

GC-MS を用いたギンコール酸の定性分析

岸 大暉*, 松本 健志*, 榎本 康敬*, 野口 大*

Qualitative analysis of Ginkgolic Acids by gas chromatography/mass spectrometry

KISHI Daiki*, MATSUMOTO Tsuyoshi*, ENOMOTO Yasuyuki* and NOGUCHI Hiroshi*

*Tokyo Customs Laboratory 2-7-11 Aomi, Koto-ku, Tokyo, 135-8615 Japan

In recent years, Ginkgo Biloba Leaf Extracts are widely sold as health supplements in Japan and medical supplies in Germany and France for the improvement of cerebral circulatory disorders and memory. However, Ginkgo Biloba Leaf contains an allergenic ingredient called Ginkgolic Acids (GAs) in addition to the active ingredient, and when Ginkgo Biloba Leaf Extract is to be added to health foods, it must be purified. On the other hand, Vegetable Extracts are classified under Heading 13.02 in the Customs Tariff Schedule. However, comments for Heading 13.02 of the Customs Tariff Schedule suggests even if it is a Vegetable Extract, it is to be excluded from the heading if the extracted components are highly refined by chromatography or other means. Thus, the purified Ginkgo Biloba Leaf Extract is classified under Heading 21.06 mainly as a food additive. So, we need to check whether Ginkgo Biloba Leaf Extract is purified and suggest analyzing for GAs as one way to judge. In this study, we examined the method of qualitative analysis of GAs contained in Ginkgo biloba leaf by gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS). As a result, we are able to analyze GAs by Trimethylsilyl derivatization of GAs.

1. 緒 言

イチョウの葉を乾燥させ、アルコール又はアセトンで有効成分を抽出したイチョウ葉エキ스는、脳の血管循環などの改善効果が期待され、日本では健康食品の添加物として使用されている。一方、イチョウの葉にはアレルギー物質であるギンコール酸が含まれていることから、健康食品に添加して使用する場合は、精製によりギンコール酸を取り除く必要がある^{1,2)}。特に、ギンコール酸は微量でも摂取すると、接触皮膚炎やアレルギーを引き起こすためイチョウ葉エキスの規格品はギンコール酸の含有量が 5 ppm 以下にすることが公益財団法人日本健康・栄養食品協会により定められている。

イチョウ葉エキ스는イチョウの葉から抽出した成分であるため、関税率表第 13.02 項の植物性エキス（植物原材料から溶剤抽出した植物性生産品）に分類されると考えられる。しかし、同表解説第 13.02 項によると、当初の抽出に続けて、例えば、クロマトグラフ精製、限外ろ過、又は追加の抽出サイクル（例えば、液液抽出）により高度に精製されたもの（以下、「高度に精製したもの」とする。）については、同項から除外するとしている。このことから、イチョウの葉に含まれるギンコール酸を除去するため高度に精製したものは、同表第 13.02 項から除外され、主に食料品の添加物として同表第 21.06 項に分類される。

以上より、同じイチョウ葉エキスでも単純に抽出しただけのものは同表第 13.02 項に分類され、税率は無税となるが、高度に精製したものは同表第 21.06 項等に分類され、関税が課せられることから、通関審査では慎重な対応が求められている。実際、イチ

ョウ葉エキスとして申告された事例では、植物性エキスの同表第 1302.19 号-239（基本税率：無税）であったものが、製造工程表を確認する等の慎重な審査を行ったことで、同表第 2106.90 号-299（協定税率：15%）の食品添加物として分類変更となった事案がある。このため、イチョウ葉エキスの分類を決定するにあたり、インボイスや製造工程表等で確認できない場合、イチョウ葉エキスが精製されているかどうか分析する必要がある。その判断材料の一つとして、ギンコール酸を分析することが挙げられる。

ギンコール酸は、Fig.1 に示すとおりサリチル酸骨格に炭化水素鎖が結合した化合物である。炭化水素鎖には 5 種類あり、それぞれの違いは直鎖の炭素数及び二重結合の有無だけである。これらを総称してギンコール酸としていることから、イチョウ葉エキスの適正な分類のためには、構造が非常に類似しているうえ、含有量が微量である 5 種類の化合物の分離を行い検出する分析方法を確立する必要がある。

本研究では、イチョウ葉エキ스에含まれるギンコール酸のガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）による定性分析方法について検討したので報告する。

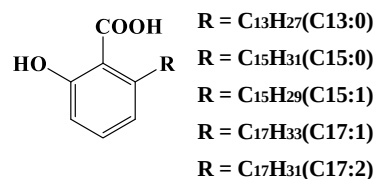


Fig.1 Chemical Structure of Ginkgolic Acids(GAs).

