

報 文

ガスクロマトグラフ及びガスクロマトグラフ直結質量分析計によるはっか油の新鑑別法*

大野幸雄，出来三男，入江隆夫**

ガスクロマトグラフ法およびガスクロマトグラフ直結質量分析計によるはっか油の鑑別法を検討した。

ガスクロマトグラフ法およびガスクロマトグラフ直結質量分析法で M.Piperita 油に特有なメントフランおよびサピネンハイドレートを確認し，M.Arvensis 油との成分的な違いを明らかにするとともに両種に共通して存在するが量的に異なるリモネン，シネオール，オクタノール - (3) のガスクロマトグラムによるピーク比の間には種に特有な関係があることを見出し，GC-Mass 法によるはっか油の新迅速鑑別法を確立した。

1. 緒 言

現行輸入関税率表におけるはっか油の分類は M.Arvensis とそれ以外のものとなっている。輸入の対象となる“その他のはっか油”は通常 M.Piperita であるので実際の区分は M.Arvensis と M.Piperita になる。

M.Piperita は M.Spicata と M.Aquatica の種間雑種であり植物分類学的には M.Arvensis とは種を異にするが，物理，化学的定数および主要成分に差異がなく，少量成分とくに M.Piperita に含まれるメントフランあるいは両種に共通して存在するが量的に違いのあるシネオール，リモネン，オクタノール - (3) およびピリデイフロロールなどがこれら種別確認の対象となり，すでに呈色反応¹⁾，赤外吸収スペクトル法^{3) 4)}，ガスクロマトグラフ法⁵⁾，薄層クロマトグラフ法^{7) 8) 9)}，あるいはこれら機器の組合せによる分析法^{2) 3)}，が検討されている。

著者ら⁹⁾も M.Piperita に含まれるメントフラン，シネオールを薄層クロマトグラフ法により同時検出す

る方法を検討し，良好な結果を得たが，その際，メントフランは精油の貯蔵状態により経時変化が起り，薄層クロマトグラフ法では検出できない事実を認めた。このことは M.Piperita，M.Arvensis の両者を鑑別する一つの手段としてメントフランの検出だけでは充分でないことを知った。そこで各種の輸入はっか油および国産はっか油についてガスクロマトグラフ直結質量分析計を用い，メントフラン以外の特徴成分の検出およびガスクロマトグラフ法によるこれら成分の含量比などを検討しはっか油の種別確認に有効な知見を得たので報告する。

2. 実験方法

2・1 試 料

実験に用いた各国産はっか油の性状は Table1 に示すようであり，外国産のものはいずれも原産地の明らかな輸入品を用いた。なお，これらのはっか油はすべて赤外吸収スペクトル，PEG - 20M カラムを用いたガスクロマトグラムから異常成分の混入のないことを確認した。

Table 1 Physical properties of peppermint oils

No.	Species	Peppermint oils	d_{15}^{20}	n_D^{20}
1	M. Piperita	S E N Midwest	0.9077	1.4612
2		Colombia natural	0.9117	1.4622
3		Michigan redistilled	0.9139	1.4626

* この報文を「ガスクロマトグラフ直結質量分析計による精油類の試験法に関する研究(第3報)」とする。

** 大蔵省関税中央分析所 千葉県松戸市岩瀬 531

No.	Species	Peppermint oils	d^{15}	n_D^{20}
4		Michigan triple redistiled	0.9104	1.4617
5		Michigan natural	0.9145	1.4629
6		Bulgaro rectified	0.9115	1.4624
7		Mitcham (R) rectified	0.9149	1.4602
8		U. S. S. R.	0.9046	1.4591
9		Vanalus super (M)	0.9106	1.4614
10		Madras	0.9177	1.4626
11		Midwest	0.9035	1.4605
12		Ontario	0.9075	1.4613
13		Willamette	0.9030	1.4613
14		Yakima	0.9071	1.4622
15		Madras prime natural 1968 crops	0.9053	1.4611
16		Prime natural M-30 (1968)*	0.9072	1.4622
17		French	0.9090	1.4605
18		Italo mitcham	0.9110	1.4610
19		Bulgaro crude	0.9123	1.4621
20		Mitcham (Hokurene)*	—	—
21	M. Arvensis	Hakka hakuyu (Formosan)	0.9055	1.4586
22		Brazilian Crude	0.9073	1.4602
23		Hōyo akayu *	0.9100	1.4592
24		“ hakuyu *	0.9063	1.4590
25		Riyokuhi crude *	0.9101	1.4610
26		Mentha White *	0.9050	1.4585
27		Hokurene crude *	0.9105	1.4617

