

キャピラリー電気泳動法によるチーズ中の 縮合りん酸塩の確認分析法

平元 秀和*, 井上 純*, 廣瀬 達也*, 川渕 哲*

Analysis of Condensed Phosphate in Cheese by Capillary Electrophoresis

Hidekazu Hiramoto*, Jun Inoue*, Tatsuya Hirose*, and Satoshi Kawabuchi*

*Osaka Customs Laboratory

4-10-3, Chikko, Minato-ku, Osaka 552-0021 Japan

As one of the methods for analytically discriminating whether an imported cheese is processed cheese or natural cheese, it is necessary to detect condensed phosphate, which is added as an emulsifier to processed cheese. Compared with the presently used paper chromatography, capillary electrophoresis (CE) is an excellent method for separating an ionic substance and is expected to allow prompt analysis since no pretreatment operation is necessary. So, the confirmation analysis of condensed phosphate by CE was examined. The migration conditions of CE were optimized, and the condensed phosphate in processed cheeses could be confirmed. It was thus demonstrated that this method is a useful method of discriminating natural cheese from processed cheese.

1. 緒 言

現在、チーズは関税率表上第0406項に分類されており、日本に輸入される際の種類・形状等によって、さらに細かく分類される。その分類基準のひとつとして、輸入されたチーズが、ナチュラルチーズなのか、あるいはプロセスチーズなのかが問題となる。日本の一般市場ではチーズ消費量の半分以上がプロセスチーズとなっており¹⁾、そのプロセスチーズは形状にかかわらず、ナチュラルチーズよりも高い税率が設定されている。従って、税関分析において、ナチュラルチーズとプロセスチーズを区別する必要がある。

プロセスチーズは、製造する際に加熱溶融を行う必要があることから、縮合りん酸塩等の溶融乳化剤が添加されている¹⁾。そのため、従来、税関分析におけるプロセスチーズの確認分析では、ペーパークロマトグラフ法で分離し、その後発色剤を用いて各種りん酸塩を発色させることで、縮合りん酸塩の有無を確認していた。しかし、ペーパークロマトグラフ法では、試料であるチーズをクロマトグラフに供するために、除脂肪、除たん白といった前処理を必要とし、ある程度の時間と作業量が要求される。

そこで今回、イオン性物質の分析を迅速・簡便に行える手法としてキャピラリー電気泳動(CE)法に注目し²⁾、CE法によるチーズ中の縮合りん酸塩の確認分析について検討を行った。

2. 実 験

2. 1 分析試料

プロセスチーズ(輸入品11検体, 国産品5検体)
ナチュラルチーズ(輸入品5検体)
とろけるスライスチーズ(輸入品, 国産品, 各1検体)
りん酸二水素ナトリウム(2水和物)(キシダ化学製)
二りん酸ナトリウム(10水和物)(キシダ化学製)
トリポリリン酸ナトリウム(キシダ化学製)
クエン酸三ナトリウム(2水和物)(キシダ化学製)

2. 2 分析装置及び測定条件³⁾

装置: HP3D CE (Hewlett Packard社製)
キャピラリー: フューズドシリカキャピラリー
50 μ m I.D. $\times$ 72 cm
50 μ m I.D. $\times$ 112.5 cm
泳動液: Inorganic Anion Buffer (IAB)

* 大阪税関業務部 〒552-0021 大阪府大阪市港区築港4-10-3

Organic Acid Buffer (OAB)

Plating Bath Buffer (PBB)

Basic Anion Buffer (BAB)

(いずれもAgilent Technologies社製)

試料注入法：加圧法 (50 mbar)

印加電圧：30 kV (IAB)

25 kV (OAB, PBB, BAB)

20 kV (BAB)

キャピラリー温度：20℃

検出器：Diode-array

検出波長：Signal：Reference = 350/80nm：245/10nm (IAB)

= 350/20nm：200/10nm (OAB)

= 350/20nm：230/10nm (PBB)

= 350/20nm：275/10nm (BAB)