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

2.1.1 試料

イチョウの葉 (東京都内採集)

2.1.2 標準物質 (5 種類)

ギンコール酸 C13:0 $\geq 99\%$ (HPLC) (長良サイエンス (株))
 ギンコール酸 C15:0 $\geq 99\%$ (HPLC) (長良サイエンス (株))
 ギンコール酸 C15:1 $\geq 99\%$ (HPLC) (長良サイエンス (株))
 ギンコール酸 C17:1 $\geq 99\%$ (HPLC) (長良サイエンス (株))
 ギンコール酸 C17:2 $\geq 96\%$ (SHANGHAI TAUTO BIOTECH
 CO., LTD.)

2.1.3 トリメチルシリル(TMS)誘導体化剤

N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamide (以下「BSA」という)
 (GL Sciences)

N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (以下「BSTFA」という) (GL
 Sciences)

N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (以下「MSTFA」という)
 (GL Sciences)

2.1.4 その他の試薬

クロロホルム (関東化学, 鹿 1 級)
 無水硫酸ナトリウム (和光純薬, 特級)

2.2 分析装置及び測定条件

2.2.1 分析装置

ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS)
 7890B/5977B (Agilent Technologies 社製)

2.2.2 測定条件 (ギンコール酸)

Mei Wang ら³⁾の方法を参考に検討した条件を以下に示す.

カラム : DB-5MS (30 m $\times$ 0.25 mm I.D., 膜厚 0.25 μ m)
 (Agilent Technologies 社製)

注入口温度 : 280 $^{\circ}$ C

注入量 : 1 μ L

スプリット比 : 10:1

オープン温度 : 150 $^{\circ}$ C (1 min) $\rightarrow$ (10 $^{\circ}$ C /min) $\rightarrow$ 230 $^{\circ}$ C
 (2 min) $\rightarrow$ (2 $^{\circ}$ C /min) $\rightarrow$ 260 $^{\circ}$ C (5 min)

キャリアーガス : ヘリウム (1 mL/min)

イオン化法 : EI 法

2.2.3 測定条件 (ギンコール酸 TMS 誘導体化)

Agus Sukito ら⁴⁾の方法を参考に検討した条件を以下に示す.

カラム : DB-5MS (30 m $\times$ 0.25 mm I.D., 膜厚 0.25 μ m)
 (Agilent Technologies 社製)

注入口温度 : 280 $^{\circ}$ C

注入量 : 1 μ L

スプリット比 : 10:1 (イチョウ葉エキ스는 100:1)

オープン温度 : 100 $^{\circ}$ C $\rightarrow$ (15 $^{\circ}$ C /min) $\rightarrow$ 240 $^{\circ}$ C (30 min) $\rightarrow$

(10 $^{\circ}$ C /min) $\rightarrow$ 320 $^{\circ}$ C

キャリアーガス : ヘリウム (1 mL/min)

イオン化法 : EI 法

2.3 実験

2.3.1 標準物質の試料調製

標準物質 (5 種類) をクロロホルムに溶解し, 約 1 mg/mL の溶液を測定試料とした. また, TMS 誘導体化は標準物質 (5 種類) 約 0.5 mg をクロロホルム 0.5 mL に溶解し, TMS 誘導体化剤 0.1 mL 加え, 90 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱したものを測定試料とした.

