高速液体クロマトグラフィーによるごま油中のセサモリン, セサミンの定量及びセサモールの確認

(昭和 56 年 7 月 22 日受理)

吉田 政晴* 檜 本 隆*

Determination of Sesamolin, Sesamin and Sesamol in Sesame Oil by High Performance Liquid Chromatography

Masaharu YOSHIDA and Takashi KASHIMOTO

(Osaka Prefectural Institute of Public Health: 3-69, Nakamichi 1-chome,
Higashinari-ku, Osaka)

A high performance liquid chromatographic (HPLC) method was established for the quantitative determination of sesamolin, sesamin and sesamol in sesame oil.

Sesamolin, sesamin and sesamol were eluted at approximately 8 min, 13 min and 35 min by using a 4.6 mm ϕ $\times$ 250 mm Lichrosorb-Si 60 column with *n*-hexane-chloroform (80:20). The ultraviolet absorption detector was set at 280 nm. Sesame oil was diluted with the eluting solvent and a sample was directly injected into the HPLC machine.

The results were as follows:

1. The extracted sesame oil were found to contain 0.42% sesamolin and 0.54% sesamin.
2. No sesamol was detected in a survey of sesame oil by this procedure (detection limit 0.0005%).
3. The average recoveries of sesamolin, sesamin and sesamol from sesame oil were 99.3%, 97.3%, 99.0%, respectively.

(Received July 22, 1981)

Key words: ごま油 sesame oil; セサモリン sesamolin; セサミン sesamin; セサモール sesamol;
高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography; ガスクロマトグラフィー gas liquid chromatography

まえがき

ごま油中には Fig. 1 に示すセサモリン, セサミン, セサモールが存在すると言われている。またごま油の確認法としては, ごま油中のセサモリンの酸加水分解生成物であるセサモールがフルフラールで紅色に呈色する点に着目した反応である Villavecchia 反応¹⁾, Baudouin 反応¹⁾ などがある。O'Connor²⁾ らはこの反応を利用してセサモリン, セサモールの分光定量法を報告している。しかしこの方法は直接セサモリンを量るのではなく, 結合型セサモールを定量し, それをセサモリン量に換算するために 2.68 倍 (セサモリン分子量/セサモール

分子量) しているので定量誤差を生じやすい。そこで我々は複雑な抽出操作を行わず, 短時間にごま油中のセサモリン, セサミン, セサモールを分析する方法として高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて検討したので報告する。なお本法はごま油の純度並びに食用油中にごま油が添加されているかどうかの鑑別にも十分応用できるものと思われる。

実験方法

1. 試薬及び試液

- (a) セサモール: Sigma 社製
- (b) エチルエーテル, エタノール, *n*-ヘキサン, 酢酸エチル, 無水硫酸ナトリウム: 和光純薬工業(株)製残留農薬用

* 大阪府立公衆衛生研究所: 大阪市東成区中道 1-3-69

(A) Sesamol

(B) (+)-Sesamin

(C) Sesamol

Fig. 1. Identification of isolated crystals from white sesame oil

(A) Sesamol; mp=93.8°C, $[\alpha]_D^{20} = +220$, FD-MS=mw 370, NMR

(B) (+)-Sesamin; mp=129°C, $[\alpha]_D^{20} = +52$, FD-MS=mw 354, NMR, IR

(C) Sesamol; SIGMA standard reagent

(c) 石油ベンジン, 水酸化カリウム, クロロホルム, フルフラール: 和光純薬工業(株)製特級

(d) アルミナ: カラムクロマトグラフィー用, 中性, Merck 社製, 300° 1 昼夜乾燥

(e) HPLC 溶離液: *n*-ヘキサン・クロロホルム (80:20), *n*-ヘキサン・クロロホルム (50:50)

(f) 薄層クロマトグラフィー (TLC) 用展開溶媒: クロロホルム・エーテル (95:5), クロロホルム・エーテル (90:10)

