

## ノート

## 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による調製豚肉中のピペリンの定量

中 村 文 雄, 赤 崎 哲 也, 東 郷 雅 子, 岩 本 和 郎\*

## Determination of Piperine in Seasoned Pork Meat by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Fumio NAKAMURA, Tetsuya AKASAKI, Masako TOGO and Kazuro IWAMOTO\*

\*Osaka Customs Laboratory

4-10-3, Chikko, Minato-ku, Osaka-shi, Osaka 552-0021 Japan

A HPLC method was developed for the determination of piperine in seasoned pork meat. This paper reports the utilization of geometrical isomers of piperine using a Zorbax BP-SIL (4.6mm i.d. × 250mm) column, eluted with n-hexane/ethanol/acetic acid (95 / 4 / 1) as the mobile phase by HPLC with UV detection at 343nm. Piperine was extracted from the meat with chloroform, and phenazine, as internal standard, was used. then this solution was diluted to ten times with n-hexane for HPLC. This method showed a good reproducibility and recovery. But, quantitative results were lower than those obtained by using conventional ultraviolet method.

## 1. 緒 言

近年、豚肉にこしょうを添加した調製豚肉の分析依頼が増加している。これらは、そのこしょうの含有率により、関税率表第2類及び第16類のいずれかに分類されることになるが、その税率格差は非常に大きい。その分類基準は、昭和61年5月関税分類例規集第1601.00号1.フレッシュソーセージの分類基準についての事務連絡により、こしょうそのものの含有量0.3%をもって目安とし、こしょう中に含有されるピペリンの平均含有量5%を基準に判定する、と規定されている。

現在、税関では、関税中央分析所参考分析法 No.25「調製肉中のピペリン定量分析法」に基づき、主としてUV法によりピペリンを定量している。しかし、この方法は健康及び環境衛生上問題の多いベンゼン及びクロロホルムを多量に使用し、分析時間も長時間を要する。

そこで、我々は健康及び環境衛生上問題が少なく、また、比較的短時間で分析ができるHPLC法によるピペリンの定量法について検討したので報告する。

## 2. 実 験

## 2.1 実験条件

## 2.1.1 装置及び測定条件

HPLC: HP-1100 System (Hewlett Packard 製)

カラム: Zorbax BP-SIL (4.6mm i.d. × 250mm)

移動相: n-hexane / ethanol / acetic acid = 95 / 4 / 1

流速: 1.0ml / min

恒温槽温度: 40

検出: UV343nm &amp; DAD

注入量: 50 µl

注入溶液組成: n-hexane/chloroform = 90/10

ホモジナイザー: 日本精機製作所製

超音波洗浄機: ヤマト科学製

## 2.1.2 試 薬

ピペリン: 試薬 (Aldrich 製)

フェナジン: 試薬特級 (東京化成製)

n-ヘキサン, エタノール: HPLC 用 (キシダ化学製)

酢酸: 試薬特級 (キシダ化学製)

クロロホルム: 試薬1級 (キシダ化学製)

粒状黒こしょう, 豚肉: 市販品

豚脂: 試薬 (キシダ化学製)

Ground seasoned pork meat: 大阪税関管内で輸入申告のあったもの

## 2.2 実験方法

## 2.2.1 ピペリンの光異性化物の分離

ピペリンの0.1%クロロホルム溶液を2分し、一方は日光の当たる窓際に、もう一方は暗所に1週間放置後、それぞれn-ヘキサンで10倍に希釈し、HPLCに注入した。以下特に注釈

のないものは、HPLC に注入の際は n-ヘキサンで 10 倍に希釈してから注入した。

また、ピペリンを粉末のまま、日光の当たる窓際に 1 週間放置し、0.1%クロロホルム溶液とし、HPLC に注入した。

#### 2.2.2 こしょう中のピペリンの分離

コーヒーマルで細かく粉碎した粒状黒こしょう 1g にクロロホルム 50ml を加え、15 分間超音波振とうし、No.5C のろ紙及び 0.45  $\mu$ m のメンブランフィルターでろ過したものを HPLC に注入した。

