

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究
（H26-食品-一般-001）

平成28年度研究分担報告書

研究分担課題：既存添加物ゴマ油不けん化物の成分規格の検討

研究分担者 井之上 浩一 立命館大学薬学部 准教授

要旨 昨年度に引き続き，日本食品添加物協会「既存添加物自主規格（第4版）」に収載されているゴマ油不けん化物の成分規格作成の検討を実施した．定義において，本品は，ゴマ（*Sesamum indicum* Linné）の種子から得られた，セサミンおよびセサモリンを主成分とすることを提案した．それに伴い，セサミンおよびセサモリンの定量評価を実施しなければならず，いずれの標準品が必要となった．そこで，高速向流クロマトグラフィーを用いて，ゴマ油不けん化物から，セサミンおよびセサモリンの高純度単離精製を試みた．2相溶媒系には，ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水(7:3:7:3, V/V/V/V)を用いたとき，保持率は85%であり，セサミンおよびセサモリンを純度99%以上で単離精製できた．その際の重量は，セサミンで，7.37 mgおよびセサモリンで5.17 mg（注入量：0.5 g）であった．本手法により，高純度のセサミンおよびセサモリンが単離精製できたため，今後，LC用分析などの定量に用いることができると思われる．

セサモリンを主成分とするものである．

A. 研究目的

日本食品添加物協会「第4版 既存添加物自主規格」（以下，4版自主規格）に規格されているゴマ油不けん化物（Sesame Seed Oil Unsaponified Matter）は，ゴマ（*Sesamum indicum* Linné）の種子から得られた，セサモリンを主成分とするものである¹⁾．現在までの確認試験では，本品を直接順相系液体クロマトグラフィー（LC）により測定するものであったが，昨年度の報告において，順相系 LC においても分析が可能であった．また，定義においても，主成分がセサミンおよびセサモリンが有用と考えられ，下記のような変更点を提案した．

定義（原案）：本品は，ゴマ（*Sesamum indicum* Linné）の種子から得られた，セサモリンを主成分とするものである．

定義（改善案）：本品は，ゴマ（*Sesamum indicum* Linné）の種子から得られた，セサミンおよび

確認試験（原案）：順相系 LC によるピーク面積からの算出方法（試料は 10 μL を量り，直接注入する）

確認試験（改善案）：逆相系 LC によるセサモール，セサミンおよびセサモリンの同時定量法（試料は適時，アセトニトリル/メタノール混合液（50/50, V/V）にて希釈して注入する）

規格基準（原案）：保持時間 8～23 分間の 5 本以上のピーク面積において，最も大きなピーク面積よりも 30%大きい 4 本のピークを認める．

規格基準（改善案）：セサミンおよびセサモリンの含有率を提示する．さらに，セサモールは含まれない（もしくは規定の含有率以下とする）．

本規格基準において，LC 法による成分規格の設定では，高純度の標準品が必要となってくる．

つまり、セサミンおよびセサモリンの標準品が必要である。しかしながら、いずれの標準品も入手困難であり、簡便かつ安価な規格基準とは言い難い。そこで、本研究では、ゴマ油不けん化物からセサミンおよびセサモリンを高純度に単離精製する簡便な方法として、高速向流クロマトグラフィー（HSCCC）を用いた手法を検討することとした。

現在までに、セサミンもしくはセサモリンを安価に単離精製する場合、ゴマ油などの製品からアルミナカラム、macroporous 樹脂、逆相系クロマトグラフ、saponification/crystallization 混合法などが利用されてきた²⁻⁴⁾。また、簡便な技術としては、向流遠心クロマトグラフィーもしくは、HSCCC が挙げられる^{5, 6)}。そこで、本研究では、HSCCC を用いて、ゴマ油不けん化物からセサミンおよびセサモリンを同時に単離精製する方法を開発した。

B. 研究方法

ゴマ油不けん化物は長岡香料社製（B478）を用いた。

電子天秤：メトラー製 METTLER ML303/52

LC 装置：Waters 社製 Acquity H Class/PDAe

MS 装置：Waters 社製 Xevo TQD

HSCCC 装置：クツワ産業社製 Easy-Prep CCC (multi-layer coil planet centrifuge), GL サイエンス社製 PU714M LC/UV702/SC762/PLC761 システム

LC による分離分析：対象試料はアセトニトリル/メタノール混液（50/50, V/V）により調製した。移動相には、0.1% ギ酸水溶液（A）/アセトニトリル（B）を使用し、A/B：80/20 を 1 分間維持し、その後、15 分にて A/B：2/98 のグラジエント分析を行った。

