

ノート

紫外外部吸収法による調味生肉中のピペリンの定量

笹川邦雄, 川端省三*

Determination of Piperine in Seasoned Fresh Meat by UV Spectrophotometry.

Kunio SASAKAWA and Shozo KAWABATA*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance,

531, Iwase, Matsudo-shi,

Chiba-ken, 271 Japan

UV spectrophotometric technique for the determination of small amount of piperine in fresh meat seasoned with pepper was investigated.

Piperine in meat was extracted with chloroform and benzene. The extract was concentrated by rotary evaporator at 45°. In order to separate lipid in the extract, silica gel column chromatography was carried out. Condition was as follows; silica gel used was 5g, and lipids were eluted with 150ml benzene (2ml/min), then, piperine was eluted with 50ml methanol. It was confirmed that piperine was completely recovered from silica gel column under this condition.

Piperine separated was measured by UV spectrophotometer (343nm) and calculated to pepper from conversion formula.

This UV spectrometric method was simpler and quicker than GC-method.

- Received June 13, 1987 -

1 緒 言

前報¹⁾において、調味した生肉中のこしょうの定量法として、こしょう中の辛味の主成分であるピペリン量をガスクロマトグラフィーにより定量し、こしょうに換算する方法を報告した。

ピペリンの最適抽出溶剤であるクロロホルム及びベンゼンはいずれも生肉中の脂質も溶解するため試料の濃縮が十分できなかったり、ピペリン含量が少ない試料ではガスクロマトグラフィーにおいて脂質の影響に

よりベースラインが安定しないため高感度測定が困難なことや、測定後のカラムからの脂質の除去に時間がかかる等の問題点が生じた。

ピペリン溶液からの脂質の除去法としては、薄層クロマトグラフィーによりピペリンと脂質を分離した後、ピペリンのスポットをかきとる方法もあるが、本報では操作の簡便なシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる方法を検討した。また、ガスクロマトグラフ法と簡易な紫外外部吸収法 (UV 法) による定量法を比較検討した結果を報告する。

*大蔵省関税中央分析所 〒271 千葉県松戸市岩瀬 531

2 実験

2.1 試薬及び試料

クロロホルム、ベンゼン、メタノール、ピペリン及びスクアランは市販（ピペリンはアルドリッヂ製、スクアランはメルク製、その他は和光純薬製）の試薬特級を使用した。クロマトグラフィー用シリカゲル（Mesh 100~200）は東海化学工業所製のものを使用した。

こしょうは市販の黒こしょうを摩碎したものを用いた。

脂質は市販牛細切れ肉からクロロホルムで抽出したものを用いた。

輸入調製生肉はスピードカッターでミンチしたものを試料とした。

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-1B 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 シリカゲルカラムクロマトグラフィー

2.3.1 シリカゲル量及び脂質溶出量の検討

シリカゲル 5g, 7.5g 及び 10g をベンゼンでスラリー状にし、内径 15mm のカラムクロマト管に充填した。各カラム上に脂質 2.5g を含むベンゼン溶液 10ml を採りベンゼン（流速 2ml/min）で脂質を溶出した。あらかじめ重量を量った受器に溶出液を 25ml 毎に分取し、ベンゼンを留去した後の重量を量り脂質の溶出量を求めた。

また、脂質 0.5g, 1.25g 及び 2.5g を含むベンゼン溶液 10ml をシリカゲル 5g のカラムクロマト管に採り、ベンゼン（流速 2ml/min）で脂質を溶出させ、あらかじめ重量を量った受器に溶出液を 25ml 毎に分取し、ベンゼンを留去した後の重量を量り脂質の溶出量を求めた。

2.3.2 ピペリン溶出条件の検討

シリカゲル 5g をベンゼンでスラリー状にして、内径 15mm のカラムクロマト管に充填した。ピペリン・ベンゼン溶液 10ml 及び同量のピペリン・ベンゼン溶液に脂質 2.5g を加えたものを各カラム上に採り

