

ノート

ジエチルエーテル・メタノール抽出法による調製肉中のピペリンの定量

西 尾 仁 美, 松 本 吉三郎, 藤 村 徹, 後 藤 弘 一*

Determination of quantitative analysis of piperine in seasoned meat with pepper by diethylether - methanol method

Hitomi NISHIO, Yoshisaburo MATSUMOTO, Toru FUJIMURA, Hirokazu GOTO

*Kobe Customs Laboratory

12 - 1, Shinko - cho, Chuo - ku, Kobe - shi, 650 - 0041 Japan

The analytical method for the determination of small amount of piperine in seasoned meat with pepper was investigated.

Now the customs laboratory method No.25 has been the only method to measured it. But this method has some problems, for example, using much benzene and chloroform, which are harmful to human beings and taking much time to analyze one sample. Already, some reports about the determination of piperine were proposed by KATO group and NAKAMURA group. But, we tried to solve these problems by another method using diethylether and methanol. And we proposed a HPLC method for quantitation of piperine in seasoned pork by using Zorbax ODS column.

It was found that we could quantitate piperine by UV - VIS spectrometer (wave length : 343 nm) after refluxing on water bath and using diethylether and methanol which are less harmful than benzen and chloroform as solvents for short time compared with previous method. Zorbax ODS column could be applies to the quantitation of piperine in seasoned pork.

1. 緒 言

近年, 肉に, こしょう等を添加した調製肉の分析事例が増加している。これらは, こしょうの含有率により, 関税率表上, 第2類か第16類のいずれかに分類されることとなるが, その税率格差は非常に大きい。こしょうに関する分類基準は, 関税分類例規集第2類の「肉類の調製品の分類基準」及び, 1602.50 項の「牛肉の調製品」により, こしょうそのものの含有率 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率 5%を基準に判定する, と規定されている。この規定に基づき, 現在, 税関では, 関税中央分析所・参考分析法 25「調製肉中のピペリンの定量分析法」により, ピペリンを定量し, こしょう含有量を算出している。

しかし, この方法では, 調製肉中からピペリンを抽出するために, 健康及び環境衛生上有害な有機溶剤であるクロロホルム及びベンゼンを多量に使用し, 分析時間も長時間を要する等, 改善の余地があると考えられ, 加藤ら^①は, 酢酸エチル抽出法

を, 中村ら^②は, クロロホルム抽出法を研究した。

我々は, さらに, ピペリンの抽出法について, 比較的危害の少ないジエチルエーテルとメタノールを組み合わせる抽出方法を検討し, 全国の税関分析室に配備されている吸光度計を用いて吸光度を測定し, ピペリン含有量を定量した。また, テオブロミンの定量に使用しているゾルボックス ODS カラムを用い, 高速液体クロマトグラフィーでの定量について検討したので報告する。

2. 実 験

2. 1 試 料

白こしょう(市販品)

豚挽肉(市販品)

調製豚肉(神戸税関管内で輸入申告されたもの)

2. 2 試 薬

ピペリン試薬特級(Aldrich 社製)

ジエチルエーテル級（米山薬品工業）
 メタノール級（米山薬品工業）
 硫酸ナトリウム（無水）一級（米山薬品工業）
 グルコース特級（米山薬品工業）
 ソルビトール特級（米山薬品工業）

2.3 装置

ダブルビーム分光光度計（日立 U-2000 型）
 測定波長：343nm
 セル：石えい 光路長 10mm
 対照液：メタノール
 高速液体クロマトグラフ装置（HPLC）
 検出器：日立 L-4200 UV-VIS Detector
 ポンプ：日立 L-6000Pump
 カラムオープン：日立 655 A-52
 データステーション：日立 U-5500 A 型
 カラム：ゾルボックス ODS（4.6mm×I.P.X 250mm）
 測定波長：343nm
 カラム温度：40
 移動相：メタノール
 流量：1ml/分

2.4 ジエチルエーテル・メタノール抽出法

白こしょうを含有する調製豚肉 200g をミキサーで挽肉とし、そのうち約 20g を褐色フラスコに秤量し、ジエチルエーテル 50ml を加え 5 分間振とうし、別の褐色フラスコにろ紙（2）を用いてろ過する。次に、メタノール 20ml を加え 5 分間振とうし、同じ褐色フラスコにろ過する。

