

ノート

薄層クロマトグラフィーによるペパーミント油中の メントフラン, シネオールの同時検出

大野幸雄

1 緒言

輸入されるペパーミント油のうち *M.Piperita* 種以外のものは非自由化品目として制限されているため、輸入の際にはこれらが *M.Piperita* あるいは *M.Arvensis* のいずれの種に該当するか鑑別する必要がある。

これらの精油成分は類似しているためにその区別は必ずしも簡単ではない。通常、両者の区別には物理恒数、香気性のほかに *M.Piperita* 種に特有な成分と考えられているメントフラン、シネオールの有無、含有量あるいは *M.Arvensis* 油に比較的多いオクタノール-3の量などが重要で、従来これら成分の検出に呈色反応¹⁾、赤外吸収スペクトル法²⁾、ガスクロマトグラフィー³⁾、薄層クロマトグラフィー⁴⁾⁵⁾あるいはこれら機器の組合せによる方法²⁾⁶⁾⁷⁾が検討され多くの成果が得られている。

しかし、多成分中の少量成分の検出という点からは問題も少なくなく、とくにメントフラン、シネオールの分離は通常の条件ではガスクロマトグラフィーでも困難で、前者はリナロールやメントンに、後者はd-リモネンのピークと重なる傾向があり⁸⁾、含有量によっては直接検出が困難となる場合がある。そこで薄層クロマトグラ法（以下 TLC 法と略称）を利用し展開条件を検討した結果、メントフラン、シネオールの同時検出が可能であることが判明し、これら精油の迅速な鑑別手段として直接利用できることを知った。

2. 実験方法および結果

2.1 標準試料および装置

標準試料として用いたl-メントン、l-メントール、酪酸メントール、d-ネオメントール、シネオール、-ピネン、-ピネン、d-リモネンなどは試薬特級またはこれに準ずるもので市販品および高砂香

料工業 KK 提供によるものをそのままあるいはカラムクロマト法で精製して使用した。またメントフランは高砂香料工業 KK により提供された 65%純度のものをそのまま用いた。

TLC 展開用の薄層プレートは市販 Eastmann Kodak 社製、Spot film (Silica Gel) 250 μを使用した。

また比較用に用いた各種ペパーミント油は Table 1 に示す性状を有するものである。

Table 1 Physical Constants of Peppermint oils

NO	Sample	S _p G ₅ at 15°C	nD ²⁰
1	Peppermint oil Mitcham "R"	0.9149	1.4602
2	Peppermint oil Vanalus Super (M)	0.9106	1.4614
3	Peppermint oil Columbia River Natural	0.9117	1.4624
4	Peppermint oil Michigan Redistilled	0.9139	1.4626
5	Peppermint oil Michigan Natural	0.9145	1.4629
6	Peppermint oil triple distilled	0.9104	1.4617
7	Peppermint oil Ontario	0.9075	1.4613
8	Peppermint oil Midwest	0.9035	1.4605
9	Peppermint oil Yakima	0.9071	1.4622
10	Peppermint oil Madras	0.9177	1.4626
11	Peppermint oil Willamette	0.9030	1.4613
12	Peppermint oil Bulgari Recti	0.9115	1.4624
13	Peppermint oil SEN Midwest	0.9077	1.4612
14	Hakka Hakuyu	0.9055	1.4586

赤外吸収スペクトルの測定は日立 - パーキン 225 型回折格子赤外分光光度計を、ガスクロマトグラムの測定には柳本 GCP - 5DH 型装置を使用した。

2.2 ペパーミント油中の主要成分の薄層クロマトグラム

ペパーミント油に含まれる主要成分の分離状態を知るため種々の展開溶媒、展開法を用いて検討した。その結果を Table 2, Table 3 に示す。

展開はいずれも 10cm 行ない、発色はメントフランに鋭敏で⁶⁾シネオールにも特異的に発色する 0.5%、ワニリン - 濃硫酸試薬を採用した。メントフランは発色剤を噴霧後ただちに呈色するがシネオールは遅く徐々

に呈色する。精油構成成分による呈色のうち、メントフランは橙赤色に、シネオールは緑色に呈色するので他成分との識別は容易であり、定性的には特に標準品を必要としない。

Table 2 Rf Values (TLC) of Main Components in Peppermint oil ...A...