ベンゼン 300ml（流速 2ml/min）で脂質を溶出させた。次にメタノール 100ml でピペリンを溶出させた。溶出液を 50ml 毎に分取し、空試験で同様に処理して得られた溶出液を対照液として 343nm における吸光度を測定した。

2.4 UV 方と GC 法の比較

2.4.1 検液の調製

こしょう約 150mg を 50ml 容共栓付三角フラスコに正確に量り採り、ベンゼン 30ml を加え沸騰湯浴上で 1 時間還流抽出した。温時 100ml 容共栓付三角フラスコを受器としてろ過し、残さにベンゼン 30ml を加え 1 時間還流抽出後ろ過し、全ろ液を 45 の温水浴中でロータリーエバポレーターを用いて約 10ml まで減圧濃縮した後、50ml 容メスフラスコにメタノールで定容し検液とした。

2.4.2 UV 法

検液の 5ml をホールピペットで 100ml 容メスフラスコに移し入れメタノールで定容した。この溶液を光路長 1cm のセルを用いて、343nm における吸光度を測定した。ピペリン含有量（%）は、次式により計算した。

$$\text{ピペリン} (\%) = \frac{\text{吸光度} \times \text{希釈倍数}}{\text{試料} (g) \times \text{吸光係数}} \times 100$$

2.4.3 GC 法

ガスクロマトグラフィーの条件は前報¹⁾と同じである。

検液の 25ml を約 5ml までさらに濃縮した。この溶液に内部標準物質としてスクアランのベンゼン溶液（1mg/ml）を 2ml 加えた。この濃縮液 1μl をガスクロマトグラフに注入し、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ピペリン量を算出した。

2.5 輸入調製生肉中のピペリンの定量

2.5.1 ピペリン溶液の調製

試料からのピペリンの抽出は前報¹⁾記載のクロロホルム・ベンゼン法によった。その際の試料採取量は 20g とし、抽出溶剤は各 40ml 使用した。抽出液は約 45

ノート 紫外部吸収法による調味生肉中のピペリンの定量

の温水浴中でロータリーエバポレーターを用いて液量が約30mlになるまで減圧濃縮した。この濃縮液を50ml容メスフラスコに移しベンゼンで定容し抽出液とした。

2.5.2 シリカゲルクロマトグラフィー

UV法の場合は抽出液の10mlをホールピペットでシリカゲル5gを充填したカラムに採り、ベンゼン140ml(流速2ml/min)で脂質を溶出させ除去した。次に50ml容メスフラスコを受器とし、メタノール45mlでカラムからピペリンを溶出させた後、メタノールで定容しピペリン溶液とした。

GC法の場合は抽出液の25mlをホールピペットでシリカゲル5gを充填したカラムに採り、ベンゼン140ml(流速2ml/min)で脂質を溶出させ除去した。内部標準物質としてスクアランのベンゼン溶液1.0ml(1mg/ml)をあらかじめ加えた100ml容梨型フラスコを受器とし、メタノール45mlでカラムからピペリンを溶出させた。溶出液は約45の温水浴中でロータリーエバポレーターを用いて液量が約10mlになるまで減圧濃縮した。

2.5.3 ピペリンの定量

UV法の場合は2.5.2で得た溶液を光路長1cmのセルを用いて、空試験で同様に処理して得られた溶出液を対照液として343nmにおける吸光度を測定した。

試料中のピペリン含量への換算は次式によった。

$$\text{ピペリン} (\%) = \frac{E \times 250}{S \times 126878} \times 100$$

$$= \frac{E}{S} \times 0.1970$$

ただし、E : 吸光度
250 : 希釈倍率
S : 試料採取量(g)
126878 : 吸光係数

GC法の場合は2.5.2で得た濃縮液1μlをガスクロマトグラフに注入し、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ピペリン量を算出した。

