

$\beta$ -ツヤプリシンの分析に用いる HPLC カラムの比較研究

眞木俊夫、山本直子、野田結子

A Comparative Study on High Performance Liquid Chromatography Columns for Determination of  $\beta$ -thujaplicin.

Toshio MAKI, Naoko YAMAMOTO, and Yuiko NODA

The optimum column for determination of  $\beta$ -thujaplicin by using ODS-C<sub>18</sub>, ODS-3, ODS-4 and RP-Amide columns was investigated. The most important observation was the disappearance of tailing on the chromatogram peak in the analysis of  $\beta$ -thujaplicin by an Ascentis RP-Amide reversed phase column. The separation and sensibility of  $\beta$ -thujaplicin was satisfactory, and the quantitative determination was possible. The column was applied to the determination of  $\beta$ -thujaplicin in commercial food products.  $\beta$ -Thujaplicin in the samples was extracted with ethyl acetate, and the extracted solution was cleaned up by using a Sep-Pak Classic C<sub>18</sub> cartridge. The eluate was analyzed on the column with acetonitril: 0.1%-phosphoric acid (6:4) as a mobile phase.  $\beta$ -Thujaplicin was analyzed at 240nm and the calibration curves showed linearity at 0~3 $\mu$ g/mL. The detection limit of  $\beta$ -thujaplicin was 0.05 $\mu$ g/g and the recovery rates were 75% in the sample. The analysis of  $\beta$ -thujaplicin was carried out within ten minutes.  $\beta$ -Thujaplicin of 0.25 $\mu$ g/g was detected in the baked Yatsunashi which did not have any mention of food preservatives. The other samples were less than detection limit.

**Keywords;** HPLC,  $\beta$ -thujaplicin, Ascentis RP-Amide column, baked Yatsunashi

## 緒言

$\beta$ -ツヤプリシンは平成5年4月に既存添加物名簿一覧表<sup>1)</sup>に保存料として収載された食品添加物である。野副らは台湾ヒノキ材の精油から融点51~52℃、分子式C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>の結晶化に成功し、この結晶成分を台湾ヒノキの名からヒノキチオールと名付けた。このヒノキチオールは台湾ヒノキ以外にも青森ヒバなどの精油中にも含まれていることが判明したが、その後、ベイスギ (*Thuja plicata*) の心材から $\alpha$ 型、 $\beta$ 型および $\gamma$ 型の3種の異性体をもつ成分が見出され、その一つである $\beta$ -ツヤプリシンがヒノキチオールと同一であった。

$\beta$ -ツヤプリシンは、鉄や銅と容易にキレートを形成する。また金属に対して強い腐食性を有し、光分解性が

ある。抗菌作用が比較的強く<sup>2,4)</sup>、広い抗菌スペクトルを示す。毒性について詳細に検討した報告は少ないが、妊娠マウスに対して催奇性があると報告<sup>5,6)</sup>されている。従って保存料として食品中への使用が認められているが、その使用量などには注意が必要と思われる。

これまで $\beta$ -ツヤプリシンの分析は、金属キレートの生成能を利用した定量法<sup>7)</sup>、三価鉄と安定な錯塩を形成して発色する性質を利用した比色定量法<sup>8)</sup>、HPLC法としては三フッ素化ホウ素誘導体化後に定量する方法<sup>9)</sup>が報告されているが、いずれも複雑な操作を行わなければならない。HPLC逆相系カラムを用いた分析でも成分の溶質後のテーリング現象が生じ正確な定量ができないのが現状である。その理由には $\beta$ -ツヤプリシンとカラム中

\* 東京聖栄大学健康栄養学部

\*\* 健康大学生命科学部

に存在する微量金属とが容易にキレートを形成しテーリング現象を起こすからと考えられている<sup>10</sup>。現在の技術ではカラム内の微量金属を完全に除去することは困難であると考えられていることから、微量金属をカラム内に残存させたままで分析が行われている。このような現状ではβ-ツヤプリシンの含有量を調査した報告は少なく、小川ら<sup>10</sup>の水蒸気蒸留法を用いた醤油、味噌中の含有量調査および萩野ら<sup>11</sup>の台所用品中などの実態調査が見られるだけである。

そこで複数の HPLC カラムを用いて良好なクロマト分離条件を検討することにし、合わせて市販の穀類加工品の含有量調査を行ったので報告する。

## 実験方法

### 1. 試料

小売店で販売している市販食品 10 試料を購入し分析対象とした。市販食品の概要は以下の通りである。2010 年 10 月から 11 月に、乾麺(中華そば 2 試料、うどん 1 試料、日本そば 1 試料)、焼八つ橋(1 試料)、せんべい(3 試料)、その他(2 試料)、総計 10 試料を購入し試料とした。

