

ガスクロマトグラフィーによる Royal・Jelly の分析

石 黒 昌 孝*

1 緒 言

関税率表上では, Royal・Jelly は税番 30・01 号に分類される。しかし, Royal・Jelly に他のものを加えて製薬原料としたものは, 税番 30・03 号に分類され, また, Royal・Jelly を添加したはちみつは税番 21・07 号に分類されることになっている。従って, 税表分類上 Royal・Jelly であるかの鑑別とか, Royal・Jelly 添加の有無の判定や, Royal・Jelly の含有量の知見を求められる場合が生じている。

Royal・Jelly は, 働き蜂の咽頭腺より分泌された乳状物で, 女王蜂の栄養物となる点より注目され, 健康食品, 活力剤等の目的で利用するため年間に約 100 トンも輸入されている。

Royal・Jelly の成分については, 渡辺ら¹⁾のほかいくつかの報告^{2), 4)}がある。産地や採取時間等により若干の相違がみられるが, 平均的にはおよそ次のような成分である。

水分	65% ~ 70%
粗蛋白質	11% ~ 15%
粗脂肪(エチルエーテル抽出物)	3% ~ 6%
炭水化物	8% ~ 11%
灰分	0.7% ~ 2%

この他にビタミンやアミノ酸などが含まれており, 複雑な成分組成となっている。Royal・Jelly に関する多数の研究も活力剤や病気の治療についての効力や成分についての報告が殆んどであり, Royal・Jelly の分析方法についての報告は極めて少ない。

早川ら⁵⁾は Royal・Jelly を乾燥させたものからエチルエーテルで抽出し, これをメチルエステル化してガスクロマトグラフィーで Nonadecanate 相当分の定量を行って Royal・Jelly の定量を行っているが, 定量結

果の再現性に若干の相違がみとめられるようである。

米山ら⁶⁾は Royal・Jelly の特有成分である有機酸 10 - ハイドロキシ - δ - 2 - デセン酸をガスクロマトグラフィーで定量することにより, Royal・Jelly を定量する方法を報告している。この方法について検討を行った結果比較的良き知見が得られ, Royal・Jelly の真疑, 有無, 含有量を鑑別するのに有効な方法であることが判ったので報告する。

2 実験方法

2・1 試 薬

エチルエーテル：特級品

TMS 化剤：BSA〔NO - Bis (trimethyl silyl) acetamide〕と TMCS (Tri-methyl chlorosilane) を 2 : 1 の割合で混合したもの。用時調整する。
標準 10HDA (10 - Hydroxy - δ - 2 - decenoic acid) の 0.2mg/ml, CHCl_3 溶液。

内部標準液：パルミチン酸またはマーガリン酸の 0.5mg/ml, CHCl_3 溶液。

2・2 試料の調整

試料として生 Royal・Jelly では 0.5g, 乾燥 Royal・Jelly では 0.2g, Royal・Jelly 調整品では 10HDA とし 8 ~ 10mg 程度含有するように採取する。試料を精秤したのち水に溶解し, 100ml に定容し, 供試液とする。水に溶け難い場合は加熱するか, または錠剤等になっていて溶け難い場合は 30%NaOH を数滴加えて溶解するとよい。

次に供試液 5ml を 200ml 容分液ロートにとり, 水を加えて 15ml とし 1 規定 HCl 数滴を添加して酸性 (pH 3.0 以下) とする。これにエチルエーテルを 40ml 加えてよく振とうし抽出する。更にエチルエーテルを 20ml づつ 2 回加えてよく振とうし抽出する。次にエチルエ

* 東京税関輸入部分析室 108 東京都港区港南 5 の 5 の 30

- テル層を集めた後、減圧でエチルエーテルを除去する。これに内部標準液を 2ml 加え、クロロホルムと水を減圧で除去する。次に少量のエチルエーテルを用いて 5~10ml 位の共栓小容器に移し入れ、エチルエーテルを除去する。

これに TMS 化剤を 0.5ml 加えて密栓し、振とうし混合する。ウォーターバス（温浴）上で若干時間加温して、TMS 化が終了ものを冷却する。この 2 μ l をマイクロシリンジでとり、ガスクロマトグラフに注入する。