Solvent Component	Pet. ether	Benzene	1, 2-Dichloroethane	Chloroform	Pet. ether: Chloroform (9:1)
l-Menthol	0	0.06	0.15	0.25	0.03
Menthofuran	0.30	0.57	0.62	0.67	0.50
Menthone	0	0.05	0.37	0.20	0
Methylacetate	0.07	0.35	0.40	0.50	0.12
d-Neomenthol	0.05	0.17	0.27	0.35	0.10
Cineol	0.07	0.17	0.22	0.37	0.15
α-Pinene	0.60	0.62	0.67	0.75	0.75
β-Pinene	0.55	0.62	0.67	0.70	0.70
d-Limonene	0.45	0.62	0.67	0.70	0.67

Table 3 Rf Values (TLC) of Main Components in Peppermint oil ...B...

Solvent Component	Benzene: Methylacetate (95:5)	Chloroform: Ethyl-alcohol (95:5)	Pet.ether: Ethyl-alcohol (95:5)	Pet. ether (multiple developing)	Chloroform → Pet. ether (step developing)
l-Menthol	0.15	0.53	0.32	0.01	0.23
Menthofuran	0.62	0.72	0.80	0.66	0.70
Menthone	0.12	0.42	0.22	0.01	0.45
Methylacetate	0.45	0.67	0.72	0.14	0.47
d-Neomenthol	0.28	0.57	0.45	0.08	0.33
Cineol	0.30	0.65	0.65	0.08	0.37
α-Pinene	0.65	0.75	0.85	0.87	0.77
β-Pinene	0.63	0.72	0.85	0.85	0.75
d-Limonene	0.65	0.74	0.85	0.85	0.75

Table 2, Table 3 に示すように、メントフランの検出を目的とする場合にはその特有な呈色から表中いずれの展開溶媒を使用しても差支えないが、シネオールも同時に検出するためにはベンゼン - 酢酸メチル(95:5), クロロホルム, 石油エーテルによる段階展開が有効である。シネオールは d - ネオメントールに重なる傾向にあるが d - ネオメントールはペパーミント油中には3~5%程度で呈色も淡青桃色であるのでシネオールの緑色とは容易に識別できる。またメントフランを分離定量する目的には石油エーテルによる展開が効果的で、 - ピネン, - ピネン, d - リモネンなどのテルペノン炭化水素との分離が特に良くこの場合他の共存成分の多くは殆んど原点近くに吸着される。

2・3 薄層クロマトグラフィーによるメントフランの検知限界

TLC 法を実際にペパーミント油の鑑別に利用する場合、その検知限界を知ることは重要であるので、65% 含有メントフランを毛細管で秤量し、そのままスポットし前後の重量差を添布量として検討した。秤量誤差を少なくする意味から - ピネンで稀釈する方法を用いた。結果の一例は Fig. 1 のようで 0.3 mg まで肉眼で検知できた。なお、紫外線照射法によればさらに検知量を低下させることができた。また発色したスポットの面積は低濃度においてはほぼ添加メントフラン量に比例してくるので、標準メントフランを同時に展開して比較すればペパーミント油中のメントフラン量を近似的に知ることができる。

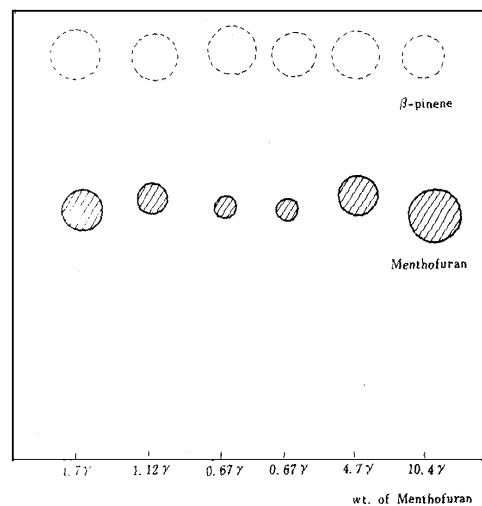


Fig. 1 Variation of Spot-Area with Menthofuran Content

Solvent : Pet. ether (multiple developing, 10cm)

Sample : Menthofuran + - Pinene

Colour reagent : 0.5% Vanillin-H₂SO₄

2・4 ペパーミント油中のメントフラン、シネオールの検出

2・2 による展開条件のうちとくにメントフラン、シネオールの分離に適したベンゼン - 酢酸メチル(95:5), クロロホルム, 石油エーテルによる段階展開および石油エーテルによる多重展開(2回)法により各種ペパーミント油を展開した結果を Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4 に示す。

