〔報文〕

ガンマ線照射コショウの成分解析 (第 1 報)

—コショウの紫外部吸収成分の抽出法と高速液体クロマトグラフィーによる分析—

高木和子・奥山典生

東京都立大学理学部化学科

(〒158 東京都世田谷区深沢 2-1-1)

Analysis of Gamma Irradiated Pepper Constituents (Part 1)

— The Extraction and Analysis of Ultraviolet Constituents of Gamma Irradiated Pepper —

Kazuko TAKAGI and Tsuneo OKUYAMA

*Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University,
2-1-1, Fukasawa, Setagaya-ku, Tokyo 158*

A reversed phase high performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed for the analysis of many constituents of pepper at the same time. And a extraction method of ultraviolet absorbing constituents from papper was developed for the HPLC analysis. The Ultraviolet absorbing constituents were extracted by precooled Automatic Air-Hammer from frozen pepper with 20% acetonitrile in water. The process of extraction was achieved under cooling by liquid nitrogen from start to end. The extracted constituents were separated on a reversed phase C₈ (LiChrospher 300 RP- 8 10 μ m 0.4 I. D. $\times$ 0.4 cm and LiChrosorb RP- 8 SelectB 0.4 I. D. $\times$ 25 cm) column with a concave gradient from 0.1% trifluoro acetic acid (TFA) in water to 75% acetonitrile and 0.1% TFA in water for 60 minutes. The eluted constituents were detected 210 nm and 280 nm. The present method permits the detection of about 50 peaks by 280 nm.

コショウをガンマ線滅菌した際の、変動成分の有無を検討することは、ガンマ線滅菌の是非を議論するうえで、極めて重要である。コショウの成分の分析で、これまでに報告されたものは、ガスクロマトグラフィーによる精油¹⁾や、脂肪酸^{2) 3)}の分析や、辛味成分のピペリン、シャビシンの高速液体クロマトグラフィー^{4) -7)}または、ガスクロマトグラフィー⁸⁾、薄

層クロマトグラフィー⁹⁾による分析や、総窒素量から算出した、蛋白質の定量などである。しかし、ガンマ線滅菌による変動成分の有無を検討する目的のためには、これらのように特定の物質群を対象とした分析法ではなく、できるだけ多くの成分を一斉に分析し、さらに成分の微小な変化をとらえることのできる分析手法の開発が必要と考えられる。そこで筆者らは、コショ

ウの成分のうちの紫外部吸収物質について、その抽出方法と、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析方法の検討を行った。

実験方法

1) 試料

試料として、浅岡香辛料 (東京都板橋区坂下9-1) より購入したコショウ (賞味期限1987年7月15日) を用いた。

2) 試薬

クロマトグラフィーの溶離液に用いた水は、水道水を一回ステンレス蒸溜後イオン交換樹脂塔で処理し、さらにガラス蒸溜したものを用い、アセトニトリルは液体クロマトグラフ用を、トリフルオロ酢酸はアミノ酸配列分析用をそれぞれ用いた (共に和光純薬)。標準物質としてピペリン (Aldrich), クマリン (高砂香料), ウラシル (和光純薬), クロロゲン酸, カフェイン酸, チロシン (東京化成), スコボレチン (Fuluka), L-DOPA (半井化学) を用いた。

それぞれの標準溶液の調製方法は、次の通りである。ピペリン, クマリン, ウンベリフェロンは、それぞれ1 mgずつを、75%アセトニトリル-0.1% TFA (最終溶液) 1 mlに溶かし、そのうちの10 μ lを0.1% TFA (初期溶液) 1 mlで希釈し試料とした。ウラシル, L-DOPA, チロシン, トリブファン, クロロゲン酸, カフェイン酸は、それぞれ1 mgずつ測りとり、0.1% TFA 1 mlで溶かし、10 μ lをさらに同じ溶液1 mlに希釈して、試料溶液とした。

