

健康食品に含まれる ginkgolic acids の分析

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*

Analysis of Ginkgolic Acids in Health Foods

Junichi NAKAJIMA*, Ichiro YASUDA*, Tomoko HAMANO*, Hiroko SHIODA*, Sutemi SHIGEOKA*,
 Keiko MINOWA*, Kiyoko KISHIMOTO*, Takako MORIYASU* and Misako TAKAHASHI*

Ginkgolic acids (GA) are the major components in the lipid fraction of the fruit pods of *Ginkgo biloba* L. These substances are also present in ginkgo leaves, which are widely sold as health foods in Japan for improvement of peripheral or cerebral circulatory disorders as well as vascular and Alzheimer-type dementia.

GA are said to be allergenic, so there is a fear of causing health damage by taking ginkgo health foods. According to the regulation of the Commission E in Germany, the GA contents in ginkgo extract that is classified as medicine must be below 5 ppm. To meet this severe level of GA contents, an analytical method using LC-MS has been reported in some literatures. LC-MS is certainly very sensitive and accurate in analyzing GA, but it is too expensive and troublesome for routine work.

To solve these problems, we isolated five kinds of GA, GA1~5, and developed a new method for the determination of GA by HPLC-fluorescence detector. With this new method, we made an investigation of the total GA contents in commercial samples, and discussed the quality of ginkgo health foods.

Keywords : イチョウ *Ginkgo biloba* L., ギンコール酸 ginkgolic acids, イチョウ葉 *Ginkgo biloba* L. leaf, イチョウ葉エキス *Ginkgo biloba* leaf extract, 蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ HPLC-FL, 健康食品 health foods

緒言

イチョウ葉を素材とした健康食品は、日本では脳循環や代謝改善が期待され、広く流通している。Ginkgolic acids (GA) は、イチョウ種皮や葉に含まれる脂溶性の化合物でアレルギー作用があるといわれ¹⁾、ドイツやフランスではこれを除去したイチョウ葉エキスが医薬品として用いられている。特にドイツでは、イチョウ葉エキス中の GA 含量を 5 ppm 以下とする基準(ドイツ医薬品規格)を設定して品質の確保に努めている²⁾。

日本ではイチョウ葉を素材とした健康食品は食品として流通しているが、GA 含量に関する規格や規制はない。しかし近年 GA によると思われる湿疹などの皮膚障害や、腹痛などの消化器障害といった健康被害の報告²⁾が多くなっており、GA 摂取に関する上限値設定が望まれている。

GA の測定には HPLC-MS を用いた分析方法が報告されているが³⁾、MS を用いた分析は、機器が高額であること、機器の維持管理が煩雑であるなど、日常の分析には難しいとの指摘もある。このような現状を踏まえ、GA を感度良く、しかも低コストで分析できる方法を開発する必要があ

ると考え、GA の光学的性質を利用した蛍光検出器付き HPLC (HPLC-FL) による分析方法を開発した。また本法を用いて市販製品の GA 分析を試み、健康食品に含有される GA の含量を測定した。更に日本では葉を茶剤として服用するという摂取方法もあることから、温湯に溶出する GA の量について考察を加えた。

なお実験にあたり、標準品 GA については GA1~5 の 5 種を植物から精製単離した。また分析値の議論は GA1~5 をそれぞれ分別定量し、合算して行った。

材料及び方法

1. 分析試料、試薬及び機器

分析試料：都内に流通する健康食品で、イチョウ葉エキスを使用していると表示されている 12 製品(No.1~12)及び葉を主原料とした 6 製品(No.13~18)。

