

シリカゲルカラムカートリッジを用いた 豚肉調製品中のピペリンの定量分析法

菅野 達朗*, 吉田 昭彦*, 片山 貴之**

Quantitative analysis method using a “Silica Gel Column Cartridge” for piperine content in processed pork products

Tatsuro KANNO*, Akihiko YOSHIDA*, Takayuki KATAYAMA**

*Hakodate Customs Laboratory 24-4, Kaigan-cho, Hakodate, Hokkaido 040-8561 Japan

**Central Customs Laboratory, Ministry of Finance 6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

For the purpose of improving safety and decreasing health risks, we investigated reducing the volume of toluene to be used for the Customs Analysis Method (CAM) “Quantitative Analysis Method for Piperine Content in Pork Products”, by replacing the Silica Gel Column Chromatograph with its miniaturized Silica Gel Column Cartridge. As a result, the toluene (mobile phase) was able to be reduced from 140ml to 12ml (about a 90% reduction) and the recovery rate of piperine from the piperine standard solution was more than 97%. Using simulated samples in which 0.3% and 0.6% of pepper were respectively contained, quantitative values measured by the current method and the improved method were compared and the difference was very slight; so it was confirmed that the modified method has almost equivalent quantitative analysis capabilities.

1. 緒 言

関税分類において、塩及びこしょうを添加することにより調味された豚肉は、その調味の度合いにより第2類または第16類に分類されることとなるが、両者の間における税率格差は非常に大きいことから、正確な分類が求められる。

関税分類の具体的な基準としては、“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, 適度な味覚を有するものを第16類に分類する”とされており, “こしょうの含有量の分析は, 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”こととなっている(国内分類例規「2類 1. 肉の調製品の分類基準について」)。

現在、ピペリンの定量分析には、税関分析法「豚肉調製品中のピペリンの定量分析法」¹⁾(以下、現行法という。)に従い実施しており、同分析法は平成28年11月の改正により、シリカゲルカラムクロマトを通じて抽出液中の脂肪分を除去する工程で使用する溶媒を、ベンゼンからより有害性の少ないトルエンに変更している。しかしながら、依然としてトルエンの使用量は1分析あたり140mLと多量であり、分析担当職員の健康面を考慮すると、トルエンの使用量の削減が望まれる。

これまでの当関における研究²⁾では、現行法でピペリン抽出のために使用するシリカゲルカラムの代わりに市販の固相抽出カートリッジを用いた場合、当該カートリッジからのピペリンの回収率が不十分となることが判明し、原因の検証及び解決策の検討を行った。

本研究では、ピペリンの回収率が不十分となる原因が、先行研究で用いた固相抽出カートリッジの充填剤の性質にあると考え、現行法で指定されているものと同じシリカゲルを充填した小型のカラム(以下、シリカゲルカラムカートリッジという。)に置き換えた、溶媒使用量を抑えた方法(以下、改良法という。)を考案し、この方法によりトルエンの使用量を抑えつつ、現行法と同程度の定量性が得られるか検証した。

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

2.1.1 試料

・模擬ピペリン抽出液

ピペリンを10μg/mL, 30μg/mL及び60μg/mLの濃度となるように、溶媒(トルエン:メタノール=3:2混液)に溶解したもの。なお、この溶液は、こしょう含有量0.1%, 0.3%及び0.6%

* 函館税関業務部
** 財務省関税中央分析所

〒040-8561 北海道函館市海岸町 24-4
〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

の豚肉調製品から得たピペリン抽出液に相当する。

・模擬試料

市販の豚肉にこしょう含有量 0.3%及び 0.6%となるようにこしょうを添加し、均一化したもの。

2.1.2 試薬

ピペリン (Sigma Ardrich, 97%)

クロロホルム (和光純薬工業)

トルエン (和光純薬工業, 関東化学)

メタノール (和光純薬工業, 純正化学)

シリカゲル (Wakogel C-200, サイズ: 100-200 mesh)

エンプティーリザーバー (GL Science, 容量: 6 mL)

2.2 分析装置及び条件

紫外可視分光光度計: V-600 (日本分光), 測定波長: 343 nm,
光路長: 1 cm

2.3 検証した試験法

・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」第3改
正版

・改良法

現行法におけるカラムクロマトグラフィー処理工程に、シリカゲル 1 g を市販のエンプティーリザーバーに充填したシリカゲルカラムカートリッジを使用した (シリカゲル柱の長さ約 1.5 cm) (Fig.1 参照)。