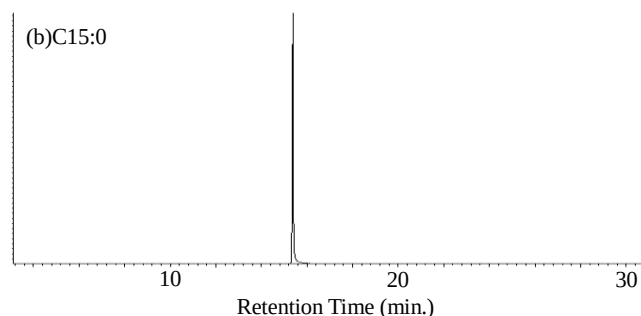
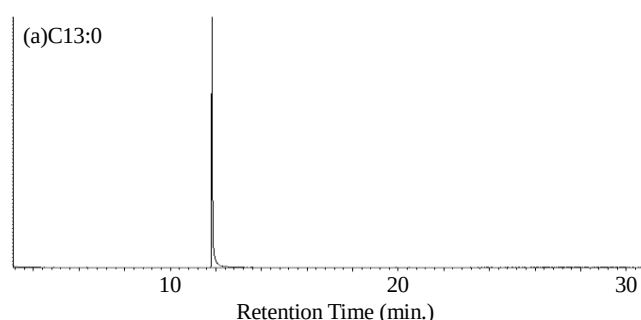
2.3.2 イチョウの葉の抽出及び試料調製

イチョウの葉を細かく刻み, 常圧, 105 $^{\circ}$ C, 6 時間乾燥したものを 200 mL 三角フラスコに約 30 g 加えた. そこに 150 mL のクロロホルムを加え, 6 時間超音波振動をかけ抽出した後, ろ過して 10 mL まで減圧濃縮し, 無水硫酸ナトリウムを用いて脱水した. この溶液 0.5 mL に TMS 誘導体化剤を 0.1 mL 加え, 90 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱した. 加熱後, 再びクロロホルムを加え, 全量を 1 mL に調製したものを測定試料とした.

3. 結果及び考察

3.1 ギンコール酸の測定結果と考察

2.2.2 の条件における, 標準物質 (5 種類) のトータルイオンカレントクロマトグラムを Fig.2 に示す. Fig.2(a), (b) 及び (e) より, C13:0, C15:0 及び C17:2 では単一のピークが観測された. 一方, Fig.2(c) 及び (d) より, C15:1 では 2 本, C17:1 では 3 本のピークが観測された. これは, Fig.3 に示すように C15:1 は二重結合が分子内に (点線部分) 2 か所, C17:1 は 3 か所存在しているからである⁴⁾. つまり, C15:1 には 2 種類, C17:1 には 3 種類の異性体が存在しているためほぼ同一の保持時間に複数のピークが観測される.



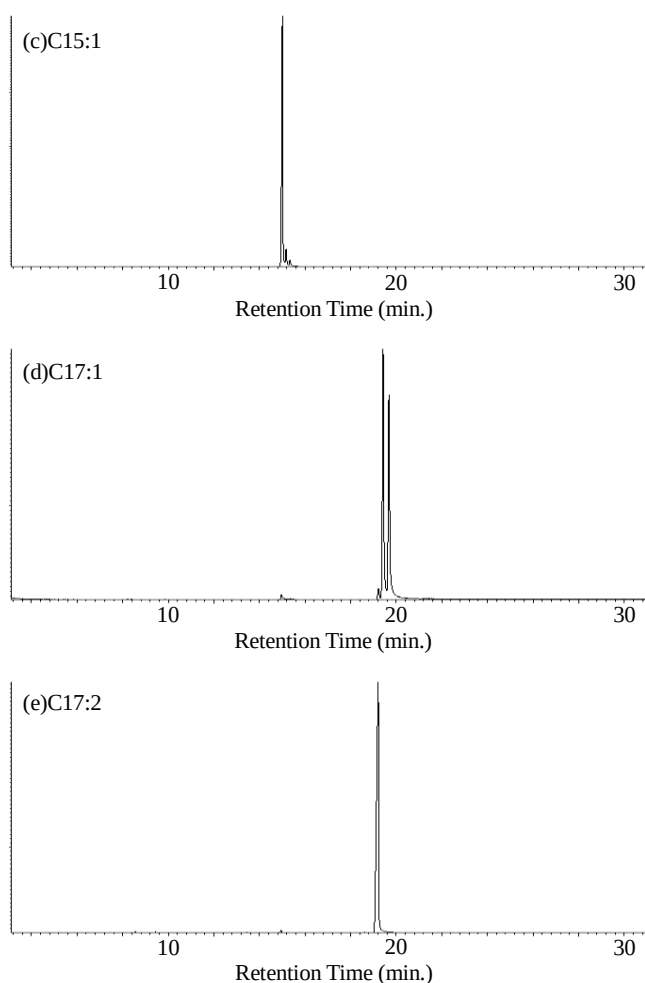


Fig.2 Total ion chromatograms of GAs.
(a)C13:0, (b)C15:0, (c)C15:1, (d)C17:1, (e)C17:2

