

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

斎藤 義和*, 盛永 誠*

Study of a benzene-free quantitative analysis method for piperine content in pork products

Yoshikazu SAITO*, Makoto MORINAGA*

*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 Analytical Method which might be harmful to analysts’ health because benzene is used in the analysis process, a method was examined that uses toluene as solvent instead of benzene. In the measurements of simulated samples that contained 0.3% pepper, differences between the results of piperine content obtained from the two methods were -0.007 to 0.003% (mean: 0.0003% , SD: 0.0002 , $n = 6$), showing no significant difference. There was no interference from the matters extracted from the meat itself in determining the test solution. In the process of silica gel column chromatography, there was no elution of piperine even if toluene was added to the column to wash the sample before the defined process of eluting piperine from the column with methanol; after the elution, there was no more elution of piperine even if methanol was added again. These facts indirectly explain the accuracy of the method. Repeatability precision obtained from measurement of simulated samples was 3.0 (RSD%, $n = 6$). The calibration curve obtained from the measurements of standard piperine solutions of 0.002 – 0.01 g/l showed good linearity.

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。

現在はピペリンの定量に、税関分析法「豚肉調製品中のピペリンの定量分析法」^{1)~7)}が使われている。この分析は、生肉からピペリン及び脂質を抽出する 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 紫外外部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、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。

近年、本法と同様にシリカゲルカラムクロマトグラフィーの溶離液にベンゼンを用いる分析法において、ベンゼンの代替としてトルエンを使用することで良好な結果が得られることが報告されたが¹⁰⁾、税関分析法「豚肉調製品中のピペリンの定量分析法」においても同様のアプローチで改善できる可能性があると考えられる。なお、トルエンは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^{11), 12)}、ベンゼンと比較して健康被害のリスクが低い物質である。

このような背景から、本研究では、現行の税関分析法「豚肉調製品中のピペリンの定量分析法」の健康上の問題点を解決する分析法を確立することを目的として、ベンゼンの代替としてトルエンを使用する方法で、定量分析が可能か否かを検討した。

* 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：市販の豚ひき肉に、こしょう含有量が0.3%になるように市販の粉末黒こしょうを添加して、混和したもの

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（関東化学、試薬特級）

クロロホルム（関東化学、試薬特級）

メタノール（関東化学、試薬特級）

2.2 分析装置

紫外可視分光光度計：UV-1200（島津製作所）

2.3 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」（以下、ベンゼン法という）

新規法：ベンゼン法において、ベンゼンをトルエンと読み替えた方法（以下、トルエン法という）

2.4 トルエン法とベンゼン法の定量結果の比較試験

模擬試料を約30 g作成し、そこから10 gずつ2検体採取して、一方をベンゼン法で、もう一方をトルエン法で測定し、それぞれ試料中のピペリン含有量を求め、二法から得られる結果の差（トルエン法 - ベンゼン法）を算出した。この実験は、6個の模擬試料に対して実施した。

2.5 トルエン法の妥当性確認試験

2.5.1 トルエン法のピペリンに対する特異性の確認

ブランク試料6検体をトルエン法で測定し得られた吸光度から、豚肉由来の成分がピペリンの検出に与える影響の有無を確認した。

2.5.2 トルエン法のシリカゲルカラム処理工程におけるピペリンの溶出状況の確認

模擬試料10 gおよびブランク試料10 gを検体として、トルエン法のシリカゲルカラムによる処理工程で得られる溶出液を、Fig. 1のとおり分取して、それぞれを紫外外部吸収法（測定波長：343 nm）で測定し、ピペリンの検出の有無を確認した。なお、各分画の対照液には、トルエン-クロロホルム混液（トルエン：クロロホルム = 20 : 30）10 mlを検液とし、各試料検液と同様に処理して得られる溶出液を用いた。

Samples

A. simulated sample solution

B. blank sample solution

C. chloroform / toluene = 30 / 20

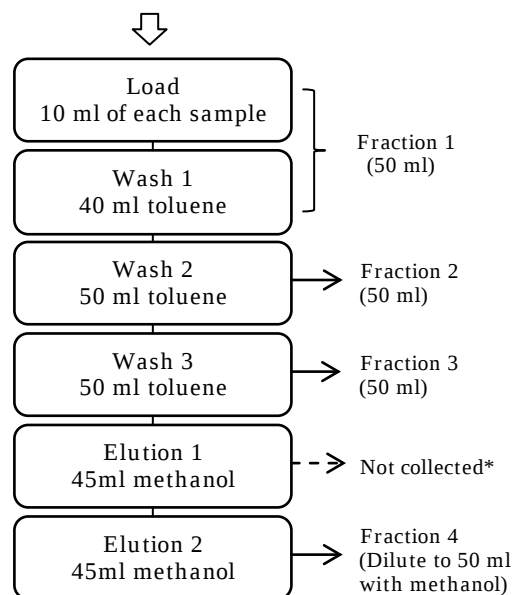


Fig. 1 Method of obtaining the fractions measured in experiment 2.5.2 from the column

*In the usual process of measurement, this fraction is collected and diluted to 50 ml with methanol as a test solution.