2. 3 実験方法

2. 3. 1 CEの泳動液の検討

今回使用したCE装置のために、メーカーであるAgilent Technologies社がいくつかの専用分析キットを用意している。その中から、陰イオンの分析に適していると思われるInorganic Anion Buffer (以下IABと略記する)、Organic Acid Buffer (以下OAB)、Plating Bath Buffer (以下PBB)、Basic Anion Buffer (以下BAB)の4種類の泳動液を用いて、モノりん酸塩やピロりん酸塩などの各種りん酸塩とチーズについて分析を行い、各成分のピーク位置、形状等について比較検討した。なお、各バッファー使用時における検出波長などの泳動条件は、それぞれのキットに向けてメーカーが推奨しているものを、そのまま使用した。

2. 3. 2 CEの泳動条件の検討

今回のCEにおいて、縮合りん酸塩のピークをチーズ由来の他成分のピークから明確に分離、検出できる泳動条件を検討した。

2. 3. 3 適正なサンプル濃度の検討

プロセスチーズを水に分散させたものについて、幾つかの濃度条件で分析を行い、縮合りん酸塩の分離、検出に適するサンプル濃度について検討した。

2. 3. 4 各種チーズの分析

今回用意した各種チーズ (計23検体) についてCE法による分析を行った。試料とするチーズの前処理を以下のように行った。まず、試料を乳鉢などで均一になるようにすりつぶし、そこから約0.5gを量り取り、蒸留水10mlを加えてよく攪拌した後、しばらく静置した。水不溶物が沈殿した後に定性用ろ紙を用いてろ過し、さらにポアサイズ0.45 μ mのメンブランフィルターを通して、そのろ液を検液とした。

3. 結果と考察

3. 1 CEの泳動液の検討

ナチュラルチーズ及びプロセスチーズから分離検出されるピーク成分と標準試薬のピークの分離状況を確認するため、4種

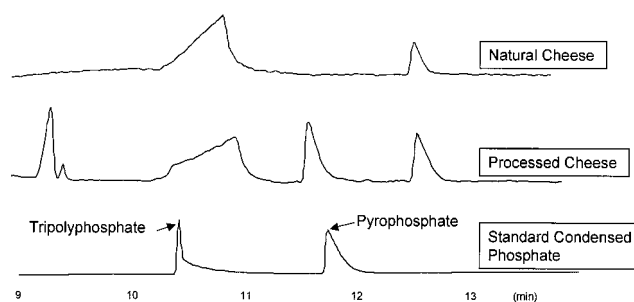


Fig.1 Electropherograms of natural cheese suspension, processed cheese suspension and condensed phosphate solution by CE using IAB.

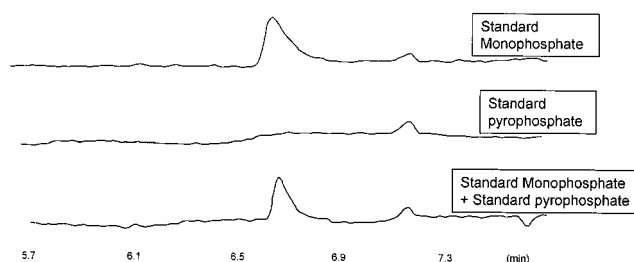


Fig.2 Electropherograms of monophosphate and pyrophosphate solution by CE using OAB.

類のバッファーについて検討した。

なお、ここでのチーズ分析用検液の濃度は、10mlの水に対してチーズ約0.5gを分散させたものとし、キャピラリーは長さ72cmのものをを用いて検討した。

3. 1. 1 IABを使用した場合

IABを使用した場合、プロセスチーズにおいてナチュラルチーズでは検出されないピロりん酸イオンのピークが確認できた。しかし、トリポリりん酸イオンのピークは、チーズ由来の別のピークと重なるため、明確に区別できなかった (Fig.1)。

3. 1. 2 OABを使用した場合

OABを使用した場合、標準モノりん酸イオンに由来する小さなピークと、ピロりん酸イオンのピークがエレクトロフェログラム上の同じ位置に検出された (Fig.2)。モノりん酸塩はナチュラルチーズ中にも含まれているため、プロセスチーズ中のピロりん酸イオンを特定できないものと考えられた。

