

HPLC法を用いたローヤルゼリー中の10-ハイドロキシ- δ -2-デセン酸の定量方法の検討

田中 順喜*, 立川 敦生*, 大嶽 秀之*, 武藤 辰雄*

Examination of a method to determine the quantification of 10-hydroxy-2-decenoic acid in royal jelly by HPLC

Junki TANAKA*, Atsuo TACHIKAWA*, Hideyuki OTAKE* and Tatsuo MUTOU*

*Nagoya Customs Laboratory

2-3-12, Irifune, Minato-ku, Nagoya, Aichi 455-0032 Japan

Presently, gas chromatography (GC) method is generally used for analyzing royal jelly in the Customs. For the quantitative determination of 10-hydroxy- δ -2-decenoic acid, the GC method is considered to be more complicated and requires greater technical skill. Therefore, we examined the use of high performance liquid chromatography (HPLC) for quantification of 10-hydroxy- δ -2-decenoic acid instead of the GC method. We found that the HPLC method can be used for the determination using suberic acid as the internal standard material, which simplifies the experimental procedures without trimethylsilylation.

1. 緒 言

ローヤルゼリーは、働き蜂から分泌されたもので、栄養補助食品、化粧品などに利用されており、かつ滋養強壮効果があることから厚生労働省が一般用医薬として承認している。ローヤルゼリーは、特段の調製・加工をしたもの除き、関税率表第30.01項の医薬品に分類される。一方、同表第04.09項のハチミツに栄養効果を高めるため、ローヤルゼリーを加えた調製品は同表第21.06項の調製食料品に分類され、これらの税率格差は大きい。

ローヤルゼリーは、特異成分として10-ハイドロキシ- δ -2-デセン酸（以下、HDAといふ。）を含有しており、ローヤルゼリーか調製されたものかの判断において、その確認を行うことは重要である。

税關においてHDAの定量は、ガスクロマトグラフィーによる内部標準法（以下、GC法といふ。）を用いて行なっているが、HDAを溶剤で抽出後に蒸発乾固し、更にHDAをTMS化剤と反応させて誘導体化する操作が必要である。

本研究では、簡便なHDAの定量方法として、誘導体化操作を必要としない高速液体クロマトグラフィーによる内部標準法（以下、HPLC法といふ。）について検討した。

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

生ローヤルゼリー（中国産）、乾燥ローヤルゼリー（中国産）エイコサノール（一級、片山化学工業）スペリン酸（シグマアルドリッヂ）N,O-ビス（トリメチルシリル）アセトアミド（関東化学）クロロトリメチルシラン（シグマアルドリッヂ）10-ハイドロキシ- δ -2-デセン酸（アルフレッサファーマ）