カラム：TSKgel ODS-100V column (2.0 × 150 mm, 3 μm, 東ソー社製)

カラム温度：40

流速：0.2 mL/min

検出波長：200-400 nm (定量：290 nm)

注入量：5 μL

MS 装置：測定条件は、エレクトロスプレーイオン化法（ESI：ポジティブモード）で行った。

Capillary voltage: 2.0 kV

Extractor voltage: 3 V

RF lens voltage: 2.5 V

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone/desolvation gas flows: 50/800 L/hr

MS/daughter scan ranges: *m/z* 50 to 400

Cone voltage: 15-20 V

Collision energy: 15-25 eV

HSCCC の分離条件：対象試料は、0.5 g を 2 相溶媒それぞれ 1 mL に溶解し、0.8 μm の LC 用フィルターを通し、試料溶液とした。2 相溶媒には、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水（7:3:7:3, V/V/V/V）を利用し、上層を固定相として、テフロンチューブ内（350 mL）に充填し、その後、遠心回転（1000 rpm）を行った。下層は、流速 2.0 mL/min において送液し、安定後、試料溶液を注入した。モニタリングには、290 nm を用いて、セサミンおよびセサモリンと想定されるピークをフラクションコレクターにより単離精製した。その後、エバポレータにより、濃縮乾固したものを、秤量した。秤量後、LC による分離分析に準じて、純度評価を行った。

C. 研究結果

ゴマ油不けん化物中のセサミン、セサモリンおよびセサモールの紫外可視吸光光度における極大吸収波長を調べた（Fig. 1）。いずれも、290 nm 付近で吸収極大波長（セサモール $\lambda_{\max} = 296$ nm, セサミン $\lambda_{\max} = 286$ nm, セサモリン $\lambda_{\max} = 289$ nm）が観察され、HSCCC などのモニタリングに用いることとした（Fig. 1）。それらの条件のもと、LC による分離分析も達成でき、HSCCC 分配係数の算出などに応用した（Fig. 1 および Table 1）。

LC 法を用いて、セサミンおよびセサモリンの HSCCC 用 2 相溶媒の分配係数および分離度の検討を行った。その結果、Table 2 に示す。Table 2 の条件から、セサミンの分配係数 0.84 ± 0.18

およびセサモリンの分配係数 1.36 ± 0.34 であり、分離度 1.61 ± 0.05 の条件、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水(7:3:7:3, V/V/V/V)を採用することとした。

本条件を用いて、HSCCC による単離精製の分析を行った際のクロマトグラムを Fig. 2 に示す。HSCCC クロマトグラムより、Fraction A および Fraction B を単離精製することができた。いずれも、絶対検量線法により定量した結果、Fraction A において、7.37 mg および Fraction B において、5.17 mg となった (Fig. 3, 4)。また、MS/MS スペクトルにより、Fraction A および Fraction B は、セサミンおよびセサモリンであると同定できた (Fig. 5, 6)。本試料を LC-フォトダイオードアレー分析 (検出波長 200-400 nm) した結果、それぞれの純度が 99% 以上となり、良好に単離精製できたものと考えられる (Fig. 7)。

D. 考察

本研究では、ゴマ油不けん化物の新たな確認試験法の基礎的な検討を実施した。昨年度報告した定義や定量法において、安価なセサミンおよびセサモリンの標準品が必要となった。そこで、本年度では、HSCCC によるセサミンおよびセサモリンの効率的な単離精製法の検討を行った。今回、HSCCC を用いて、ゴマ油不けん化物からセサミンおよびセサモリンを単離精製するため、2 相溶媒系の比較した結果、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水(7:3:7:3, V/V/V/V)が最適であるとの判断になった。本溶媒系を用いて、HSCCC による分離を行った結果 (Fig. 2)、主に 2 つの Fraction を得ることができ、LC 分析の結果、Fraction A においてセサミン、Fraction B においてセサモリンが高純度 (LC 評価: 99%以上, Fig. 3) の標準品を得ることができた。いずれも、セミ分取スケールで 1 回の操作で、数 mg から数十 mg 程度は同時に単離精製できることが判明した。しかしながら、ゴマ油不けん化物含有濃度が低いため、今回では、数 mg 程度の単離精製となった。