#### 2.2.3 検量線

16  $\mu$ g/ml から 80  $\mu$ g/ml のピペリンを含むクロロホルム溶液を調製し、それぞれ HPLC に注入し、濃度とピーク面積比の関係を調べた。なお、内標準物質として、フェナジンを 96  $\mu$ g/ml となるように加えた。

#### 2.2.4 再現性

48  $\mu$ g/ml のピペリン及び 96  $\mu$ g/ml のフェナジンを含むクロロホルム標準溶液を HPLC に 5 回注入し、そのピーク面積比の再現性を調べた。

#### 2.2.5 こしょう中のピペリンの定量

コーヒーマルで細かく粉碎した粒状黒こしょう 100mg を共栓付き 100ml 容褐色三角フラスコに精秤し、以下 Fig.1 のとおり操作し、HPLC に注入して定量した。

#### 2.2.6 豚脂の溶出の影響

豚脂 2g を 25ml のクロロホルムに溶かし、HPLC に注入して、クロロホルムによりピペリンとともに抽出される豚脂の溶出による影響を検出波長 210nm を用いて調べた。

#### 2.2.7 模擬試料中のピペリンの定量 (回収率)

共栓付き 100ml 容褐色三角フラスコに 2.2.5 で粉碎したこしょう 60mg 及びホモジナイズした豚肉 (調味されていない生肉) 20g を精秤し、以下 Fig.1 のとおり操作し、HPLC に注入して定量し、回収率を求めた。

#### 2.2.8 実試料中のピペリンの定量 (UV 法との比較)

実際に分析依頼のあった Ground seasoned pork meat をホモジナイズしたものの 20g を共栓付き 100ml 容褐色三角フラスコに精秤し、以下 Fig.1 のとおり操作し、HPLC に注入して定量した。

また、関税中央分析所参考分析法 No.25 による UV 法によりピペリンを定量し、HPLC 法と比較した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 ピペリンの光異性化物の分離

こしょうの主な辛味成分であるピペリンの定量法については、香辛料としてのこしょうの品質評価の観点から、多くの報告がある<sup>1)-12)</sup>。

ピペリンは光により異性化し、シャビシン、イソシャビシン、イソピペリン及びピペリンの幾何異性体混合物を生成することが知られている。それらの構造式を Fig.2 に示した。ピペリン

Sample in Amber Erlenmeyer F1ask with Stopper

Add 50ml Chloroform

Ultrasonicate for 15min

Add 4.8mg Phenazine as Internal Standard

Shake for 30sec

Filtrate (Paper No.5C and Membrane 0.45  $\mu$ m) \*

Dilute 1ml to 10ml with n-Hexane \*

Inject 50  $\mu$ l to HPLC

\*This procedure must be carried out in the dark.

