

ベンゼンを用いない豚肉調製品中のピペリンの 定量分析法の検討（第2報）

斎藤 義和*

Study of a benzene-free quantitative analysis method for piperine content in pork products (the second report)

Yoshikazu SAITO*

*Hakodate Customs Laboratory

24-4, Kaigan-cho, Hakodate, Hokkaido 040-8561 Japan

To improve the “Analysis Method for Piperine in Pork Products” of the Customs Analysis Methods which might be harmful to analysts’ health because benzene is used in the analysis process, a method was examined that uses toluene solvent as an alternative to benzene, and solid phase extraction as an alternative to silica gel column chromatography to remove the fat from the sample solution. Measurements of the simulated samples that contained 0.3% pepper by the examined method gave a piperine content that was 0.0009% lower than that obtained by the current method, revealing a significant difference. On closer inspection of the solid phase extraction process, it was supposed that one of the reasons for this difference was insufficient elution of piperine from the SPE cartridge, as well as other non-negligible reasons not specified in this study.

1. 緒 言

こしょうで調味された生豚肉は、食肉加工品の材料などとして多く輸入されている。これらは、調味の程度によって、豚肉調製品として関税率表第16類もしくは豚肉そのものとして第2類に分類されるが、両者の関税率に大きな差があることから、関税分類を決定する際に特に注意を要する物品である。

これら二つの分類の具体的な基準については、国内分類例規2類「1. 肉類の調製品の分類基準について」に規定があり、こしょうの添加が分析の結果から明らかに確認でき（こしょうそのものの含有量0.3%をもって目安とする。）、かつ適度の味覚を有するものを第16類に分類することになっている。なお、こしょうの含有量の分析は、こしょう中のピペリン含有量5%を基準に判定することになっていることから、正確な関税分類のためには、分析を実施して、これらの物品中のピペリンを正確に定量することが重要となる。

現在、ピペリンの定量には、税関分析法「豚肉調製品中のピペリンの定量分析法」¹⁻⁷⁾（以下「現行法」という）が使われている。この分析は、①生肉からピペリン及び脂質を抽出する ②シリカゲルカラムにより脂質を除去し、ピペリンを分取する ③紫外吸収法によりピペリンを定量する という手順にしたがって行う

ものであり、②において脂質を除去する溶媒としてベンゼンを使用する。このベンゼンは、国際がん研究機関（IARC）発表の発がん性リスク一覧において Group 1（ヒトに対する発がん性が認められる）の化学物質であり^{8,9)}、その使用が分析担当者の健康上好ましくないことから、この分析法は改善が望まれてきた。

このような背景から、著者らは第1報において、上記発がん性リスク一覧において Group 3（ヒトに対する発がん性が分類できない）の化学物質であり、ベンゼンと比較して健康被害のリスクが低いトルエン^{10,11)}をベンゼンの代替溶媒として使用する方法の妥当性について検討した¹²⁾。結果として、この分析法は現行法と差が無く妥当な分析法であることが示されたが、一方でトルエンの使用量が多く、分析に長時間を要するという課題点を残していた。

本研究では、その課題の解決のため、②の工程を見直した方法として、同工程に固相抽出（Solid Phase Extraction, SPE）カートリッジ処理（以下「固相処理」という）を用いた方法を検討し、現行法との比較実験を行った。