本標準試料は、ゴマ油不けん化物の確認試験のみならず、様々なゴマ油由来の製品に関する

定量評価へ応用できるものと思われる。また、定量 NMR/LC 分析法との組み合わせにより、今後は、モル吸光度係数比による定量評価へ応用できるものと考えている。

E. 結論

本結果より、既存添加物ゴマ油不けん化物の定量分析用セサミンおよびセサモリンは、HSCCC により簡便かつ安価に単離精製できることが判明した。下記のその条件を示す。本標準品は、ゴマ油不けん化物の確認試験のみならず、様々なゴマ油由来の製品に応用可能と考えられる。

HSCCC 条件

2 相溶媒系:ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水(7:3:7:3, V/V/V/V)

固定相:上層

移動相:下層

流速:2.0 mL/min

保持容量:85%程度

Fraction A:セサミン(純度 99%以上)

Fraction B:セサモリン(純度 99%以上)

F. 研究発表

1. 論文発表

Takahashi, M., Nishizaki, Y., Sugimoto, N., Takeuchi, H., Nakagawa, K., Akiyama, H., Sato, K., Inoue, K. Determination and purification of sesamin and sesamol in sesame seed oil unsaponified matter using reversed-phase liquid chromatography coupled with photodiode array and tandem mass spectrometry and high-speed countercurrent chromatography. *J. Sep. Sci.* 39, 3898-3905 (2016)

2. 学会発表

高橋未来, 多田敦子, 西崎雄三, 杉本直樹, 竹内弘明, 中川一弥, 穠山 浩, 井之上浩一: 高速向流クロマトグラフィーによるゴマ油不けん化物からの高純度セサミンおよびセサモリンの単離精製 日本食品化学学会第 22 回総会・

学術大会（高知），2016年6月

G. 知的財産権の出願，登録状況

特になし

H. 健康危機情報

特になし

I. 参考文献

- 1) 日本食品添加物協会；第4版 既存添加物
自主規格 平成20年10月13日発行
- 2) Amarowicz R, Shahidi F, Pegg RB; *J. Food
Lipids* 8, 85-94. (2001)
- 3) Zhou JC, Feng DW, Zheng GS; *J. Food Eng.*
100, 289-293. (2010)
- 4) Reshma MV, Balachandran C, Arumughan C,
Sunderasan A, Sukumaran D, Thomas S, Saritha
SS; *Food Chem.* 120, 1041-1046. (2010)
- 5) Wang X, Lin Y, Geng Y, Li F, Wang D; *Cereal
Chem.* 86, 23-25. (2009)
- 6) Jeon JS, Park CL, Syed AS, Kim YM, Cho IJ,
Kim CY; *J. Chromatogr. B* 1011, 108-113.
(2016)