2・3 検量線の作成および計算

標準溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 および 5.0ml を共栓小容器に別々にとる。これに内部標準液を 2ml ずつそれぞれに加え、減圧下で溶媒を除去する。次に試料と同様な方法で処理して TMS 化し、ガスクロマトグラフに夫々 2 μ l を注入し、クロマトグラフをとる。内部標準に対するピーク比より検量線を作成する。

この検量線より試料中の 10 - ハイドロキシ - δ - 2 - デセン酸の量を求め、更に標準品の純度を補正して試料中の 10 - ハイドロキシ - δ - 2 - デセン酸の含有量を算出する。

2・4 ガスクロマトグラフィーの条件

カラム：3% Silicone SE - 30, Chromosorb
WAW DMCS, 60~80mesh, glass
column 2m $\times$ 3mm ϕ

カラム温度：190

注入口温度：250

N₂ gas : 40ml/min

H₂ gas : 50ml/min

air : 1 l/min

検出器：FID

機種：島津 GC 4BM

3 実験結果と考察

3・1 標準品のガスクロマトグラムと検量線

10 - ハイドロキシ - δ - 2 - デセン酸の標準液のみを TMS 化したときのガスクロマトグラムが Fig.1 である。次に 10 - ハイドロキシ - δ - 2 - デセン酸標準液に内部標準液を加えて TMS 化したときのガス

クロマトグラムが Fig.2 である。更に Royal Jelly に内部標準液を加えて TMS 化したときのガスクロマトグラムが Fig.3 である。Royal Jelly のエチルエーテル抽出物を TMS 化した Fig.3 では 10 - ハイドロキシ - δ - 2 - デセン酸以外にもピークがみとめられるが、有機酸と考えられる。いずれにしても 10 - ハイドロキシ - δ - 2 - デセン酸の TMS 化物のピークは明らかであり、内部標準のパルチミン酸の TMS 化物とのピーク比は容易に算出できる。