3. 1. 3 PBBを使用した場合

PBBを使用した場合も、ナチュラルチーズとプロセスチーズの両方で、エレクトロフェログラム上でピロりん酸イオンと同じ位置にピークを検出した (Fig.3)。

3. 1. 4 BABを使用した場合

BABを使用した場合、ピロりん酸イオンのピークとクエン酸イオンのピークがエレクトロフェログラム上の同じ位置に検出された (Fig.4)。クエン酸は、牛乳に含まれる天然の成分としてほとんどのチーズ中に含まれるため、結果として、ナチュラルチーズのエレクトロフェログラムにおいても、ピロりん酸イオンと同じ位置にピークが検出されると考えられた。

3. 1. 5 泳動バッファーの選択

4種類のバッファーいずれについても、当初の泳動条件にお

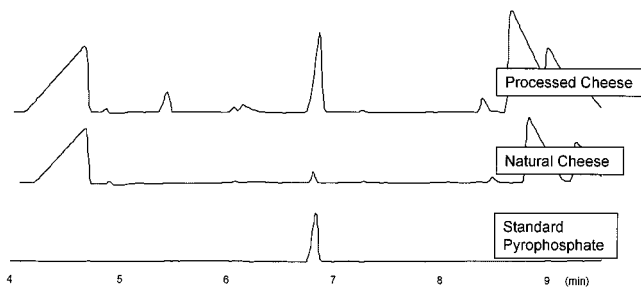


Fig.3 Electropherograms of natural cheese suspension, processed cheese suspension and condensed phosphate solution by CE using PBB.

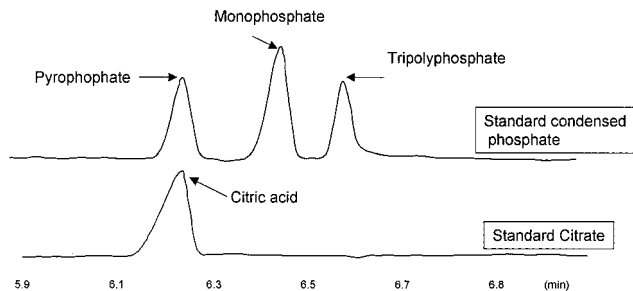


Fig.4 Electropherograms of citrate, monophosphate and condensed phosphate solution by CE using BAB.

いてはモノリン酸イオン、縮合リン酸イオン及びチーズ由来イオンのピークを分離できないという問題点があった。そこで、条件検討を加えるためのバッファーを選択するため、4つのバッファーの問題点について更に比較検討を行った。

まず、4つのバッファーのうちOABとPBBについては、先に挙げたピークの分離上の問題の他にも分析の支障になりそうな問題点があった。OABでは、縮合リン酸イオンのピークが濃度変化に敏感で、少しでも濃度を上げるとピーク形状に乱れを生じ、ベースラインが不安定になった。また、PBBでは、チーズの種類によって縮合リン酸イオンのピーク近傍にチーズ由来の他のピークが検出される事があり、それぞれのピークの区別が難しい場合があった。従って、この2種類のバッファーを今回の目的に適合させることは困難と考えた。

残る2つのバッファーであるIABとBABについては、先に挙げた分離上の問題以外にはエレクトロフェログラム上での目立った問題点はなかったが、IABが無機陰イオンの分析を目的としているのに対して、BABは陰イオンだけではなく糖、有機酸等様々な目的に使用される汎用性を有するので、今回はBABを泳動バッファーとして選択し、目的に適合させるため、さらに泳動条件の検討を行った。

3. 2 BABを泳動バッファーとしたCEの泳動条件の検討

泳動条件のうち、イオンの移動速度を下げるため、印加電圧を25KVから20KVに変更し、泳動時間を長くすることで、わずかながらピーク形状に改善が見られた。そこで、更にキャピラリーの長さを112.5センチメートルに延長することで、プロセスチーズのエレクトロフェログラムにおいて、重なっていた

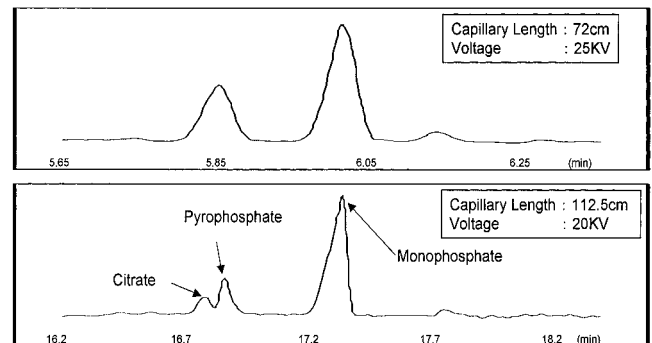


Fig.5 Electropherograms of processed cheese suspension under the different migration conditions.