* 函館税関業務部 〒040-8561 北海道函館市海岸町 24-4

2. 実 験

2.1 試料および試薬

2.1.1 試料

ブランク試料：市販の豚ひき肉

模擬試料：市販の豚ひき肉約 200 g に市販の粉末黒こしょう 0.6 g を混ぜたもの

なお、両者とも 1 検体（約 10 g）ずつ小分けにして冷凍保存し、実験時に解凍して用いた。

2.1.2 試薬

ピペリン（ALDRICH、97%）

ベンゼン（関東化学、試薬特級）

トルエン（和光純薬、試薬特級）

クロロホルム（和光純薬、試薬特級）

メタノール（和光純薬、試薬特級）

シリカゲル（Wakogel C-200）

固相抽出カートリッジ（Phenomenex STRATA SCX Tube 1 g/6 mL）

2.2 分析装置及び条件

紫外可視分光光度計：UV-1200（島津製作所）、設定波長：343 nm、光路長：1 cm

ガスクロマトグラフ：7890A（Agilent）、条件は 2.6.1(1) のとおり

2.3 統計ソフトウェア

Microsoft Excel 2010

なお、後述の各項に記載した統計処理で鍵括弧内に記載したものは、本ソフトウェアに組み込まれた分析ツール名を指す。

2.4 検討した試験方法

・ 現行法

税関分析法「豚肉調製品中のピペリンの定量分析法」

・ SPE 法

現行法において、ベンゼンをトルエンと読み替え、さらにシリカゲルカラム処理の代わりに固相処理を用いた方法。なお、固相処理手順は、Fig.1 のとおりであり、カートリッジは黒色テープで遮光して使用した。また、通液の際は、シリンジを用いてカートリッジ上部から圧力をかける方法を採用した。

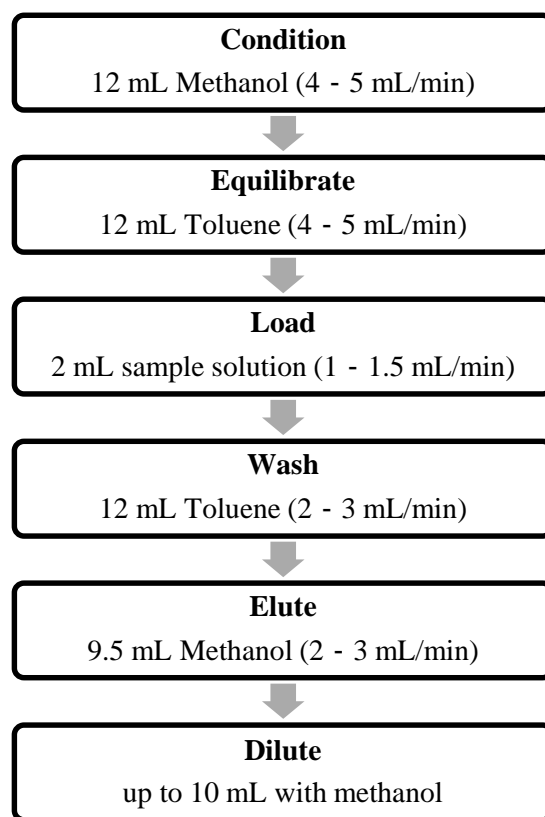


Fig.1 SPE method examined in this study

2.5 二法の定量結果の比較試験

模擬試料を現行法で 7 回、SPE 法で 6 回測定しピペリン含有率を求め、その平均、標準偏差及び相対標準偏差を算出し、得られた結果を比較した。

2.6 二法の結果の差の原因検証実験

2.6.1 二法の測定用検液の溶媒組成と吸光度への影響確認

SPE 法では、最終的に得られる測定用検液の溶媒組成が現行法のものとは異なることから、以下の実験によって、吸光度への影響を確認した。

2.6.1(1) 二法の測定用検液の溶媒組成の確認

二法において空試験を行って得た測定用検液をガスクロマトグラフで測定し、トルエン及びベンゼンのピーク面積を得た。併せて、トルエン及びベンゼンをそれぞれ 20vol% 含有するメタノールを同様に測定し、トルエン及びベンゼンのピーク面積を得た。これらのピーク面積を比較することで、SPE 法の測定用検液中のトルエン含有量、現行法の測定用検液中のベンゼン含有量を求めた。

