

報 文

## ガスクロマトグラフ法による調味した生肉中のピペリンの定量

笹 川 邦 雄 , 加 藤 時 信\*

Determination of Piperine in Seasoned  
Fresh Meat by Gas Chromatography

Kunio SASAKAWA and Tokinobu KATO\*

\*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance,  
531, Iwase, Matsudo-shi, Chiba-ken, 271 Japan

Gas chromatographic technique for the determination of piperine in fresh meat seasoned with pepper was investigated.

The recommended procedure for extraction of piperine in seasoned fresh meat is as follows; add 30 ml of chloroform to homogenized seasoned fresh meat and filtrate after shaking for 30 minutes. Add another 30 ml of benzene to residue and filtrate after shaking for 30 minutes. The whole extract obtained by two times repetition of above procedure are concentrated by rotary evaporator at 45 .

By this procedure, piperine was extracted completely from seasoned fresh meat. The extracts were analysed by gas chromatography. Squalane (2.6 mg/ml, benzene solution) was used as an internal standard for gas chromatography. The conditions of gas chromatography were as follows; Column: Silicone OV-101 (5%, 3 mm  $\times$  2 m), Column temperature: 290 , Carrier gas: He (50 ml/min). This method was much better than TLC-UV method<sup>4)</sup> in accuracy.

- Received June 12, 1984 -

## 1 緒 言

調味した生肉の調味料としては、食塩、こしょう、しょう油、ぶどう酒、グルタミン酸ナトリウムなどが種々の割合で組み合わせられて使用されている。商品が輸入される場合には関税率表における分類を決定する必要があり、調味した生肉の場合には調味料の種類と量などにより分類の異なる場合がある。例えば、食塩のみ添加されているものは食塩の量によって調味されていない生肉と同等に扱われたり、塩蔵肉として分類されることがある。また、食

塩とこしょうが添加されているものは食塩と共にこしょうの量が問題となり、十分な調味効果が与えられておれば調製した肉として分類され、調味効果が不十分なものは調味されていない生肉と同等に扱われる。

こしょうが添加されている生肉の関税率表における商品分類に際し、客観的な判断基準としてこしょうの量を知ることが重要なファクターの一つであるが、こしょうを直接定量することは極めて困難である。しかしながらこしょうに特徴的な辛味成分であり調味効果の大きいピペリン量を求め、こしょうの

平均的なピペリン含有量を参考としてピペリン量からこしょうの量に換算することによって調味した生肉中のこしょうの量を調味効果をも反映した量として求めることができるものと考えられる。このような観点から調味した生肉中のピペリン定量法について検討した。

ピペリンの定量法としては幾つかの方法が報告されているが、そのほとんどがこしょうそのものを対象とした方法である。例えば、H. D. Graham のりん酸法<sup>1)</sup>、ASTA 分析法に記載されているクロマトローブ酸法<sup>2)</sup>、C. Genest らの UV 法<sup>3)</sup>、森らの TLC - UV 法<sup>4)</sup>、M. Verzele らの HPLC 法<sup>5)</sup>と固体試料導入システムを用いたキャピラリー GC 法<sup>6)</sup>が報告されている。

生肉中のピペリン定量法についての報告は見当たらないが、こしょう中のピペリン定量法を生肉中のピペリン定量に直接適用すると、肉というマトリックスが加わるにより抽出効率、回収率に大きく影響が生ずるものと予想される。したがって本報ではピペリンの抽出法の検討に重点をおき、抽出液中のピペリン定量法としては、迅速性を考慮してガスクロマトグラフによる方法を採用すると共に森らの TLC - UV 法<sup>4)</sup>と比較検討した結果を報告する。