クエン酸イオンとピロリン酸イオンのピークを分離することができた (Fig.5)。

3. 3 適正な試料濃度の検討

エレクトロフェログラム上の接近した位置に検出されるピロリン酸イオンとクエン酸イオンのピークについて、最も良好なピーク形状が得られる濃度の検討を行った。10 mlの水に、同じプロセスチーズを1.5 g, 1.0 g, 0.5 g, 0.25 g, 分散させたものを検液とした。これらのエレクトロフェログラムにおいて、1.5 g, 1.0 g及び0.25 gのチーズを使用したものについては、ピロリン酸イオンとクエン酸イオンのピークが分離しなかったのに対して、0.5gを使用したものでは2本のピークが明確に区別できた (Fig.6)。従って、水10 mlに対しチーズ0.5 gを分散させた濃度が、接近したピロリン酸イオンとクエン酸イオンのピークを分離する上で最適な濃度であると考えられた。

3. 4 各種チーズの分析

3.2及び3.3において、CEの泳動条件及び最適と考えられる試料濃度が確認されたので、これらの条件で実際に各種チーズの分析を試みた。

検体として用意した各種チーズをCEに供した。そうして得

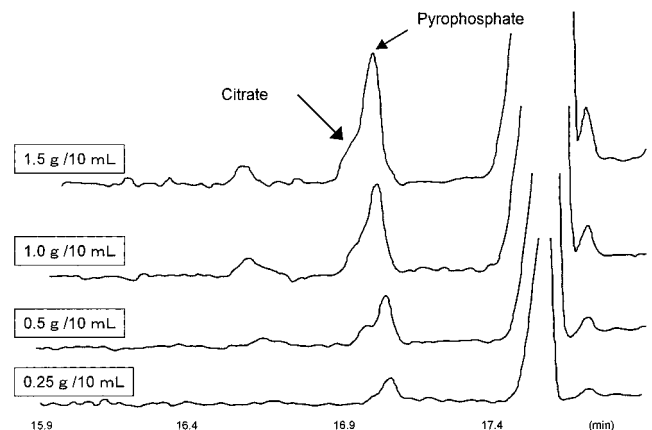


Fig.6 Electropherograms of processed cheese suspension with various concentrations.

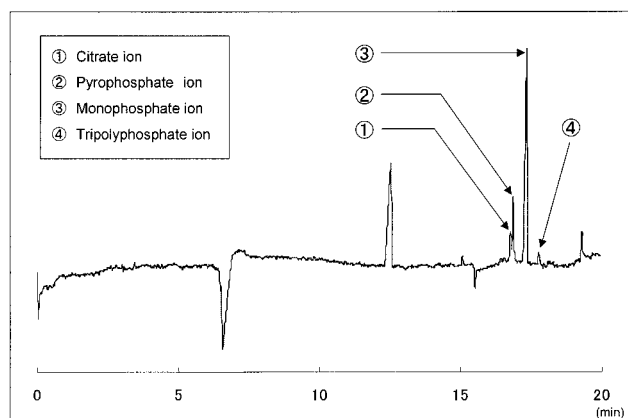


Fig.7 Electropherogram of processed cheese suspension.

られたプロセスチーズの電クログラムを一例をFig.7

に示した。この電クログラムにおいて、クエン酸イオン、ピロリン酸イオン、モノリン酸イオン及びトリポリリン酸イオンのピークが確認できた。Fig.8に各種プロセスチーズの電クログラムのうち一部を、Fig.9に各種ナチュラルチーズの電クログラムを示す。これらを比較すると、プロセスチーズでのみ縮合りん酸塩を検出するため、プロセスチーズとナチュラルチーズの電クログラムには明らかな差異が認められた。このように、用意したプロセスチーズ16検体とナチュラルチーズ5検体は、電クログラム上での差異により区別することが可能であった。

なお、一般に「とろけるスライスチーズ」と呼ばれるチーズについては、溶融乳化の工程を経たプロセスチーズであるにもかかわらず、電クログラム上でナチュラルチーズと区別することができなかった。これは、乳化剤として縮合りん酸塩を使わずクエン酸を使用するケースが多いためであると考え