Fig.1 Analytical Procedure

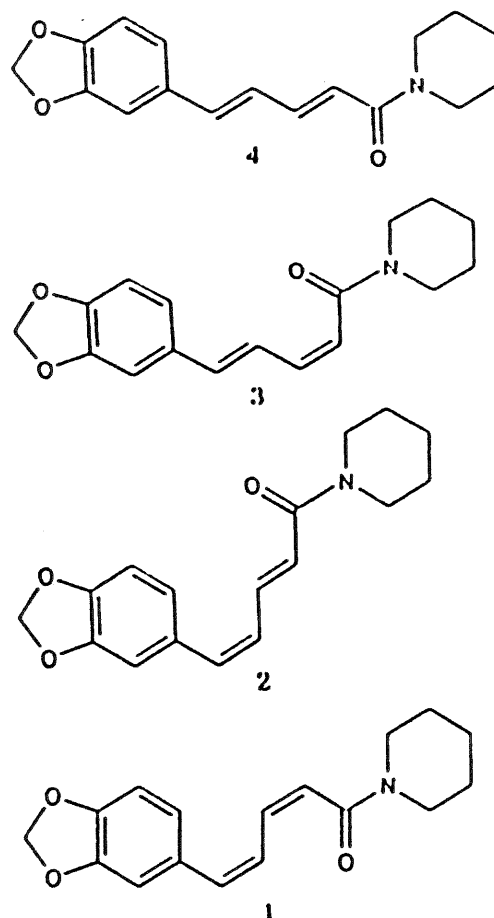


Fig.2 Structural formulae of piperine and its geometrical isomers  
1, chavicine ; 2, isochavicine ; 3, isopiperine ; 4, piperine

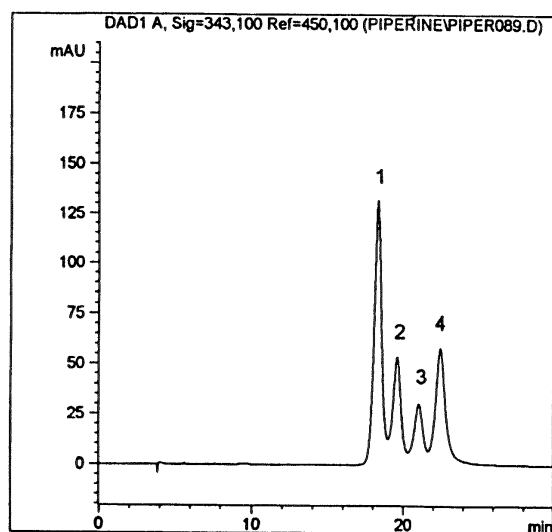


Fig.3 Chromatogram of a photoisomerized piperine  
Chromatographic conditions were described in 2.1.1  
Peaks in order of appearance:1, chavicine;  
2, isochavicine;3, isopiperine;4, piperine

以外の異性体はほとんど辛さを有しないことが報告されている<sup>13)</sup>。HPLC によるピペリンの幾何異性体の分離は、こしょう中のピペリンの分離条件を検討する上で非常に重要である<sup>12)</sup>。

クロロホルム溶液の光照射物のクロマトグラムを Fig. 3 に示した。

この HPLC 条件により、ピペリンの幾何異性体を分離することができた。各ピークの同定は DAD による最大紫外線吸収波長によった<sup>13) 14)</sup>。各ピークの DAD による UV 波形を Fig.4 に示した。

しかし、暗所保管クロロホルム溶液及び光照射粉末ピペリンについては、いずれも異性化は起こらなかった。このことから、光のみにより異性化が起こるのではなく、溶液状態のピペリンに光を照射することによって、異性化が起こることがわかった。

粉末状のピペリンに異性化が起こらないことは、森ら<sup>2)</sup>の報告と一致する。

### 3. 2 こしょう中のピペリンの分離

こしょう中のピペリンの幾何異性体の存在については、存在するという報告<sup>3)</sup>もあるが、存在しないという報告<sup>1) 2) 7)</sup>もある。

また、こしょう中のピペリン類縁体についても多くの報告がある。

ピペリンのピロリジン置換体はピペリリンと呼ばれるが、ピペリン同様の辛さを有するという報告<sup>13)</sup>や少ししかないという報告<sup>2)</sup>もある。ピペリンの二重結合がひとつ少ない構造のピペラニン<sup>15)</sup>はある。エチレン鎖がひとつ多い構造のピペレチン<sup>1)</sup>についても報告されている<sup>1)</sup>が、辛さについては言及されていない。また、これらについても幾何異性体が考えられるが、どちらにしてもこしょう中にはピペリン以外は少量しか含まれず、しかも

