

たらこ調製品中のカプサイシノイドの確認・定量方法の検討

不破 茉綸*, 早乙女 航*, 原 裕樹*, 八木 潤*

Examination of determination of and quantitative methods for capsaicinoids in prepared pollack roe samples

FUWA Marin*, SOUTOME Wataru*, HARA Yuki* and YAGI Jun*

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

The tariff classification of pollack roe differs depending on the extent of preparation. In order to classify pollack roe, whether it contains chili peppers, etc. can be used as materials for classification judgment. Chili peppers contain capsaicinoids as a pungent component. Measuring capsaicinoids in prepared pollack roe is one of the standards for determining whether it contains chili peppers. However, there are no Customs Analytical Methods concerning extraction and measurement of capsaicinoids in prepared pollack roe. In this study, we examined the measurement instruments and the extraction condition of capsaicinoids in prepared pollack roe and conducted quantitation of capsaicin in it. As a result, it was possible to detect capsaicinoids in prepared pollack roe with HPLC-FLD and reflux with ethanol showed high extract efficiency. However, reproducibility of quantitative value and spike and recovery rates was low, so it is necessary to examine other measurement and extraction methods.

1. 緒 言

2. 実 験

たらこ調製品は、その調製の程度により、関税率表第3類又は第16類に分類される。国内分類例規第1604.20号-1には同表第16.04項に分類される調製品の一部が例示されており、また、唐辛子等を含有する物品は、調味料の含有量によらず同項に分類されるものがある旨記載されている。

唐辛子には辛み成分のカプサイシンが含まれている。また、カプサイシンに構造が類似する物質が20種類ほど存在し、化学的にはこれらをまとめて「カプサイシノイド」と総称している¹⁾。唐辛子の品種によって異なるものの、カプサイシン、ジヒドロカプサイシンが辛み成分の約80-90%を占め、次に多い成分としてノルジヒドロカプサイシンがある²⁾。カプサイシンは、植物の中でも唐辛子のみに含有される物質であり、これまでに他の植物からは見つかっていない¹⁾。これらのカプサイシノイドの含有の有無を確認することができれば、唐辛子を含有する物品か否かの判断基準の一つとなりうるが、カプサイシノイドの抽出・測定方法に関する税関分析法は定められていない。

そこで本研究では、たらこ調製品に含まれるカプサイシノイドの確認・定量方法を検討した。まず、ガスクロマトグラフ質量分析計（以下、GC-MSと略記する。）及び液体クロマトグラフ（以下、HPLCと略記する。）を用いて測定機器の検討を行った。次に、分析試料からの抽出条件の検討、たらこ調製品中のカプサイシンの定量、添加回収試験を実施した。これらの検討内容及び検討結果から得られた知見について報告する。

2.1 試薬

標準カプサイシノイド（カプサイシン70%、ジヒドロカプサイシン20%、ノルジヒドロカプサイシン5%）（LKT Laboratories）
1,1,1,3,3,3-ヘキサメチルジシラザン（以下、HMDSと略記する。）（東京化成工業）

トリフルオロ酢酸（以下、TFAと略記する。）、エタノール、アセトン、アセトニトリル、酢酸（以上、富士フイルム和光純薬）

2.2 装置及び測定条件

2.2.1 装置

GC-MS	: GCMS-QP2020 NX (島津製作所)
HPLC	: 1260 InfinityII (Agilent Technologies)
ロータリーエバポレーター	: IKA RV 10 (IKA)
インキュベーター	: Thermomixer comfort (Eppendorf)
振とう恒温槽	: MM-10 (タイテック)
ホットプレート	: SR350 (ADVANTEC)

2.2.2 測定条件

2.2.2(1) GC-MS

Supradip Saha らの研究報告³⁾を参考に測定条件を以下のとおり

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

設定した.

カラム	: DB-5MS (30 m× 0.25 mm I.D. × 0.25 µm)
注入口温度	: 290 °C
注入量	: 1 µL
キャリアーガス	: ヘリウム
カラム流量	: 1.0 mL/min
スプリット比	: 50 : 1
カラム温度	: 90 °C(1 min) - 5 °C / min - 290 °C(2 min)
イオン源温度	: 200 °C

2.2.2(2) HPLC

AOAC 法⁴⁾を参考に測定条件を以下のとおり設定した.