* : Manufactured in Japan

2・2 装置および測定法

ガスクロマトグラムは柳本 GCG - 5DH 形ガスクロマトグラフを用い、水素炎イオン化検知方式で測定した。カラムにははっか油の特徴成分の分離に適した Sucrodiacetate hexaisobutyrate¹⁰⁾(以下 SAIB と略称する) 10%を含有する 80~100 メッシュ、クロモソルブ GAW を充填した 2m のステンレス製カラムを用い、110~180℃, 4 ml/min の昇温条件を採用した。

また、質量スペクトルの測定は日立質量分析計 RM-U6E 形に同社製 K-53 形ガスクロマトグラフを Watson Biemann 型ヘリウムセパレーターで直結した GC-Mass 計を用いた。分離条件はガスクロマトグラムの測定条件に近似させた。各質量スペクトルの測定条件はイオン加速電圧, m/e600 1.8keV, イオン化電圧 70eV, 電子電流 60 μA, イオン源温度 220℃である。

3．結果および考察

3・1 SAIB カラムによる各種はっか油のガスクロマトグラムの比較

はっか油あるいははっか油成分のガスクロマトグラムの測定には、従来 PEG - 400,¹¹⁾ 1500,³⁾ 6000,¹²⁾ 20M,¹³⁾ DEGS,¹³⁾ Hyprose¹⁴⁾ などのカラムが利用されているが種別確認に必要な微量成分の分離を目的とする場合には、メントール異性体、セスキテルペン類などの分離を多少犠牲にしてもリモネンとシネオールまたはメントフラとメントンを明瞭に分離する SAIB カラムが有効である。Table 2 に SAIB カラムによるはっか油成分の相対保持時間を示す。

Table 2 Relative retention times of main constituents
in peppermint oil

Constituents	Relative retention time	Constituents	Relative retention time
α -Pinene	1.00	Menthofurane	7.82
β -Pinene	1.88	Menthone	8.76
Myrcene	2.05	iso-Menthone	9.64
Limonene	2.41	d-Neomenthol	11.53
Cineol	2.76	<i>l</i> -Menthol	13.35
P-Cymene	3.35	Menthy acetate	14.83
Octanol- (3)	3.94	Piperitone	19.59

