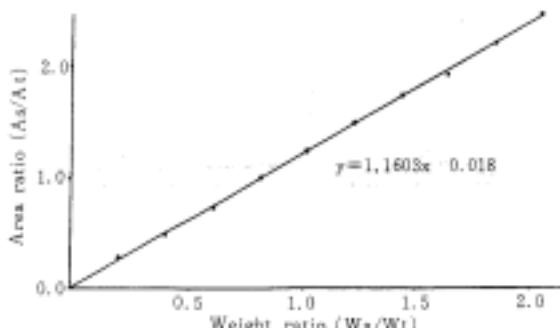


Fig 7 Calibration curve of solanesol by HPLC

Column : Zorbax - Sil (25cm × 2.1mm), solvent : n - hexane - isopropylether (70:30v/v), flow rate : 0.1ml /min.

Internal standard : - tocopherol.

As=area of sample, At=area of a - tocopherol, Ws=weight of sample, Wt=weight of - tocopherol.

b) 絶対検量線法

内部標準添加法は、溶離液の流速、カラム温度などの実験条件が多少変っても、検量線がそのまま使用できる利点はあるが、内部標準物質の選択が容易でないという欠点がある。試料の注入量を再現性よく行うことができれば、絶対検量線法によるのが簡便であるので、この点について検討した。ここで設定した実験条件下では、0.5~30μgの濃度範囲でソラネソールのHETP=0.045, K=0.39であった。そこでソラネソール11μgの標準試料について、注入操作によるピーク面積とピーク高の再現性について検討した。

Table 2 Precision of retention time, peak height and peak area

Exp. No	Rt(min)	Peak height(cm)	Peak area(cm ²)
1	12.90	2.32	0.696
2	12.86	2.30	0.690
3	12.86	2.33	0.699
4	12.90	2.34	0.702
5	12.88	2.30	0.690
av	12.88	2.32	0.695
σ	0.32	0.018	0.005
C (%)	0.25	0.78	0.77

Solanesol 11.0 μg, Column : Zorbax-Sil(25 cm × 2.1 mm), solvent : n-hexane-isopropylether(70:30 v/v), flow rate : 0.1 ml/min., detector : RI, 32 X 10⁻⁴ RIU.

Table 2 に示したように、5回の繰り返し注入によるRtの変動は少なく、ピーク面積、ピーク高さのバラツキも小さく、変動係数として0.8%以下という高い精度が得られた。このような良好な精度が得られる原因のひとつは、試料注入をセプタム方式とし、カラムフローを停止することなしに注入したことによるものと考えられる。

各種濃度のソラネソールをマイクロシリンジを用いて一定量注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積及びピーク高さの両者について検量線を作成した。Fig 8に示したように、ソラネソール濃度とピーク面積、ピーク高の間には直線関係があり、この方法により容易に定

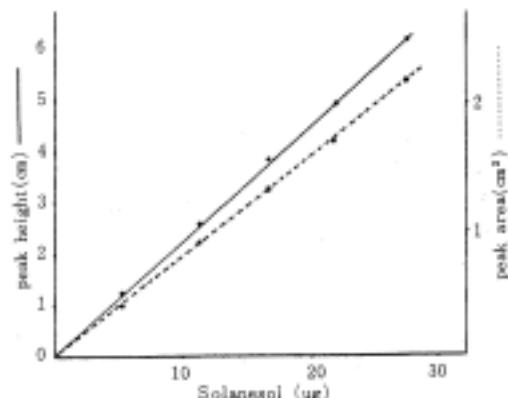


Fig 8 Quantitation of solanesol by peak height and peak area

Column : Zorbax - Sil(25cm × 2.1mm), solvent : n - hexane - isopropylether (70:30v/v), flow rate : 0.1ml /min.

量することができることを知った。なお、溶離液の流速は、各実験毎に一定にすることはできないので、絶対検量線法による場合は、定量分析ごとに、濃度既知の標準試料2種類を用いて検量線のチェックを行う必要がある。

3・3・3 実際試料の分析

数種の試料についてソラネソールの定量を行った。試料はあらかじめ酸化し、不酸化物をn-ヘキサンで抽出して検体とした。不酸化物を直接定量する場合には絶対検量線法を用い、不酸化物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより前処理した場合は、内部標準法によった。両方法の定量値は、ほぼ類似しており、HLCのカラム劣化を考慮しなければ、不酸化物を直接分離することにより迅速に定量できることを明らかにした。HCLとTLCの定量値を比較すると、HLCによる場合が、やや低い値になっているが、これは、試料の酸化、シリカゲルクロマトグラフィーによる分別などの前処理操作での