2. 装置器具

(a) カラムクロマト管: 40 cm×2.5 cmφ

(b) 展開槽: 12 cm×10 cmφ フタ付ガラスポット 11 cm×24 cm×25 cm フタ付ガラス槽

(c) TLC 板: Merck 社製 PSC-Kieselgel Plate 60 F-254, Merck 社製 Kieselgel 60 F-254

(d) UV ランプ: 東京光学機械(株)製 PAN-UV ランプ PUV-1 型

(e) HPLC: ALTEX MODEL-153

(f) ガスクロマトグラフィー (GC): (株) 島津製作

所製 GC-6 AM

(g) 赤外分光光度計 (IR): (株) 日立製作所製 285 型

(h) FD-MS: 日本電子(株)製 JMS-D 300 型

(i) ¹H 核磁気共鳴 (PMR) スペクトル: (株) 日立製作所製 R-24 A 型 (tetramethylsilane を内部基準として)

(j) 旋光分散 (ORD): 日本分光工業(株)製 ORD/UV-UV 5 型

3. 試料油の調製

市販の白, 黒, 黄の各種ごまを錠剤粉碎機で粉末にした後, それぞれの 100 g をとり *n*-ヘキサン 100 ml を加え 24 時間浸漬抽出を行う. フロロボアーフィルターで吸引ろ過した残渣については, 更にこの抽出操作を 2 回繰返し行う. また最後にクロロホルム 100 ml で同様に浸漬抽出を行い, ろ液は *n*-ヘキサンろ液と合せ無水硫酸ナトリウムで脱水後, 減圧濃縮乾固する. かくして得られた抽出油は次のとおりである.

白ごま抽出油分 41.9%

黒ごま抽出油分 37.0%

黄ごま抽出油分 35.5%

4. 抽出ごま油中のセサモリン, セサミンの単離精製

セサモリン, セサミンは標準物質が市販されていないので抽出ごま油より単離精製することにした. 方法は Edowin Haslam³⁾ の方法を準用した. 概略は Scheme 1 に示す.

まず, 石油ベンジンで湿潤させた活性アルミナ 75 g を湿式法でカラムクロマト管 (φ 2.5 cm×40 cm) に充てんし, 試料のごま油 100 ml を約 10 時間かけてカラムクロマト管内に流入させる. そして脂肪部分を除去するために石油ベンジン約 500 ml を流下させる. その際, 溶出液についてセサモリン, セサモールの確認に使用する Villavecchia テスト¹⁾ (溶出液 10 ml を試験管に取り, これに同量の塩酸を入れ更に 2% フルフラール・エタノール溶液 0.1 ml を加え 15 秒振り混ぜた後静置する. 2 層に分離したらすばやく下層の色を観察する.) を行う. 溶出液がわずかに紅色を示すまでこの溶出操作を繰返し脂肪部分を溶出させる. ついでエーテル 500 ml でセサモリン, セサミン画分を溶出させた後, エーテルを減圧下留去すると黄色油状物が得られる. これに 5% 水酸化カリウム・エタノール溶液 25 ml を加え 1 時間沸騰水浴上で加水分解する. 冷後水 100 ml を加えエーテル抽出を行う. (60 ml×3 回). エーテル抽出液を合せ, 無水硫酸ナトリウムで脱水した後, エーテルを減圧下留去したところ約 2 g の黄色残渣が得られた. それを少量のエーテルに再度溶解し 1 昼夜冷所で放置してセサミンの粗結晶 (約 0.5 g) を得る. フロロボアーメンブランフィルターで吸引ろ過したろ液のエーテル溶液を減圧下留去した後, 残渣を少量のエタノールに加温して溶か

Scheme 1. Isolation of sesamol and sesamin

TLC-condition

Solvent: chloroform:ether (95:5)

