

キャピラリー電気泳動によるチーズ中のポリリン酸塩の定性及び くえん酸塩の定量分析法について

馬越 秀一*, 小川 浩史*, 松本 啓嗣*

Capillary Electrophoresis Qualitative Analysis of Polyphosphate and Quantitative Analysis of Citric Acid in Cheese

UMAKOSHI Shuichi*, OGAWA hirofumi* and MATSUMOTO Yoshitsugu*

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

This study concerns the qualitative analysis of polyphosphate (PP) and quantitative analysis of citric acid (CA) in cheese using CE. Processed cheese has higher tariffs than natural cheese. Distinguishing between natural and processed cheese is important in the correct and fair imposition of tariffs. Processed cheese has added monophosphate, PP and CA as emulsifiers. On the other hand, natural cheese contains phosphoric acid and CA which bind with calcium from milk protein that does not contain PP. Therefore, if PP is found in the sample analysis, it is considered as processed cheese. Identification can be made by the amount of citric acid present in the cheese. Currently, in the PP analysis, PP is separated by paper chromatography and the color of PP is developed using a color-developing agent; however, the process is time-consuming. We have previously considered the analysis of PP by CE, but the separation of the peaks of CA and PA is incomplete and it is not possible to quantify the CA. Therefore, when the adjustment method for the test solution was examined, PP and CA could be optimally separated. In addition, when the cheese was analyzed, it was found that the 2 types of cheese could be easily classified by performing a quantitative analysis method for lactose.

1. 緒 言

関税率表第 04.06 項に分類されるチーズは、プロセスチーズかその他のチーズかにより号の分類が異なり、プロセスチーズは他のチーズと比較して高い関税率が設定されているため、両者を識別することは関税分類において非常に有用となる。

プロセスチーズはナチュラルチーズ（乳及び乳製品の成分規格等に関する省令に定めるもの）等を原料に、乳化剤を加えて加熱・溶解させてから冷やして固めたチーズで、乳化剤として、くえん酸（以下「CA」という。）塩、オルトリん酸（以下「OP」という。）塩及びポリリン酸（以下「PP」という。）塩が一般的に使用される¹⁾。これらは、単独で使用されることはまれで、一般的に複数を配合し使用される。また、これらのうち OP 及び CA は、ナチュラルチーズ中にも乳たんぱく質とカルシウムを介して結合した状態で含まれているが、PP は含まれていない。このため、分析試料に PP の存在が確認されれば、プロセスチーズであると判断することができ、PP の存在を確認できない場合でも、一般的なナチュラルチーズの CA と乳糖の比が 0.04 度程とされている²⁾ので、チーズ中の CA 量を参考にプロセスチーズと判断することもある。

税関におけるチーズ中の PP の定性分析では、ペーパークロマトグラフィーにより分離し、その後発色剤を用いて発色させることにより、OP、ピロリン酸（以下「P2」という。）及びトリボリリン

酸（以下「P3」という。）の同定を行っている。しかし、ペーパークロマトグラフィーによる分離に先立ち、脱脂、除たんぱく操作といった前処理を必要とし、操作が煩雑で、発色させるために長時間を要する。また、CA の定量分析では、抽出した CA を無水酢酸及びピリジンと反応させ、生成物の紫外吸光度から定量するものであり、これは国際酪農連盟が定めるスタンダードの一つである IDF34B（1971 年制定）を参照したものであるが、この方法は 1992 年に廃止されている。その際、代替法として制定されたのが、酵素法によるチーズ中のくえん酸の定量分析法である IDF34C であり、これが 2006 年に IDF34 となり、現在も有効な分析法である。しかし、この IDF スタンダードの変更に伴う税關での分析法の改定は行われていない。さらに、吉武らは IDF34B の方法についての問題点を報告し、改良法を提案している³⁾。

このように、PP の定性分析と CA の定量分析の双方に改善すべき課題が存在するうえに、両者は全く異なる分析法であるため、試料検液の調製から別個に行い、多種の試薬を調製する必要がある等、業務上の負担が大きい。

本研究では、PP の定性分析及び CA の定量分析を高速かつ高精度に行うために、キャピラリー電気泳動（CE）による同時分析を試みた。元来は CE による PP の分析を検討している⁴⁾が、CA と P2 のピークの分離が不完全であること等により、この方法では CA の定量分析を行うことができない。そこで、泳動液や検液調製法を検討し、市販のチーズを分析したところ、いくつかの知見が得

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

られたので報告する。

2. 実験

2.1 試料及び試薬

2.1.1 試薬

ピロりん酸ナトリウム(無水)(純正化学), トリポリりん酸ナトリウム, くえん酸一水和物, トリクロロ酢酸(以下「TCA」という.), 酒石酸, コハク酸, マレイン酸, フマル酸(以上, 富士フィルムと光純薬), マロン酸(以下「MA」という.), 2,6-Pyridinedicarboxylic acid(以上, 東京化成), n-Hexadecyltrimethylammonium solution 10 wt.% in H₂O (merck)

2.1.2 試料

市販ナチュラルチーズ7種類

市販プロセスチーズ10種類

2.1.3 試液

- ・4%TCA水溶液:TCA 4gに蒸留水100mlを加えた.
- ・8%TCA水溶液:TCA 8gに蒸留水100mlを加えた.
- ・4%TCA水溶液(内標準含有):2.3.1で決定した内標準物質50mgに4%TCA水溶液を加え, 100mlに定容した.
- ・8%TCA水溶液(内標準含有):2.3.1で決定した内標準物質50mgに4%TCA水溶液を加え, 100mlに定容した.