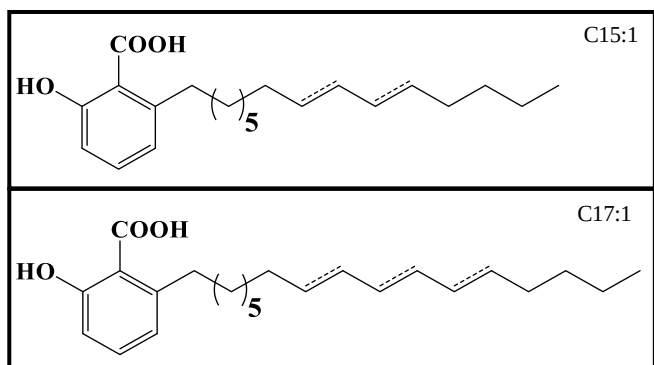
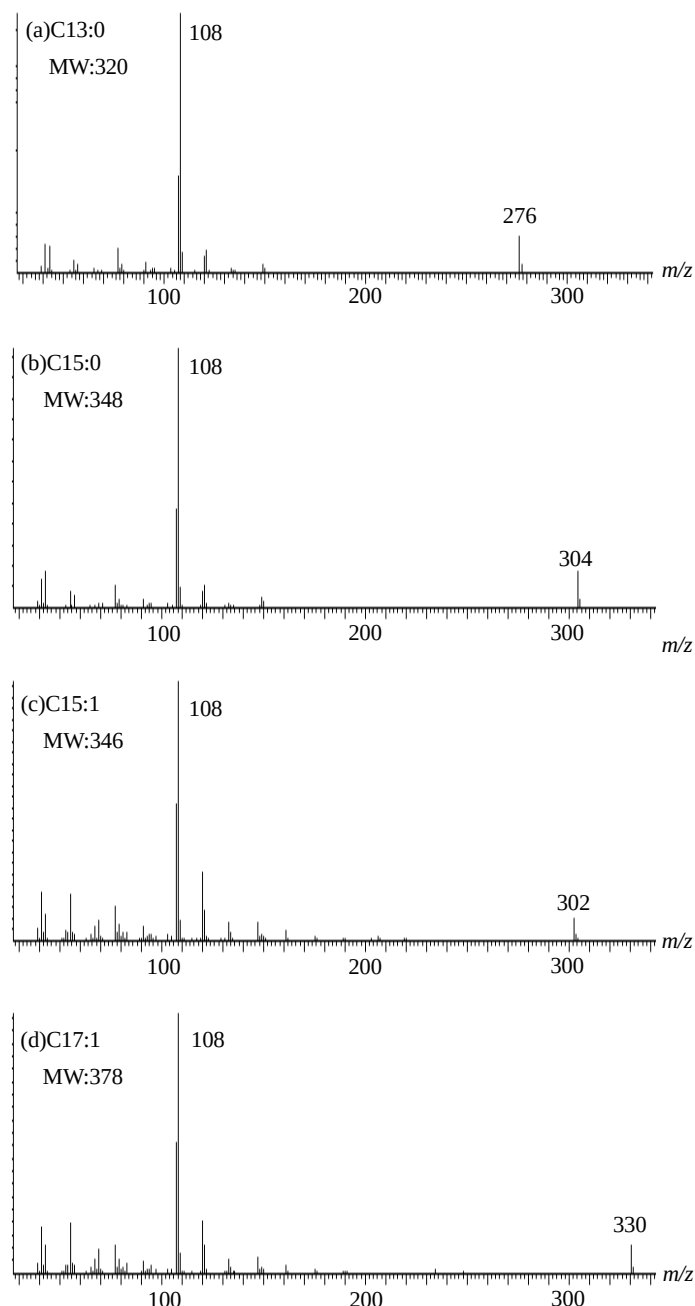


Fig.3 Localization of the double bond in GAs(C15:1 and C17:1)

3.2 ギンコール酸のマススペクトル解析及び考察

Fig.2 における保持時間(RT)が(a)11.83 min, (b)15.38 min (c)15.01 min, (d)19.42 min 及び(e)19.21 min のピークのマススペクトルを Fig.4 に示す. マススペクトルを解析した結果, すべてのマススペクトルで m/z 108 のフラグメントイオンピークが観測された. これは, ギンコール酸のベンジル位での結合開裂によるものと考えられる. また, Fig.4(a)C13:0 からは m/z 276, (b)C15:0 からは m/z 304,