Plate: PSC-Kieselgel 60F-254

し冷所で1夜放置してセサモリンの粗結晶(約0.1~0.5 g)を得る。これらの粗結晶は蛍光剤入りかきとり用の TLC プレートである PSC キーゼルゲル 60 F-254 に帯状にスポットしてクロロホルム・エーテル (95:5) でかきとり精製を行う。かきとり部分は UV 照射で認められる暗紫色の吸収スポットで、それをカラムクロマト管 (φ 1 cm) にとりアセトン溶出する。溶媒留去後、前述のエーテル並びにエタノールで再結晶化する。

5. 単離セサモリン, セサミンの同定

単離したセサモリン, セサミンの結晶を少量の酢酸エチル溶媒に溶かして蛍光剤入りの TLC プレートであるキーゼルゲル 60 F-254 にスポットし, クロロホルム・エーテル (90:10) の展開溶媒で展開し, UV 照射したところ Fig. 2 に示すように単一の吸収スポットが得られた。セサモリン R_f 値=0.65, セサミン R_f 値=0.53。

また, セサモリン, セサモールの確認法である Villa-

vecchia 反応(濃塩酸噴霧後 2% フルフラール・エタノール噴霧)を試みたところ, 紅色を呈しセサモリンの存在を示した。なお各単離結晶で mp, [α]_D, FD-MS, PMR⁴⁾, IR⁵⁾, 測定を行ったところすべて文献値と一致した。

6. HPLC 定量条件

TLC によりシリカゲルがセサモリン, セサミンの分離に有効なことがわかったので, HPLC による定量もシリカゲル系カラムである Lichrosorb-Si 60 を用いて検討を行うことにした。検出器は 280 nm の固定波長を用い, 溶離液の検討を行ったところ, 妨害物の影響も少なく, 短時間でかつ定量性に優れている溶離液として, *n*-ヘキサン・クロロホルム (80:20) を定めた。注入試料は試料油をミリポアフィルターでろ過後 HPLC 溶離液に溶かし 50 mg/ml, 100 ml/ml にメスアップし, それを試料とした。

Fig. 2. Thin layer chromatogram of sesamol, sesamin and sesamol

Solvent; chloroform: ether (90:10), plate; Kieselgel 60F-254

The spots on the plate were detected under UV light (wave length 250~380 nm) and Villavecchia test.

A) sesamol, B) sesamin, C) sesamol, D) crude sesamol

定量条件は以下のとおりである。

機器: ALTEX Model-153 検出器: 280 固定波長, カラム: Lichrosorb-Si 60 (25 cm×4.6 mmφ), 溶離液: *n*-ヘキサン・クロロホルム (80:20), 流速: 1.7 ml/min, 試料注入量: 100 μl (脂肪酸濃度 10% 以下)

7. GC 定量条件

HPLC による定量値を再確認する意味で GC 法による定量も検討した。GC による直接定量は試料の油脂が妨害してうまくいかなかったので HPLC によりセサモリン, セサミンの各フラクションを分取し, それを窒素気流下で濃縮し酢酸エチル 1 ml でメスアップしたものを GC 用試料とした。定量条件は以下のとおりである。

機器: (株)島津製作所製 GC-6 AM, 検出器: FID, カラム: 2% OV-1 (50 cm×3 mmφ), 担体: ガスクロム Q (100~120 メッシュ), カラム温度: 225°, 検出器及び注入口温度: 237°, キャリヤガス: 窒素 60 ml/min, 水素 40 ml/min, 空気 400 ml/min, 試料注入量: 4 μl

結果及び考察

1-a. HPLC によるごま油中のセサモリン, セサミンの定量

白ごま抽出油を溶離液 (*n*-ヘキサン・クロロホルム 80:20) で 50 mg/ml にメスアップし, その 100 μl を HPLC に注入した。Fig. 3 にそのクロマトグラムを示す。ただし, セサモールはごま油中に見いだせなかったので Sigma 社の標準試薬を添加してその位置を示した。中性脂質は 3 分までに溶出し終り, かつ油脂の UV 吸収が 230~250 nm なので定量には妨害とならなかった。ピーク height 法によるセサモリン, セサミンの検量線