Column temp : 120

Inj, temp : 220

Carrier gas : He 5ml/min

Detector : FID

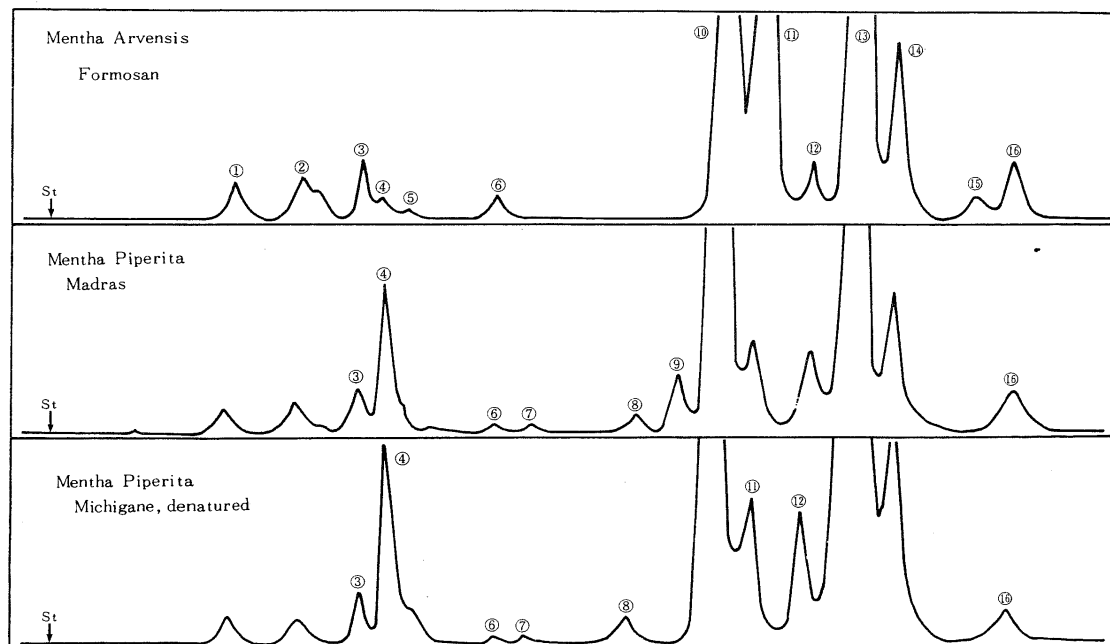


Fig 1 Gas chromatograms of peppermint oils

Column : SAI B 10% 2m 80 ~ 100 Mesh

Temp : 110 ° ~ 190 ° /min, FID

Carrier : 0.5 μ l

α -Pinene	Octanol-3	<i>l</i> -Menthol
β -Pinene	Menthofurane	Menthy acetate
Limonene	Menthone	Sesquiterpene (M.W.204)
Cineol	iso-Menthone	Piperitone
P-Cgmene	d-Neomenthol	

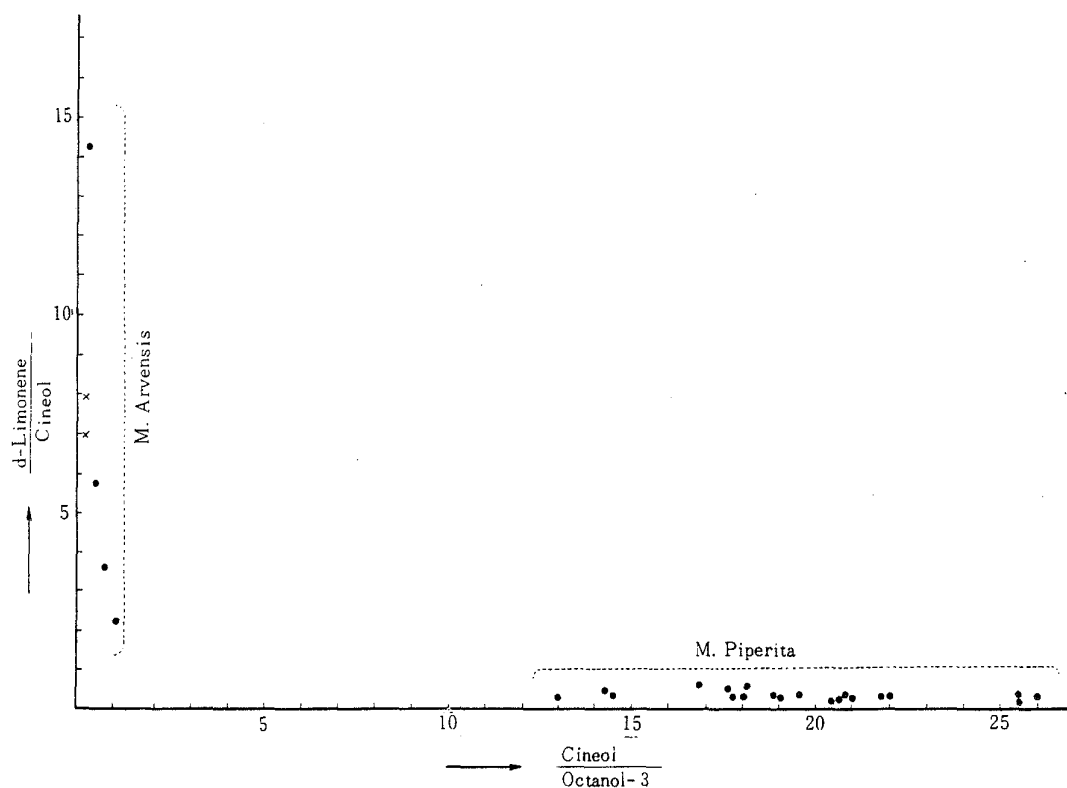


Fig.2 Correlation of d-Limonene/Cineol and Cineol/Octanol -

(3)

Fig.1 は各種はっか油のガスクロマトグラムの比較を示したもので、各ピーク成分の確認は純品の保持時間および質量スペクトルの比較で行なった。

SAIB カラムを用いた場合、Fig.1 に示すように M.Arvensis 油においてはいずれもリモネンとシネオールのピーク高さの比は 1 より大きく、ミルセン、オクタノール - (3) が顕著に現れる。これに対し、M.Piperita 油ではこの比が常に 1 以下でメントンの前にメントフランのピークが出現する。オクタノール - (3) も僅かに認められるが、M.Arvensis のクロマトグラムと著しく相異なる点はメントフランの前に出現する小ピークである。これは Fig.1 に示すミシガン産の精油のクロマトグラムのように、経時変化を受けメントフランのピークが完全に消失した M.Piperita 油(TLC 法によるメントフランの呈色反応が全くなかったもの)においても常に出現し、オクタノール - (3) のピークに近接して現れる微少ピークとともにこの種のはっか油に特徴的なものである。