(c)C15:1 からは m/z 302, (d)C17:1 からは m/z 330, (e)C17:2 からは m/z 328 の特徴的なフラグメントイオンピークがそれぞれ観測されたが, 分子イオンピークはいずれからも観測されなかった. これは, ギンコール酸の性質の一つとして, 200 °C 以上に加熱すると脱炭酸を起こし⁵⁾, CO₂の分子量(44)だけ減少したためと考えられる. しかし, その場合カルボキシ基の置換基がないアルキルフェノール(カルダノール)のマススペクトルと区別することができない. そこで, 本研究では TMS 誘導体化の検討を行った.TMS 誘導体化剤としては, 今回 3 種類(BSA, BSTFA 及び MSTFA)を使用し, その挙動を確認した.



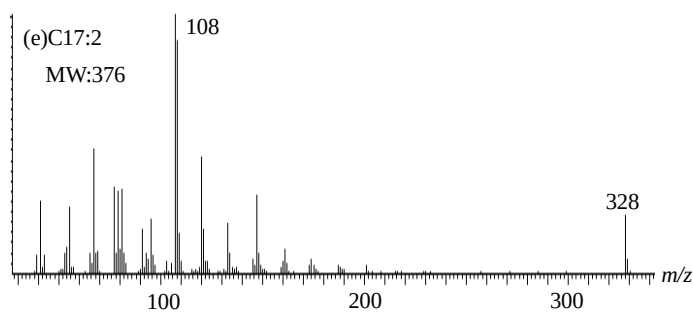


Fig.4 EI-MS spectrum of GAs.
(a)C13:0, (b)C15:0, (c)C15:1, (d)C17:1, (e)C17:2

3.3 ギンコール酸 (TMS 誘導体化) の測定結果

3 種類の TMS 誘導体化剤を用いて誘導体化を行い、2.2.3 の条件で測定した結果、TMS 誘導体化剤 3 種類すべてで反応が進行し、誘導体化物のマススペクトルについても TMS 誘導体化剤の種類に関わらず同様の結果が得られた。代表として C15:0 を誘導体化したトータルイオンカレントクロマトグラムを Fig.5 に示す (マススペクトルについては Fig.7(b)参照)。また、3 種類の TMS 誘導体化剤のうち MSTFA を用いて標準物質 (5 種類) を誘導体化したもののトータルイオンカレントクロマトグラムを Fig.6 に示す。

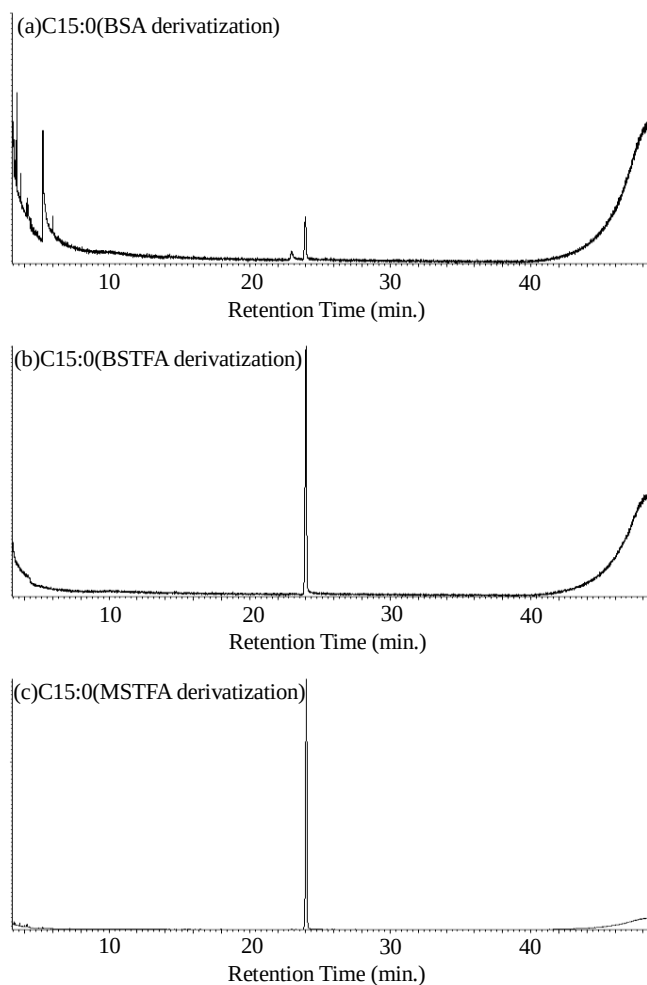


Fig.5 Total ion chromatograms of TMS derivatization of GAs(C15:0).
(a)BSA, (b)BSTFA, (c)MSTFA