試料油 0.5mg ~ 1.0mg の添布により *M.piperita* 系精油のすべてからメントフラン、シネオールを明瞭に検知できた。また *M.Arvensis* 系のハッカ白油からはいずれも検知されなかった。

ノート 薄野：薄層クロマトグラフィーによるペパーミント油中のメントフラン，シネオールの同時検出

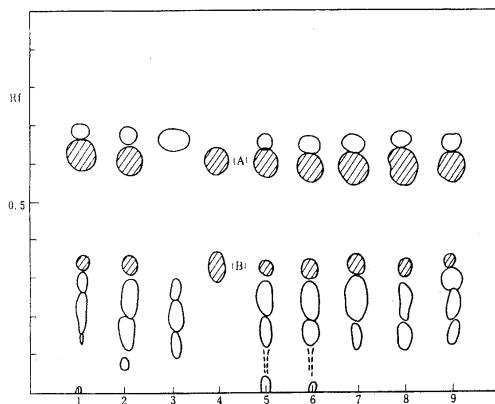


Fig. 2 Thin-Layer chromatograms of Peppermint Oils

Solvent : Benzen : Methyl acetate (95 : 5)

Sample : 1 . Pep. oil Bulgaro Recti
 2 . Pep. oil SEN Midwest
 3 . Hakka Hakuyu
 4 . Menthofuran (A) + Cineol (B)
 5 . Pep. oil Madras
 6 . Pep. oil Ontario
 7 . Pep. oil Midwest
 8 . Pep. oil Yakima
 9 . Pep. oil Willamette

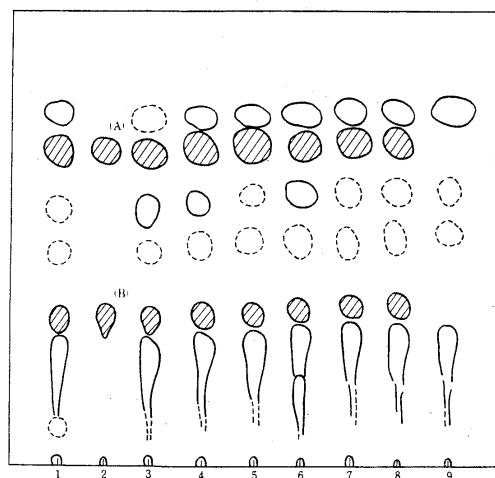


Fig. 3 Thin-Layer chromatograms of Peppermint oils

Solvent : Chloroform, Pet. ether
 (Developed by step technique each 12cm)

Sample : 1 . Pep. oil Vanalus Super (M)
 2 . Melnthonfuran (A) + Cineol (B)
 3 . Pep. oil Mitcham" R " Rectifie
 4 . Pep. oil (imported)
 5 . Pep. oil Columbia River Natural
 6 . Pep. oil Michigan Natural
 7 . Pep. oil Michigan Redistilled
 8 . Pep. oil Triple Distilled
 9 . Hakka Hakuyu

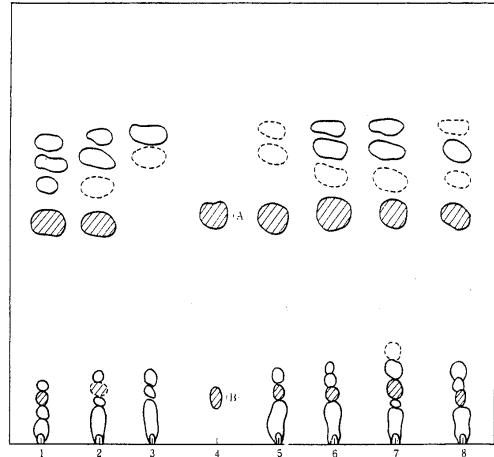


Fig. 4 Thin-Layer chromatograms of Peppermint oils

Solvent : Pet. ether (multiple developing 12cm)

Sample : 1 . Pep. oil Bulgaro Recti
 2 . Pep. oil SEN Midwest
 3 . Hakka Hakuyu
 4 . Menthofuran (A) + Cineol (B)
 5 . Pep. oil Madras
 6 . Pep. oil Ontario
 7 . Pep. oil Midwest
 8 . Pep. oil Yakima

石油エーテルによる二重展開法はメントフランに比ベシネオールのスポットは d - ネオメントール，醋酸メントールなどのスポット間に出現するが，前述のようにその特異的な呈色により識別には支障を来さない。