2.2 装置及び測定条件

装置 : Agilent7100 (Agilent社製)

キャビラリー : 標準フューズドシリカキャビラリー
75 μm I.D. × 72cm

泳動液 : 20 m mol/L 2,6-pyridinedicarboxylic acid
0.5 m mol/L n-hexadecyltrimethylammonium hydroxide (1N NaOHでpHを調整)

試料注入法 : 加圧法(50 mbar)

印加電圧 : -30 kV

キャビラリー温度 : 18°C

検出器 : Diode-array

検出波長 : signal 350 nm, reference 275 nm

2.3 実験方法

2.3.1 内標準物質及び分離条件の検討

2.3.1 (1) 内標準物質の検討

内標準物質の候補として, 酒石酸, コハク酸, マレイン酸, フマル酸及びMAを検討することとし, それぞれ0.1 mg/ml水溶液を調製した. この溶液に, 等量の0.1 N NaOHを加えたものを検液とし, 同濃度のP2, P3及びCAの水溶液と共に測定し, ピークの分離が可能か確認した. ここで, ピークの分離を確認した物質について, 下記2.3.1(2)の試験を実施した.

2.3.1 (2) 標準P2, P3及びCAを用いた分離条件の検討

100ml容メスフラスコにP2, P3, CA及び上記2.3.1(1)において分離を確認した物質を各10 mg量り取り, 水で定容した. この溶液に, 等量の0.1 N NaOHを加えたものを検液とした. これを, pH3.5~5.5の範囲で0.5毎に変化させた泳動液を使用して測定

し, 各成分の泳動時間を比較することにより, 最適な分離条件及び内標準物質を検討した.

2.3.2 抽出条件の検討

2.3.2 (1) ジエチルエーテル洗浄の効果の確認

プロセスチーズ200 mgを量り取り, 4%TCA水溶液を1 ml加え粉碎器で粉碎し, 懸濁液を遠沈管に移し入れてから, 4%TCA水溶液(内標準含有)を9 ml追加した. これを遠心分離(3000 rpm, 10 min)し得られた上清に, 等量の0.1 N NaOHを加えたものを検液とした. また, 検液からTCAを除去するため, 上記と同様に操作し得られた上清をジエチルエーテルで2回洗浄した後, 等量の0.1 N NaOHを加えた検液も調製した. これらを測定し, 結果を比較することにより, ジエチルエーテル洗浄の効果を確認した. なお, これ以降の実験においては, pH4.8に調整した泳動液を使用した.

2.3.2 (2) 検量線の作成

内標準物質を200 μg/mlの濃度で含むCA水溶液(濃度10, 20, 40, 100, 200, 400, 1000 μg/ml)を調製した. この水溶液1mlと8%TCA水溶液1mlを混合し, ジエチルエーテルで2回洗浄した後, 等量の0.1 N NaOHを加えたものを検量線用の検液とした. これらの検量線用の検液を, 測定の繰り返し回数を3回として測定し, 検量線を作成した. このとき得られた面積値の変動係数及び作成した検量線の相関係数を算出した.

2.3.2 (3) 適切なTCA水溶液使用量の検討

細切したプロセスチーズ(PPを含有するもの)2 gをホモナイザーに量り取り, 一定量の内標準物質を含む4%TCA水溶液を正確に10 ml加え, ホモナイザーで粉碎し, 懸濁液を三角フラスコに移し入れてから, 4%TCA水溶液を加えた. これを遠心分離(3000 rpm, 10 min, 20°C)し, 得られた上清を等量のジエチルエーテルで2回洗浄した後, 等量の0.1 N NaOHを加えたものを検液とした. このとき, 4%TCA水溶液に含まれる内標準物質の量がTable 1に示すとおりの3種類の懸濁液を調製し, ホモナイズ後に加える4%TCA水溶液量もTable 1のとおりとした. これにより, 検液中の内標準物質濃度はいずれも10 μg/mlとなる. これら3種類の検液を測定し, 2.3.2 (2)で作成した検量線から試料中のCA含有量を算出し, 適切なTCA使用量の検討を行った. なお, 測定の繰り返し回数はすべて3回とした.