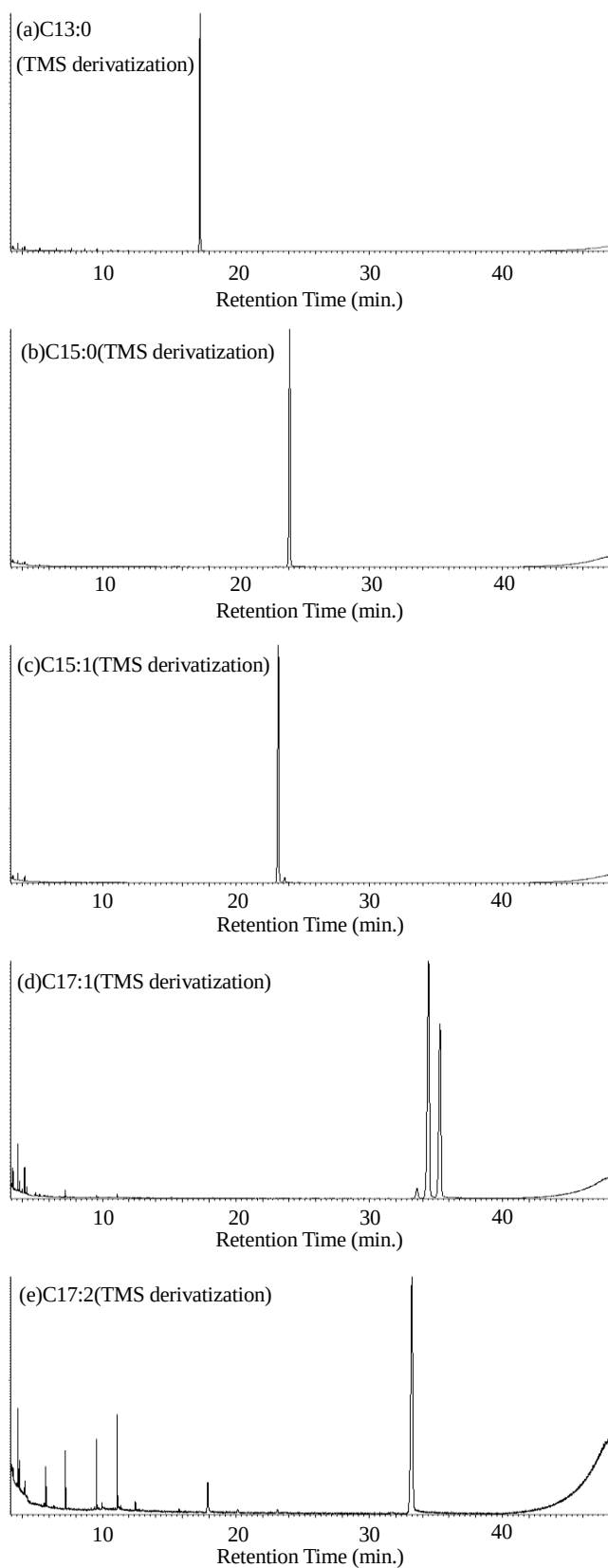


Fig.6 Total ion chromatograms of TMS derivatization of GAs.
(a)C13:0, (b)C15:0, (c)C15:1, (d)C17:1, (e)C17:2

3.4 ギンコール酸 (TMS 誘導体化) のマスペクトル解析及び考察

Fig.5 において, 3 種類の TMS 誘導体化剤すべてで反応が進行し、マスペクトルについても同様の結果が得られたが, BSA については BSTFA 及び MSTFA とは異なりピークが小さくなってしまった. このことから, ギンコール酸を TMS 誘導体化には, BSTFA または MSTFA が向いていると考えられる.