検出器	: 蛍光検出器 (以下, FLD と略記する.) (Agilent Technologies)
励起波長	: 280 nm
蛍光波長	: 325 nm
カラム	: L-column2 ODS 4.6 mm i.d. × 250 mm 粒径 5 µm (化学物質評価研究機構)
カラム温度	: 40 °C
移動相	: アセトニトリル : 1 % (v/v) 酢酸 = 4 : 6
流速	: 1.2 mL/min
注入量	: 1 µL

2.3 試薬及び試料の調製

2.3.1 試料の調製

本研究で使用した市販品の明太子 2 種に含まれる添加物について Table 1 に示す. これらの試料を液体窒素存在下にて, 乳鉢を用いて均質化したものを分析試料とした.

Table 1 List of pollack roe samples used in this study

sample	additives
A	reduced starch syrup, salt, fermented seasoning, chili pepper, hydrolyzed protein, seasoning(amino acid, etc.), antioxidant(vitamin C), niacin, coloring(red 102, yellow 5, red 106), coloring agent(sodium nitrite), sweetener(stevia), enzyme
B	salt, brewed seasoning, high fructose corn syrup, chili pepper, seasoning(amino acid, etc.), antioxidant(vitamin C), coloring(red 40, yellow 5), coloring agent(sodium nitrite), polysaccharide thickener

2.3.2 標準カプサイシノイド溶液の調製

標準カプサイシノイド 1 g をスクリュースバイアルに量り取り, エタノール 1 mL をホールピペットにて加え, 攪拌したものを標準カプサイシノイド溶液とした.

2.3.3 試料溶液の調製

2.3.3(1) 還流抽出法

2.3.1 で調製した分析試料 6 g を 200 mL 容平底フラスコに量り取り, エタノール又はアセトンを 75 mL 加えて攪拌後, 冷却管に接続し, 還流抽出を 5 時間行った (エタノール: 90 °C, アセトン:

70 °C). この抽出液をろ紙 (No. 5C のもの, 以下同様.) でろ過し, ろ液をナス型フラスコに回収した. ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を除去後, エタノール又はアセトンをそれぞれ 6 mL ホールピペットにて加え, 溶解した. この抽出溶液を 0.45 µm メンブレンフィルターで通液したものを試料溶液とした.

2.3.3(2) ソックスレー抽出法

2.3.1 で調製した分析試料 12 g を円筒ろ紙に量り取り, 上部を脱脂綿でふたをして, ソックスレー抽出器内に入れた. 200 mL 容平底フラスコに 150 mL のエタノール又はアセトンを加え抽出器に接続し, 湯浴上で 5 時間循環させた (エタノール: 100 °C, アセトン: 80 °C). この抽出液をろ紙でろ過し, ろ液をナス型フラスコに回収した. ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を除去後, エタノール又はアセトンをそれぞれ 12 mL ホールピペットにて加え, 溶解した. この抽出溶液を 0.45 µm メンブレンフィルターで通液したものを試料溶液とした.

2.3.3(3) 振とう抽出法

2.3.1. で調製した分析試料 6 g を 200 mL 容三角フラスコに量り取り, Table 2 に示す組成からなる抽出溶媒をそれぞれ 75 mL 加えて攪拌後, 40 °C の振とう恒温槽で 5 時間抽出を行った. この抽出液をろ紙でろ過し, ろ液を 200 mL 容ビーカーに回収した. ホットプレートを用いて溶媒を除去後, エタノール又はアセトンをそれぞれ 12 mL ホールピペットにて加え, 溶解した. この抽出溶液を 0.45 µm メンブレンフィルターで通液したものを試料溶液とした.

Table 2 List of extraction solvents used in 2.3.2(3)

Extraction solvent	Molar ratio (mol fraction)
Ethanol / H ₂ O	1.00 / 0 (1.0)
	0.20 / 0.80 (0.2)
	0.40 / 0.60 (0.4)
Acetone / H ₂ O	1.00 / 0 (1.0)
	0.60 / 0.40 (0.6)
	0.80 / 0.20 (0.8)

2.3.4 誘導体化

2.3.4(1) 標準カプサイシノイドの誘導体化

Supradip Saha らの研究報告⁵⁾を参考に, カプサイシノイドの誘導体化を実施した.