Table 1 Amount of TCA solution for 2 g of processed cheese

4% TCA containing Internal Standard used for extraction (ml)	10	10	10
Concentration of Internal Standard (μg/ml)	1000	500	300
4% TCA used after extraction (ml)	90	40	20
Total 4% TCA (ml)	100	50	30

2.3.3 チーズを用いた添加回収試験

細切したCAを殆ど含まないチーズ2 gを量り取り, 4000 μg/mlのCA水溶液5 ml及び8%TCA水溶液(内標準含有)5 mlを正確に加え, ホモナイズした. この懸濁液を遠沈管に移し入れてから, 追加で4%TCA水溶液を40 ml加えた. これを遠心分離(3000 rpm, 10 min, 20°C)し, 得られた上清を等量のジエチルエーテルで2回洗浄した後, 等量の0.1 N NaOHを加えたものを検液とした. これを測定し, 検量線を用いて回収率を算出した.

rpm, 10 min, 20°C) し, 得られた上清をジエチルエーテルで 2 回洗浄した後, 等量の 0.1 N NaOH を加えたものを検液とした。これを測定し, 2.3.2 (2) で作成した検量線から試料中の CA 含有量を算出し, 実際の CA 添加量に対する CA 定量値の割合として回収率を算出した。なお, 測定の繰り返し回数はすべて 3 回とした。

2.3.4 各種チーズの分析

2.3.4 (1) チーズ中の P2, P3 及び CA の定性試験

チーズ 200mg を量り取り, 4% TCA 水溶液を 1 ml 加え粉碎器で粉碎し, この懸濁液を遠沈管に移し入れてから, 追加で 4% TCA 水溶液を 4 ml 加えた。これを遠心分離 (3000 rpm, 10 min) し, 得られた上清をジエチルエーテルで 2 回洗浄した後, 等量の 0.1 N NaOH を加えたものを検液とした。これを測定し, P2, P3 及び CA のピークの有無を確認した。

2.3.4 (2) チーズ中の CA 定量試験

細切したチーズ 2 g を量り取り, 500 μg/ml の濃度で内標準物質を含む 4% TCA 水溶液を正確に 10 ml 加え, ホモジナイズした。この懸濁液を遠沈管に移し入れてから, 追加で 4% TCA 水溶液を 40 ml 加えた。これを遠心分離 (3000 rpm, 10 min, 20°C) し, 得られた上清をジエチルエーテルで 2 回洗浄した後, 等量の 0.1 N NaOH を加えたものを検液とした。これを測定し, 2.3.2 (2) で作成した検量線から試料中の CA 含有量を算出した。なお, 測定の繰り返し回数はすべて 3 回とした。

3. 結果及び考察

3.1 内標準物質及び分離条件の検討

3.1.1 内標準物質の検討

2.3.1 (1) で調製した各試料溶液を CE に導入し, 50 μm × 104 cm キャピラリーを使用して, pH 5.0 に調整した泳動液を使用して測定したところ, 酒石酸, マレイン酸及びフマル酸は測定対象化合物である P2, P3 又は CA のピークと近接し, コハク酸は CA の後の巨大なピークの直後に検出されたが, MA は分離して検出することができた。2.2 の装置に下記 3.1.2 で決定した分離条件である pH 4.8 の泳動液を使用して測定し, 得られたエレクトロフェログラムを Fig. 1 に示す。

以上から, MA のみを 2.3.1(2) の試験に供することとした。

3.1.2 標準 P2, P3 及び CA を用いた分離条件の検討

今回の研究では, キャピラリー電気泳動技術の一つであるキャピラリーゾーン電気泳動を利用して, キャピラリーゾーン電気泳動における分析対象イオンの移動度は, 泳動液の pH 等に依存する。今回, 最適な分離条件を検討するため, 泳動液の各 pH における P2, P3, MA 及び CA の泳動時間, ピーク形状等について比較した。なお, 泳動液については, 2,6-pyridinedicarboxylic acid 及び第 4 級アンモニウム塩である n-hexadecyltrimethylammonium を用いる, 有機酸の定量分析法についての Soga らの報告⁵⁾を参考にした。

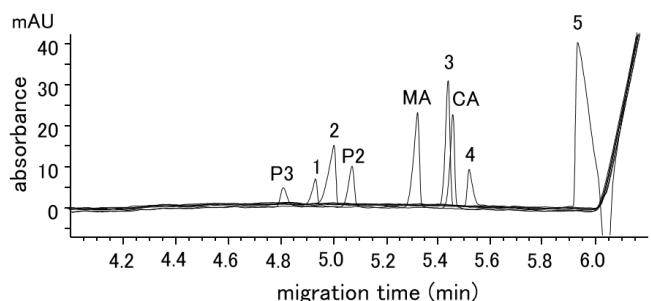


Fig. 1 Electropherograms of Pyrophosphate (P2), Tripolyphosphate (P3), Citrate (CA) and candidate internal standard: 1 = fumaric acid, 2 = tartaric acid, MA = malonic acid, 3 = malic acid, 4 = maleic acid, 5 = succinic acid

3.1.2 標準 P2, P3 及び CA を用いた分離条件の検討

今回の研究では, キャピラリー電気泳動技術の一つであるキャピラリーゾーン電気泳動を利用して, キャピラリーゾーン電気泳動における分析対象イオンの移動度は, 泳動液の pH 等に依存する。今回, 最適な分離条件を検討するため, 泳動液の各 pH における P2, P3, MA 及び CA の泳動時間, ピーク形状等について比較した。なお, 泳動液については, 2,6-pyridinedicarboxylic acid 及び第 4 級アンモニウム塩である n-hexadecyltrimethylammonium を用いる, 有機酸の定量分析法についての Soga らの報告⁵⁾を参考にした。