## 2 実 験

### 2・1 試薬及び試料

クロロホルム、ベンゼン、ジクロロメタン、メチルアルコール、無水硫酸ナトリウム、ピペリン、塩化ナトリウム及びスクアランは市販（和光純薬製）の試薬特級を使用した。

生肉としては、市販のステーキ用牛肉を用いた。こしょうは市販の黒こしょうを摩砕して用いた。

調味した生肉は、ステーキ用牛肉を乳鉢で摩砕したものに、黒こしょうと塩化ナトリウムをそれぞれ 1% になるように加え、再び摩砕し均質に混合したものを使用した。

### 2・2 装 置

ガスクロマトグラフは島津製作所製の GC - 7A 型にクロマトパック C - R1B を接続したもの、紫外分光光度計は島津製作所製のダブルビーム分光

光度計 UV - 190 を使用した。

### 2・3 ピペリンの抽出法

#### a) クロロホルム・ベンゼン法

試料が調味した生肉の場合には約 20g、黒こしょうの場合には 0.2g を精秤し、共栓付き三角フラスコに入れ、クロロホルム 30ml を加えて 30 分間振とうした後、東洋ろ紙 No.6 を用いてろ過する。次に残渣にベンゼン 30ml を加えて 30 分間振とうした後最初に用いたろ紙でろ過する。更にクロロホルム 30ml、最後にベンゼン 30ml で同様に振とう・ろ過する。全ろ液を約 45 の温水浴中で加温しながらアスピレーターを接続したロータリーエバポレーターを用いてろ液が約 15ml になるまで減圧濃縮する。この濃縮した抽出液を 20ml のメスフラスコに移し、内部標準物質としてスクアランのベンゼン溶液（スクアラン 2.6mg/ml）を 1ml 加えて定容する。

#### b) ベンゼン法

a)の方法と同様に、試料を採取した三角フラスコにベンゼンを 1 回当たり 30ml 加えて、合計 4 回振とう・ろ過する。ろ液は濃縮後、内部標準物質を加えて 20ml に定容する。

#### c) ジクロロメタン法

a)の方法と同様に、試料を採取した三角フラスコにジクロロメタンを 1 回当たり 30ml を加えて、合計 3 回振とう・ろ過する。ろ液は濃縮後、内部標準物質を加えて 20ml に定容する。

#### d) クロロホルム法

a)の方法と同様に、試料を採取した三角フラスコにクロロホルムを 1 回当たり 30ml を加えて、合計 3 回振とう・ろ過する。ろ液は濃縮後、内部標準物質を加えて 20ml に定容する。

#### e) メチルアルコール・ベンゼン法

a)の方法と同様に、試料を採取した三角フラスコにメチルアルコールとベンゼンを交互に 1 回当たり 30ml を加えて、合計 4 回振とう・ろ過する。ろ液は無水硫酸ナトリウムを用いて脱水し、濃縮後、内

# 報文 ガスクロマトグラフ法による調味した生肉中のピペリンの定量

部標準物質を加えて 20ml に定容する。

## f) メチルアルコール法

a)の方法と同様に、試料を採取した三角フラスコにメチルアルコールを 1 回当たり 30ml を加えて、合計 3 回振とう・ろ過する。ろ液は無水硫酸ナトリウムを用いて脱水し、濃縮後、内部標準物質を加えて 20ml に定容する。

## 2・4 ガスクロマトグラフ法

ガスクロマトグラフ法の条件は次のとおりである。

分離カラム：Silicone OV-101, 5% on  
Chromosorb GAW - DMCS  
80 ~ 100 mesh, 3 mm × 200 cm  
ガラスカラム

カラム温度：290

注入口温度：300

キャリアガス：He, 50ml/min

この条件により 2・3 で得られた抽出液をガスクロマトグラフに注入し、ピペリンとスクアラン（内部標準物質）のピーク面積強度比を求める。別に試薬のピペリンとスクアランを用いて作成した検量線により試料中のピペリンの量を算出する。