試薬：蛍光分析用試薬は関東化学製、その他の試薬は和光純薬製特級を用いた。

機器：HPLC；日本分光製ガリバーシリーズ、データ処理 Borwin DP-L1500W、オートサンプラー AS-950、ポン

* 東京都健康安全研究センター医薬品部医薬品研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

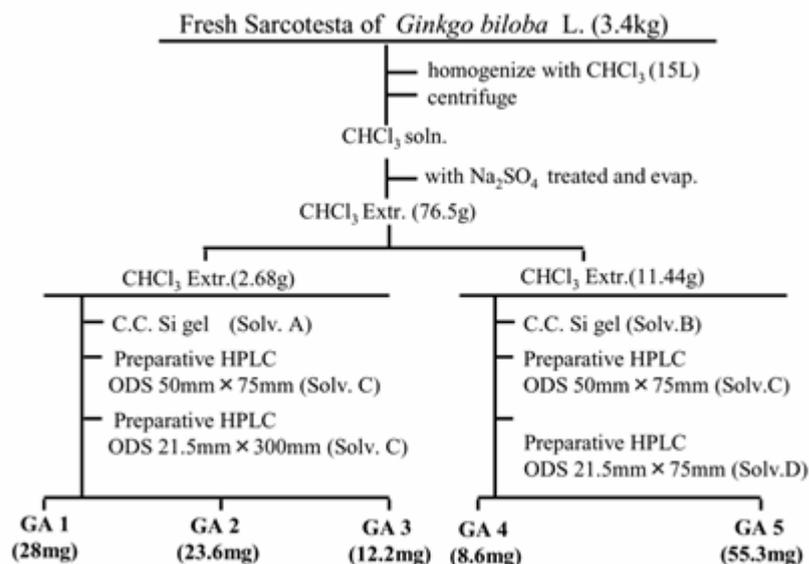


Fig.1. Flow Diagram of Isolation for GA1 ~ 5

Solv. A : CHCl₃ : MeOH (99:1)Solv. B : CHCl₃ : MeOH (99:2)Solv. C : MeOH : H₂O : CH₃COOH (90:9:1)Solv. D : MeOH : H₂O : CH₃COOH (85:14:1)

PU-980, カラムオープン CO-965, 紫外外部検出器 UV-970, 蛍光検出器 FP-920S, 分取 HPLC; 東ソー製全自動分取システムコントローラー SC-8020, オートサンプラー AS-8071, ポンプ CAPP-M, カラムオープン CO-8020, 紫外外部検出器 UV-8020, フラクションコレクター FC-8020. 分光蛍光光度計; 日本分光製 FP-750. NMR; 日本電子製 Alpha 500 型スペクトロメーター (500MHz). HPLC-MS; HPLC, Waters 製 alliance 2690, ESI-MS, Waters 製 ZMD2000.

2. GA 標準品

平成 12 年 9 月に東京都新宿区内で採集したイチヨウ種皮 3.4 kg を用い, Fig.1 に従い, 標準品として GA1~5 (Fig.2) を精製単離した.

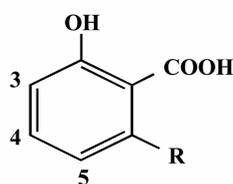
GA 1 : R = C₁₃H₂₇ (C13:0)GA 2 : R = C₁₅H₂₉ (C15:1)GA 3 : R = C₁₇H₃₁ (C17:2)GA 4 : R = C₁₅H₃₁ (C15:0)GA 5 : R = C₁₇H₃₃ (C17:1)

Fig.2. Chemical Structures of GA1 ~ 5

3. HPLC 用標準溶液の調製

上記で得た GA1~5 を一晩常温で減圧乾燥後, それぞれ正確に量り, 約 1,000 ppm のメタノール溶液を調製した. これをメタノールで希釈及び混合して 5 種類の GA を含む約 5 ppm と 0.02 ppm の溶液を HPLC 用標準溶液とした.

4. HPLC 条件

HPLC-FL: カラムは TSKgel ODS-80T_M, 4.6 × 150 mm (東ソー製), カラム温度は 40, 移動相はメタノール: 水: 酢酸 (90:9:1), 流速は 1.0 mL/min, 蛍光検出器の

測定波長は, Ex 299nm, Em 407nm, 注入量は 25 μL とした. HPLC-UV: 紫外外部検出器の測定波長は, 242 nm に設定し, その他は HPLC-FL と同じ条件とした.