2.3.1 (2) で調製した検液を CE に導入し, 得られた P2, P3, MA 及び CA の泳動時間を Fig. 2 に示す。CA については, pH を高くすると泳動時間は短くなる傾向にある。一方, P2 及び P3 については, pH を高くすると泳動時間が長くなる傾向があり, pH 4.0 以下では両者の分離が困難であった。また, MA については, pH 3.5 ~ 4.6 の範囲内では泳動時間が長くなる傾向にあるが, pH 4.6 以上の領域では短くなる傾向があり, pH 5.1 で CA とピークが重なる。次に, pH 4.5 ~ 5.0 まで 0.1 每に変化させた泳動液によるエレクトロフェログラムを Fig. 3 に示す。CA は定量分析を行う必要があり, 他のピークとの分離だけでなく, ピーク形状も重要となるが, pH が高くなるにつれ, 次第にリーディングが大きくなる傾向にある。また, MA については, 低領域 pH ではリーディングする傾向にある。これらのこと踏まえて, 本研究で使用する泳動液の pH は, それぞれの成分ピークの分離が良好で, かつ CA 及び MA の双方のピーク形状が比較的良好な pH 4.8 に決定した。

以上により pH 4.8において, MA はピーク形状が比較的良好かつ, ピークの分離が良好であり, さらに食品添加物として認可されていないためにチーズ中に存在している可能性が低いことから, MA を内標準物質として決定した。

なお, 参考までに, OP のピークは, pH 4.8 の泳動液を使用した場合は検出することができなかったため, 今回の条件で P2, P3 及び CA と同時に分析することはできない。

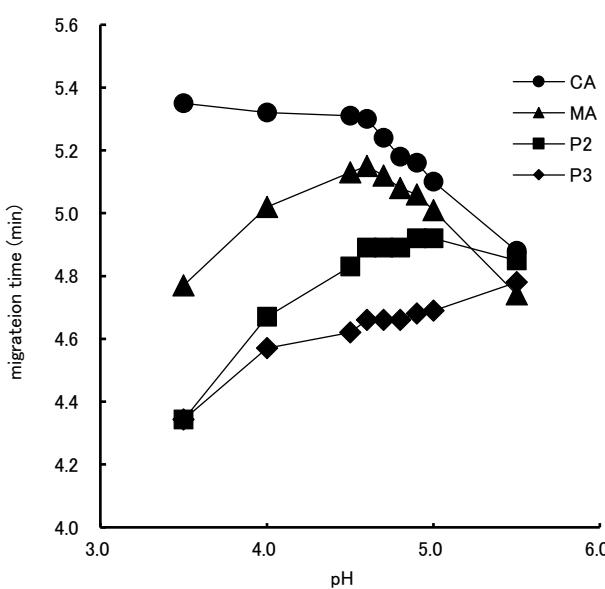
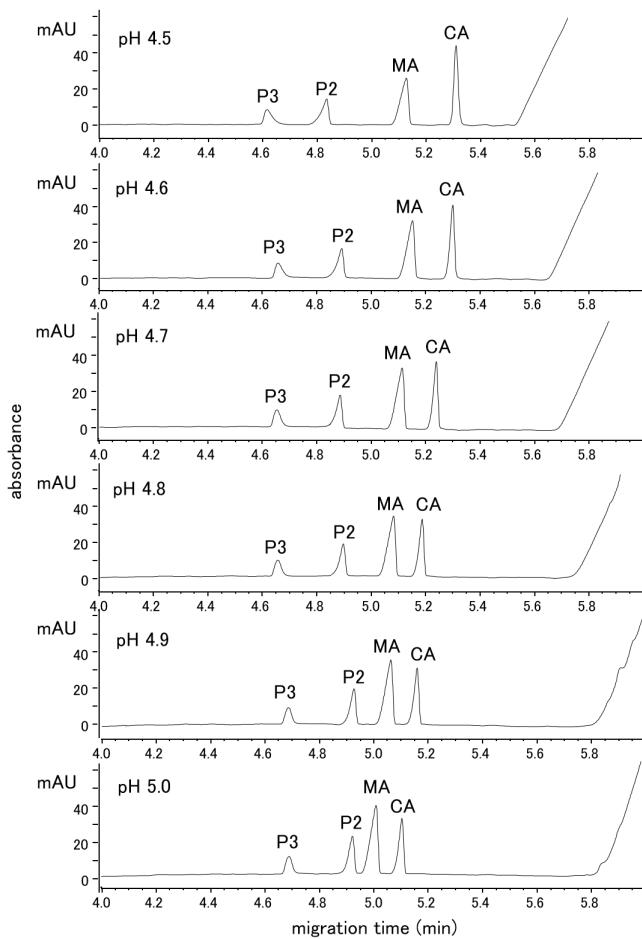


Fig. 2 Effect of electrolyte pH on migration time of P2, P3, CA and MA

Fig. 3 Effect of electrolyte pH on P2, P3, citric acid, malonic acid Peaks
(100 mg/ml each)