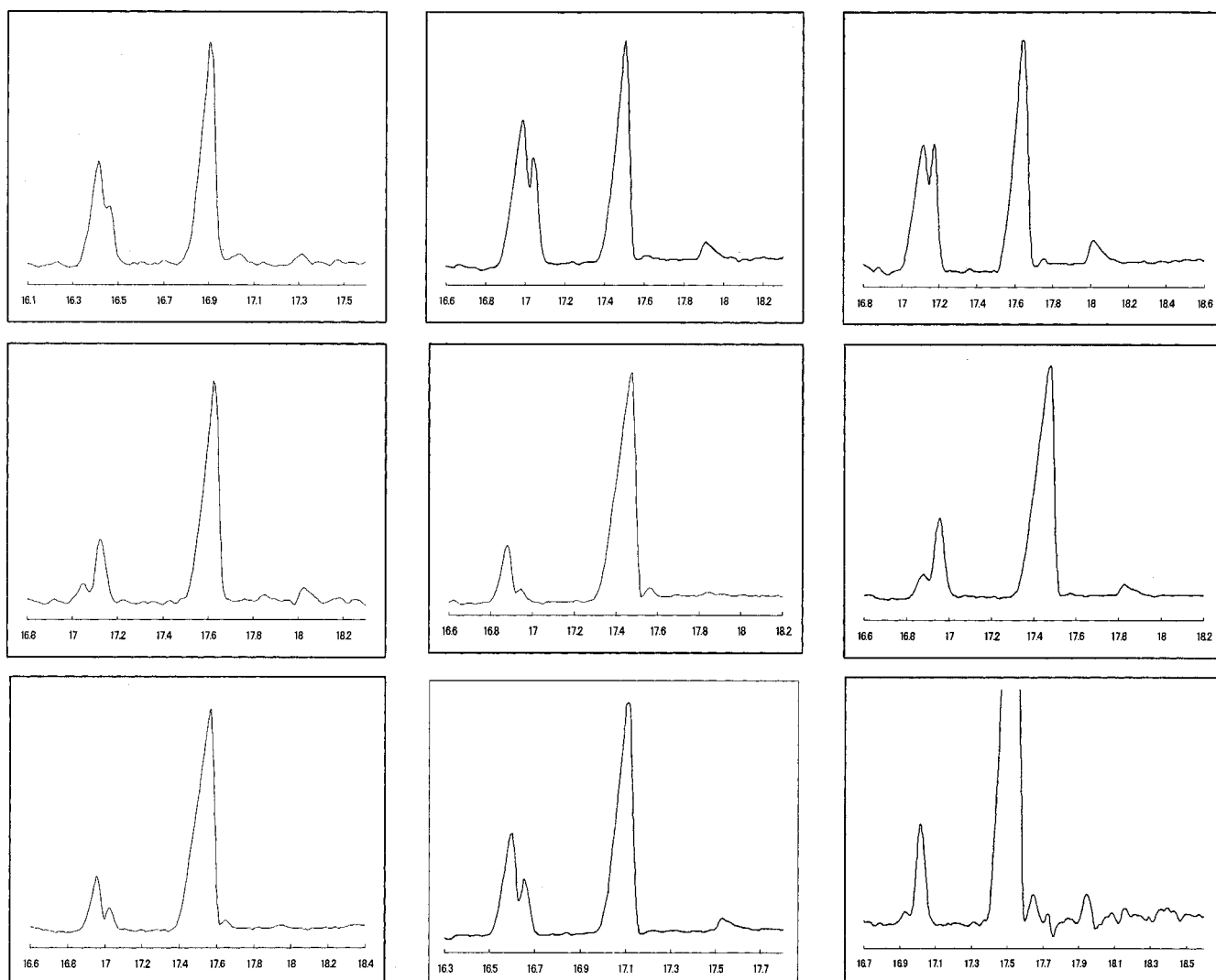


Fig.8 Electropherograms of various processed cheese suspensions.