HPLC-MS: カラムは TSKgel ODS-100S 2.0 × 150 mm (東ソー製), カラム温度および移動相は HPLC-FL と同じ条件とした. 流速は 0.2 mL/min, ESI-MS: イオン化エネルギーが 60 eV, それぞれの [M-H]⁻ を測定した. 注入量は 5 μL とした.

5. HPLC 用試料溶液の調製

試料を粉末とし, No.1~12 については, 表示される 1 日摂取量を正確に量り, HPLC 移動相を 10 mL 加え 30 分間激しく振とうさせたのち, 遠心分離 (3,000 rpm × 10min) を行い, 上澄液を分別した. 残さに同じ処理を再度行い, 上澄液を合わせ, 同液で全量を正確に 25 mL とし, その一部 0.45 μm のフィルターを通して HPLC 用試料溶液とした. No.13~18 については, 約 0.25 g を正確に量り, 同液 10 mL を加え, 同様の処理を行った.

結果および考察

1. 標準品 GA の同定

単離した GA1~5 について, ¹H-NMR, ¹³C-NMR を測定した結果を Table1 に示した. 質量分析は ESI-MS により測定した. [M-H]⁻: GA1 (m/z=319), GA2 (345), GA3(371), GA4(347), GA5(373). これらのデータを文献⁴⁾と比較し, Fig.2 に示すアルキルフェノールと同定した.

2. 分析方法の検討

(1) 抽出溶媒および抽出回数

No.16 を用い, HPLC 移動相, N-N-ジメチルホルムアミド, 1% 酢酸・ヘキサン (1:1) 混液による抽出効率を比較検

Table 1. Recorded ^1H and ^{13}C -NMR Data (ppm) of GA1 ~ 5 in CDCl_3

Compound		COOH	1	2	3 ^a	4 ^b	5 ^c	6	sidechains
GA1	^1H	11.09	—	—	6.87	7.36	6.78	—	2.95 (2H, t, 8.0Hz), 1.58 (2H,m), 1.24 (m), 0.86 (3H, t, 7.0H)
	^{13}C	176.3	110.4	163.6	115.9	135.5	122.8	147.9	36.5, 32.0, 31.9, 29.8, 29.7, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 22.7, 14.1
GA2	^1H	10.98	—	—	6.88	7.36	6.79	—	5.34 (2H, m, CH=CH), 2.97 (2H, t, 7.6Hz), 2.00 (4H, m), 1.59 (2H,m), 1.27 (m), 0.87 (3H, t, 7.0Hz)
	^{13}C	176.3	110.4	163.6	115.9	135.5	122.8	147.8	129.9, 129.8, 36.5, 32.0, 31.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 29.0, 27.2, 26.9, 22.7, 22.3, 14.1
GA3	^1H	11.05	—	—	6.87	7.36	6.78	—	5.36 (4H, m, CH=CH), 2.97(2H, t, 8.0Hz), 2.77(2H, m), 2.05(4H,m) 1.59(2H,m), 1.32(m), 0.88 (3H, t, 7.4Hz)
	^{13}C	176.3	110.3	163.6	115.8	135.3	122.7	147.7	130.2, 130.1, 128.0, 127.9, 36.5, 32.0, 31.5, 29.8, 29.7, 29.3, 29.2, 27.2, 25.6, 22.6, 14.1
GA4	^1H	11.01	—	—	6.87	7.36	6.78	—	2.95 (2H, t, 8.0Hz), 1.59 (2H,m), 1.25 (m), 0.88 (3H, t, 6.7H)
	^{13}C	176.3	110.3	163.6	115.8	135.4	122.7	147.7	36.5, 32.0, 31.9, 29.8, 29.7, 29.5, 29.4, 22.7, 14.1
GA5	^1H	11.01	—	—	6.87	7.36	6.78	—	5.33 (2H, m, CH=CH), 2.97 (2H, t, 7.9Hz), 2.00 (4H, m), 1.59 (2H,m), 1.27 (m), 0.87 (3H, t, 6.8Hz)
	^{13}C	175.8	110.4	163.6	115.9	135.4	122.8	147.9	129.9, 129.8, 36.5, 32.0, 31.9, 31.8, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3, 29.0, 27.2, 22.7, 14.1

a:dd with $J=8.3$ and 1.0Hz , b:dd with $J=7.6$ and 8.3Hz , c:dd with $J=7.6$ and 1.0Hz