標準カプサイシノイド 1 g を 2 mL マイクロチューブに量り取り, アセトニトリル 500 µL をマイクロピペットにて加え, 攪拌した. その後, HMDS 500 µL を加えた後, TFA 3 µL を加え, 50 °C で 30 分間振とうした.

2.3.4(2) 試料溶液の誘導体化

2.3.3(1)により調製した試料溶液 2 mL をホールピペットにてビーカーに採り, ホットプレート上で溶媒を除去した. 除去後にアセトニトリル 1 mL をホールピペットにて加え, 攪拌溶解後, 0.45

μm メンブレンフィルターで通液した。この溶液 500 μL を 2 mL マイクロチューブに採り、HMDS 500 μL を加えた後、TFA 3 μL を加え、50 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間振とうした。

2.3.5 検量線用検液の調製

スクリュウバイアルに標準カプサイシノイド 1 mg を量り取り、エタノール 10 mL をホールピペットにて加え、攪拌した。この検量線用標準溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を濃度が 0.5, 1, 2, 4, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (カプサイシン濃度: 0.35–0.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$) となるよう段階希釈し、検量線用検液とした。

2.3.6 添加回収試験

2.3.1. で調製した分析試料 3 g を 100 mL ナス型フラスコに量り取り、エタノール 36.5 mL と 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準カプサイシノイド溶液 (5.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準カプサイシン溶液) 1 mL を加えた。攪拌後、冷却管を取り付け、90 $^{\circ}\text{C}$ の湯浴上で 5 時間還流抽出を行った。抽出液をろ紙でろ過し、ろ液をナス型フラスコに回収した。ロータリーエバポレーターにより溶媒を除去後、エタノールを 3 mL ホールピペットにて加えた。この抽出溶液を 0.45 μm メンブレンフィルターで通液したものを試料溶液とした。

2.4 実験

2.4.1 測定機器の検討

2.3.2 で調製した標準カプサイシノイド溶液及び 2.3.3(1)の方法により調製した明太子 A の試料溶液について、2.2.2(1)及び 2.2.2(2)の条件で測定を行った。

2.4.2 抽出条件の検討

2.3.3(1)–(3)で抽出した明太子 A の試料溶液を 2.2.2(2)の条件で測定を行った。抽出条件ごとのカプサイシンのピーク面積値を算出し、抽出効率を比較した。

2.4.3 たらこ調製品に含まれるカプサイシンの定量

2.4.3(1) 検量線の作成

2.3.5 で調製した検量線用検液を 2.2.2(2)の条件で 5 回ずつ測定し、検量線を作成した。

2.4.3(2) 検出限界、定量下限の測定

2.2.2(2)の条件で、濃度の異なる標準カプサイシノイド溶液 5 点 (0.5, 1, 2, 4, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を繰り返し (5 回) 測定し、その標準偏差から求める方法⁶⁾により、カプサイシンの検出限界を求めた。さらに算出した検出限界の 3.04 倍を定量下限とした⁷⁾。

2.4.3(3) たらこ調製品に含まれるカプサイシンの定量

2.3.3(1)の方法により調製した明太子 A 及び B の試料溶液を 2.2.2(2)の条件で測定を行い、2.4.3(1)で作成した検量線から試料中のカプサイシン量を算出した。

2.4.4 添加回収試験

2.3.6 で調製した明太子 A の試料溶液を 2.2.2(2)の条件で測定を行い、次式により回収率 (%) を算出した。

回収率 (%) = (試料 3 g あたりの添加回収試験用溶液中のカプサイシン量 – 試料 3 g あたりに換算した試料中のカプサイシン量) / カプサイシン添加量 $\times 100$

(Eq.1)

3. 結果及び考察

3.1 測定機器の検討

3.1.1 GC-MS

3.1.1(1) 試料溶液の測定

2.4.1 において調製した標準カプサイシノイド溶液及び明太子 A の試料溶液を GC-MS にて測定を行い、得られた標準カプサイシノイドのトータルイオンカレントクロマトグラムを Fig. 1 に、明太子 A の試料溶液のトータルイオンカレントクロマトグラムを Fig. 2 に示す。標準カプサイシノイド溶液については、カプサイシン及びジヒドロカプサイシン、ノルジヒドロカプサイシンのピークが検出された。一方、明太子 A の試料溶液については、最も含有割合の高いカプサイシンを含め、いずれのカプサイシノイドのピークも確認されず、たらこや調味液由来の夾雑ピークが多数確認された。