試料中のピペリン含量への換算は次式によった

$$\text{ピペリン} (\%) = \frac{E \times W \times 2}{S \times 1000} \times 100$$

ただし、E : 検量線から求めた重量比
W : 内部標準に用いたスクアランの量(g)
2 : 希釈倍率
S : 試料採取量

3 結果及び考察

3.1 シリカゲルカラムクロマトグラフィー

Fig.1にシリカゲル量と脂質溶出率の関係を示す。いずれのカラムでも溶出液量の増加と共に脂質溶出率も増加している。シリカゲル量5g及び7.5gでは、溶出液量が150mlを超えると溶出率に大差がない。

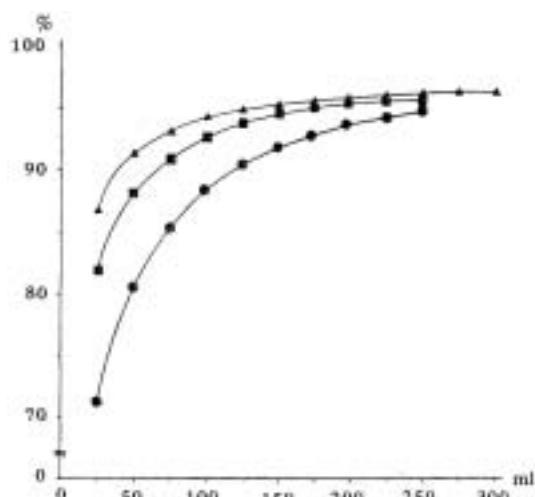


Fig. 1 Relationship between recovery of lipid and elution volume by silica gel column chromatography.
column chromatographic condition: elute: benzene, elution rate: 2ml/min, silica gel: 5g
lipid content: ▲-▲: 2.5 g, ■-■: 1.25 g,
●-●: 0.5 g

Fig. 2に脂質含量と脂質溶出率の関係を示す。脂質含量が少ないものほど同一溶液量における溶出率は

低い。溶出溶液量 150ml の場合、カラム内に残っている脂質の割合は脂質 2.5g では約 5%、0.5g では約 7% である。

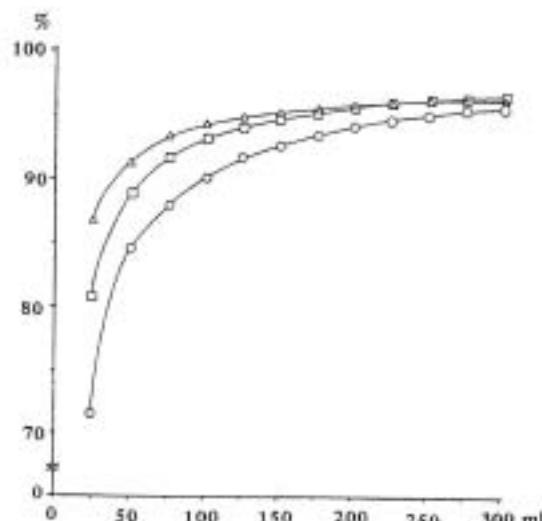


Fig. 2 Relationship between recovery of lipid and elution volume by silica gel column chromatography.
column chromatographic condition: elute: benzene, elution rate: 2 ml/min, lipid content: 2.5 g
silica gel: △-△: 5 g, □-□: 7.5 g, ○-○: 10 g

実際の試料の場合、肉の種類により脂肪含量が異なるが、牛肉では 8~36%、豚肉では 6~50%、羊肉では 12~45% であり、カラムで除去しなければならない脂質の量は脂肪含量の一番多い豚肉では最大 GC 法で 5g、UV 法で 1g となる。

シリカゲルクロマト管からのピペリンの溶出溶剤はメタノールにより行った。この理由としては、メタノール溶液における分子吸光係数を用いてピペリン量の計算を行うためである。

シリカゲル 5g カラムからのピペリン溶出条件を検討した結果、ピペリンはベンゼン溶液 300ml 程度では溶出せず、メタノール 50ml でほぼ溶出することがわかった。ピペリン溶液からの脂質の除去は、分析の迅速性を考慮するとベンゼン 150ml が適当と思われる。

以上の結果から脂質除去のためのシリカゲルクロマトグラフィーは、シリカゲル 5g、ベンゼン 150ml で

行い、カラムからのピペリン溶出はメタノール 50ml で行うこととした。

3.2 UV 法と GC 法の比較

Table 1 Results of repeatability of piperine in black pepper by two methods.