討した。その結果, Fig.3 に示すように, HPLC 移動相による抽出が最も効率が高いことが判明した。また, HPLC 移動相による振とう抽出を 2 回行うことで, GA のほぼ全量が抽出された。

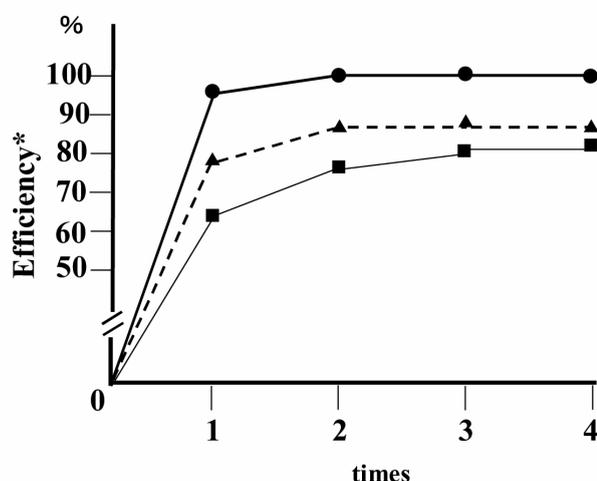


Fig.3. Efficiency of Extraction with Different Solvents

*Efficiency was calculated by total GA

: MeOH:H₂O:CH₃COOH (90:9:1)

: 1%CH₃COOH/n-Hexane

: N,N-Dimethylformamide

(2) GA の極大励起波長および極大蛍光波長の検索

GA1 ~ 5 について, 約 5 ppm の蛍光分析用メタノール溶液を調製し, セル長 1 cm の石英セルを使用して, 極大励起波長(Ex)および極大蛍光波長(Em)を分光蛍光光度計のサーチ機能により測定した。GA1 ~ 5 のいずれも, 極大 Ex は 299 nm, 極大 Em は 407 nm であった。また Fig.4 に

示すように, サリチル酸は, それぞれ 295 nm と 403 nm で, その波長パターンが GA1 ~ 5 と酷似していたことから, GA の蛍光現象はアルキル基のオルト位のカルボン酸とメタ位の水酸基, そしてベンゼン環により生じているものと推察された。

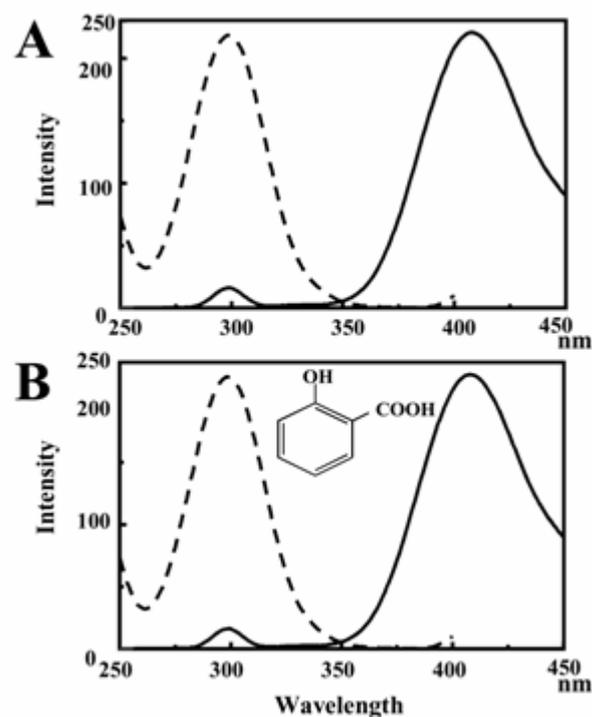


Fig.4. Comparison of Fluorescence Spectra Patterns of GA1(A) and salicylic acid(B) in MeOH