2.2 装置及び測定条件

2.2.1 高速液体クロマトグラフ（HPLC）

装置：LaChrom ELITE（日立ハイテクノロジーズ）

カラム：LaChrom C18（4.6 mm×250 mm）

（日立ハイテクノロジーズ）

カラム温度：50°C 流量：0.75 ml/min

移動相：メタノール/50 mM リン酸緩衝液（pH=2.8）（50/50）

検出器：ダイオードアレイ検出器

（日立ハイテクノロジーズ L-2455）

測定波長：210 nm 注入量：10 μl

2.2.2 ガスクロマトグラフ（GC）

装置：GC-2014（島津製作所）

カラム：HP-5（30 m×0.25 mm×0.25 μm）（Agilent Technologies）

カラム温度：200°C 注入口温度：250°C

* 名古屋税關業務部 〒455-0032 愛知県名古屋市港区入船2-3-12

キャリアーガス：窒素ガス

流量：9.6 ml/min 注入量：1 μl

検出器：水素炎イオン化検出器

2.3 定量方法

以下の定量方法は、税関分析で用いられている GC 法¹⁾及び中陳らの方法²⁾を参考にし、HDA の定量を行った。

2.3.1 定量の概要

Fig.1 のフローチャートに従い、GC 及び HPLC で HDA の定量を行った。

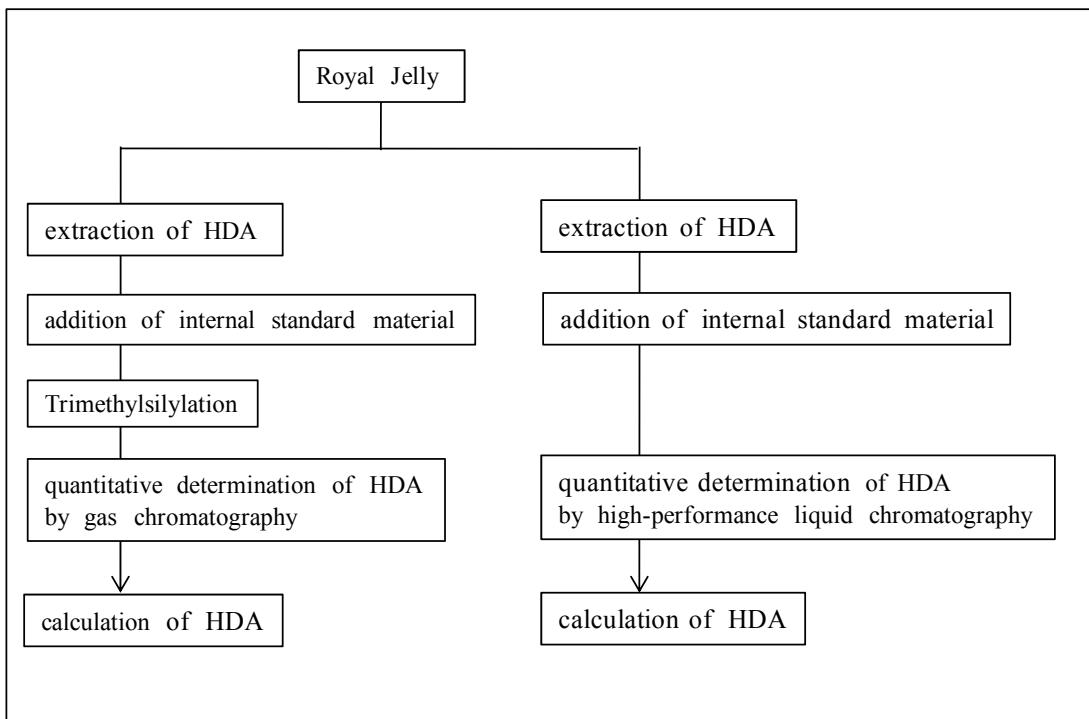


Fig.1 Flow chart of quantitative determinations of HDA by GC method and HPLC method, used in this study

2.3.2 試料の調製

試料中の HDA の含有量が GC 法では 0.1~1.0 mg、HPLC 法では 1.0~5.0 mg 程度になるよう採取し、約 33 % の水酸化ナトリウムを少量加え、溶解させたのち 100 ml 容メスフラスコに定容した。この 10 ml を試料として 200 ml 容分液ロートに移し蒸留水を 10 ml 加え全液量が 20 ml となるようにし、1N 塩酸溶液を数滴加え酸性 (pH3 以下) とした。これにジエチルエーテル 40 ml 加え振とう抽出し、続いて 20 ml で 3 回振とう抽出を行った。次いでエーテル層を蒸留水 20 ml で 4 回洗浄しエーテル層を 200 ml 容ナス型フラスコに移した。ロータリーエバボレーターによりエーテル層を留去させた。

2.3.3 HDA の含有率の算出

得られたクロマトグラム上の内部標準物質のピーク面積に対する HDA のピーク面積の比を求め、HDA 標準品により作成した検量線から内部標準物質及び HDA の重量比を求め、次式により HDA の含有率を算出した。

$$\text{HDA 含有率 (\%)} = \frac{W_x/W_s \times M_s \times V / S \times 100}{}$$

ただし、

W_x/W_s : 検量線から求めた検液の内部標準物質と HDA の重量比

M_s : 内部標準物質の重量 (mg)

V : 希釈倍率

S : 試料の採取量 (mg)

2.4 実験

2.4.1 HPLC 法

2.4.1(1) 試薬の調製

HDA 標準溶液：HDA 標準品 1.0、2.0、3.0、4.0 及び 5.0 mg と内部標準物質であるスペリン酸 0.5 g をそれぞれ 100 ml 容メスフラスコに正確に量り採り、水を加えて定容した。