また、両種に共通して認められるが含有量の異なるリモネン、シネオール、オクタノール - (3) 相互のピーク高さの比の間には Fig.2 に示した相関関係があり、実験に使用した M.Arvensis 系、M.Piperita 系のはっか油はそれぞれの比が縦軸、横軸側に完全に分布する。このことは Smith ら⁵⁾の示したリモネン/シネオールとメントフラン/イソメントンの関係に一致する。しかもこの関係は経時変化を受けてメントフランの消失した M.Piperita 油や両種の取卸油にも認められるので試料の種別を明らかにする上により効果的な手段と考えられる。

さらに、リモネン/シネオールとオクタノール - (3)/シネオールの相関関係は Fig.3 に示したとおりである。これからわかるように M.Piperita 油はすべて原点近くに分布するのに対し、M.Arvensis 油は広範囲に分布する。とくに両種の混合油では、この比が中間的な値を示すことから混合の有無の判定にも利用できるものと考えられる。

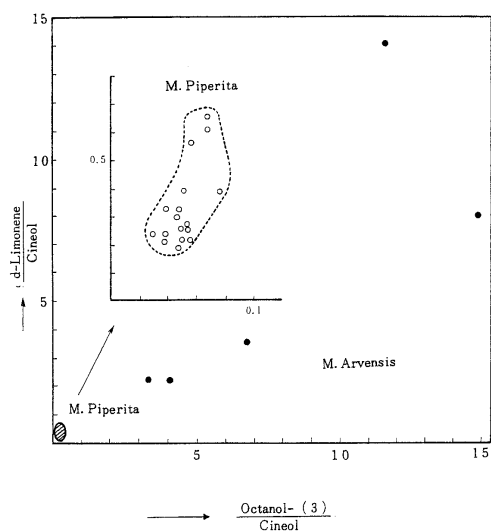


Fig.3 Correlation of $\frac{d\text{-Limonene}}{\text{Cineol}}$ and $\frac{\text{Octanol-(3)}}{\text{Cineol}}$

3・2・ガスクロマトグラフ直結質量分析計によるはっか油の鑑別

3・2・1 GC-Mass 測定用カラム充填剤の検討

精油成分の分析に GC-Mass 法の利用が逐次増加の傾向にあるがカラム充填剤として SAIB を利用した報告は見当たらない。

SAIB カラムの最高使用温度は 200 であり、質量分析計にガスクロマトグラフを直結する場合カラム出口付近はかなりの真空下にあることを考慮し、カラム使用温度を 190 以下にしてバックグラウンドの変化を検討した。カラム充填剤は質量分析計内の汚染を妨ぐためにあらかじめガスクロマトグラフで 8 時間空焼きしたものを用い、室温から徐々に昇温させ GC-Mass 分析における最高感度でバックグラウンドを測定した。使用最高温度近辺のバックグラウンドは Fig.4 に示したようで、 m/e 43, 71 のピークが比較的強く出るが測定時における感度を考慮すればカラム液相の流出による試料成分の質量スペクトルへの影響は極めて少ないことが認められた。

3・2・2 はっか油の GC-Mass 法による分析

試料油 0.4 μ l を注入したときの全イオンモニター検知クロマトグラフを Fig.5 に示す。全イオン検知クロマト法はカラム出口と検知器までにかなりの距離があるために分離能は幾分低下するが通常ガスクロマトグラフとほぼ同一のクロマトグラムを得ることができる。連続的に測定したはっか油の特徴成分の質量スペクトルを Fig.5, Fig.6 に示す。これらのスペクトルにおいて M^+ イオンおよび主要な各フラグメントイオンの強度比は標準品の全ガラス導入系を用いて測定した質量スペクトルとほとんど変わらず、ピーク成分の同定に使用可能である。