2.5.3 トルエン法の繰り返し精度の確認

模擬試料を約100 g作成し、そこから10 gずつ6検体採取して、トルエン法で測定し試料中のピペリン含有量を求め、相対標準偏差を算出した。

2.5.4 標準液から得られる検量線の直線性の確認

54.5 mg のピペリンを量り取り、メタノールに溶解したものを原液1とした。原液1をホールピペットで10 ml採取し、メタノールで50 mlに定容したものを原液2とした。原液2をホールピペットで、1、2、3、4、及び5 ml採取し、それぞれ50 mlに定容したものを検液として、紫外外部吸収法（測定波長：343 nm）で測定した。各検液中のピペリン重量と吸光度との関係をプロットし、最小二乗法により得た検量線を作成し、その直線性の確認をした。

3. 結果及び考察

3.1 トルエン法とベンゼン法の定量結果の比較結果

2.4.1の実験結果はTable 1のとおりであり、二法の結果の差は非常に小さいものであった。

また、これらの結果から、二法の結果の差が0と有意な差がないという帰無仮説を検定するため、対になったデータのt検定を実施すると、 $t = -1.86$ （平均値×サンプル数の平方根 / 標準偏差）を得る。tの臨界値は $t_{5} = 2.57$ （ $P = 0.05$ ）にであり、tの絶対値はこれよりも小さいことから、帰無仮説は棄却されない。すなわち、二つの方法はピペリンの定量値として有意に異なる結果を与えないということになる。

また、ピペリン含有量 5%を基準として、ベンゼン法とトルエン法の結果の差をこしょう含有量に換算すると、 $\pm 0.01\%$ 程度である。

Table 1 Comparison of measurement results by toluene and standard (benzene) method obtained from six simulated samples

sample No.	piperine content (%)		differences (A-B)
	toluene method (A)	standard method (B)	
1	0.0119	0.0116	0.0003
2	0.0108	0.0115	-0.0006
3	0.0112	0.0116	-0.0003
4	0.0107	0.0112	-0.0005
5	0.0109	0.0116	-0.0007
6	0.0115	0.0115	0.0000
		Mean	-0.0003
		S.D.	0.0004

3.2 トルエン法の妥当性確認結果

3.2.1 トルエン法の特異性の確認結果

ブランク試料 6 検体の測定で得た吸光度は、0.000 - 0.005 であり、平均値が 0.003、標準偏差が 0.002 であった。なお、使用した装置の仕様上の測光繰り返し精度が ± 0.002 （吸光度 1.0 における数値）であることから、観察された標準偏差は装置由来の誤差であると言える。この標準偏差から、観察された平均値の 95%信頼限界（平均値 $\pm$ 標準偏差 $\times 1.96$ ）を計算すると、 0.003 ± 0.004 であったことから、0 との実質的な差は認められなかった。

このことから、豚肉由来成分でありながらトルエン法の工程においてピペリンと同様の挙動を示し、ピペリンの正確な定量を妨害する物質の存在は認められないことが示された。

3.2.2 トルエン法のシリカゲルカラム処理工程におけるピペリンの溶出状況の確認結果

2.5.2 の実験結果は、Table 2 のとおりであった。

同一工程で得られた模擬試料の分画とブランク試料由来の分画の吸光度の比較（例：試料 A の分画 1 と試料 B の分画 1 の比較）においては、3.2.1 で言及した装置由来の誤差から計算する検出値の信頼限界を考慮に入れると、各比較対象間の検出値には実質的な差は無いと言えた。これは、模擬試料から得た各分画においてブランク試料のそれと同様に、ピペリンに由来する吸収が認められなかったことを意味する。すなわち、検液分取工程の前後にはピペリン溶出が無かったということになり、特に、分画 1 から 3 の段階では、トルエンで洗浄を行っても、ピペリンはシリカゲルカラムに吸着したままであることが示された。

Table 2 Absorbance of the fractions eluted from the silica gel column. Sample name and fraction No. are the same as in Fig. 1.