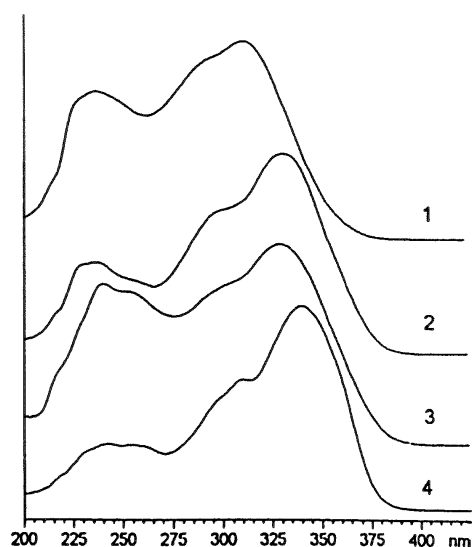


Fig.4 UV Spectra of the peaks in Fig.3  
Spectrum numbers are same as peak numbers in Fig.3.

辛さもそれほどないと考えられることから、こしょうの辛さの評価はピペリンを定量することで達成されるものと考えられる。それら類縁体の構造式を Fig.5 に示した。

こしょうのクロロホルム抽出物のクロマトグラムを Fig.6 に各ピークの UV 波形を Fig.7 に示した。

その結果、保持時間と UV 波形から考えるとピペリンの幾何異性体の存在は認められなかった。また、ピペリン以外の各ピークの同定は、溶出順序と UV 波形から推定した<sup>1) 2) 5) 13) -16)</sup>。

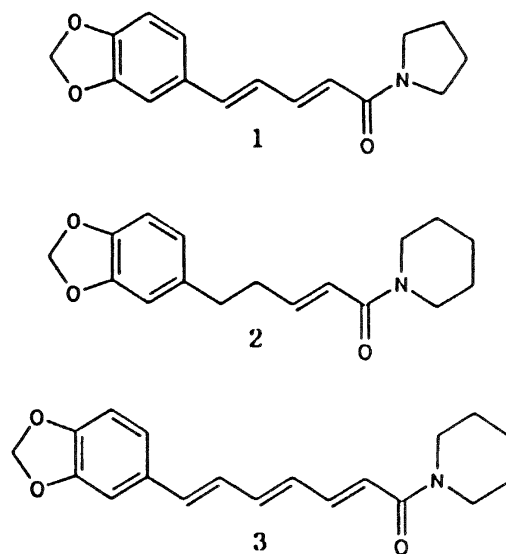


Fig.5 Structural formulae of some analogs of piperine  
1, piperylin; 2, piperanine; 3, piperettin

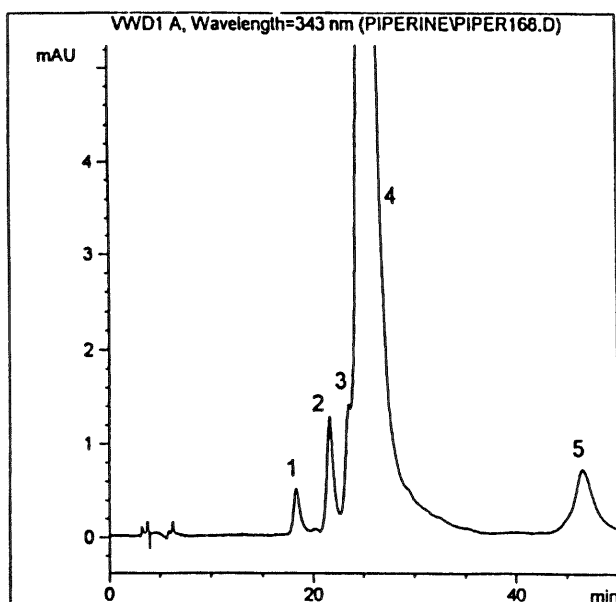


Fig6 Chromatogram of a pepper extract

Peaks in order of appearance: 1, unknown; 2, unknown;  
3, piperettin; 4, piperine; 5, piperylin

### 3.3 検量線

内標準物質についても、いろいろな物質を検討した報告があるが、ここでは Archer ら<sup>10)</sup>が用いたフェナジン(2, 3, 5, 6, -ジベンゾピラジン)を検討した。その結果、フェナジンはこしょう中の各成分と分離し、内標準物質として適当であることを確認した。標準溶液のクロマトグラムの一例を Fig.8 に示した。また、ピペリンとフェナジンの DAD による UV 波形を Fig.9 に示した。