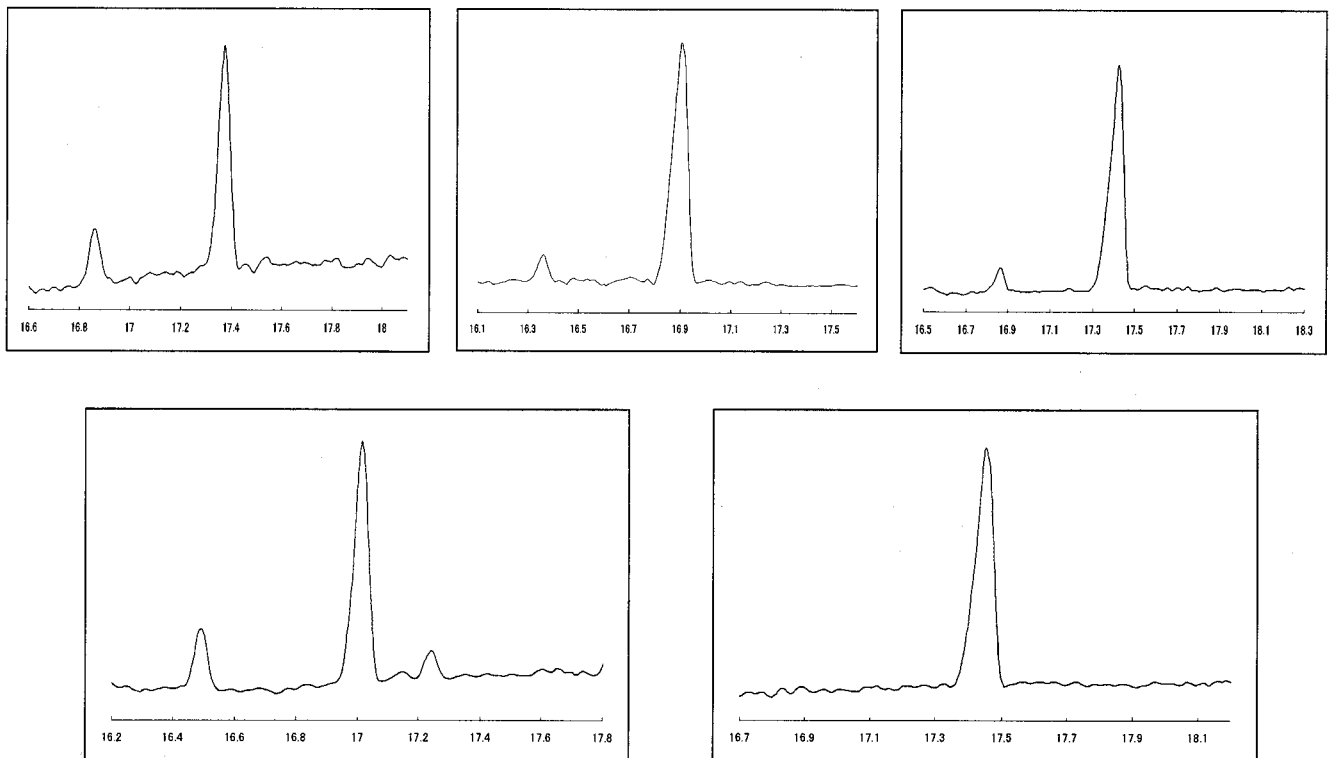


Fig.9 Electropherograms of various natural cheese suspensions.

られる。その場合縮合りん酸イオンのピークが存在しないため、「とろけるスライスチーズ」とナチュラルチーズのエレクトロフェログラムの間に、差異は認められない。

4. 要 約

今回キャピラリー電気泳動法による分析で、バッファー、キ

ャピラリーの長さ、電圧といった条件を最適化することにより、チーズ由来の他の成分と区別できる形で縮合りん酸塩を検出した。また、その最適化した条件において、大部分のプロセスチーズで縮合りん酸イオンのピークを検出し、その結果ナチュラルチーズとは異なるエレクトロフェログラムを得た。

文 献

- 1) 山内邦夫, 横山健吉編集: “ミルク総合事典” (1992), (朝倉書店) .
- 2) 本田進, 寺田茂編: “キャピラリー電気泳動 基礎と実際” (1995), (講談社サイエンティフィク) .
- 3) キャピラリー電気泳動用分析キット取扱説明書 (有機酸, 無機陰イオン, めっき液, 糖), (横河アナリティカルシステムズ株式会社)