なお、本実験に用いたガスクロマトグラフの測定条件は以下のとおりである。

カラム：DB-1 HT（30 m、0.25 mm 径、膜厚 0.1 μm）

オーブン：80°C 定温

キャリアーガス：ヘリウム、0.9 mL/min

試料導入部：温度 250°C、スプリット比 100：1、1 μL 注入

検出器：FID（温度 250℃、水素 30 mL/min、空気 300 mL/min、付加ガス（ヘリウム）20 mL/min）

2.6.1(2) 異なる溶媒組成におけるピペリン溶液の吸光度測定

2.6.1(1)で求めた濃度のトルエン及びベンゼンを含有するメタノールを溶媒として、約 3、6 及び 9 µg/mL のピペリン溶液を各濃度 6 検体調製した。それぞれの紫外吸光度を、溶媒のみを対照液として、2.2 の条件で測定した。これらのピペリン溶液を 10 g の試料から SPE 法及び現行法の規定に従って得た測定用検液と仮定し、得られた吸光度を試料中のピペリン含有量に換算し、溶媒組成間で結果に違いが生じるか否かを確認した。

なお、本実験で用いたピペリン溶液の濃度は、ピペリン含有量 0.0075–0.0225% の豚肉調製品 10 g を試料として二法により得られた測定用検液の濃度に相当する。

2.6.2 SPE 法の固相処理工程におけるピペリンの溶出状況の確認

模擬試料及びブランク試料各 6 検体を用いて、SPE 法の固相処理工程の溶出液を Fig.2 のとおり分取、定容して得た検液の紫外吸光度を 2.2 の条件で測定した。得られた吸光度からピペリン相当量を算出し、模擬試料とブランク試料の結果を比較することで、ピペリンの溶出の有無を確認した。

sample A: simulated sample solution

sample B: blank sample solution

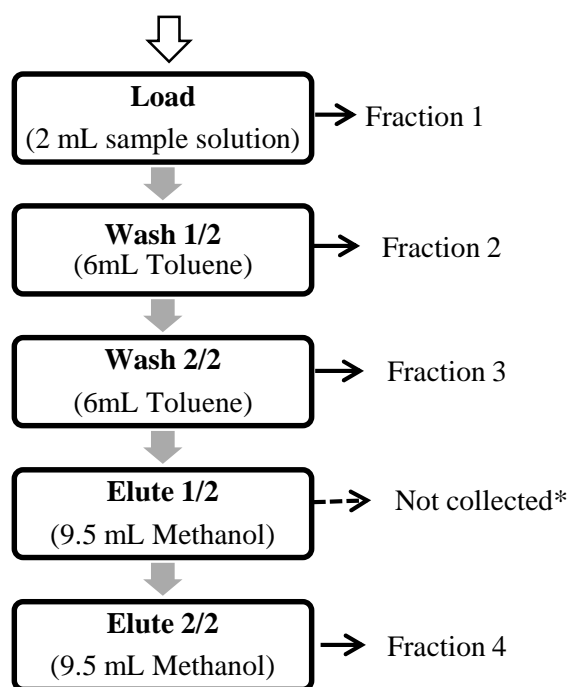


Fig.2 Method of obtaining the fractions from the SPE cartridge (noted in experiment 2.6.2)

*In the usual process of measurement, this fraction is collected and diluted to 10 mL with methanol as a test solution.

3. 結果及び考察

3.1 二法の定量結果の比較

2.5 の測定結果は Table 1 のとおりであり、全体的にわずかながら SPE 法の結果が低くなった。

「F-検定: 2 標本を使った分散の検定」により二法の分散間に 5% 水準（両側検定）で有意差が認められないことから、二法の平均の比較に「t-検定: 等分散を仮定した 2 標本による検定」を用いた結果、5% 水準（両側検定）で有意差が認められた。

なお、二法の平均の差は、0.0009% であり、ピペリン含有量 5% を基準としてこしょう含有量に換算すると、0.02% 程度である。

また、結果のばらつきに関しては、一見 SPE 法の方が小さいが、前述のとおり、二法から得られた分散間に有意差が認められなかったことから、二法の差違は認められないと判断した。

AOAC による分析法の妥当性確認ガイドライン¹³⁾によると、繰り返し精度（相対標準偏差）は、分析対象物の質量分率の 0.15 乗を基準とし、その 1/2–2 倍が許容範囲であるとされている。本研究のように 0.01% 程度の分析対象物の定量分析においては、2–8% 程度が許容範囲と言え、SPE 法はそれを満たすことが示された。