## 2・5 TLC - UV 法

森らの方法を一部修正し、次のように行った。

薄層板：シリカゲル G F<sub>254</sub>, 厚さ 0.25mm,  
メルク製

展開溶媒：四塩化炭素と酢酸エチルの 1 : 1 混合  
溶媒

2・3 で得られた抽出液 50 μl と試薬のピペリン溶液を 1 枚の薄層板の原点になる水平線上の別の場所にそれぞれ長さ 4cm の帯状にスポットし、暗室で 1 時間展開する。展開が終了した薄層板は風乾し、UV ランプでスポットを観察して試薬のピペリンの位置に対応する抽出液のスポット部分をすばやくかき取る。かき取った粉末に温メチルアルコール 5ml を加えてかき混ぜ、2,000rpm で 5 分間遠心分離後、東洋ろ紙 No.5 C でろ過する。更に残渣に温メチルアルコール 5ml を加えて同様に抽出してろ液を 10ml 容のメスフラスコに集めて定容す

る。これと同様に処理して得られた空試験液を対照として 343nm における吸光度を測定する。試薬のピペリンを用いて作成した検量線により試料中のピペリンの量を算出する。

## 3 結果及び考察

### 3・1 ピペリン抽出法の選択

こしょう粉末からピペリンを抽出するための溶剤としては、従来、ベンゼン<sup>2), 4)</sup>、95% エチルアルコール<sup>2)</sup>、ジクロロメタン<sup>5)</sup>などが用いられているが、これらの溶剤が調味した生肉からピペリンを抽出するのに適しているとは限らない。すなわち、試料の主たるマトリックスとなる成分がこしょうそのものであるか生肉であるかの大きな違いがあるので、抽出に及ぼす生肉の影響を考慮する必要がある。

ここでは、従来から使用されている抽出法等を参考として、2・3 に記載した 6 種の抽出方法によりピペリンを抽出し、回収率を比較した。なお、抽出液中のピペリンの定量はガスクロマトグラフ法によった。

Table 1 にこしょう及び調味した生肉からのピペリンの回収率をこしょうからのピペリン抽出量が最も多かった方法を 100%として示した。こしょうからはクロロホルム・ベンゼン法によって最も多くピペリンが回収され、ジクロロメタン法及びベンゼン法によってもそれぞれの回収率が 97.5%と 98.9%で

Table 1 Comparison of Piperine Extraction Methods

Extraction Methods*	Piperine Recovery (%)	
	Black Pepper	Seasoned Fresh Meat
a) Chloroform - Benzene	100 %	99.7%
b) Benzene	97.5	88.5
c) Dichloromethan	98.9	75.0
d) Chloroform	83.5	74.2
e) Methyl alcohol-Benzene	74.8	53.6
f) Methyl alcohol	65.4	53.6

\* Extraction methods are cited in 2・3 a) ~ f)

あり良好な結果が得られたが、その他の方法では回収不十分であった。

調味した生肉からのピペリン回収率は、クロロホルム・ベンゼン法では 99.7% であり、この方法によりほぼ完全にピペリンを抽出できることが判明した。その他の方法ではいずれもこしょうからの回収率よりかなり小さい値を示し、生肉による妨害を大きく受けていることが示唆された。

クロロホルム・ベンゼン法が調味した生肉からピペリンを抽出するのに適している理由は、この方法はクロロホルムとベンゼンを交互に用いて振とう抽出するが、ベンゼン抽出時には肉が団子状に固まり、クロロホルム抽出時には肉がばらばらにほぐれる現象が観察されることから、クロロホルムがベンゼン抽出時においても生肉の妨害を最小限に止める効果を有するためと推測される。

クロロホルムとベンゼンを交互に用いて振とう抽出する方法で、何回抽出すればピペリンがほぼ完全に抽出されるかについて検討した結果を Table 2 に示した。クロロホルムとベンゼンを各 1 回では抽出不十分であったが、各 2 回以上の抽出では回収率に若干のばらつきはあるもののほとんど変化がなく、クロロホルムとベンゼンをそれぞれ 2 回用いて交互に抽出することによりほぼ完全にピペリンを回収できることが判明した。