fraction No.	absorbance	
	sample A	sample B
1	0.014	0.016
2	0.018	0.013
3	0.010	0.005
4	0.003	0.005

3.2.3 トルエン法の繰り返し精度の確認結果

2.5.3 の実験結果は、Table 3 のとおりであった。

なお、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、トルエン法はそれを満たすことが示された。

Table 3 Results obtained from six determinations of a simulated sample containing 0.3% pepper

determination no.	piperin content (%)
1	0.0111
2	0.0119
3	0.0116
4	0.0119
5	0.0114
6	0.0121
mean	0.0117
SD	0.0004
RSD(%)	3.0

3.2.4 標準液から得られる検量線の直線性の確認結果

2.5.4 に従って作成した検量線は、 $R^2 > 0.9999$ で原点付近を通る良好な直線性が確認された（Fig. 2）。この検量線の範囲は、ピペリン含有率 0.005 - 0.025%の試料 10 g から規定の方法で測定した吸光度に対応する。また、この範囲を試料中こしょう（ピペリンを 5%含有するもの）含有率に換算すると 0.1 - 0.5%に相当する。

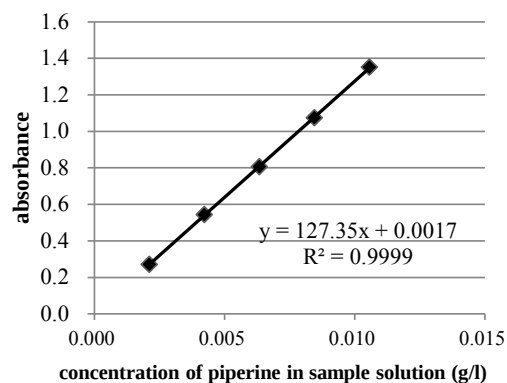


Fig. 2 Calibration curve, generated using standard piperine solutions

3.3 代替溶媒に関する考察

トルエン法はマトリックスの影響を受けずにピペリンを測定可能（3.2.1 参照）で、ピペリン分取工程におけるピペリンの損失は観察されなかった（3.2.2 参照）。これらのことからトルエン法が妥当な真度を有していると推測され、得られる測定結果は現行のベンゼン法と有意差がなかった（3.1 参照）。

また、トルエン法の精度は許容される範囲であった（3.2.3 参照）。検量線の直線性が担保される範囲からは、こしょう（ピペリンを 5%含有するもの）含有量 0.1 - 0.5%の試料に対応可能であり

(3.2.4 参照) 関税分類上の確認が必要であるこしょう含有量 0.3%前後の物品の分析には十分な範囲であると言えた。

すなわち、トルエンを現行法におけるベンゼンの代替溶媒として使用すれば、定量性能はこれまでどおりのままで、現行法の健康上の問題を解決できる。

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」は、ベンゼンを使用し健康上の問題が指摘されているが、その問題を解決する分析法として、同法中のベンゼンをトルエンに置き換える分析法の妥当性を検討した。こしょうを 0.3%含有する模擬試料の測定においては、両法の結果の差はピペリン含有量で -0.007 -

0.003% (平均 0.0003%、標準偏差 0.0002、n=6) と非常に小さく、対になったデータの t 検定の結果、これら二法は統計学的に有意な差を与えない分析法であることがわかった。また、ピペリンの検出がマトリックスである豚肉に妨害されないこと、シリカゲルカラムによる処理において、検液分取工程前後にはピペリンの溶出がないことが示され、同法がピペリンを正確に定量出来ることが間接的に推測された。また、模擬試料の測定から求めた繰り返し精度は 3.0% (相対標準偏差、n=6) であった。ピペリン含有率 0.005 - 0.025% の試料 10 g から規定の方法で作成した検液のピペリン濃度に相当する標準液の測定により、同範囲におけるピペリン濃度と吸光度の間に高い直線性が認められた。以上から、本研究で検討したトルエン法は、豚肉調製品中のピペリンの定量が可能な分析法である。

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，川端省三：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，加藤康紀，富田健二，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：関税中央分析所報，40，27 (2000)
- 8) IARC Monographs, 29, 93 (1982)
- 9) IARC Monographs, Supplement. 7, 59 (1987)
- 10) 西村康彦，行本剛，大崎伸明，勅使川原尚行：関税中央分析所報，53，89 (2013)
- 11) IARC Monographs, 47, 79 (1989)
- 12) IARC Monographs, 71, 829 (1999)
- 13) AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals (2002)