### 2. 試薬

β-ツヤプリシン標準溶液：β-ツヤプリシン C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub> (和光純薬株式会社製) 100mg を精秤し HPLC 用メタノールに溶解し、正確に 100mL としたものを標準原液(1000μg/mL)とした。分析に使用するまでは遮光して冷暗所に保存した。これを適宜アセトニトリルで希釈し、0.1~100ppm 標準溶液を調製した。Figure 1 にβ-ツヤプリシンの化学構造を示した。化学名は 2-ヒドロキシ-4-イソプロピル-2,4,6-シクロヘプタトリエン-1-オン、水酸基とケトン基を持つ 7 員環のトロポロン誘導体である。融点 50~52℃、沸点 140℃、水には微溶(0.1%程度)だがアルコールなどに可溶である。

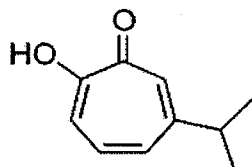


Figure 1. Chemical structure of β-thujaplicin

テトラブチルアンモニウムクロリド溶液：テトラブチルアンモニウムクロリド(和光純薬工業株式会社製) 0.500g を正確にとり蒸留水を加えて 100mL にした。その他の試薬は和光純薬(株) 特級品を用いた。

カラム：ODS-C<sub>18</sub>系(25cm×4.6mm 3μm)、ODS-3系(25cm×4.6mm 3μm)、ODS-4系(25cm×4.6mm 5μm)、RP-Amide

(25cm×4.6mm 5μm) をそれぞれ用いた。

Sep-Pak Classic C<sub>18</sub>：予め 40%メタノールで洗浄したものを用了。

### 3. 装置

高速液体クロマトグラフ：SHIMADZU SPD-20A/LC-20AT

検出器：SHIMADZU SPD-10Avp 型

### 4. 試料調製

試料 10g を取り、蒸留水 10mL、10%リン酸を加え酸性とし、酢酸エチル 50mL を加え 5 分間振盪抽出した。酢酸エチル層を取り出し、先の水層に酢酸エチル 30mL を加え、この振盪抽出を 2 回繰り返した。全抽出した酢酸エチルを全て集め、無水硫酸ナトリウムで十分に脱水を行った。これを濾過し、濾液をエバポレーターにて 30℃で 5mL 以下に濃縮し、アセトニトリルで 5mL に定容した。予め 40%メタノールでコンディショニングした Sep-Pak Classic C<sub>18</sub> に試料液 5mL を流し負荷した。100%メタノール 5mL で不純物を取り除き、ただちに移動相 5mL でβ-ツヤプリシンを溶出させ、これを HPLC 用試験溶液とした。

## 結果および考察

### 1. β-ツヤプリシンの分析法の確立

#### 1) 移動相の検討

逆相系カラムを用いることから酸性下で極性溶媒であるアセトニトリルとリン酸の混合溶液を、また過去の報告<sup>7,9,12</sup>を参考に ODS-3 系カラムを用いて検討を行った。Figure 2 に 3ppm β-ツヤプリシン標準液を用いた。アセトニトリル：0.1%リン酸(4:6) および同(6:4)の両移動相で得られた HPLC クロマトグラムを示した。双方のクロマトグラムには大きなテーリング現象が認められ、移動相の混合比の調製では消失させることはできなかった。この大きなテーリング現象は、カラム内に存在する微量金属がβ-ツヤプリシンと安定なキレートを形成したからであると考えた。しかし、溶出時間のみに大きな違いが認められた。すなわち、移動相の混合比が(4:6)の場合で約 16 分であり、(6:4)の場合は約 7 分とかなりの開きが見られた。迅速性のある分析法が求められていることから(6:4)の移動相を使用することにした。正確な定量分析を可能にするためには、このテーリング現象を消失させる必要があることから、先の移動相(6:4)に 0.001 M のテトラブチルアンモニウムクロリドのイオン対試薬を添加し検討を行った。そのク