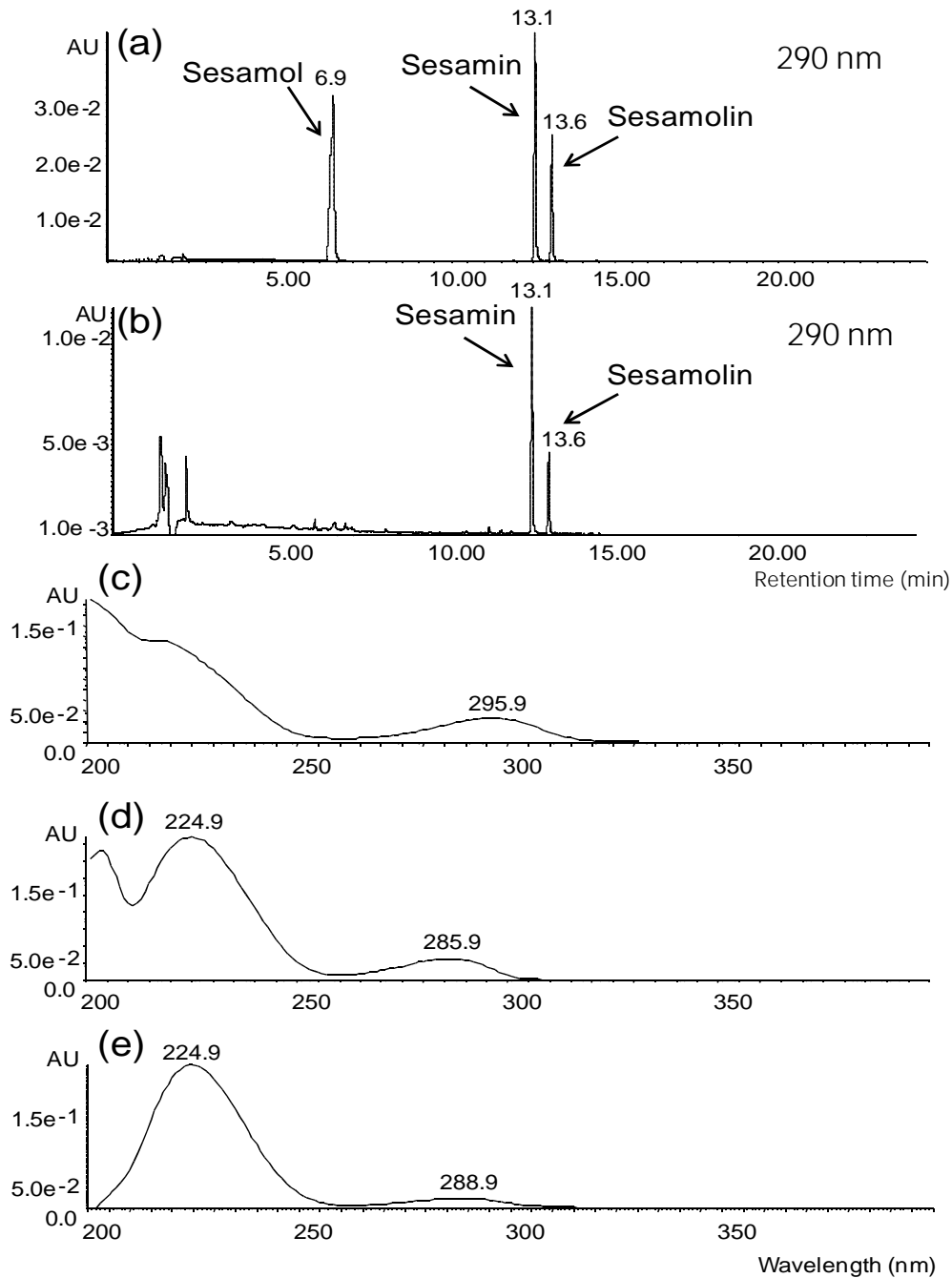


Fig. 1 ゴマ油不けん化物におけるセサモール、セサミンとセサモリンの RPLC クロマトグラムおよび紫外可視吸収スペクトル

(a) 標準溶液 (5 µg/mL) の RPLC クロマトグラム (290 nm)

(b) ゴマ油不けん化物の RPLC クロマトグラム (290 nm)

(c) クロマトグラム(a)におけるセサモール(保持時間 6.9 min) の紫外可視吸収スペクトル

(d) クロマトグラム(a)におけるセサミン(保持時間 13.1 min) の紫外可視吸収スペクトル

(e) クロマトグラム(a)におけるセサモリン(保持時間 13.6 min) の紫外可視吸収スペクトル

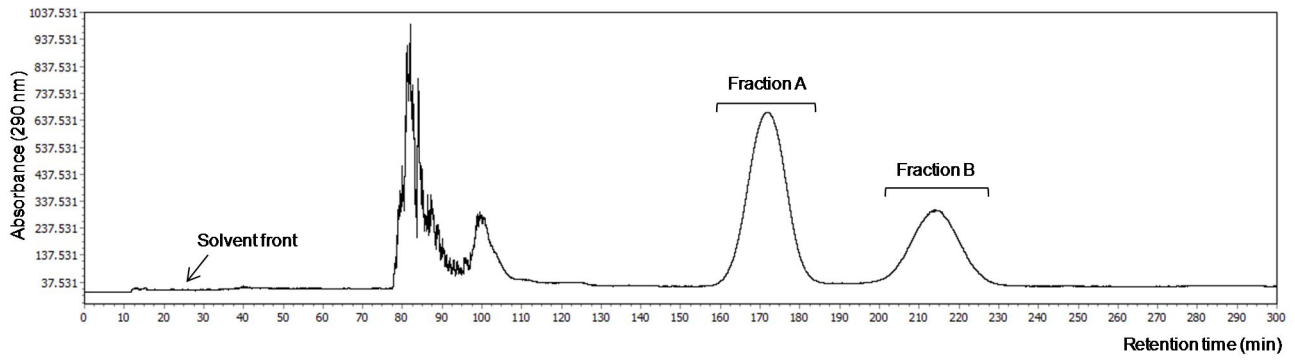


Fig. 2 ゴマ油不けん化物における HSCCC クロマトグラム
Fraction A (40-90 min) および Fraction B (400-450 min)