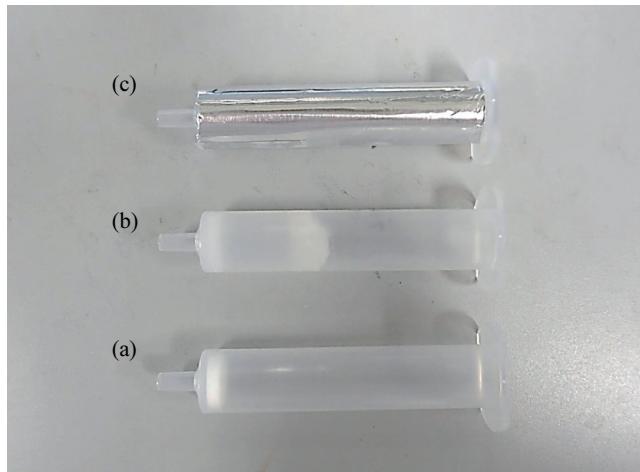


Fig. 1 Picture of Silica-gel column cartridges

(a) empty reservoir (cartridge), (b) silica-gel column cartridge (filled with silica-gel), and (c) aluminum-foil covered silica-gel column cartridge

2.4 改良法におけるピペリンの回収率の確認

改良法では、現行法に比べ 5 分の 1 程度のシリカゲル使用量となることから、試料から得たピペリン抽出液の通液量も 5 分の 1 の量とした。この分析条件の縮小化の定量性に与える影響の有無について確認するため、改良法によるカートリッジ処理を行って

得られた検液中のピペリン含有量と、当該処理前の溶液中のピペリン含有量から、ピペリンの回収率を算出し、十分な回収率が得られるかどうかの確認を行った。回収率の算出方法は Equation 1 のとおりである。回収率の確認にあたっては、各模擬ピペリン抽出液につき 7 回ずつ測定を行った。

Equation 1

$$\text{Recovery Rate (\%)} = (B/A) \times 100$$

A : Absorbance of simulated piperine extracts

B : Absorbance of fractions after column processing of simulated piperine extracts

2.5 現行法及び改良法の定量性の比較

各模擬試料から現行法の手順により得たピペリン抽出液を用いて、現行法及び改良法におけるカラム処理を 3 回ずつ行い、得られた検液の吸光度を測定し、ピペリンの定量値の比較を行った。なお、現行法のカラム処理手順は Fig.2 (A) のとおりである。また、シリカゲルカラムカートリッジを用いた処理手順は Fig.2 (B) のとおりであり、カートリッジはアルミニウムホイルで遮光して使用した。また、カートリッジへの通液については、カートリッジ上部から圧力をかけず、自然落下による方法を採用した。

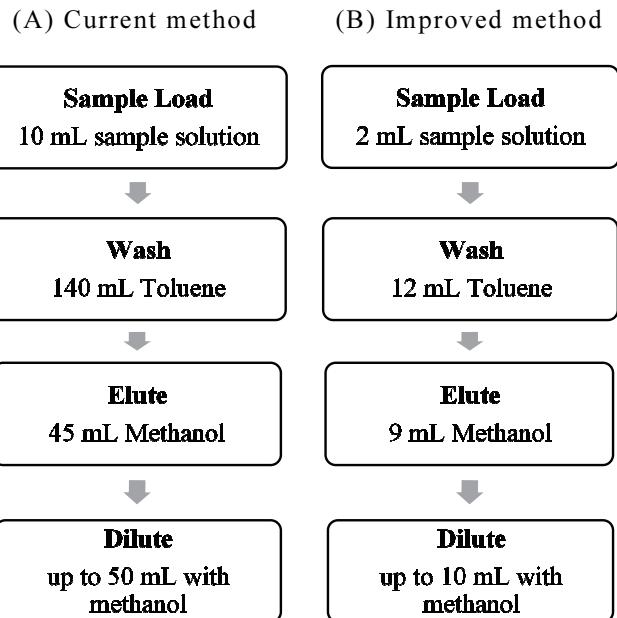


Fig. 2 Summary of the column purification procedures for piperine extraction

(A) Customs Analytical Method “Quantitative Analysis Method for Piperine Content in Pork Products”, and (B) The proposed silica-gel column cartridge purification to be operated by freefall method