ピペリンとフェナジンについて、濃度比とピーク面積比との関係を求めると、相関式:  $Y = 2.3978X - 0.0183$  (相関関係 0.99998) となり、原点付近を通る良好な直線性を示した。

### 3.4 再現性

ピペリンとフェナジンについてのピーク面積比の再現性を求めると、平均値: 1.3429 (変動係数 0.13%,  $n=5$ ) と良好な再現性を示した。

### 3.5 こしょう中のピペリンの定量

こしょう中のピペリン含有率は、平均値: 3.21% (変動係数 0.65%,  $n=5$ ) であった。

これは、生産地が不明な市販品のこしょうを用いたことや、水分の影響等を考慮したとしても事務連絡の規定値 5% より少ない。なお、超音波振とう抽出を 1 時間行っても含有率の変化はなかった。

### 3.6 豚脂の溶出の影響

豚脂は、この HPLC 条件で 7 分までに溶出することを 210nm の検出により確認した。そのクロマトグラムを Fig.10 に示した。フェナジンの保持時間が約 8 分であることから、定量に影響を与えないことを確認した。

これは、この HPLC 条件では移動相に有機溶媒系を用いる

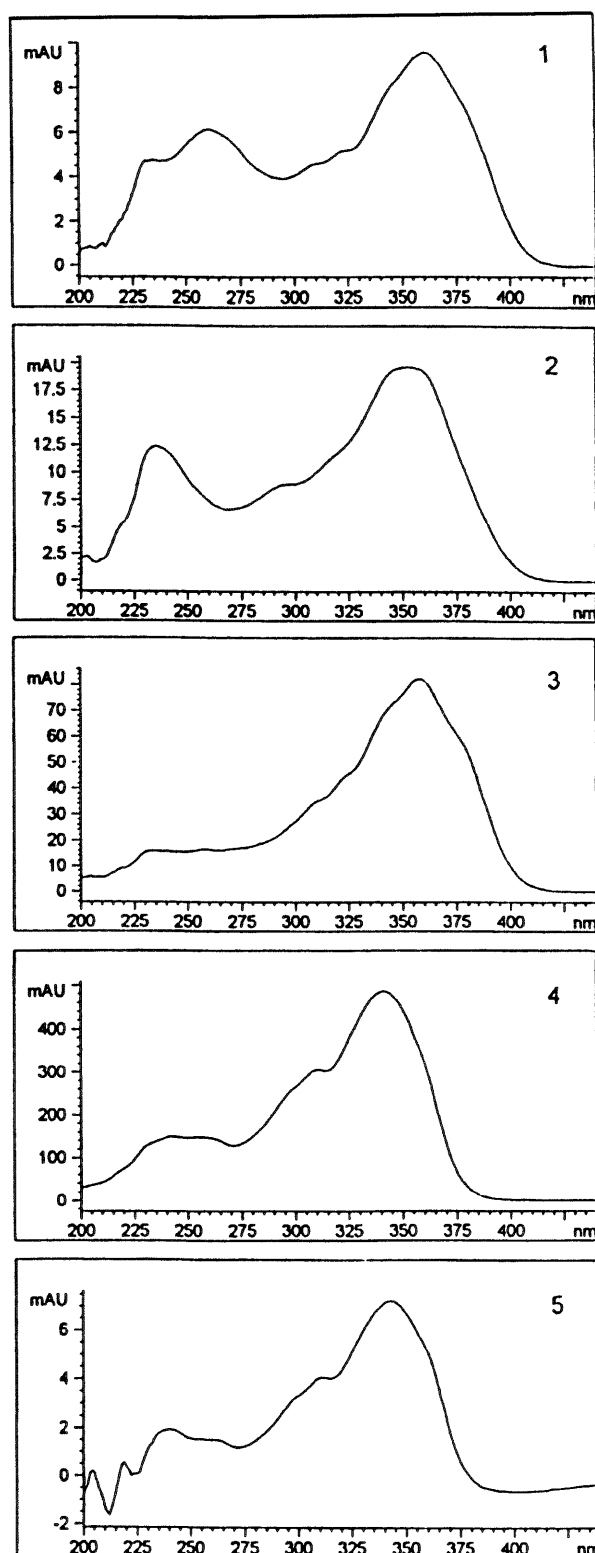


Fig.7 UV Spectra of the peaks in Fig.6