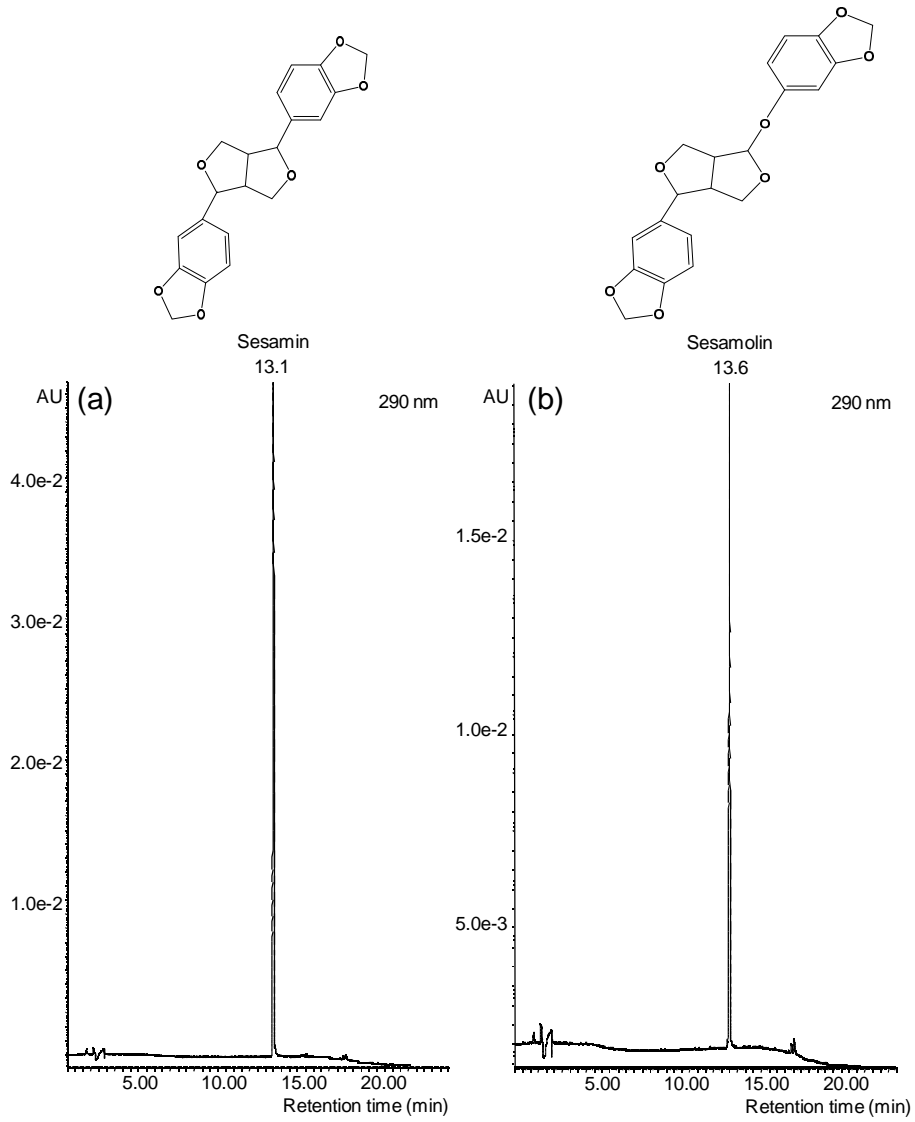


Fig. 3 HSCCC を用いて精製した Fractions A と Fractions B の RPLC クロマトグラム
(a) Fraction A はセサミン (290 nm), (b) Fraction B はセサモリン (290 nm)