3.2 抽出条件の検討

3.2.1 ジエチルエーテル洗浄の効果の確認

プロセスチーズに添加されたPP及びCAは、カゼインに結合しているカルシウムと塩を形成（その結果、カゼインは水に溶解しやすくなり、溶解したカゼインが脂肪を乳化させる）することが知られており⁹、水溶性をほとんど有さないため、定量分析が必要なCAの抽出には、IDF34等を参考に、TCAを使用することとした。

2.3.2 (1) で、遠心分離により得られた上清をジエチルエーテルで洗浄せずに調製した検液をCEに導入し、pH4.8の泳動液を使用して得られたエレクトロフェログラムをFig. 4に示す。異常な形状のピークを検出したものの、P2, P3, MA及びCAと同定することができるピークを、Fig. 3と同一の泳動時間に検出することができなかった。原因として、TCAを抽出溶媒に使用することにより、①検液が酸性となり分析対象成分がイオン化されてなかったこと、②検液の電気伝導度が高すぎたこと、等が考えられる。

そこで、遠心分離により得られた上清をジエチルエーテルで洗浄し、大部分のTCAを除去することにより、P2, P3, MA及びCAを検出することができるか確認した。2.3.2 (1) に従い、遠心分離により得られた上清をジエチルエーテルで洗浄して調製した検液をCEに導入し、得られたエレクトロフェログラムをFig. 5に示す。抽出液をジエチルエーテルで洗浄することにより、P2, P3, MA及びCAのピークを、Fig. 3と同様に分離・検出することができた。

以上により、TCA水溶液により抽出したチーズ中のPP及びCAをCEにより分析するには、抽出液をジエチルエーテルで洗浄する必要があることが判明した。

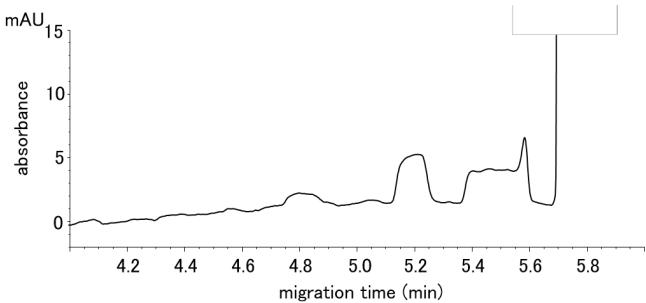


Fig. 4 Electropherograms of TCA extract of unwashed cheese

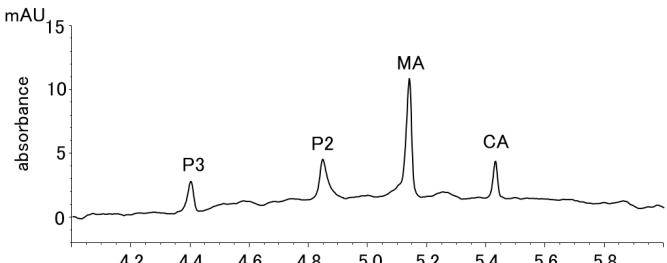


Fig. 5 Electropherograms of TCA extract of cheese washed with diethyl ether

3.2.2 検量線の作成

2.3.2(2)で調製した検量線用の検液を用いて作成した検量線をFig. 6に示す。相関係数0.9998で原点付近を通る良好な直線性を示した。また各CA濃度におけるピーク面積値の変動係数をTable 2に示す。CAの濃度が2.5 µg/mlの場合に、他の濃度と比較して変動係数が高くなった。従って、5~250 µg/mlの範囲でチーズ中のCA定量を行うことが望ましいと考えられる。

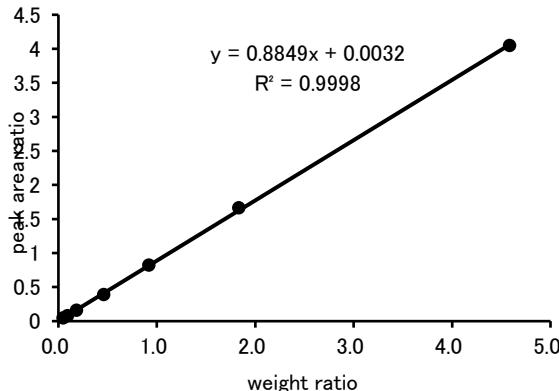


Fig. 6 Calibration curve of CA in the solutions range of solution

Table 2 Effect of varying CA concentrations and coefficient of Variation of CA area (n=3)

Concentration of CA (µg/ml)	2.5	5	10	25	50	100	250
Coefficient of Variation of CA area (%)	20.36	3.06	2.17	0.98	1.92	0.16	0.86