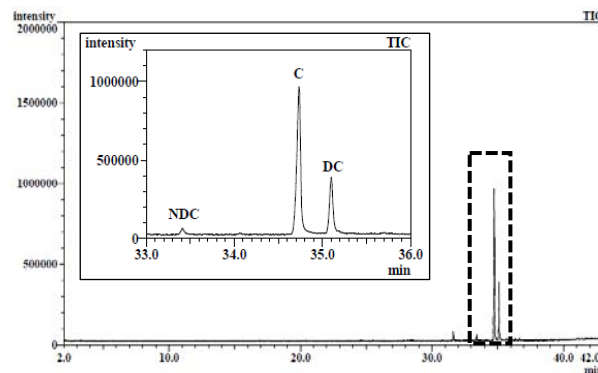


Fig.1 Total ion current chromatograms of capsacinoids (NDC: nordihydrocapsaicin, C: capsaicin, DC: dihydrocapsaicin) in standard by GC-MS. Inset shows the expanded region of the dotted frame.

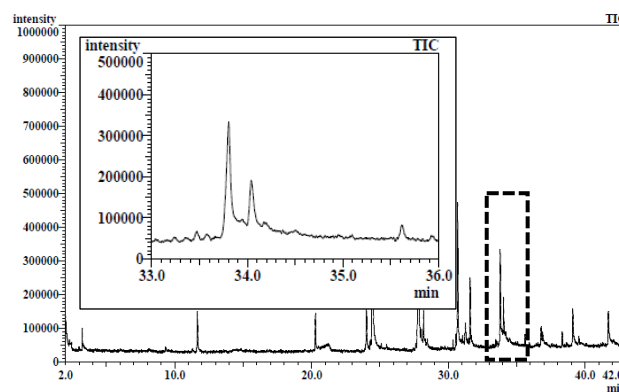


Fig.2 Total ion current chromatograms of capsacinoids (NDC: nordihydrocapsaicin, C: capsaicin, DC: dihydrocapsaicin) in pollack roe A by GC-MS. Inset shows the expanded region of the dotted frame.

3.1.1(2) 誘導体化後の試料溶液の測定

Jaroslav Blasko らの報告⁵⁾により、カプサイシノイドは HMDS による誘導体化により検出感度が向上するとされている。3.1.1(1)において、明太子Aの試料溶液からカプサイシノイドのピークが確認されなかったことから、誘導体化操作後、再度 GC-MS での測定を行った。測定により得られた標準カプサイシノイドのトータルイオンカレントクロマトグラムを Fig. 3 に、明太子Aの試料溶液のトータルイオンカレントクロマトグラムを Fig. 4 に示す。標準カプサイシノイドについては、誘導体化によりカプサイシンのピーク強度が約 1.5 倍となった。一方、明太子Aの試料溶液については、誘導体化後も含有割合の最も高いカプサイシンを含め、いずれのカプサイシノイドもピークは確認されなかった。これらの結果から、2.3.3(1)において調製した明太子Aの試料溶液中のカプサイシノイド量は微量であり、本研究で実施した方法では調製が不十分であったことが予想される。今後 GC-MS で分析する際には、試料溶液を液液抽出や固相抽出により夾雑物を除去した上で濃縮を行う必要があると考えられる。

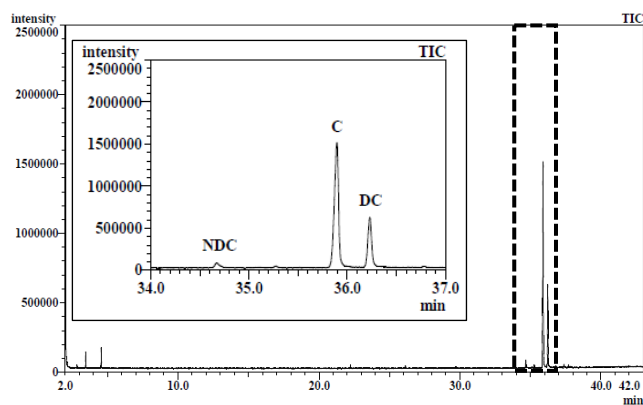


Fig.3 Total ion current chromatograms of derivatized capsaicinoids (NDC:nordihydrocapsaicin, C:capsaicin, DC:dihydrocapsaicin) in standard by GC-MS. Inset shows the expanded region of the dotted frame.