ろ液を約 10ml 程度まで減圧濃縮（40℃，900mbar）する。

一方、先のろ過に使用したろ紙を調製豚肉の入った褐色フラスコにあわせ入れた後、メタノール 100ml を加え、湯浴上で冷却管をつけ 30 分煮沸還流する。流水で冷却後、これに、濃縮した褐色フラスコ内容物をメタノール 40ml で洗い入れ。次に、無水硫酸ナトリウムを少量加えて脱水し、200ml 容褐色メスフラスコを受器としてろ過し、メタノールで定容する。冷蔵庫で約 30 分冷却し、油脂を析出させる。

常温に戻して、褐色フラスコにろ過し、メタノールで 5 倍に希釈して検液とする。

なお、吸光度が、1 以上となる場合は、さらに希釈して検液とする。

2.5 白こしょう中のピペリンの抽出

白こしょう約 0.1g を 200ml 容褐色三角フラスコに正確に秤量し、メタノール 100ml を加え、2 時間加熱還流した。冷却後、200ml 容褐色メスフラスコに全量をろ過しメタノールで定容した。さらに、メタノールで 5 倍に希釈し、検液とした。

2.6 妨害要素

調製豚肉に加えられたこしょう中のピペリンを、抽出溶剤にメタノールを使用して抽出するとき、調製豚肉中に混在する他の成分が、吸光度測定の影響要素となるかどうかについて、実際のサンプルに含まれている、水分、ソルビトール、グルコース及び脂肪分（肉中のメタノール可溶分として）のそれぞれを

メタノールに溶解して、343nm の吸光度を測定した。

2.7 標準品による抽出法の比較

市販の豚挽肉約 20g に白こしょう約 0.1g を加えてよく混合し、ジエチルエーテル・メタノール抽出法の操作のうち、メタノール 100ml による“煮沸還流 30 分”を“煮沸還流 45 分”及び、“常温振とう 60 分”に変更して、それぞれ 5 回ピペリンを抽出し、343nm の吸光度を測定、吸光係数（=126878）を用いてピペリン含有率を算出した。

2.8 輸入調製豚肉の分析

実際に、輸入申告された調製豚肉を用いて、参考分析法 25 のクロロホルム・ベンゼン抽出法とジエチルエーテル・メタノール法により、ピペリンを抽出、吸光度を測定し、ピペリン含有率を算出した。

2.9 高速液体クロマトグラフィーによるピペリンの定量

ココア調製品中のテオブロミンの定量に使用している高速液体クロマトグラフ用カラム“ゾルボックス ODS”を用いてピペリンを定量した。

2.9.1 ピペリン定量用検量線の作成

ピペリン試薬をメタノールに溶解し、濃度既知の標準液 4 種を調製する。HPLC の試料注入口から、標準ピペリン液 80μl を 20μl ループに注入し、ループ内の液を完全に入れ換えた後、インジェクトレバーを操作して装置に試料を導入し測定する。絶対検量線法を用いて、ピペリンの検量線を作成した。

2.9.2 標準品より抽出したピペリンの定量

2.7 より得た検液を繰り返し測定した。

2.9.3 輸入調製豚肉の分析

輸入調製豚肉（輸入品 B）を用いて、ジエチルエーテル・メタノール抽出法により、検液を調製し、吸光度法並びに HPLC 法を用いて、ピペリンを定量した。

3. 結果及び考察

3.1 こしょう中のピペリン含有率

加藤らのこしょう中のピペリン抽出実験を参考とし、メタノールを用いてこしょう中のピペリンを抽出し、吸光度法により測定、定量した結果、今回の実験に用いた白こしょうのピペリンの含有率は、5.4%であった。

3.2 妨害要素

実際の輸入調製豚肉においては、豚肉が本来含有している水分並びに脂肪分や肉質の改質の為に加えられるソルビトール並びにグルコースが、抽出溶剤として使用するメタノールに溶け出すが、実際の検液と同程度に希釈した場合、343nm の測定波長帯では吸光度に影響しない。（Fig. 1）