以上の検討結果から、調味した生肉中のピペリン抽出に最も良い方法として、2・3 の a) に記載した“クロロホルム・ベンゼン法”を選定した。

Table 2 Relationship between the Piperine Recovery and the Chloroform - Benzene Extraction Times

Extraction Time	Piperine Recovery (%)	
	Black Pepper	Seasoned Fresh Meat
(Chloroform, Benzene) × 1	94.3%	72.5%
(Chloroform, Benzene) × 2	100	99.7
(Chloroform, Benzene) × 3	96.0	95.6
(Chloroform, Benzene) × 4	102.6	102.6
(Chloroform, Benzene) × 5	102.4	89.3

### 3・2 ガスクロマトグラフ法

ガスクロマトグラフ法の条件は、カラム充填剤の種類、カラム温度、内部標準物質の種類等について幾つかの検討を行った結果から、2・4 に記載した条件によることとした。ガスクロマトグラフに注入する試料は、2・3 の a) に記載したクロロホルム・ベンゼン法により得られた抽出液を用いた。

この方法により得られたガスクロマトグラムは Fig.1 に示した。内部標準物質として添加したスクアランのピークは、生肉及びこしょうの抽出液からはピークが出現しない位置に出現している。この方法によれば 1 回の測定は 30 分以内に終了する。

内部標準物質のスクアランに対するピペリンの重量比とピーク面積強度比の関係から作成した検量線は Fig.2 に示したとおりであり、ほぼ原点をとる良い直線関係が得られた。

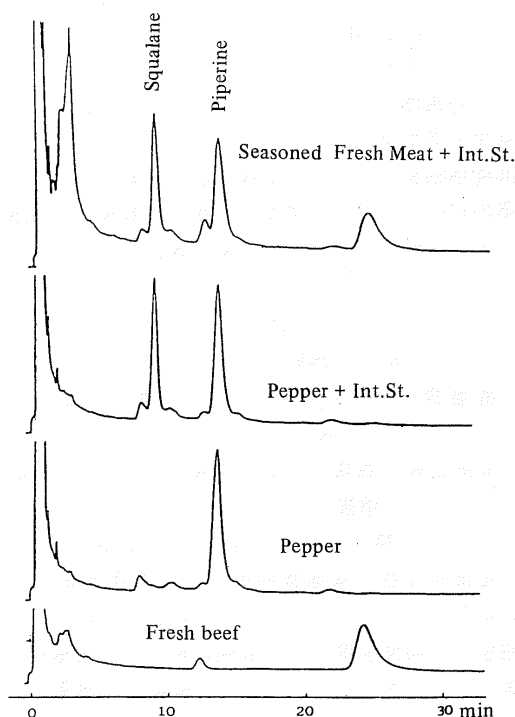


Fig.1 Gas chromatograms of Extracts

Column: Silicone OV - 101,  
5%(3mm × 2m)

Column Temp: 290

Carrier Gas: He 50 ml/min

Detector: FID

## 報文 ガスクロマトグラフ法による調味した生肉中のピペリンの定量

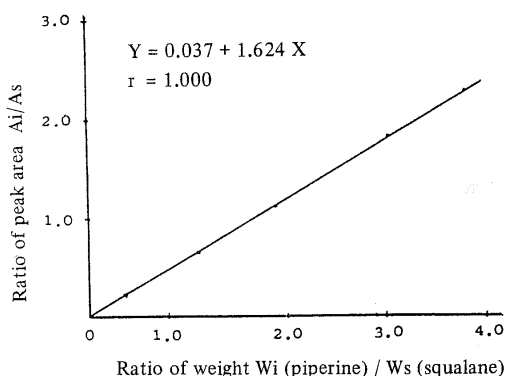


Fig.2 Calibration Curve for Piperine Content

## 3・3 ガスクロマトグラフ法と TLC - UV 法の比較

黒こしょうと調味した生肉 (1%の黒こしょうを含む。)から,2・3の a)に記載したクロロホルム・ベンゼン法により調製して得られた抽出液を用い,ガスクロマトグラフ法と TLC-UV 法<sup>4)</sup>によって定量した結果は Table 3 に示したとおりである。なお,ここに用いた黒こしょうは約 3%のピペリン