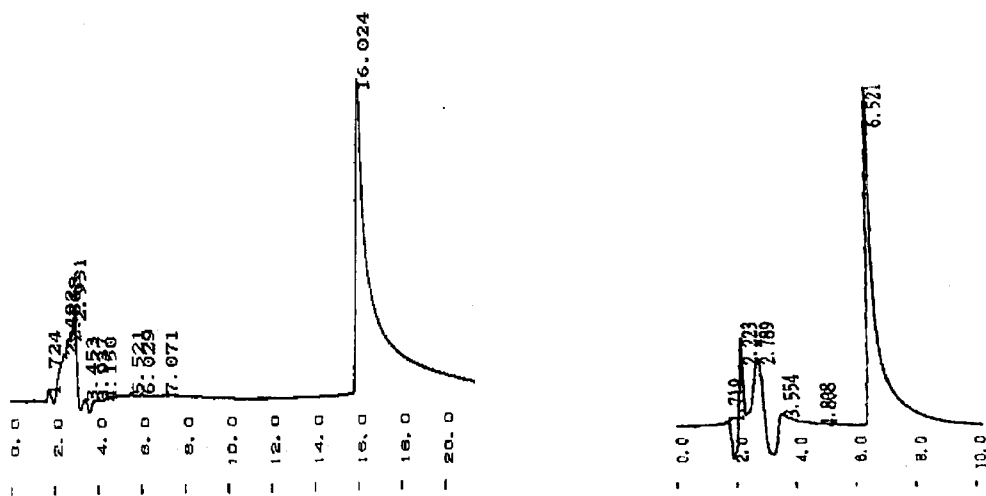


Figure 2. HPLC chromatograms of : acetonitrile-0.1% phosphoric acid , left (4:6) right (6:4) column; ODS-3 (4.6×250mm 3μm)

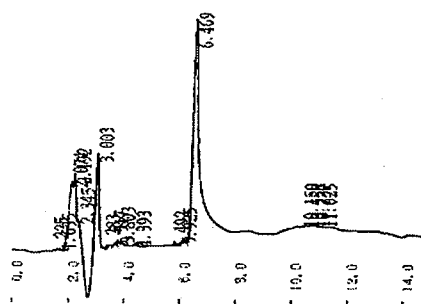


Figure 3. HPLC chromatogram of : acetonitrile-0.1% phosphoric acid (6:4) containing tetramethyl ammonium chloride, column; ODS-3 (4.6×250mm 3μm)

ロマトグラムを Figure 3 に示した。その結果、溶出時間に変化はなく、テーリング現象はやや消失されたものの完全なクロマトグラムではなかった。イオン対試薬は、カラムの劣化を生じることが多いので低濃度の範囲内で用いた。微量金属との結合を阻害するまでには至らなかった。高濃度のイオン対試薬を使用するとカラムの劣化が生じ、空気中の水分に溶けやすい性質があるため作業が複雑になる。イオン対試薬を 0.01M まで上げて検討したがテーリング現象の消失効果は得られなかった。さらにアセトニトリルとリン酸の混合比を (1:9) まで変えた移動相、アセトニトリルの代わりにメタノールを使用した移動相、またリン酸の代わりにクエン酸を添加した移動相による各検討を行ったが、いずれも良好なピー

クは得られなかった。

## 2) 測定波長の検討

β-ツヤプリシンの分析では 240nm、254nm および 320nm の 3 種の波長のいずれかを使用している報告<sup>10-12)</sup>がほとんどである。そこで、最適な測定波長を決定するために、再度、3ppm の β-ツヤプリシン標準液で測定をした。Figure 4 にそのクロマトグラムを示した。いずれの波長もテーリング現象の消失は認められず、測定波長とテーリング現象とは関係がないことが分かった。しかし、240nm で得られたピーク高が、その他の波長の約 2 倍以上であったので 240nm を用いることにした。

## 3. カラムの検討

β-ツヤプリシンの分析カラムには、逆相系カラムを用いていることから、ODS-C<sub>18</sub>系、ODS-3 系、ODS-4 系及び RP-Amide の 4 種のカラム、移動相は先の通り混合比 (6:4)、測定波長 240nm を用いて検討を行った。Figure 5 にそれぞれのカラムで得られたクロマトグラムを示した。まず、ODS-C<sub>18</sub> 系のカラムでは、測定時間を最長 40 分まで行ったが、β-ツヤプリシンを検出することはなかった。明確な理由は不明だが、他のカラムと比較して微量金属含有量が多量に存在し強い吸着現象が生じたからと推定した。