3.3 標準品による抽出法の比較

メタノール 100ml による抽出操作を変更した場合の標準品のこしょう中のピペリン回収率を Table 1 に示す。それぞれの回収率に大きな差は認められないが、メタノール 100ml による 30 分煮沸還流が、抽出効率 101.4%、標準偏差は、0.077 と安定

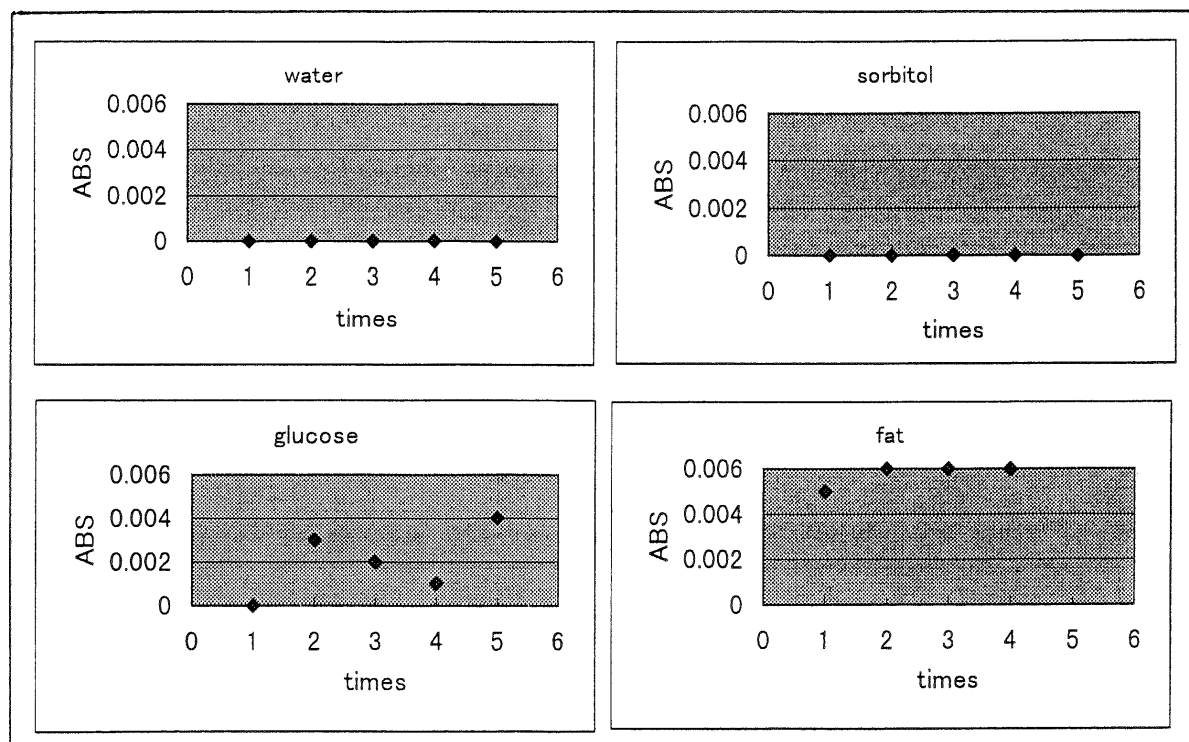


Fig.1 Influence of interfering material in methanol

Table1 Recoveries of piperine in pork added white pepper by proposal method

	Shaking 60min.	Refluxing 45min.	Refluxing 30min.
No.1	5.14	5.13	5.47
No.2	5.46	5.08	5.48
No.3	5.53	5.55	5.54
No.4	5.21	5.47	5.59
No.5	5.31	5.40	5.36
Average	5.33	5.32	5.48
St. Deviation	0.146	0.187	0.077
Recovery(%)	98.70%	98.50%	101.40%

Table2 Analytical results of piperine content in seasoned pork by two method

		benzen-chloroform method	diethylether-methanol method
Recovery of piperine (%)	No.1	0.028	0.032
	No.2	0.030	0.030
	No.3	0.027	0.032
	No.4	0.027	0.033
	No.5	0.027	0.028
	Average(%)	0.027	0.031
	St. Deviation	0.0013	0.0020
Recovery of pepper(%)		0.54	0.62