3.2.3 適切なTCA水溶液使用量の検討

TCAは3.2.1のとおり、ジエチルエーテル洗浄により取り除く必要があるため、チーズ中のPP及びCAの抽出時に使用するTCAの総量がなるべく少ない方が望ましいが、少なすぎるとチーズ中のPP及びCAが十分に抽出できないおそれがある。また、抽出に用いる液量が少ない方が、検液中のCA濃度が高くなるため測定に有利である一方で、TCA濃度を濃くした場合、PPが分解する可能性がある⁵⁾。IDF34の規定では、チーズ中のCAを抽出する際に3.3%のTCAを使用（チーズ1g対し、12.2 mmolのTCA）しているため、今回、4%のTCA水溶液を抽出溶媒として使用することとし、2.3.2(3)のとおりチーズに加えるTCA水溶液量を変化させ、得られたCA含有量を比較することにより、TCA水溶液量を減少させても適切に抽出されているか確認した。なお、4%TCA水溶液を100 ml用いて抽出した場合、チーズ1 gに対するTCAの総量はIDF34と同値となる。得られた測定値をTable 3に、エレクトロフェログラムをFig. 7に示す。いずれのTCA水溶液量においてもチーズ中のCA濃度がほぼ同値であったため、30 mlにおいても十分CAが抽出できることを確認した。一方、分析試料のCA濃度が今回測定したものよりも高い場合、Fig. 7のとおりCAのピーク幅が増大することにより分離度が更に低下し、加えて、CAが抽出溶液に溶けきれない可能性も考えられる。そこで、抽出に用いる最適なTCA水溶液量を50 mlとした。

Table 3 Relationship between the amount of TCA solution and the measured concentration of CA

Amount of TCA (ml)	Test sample number	Amount of CA (µg/g)	Coefficient of Variation (%) n=3
100ml	1	5.18	2.00
	2	5.01	0.97
	3	4.99	1.25
	4	5.16	0.08
	5	4.99	1.40
	mean	5.07	-
	CV (%)	1.69	-
50ml	1	5.16	2.65
	2	4.99	2.00
	3	5.40	1.78
	4	5.17	3.51
	5	5.10	3.02
	mean	5.16	-
	CV (%)	2.59	-
30ml	1	5.21	1.12
	2	5.32	1.12
	3	5.02	2.96
	4	4.93	1.01
	5	4.92	1.04
	mean	5.08	-
	CV (%)	3.14	-

CV: Coefficient of Variation

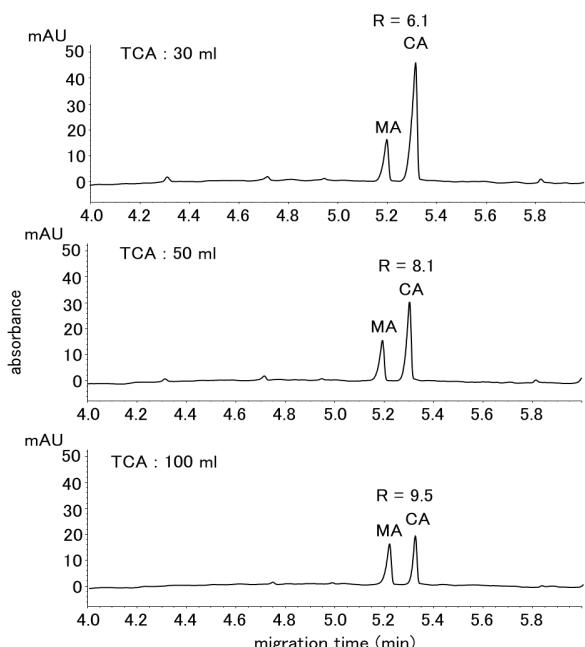


Fig. 7 Effect of varying TCA extract concentrations in Electropherograms
R: Resolution

3.3 チーズを用いた添加回収試験

2.3.3 に従い、下記 3.4 でくえん酸のピークを検出しなかったナチュラルチーズ G を使用した添加回収試験の結果を Table 4 に示す。回収率は 97.6 % から 104.6% で、5 検体の平均が 101.8 % となり、良好な回収率が得られた。

Table 4 Results of the recovery rate of natural cheese

	Added ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Found ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Coefficient of Variation (%) $n=3$	Recovery (%)
1	183.4	179.0	0.70	97.6
2		186.5	0.83	101.7
3		191.9	0.33	104.6
4		189.2	1.29	103.1
5		186.6	0.72	101.8
mean		186.6	-	101.8
CV (%)		2.30	-	2.30

CV: Coefficient of Variation

3.4 各種チーズの分析

3.4.1 チーズ中の P2, P3 及び CA の定性試験

検体として用意した各種市販チーズについて、2.3.4(1)に従って調製した検液を CE に導入し、得られたエレクトロフェログラムを Fig. 8-1~8-2 に示す。

Fig. 8-1 に示すとおり、ナチュラルチーズ A～C では CA のピークが検出され、ナチュラルチーズ D～G では CA のピークは非常に微弱であった。また、いずれのナチュラルチーズにおいても P2 及び P3 のピークは検出されなかった。

Fig. 8-2 に示すとおり、プロセスチーズ A～F では、CA のピークに加え P2, P3 のピークが検出され、プロセスチーズ G では、CA のピークに加え、P2 のピークが検出された。これらのプロセスチーズは、ナチュラルチーズと比較して、エレクトロフェログラムに明らかな差異を確認でき、ナチュラルチーズと識別可能であった。