Table 1 Comparison of results of piperine content in simulated samples obtained by the SPE method and by the benzene method

	piperine content(%)	
	benzene method	SPE method
1	0.0111	0.0099
2	0.0108	0.0097
3	0.0105	0.0099
4	0.0112	0.0100
5	0.0105	0.0099
6	0.0104	0.0097
7	0.0110	-
mean	0.0108	0.0099
SD	0.0003	0.0001
RSD	2.9%	1.2%

3.2 二法の結果の差の原因検証

3.2.1 二法の測定用検液の溶媒組成と吸光度への影響

3.2.1(1) 二法の測定用検液の溶媒組成

2.6.1(1)の結果、SPE 法の測定用検液の溶媒はトルエンを約 12vol% 含有し、現行法の測定用検液の溶媒はベンゼンを約 17vol% 含有することを確認した。

3.2.1(2) 異なる溶媒組成におけるピペリン溶液の測定結果

2.6.1(2)の測定結果は、Table 2 のとおりであり、観察された吸光度の差は、サンプル 10 g 中ピペリン含有量に換算するといずれの濃度においても約 0.0001% と小さく、ピペリン溶液の濃度 (µg/mL) と吸光度の平均の関係をプロットして作成した検量線の数式は、トルエン 12vol% 含有のものが $y = 0.1236x + 0.0029$ ($R^2 > 0.9999$)、ベンゼン 17vol% 含有のものが $y = 0.1234x - 0.0007$ ($R^2 > 0.9999$) であり、類似の直線が得られることから、実用上測定に影響のない程度と判断した。

Table 2 Results of UV measurements of piperine solutions shown as piperine content, assuming that the solutions were obtained from 10 g of sample by the current method and by the SPE method.

*Solvent B is methanol containing 17 vol% of benzene, the same compound as the solvent of the test solution obtained by the current method; solvent T is methanol containing 12 vol% of toluene, the same compound as the solvent of the test solution obtained by the SPE method.

Results of UV measurement shown as piperine content (%)						
content	3.13 µg/mL		6.26 µg/mL		9.39 µg/mL	
solvent*	B	T	B	T	B	T
1	0.0075	0.0076	0.0152	0.0154	0.0228	0.0229
2	0.0076	0.0076	0.0152	0.0153	0.0228	0.0229
3	0.0075	0.0077	0.0152	0.0153	0.0226	0.0229
4	0.0076	0.0077	0.0153	0.0153	0.0228	0.0229
5	0.0076	0.0077	0.0153	0.0153	0.0229	0.0228
6	0.0076	0.0077	0.0153	0.0154	0.0229	0.0230
mean	0.0076	0.0077	0.0152	0.0153	0.0228	0.0229
SD	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0001

Table 3 Results of UV measurement shown as piperine content of the fractions eluted from the SPE cartridge. Sample name and fraction No. are the same as noted in Fig.2.

*When diluting this fraction with methanol, a deposit of fat appeared and the stabilized absorbance of the solution could not be measured.

results of UV measurement shown as piperine content (%)								
	Fraction 1		Fraction 2		Fraction 3		Fraction 4	
	sample A	sample B	sample A	sample B	sample A	sample B	sample A	sample B
1			0.0001	0.0001	0.0000	0.0000	0.0003	0.0000
2			0.0000	0.0001	0.0000	0.0001	0.0004	0.0001
3			0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0005	0.0000
4	No Data*		0.0000	0.0000	0.0001	0.0000	0.0005	-0.0001
5			0.0001	0.0001	0.0001	0.0000	0.0004	0.0001
6			0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0005	0.0000
mean	-	-	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0004	0.0000
SD	-	-	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0001

3.2.3 二法の結果の差に関する考察

2.5 では、SPE 法の方が現行法よりも測定結果が 0.0009% 小さくなるが示されたが、実際に 3.2.2 において、SPE の工程中で回収しきれていないピペリン 0.0004% を確認した。これは、検討した SPE 法のピペリン分取工程では、吸着しているピペリンを完全には溶出しきれていないことを示している。しかし、二法の結果の差の半分程度の原因が示されただけであるため、さらに詳細なピペリンの損失の検証及び解決策の検討が必要である。