3 薄層クロマトグラ法のソ連産ペパーミント油鑑別への応用

最近，輸入実例のあった種別不明のソ連産ペパーミント油の鑑別に機器的手段と併用して本法を応用了。試料油はつぎのような性状を示し，物理恒数，香気性などからは *M.Arvensis* 系に近いことが予想されるものである。

試料油の性状	
Sp Gr (15°C)	0.9046
n_D^{20}	1.4591
$[\alpha]_D^{25}$	-45, 25°
S. V.	37.1
A. V.	trace
Total Menthol	47.6% (醸化法)

試料油の赤外吸収スペクトルを Table 1 に示す各種ペパーミント油と比較した結果の一部を Fig. 5 に

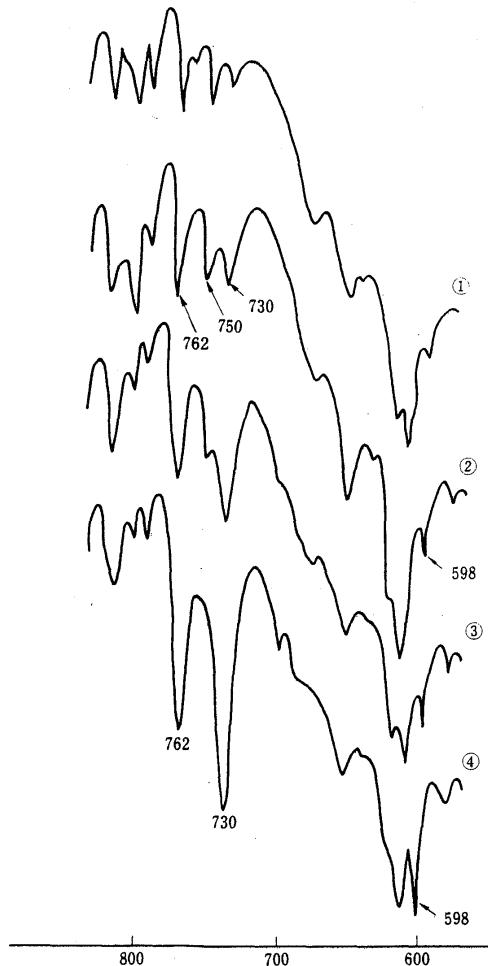


Fig. 5 Infrared Spectra of Peppermint oils
(Liquid film, 0.1mm)

Japanese Hakka Hakuyu
Peppermint oil U S S R
Peppermint oil Midwest SEN
Peppermint oil Bulgari Recti .

示す。メントフランの特徴的吸収帯が現われる 762cm^{-1} , 730cm^{-1} 附近で、精油構成成分に起因する吸収帯の重複性を詳細に検討した結果、*M.Piperita* 種にくらべ 762 , 730cm^{-1} , 730cm^{-1} の相対強度がいちじるしく小さくなっていることはこの位置にとくに強い吸収をもつ I -メントン、メントフランが少ないことを示し、また吸収波形からみてむしろ *M.Arvensis* 系に近いことを示す。

しかし、ガスクロマトグラムからは (Fig. 6) *M.Arvensis* 系に多いオクタノール- (3) が試料油においては少なく *M.Piperita* 系であることを示している。また試料油には酢酸メントールが多く、これは赤外吸収スペクトルにおいてメントフランの示す 598cm^{-1} の吸収帯が、メントフランが少ないにもかかわらず明瞭に認められることと関係する。

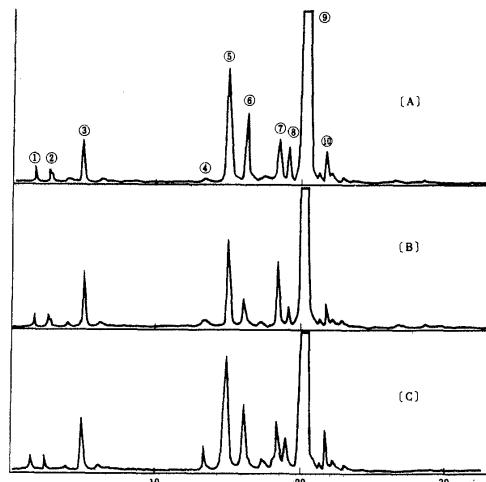


Fig. 6 Gas chromatograms of Peppermint oils

A : Peppermint oil Bulgari Recti

B : Peppermint oil U S S R (sample)