プロセスチーズ H～J では、P2, P3 のピークは検出されず、CA のピークのみが検出された。これらのプロセスチーズでは、ナチュラルチーズと比較して CA のピーク面積は増大しているものの、ナチュラルチーズの成分組成も多様であるため、エレクトロフェログラムに差異があるとは判断できず、ナチュラルチーズと識別することは困難であった。なお、これらのプロセスチーズは「とろけるチーズ」と称する商品であり、乳化剤として PP を使用せずに CA を使用しているものと考えられる¹⁾。そこで、これらについては、3.4.2 で CA の定量試験を試みた。

なお、いずれのチーズからも MA のピークが検出される泳動時間 5.2 分付近にピークは検出されなかったことから、MA を内標準物質にしても問題ないことを再確認することができた。また、測定毎に各成分の泳動時間に多少の変動がみられるうえ、P3 のピーク近傍に、ナチュラルチーズ由来のピークが検出されることか

ら、PP 及び CA を確実に同定するため、定性分析であっても内標準物質として MA を添加することにより、泳動時間を補正できるようになることが望ましいと考えられる。

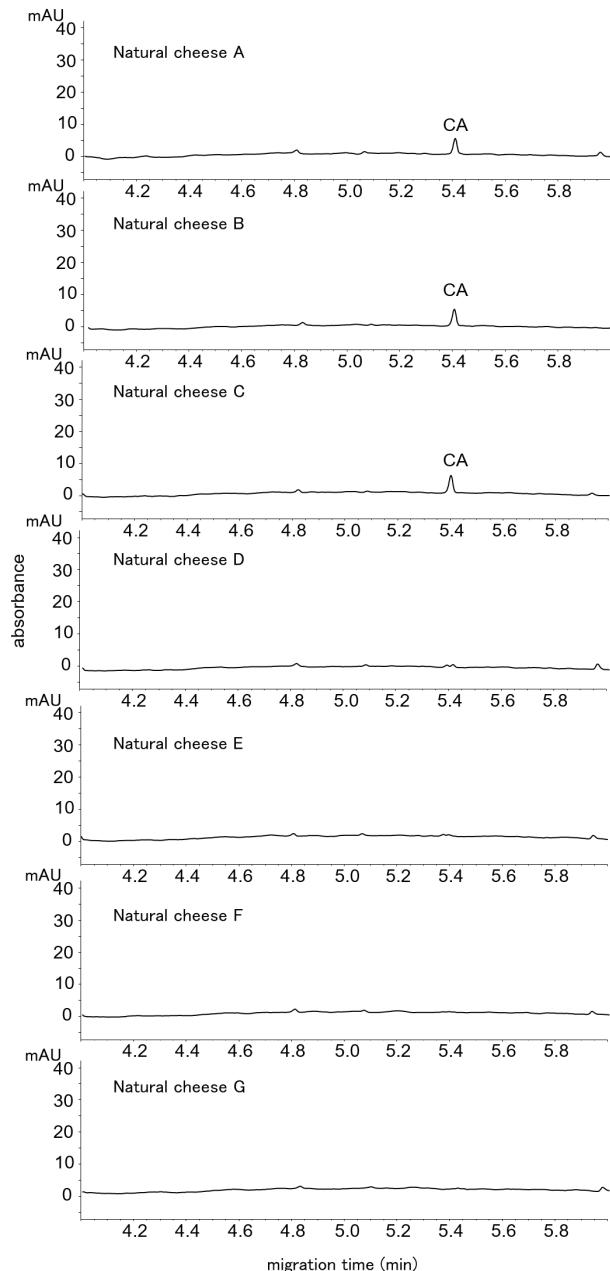


Fig. 8-1 Electropherograms of various natural cheese of suspensions

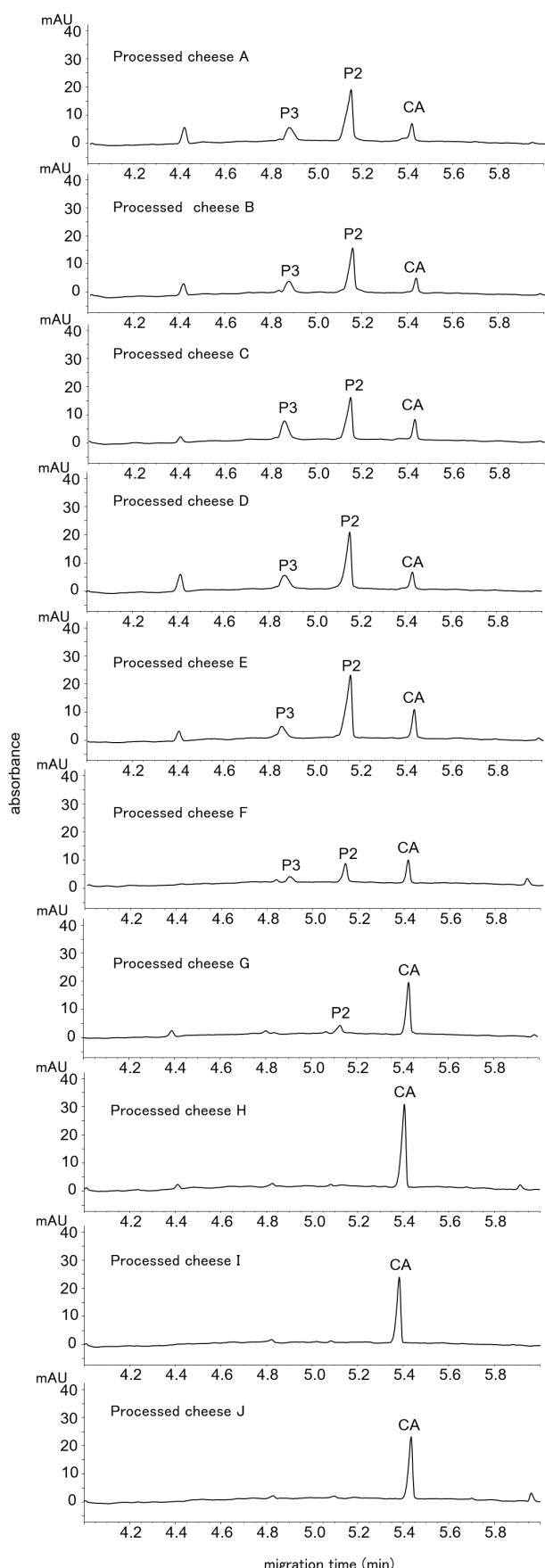


Fig. 8-2 Electropherograms of various processed cheese suspensions

Table 5 Results of the amount of CA in cheese

sample	Test sample number	Amount of CA ($\mu\text{g/g}$)	Coefficient of Variation (%) n=3
Natural cheese A	1	0.058	1.15
	2	0.060	7.34
	3	0.057	1.68
	4	0.055	2.35
	5	0.057	3.56
	mean	0.057	-
Processed cheese H	CV (%) n=5	3.320	-
	1	0.517	1.39
	2	0.531	2.06
	3	0.537	2.11
	4	0.533	1.05
	5	0.532	3.66
Processed cheese I	mean	0.530	-
	CV (%) n=5	1.297	-
	1	0.402	1.39
	2	0.416	2.06
	3	0.411	2.11
	4	0.419	1.05
Processed cheese J	5	0.430	3.66
	mean	0.415	-
	CV (%) n=5	2.236	-
	1	0.328	3.28
	2	0.328	3.77
	3	0.321	4.47
	4	0.312	1.52
	5	0.304	1.99
	mean	0.319	-
	CV (%) n=5	2.942	-