Fig. 3. Liquid chromatogram of white sesame oil

Solvent; *n*-hexane: chloroform (80:20), injection volume; 100 μl, concentration; 50 mg/ml, column; 4.6 mmφ×250 mm, packing material; Lichrosorb-Si 60, detector; UV 280 nm, range; 1.28 AUFS, chart speed; 2.5 mm/min, flow rate; 1.7 ml/min, temperature; R. T. peaks; (A) sesamol, (B) sesamin, (C) added sesamol

Fig. 4. Calibration curve of sesamol and sesamin on HPLC

を Fig. 4 に示す。0~250 μg の範囲でよく直線性を示した。

1-b. セサモリン, セサミンの回収率

Table 1 に示すように精製ごま油中にはセサモリン 0.25%, セサミン 0.36% 含有されており, これにセサモリンを更に 0.1% 添加したところ 94.4%, 0.2% 添加で 104.1%, またセサミンにおいても 0.1% 添加したところ 97.0%, 0.2% 添加で 97.6% でその回収率は満足できるものであった。

2. GC による定量

HPLC 法による定量が真の値を示しているかどうかを再確認するために更に GC による定量も試みた。HPLC 分取後, 酢酸エチルでメスアップして GC に注入した。その時の GC のクロマトグラムを Fig. 5 に示

Table 1. Recovery of Sesamolin and Sesamin added to Refined Sesame Oil

	Weight of sample (mg)	Blank value (μg)	Added (μg)	Found (μg)	Recovery (%)
Sesamolin	50	127 (0.25%)	50 (0.1%)	167.0	94.4
			100 (0.2%)	236.2	104.1
Sesamin	50	182.2 (0.36%)	50 (0.1%)	225.3	97.0
			100 (0.2%)	275.3	97.6

Fig. 5. Gas chromatograms (FID) of sesamolin and sesamin separated from HPLC of the white sesame oil

(A) sesamolin, (B) sesamin

column; 2% OV-17 on gaschrom Q (80~100 mesh), 50 cm $\times$ ϕ 3 mm, column temp; 225°C, det. temp.; 237°C, inj. temp.; 225°C, carrier gas; N₂ 60 ml min

す。

セサモリン、セサミンともきょう雑物の影響もなく、そのピークパターンは良好であった。ピーク height 法

によるセサモリン、セサミンの検量線を Fig. 6 に示す。0~100 μg の範囲でよく直線性を示していた。

3. HPLC 法と GC 法による定量値の比較

抽出白ごま油、黒ごま油、黄ごま油で HPLC 法、GC 法によるセサモリン、セサミンの定量値を比較した。(Table 2)

その結果、両法ともその値は比較的よく一致していた。このことから HPLC による定量値はほぼ真の値を示しているものと思われる。

4. 市販調合ごま油中のセサモリン、セサミンの定量

市販純正ごま油及び調合ごま油よりセサモリン、セサミンの HPLC による定量を行った。(Table 3)

調査した調合油ではすべてセサモリン、セサミンが検出された。このことから調合ごま油中にごま油が添加されているかどうかの鑑別にも本法は十分に応用できることを示している。

5. 妨害物質の影響

セサモリン、セサミンの定量に当たり妨害物質の存在を検討したところ、各食用油（なたね油、落花生油、大豆油、紅花油、荳油、やし油、パーム油、あまに油、オリーブ油、綿実油、コーン油、米ぬか油、鯨油、いわし油、牛脂）では影響を及ぼす物質は存在しなかった。また抗酸化剤である BHT, BHA も定量には影響を及ぼさなかった。

Fig. 6. Calibration curves of sesamolin and sesamin on FID-GC

Table 2. Comparison of Results on Sesamolin and Sesamin by HPLC Method and GC Method

Sample	HPLC method sesamolin	GC method sesamolin	HPLC method sesamin	GC method sesamin
White sesame oil	0.42%	[1] 0.41% [2] 0.39%	0.62%	[1] 0.72% [2] 0.64%
Yellow sesame oil	0.35%	[1] 0.34% [2] 0.35%	0.53%	[1] 0.55% [2] 0.60%
Black sesame oil	0.49%	[1] 0.47% [2] 0.48%	0.48%	[1] 0.41% [2] 0.52%