メタノール-50 mM リン酸緩衝液 (pH=2.8) : リン酸二水素ナトリウム (二水和) 6.24 mg 及び 85 % りん酸 0.68 ml を 1 L の蒸留水に溶解させ pH=2.8 に調整した。このリン酸緩衝液とメタノールを 50 : 50 の割合で混合し移動相とした。

2.4.1(2) 内部標準物質の検討

クエン酸、コハク酸、フタル酸、フマル酸、メサコン酸、酢酸、デヒドロ酢酸及びスペリン酸の計 8 種についてローヤルゼリー中の物質とピークが重ならないもので、かつピーク強度及び再現性が良好のものがないかどうか検討した。

2.4.1(3) 検量線の直線性の確認

標準HDA溶液0.01—0.05 mg/mlをそれぞれHPLC用のバイアル瓶に移し、2.2.1の条件下でそれぞれ測定した。得られたクロマトグラムから濃度ごとにHDAのピーク面積(Ax)と内部標準物質のピーク面積(As)の比(Ax/As)を求めた。この値に対する各HDAと内部標準物質の重量比により検量線を作成し、検量線の直線性を確認した。

2.4.1(4) 試料の定量

2.3.2で5つ調製後、内部標準物質0.5 gをそれぞれ加えメタノールに溶解し、これを検液とし、2.2.1の条件下で定量した。また、2.3.3からHDAの含有率を算出した。

2.4.2 GC法

2.4.2(1) 試薬の調製

TMS化剤:N,O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド及びクロロトリメチルシランを2:1の割合で混合し0.5 mlとし、使用時に調製した。

HDA標準溶液:HDA標準品5.0 mgを25 ml容メスフラスコに移し、クロロホルムで定容した。

内部標準溶液:1-エイコサノール12.5 mgを25 ml容メスフラスコに移し、クロロホルムで定容した。

2.4.2(2) 検量線の直線性の確認

2.4.2(1)で作製したHDA標準溶液0.2 mg/mlを1、2、3、4及び5 mlホールピペットで量り取り、内部標準溶液0.5 mg/mlをそれぞれ2 mlホールピペットで量り取り加え溶剤を留去した。その後、TMS化剤を加え2.2.2の条件下でそれぞれ測定した。得られたクロマトグラムから濃度ごとにHDAのピーク面積(Ax)と内部標準物質のピーク面積(As)の比(Ax/As)を求めた。この値に対する各HDAと内部標準物質の重量比をプロットし、検量線の直線性を確認した。

2.4.2(3) 試料の定量

2.3.2で5つ調製後、2.4.2(1)で調製した内部標準溶液0.5 mg/mlをそれぞれ2 mlホールピペットで量り取り加え、溶剤を留去した。これにTMS化剤を加え水浴上で加温し冷却後、検液とし2.2.2の条件下で定量した。また、2.3.3からHDAの含有率を算出した。

3. 結果及び考察

3.1 HPLC法

3.1.1 内部標準物質の検討

ローヤルゼリーの抽出物のクロマトグラムをFig.2に示す。fのピークはHDAで、a~eのピークは内部標準物質に妨害となるピークである。

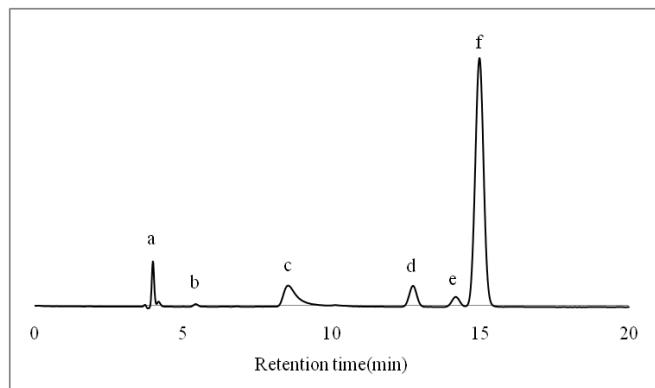


Fig.2 Chromatogram of raw (or lyophilized) royal jelly

次に2.4.1(2)における8種の物質のクロマトグラムをFig.3に示す。それぞれ、1:フマル酸、2:酢酸、3:メサコン酸、4:フタル酸、5:スペリン酸、6:デヒドロ酢酸、7:クエン酸のクロマトグラムである。5:スペリン酸、6:デヒドロ酢酸がFig.2で示したa~fのピークと重ならないことがわかった。しかし、6:デヒドロ酢酸が実験過程で消失する恐れがあったため、内部標準物質として5:スペリン酸を使用することとした。