..... : Excitation spectrum,

———— : Emission spectrum

(3) 各検出器による GA の検出限界値の比較

GA1~5 のメタノール溶液について HPLC を行い UV, FL, ESI-MS の検出器の違いによる検出限界値を S/N=3 で比較した。Fig.5 に各検出器による HPLC クロマトグラムを、Table 2 には検出限界値を示した。この結果、FL は ESI-MS より 12~13 倍程感度が低いが、UV と比較して概ね 100 倍感度が高かった。

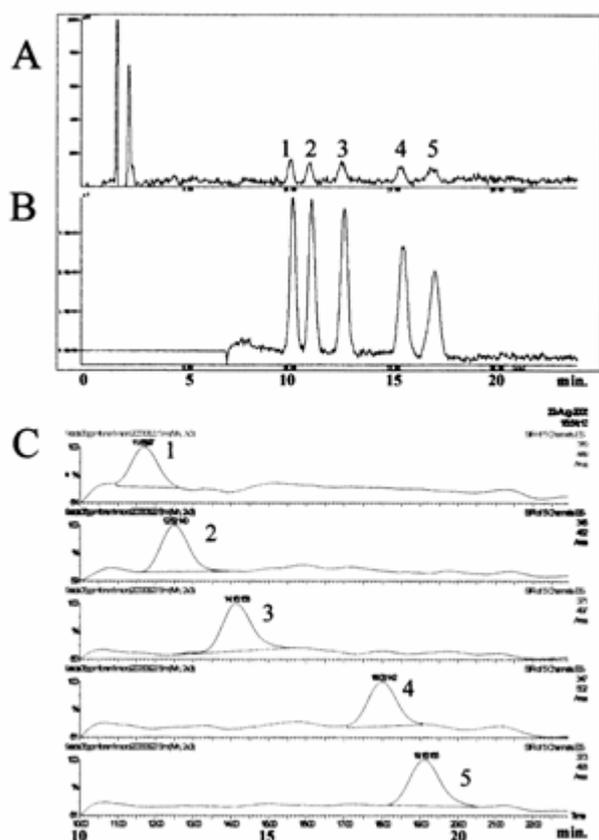


Fig.5. HPLC Chromatograms of GA1~5 by Different Detectors
1:GA1, 2:GA2, 3:GA3, 4:GA4, 5:GA5.
Detector:A;UV, B;FL, C;ESI-MS.

Table 2. Detection Limits (ng, S/N=3) of GA1~5 by Different Detectors

Compound	UV	FL	ESI-MS
GA 1	4.8	0.05	0.004
GA 2	5.2	0.05	0.004
GA 3	8.4	0.08	0.006
GA 4	6.8	0.07	0.006
GA 5	3.2	0.06	0.004

(4) 検量線

GA1~5 の各々について、ピーク高さより検量線を作成し、相関係数を求めた。Table 3 に示すように、いずれも

広い濃度範囲で良好な直線性が得られた。

Table 3. Determination Range and Linearity of GA1~5 by HPLC-FL

Compound	Determination range (ng)	Calibration curve (Correlation coefficient)
GA 1	0.095 - 237.0	$y = 7550.7x - 686.1$ (1.000)
GA 2	0.105 - 262.5	$y = 6856.9x - 870.6$ (1.000)
GA 3	0.166 - 415.5	$y = 4292.5x - 1801.8$ (1.000)
GA 4	0.137 - 342.0	$y = 3999.7x - 1551.1$ (1.000)
GA 5	0.128 - 320.0	$y = 3434.2x + 48.2$ (1.000)

(5) 繰り返し精度

No.16 を用い、6 回のサンプリングによる繰り返し精度を求め、Table 4 にその結果を示した。また Fig.6 にその HPLC クロマトグラムを示した。クロマトグラムから明らかのように、GA3, 4 はそれぞれ GA2, 5 の大きなピークに隣接する微小ピークであるため、変動係数(C.V.)は大きな値を示したが、GA1, 2, 5 はいずれも 1% 前後と良好であった。