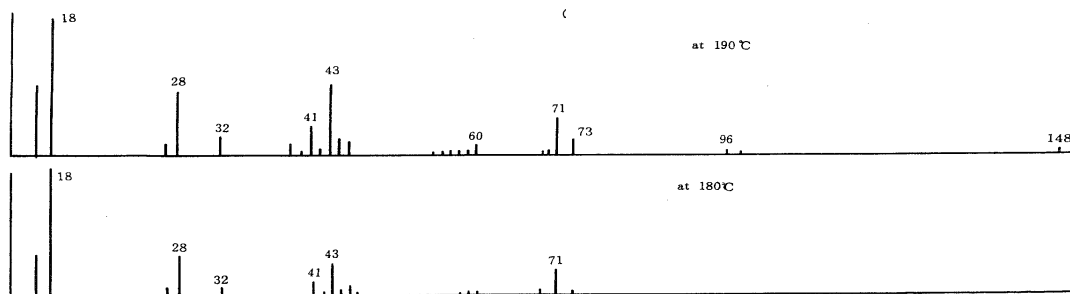


Fig.4 Background of SAIB column

E.M Sensitivity : xl

E.M.volt : 3.0 Kvolt

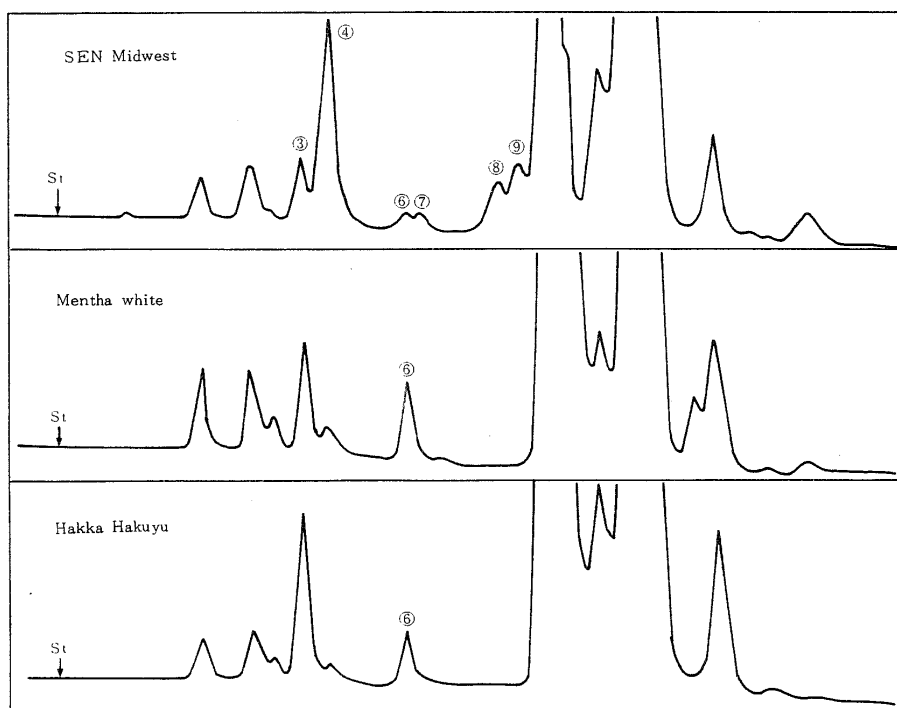


Fig.5 Gas chromatograms of peppermint oil detected by total ionic monitor

column : SAIB 10% 2m 80~100 mesh

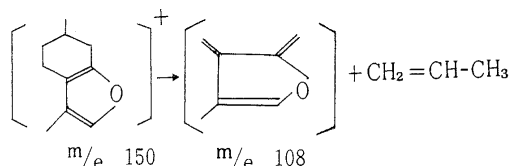
Temp. : 90 ° ~ 180 4 / min

Carrier : He 0.2Kgs/ cm²

Sample size : 0.4/μl

オクタノール - (3)はイオン化電圧を下げて測定しても分子イオンは検知できないが、最高質量位置に M - 18 イオンを明瞭に示し m/e59 をベースピークとするオレフィン形のパターンを示す。

メントフランは強度の大きい分子イオンとともに Retro-Diels-Alder 形の開裂に伴う m/e108 の特徴的なフラグメントイオン (ベースピーク) を示す。はっか油成



分の質量スペクトルにおいては m/e108 に強度の大きいフラグメントイオンを示すものは全くないためこのピークはメントフランの確認ピークとして有効である。通常の測定条件で、GC-Mass 法におけるはっか油中のメントフランの検知限界は約 2γ である。

また、はっか油成分の質量スペクトルで特異的なものは M.Piperita 油に共通して出現するピーク 7 とピーク 8 である。ピーク 7 が示す質量スペクトルの最高質量数は m/e85 または m/e103 であり、このイオンが分子イオンまたはフラグメントイオンを示すか否かは不明であるが、現在までにははっか油成分として確認されているものの中には該当するものはない。この成分は経時変化を受けた M.Piperita 油にも共通して見出されているが M.Arvensis 油からはいずれも検知できなかった。