CV: Coefficient of Variation

3.4.2 チーズ中のCA定量試験

ナチュラルチーズA並びにプロセスチーズH,I及びJについて、2.3.4(2)に従って調製した検液をCEに導入し、得られたCAの定量結果をTable 5に示す。プロセスチーズH,I及びJはナチュラルチーズAに比べ、CAの含有量が5.6倍～9.3倍となり、両者間に明らかな差が見られた。一般的にプロセスチーズには、原料チーズに対して乳化剤が2～3%添加されている¹⁾ことから、乳化剤にPPを使用せずにCAを使用しているプロセスチーズでは、ナチュラルチーズと比較して多量のCAが検出されるものと考えられる。従って、このようなチーズを分析する場合は、今回の測定に加えて乳糖量を測定し、CAと乳糖の比が0.04を超えていることを確認することにより、ナチュラルチーズと識別可能であることが示唆された。

3.4.1 及び 3.4.2 の結果から、分析依頼されたチーズについて、まず P2 及び P3 の定性試験を行い、P2 及び P3 の存在が確認されれば分析試料がプロセスチーズと判断できる。次に、P2 及び P3 が検出されない場合には、CA 及び乳糖量を測定することにより、分析試料が、プロセスチーズであるかナチュラルチーズであるかを識別することが可能と考える。

4. 要 約

Soga らの報告にある分離条件を基に、キャビラリー電気泳動装

置による縮合りん酸及びくえん酸の最適な分離条件を検討したところ、泳動液の pH を 4.8 に調整した場合に、内標準物質として選択したマロン酸を含め最適に分離することができた。チーズの抽出に 4% トリクロロ酢酸水溶液を使用し、抽出液をジエチルエーテルで洗浄してトリクロロ酢酸を除去することにより、これらを正しく分離・検出すことができた。チーズを用いたくえん酸の添加回収試験においては、平均が 101.8 % となり、良好な回収率が得られた。以上の条件により 17 種の市販チーズを分析したところ、乳糖の定量分析法を実施することにより問題なく判別可能であることが示唆された。

文 献

- 1) NPO法人チーズプロフェッショナル協会：“チーズを科学する”， P.92 (2016), (幸書房).
- 2) ISO/TS 12082, Calculation of the content of added citrate emulsifying agents and acidifiers/pH-controlling agents, expressed as citric acid (2006).
- 3) 吉武充, 小石川常吉, 酒井洋子, 神林弘一, 染谷幸男：畜産試験場研究報告, **36**, 155 (1979).
- 4) 平元秀和, 井上純, 廣瀬達也, 川渕 哲：関税中央分析所報, **44**, 37 (2004).
- 5) T. Soga, G.A. Ross : *Journal of Chromatography A*, **767**, 223 (1997).
- 6) 松永明信, 山本 敦, 水上英一, 川崎賢一, 大泉 徹：日本食品工業学会誌, **37**, 20 (1990).