Spectrum numbers are same as peak numbers in Fig.6

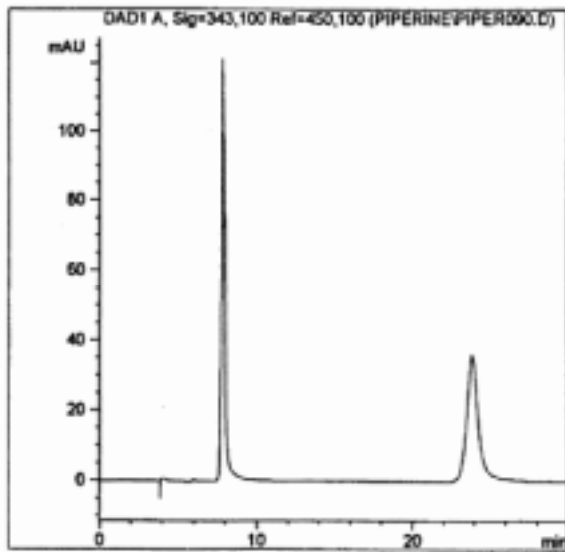


Fig.8 Chromatogram of a standard solution  
Peaks in order of appearance:phenazine,piperine

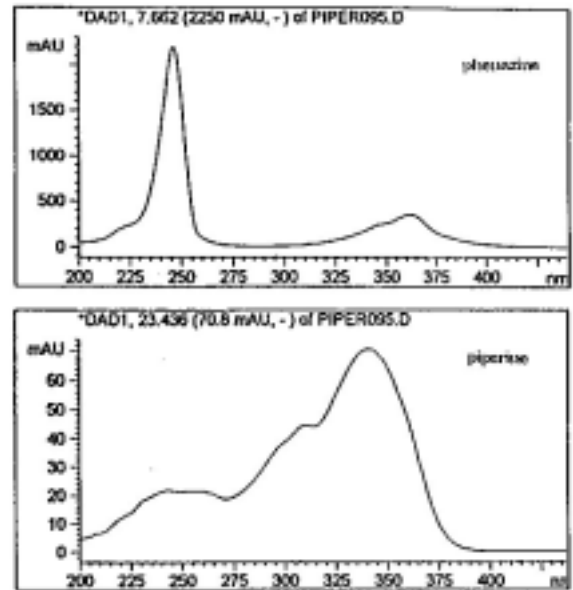


Fig.9 UV Spectra of piperine and phenazine

ため、これまでの報告<sup>9)11)</sup>で多大な労力を要していた豚脂の除去が省略でき、分析時間の短縮化及び省力化が図られることになった。

### 3.7 模擬試料中のピペリンの定量(回収率)

模擬試料中のピペリンの回収率は、平均値:99.33%(変動係数 0.95%, n=5)と良好な回収率を得た(回収率の計算には、3.5で求めたピペリン含有率3.21%を用いた)。

### 3.8 実試料中のピペリンの定量(UV法との比較)

HPLC法による実試料中のピペリンの定量値は、181.5ppm(変動係数 1.24%, n=3)となり、こしょうの含有率は、事務連絡どおりこしょう中のピペリンの含有率 5%を基準として計算すると0.363%となった。