していた。

3.4 輸入調製豚肉の分析結果

実際の輸入調製豚肉（輸入品A）中のピペリンを測定した結果を Table 2 に示す。参考分析法に比べ、ジエチルエーテル・メタノール抽出法は、1～1.2 倍の高い値を示し、抽出効率良好であった。

3.5 参考分析法とジエチルエーテル・メタノール抽出法の分析時間の比較

両分析法の1検体あたりの分析時間を比較したものを Table 3 に示す。

ジエチルエーテル・メタノール法では、1検体あたりの分析時間が、95分に短縮され、1日に5検体処理も可能であり、加熱還流装置を多くすれば、複数のサンプルを平行処理できるた

め、さらに多数の分析が可能となる。

3.6 参考分析法とジエチルエーテル・メタノール抽出法のコストの比較

両分析法の1検体あたりのコストを比較したものを Table 4 に示す。参考分析法では、クロロホルム・ベンゼン等の毒性の強い溶剤を多量に使用するのに対し、ジエチルエーテル・メタノール抽出法では、ジエチルエーテル・メタノールの毒性の弱い溶剤であり、そのコストも半分以下である。

3.7 HPLCによるピペリンの定量用検量線

白こしょうから抽出したピペリンのクロマトグラムを Fig. 2 に示す。ピペリン試薬のクロマトグラムを Fig. 3 に示す。

ピペリンの4点検量線は、Fig. 4のとおりである。 R^2 は0.9997であり、良好な直線性を示した。

Table3 Comparison of analytical time for one sample by two methods

benzen-chloroform method		diethylether-methanol method	
evaporation	10min	evaporation	10min
column chromatography	93min	refluxing	30min
vibration	120min	coolant	30min
measurement by UV	3min	measurement by UV	3min
		other	22min
Total	250min	Total	95min

Table4 Comparison of each amount of solvents and cost for one sample by two methods

solvent			Customs lab. Method		Proposal method	
	volume	unit price	amount	price	amount	price
diethylether	500ml	¥1,950			50ml	¥195
benzen	500ml	¥700	267ml	¥374		
chloroform	500ml	¥1,100	80ml	¥176		
methanol	500ml	¥500	50ml	¥50	240ml	¥50
wacogel	500g	¥4,200	5g	¥42		
total				¥672		¥245