3. 結果及び考察

3.1 改良法におけるピペリンの回収率の確認結果

2.4における実験結果をTable 1に示す。いずれのピペリン濃度においても97%以上の回収率が得られた。このことから、シリカゲルカラムカートリッジをピペリンの定量分析に使用することは可能と考えられる。

Table 1 Recovery Rate of piperine in the Silica Gel Column Cartridge Method

| | Recovery Rate (%) | | |
|-----------------|-------------------|----------|----------|
| | piperine content* | | |
| | 10 µg/mL | 30 µg/mL | 60 µg/mL |
| 1 st | 99.3 | 98.0 | 97.0 |
| 2 nd | 99.8 | 97.5 | 97.7 |
| 3 rd | 99.7 | 98.4 | 97.7 |
| 4 th | 99.4 | 98.0 | 97.7 |
| 5 th | 99.4 | 97.3 | 97.0 |
| 6 th | 100.5 | 98.0 | 98.1 |
| 7 th | 99.5 | 98.1 | 97.2 |
| mean | 99.7 | 97.9 | 97.5 |
| SD | 0.4 | 0.4 | 0.4 |

*Piperine content indicate concentration of each simulated piperine extract.

3.2 現行法及び改良法の定量性の比較結果

2.5における実験結果をTable 2に示す。この結果について現行法と改良法とでピペリン定量値の差を比較すると、こしょう含有量0.3%のもの（Sample A）については0.0001%，こしょう含有量0.6%のもの（Sample B）については0.0002%であった。また、このピペリン定量値の差をこしょう含有量に換算（ピペリン定量値（%）/0.05）すると、前者が0.002%，後者が0.004%であり、関税分類上の境界値であるこしょう含有量0.3%に対して1%程度の差であった。以上の結果から、改良法は現行法と遜色のない定量性が得られるものと考えられる。

Table 2 The comparison of measurement results by current and improved method

| | piperine content (%) | | | |
|-----------------|----------------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | sample A | | sample B | |
| | current method | improved method | current method | improved method |
| 1 st | 0.0108 | 0.0106 | 0.0221 | 0.0218 |
| 2 nd | 0.0108 | 0.0107 | 0.0220 | 0.0219 |
| 3 rd | 0.0108 | 0.0107 | 0.0221 | 0.0218 |
| mean | 0.0108 | 0.0107 | 0.0221 | 0.0219 |
| difference | 0.0001 | | 0.0002 | |

Simulated samples were prepared under the conditions of A: containing 0.3% pepper in the prepared pork and B: containing 0.6% pepper in the prepared pork

3.3 二法の定量性の比較結果にかかる考察及び今後の課題

改良法は、現行法に比べてシリカゲル量を減らすとともに、カラムへのトルエンの通液量も減らしているが、二法でピペリン定量値の差がごく僅かであった。この結果から、現行法のシリカゲルカラム処理工程のスケールを小さくした場合においても、現行法と遜色のない定量性が得られることが示唆され、関税分類上の確認が必要とされるこしょうの含有量0.3%前後の物品について、改良法によっても現行法と同等の分析結果が得られるもの考えられる。

今後は、統計的な評価が可能な検体数を測定し、二法の定量値に有意差が無いことの検証が必要である。

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」におけるトルエンの使用量を削減するために、同分析法の脂肪除去工程で用いるシリカゲルカラムをより小型のシリカゲルカラムカートリッジに変更し、カラム処理工程で使用する有機溶媒量を最適化した改良法による代替可能性を検証した。

ピペリン濃度既知の模擬抽出液を用いて改良法のピペリン回収率を確認したところ、回収率は97%以上で良好であった。

こしょう添加量既知の豚肉調製品を模擬試料とし、現行法及び改良法によりピペリンの定量分析を行ったところ、二法におけるピペリン定量値に差はほとんどなく、改良法は現行法と遜色のない定量性を示した。

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.jp/ccl_search/analysis_search/a_111_j.pdf)
- 2) 斎藤義和：関税中央分析所報, 55, 113 (2015)