UV法によると、202.5ppm(変動係数 1.81%, n=3)となり、同様に 5%基準で計算すると、こしょう含有率は0.405%となった。

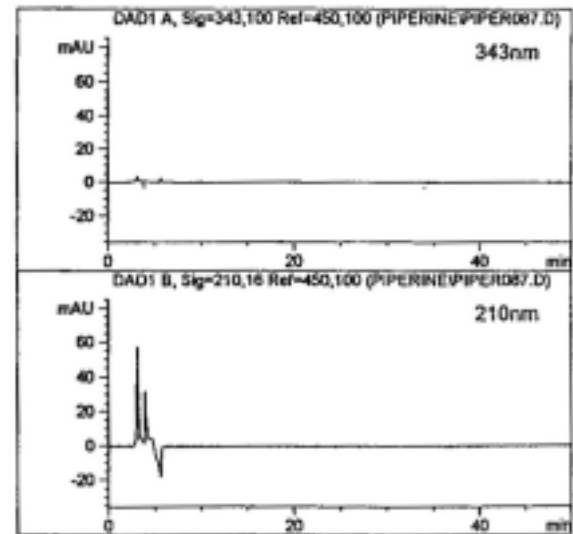


Fig.10 Chromatogram of a pork fat  
Detector wavelength, 210nm and 343nm.  
Other conditions were same as in Fig.3

## 4. 要 約

今回、カラムとして化学装飾されていないシリカゲルカラムを、移動相として n-ヘキサン/エタノール/酢酸 = 95/4/1 を用いた HPLC 法による調製豚肉中のピペリンの定量について検討した。この方法は、再現性、回収率ともに良好で、健康及び環境衛生上問題の多い有機溶媒の使用量を低くすることができ、これまで多大な労力を要した前処理を省くことが可能となった。

しかし、関税中央分析所参考分析法 No.25 による UV 法と比較すると、1 割程度低い値が得られた。これは、Galetto ら<sup>4)</sup>も報告しているように、UV 法は測定波長である 343nm に吸収をもつ化合物 (ピペレチン、ピペリリン等) をすべて定量してしまうためである。調味に寄与しているのはこしょうの量ではなく、その辛み成分であるピペリンの量である。したがって、ピペリンのみの量を評価することが、調味を評価することになる。そのためにも、HPLC 法によりピペリンを定量することが最適である。

## 文 献

- 1) C. Genest, D. M. Smith, D. G. Chapman : J. Agri. Food. Chem, 11, 508 (1963)
- 2) 森一雄, 山本泰男, 駒井正一 : Nippon Shokuhin kogyo Gakkaishi, 21, 466 (1974)
- 3) R. De Cleyn, M. Verzele : Chromatographia, 8, 435 (1975)
- 4) W. G. Galetto, D. E. Walger, S. M. Levy: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 59, 951 (1976)
- 5) V. S. Govindarajan " Food Taste Chemistry ", pp.53 ~ 92, A.C.S.(1979)
- 6) M. Verzele, S. Qureshi : Chromatographia, 13, 241 (1980)
- 7) M. Verzele, G. Redant, S. Qureshi, P. Sandra : J. Chromatogr, 199, 105 (1980)
- 8) M. Rathnawathie, K. A. Buckle : J. Chromatogr, 264, 316 (1983)
- 9) 笹川邦雄, 加藤時信 : 本誌, 25, 19 (1985)
- 10) A. W. Archer : J. Chromatogr, 351, 595 (1986)
- 11) 笹川邦雄, 川端省三 : 本誌, 27, 173 (1987)
- 12) M. Verzele, F. V. Damme, G. Schuddinck : J. Chromatogr, 471, 335 (1989)
- 13) R. Grewe, W. Freist, H. Neumann, S. Kersten : Chem. Ber., 103, 3752 (1970)
- 14) R. Cleyn, M. Verzele : Bull. Soc. Chim. Belg., 84, 435 (1975)
- 15) J. T. Traxler : J. Agri. Food. Chem, 19, 1135 (1971)
- 16) D. E. Games, N. J. Alcock : J. Chromatogr. 294, 269 (1984)