ソラネソールのロスによるものと考えられる。これらの定量結果はTable 3に示した。

4 要 約

TLC、及びHLCによりたばこエキスに含まれるソラネソールの定量分析法について検討した。ソラネソールは、シリカゲル薄層板を用い、n-ヘキサン-1,2-ジクロルエタン-アセトン(9:1:0.5v/v)を展開溶媒として展開したのち、5%硫酸液を噴霧、140°で加熱すると、明瞭なスポットを示す。脂質、炭化水素などのスポットがソラネソールに近接して現われるが、これらのスポットは、試料を酸化し、不酸化物を分取し、これをシリカゲルクロマトグラフィーにより分別溶出する操作で除去できる。このように前処理した試料について内部標準として-トコフェロールを用い、TLCにより定量すると、ソラネソールとピーク面積の間には直線関係が得られた。TLCの検出限界は0.2μgであった。一方、Zorbax-Silを固定相、n-ヘキサン-イソプロピルエーテル(70:30v/v)混液を溶離液に用い、HPLCにより分離すると、ソラネソールはRt=12minで溶出し、対称性のよいピークを示した。-トコフェロールを内部標準とした場合、ピーク面積比と濃度比との間には原点を通る直線関係があった。また、絶対検量線法においては、ソラネソール濃度1.0~30μgの範囲でピーク面積及びピーク高さとの間にも原点を通る直線関係があった。HPLCの検出限界は0.5μgであった。

数種の実際試料についてTLC法とHPLC法を比較したところ、HPLC法がやや低い値を示すが、両定量値の間には著しい違いはなかった。絶対検量線法によるHPLCでは、試料をあらかじめシリカゲルクロマトグラフィーにより前処理する必要がないので、迅速にソラネソールを定量できることを知った。

Table 3 Analytical results of solanesol in tobacco extracts

Sample Name	Solanesol (%)			
	HPLC method		TLC method	
	(A)	(B)	(A)	(B)
Solanesol	9.79	9.28	10.40	9.84
Tobacco flavour	2.46	2.76	2.70	2.12
Tobacco blond absolute	0.18	0.33	1.61	0.52
Tobacco Turkish absolute	0.47	0.47	0.70	0.87

Column: Zorbax-Sil(25 cm X 2.1 mm), solvent: n-hexane-isopropyl ether(70:30 v/v), flow rate: 0.1 ml/min., detector: RI, 32 X 10⁻⁴ RIU.

(A): unsaponifiable substance extracted from sample after saponification, (B): eluate fractionated from (A) by silica gel liquid chromatography.

文 献

- I. Onishi and K. Yamasaki, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **19**, 137 (1955).
- I. Onishi and M. Nagasawa, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **19**, 143 (1955).
- I. Onishi, H. Tomita, and T. Fukuzumi, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **20**, 61 (1956).
- I. Onishi and M. Nagasawa, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **21**, 38 (1957).
- I. Onishi and K. Yamasaki, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **21**, 82 (1957).
- I. Onishi and K. Yamasaki, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **21**, 177 (1957).
- I. Onishi, M. Nagasawa, H. Tomita and T. Fukuzumi, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **22**, 19 (1958).
- E. Demole and D. Berthet, *Helv. Chim. Acta*, **55**, 1866 (1972).

- 9) E. Demole and D. Berthet , Helv. Chim. Acta , **55** , 1898 (1972).
- 10) R. L. Rowland , P. H. Latimer and J. A. Giles , J. Ame. Chem. Soc. , **78** , 4680 (1956).
- 11) J. D. Grossman , R. M. Ikeda , E. J. Deszyck and A. Bavley , Nature , **199** , 661 (1963).
- 12) C. H. Schunk , R. E. Erickson , E. L. Wong and K. Folkers , J. Ame. Chem. Soc. , **81** , 5000 (1959).
- 13) I. Ivanov and I. Ognyanov , C. A. , **65** , 2645 (1966).
- 14) W. R. Bilinsky and L. Stedman , A. O. A. C., **45** , 532 (1962).
- 15) B. H. Woollen and D. H. Jones , J. Chromatogr., **61** , 180(1971).

Determination of Solanesol in Tobacco Extracts by Thin Layer Chromatography and High Pressure Liquid Chromatography

Mitsuo DEKI

Central Customs Laboratory, Ministry of Finance
531, Iwase, Matsudoshi, Chiba - ken,
271 Japan.

The determination of solanesol in tobacco extracts by TLC and HPLC were investigated. For the TLC method, the silica gel plate was developed in mixed solvent consist of n - hexane - 1, 2 - dich - loroethane - acetone (9:1:0.5v/v) which facilitated the separation of solanesol (*Rf* 0.45) from major interfering compounds in tobacco extracts and - tocopherol use as internal standard. HPLC method allows a rapid separation of solanesol with high resolution, reproducibility, and sensitivity within 13 minutes under the following conditions : column Zorbax - Si l(25cm × 2.1mm) ; eluent n - hexane - isopropylether (70:30v/v); flow rate 0.1ml /min. The column effluent was monitored by RI method. The limits of detection were 0.2 µg for TLC method, and 0.5 µg for HPLC method. The quantitative evaluation of solanesol, as evaluated by correlation of area ratio and concentrate ratio of solanesol to - tocopherol, shows lineality in both TLC and HPLC methods. The solanesol contents obtained by TLC method in tobacco extracts were slightly higher than those of by HPLC method. Although TLC offers preparative advantages, HPLC is highly reproducible and fast. Unlike TLC, HPLC allows for the determination of solanesol from tobacco extracts without preliminary column chromatography.

- Received Sep. 28, 1976 -