ピーク 8 の質量スペクトルは $M^{+} = 154$,ベースピーク m/e93 を示し、m/e136(M-H₂O)以下の主要フラグメントイオンのパターンは Fig.8 のサビネンの質量スペクトルに一致する。またこのピークはガスクロマトグラフ法において標準 trans - サビネンハイドレートと同一 Rt を有し、はっか油と同条件で測定した標準品の質量スペクトルとも完全に一致することから trans - サビネンハイドレートと認められる。

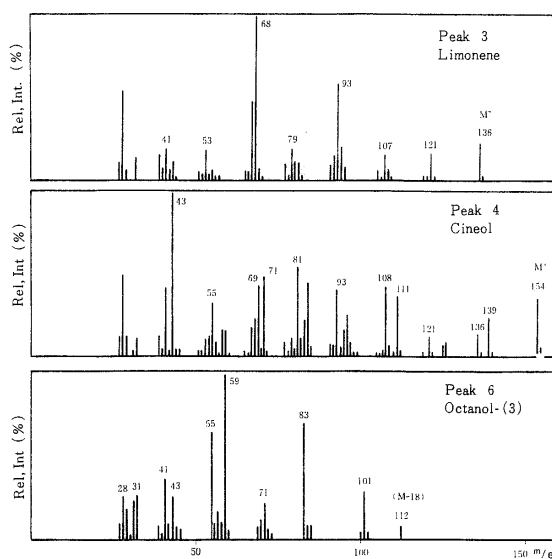


Fig.6 Mass spectra of characteristic constituents in peppermint oils

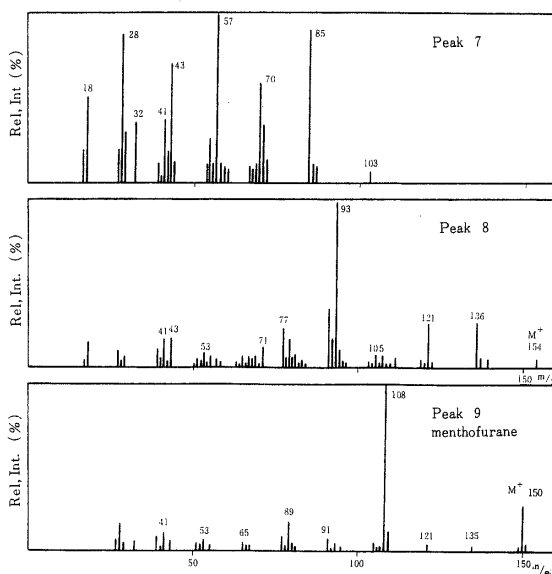


Fig.7 Mass spectra of characteristic constituents in peppermint oils

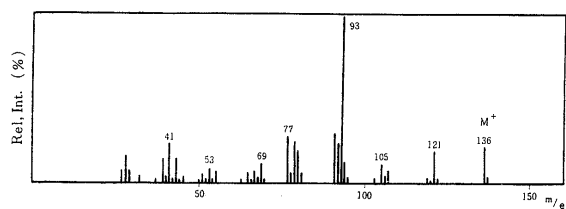


Fig.8 Mass spectra of sabinene

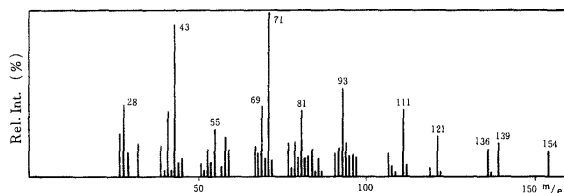


Fig.9 Mass spectra of peak 8 (from Ontario)

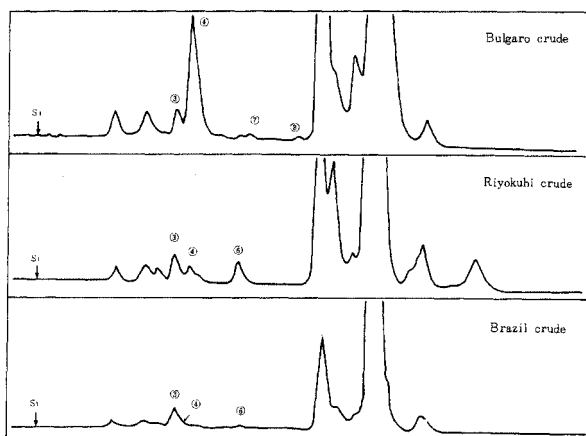


Fig.10 Gas chromatograms of crude oils detected by total ionic monitor
Column SAIB 10% 2m 80 ~ 100 mesh Carrier : He 0.2 kgs/cm²
Temp. : 90 ° ~ 180 4 /min Sample size : 0.4/μl