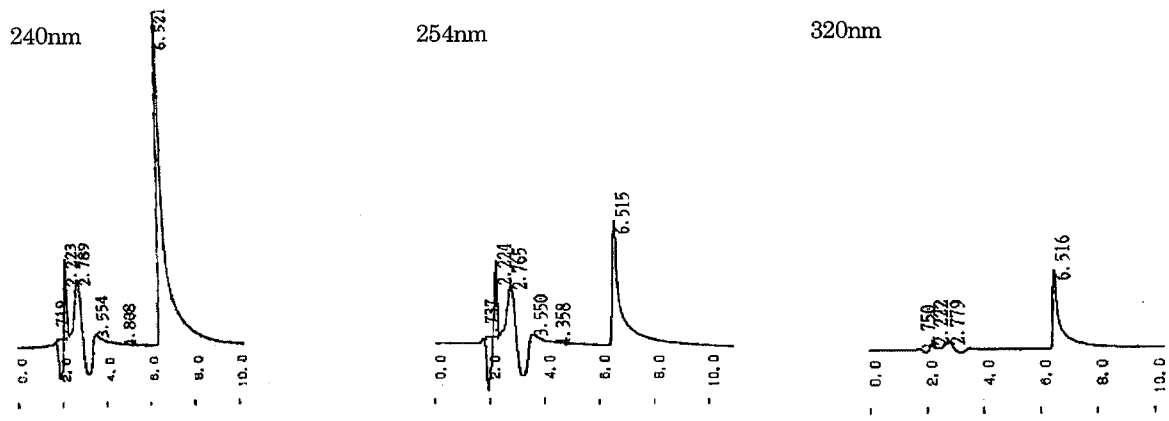
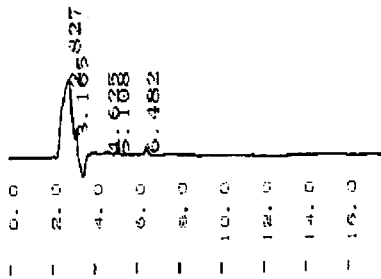
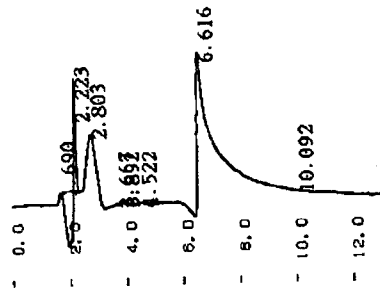


Figure 4 HPLC chromatograms of  $\beta$ -thujaplicin by the difference of detection wavelength, column; ODS-3 (4.6 $\times$ 250mm 3 $\mu$ m)

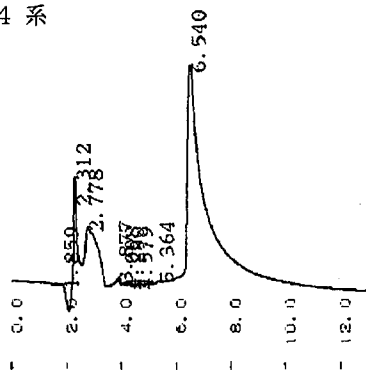
ODS-C<sub>18</sub> 系



ODS-3 系



ODS-4 系



RP-Amide

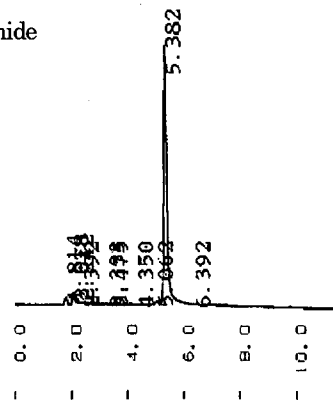


Figure 5. HPLC chromatograms of four columns

次に ODS-3 系と ODS-4 系カラムでは、 $\beta$ -ツヤプリシンは溶出したが、テーリング現象が大きく認められ、このクロマトグラムからでは正確な分析値が得られないと考えた。事前の繰り返しの測定を行えば微量金属のキレート率が低下するとの情報があることから試みたが、少なくとも得られたクロマトグラムからでは、そのような事実は得られていない。ODS-C<sub>18</sub>系カラムと同様にカラム内の微量金属の存在が大きく影響しているものと考えた。一方、RP-Amide カラムを使用したところ、テーリ

#### 4. 分析条件の設定

カラムは、Acentis RP-Amide (25cm×4.6mm 5 $\mu$ m)、移動相は、アセトニトリル：0.1%リン酸 (6：4)、測定波長は 240nm、流速は 1 mL/min、注入量は 10  $\mu$ L とした。

#### 5. 市販食品からの $\beta$ -ツヤプリシンの実態調査

菓子類・麺類 総計 10 試料中の  $\beta$ -ツヤプリシンの含有量調査を Table 1 に示した。今回、調査を行った 10 試料のうち焼八つ橋 1 試料から  $\beta$ -ツヤプリシンが

Table 1. Contents of  $\beta$ -thujaplicin in commercial food products

Food products	expiration date	indication of additive	Content
Chinese noodle	11.4.20	Antioxidant (vitamin E)	n.d.*
Chinese noodle	11.4.3	non	n.d.
Wheat noodle	11.9	non	n.d.
Soba noodle	11.5.29	non	n.d.
Baked Yatsushashi	11.3.8	non	0.25 $\mu$ g/g
Nambu sembei	11.2.6	non	n.d.
Soy sembei	11.4.19	non	n.d.
Solto sembei	11.4.12	non	n.d.
Biscuit	11.5.4	non	n.d.
Glanola	11.6.9	Antioxidant (vitamin E)	n.d.