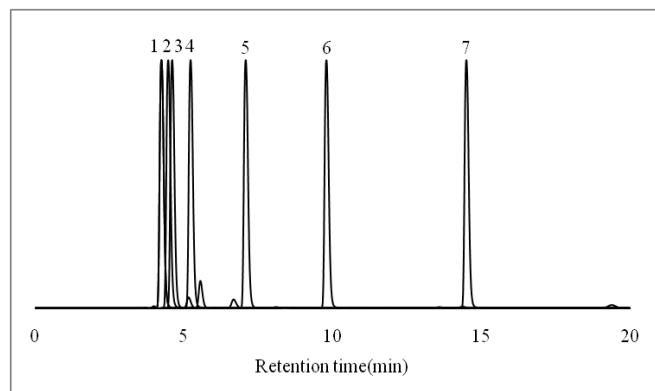


Fig.3 Chromatogram of eight possible internal standard materials

1. Fumaric acid, Succinic acid
2. Acetic acid
3. Mesaconic acid
4. Phthalic acid
5. Suberic acid
6. Dehydroacetic acid
7. Citric acid

3.1.2 検量線の直線性の確認

2.4.1(3)にて得られた検量線をFig.4に示す。今回測定した濃度範囲では相関係数が0.9992で原点付近を通る良好な直線性を示した。

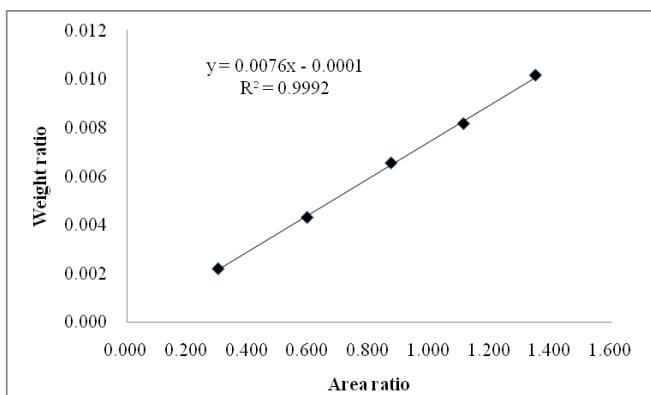


Fig.4 Calibration curve obtained from HDA standard solutions by HPLC method

3.1.3 HDA 定量及び定量結果の評価

生、乾燥ローヤルゼリーをそれぞれ 5 検液ずつ作製し、HPLC で定量した結果を Table.1 に示す。生が 1.22%～1.33%、平均値 1.27%、標準偏差 0.040 となり、乾燥が 3.86%～4.97%、平均値 4.48%、標準偏差 0.480 となった。生では定量結果に再現性が見られたが、乾燥では定量結果に再現性が見られなかった。この原因として、抽出の再現性に問題があるのではないかと考えられる。

Table 1 Content of HDA in fresh and lyophilized royal jelly, determined by HPLC method

		Content of HDA(%)	
Sample Experiment	Fresh royal jelly	Lyophilized royal jelly	
No.1	1.22	3.86	
No.2	1.26	4.10	
No.3	1.29	4.71	
No.4	1.33	4.97	
No.5	1.26	4.79	
Average	1.27	4.48	
St.Deviation	0.040	0.480	