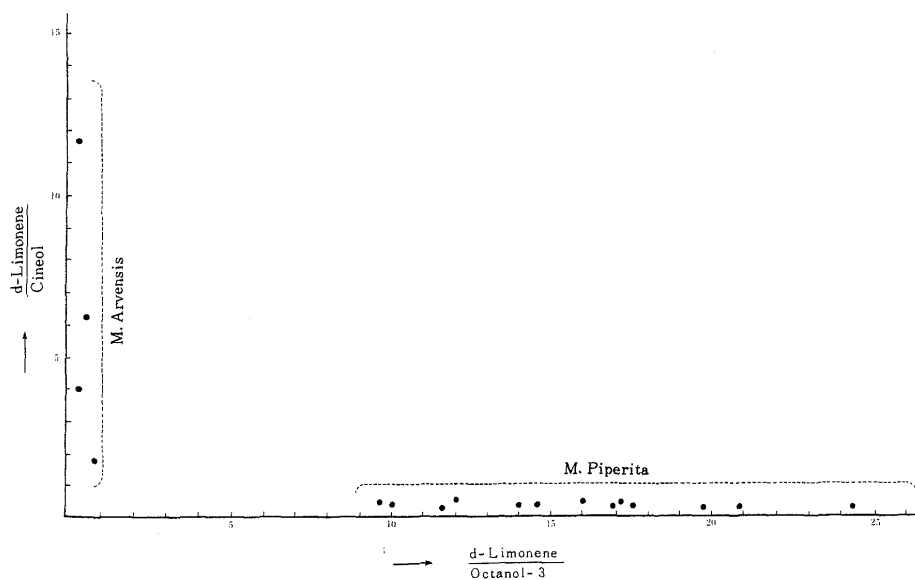
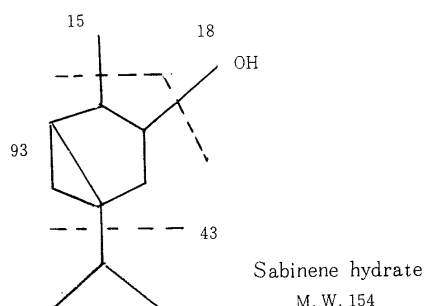


Fig.11 Correlation of d - Limonene/Cineol and Cineol/Octanol - (3)
(by total ionic monitor)



しかし、このピークの質量スペクトルを測定する場合、測定条件によっては Fig.9 に示すサビネンハイドレートと他のテンペンアルコール類が重なったような質量スペクトルが得られた。このスペクトルでは $m/e154$ が比較的強く (約 7%)、ベースピークが $m/e71$ で他のクラブメントイオン $m/e111$, 55, 43 などの強度比からテルピネン - 4 - オールとの重なりが推定される。しかし、このピークはガスクロマトグラフ法で SAIB(4m) および SAIB(2m) + PEG-20M(1m) カラムを用いても分離しない。したがって、この原因としてサビネンハイドレートの一部がカラム出口付近でテンピネン - (4) - オールに転移することによって考えれば質量スペクトル重複の説明はつくものと考えられる。実際、清水ら¹⁵⁾は *Mentha Candicans* の精油中のサビネンハイドレートの転移反応について検討し、水蒸気蒸留によってもテルピネン - (4) - オールへの転移が一部起ることを報告している。なお、*M. Piperita* 油中にはサビネンハイドレートが存在することはすでに報告されている³⁾¹⁶⁾が *M. Arvensis* 油には未知であるので、このサビネンハイドレートははっか油の香気特性とともに鑑別上有効な成分と考えられる。

ブルガリヤ産および日本産取卸油の場合には Fig.10 に示すように、全イオンモニター検知クロマトグラムはそれぞれ *M. Piperita*, *M. Arvensis* の特徴的パターンを示し、試料油 0.4ml の注入によってシネオール、リモネン、オクタノール - (3)、サビネンハイドレートなどの特徴成分を質量スペクトルから確認できた。しかし、ブラジル産取卸油ではメントール含量が非常に高いために同じ条件ではシネオール、オクタノール - (3) は量的にも少なくなり明瞭な質量スペクトルは得られなかった。しかし、ガスクロマトグラムから *M. Arvensis* 系であることは容易に知ることができた。