Table 4. Repeatability of GA1~5 by HPLC-FL (n=6)

Compound	Average ($\mu\text{g/g}$)	S.D.	C.V. (%)
GA 1	697	11.3	1.6
GA 2	2789	27.5	1.0
GA 3	192	8.2	4.3
GA 4	244	13.0	5.3
GA 5	4928	45.1	0.9

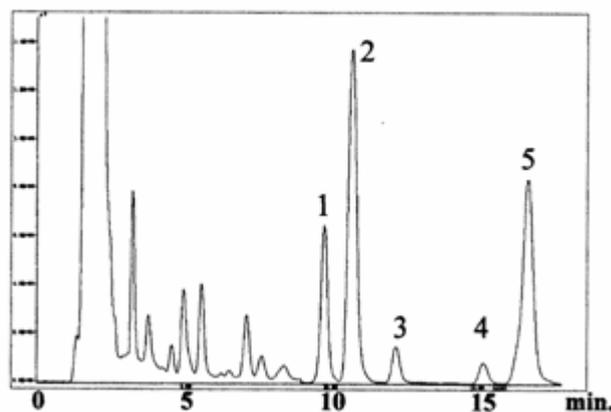


Fig.6. HPLC-FL Chromatogram of Ginkgo Health Food (No.16)
1:GA1, 2:GA2, 3:GA3, 4:GA4, 5:GA5.

Table 5. GA Contents ($\mu\text{g}/\text{day}$) in Commercial Health Foods (supplement type)

Sample No.	GA 1	GA 2	GA 3	GA 4	GA 5	Total
1	t	t	t	t	t	—
2	t	t	t	t	t	—
3	t	t	t	t	t	—
4	t	t	t	t	t	—
5	t	t	t	t	t	—
6	t	t	t	t	t	—
7	32	76	15	23	5	151
8	40	114	4	17	88	263
9	11	80	15	26	121	253
10	45	90	10	4	171	320
11	116	270	45	27	336	794
12	152	335	39	37	802	1365

t: less than detection limit, — : less than $0.31 \mu\text{g}/\text{day}$

Sample No.1 and 11: tincture, No.2~6, 9~10: tablet, No.7~8 and 12: capsule.

Table 6. GA Contents (mg/pack) in Commercial Health Foods (raw material type)

Sample No.	GA 1	GA 2	GA 3	GA 4	GA 5	Total
13	0.01	0.08	0.01	0.03	0.13	0.26
14	0.20	2.50	0.15	0.28	5.58	8.73
15	0.40	4.60	0.65	0.55	11.24	17.46
16	2.09	8.37	0.58	0.73	14.78	25.78
17	3.57	6.08	0.86	1.00	16.03	27.54
18	4.68	22.36	3.01	2.98	36.77	69.79

3. 分析結果

(1) 市販健康食品の分析

市販健康食品 18 製品の分析結果を Table 5 および 6 に示した。GA は、1 日摂取量中全く検出しないものから、茶剤 1 包中に 69.79 mg 含有するものまで、大きなばらつきが認められた。イチョウ葉エキス使用の表示がある No.1~6 については、GA1~5 の明瞭なピークが確認できなかったが、GA 総量では GA1~5 の検出限界値の合算値から 1 日摂取量 $0.31 \mu\text{g}$ 以下であると考察した。ドイツ医薬品規格ではイチョウ葉エキスの 1 日服用量は、痴呆症の治療目的では 120mg から 240 mg を服用することになっている。イチョウ葉エキスの GA の含量は 5 ppm 以下⁵⁾であるとすると、算出される GA の 1 日摂取許容量は $0.6 \mu\text{g}$ 以下から $1.2 \mu\text{g}$ 以下となる。分析の結果から No.1~6 は 1 日摂取許容量 $0.6 \mu\text{g}$ を下回っており、一度に大量に摂取しない限り、GA による健康被害は起きにくいと考えられる。一方同様の表示のある製品でも、No.7~12 のように GA が含まれているものが確認された。更にイチョウ葉を使用している No.13~18 は、GA を多量に含有していることが判明し、これらは生体に対し好ましくない反応を起こさせる可能性があると考えられた。

