

23 カゼイン及びカゼインナトリウム

Casein and Sodium Caseinate

1. 試験法の概要

食品中のカゼイン及びカゼインナトリウムは比色法によりリンの量として定量する。カゼイン中には、ほぼ一定の割合でリンが含まれているので係数を乗じてカゼインの量とする。動物乳中には天然のカゼインが分布している。またタンパク性食品には天然のカゼイン様物質も分布している。したがって、検体中にこれらの食品を素材として含有する場合には、定量値は素材由来のカゼイン及びカゼイン様物質と添加されたものとの合計値である。

2. 試験法 (比色法)¹⁾

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。ただし検体は十分にホモジナイズして検体を微細均一化して試料とする。二酸化炭素を含む試料はあらかじめガスを追い出す。

(2) 試料液の調製

試料約 1g を精密に量り、遠心管に入れ、エタノール 20ml を加え、よくかき混ぜて 15 分間放置した後、遠心分離し、エタノール層を除去し、次にエタノール・クロロホルム混液 (3 : 1) 20ml を加え、よくかき混ぜて 15 分間放置し、遠心分離して液層を除去する。この混液による洗浄を 3~5 回繰り返した後、最後にエタノール 20ml で最初と同じ条件で 1 回残留物を洗浄する²⁾。次に、あらかじめ 4℃ 以下に冷却した過塩素酸溶液 (1 → 6) 20ml を加え、遠心管を氷水中に 30 分間保った後、20 分間遠心分離を行い、液層を除去する。残留物に過塩素酸溶液 (1 → 12) 20ml を加え、水浴中で加温し、よくかき混ぜ、遠心分離し、液層を再び除去する。

遠心管内の残留物をできるだけ少量の水及び過塩素酸 2ml でケルダールフラスコへ定量的に移し、沸石を入れ、必要あれば過酸化水素 5 滴を加え、セラミック板上で注意して加熱する。内容物の泡だちが消えた後は炎を小さくし、5~7 時間加熱する³⁾。冷後、水で全量 25ml とし、これを試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

リン酸一カリウムを105℃で3時間乾燥した後, その439.3mgを正確に量り, 水を加えて溶かし, 正確に1,000mlとする. この液5mlを正確に量り, 水を加えて正確に50mlとし, 標準液とする (この液1mlは, リン10 μ gを含む).

(4) 測定法

① 測定条件

分光光度計を用い, 波長720nmで吸光度を測定する.

② 検量線

25mlのメスフラスコ6本に標準液0.5, 1, 2, 4, 8ml及び15mlずつをそれぞれ正確に量り, それぞれに過塩素酸2mlと水を加えて約20mlとする. 次にアミドール液2ml及びモリブデン酸アンモニウム溶液1mlを加え, 更に水を加えて正確に25mlとし (これらの液1mlは, それぞれリン0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 μ g及び6 μ gを含む), よく混和した後, 5~30分間の間に波長720nmで吸光度を測定する. ただし, 対照液は水20ml, 過塩素酸2ml, アミドール液2ml及びモリブデン酸アンモニウム溶液1mlの混液を使用する. 横軸にリンの含量, 縦軸に吸光度をとり, 検量線を作成する.

⑤ 定量

25mlのメスフラスコに試料液20mlを正確に採り, アミドール液2ml及びモリブデン酸アンモニウム溶液1mlを加えた後, 水を加えて正確に25mlとする. よく混和した後, 5~30分間の間にこの液につき, 波長720nmで検量線の作成で用いた対照液を対照として吸光度を測定し, 得られた吸光度と検量線から試料液中のリン濃度 (μ g/ml) を求め, 次式⁴⁾によって検体中のカゼイン含量 (g/kg) を求める.

$$\text{カゼイン含量 (g/kg)} = \frac{C}{W} \times 25 \times \frac{25}{20} \times \frac{1}{1,000} \times \frac{10,000}{65}$$

C: 試料液中のリン濃度 (μ g/ml)

W: 試料の採取量 (g)

$\frac{10,000}{65}$: カゼイン中のリン含有量は0.65%であるので, リン含有量からカゼイン含有量への換算値

試薬・試液

1. アミドール: 市販品を用いる.
2. アミドール液: アミドール1.0g及びメタ重亜硫酸ナトリウム18.3gに水を加えて溶かし,

- 1,000mlとする。褐色瓶に保存し、4日間は使用可能である。
3. エタノール：[95v/v%，特級]
 4. 過塩素酸：[60%，特級]
 5. 過酸化水素水：[30%，特級]
 6. クロロホルム：[特級]
 7. メタ重亜硫酸ナトリウム：市販品を用いる
 8. モリブデン酸アンモニウム：[特級]
 9. モリブデン酸アンモニウム溶液：モリブデン酸アンモニウム 8.3g を量り，水を加えて溶かし，100mlとする。
 10. リン酸一カリウム：[特級]

[注]

- 1) エタノール及びエタノール・クロロホルム混液でリン脂質を反復抽出した後，酸可溶性のリン酸結合物を過塩素酸溶液（1→6）で冷却抽出する。次に90℃の過塩素酸溶液（1→12）で核酸類を抽出する。ここで残った不溶性物質は動物繊維及びリントタンパク質（カゼイン）のみを含む。両者を過塩素酸で灰化し，灰化物中のリン含量をAllen法で測定する。リントタンパク質の定量には，水酸化ナトリウム溶液処理によるリン酸結合の開裂を避け，過塩素酸分解を採用した。
- 2) 非常に脂肪の多い試料，たとえばレバーや脳みそを使った食肉加工品では，リン脂質の量が多いので5～6回アルコールで抽出する。
- 3) 分解灰化は通常5～6時間で終了する。分解がどうしてもうまく進まない場合には，更に促進剤として4～6滴の過酸化水素水を追加してもよい。この際にはいったん，フラスコをセラミック板より持ち上げ，約2分後に器壁に沿って過酸化水素水を添加し，更に加熱する。
- 4) 試料液のリン濃度が $6\mu\text{g/ml}$ （カゼインとして2.3%）以上になるときは，試料液の残り（5ml）の2mlを正確に量り，定量に用い，得られた結果を12.5倍にしてリン含量とする。なお，この方法は食肉製品等では類似物質のために0.1～0.23%のブランク値を示す。