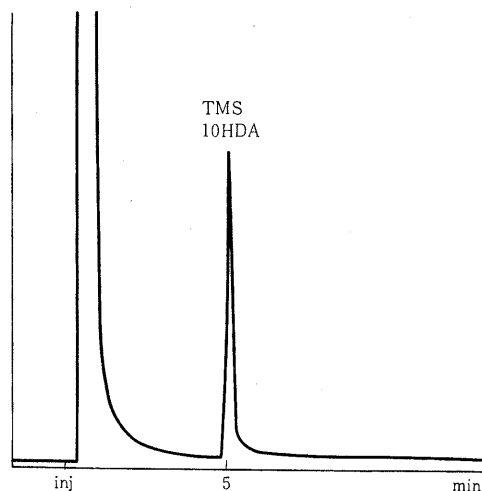


Fig. 1 Gas chromatogram of 10HDA

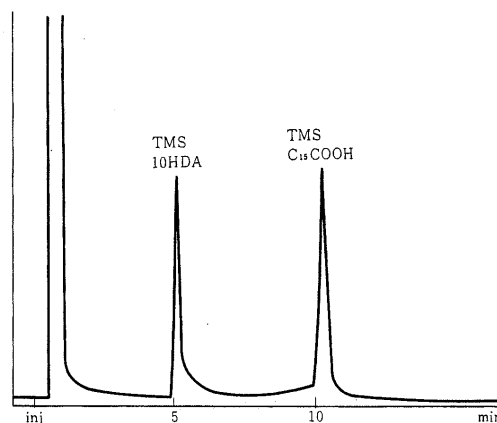


Fig.2 Gas chromatogram of 10HDA
added palmitic acid

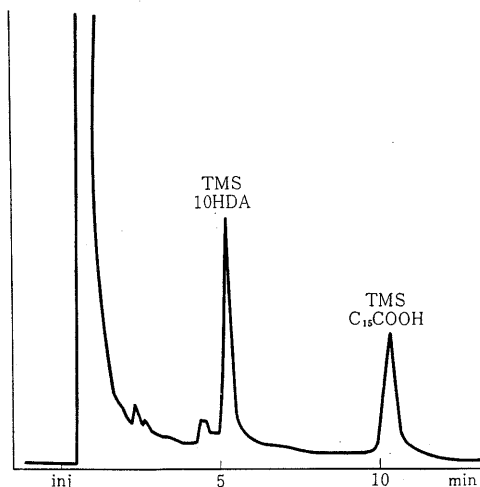


Fig. 3 Gas chromatogram of Royal Jelly added palmitinic acid

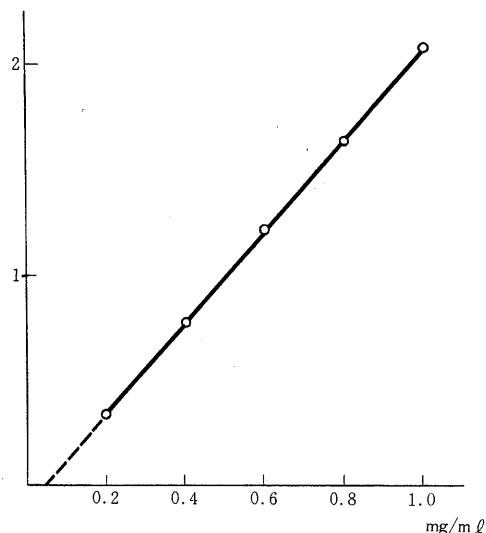


Fig. 4 Calibration curve of 10HDA/C₁₅COOH

次に検量線であるが、標準液と内部標準液を用いて作成する。すなわち、標準液を 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 及び 5.0ml をそれぞれとり、これに内部標準液を TMS 化して得られるガスクロマトグラムより作成したのが Fig.4 である。図のように、検量線は原点を通らないが、0.2mg から 1.0mg の範囲では明らかに直線性がみとめられる。数回繰返してもほとんど同じ値がえられ、いずれも直線であり、検量線として十分に使用できる。

3・2 試料

実験に用いた試料は次のとおりである。

- No1 台湾産 ローヤルゼリー（生）
- No2 台湾産 ローヤルゼリー（生）
- No3 日本産 ローヤルゼリー（生）
- No4 スペイン産 Pollen（花粉）

- No5 オーストラリア産 ハチミツ
- No6 台湾産 クロレラローヤルゼリー
（ハチミツとクロレラに
ローヤルゼリー10%を
混ぜたもの。）

各試料の一般定量値は Table1 に示した。

3・3 試料の実験結果

試料を前述の方法により実験し、得られた結果を示したのが、Table2 である。台湾産および日本産の生 Royal・Jelly の試料は、夫々10 - ハイドロキシ - δ - 2 - デセン酸を 1.7%程度含んでおり、偽和のない純粋なものと考えられる。ハチミツもごく少量、痕跡程度に 10 - ハイドロキシ - δ - 2 - デセン酸がみとめら

Table 1 Analysis of Sample

No	Sample	Moisture%	Ethyl-Ether Extract, %	Crude protein, %	Dropping acid value, ml	Direct Reducing Sugar, %
1	Raw Royal Jelly	68.17	4.80	11.51	42.1	1.06
2	Raw Royal Jelly	67.31	4.97	12.06	44.0	1.18
3	Raw Royal Jelly	66.44	5.04	12.46	43.4	1.22
4	Pollen	7.13	3.01	20.83	1.9	35.62
5	Honey	18.90	1.10	0.25	2.1	76.44
6	Chlorella Royal Jelly	20.92	1.70	1.59	6.1	66.90

Table 2 Experimental Results of Samples

No	Sample	Weigh of Sample, (g)	10HDA, (mg)	10HDA, (%)	As dry base (%)
1	Raw Royal·Jelly	0.661	0.57	1.72	5.42
2	Raw Rayal·Jelly	0.604	0.51	1.69	5.17
3	Row Royal·Jelly	0.612	0.54	1.76	5.26
4	Pollen	3.200	0.01	0.006	0.007
5	Honey	4.514	0.01	0.004	0.005
6	Chlorella Royal·Jelly	3.042	0.27	0.18	0.23