3.3 SPE 法の評価

今回検討した SPE 法は、現行法と比較し、有機溶媒使用量削減

3.2.2 SPE 法の固相処理工程におけるピペリンの溶出状況の確認結果

2.6.2 の実験結果は、Table 3 のとおりであった。分画 1 については、検液中に脂質が析出して測定値が安定しなかったことから測定不可とした。

分画 2 及び 3 については、模擬試料とブランク試料の測定結果の平均の間に 5% 水準（両側検定）で統計学的な有意差は認められなかったが、分画 4 については、模擬試料から得られた結果の方がブランク試料のものよりも全般的に大きく、両者には 5% 水準（両側検定）で統計学的な有意差が認められた。

なお、いずれの分画においても、「F-検定: 2 標本を使った分散の検定」により模擬試料の測定結果及びブランク試料の測定結果の二法の分散間に 5% 水準（両側検定）で有意差が認められなかったことから、平均の比較には「t-検定: 等分散を仮定した 2 標本による検定」を用いた。

上記の結果から、洗浄工程においてはピペリンが吸着したままであること及び通常の溶出工程ではすべてのピペリンが溶出できていないことが示された。また、模擬試料とブランク試料の分画 4 の測定結果の平均の差は約 0.0004% だった。

及び時間短縮が見込める分析法である。具体的には、脂質除去工程における有機溶媒使用量は、現行法はベンゼン 140 mL であるのに対し SPE 法はトルエン 12 mL であり、ピペリン分取工程における有機溶媒使用量は、現行法がメタノール 45 mL であるのに対し SPE 法はメタノール 9.5 mL である。また、脂質除去工程からピペリン分取工程の時間を比較すると、現行法は 90 分程度であるのに対し、SPE 法は 10 分程度である。

現状の結果を踏まえた範囲においての SPE 法の評価としては、精密な測定を要しない場合、例えば予備実験の場合や測定結果が関税分類上の境界値から大きく離れていることが予見される場合、には簡易法として有効と言える。

4. 要 約

税関分析法「豚肉調製品中のピペリンの定量分析法」と同法中のベンゼンをトルエンに置き換え、脂質除去工程に固相抽出処理を用いる分析法を比較した。こしょうを0.3%含有する模擬試料のピペリン含有量の測定においては、今回検討した方法は現行法と比べて0.0009%低い結果となり、二法の結果の平均には統計学的

な有意差を認めた。カートリッジからのピペリンの溶出が不十分であることが示されたことから、それが二法の差の原因のひとつであると考えられるが、さらに詳細な原因の検証及び解決策の検討が必要である。有意差がある一方、SPE法の採用により有機溶媒使用量削減及び時間短縮が見込めることから、本研究での結果を踏まえた範囲において、SPE法は精密な測定を要しない場合の簡易法として有効と言える。

文 献

- 1) 関税中央分析所ホームページ：税関分析法「豚肉調製品中のピペリンの定量分析法」(http://www.customs.go.jp/ccl_seacch/analysis_search/a_111_j.pdf)
- 2) 笹川邦雄，加藤時信：関税中央分析所報，**25**, 19(1985)
- 3) 笹川邦雄，川端省三：関税中央分析所報，**27**, 173(1987)
- 4) 加藤康紀，佐藤里子，富田健次，関川義明，氏原覚：関税中央分析所報，**36**, 5(1997)
- 5) 中村文雄，赤崎哲也，東郷雅子，岩本和郎：関税中央分析所報，**37**, 1(1998)
- 6) 西尾仁美，松本吉三郎，藤村徹，後藤弘一：関税中央分析所報，**38**, 13(1998)
- 7) 柴田正志，中川清貴，加藤隆，中村文雄，笹谷隆：関税中央分析所報，**40**, 27(2000)
- 8) IARC Monographs, **29**, 93(1982)
- 9) IARC Monographs, Supplement. **7**, 58(1987)
- 10) IARC Monographs, **47**, 79(1989)
- 11) IARC Monographs, **71**, 829(1999)
- 12) 斎藤義和，盛永誠：関税中央分析所報，**54**, 61(2014)
- 13) AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals (2002)