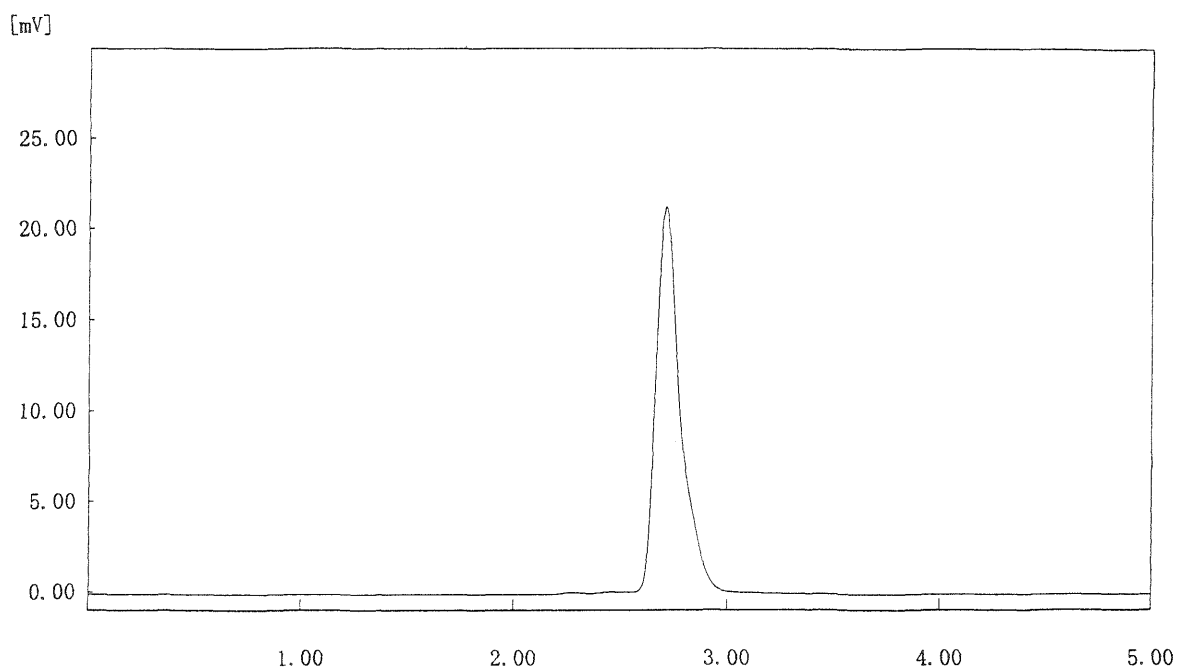


Fig.2 chromatogram of a white pepper extract 1. piperin

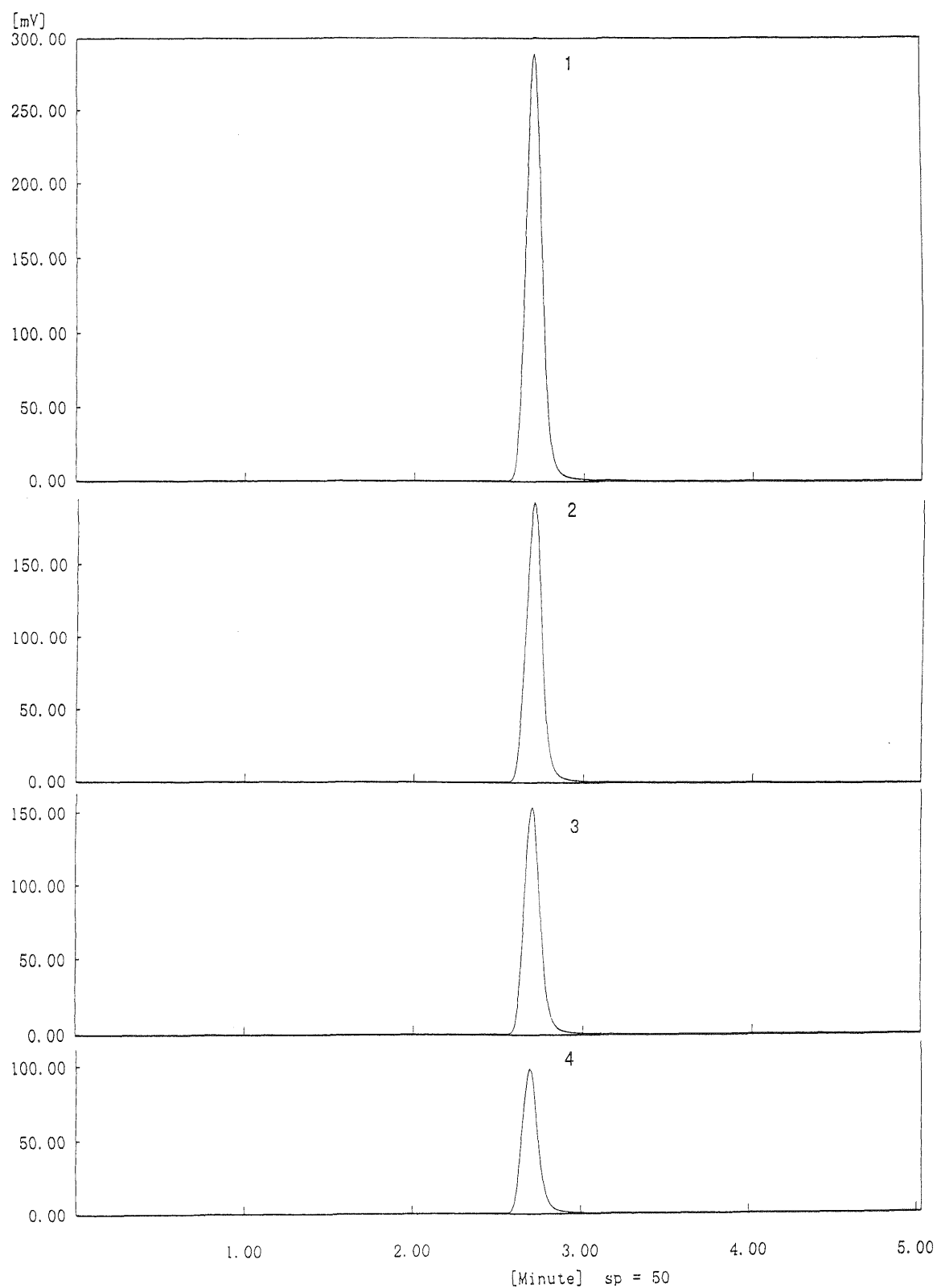


Fig.3 Chromatogram of standard piperine

1. 2.91 $\mu\text{g/ml}$ (piperine / methanol)
2. 1.94 $\mu\text{g/ml}$ (piperine / methanol)
3. 1.552 $\mu\text{g/ml}$ (pipertine / methanol)
4. 0.97 $\mu\text{g/ml}$ (piperine / mechanol)

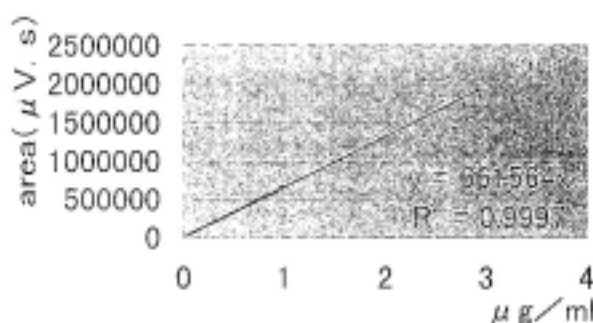


Fig.4 Calibration curve by HPLC

Table5 analytical results of piperine content in seasoned fresh meat by HPLC

No.	R. T	$\mu V. S$	piperine content ($\mu g/ml$)
1	2.709	168717	0.2762
2	2.709	168318	0.2755
3	2.709	168217	0.2753
4	2.709	168167	0.2752
5	2.669	167642	0.2743
AVE		168212	0.2753
St.Deviation		246.16	0.00044

3.8 標準品より抽出したピペリン検液のHPLC定量結果
ジエチルエーテル・メタノール抽出法で得た検液について、5回繰り返し測定した結果をTable 5に示す。標準偏差も小さく、良好な結果であった。

3.9 輸入調製豚肉の吸光度法とHPLC法との比較
両分析法の分析値をTable 6に示す。HPLC法の方が、少し