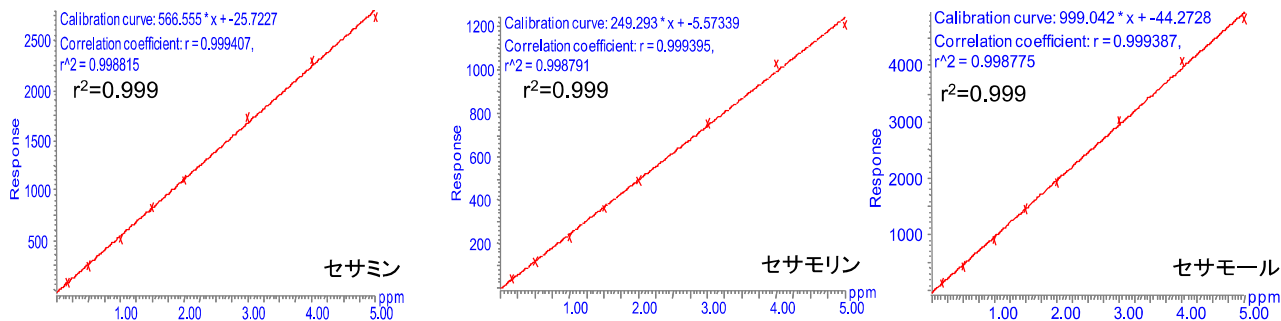


Fig. 4 セサミン，セサモリン，セサモールの絶対検量線

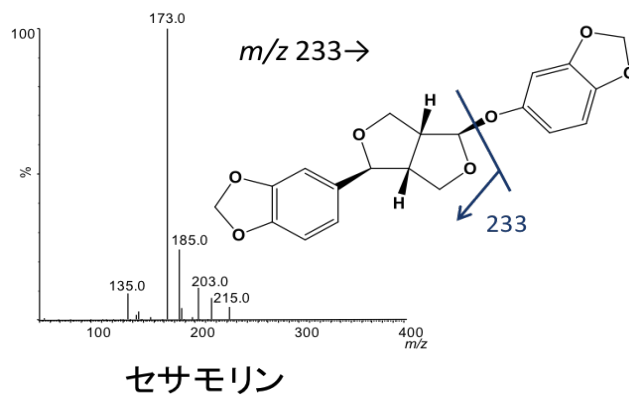
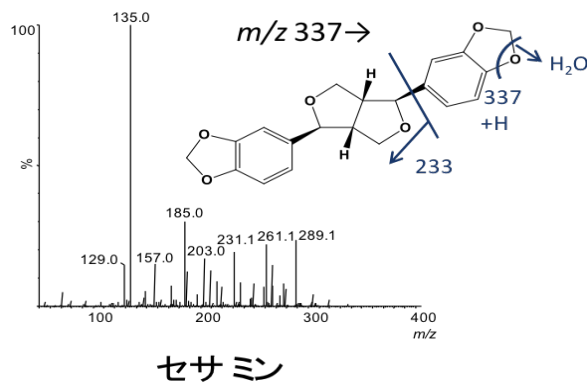
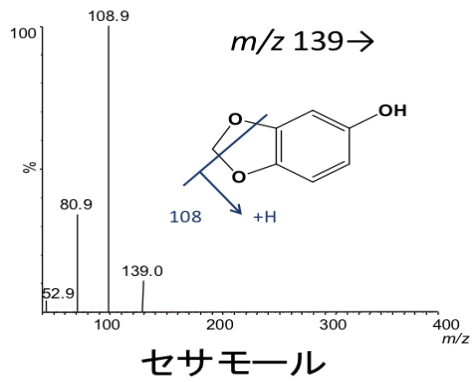


Fig. 5 セサモール，セサミン，セサモリンのMS スペクトル
(ESI：ポジティブモード)

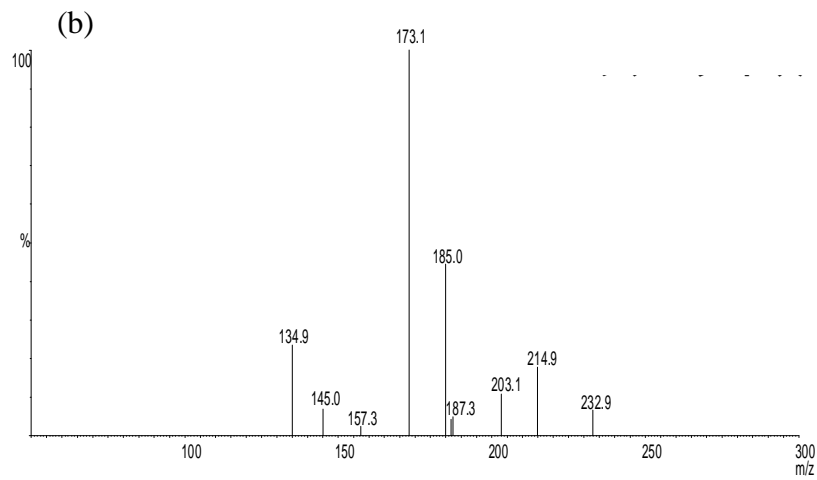
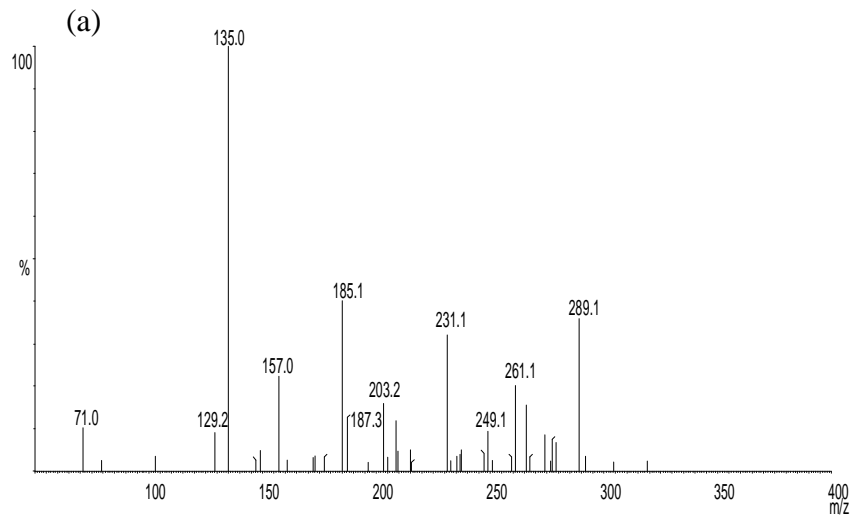