3・2・3 全イオンモニター検知クロマトグラムによる特徴成分比の検討

3・1 と同様に *M. Arvensis*, *M. Piperita* 油に特徴的なリモネンとシネオールのピーク高さの比およびシネオールとオクタノール - (3) のピーク高さの比を全イオンモニター検知クロマトグラムから求め相互の関係を求めたのが Fig. 11 である。Fig. 2 と同様にこの場合も成分比とははっか油の種との間には相関関係があることは明らかである。

したがって、GC-Mass 法で特徴成分を直接検出すると同時に全イオンモニター検知クロマトグラムを利用してこれらの微量成分比を検討すれば迅速鑑別法として応用することができる。

4. 結 語

ガスクロマトグラフ法によるはっか油の種別鑑定の場合に SAIB カラムを用いれば *M. Piperita* 油の特有成分であるメントフラン、サビネンハイドレートなどを分離検出でき、またリモネンとシネオールのピーク高さの比とオクタノール - (3) とシネオールのピーク高さの比またはシネオールとオクタノール - (3) のピーク高さの比の比較から Smith ら¹⁰⁾が示した方法と同様に種間の違いを明らかにすることができた。

しかも、著者らの方法では経時変化を受けた *M. Piperita* 系ははっか油についても適用可能であった。さらにこれらの結果を GC-Mass 法に適用し、質量スペクトルから直接に特徴成分を確認し、同時に全イオンモニター検知クロマトグラムで成分比を比較し種別を判定する新鑑別法を確立した。なお、GC-Mass 法による鑑別では所要時間は 1 時間で十分である。

おわりに、本研究にあたり試料入手など御協力いただいた函館税関分析室および横浜税関分析室の各位に感謝いたします。

文 献

- 1) F. A. Flückiger : *Pharm. J.* **3** No. 682 (1871).
- 2) I. C. Nigam, Suharabudhe, L. Levi : *Can. J. Chem.*, **41**, 1535 (1963).
- 3) H. Farnow, F. Poroch : *Dragoco Report*, **7**, 163 (1962).
- 4) 多田一郎 : 本誌 No.5, 59 (1967).
- 5) M. Smith, L. Levi : *J. Agr. Food. chem.*, **9**, 230 (1961).
- 6) Byron, Skurubis : P&E. O. R., 511 (1965).
- 7) R. Jaspersen-Siel : *Pharm. Acta Helv.*, **36**, 141 (1961).
- 8) W. F. Hefendehi : *Plant Med.*, **8**, 65 (1960).
- 9) 大野幸雄 : 本誌 No.7, 29 (1968)
- 10) D. M. Smith, J. C. Bartlet, L. Levi : *Anal. chem.*, **32**, 568 (1960).
- 11) 印藤元一, 湯川弘 : 第五回香料, テルペン及び精油化学討論会 (1961).
- 12) W. Tagaki, T. Mitsui : *Bull. Agr. chem. Soc. Japan*, **24**, 217 (1960).
- 13) P. J. Porcaro, J. D. Johnston : *Anal. Chem.*, **33**, 1748 (1961).
- 14) D. R. Moore, A. D. Kossoy : *Anal. Chem.*, **33**, 1437 (1961).
- 15) 清水純夫, 唐沢伝英 : 第 12 回香料, テルペン及び精油化学討論会 (1969).
- 16) J. W. Daly, F. C. Green, R. H. Eastman : *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 6380(1958).

A New Method of Identification of Peppermint Oils by Gas Chromatograph and Mass-Spectrometer Combined with Gas Chromatograph

Yukio ONO, Mitsuo DEKI, Takao IRIE
 Central Customs Laboratory
 531, Iwase, Matsudo-shi, Chiba-ken.

Peppermint oils were examined by gas chromatograph and mass-spectrometer combined with gas chromatograph and new experimental results were obtained.

Menthofurane and Sabinene hydrate which are specified in M.Piperita oils were identified by G.L.C. and GC-Mass method using SAIB column.

In each method the correlation of peak ratio among minor constituents, d-limonene, cineol, octanol-(3), in those oils were found to enable to identify the species.

A new rapid method using GC-Mass technique for identification of peppermint oils was established.

— Received Jan.9, 1971 —