※ n.d. means less than 0.05 $\mu$ g/g

ング現象が全く認められなかった。微量金属の妨害もなく吸着と脱着が良好で、検討した他のクロマトグラムと比較しても分離は優れていた。理由として、この酸アミド基と  $\beta$ -ツヤプリシンの水酸基とが水素結合により微量金属とキレートの形成が阻害されているからか、あるいはこのカラム内の微量金属が取り除かれている製品であるからと考えられる。

このカラムを用いて検量線を作製したところ、原点を通り 3 $\mu$ g/mL までは良好な直線性が得られた。そのときの検出限界は 0.05 $\mu$ g/g 以下であった。実験方法 4 の試料調製に従って回収率を求めたところ 75% であった。以上のことから、 $\beta$ -ツヤプリシンの最適な HPLC 分析条件を確立しまとめた。

0.25 $\mu$ g/g 検出された。他の試料はすべて検出限界以下であった。焼八つ橋に保存料の表示がなかったにも関わらず検出された。これは各種八つ橋には原材料として桂皮、シナモン、精油などが使用され、これによる菓子加工品であるため植物由来と考えられる。今後、幅広い調査が望まれる。

#### 結 論

$\beta$ -ツヤプリシンの HPLC 分析には、Ascentis RP-Amide カラムが適していた。検出限界は 0.05 $\mu$ g/g、検量線は原点～3 $\mu$ g/mL の範囲内で良好な直線が得られた。従来報告されている分析法と比較しても数倍感度が高く、また溶出時間も 10 分以内と迅速性が認められた。この分析法を用いて市販食品を検査したところ、焼八つ

橋1試料から0.25 $\mu$ g/gの $\beta$ -ツヤプリシンを検出した。今後、この分析条件を用いれば市販食品の使用実態などに大きく貢献するものと思われる。

#### 参考文献

- 1) 日本食品添加物協会技術委員会編：既存添加物名簿 収載品目リスト注解書、359、(1999) 日本食品添加物協会、東京
- 2) 乗上綾子、熊木奈々、千葉海里、伊藤雄幸：ヒノキチオール・ガス体の抗菌作用、弘前大学医学部保健学科卒論集 (2005)。
- 3) Miyano, N., Nakashima, H. and Matsunaga, I. : Evaluation of antibacterial activity for antimicrobial/deodorant processed textile products using natural ingredients., Bulletin of Osaka Prefectural Institute of public health, 37, 23-26 (1999).
- 4) 岡部敏弘、斉藤幸司、大友良光：木材成分HNの物理化学的性状と抗菌作用、ジャパンフードサイエンス、2、45-52 (1988)。
- 5) 小縣昭夫、長澤明道、湯沢勝広、他：天然添加物ヒノキチオールの催奇性について、食品衛生学会第75回学術講演会 講演要旨集 (1998)。
- 6) Ogata, A., Ando, H., Kubo, Y., et al. : Teratogenicity of thujaplicin in ICR mice., Food Chem. Toxicol., 37, 1097-1104 (1999).
- 7) 花房文人、中村淳、梅野清作、太田忠男：高速液体クロマトグラフィーによる化粧品中のヒノキチオールの定量、分析化学 38, 124-128 (1989).
- 8) H. MacLean, J. A. F. Gardener : Analytical Method for Thujaplicins., Anal. Chem., 28, 509 (1956).
- 9) Endo, M., Mizutani, T., Matsumura, M., et al. : High-performance liquid chromatographic determination of hinokitiol in cosmetics by the formation of difluoroborane compounds., J. Chromatogr., 445, 430-433 (1988).
- 10) 小川仁志、勝木康隆、鈴木敬子、他：食品中のヒノキチオールの分析法、東京衛研年報、48, 129-134 (1997)。
- 11) 萩野賀世、松本ひろ子、坂牧成恵、中里光男、安田和男：台所用品からのヒノキチオールの分析、東京健安研七年報、54, 247-250 (2003)。
- 12) 中島晴信、宮野直子、高塚正、荒川泰昭：抗菌加工繊維製品中のヒノキチオールの分析法と光分解による抗菌効果の増強、繊維学会誌、56, 60-65 (2000)。