Fig. 6 HSCCC を用いて精製した Fractions A と Fractions B の MS スペクトル
(a) Fraction A はセサミン , (b) Fraction B はセサモリン

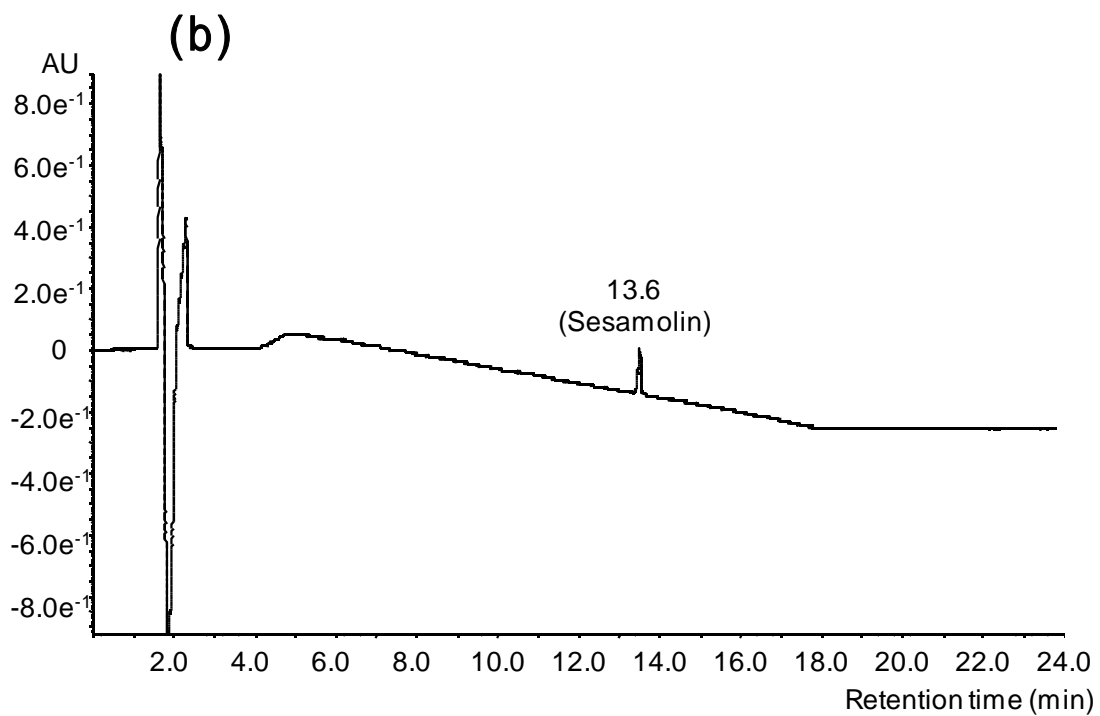
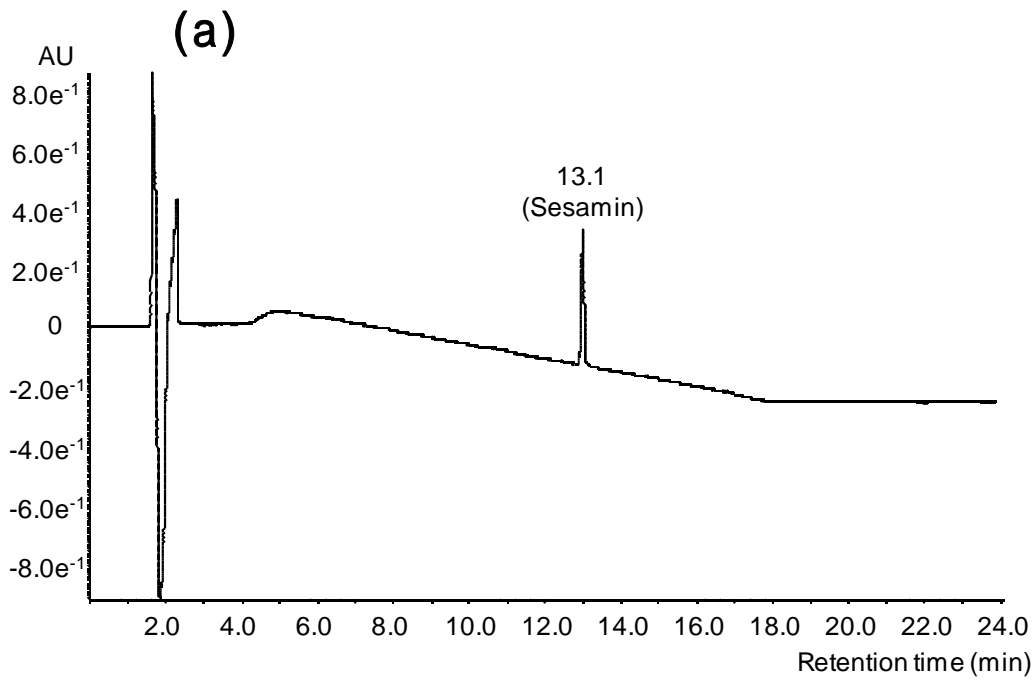