	UV method	GC method
no. of data	8	8
average	4.13 %	4.13 %
max. value	4.19 %	4.18 %
min. value	4.09 %	4.05 %
variance	0.001166	0.001581
st. deviation	3.415 %	4.337 %

$$FO = 1.613 \quad TO = 0.384$$

$$F \text{ Value} = 3.79 \quad T \text{ value} = 2.15$$

Table 1 に UV 法と GC 法によるこしょうの定量結果を示す。定量値の最大値及び最小値の差は UV 法のほうが GC 法よりも狭い。平均値は両法とも同じである。F 検定及び T 検定をおこなったところ、両法は信頼度 95% で有意差は認められなかった。

3.3 調製生肉中のピペリンの定量

Fig. 3 にシリカゲルカラムで脂質を除去したものと未処理のもののガスクロマトグラムを示す。内部標準物質の量は同量である。カラム未処理のものは脂質の影響により濃縮が不十分でピペリンを定量することができないが、カラム処理により少量のピペリンを定量することができる。

Table 2 に UV 法及び GC 法による定量結果を示す。

Table 2 Determination of piperine content in imported seasoned fresh meat by two methods.

	UV method (%)	GC method (%)	crude fat (%)
A	0.0013	0.0010	34.5
B	0.0024	0.0010	26.5
C	0.0021	0.0011	26.9
D	0.0051	0.0048	16.0

UV 法の値は GC 法に比べてやや高くなっているが、この理由について検討中である。

ノート 紫外部吸収法による調味生肉中のピペリンの定量

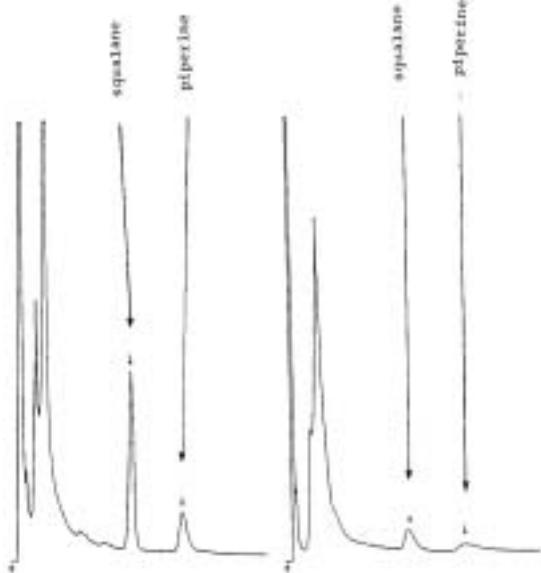


Fig. 3 Gas chromatograms of extracts, A : treatment of silica gel column chromatography
 B : untreatment of silica gel column chromatography
 gas chromatographic condition ; column :
 silicone OV-101 5% (3mmx2m), column
 temp : 290 , carrier gas : He (50ml/min)
 detector : FID

4 要 約

こしょうで調味した調製生肉中のピペリンを定量する方法の検討を行った。

前報¹⁾で報告したクロロホルム・ベンゼン抽出液中の脂質をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより除去することにより少量のピペリンを定量することができた。

また、紫外部吸収法は、ガスクロマトグラフ法と同様に簡易・迅速性に優れていることが判明した。

文 献

1) 笹川邦雄, 加藤時信: 本誌, 25, 19 (1985)