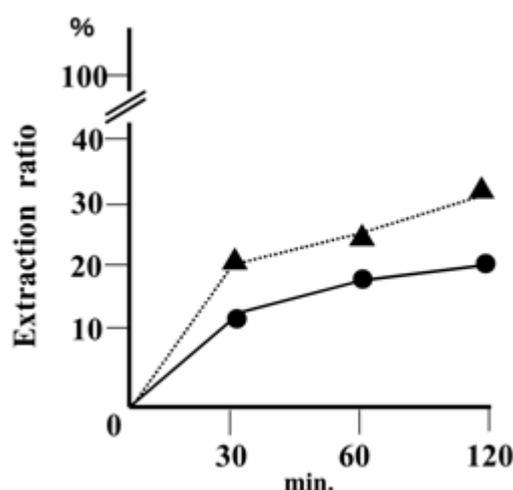


Fig. 7. Changes of Extraction Ratio of Total GA by Mild Decoction
: 40 , : 80

(2) 浸出条件による温湯への GA の溶出

No.16 について、約 0.5g を正確に量り、水 25mL を加え、40, 80 の各温度で 30, 60, 120 分間、スターラーで

攪拌しながら浸出させ、温時ろ過を行い、水により全量 50 mL とした。この一部を 0.45 μ m のフィルターに通して HPLC 用試料溶液とし GA 含量を測定した。温湯への GA の溶出率は No.16 の HPLC 移動相による抽出量を 100 % とし、その結果を Fig.7 に示した。図から明らかなように、温度が高いほど、また長く浸出させるほど GA はより多く溶出することが判った。GA は低極性物質で水に溶けにくいと考えていたが、今回検討した試料 1g あたり、80、120 分の浸出により約 3.2 mg 程度溶出されたことから、イチョウ葉を茶として服用することは、好ましくないと思われた。

結 論

1. 今回測定した GA1~5 は、アルキル基のオルト位にカルボン酸を有し、メタ位に水酸基を持つ芳香族化合物でいずれも蛍光を発する。この光学的性質を利用して、広く普及され、操作性も簡便な蛍光検出器を用いた HPLC 法を開発した。

2. 抽出は HPLC 移動相が最も効率的であった。HPLC-FL による GA1~5 の検出限界は S/N =3 で約 0.05~0.08 ng であった。本法により市販健康食品を分析したところ、GA1~5 の総量では 1 日摂取量に換算して 0.31 μ g 以下から、茶剤 1 包中 69.79 mg と大きなばらつきが認められた。

また GA は低極性物質であるにも関わらず、温湯により溶出することが確認された。

3. 今回開発した分析方法は、多成分が配合される健康食品への応用には、一部夾雑物により GA の分析が難しいことが予想される。したがって原料の段階での適切な規格および試験方法の設定が必要であると考えている。

文 献

- 1) H.Jaggy and E.Koch, *Pharmazie*, **52**, 735-738, 1997.
- 2) 国民生活センター報道発表資料, イチョウ葉食品の安全性アレルギー物質とその他特有成分について考える, **11**, 2002.
- 3) Karine Ndjoko, Jean-Luc Wolfender and Kurt Hostettmann, *Journal of Chromatography B*, **744**, 249-255, 2000.
- 4) Teris A.van Beek and Martijn S. Wintermans, *Journal of Chromatography A*, **930**, 109-117, 2000.
- 5) Mark Blumenthal, Werner R.Busse, Alicia Goldberg, Joerg Gruenwald, Tara Hall, Sigrid Klein, Chance W. Riggins, Robert A. Rister, *The Complete German Commission E Monographs, Therapeutic Guide to Herbal Medicines*, 136-138, 1998. American Botanical Council, Austin Texas.