Fig. 7 HSCCC を用いて精製した Fractions A と Fractions B の RPLC クロマトグラム
Fraction A はセサミン , Fraction B はセサモリン (200-400 nm)

Table 1 セサミン，セサミン，セサモリンの RPLC による分析パラメーター（PDA 検出）

Mobile Phase	Concentration of FA (%)	S1	S2	S3	Rs	N
Water/Acetonitrile	0	0.63±0.02	1.08±0.06	1.03±0.06	4.38±0.21	270585.61±3244
	0.1	0.72±0.04	1.01±0.01	1.01±0.02	4.64±0.14	278057.79±143
	0.5	0.77±0.02	0.98±0.06	1.05±0.02	4.14±0.23	267973.57±281
Water/Methanol	0	0.62±0.01	1.07±0.05	1.06±0.07	3.63±0.01	272869.45±284
	0.1	0.63±0.01	1.20±0.01	1.24±0.05	3.84±0.05	286477.72±436
	0.5	0.69±0.01	1.30±0.09	1.14±0.05	3.74±0.04	276324.12±1429

S1：セサモールのシンメトリー係数，S2:セサミンのシンメトリー係数，S3:セサモリンのシンメトリー係数，Rs：セサミンおよびセサモリンの分離度，N：セサモリンの理論段数

Table 2 各 2 相溶媒系における分配係数 (K)および分離係数(α)

Two-phase solvent system Hexane/ethyl acetate/methanol/ water Ratio (v/v/v/v)	Partition Coefficient(K) \pm SD (n=3)		Separation factor(α) \pm SD (n=3)
	Sesamin	Sesamolin	
9:1:9:1	0.15 \pm 0.02	0.22 \pm 0.02	1.39 \pm 0.02
8:2:8:2	0.33 \pm 0.02	0.51 \pm 0.02	1.55 \pm 0.01
7:3:7:3	0.84 \pm 0.18	1.36 \pm 0.34	1.61 \pm 0.05
7:3:6:4	2.22 \pm 0.19	3.90 \pm 0.57	1.75 \pm 0.12
6:4:6:4	2.27 \pm 0.76	4.04 \pm 1.60	4.04 \pm 0.23
7:3:5:5	7.21 \pm 1.90	14.51 \pm 4.46	2.00 \pm 0.10
6:4:5:5	9.69 \pm 2.13	15.80 \pm 1.34	1.67 \pm 0.28