Fig.6 において保持時間(RT)が(a)17.31 min, (b)24.04 min (c)23.19 min, (d)34.46 min 及び(e)33.20 min のピークのマスペクトルを Fig.7 に示す. マスペクトルを解析した結果, すべてのマスペクトルで m/z 73 のフラグメントイオンピークが観測された. これは, $[\text{Si}(\text{Me})_3]^+$ のイオンが観測されたと考えられる. また, それぞれのマスペクトルから, Fig.7(a)C13:0 (TMS 誘導体化) からは m/z 449, (b)C15:0 からは m/z 477, (c)C15:1 からは m/z 475, (d)C17:1 からは m/z 503, (e)C17:2 からは m/z 501 のフラグメントイオンピークがそれぞれ観測された. これは, Si-C 結合の開裂によりメチル基が脱離して生じたイオンと考えられる. また, 誘導体化前に観測されなかった分子イオンピークが, 誘導体化することで観測された. 以上のことから, ギンコール酸の TMS 誘導体化は進行していると判断できる.

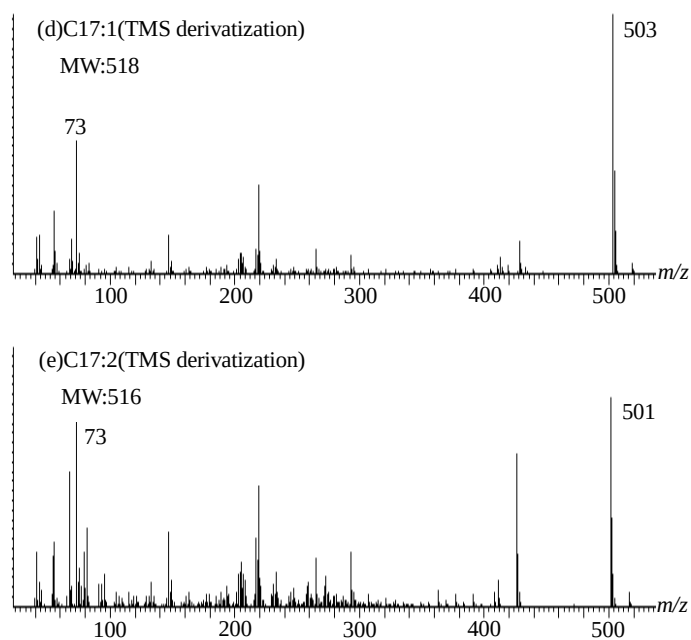
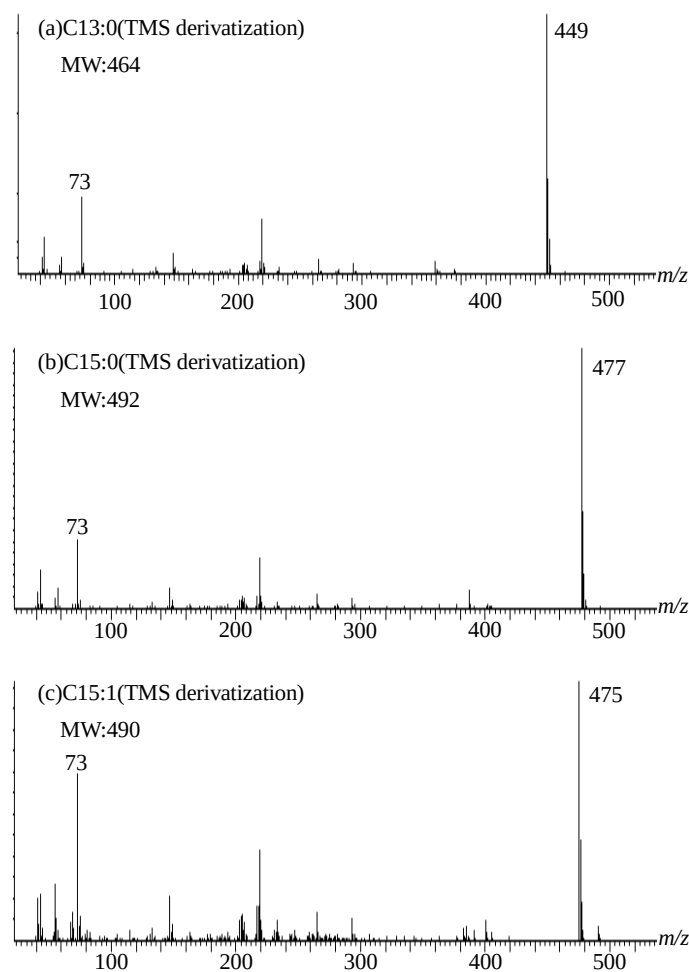