が含まれている。Sample No.A~E 及び A'~E'はそれぞれ試料採取から別々に抽出したものである。

Table 3 からわかるとおり, TLC - UV 法に比較してガスクロマトグラフ法は標準偏差が小さく,かつ,定量値が大きい傾向が認められる。TLC - UV 法によって得られた定量値がガスクロマトグラフ法によって得られた値より小さいのは, TLC - UV 法は TLC 分離後シリカゲルからピペリンを抽出する操作が入るので,この抽出過程での完全抽出が困難であるためと推測される。黒こしょうと調味した生肉について行ったガスクロマトグラフ法による標準偏差は調味した生肉がかなり大きい値を示す。この原因は,定量値の平均値が黒こしょうと調味した生肉でほぼ一致していることから,抽出法の問題よりもむしろ調味した生肉中に含まれている黒こしょうの不均一性によるものと考えられる。

以上の実験結果から,同一の抽出液からピペリンを定量する場合, TLC - UV 法よりもガスクロマトグラフ法によって精度良く行うことができることが判明した。また,操作性,分析時間の点からもガスクロマトグラフ法が優れていた。

Table 3 Determination of Piperine in Black Pepper and Seasoned Fresh Meat by the Two Methods

Sample	Black Pepper		Sample	Seasoned Fresh Meat	
Sampling No.	TLC-UV Method <sup>4)</sup>	GC Method	Sampling No.	TLC-UV Method <sup>4)</sup>	GC Method
A	5.748 mg	6.179 mg	A'	5.888 mg	5.894 mg
B	4.980	5.912	B'	5.326	5.442
C	4.493	6.117	C'	4.710	6.788
D	4.715	6.017	D'	4.941	5.947
E	4.496	6.061	E'	5.728	6.116
Average	4.886	6.057	Average	5.319	6.037
St. Dev.	0.47	0.09	St. Dev.	0.45	0.44
C.V.	9.5	1.5	C.V.	8.4	7.2

Sampling weight: Black Pepper = 200 mg, Seasoned Fresh Meat (containing 1% Black Pepper) = 20 g

## 4 要 約

こしょうにより調味した生肉中のピペリンをガスクロマトグラフ法により定量するための検討を行った。

調味した生肉中のピペリンは,クロロホルム・ベンゼン法によりほぼ完全に抽出できた。この抽出液中のピペリンは,内部標準物質としてスクアランを用い,分離カラムとして Silicone 0 - 101 (5%, on Chromosorb GAW - DMCS, 80 ~

報文 ガスクロマトグラフ法による調味した生肉中のピペリンの定量

100mesh, 3mm × 200cm) を用いるガスクロマトグラフ法により精度よく定量できた。

このガスクロマトグラフ法は, TLC - UV 法に

比較して, 簡易・迅速性及び分析精度において優れていることが判明した。

## 文 献

- 1 ) H. D. Graham : J. Food Sci. , 30 , 651 (1965)
- 2 ) American Spice Trade Association : " Official Analytical Methods of the ASTA " , Methods 12 , 25 (1968)(ASTA , Inc.)
- 3 ) C. Genest , D.M.Smith , D.G.Chapman : J.Agr.Food Chem. , 11 , 508 (1963)
- 4 ) 森一雄 , 山本泰男 , 駒井正一 : 日本食品工業学会誌 , 21 , 466 (1974)
- 5 ) M. Verzele , P. Mussche , S. A. Qureshi : J. Chromatogr. , 172 , 493 (1979)
- 6 ) M. Verzele , G. Redant , S. Qureshi , P. Sandra : J. Chromatogr. , 199 , 105 (1980)