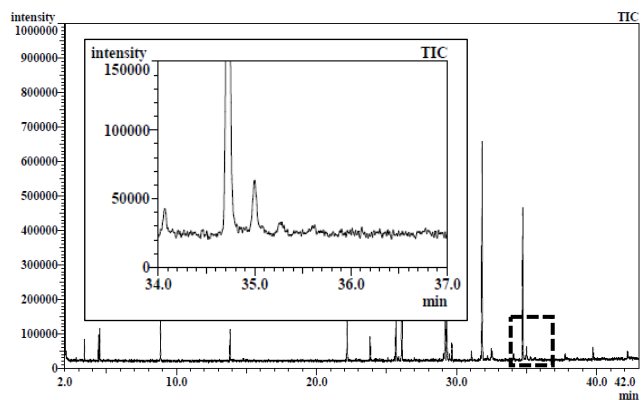


Fig.4 Total ion current chromatograms of derivatized capsaicinoids (NDC:nordihydrocapsaicin, C:capsaicin, DC:dihydrocapsaicin) in pollack roe A by GC-MS. Inset shows the expanded region of the dotted frame.

3.1.2 HPLC-FLD

2.4.1において調製した標準カプサイシノイド溶液及び明太子Aの試料溶液を HPLC-FLD にて測定を行い、得られた標準カプサイシノイドのクロマトグラムを Fig. 5 に、明太子Aの試料溶液のクロマトグラムを Fig. 6 に示す。標準カプサイシノイド及び明太子Aの試料溶液いずれについても、カプサイシン及びジヒドロカプサイシン、ノルジヒドロカプサイシンのピークが検出された。これより以降のカプサイシン抽出条件の検討やカプサイシンの定量については、HPLC-FLD により測定を行った。

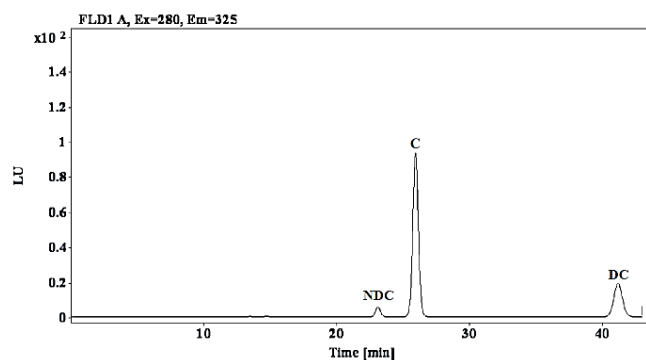


Fig.5 Chromatogram of capsaicinoids (NDC:nordihydrocapsaicin, C:capsaicin, DC:dihydrocapsaicin) in standard by HPLC-FLD.

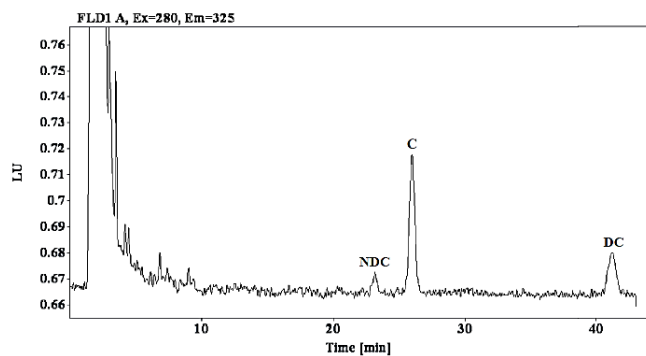


Fig.6 Chromatogram of capsaicinoids (NDC:nordihydrocapsaicin, C:capsaicin, DC:dihydrocapsaicin) in pollack roe A by HPLC-FLD.