3.2 GC 法

3.2.1 検量線の直線性の確認

2.4.2(2)にて得られた検量線を Fig.5 に示す。今回測定した濃度範囲では相関係数が 0.9997 で原点付近を通る良好な直線性を示した。

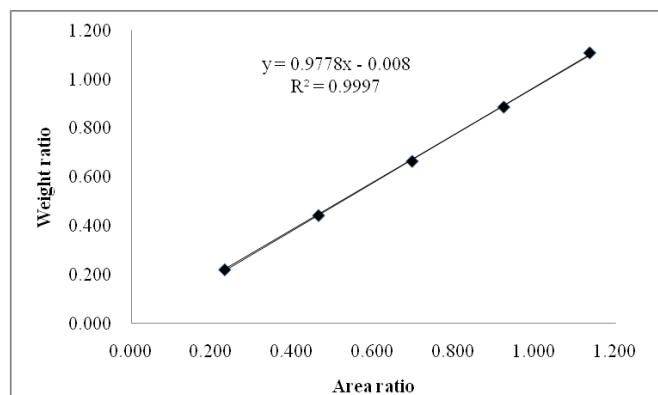


Fig.5 Calibration curve of HDA standard solution by GC method

3.2.2 HDA 定量及び定量結果の評価

生、乾燥ローヤルゼリーをそれぞれ 5 検液ずつ作製し、HPLC で定量した結果を Table.2 に示す。生が 0.96%～1.52%、平均値 1.25%、標準偏差 0.259 となり、乾燥が 2.93%～3.74%、平均値 3.33%、標準偏差 0.364 となった。生、乾燥ともに定量結果に再現性が見られなかった。この原因として、抽出の再現性の問題、TMS 化剤による誘導体化が不完全であるのではないかと考えられる。

Table 2 Content ratio of HDA in fresh and lyophilized royal jelly by GC method

Sample Experiment \	Content of HDA(%)	
	Fresh royal jelly	Lyophilized royal jelly
No.1	1.03	3.29
No.2	1.23	2.93
No.3	0.96	3.67
No.4	1.52	3.04
No.5	1.50	3.74
Average	1.25	3.33
St.Deviation	0.259	0.364

3.3 HPLC 法及び GC 法の定量結果の比較

生、乾燥ローヤルゼリーを GC 法及び HPLC 法で定量した結果を Table.3 に示す。乾燥ローヤルゼリーの場合に定量結果が GC 法及び HPLC 法とともに定量結果が不安定であった。この原因として、抽出の再現性の問題、またローヤルゼリーに起因する何らかの原因があるのではないかと考えられる。

Table 3 Comparison of content ratio of HDA in royal jelly by GC method and by HPLC method

Sample Experiment \	Content of HDA(%)			
	Fresh royal jelly (HPLC method)	Fresh royal jelly (GC method)	Lyophilized royal jelly (HPLC method)	Lyophilized royal jelly (GC method)
No.1	1.22	1.03	3.86	3.29
No.2	1.26	1.23	4.10	2.93
No.3	1.29	0.96	4.71	3.67
No.4	1.33	1.52	4.97	3.04
No.5	1.26	1.50	4.79	3.74
Average	1.27	1.25	4.48	3.33
St.Deviation	0.040	0.259	0.480	0.364

4. 要 約

より簡便な定量方法として、HPLC 法による HDA (10-hydroxy- δ -2-decenoic acid) の定量方法について検討した。

内部標準物質の検討を行った結果、ローヤルゼリー中に含まれる物質とピークが重ならない物質としてスペリン酸が適当であった。

検量線が直線性を示したことから HPLC 法で HDA を定量できることがわかった。

また、TMS 化を行うことなく定量を行うことで実験操作が簡略化できた。

しかしながら、GC 法、HPLC 法ともに実サンプルについての HDA の定量結果が不安定であったことから、今後は同一抽出物における両法の定量結果を比較しながら最適な抽出条件を検討するなど原因究明が必要である。

文 献

- 1) 石黒昌孝：関税中央分析所報, **18**, 77(1978)
- 2) 中陳静男, 田口光江, 秋山義郎, 篠田雅人, 星葉科大学, 秋山錠剤株式会社：薬学雑誌, **102**(6), 549 (1982)
- 3) 関千加代, 斎藤弘和, 農林水産消費安全技術センター(FAMIC)：調査研究報告, **11**(1106), 50 (1987)
- 4) 全国公正取引協議会連合会：ローヤルゼリーの表示に関する公正競争規約