スコボレチンは、1 mgをエタノール1 mlに溶かし、10 μ lを0.1% TFA 1 mlに希釈して、試料溶液とした。

3) 高速液体クロマトグラフィー装置とカラム充填剤

ポンプは、JASCO Intelligent HPLC 880-PUを用い、グラジエントプログラムをコンピューター (MSX) で電磁弁を制御する低圧混合方式により作成し、初期溶液; 0.1% TFA水溶液, 最終溶液; 75

%アセトニトリル-0.1% TFA水溶液の60分間リニアグラジエントまたはコンケイブグラジエントにより流速1.0 ml/minで溶出を行なった。カラムは、LiChrosorb RP-8 Select B (0.4I. D. x 25cm) を用い、検出はShimadzu Model SPD-2 A 2 台で210 nmと280 nmの2波長で行ない、記録計 (Shimadzu R-112) につないだ。

実験結果

1. 紫外部吸収物質の抽出法の検討

コショウの紫外部吸収成分を、高速液体クロマトグラフィーによって分析するための抽出法について、乳鉢と乳棒による方法と、Air-Hammer (Fig. 1) による方法の2通りについて検討を行った。

Fig. 1 Extractor of the pepper constituents
The extraction method was described in material and method

前者の方法は以下のようにして行った。乳鉢に液体窒素約25mlを入れ、蒸発後白コショウ2 gを加える。さらに液体窒素約25mlを加え蒸発後、凍ったコショウ

ウを乳棒で砕く。抽出溶液の20%アセトニトリル水溶液2.0mlを加え、さらに乳棒で粉末化し、5分間遠心分離を15000rpmで行なう。上澄みをフィルター（エキクロディスク、0.45 μ m）でろ過し、これを試料溶液とした。

Air-Hammer法は、コショウ1粒をあらかじめ液体窒素で冷却したステンレス製の凍結組織破砕器に入れ、さらに液体窒素2mlを加え、コショウを凍結する。抽出溶液の20%アセトニトリル水溶液をコショウ重量50mgに対し100 μ l相当加え凍結する。Automatic Air Hammerを押し付け、5秒間破砕する。破砕後、破砕器の中で粉状になったコショウと抽出溶媒をスパーテルでかきとり、1.5ml用プラスチック製遠心管に入れ室温で1分間放置し解凍後、遠心分離を3分間15000rpmで2度繰り返す、上層液をHPLC分析用の試料溶液とした。

各々の方法で得られた試料溶液をHPLCで分析した（Fig. 2, 3）。溶出は、リニアグラジエント法で行った。

Fig. 2 Chromatogram of the white pepper constituents extracted with manual mill. Conditions : column ; Lichrosorb RP - 8 . solvent A, 0.1% TFA in water ; B, 75 % acetonitrile and 0.1% TFA in water ; gradient programme, concave gradient from 100% A to B over 60 min ; flow rate, 1.0ml/min ; detection wavelength ; 210 nm and 280 nm.

Fig. 3 Chromatogram of the white pepper constituents extracted with the extractor. The HPLC conditions were described as Fig. 2.

さらに、Air Hammer法では抽出回数に伴う抽出される成分への影響を検討するため、1回目の抽出で得られた、遠心分離後の残渣からさらに2回、3回と抽出を繰り返す、同様な方法で分析し（Fig. 4, 5）、これらを相互に比較した。

その結果、凍結破砕器を用いると、乳鉢法と比較してごく短時間にコショウを凍らせたまま破砕でき、また破砕時間を一定にすれば、破砕の状態を一定に保つことができ、再現性に優れていた。また、検出されるピークの数も両者で大きな差はなかった。以上の結果から、Air Hammer法で抽出する方法を常法とした。また、抽出回数に伴う抽出成分とその量の変化を比べると、比較的親水性の成分（20分までに溶出する）のピーク高さは2回、3回で確実に低くなり、3回目の抽出溶液中には7～8分で溶出される物質は全く検出されなかった。一方、50分以降に溶出する比較的疎水性と思われるピークは、逆に抽出回数の増加と共に高くなっていた。しかし、1回目には抽出されず、2、3回目の抽出で新たに検出されるピークはなかった。以上のことより、成分物質には抽出のされやすさに差はあるが、種々の条件におけるコショウの成分を比較するには、1回目抽出液の分析で比較できると考えられた。従って、凍結破砕器で破砕し抽出し得られた1回目抽出液を、試料溶液として用いることとした。

Fig. 4 Chromatogram of the white pepper constituents extracted secondarily with the extractor. The HPLC conditions were described as Fig. 2.