3.2 抽出条件の検討

2.3.3(1)-(3)で抽出した明太子 A の試料溶液を 2.2.2(2)の条件で測定し、得られたカプサイシンのピーク面積値を Table 3 に示す。カプサイシンの抽出方法としては、抽出溶媒としてエタノールを用いた場合は還流抽出が、アセトンを用いた場合はソックスレー抽出における抽出効率が良好であった。

また、山本の報告⁸⁾により、唐辛子からカプサイシノイドを溶媒抽出する際に、抽出溶媒として水及びエタノールやアセトン等の親水性有機溶媒からなる混合抽出溶媒を用いることで、カプサイシノイドの抽出効率を高めることができるとされている。この方法を参考に、エタノール及びアセトンそれぞれ混合モル比の異なる

2 種の混合抽出溶媒を用いて振とう抽出を行った。測定の結果、特に水及びアセトンの混合抽出溶媒を用いた場合、アセトンで抽出した場合と比較してカプサイシンの抽出効率が良好であった。しかし、混合抽出溶媒中の水の割合が高くなるほど、相対標準偏差の値が大きくなるという結果が得られた。これは抽出溶媒中に水が含まれることにより、たらこや調味液由来の水溶性物質の抽出量が多くなることが影響していると考えられる。

以上より、エタノールによる還流抽出において抽出効率及び再現性が良好であったことから、以降のカプサイシンの定量及び添加回収試験においては、エタノールにより還流抽出した明太子 A、B の試料溶液を用いた。

Table 3 Peak area of capsaicin in salted pollack roe by HPLC-FLD (n=3).

Extraction solvent (Mol fraction)	Reflux		Soxhlet		Shaking	
	Peak area	RSD (%)	Peak area	RSD (%)	Peak area	RSD (%)
Ethanol (1.0)	4.88	2.77	4.41	5.37	4.00	4.19
Ethanol (0.2)	—	—	—	—	3.34	8.46
Ethanol (0.4)	—	—	—	—	4.13	6.96
Acetone (1.0)	3.73	6.81	4.82	8.43	3.01	3.03
Acetone (0.6)	—	—	—	—	4.64	6.61
Acetone (0.8)	—	—	—	—	4.24	3.77

— : Not measured

3.3 たらこ調製品に含まれるカプサイシンの定量

3.3.1 検量線の作成

2.4.3(1)により得られたカプサイシンの検量線を Fig. 7 に示す。カプサイシン濃度 0.35–5.6 µg/mL の範囲において決定係数は 0.99990 以上であり、原点付近を通る良好な直線性を示した。

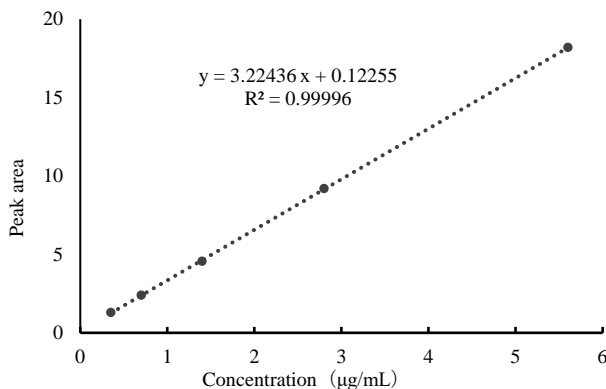


Fig. 7 Calibration curve of capsaicin.

3.3.2 検出限界、定量下限の測定

2.4.3(2)により得られたカプサイシンの検出限界及び定量下限の結果を Table 4 に示す。3.2 で得られた各抽出条件におけるカプ

サイシンのピーク面積値から 3.3.1 の検量線によりカプサイシン濃度を算出した結果、0.89–1.47 µg/mL となった。これより、いずれの抽出条件においてもカプサイシンの濃度は検出限界及び定量下限以上であることが確認された。

Table 4 Limit of detection (LOD) and Limit of quantification(LOQ) of capsaicin by HPLC-FLD (n=3).