Table 3. Amount of Sesamolin and Sesamin in Commercial Mixing Oil

Commercial oil	Indication	Sesamolin	Sesamin
Edible sesame oil	Pure sesame oil	0.29%	0.35%
Edible mixing sesame oil	60% sesame oil soybean oil	0.12%	0.32%
Rā-oil (gyōza-oil)	Pure sesame oil Red pepper	0.18%	0.38%
Hot plate oil	Pure sesame oil Corn salad oil Soybean lecithin	0.01%	0.01%

Fig. 7. Liquid chromatogram of white sesame oilSolvent; *n*-hexane:chloroform (50:50)

HPLC-condition; see legend of Fig. 3.

(A) sesamolin, (B) sesamin, (C) added sesamol

6. ごま油中のセサモールの確認

ごま油にはセサモールが 0.001~0.1% 存在する⁶⁾といわれている。そこでその存在を確認するために、HPLC により同定を行った。ただしその際、セサモールのピークをよりシャープなものにするために溶離液中のクロロホルムの割合を増やして *n*-ヘキサン・クロロホルム (50:50) とした。抽出白ごま油、黒ごま油、黄ごま油及び精製ごま油からはいずれもセサモールは検出されなかった。(検出限界 0.0005%) (Fig. 7)

なお、この事実を更に確認するためにセサモール

0.001% 添加した時の回収率をみたところ 99.0% 以上であった。このことは、一般にセサモールはごま油中にはセサモリンとして含有されその加水分解によってセサモールとサミンに分かれる。文献 7) と一致する結果である。従来の比色法では濃硫酸中で発色定量を行うため一部が加水分解してセサモールが生じそれが定量値に影響を与えるためと思われる。

要 約

1) 従来の比色法は操作が複雑なうえに定量誤差を生じやすい。

2) 本法は試料油を溶離液で希釈し、直接 HPLC で定量する方法である。

3) 抽出ごま油、精製ごま油、調合ごま油、などでセサモリン、セサミンの定量を行ったところ良好な分析結果が得られた。

4) 従来ごま油中に 0.001~0.1% のセサモールが存在するといわれていたが、本法の直接 HPLC 分析法で確認したところ、いずれのごま油からも検出されなかった。このことはセサモリンとしてごま油中に存在し、加水分解を受けてセサモールとサミンに分かれるとする説に一致する。(検出限界 0.0005%)

5) 本法の利点は、比色法に比べて定量行程が短く妨害物質の影響も少なく、かつ高感度であるなどである。このことから本法はごま油の純度及び食用油中にごま油が添加されているかどうかの鑑別にも十分応用できるものと思われる。

謝 辞

終りに当たり PMR, ORD 測定に御便宜を戴いた大阪薬科大学小澤 貢教授, 馬場きみ江講師並びに FD-MS の測定に御便宜を戴いた日本電子(株)技術部板垣又丕氏に深謝致します。

なお, 本研究の一部は日本食品衛生学会第37回学術講演会 (1979 年, 東京) において発表した。

文 献

- 1) 日本油化学協会編: “基準油脂分析試験法” p. 199 (1976), 朝倉書店.
- 2) 山口一孝著: “植物成分分析法 (下巻)” p. 169, p. 380~382 (1960), 南江堂.
- 3) Haslam, E., Haworth, R. D.: J. Chem. Soc., **44**, 827~833 (1955).
- 4) Haslam, E.: *ibid.*, 2332~2334 (1970).
- 5) Freudenberg, K., Singh Sidhu, G.: Chem. Berichte., **94**, 851~862 (1961).
- 6) 日本公定書協会編: “第八改正日本薬局方” p. C-693 (1972), 金原出版.
- 7) 刈米達夫著: “最新植物化学” p. 70 (1968), 廣川書店.