Fig. 5 Chromatogram of the white pepper constituents extracted thirdly with the extractor. The HPLC conditions were described as Fig. 2.

2. HPLCの分析条件の検討

試料溶液の分離条件をリニアグラジエント溶出法 (Fig. 6) とコンケイブグラジエント溶出法 (Fig. 3) の2法で行い、それぞれ分離を検討した。

その結果、前者の方法では30分までに溶出されるピークが多くよい分離は得られなかった。一方コンケイブグラジエント溶出法では、これらのピークを分離よく分離させることができた。このため、以下、コンケイブグラジエント溶出法を用いることとした。

また、この条件では溶出されない物質が、カラムに徐々に蓄積して (極めて疎水性の高い物質あるいは高

Fig. 6 Chromatogram of the white pepper extract. The elution method was linear gradient type. Other conditions were described as Fig. 2.

分子化合物、蛋白質など)、分離の妨げとなる可能性があるため、前置カラム (LiChrospher 300 RP-8 10 μ m 0.4 I.D $\times$ 0.4cm) を用いた。これにより、カラムの洗浄に要する時間を省くことができた。

以上決定した抽出法、分析条件に従い、白コショウからFig. 7に示すクロマトグラムが得られた。このクロマトグラムの280 nmで検出されるピークに、遅く溶出するほうから順に番号を付けると、およそ50個の成分が分析されたことが確認できた。

Fig. 7 Chromatogram of the white pepper extract not irradiated with gamma spectrum. HPLC Conditions: column; LiChrospher 300 RP - 8 10 μ m (0.4 I. D. $\times$ 0.4cm) + LiChrosorb RP - 8 SelectB (0.4 I. D. $\times$ 25cm) Other conditions were described as Fig. 2.

3. ピークの同定法の検討

1) 既知化合物の溶離位置の検討

コショウの標準溶離曲線で、個々のピークを同定していく方法の検討を行なった。まず、コショウの辛味成分で主成分のヒペリンや、その他コショウに含まれると予想された10種類の既知化合物(ピペリン、クマリン、ウンベリフェロン、ウラシル、L-ドーパ、チロシン、トリプトファン、クロロゲン酸、カフェイン酸)をそれぞれ標準分析法に従い分析した(Fig. 8)。

その結果10種の成分は相互により分離を示しており、このHPLCの条件が、コショウの成分分析に適したものであることが示された。

Fig. 8 Chromatogram of the 10 standard sample i. e., Urasil, L-DOPA, Tyrosine, Tryptophan, Chlorogenic Acid, Caffeic Acid, Umbelliferone, Coumarine, Scooletin, and Piperine.
HPLC conditions: column; described as Fig. 7 and other conditions were described as Fig. 2.

2) 内部標準法によるピペリンの同定

コショウの抽出液に、ピペリン溶液を添加して分析を行なった(Fig. 9)。その結果、コショウの標準溶離曲線のピークに比べピーク13番のみが、特異的に高くなった。それゆえピーク13番が、ピペリンと推定できた。同様な方法で、ピーク26番はクマリンと推定できた。

Fig. 9 Chromatogram of the white pepper extract, containing the additional standard piperine.
The HPLC conditions were described as Fig. 2.