Fig.7 EI-MS spectrum of TMS derivatization of GAs.
(a)C13:0, (b)C15:0, (c)C15:1, (d)C17:1, (e)C17:2

3.5 イチョウの葉から抽出したエキスの測定結果及び考察

2.3.2 で調製した試料を測定したトータルイオンカレントクロマトグラム及び RT15~38 min を拡大したクロマトグラムを Fig.8 に示す. Fig.8(b)①~⑤のピークのマスペクトルから Fig.7 で得られたマスペクトルと同じ結果が得られた. このことから, イチョウの葉に含まれるギンコール酸を測定することができた. また, Fig.8 の(b)で観測された C15:1 及び C17:1 のピークと Fig.6(c) 及び(d)のピーク強度に異なっている. これは, 標準物質に含まれる異性体の量とイチョウの葉に含まれるギンコール酸の異性体の量の違いによるものと考えられる.

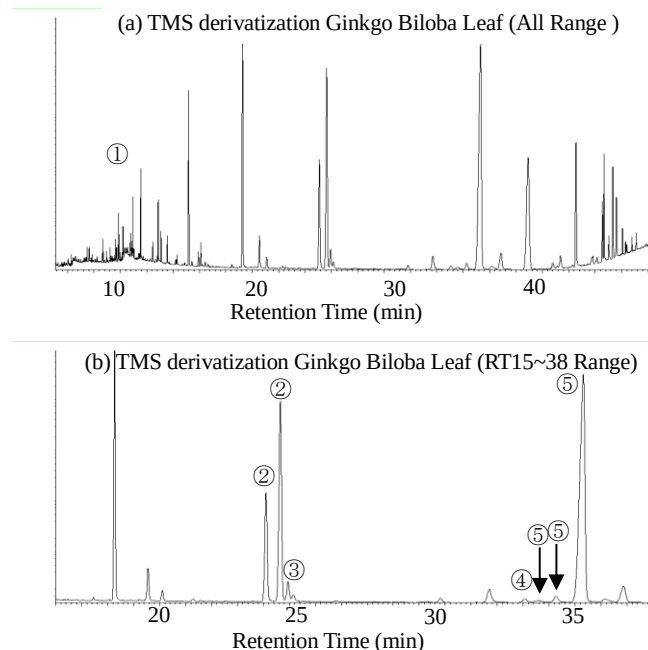


Fig.8 Total ion chromatograms of TMS derivatization of Ginkgo Biloba Leaf.
(a)All Range, (b)RT15~38 Range

4. 要 約

5 種類のギンコール酸の標準物質をクロロホルムに溶解し、GC-MS で測定して得られたマススペクトルについて解析を行った。その結果、ギンコール酸が加熱により脱炭酸を起こすことが確認された。次に、ギンコール酸とギンコール酸から脱炭酸した化合物（カルダノール）を区別するため、ギンコール酸の TMS 誘導体化を検討した。その結果、TMS 誘導体化は進行し、ギンコール酸

特有のマススペクトルが得られた。この条件を用いてイチヨウの葉を分析した結果、ギンコール酸 5 種類を全て検出することができ、ギンコール酸の定性分析が可能となった。

文 献

- 1) 中嶋順一，安田一郎，浜野朋子，塩田寛子，重岡捨身，蓑輪佳子，岸本清子，守安貴子，高橋美佐子：東京健安研セ年報，**54**，109-114 (2003)
- 2) 独立行政法人 国民生活センターホームページ 「イチヨウ葉食品の安全性」 (<http://www.kokusen.go.jp/pdf/n-20021125.pdf>)
- 3) Agus Sukito and Sanro Tachibana : *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **17 (11)**, 1170-1178 (2014).
- 4) Mei Wang, Jianping Zhao, Bharathi Avula, Yan-Hong Wang, Cristina Avonto, Amar G. Chittiboyina, Philip L. Wylie, Jon F. Parcher and Ikhlas A. Khan : *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62**, 12103-12111 (2014).
- 5) 化学大辞典編集委員会編：“化学大辞典”，第2巻，P.909(1960)，(共立出版株式会社)