Number of measurements	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
1	0.12	0.36
2	0.15	0.45
3	0.16	0.49
Average	0.14	0.43

3.3.3 たらこ調製品に含まれるカプサイシンの定量

2.4.3(3)により得られたカプサイシンの定量結果を Table 5 に示す。明太子 A、B ともに定量値について相対標準偏差の値が大きく、再現性が低い結果となった。この結果については、明太子 A、B に含まれるカプサイシン量が微量であり、検出感度が低いためピーク面積値の再現性が低いことや、抽出操作における誤差等の影響を受けやすいことが関係しているとして考えられる。

市販品である明太子 A, B のカプサイシノイド含有量は、公開されていないため不明であるが、唐辛子の添加割合が 3.2 % の場合、明太子 100g あたり 840 μg –4.92 mg であるという報告がなされている⁹⁾。国内分類例規「1604.20 1.たらこ（たら卵）の調製品の関税について」(4)¹⁰⁾では、唐辛子の添加割合が 0.7 % であるたらこ調製品が例示されており、カプサイシン：ジヒドロカプサイシン = 7:2 と仮定した場合、100 g あたりのカプサイシン含有量は 143–837 μg であると推定される。Table 5 の定量値は、当該範囲内に収まっているため、抽出や測定に問題はないと考えられる。

また、上記の結果より、本研究での測定条件及び抽出条件で、たらこ調製品中のカプサイシンの含有の有無を確認することが可能であることが示された。

Table 5 Capsaicin contents in pollack roe A and B (n=3).

sample	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)	Capsaicin ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	RSD (%)
A	1.47	2.84	147	2.86
B	3.79	2.87	379	2.94

3.4 添加回収試験

2.4.4 により添加回収試験を行った結果、カプサイシンの添加回

収率は 93.6 % (RSD=5.49 %, n=3) であった。添加回収率がやや低い値となった要因としては、3.3.3 と同様に明太子 A に含まれるカプサイシン量が微量であり、今回添加したカプサイシン量（試料 3 g に対してカプサイシン 5.6 μg ）も少ないことからピーク面積値の再現性が低いこと、また、抽出操作における誤差等の影響を受けやすいことが関係していると考えられる。

4. 要 約

本研究では、たらこ調製品に含まれるカプサイシノイドの定性、定量のために、適切な測定機器や抽出条件等を検討した。検討の結果、測定機器として HPLC-FLD を用いることにより、たらこ調製品中のカプサイシノイドの検出が可能であり、エタノールを用いた還流抽出による抽出効率が良好であった。たらこ調製品中のカプサイシンの定量及び添加回収試験の結果、含有するカプサイシン量が少ないことから再現性が低かったが、カプサイシンの含有の有無を確認することについて、分析可能であることが示された。今後、たらこ調製品中のカプサイシノイドについて正確な定量を実施する場合は、再現性の向上のために測定条件や抽出条件のさらなる検討が必要であると考えられる。

文 献

- 1) 松島憲一：“とうがらしの世界”，P.58,60,62 (2020).
- 2) 岩井和夫，渡辺達夫：“トウガラシ—辛味の科学”，P.22 (2000).
- 3) Supradip Saha, S. Walia, Aditi Kundu, Charanjit Kaur, Jashbir Singh & R. : *International Journal of Food Properties*, **18**, 1535-1545 (2015).
- 4) AOAC 43.1.43, Capsaicinoids in Capsicums and Their Extractives Liquid Chromatographic Method (2016).
- 5) Jaroslav Blasko, Zofia Niznanska, Robert Kubinec, Lubomir Mikulas, Lubos Niznansky, Janka Kubincova, Marek Kunstek, Lubomira Duhackova, Rastislav Hrecka, Juraj Kabat, Ludmila Gabrisova, Jozef sidlo, Alexandra Hengerics Szabo : *Journal of Food Composition and Analysis*, **114**, 104733 (2022).
- 6) ISO/CD 11843-2, Capability of detection Part 2: Methodology in the linear calibration (1994).
- 7) 農林水産省：分析法の妥当性確認に関するガイドライン分析化学，68, 581 (2019).
- 8) 山本秀樹：日本特許公開公報，特開 2008-19191 (2008.1.31).
- 9) Hoyoun Cho, Youngjoo Kwon : *Food Science & Nutrition*, **8**, 4611-4624(2020).
- 10) 昭和 62 年 12 月 23 日蔵関第 1299 号「分類例規」