3) UVスペクトルによるピペリンの同定

内部標準法で、ピペリンと一致したピーク13番を別に分取し、UVスペクトルを測定した。その結果、ピペリン標品のUVスペクトルと非常に類似していた(Fig. 10)。このことから、ピーク13番はピペリンと推定できた。以上、溶出位置と紫外外部吸収スペクトルを測定する方法により、ピークの同定が可能であることが示唆された。この方法で、ピーク26番はクマリンと同定された。

Fig. 10 Ultraviolet spectra of fraction of peak 13 and standard piperine.
(1) fraction of peak 13
(2) standard piperine

考 察

コショウから液体窒素冷却下、凍結破砕器を用いて多成分を抽出する方法と、紫外外部吸収を検出法として用いたHPLCでの分析法の標準操作法を決定した。

抽出は、凍結破砕装置を用いることにより、試料を抽出溶媒とともに凍らせたまま短時間で破砕でき、遠心分離後得られた溶液を、フィルターで濾過するのみで完了する方法を確立した。本法は操作が非常に簡便であるため、多成分を再現性良く抽出できた。

またコショウの成分分析は、これまでである特定の物質群にのみ行なわれていた。今回、分離法として逆相HPLCを、検出法として紫外外部吸収を導入することにより、多成分の一斉分離検出が可能となった。コショウの抽出物質の分離は、コンケイブグラジエント溶出法を用いることにより60分間の溶出で分離度の良いクロマトグラムを得ることができた。この分析条件でコショウに含まれると予想される既知物質はすべて分離よく溶出されることがわかり、本法の有用性が確認された。また検出は210 nm及び280 nmの吸収を測定することで行った。210 nmの吸収では、感度のよい測定ができるが、その反面で本法のような微量成分の分析条件では、溶離液中の不純物によるバックグラウンドが問題となってしまう。本分析においても、210 nmではベースラインのゆれが、280 nmに比べ大きかった。一方、今回の結果では210 nmと280 nmではピークの数にほとんど変わりがなかった。このため、ピークの番号付けを280 nmで行なうなど、主に280 nmのクロマトグラムにより結果を論じた。

本分析法ではコショウの成分約50種類が分離されたがこれらの化合物はまだほとんど同定されていない。また、分析の条件では微量である成分が多く、分取、構造決定には時間を要するものと考えられる。しかし、予想成分の標品があれば、内部標準法、及び紫外外部吸

収スペクトルによる簡便な同定が可能であり、本研究においては、クマリン、ピペリンのピークを同定することができた。

以上のように本法は、抽出から分析までを短時間に行なえるコショウ成分の一斉分析法として、有用であることが示された。

今後、この方法を適用してガンマ線を照射した際に変化するコショウ成分の検索を行なえるものと考えられた。

文 献

- 1) RUSSELL, G. F. and ELSE, J. J. : *Assoc. Off. Anal. Chem.*, **56**, 344 (1973) .
- 2) BEDI, K. L., ATRAL, C. K. and ACHAYA, K. T. : *Chem. Abstr.*, **75**, 101183r, (1971) .
- 3) SALZER, U. : *Fette Siefen Anstrichm.*, **77**, 446 (1975) .
- 4) DE CLEYN, R. and VERZELE, M. : *Chromatographia*, **8**, 342, (1975) .
- 5) VERZELE, M., MUSSCHE, P. and QURESHI, S. A. : *J. Chromatogr.*, **172**, 493 (1979) .
- 6) VERZELE, M., REDANT, G., QUERSHII, S. and SANDRA, P. : *J. Chromatogr.*, **199**, 105, (1980) .
- 7) RATHNAWATHIE M. and A. BUCKLE, K. : *J. Chromatogr.*, **264**, 316 (1983) .
- 8) ARCHER, A. W. : *J., Chromatogr.* **351**, 595, (1986) .
- 9) DE CLEYN, R., VERZELE, M. : *Chromatographia*, **5**, 346 (1972) .
- 10) WINTON, A. L. and WINTON, K. B. : *The Structure and Composition of Foods*, Vol. 4, John Wiley & Sons, New York, 319 (1939) .

(昭和63年9月21日受理)