れるが、種々の報告によると通常ハチミツ中にはごく少量の Royal·Jelly が混入しているとのことなので無視できる。又、花粉は働き蜂がハチミツを集めて帰巢する際に足に付着した花粉を集めたものであり、半分位の成分はハチミツよりなっており、Royal·Jelly の混入は通常考えられる筈である。クロレラローヤルゼリーは、10%Royal·Jelly を加えてあるという説明であるが、およそのところ 10%加えたと考えられる数値を示している。

Table 3 Recovery

Experiment No	Weighi of Sample(g)	10·HDA (mg)	10·HDA (%)
1	0.661	0.57	1.72
2	0.621	0.54	1.74
3	0.630	0.55	1.75
4	0.702	0.59	1.68
5	0.652	0.56	1.72
6	0.631	0.56	1.77
7	0.667	0.58	1.74
average : 1.731 $\pm$ 0.021			

Sample : Raw Royal Jelly, Taiwan

3・4 実験結果の再現性

実験結果の再現性を知るために、同一試料についてくりかえし検討を行った。

試料として台湾産の生ローヤルゼリーを用い、計 7 回の実験を行った結果を示したのが Table3 である。7 回の結果を検討してみると、数値も近く、標準偏差値で試料中の 10 - ハイドロキシ - δ - 2 - デセン酸の含有量として 0.021%であり、良好な結果がえられた。

3・5 調製試料の実験結果

ハチミツに Royal·Jelly を加えた場合の実験結果を検討するために、試料 No6 のオーストラリア産ハチミツに日本産の生ローヤルゼリーを用いて調製試料を作成した。混合割合はハチミツに対して 5%、10%、および 20%の割合でローヤルゼリーを加えて調製した。

この 3 試料を実験した結果を示すのが Table4 である。結果をみると Royal·Jelly の添加量に比例して、10 - ハイドロキシ - δ - 2 - デセン酸が定量され、満足すべき値がえられた。

Table 4 Analytical results of mixed samples (Honey* mixed with Royal Jelly**)

Sample No	Royal Jelly content (%)	Weigh of sample (g)	Found, 10HDA (mg)	10HDA (%)
1	0	4.514	0.01	0.004
2	5	5.622	0.26	0.092
3	10	3.100	0.29	0.187
4	20	2.514	0.49	0.39

* Australian, ** RaW, domestic

4 総 括

Royal·Jelly の分析方法につき検討を行った。Royal·Jelly のエチルエーテル抽出物を TMS 化し、ガスクロマトグラフ法で 10 - ハイドロキシ - δ - 2 - デセン酸を定量する方法は Royal·Jelly の分析法としてすぐれた方法であることがわかった。

検量線も直線的に作成でき、実験結果の再現性も良く調製試料についての実験結果も満足すべき値がえら

れた。

本方法を生ローヤルゼリーや関連輸入品の分析に応用してほぼ満足すべき結果がえられたが、更に多種について検討をすすめていきたい。

本方法を更に検討し改良するならば、今後ローヤル

ゼリーの真疑の判定や含有の有無から含有割合にいたるまで、有効に税関分析に役立つものと考えられる。

終りに標準品を戴いた日本商事の中島博士、御教示戴いた日本食品センター米山氏に深謝します。

文 献

- 1) 渡辺武, 後藤: 生薬学雑誌, **11** (2) (1957) .
- 2) Murat . R : " Gleanings and Observation on Royal・Jelly " , (1957) .
- 3) Haydak . H : *Ann . ent Soc . Amer .* , **43** .
- 4) Melampy . R and Jones . D : *Proc . Sco . exper . Biol . N . Y.* , **41** , 382 (1939) .
- 5) 早川幸男, 平林達郎, 渡辺正男: 食品工誌, **21** (1974) .
- 6) 米山智, 荒木恵美子, 山下太郎: 食品工誌, **23** (1976) .

Analysis of Royal Jelly by Gas Chromatography

Masataka ISHIGURO*

*Tokyo Customs Laboratory, 5-5-30, Konan, Minato - Ku, Tokyo, 108 Japan

—Received Sept. 30, 1977—