C : Hakka Hakuyu

Column:	PEG20 M.	① α -Pinene
	5 %, 2 m	② β -Pinene
Column Temp.:	60~200°C	③ d-Limonene + Cineol
	6°C/min	④ Octanol-3
Carrier Gas:	He, 10mL/min	⑤ Menthone
Inj. Temp.:	200°C	⑥ Menthofuran + iso-Menthone
Sample Size:	1 μ l	⑦ Menthyl acetate
		⑧ d-Neomenthol
		⑨ Menthol
		⑩ Piperitone

つぎに、TLC 法により比較した結果を Fig. 7 に示す。機器的手段では確認困難であったメントフラン、シネオールの存在は容易に検知できた。しかし発色の状況からメントフラン量は通常の *M.Piperita* 種にくらべ少なく $2\cdot3$ による標準メントフラン比較法で約 2% であった。

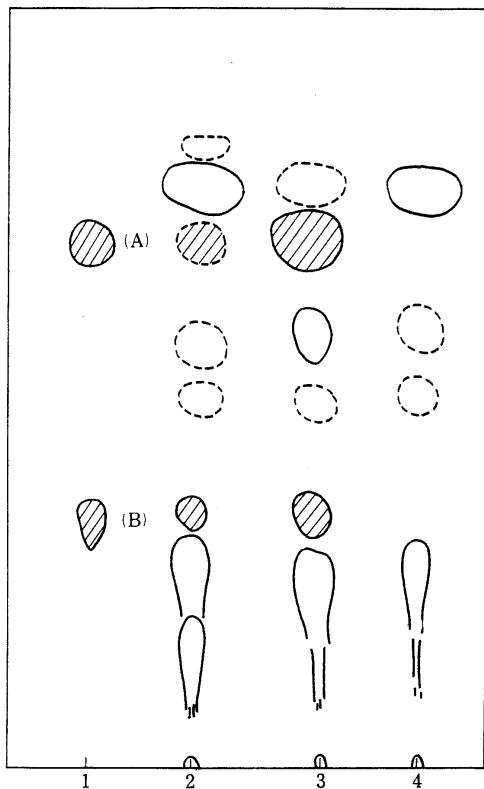


Fig. 7 Comparison of Thin-Layer Chromatograms

- 1 . Menthofuran (A) + Cineol (B)
- 2 . Peppermint oil U S S R (sample)
- 3 . Peppermint oil Mitcham "R" Rectifie
- 4 . Hakka Hakuyu

Solvent : Chloroform, Pet. ether
(Developed by step technique each 12cm)

4 結 論

薄層クロマトグラフ法によるペパーミント油中のメントフラン，シネオールの同時検出法を検討し，*M.Piperita* 種ペパーミント油に通常含まれるこれら成分の分離ができ，呈色状態も共存成分の呈色に比べ非常に特異的であるため試料精油をそのまま展開することによって直接検出ができた。また，内部標準としてメントフランの既知量を同時に展開することによりその近似量を知ることも可能と考える。

したがって，赤外吸収スペクトル法，ガスクロマトグラフ法に本法を併用することによってペパーミント

油の種別判定により迅速確実な方法として利用できるものと考えられる。

おわりに，本研究にあたり試料の提供などで御協力いただいた高砂香料工業 KK 中央研究所，吉田利男博士，村木繁氏，資料の入手に御助力いただいた大阪税関分析室，多田一郎副分析官および御助言いただいた当所，入江分析官に感謝いたします。

文 献

- 1) F. A. Fluckiger, *Pharm. J.* 3, Vol. 682 (1871)
- 2) H. Farnow, F. Poroch ; *Dragoco Report* 7, 163 (1962)
- 3) M. Smith, L. Levi ; *J. Agr. Food. Chem.*, 9, 230 (1961)
- 4) R. Jaspersen-Siel, *Pharm. Acta Helv.*, 36, 141 (1961)
- 5) W. F. Hefendehi, *Plant Med.*, 8, 65 (1960)
- 6) I. C. Nigam, Suharabudhe and Leo Levi , *Canad. J. Chem.*, 41, 1535 (1963)
- 7) 多田一郎；関税中央分析所報 5 59 (1967)
- 8) 大野幸雄，川端欣五；関税中央分析所報，1, 87 (1965)

Simultaneous Detection of Menthofuran and Cineol in Peppermint Oils by Thin-layer Chromatography

YUKIO ONO
Central Customs Laboratory
531 Iwase Matsudo City, Chiba Pref.,

- Received July 31, 1968 -