Table6 Comparison of recoveries of piperine in seasoned pork by two methods

	UV method (Height)	HPLC method (Area)
No.1	0.330	153538
No.2	0.331	153648
No.3	0.330	154028
No.4	0.330	154379
No.5	0.332	154687
Average	0.3306	154056
St.deviation	0.000894427	484.268
recovery of piperine	0.02595%	0.02509%
recovery of pepper	0.5190%	0.5018%

低い値となっているが、343nmに吸収を持つピペリン異性体以外の化合物が分離したためと考えられる。

4. 要 約

調製肉中のピペリンの定量分析に用いる際の抽出法、並びに抽出検液の測定法について検討を行なった。

新たに検討した、ジエチルエーテル・メタノール抽出法は、多量の試料(20g以上)からの抽出が可能であり、安定した分析値を示した。

参考分析法に比べ、分析時間を短縮でき、分析コストは少なくなった。また、溶剤の毒性も低いことから調製豚肉中のピペリンの定量に有効な抽出方法であることがわかった。

なお、ジエチルエーテル・メタノール抽出法とHPLC法を組み合わせることにより、さらに、効率的かつ正確な分析が可能となるものと思われる。

文 献

- 1) 笹川邦雄, 加藤時信; 本誌, 25, 19 (1985)
- 2) 笹川邦雄, 川端省三; 本誌, 27, 173 (1987)
- 3) A.B. Wood, Maureen L. Barrow & D.J. James: Flavour and Fragrance Journal Vol. 3, 55 - 64 (1988)
- 4) 吸光光度分析通則 JIS K 0115 (1992)
- 5) 加藤康紀, 佐藤里子, 富田健次, 関川義明, 氏原寛; 本誌, 36, 5 (1997)
- 6) 中村文雄, 赤崎哲也, 東郷雅子, 岩本和郎; 本誌, 37, 1 (1998)