

## 別添 栄養成分等の分析方法等

通則	1
1 たんぱく質	3
(1) 窒素定量換算法	3
1) ケルダール法	4
2) 燃焼法	6
2 脂質	7
(1) エーテル抽出法	7
(2) クロロホルム・メタノール混液抽出法	9
(3) ゲルベル法	10
(4) 酸分解法	11
(5) レーゼゴットリーブ法	13
3 飽和脂肪酸及び不飽和脂肪酸	14
(1) ガスクロマトグラフ法	14
1) 脂質の抽出Ⅰ（けん化法）	15
2) 脂質の抽出Ⅱ（酸分解法）	16
3) 脂肪酸メチルエステルの調製	17
4) ガスクロマトグラフィー	17
4 コレステロール	19
(1) ガスクロマトグラフ法	19
5 炭水化物	22
ア 灰分	22
(1) 酢酸マグネシウム添加灰化法	23
(2) 直接灰化法	23
(3) 硫酸添加灰化法	25
イ 水分	26
(1) カールフィッシャー法	26
(2) 乾燥助剤法	29
(3) 減圧加熱乾燥法	30
(4) 常圧加熱乾燥法	31
(5) プラスチックフィルム法	33

6	糖質	34
7	糖類	35
	(1) ガスクロマトグラフ法	35
	(2) 高速液体クロマトグラフ法	37
	1) 単糖類、二糖類及びオリゴ糖類	37
	2) 糖アルコール類	40
8	食物繊維	42
	(1) プロスキー法 (酵素-重量法)	43
	(2) 高速液体クロマトグラフ法 (酵素-HPLC 法)	47
9	亜鉛	51
	(1) 原子吸光光度法	51
	(2) キレート抽出-原子吸光光度法	52
	(3) 誘導結合プラズマ発光分析法	53
10	カリウム	54
	(1) 原子吸光光度法 (灰化法)	54
	(2) 原子吸光光度法 (塩酸抽出法)	55
	(3) 誘導結合プラズマ発光分析法	56
11	カルシウム	57
	(1) 過マンガン酸カリウム容量法	57
	(2) 原子吸光光度法	58
	(3) 誘導結合プラズマ発光分析法	59
12	クロム	60
	(1) キレート抽出-原子吸光光度法	60
	(2) 誘導結合プラズマ発光分析法	62
13	セレン	63
	(1) 蛍光光度法	63
	(2) 水素化物 - 原子吸光光度法	65
14	鉄	66
	(1) オルトフェナントロリン吸光光度法	66
	(2) 原子吸光光度法	67
	(3) 誘導結合プラズマ発光分析法	68

15	銅	69
	(1) 原子吸光光度法	69
	(2) キレート抽出-原子吸光光度法	70
	(3) 誘導結合プラズマ発光分析法	71
16	ナトリウム (食塩相当量)	72
	(1) 原子吸光光度法 (灰化法)	73
	(2) 原子吸光光度法 (塩酸抽出法)	73
	(3) 誘導結合プラズマ発光分析法	74
17	マグネシウム	75
	(1) 原子吸光光度法	75
	(2) 誘導結合プラズマ発光分析法	76
18	マンガン	78
	(1) 原子吸光光度法	78
	(2) キレート抽出-原子吸光光度法	79
	(3) 誘導結合プラズマ発光分析法	80
19	モリブデン	81
	(1) 誘導結合プラズマ質量分析法	81
	(2) 誘導結合プラズマ発光分析法	83
20	ヨウ素	85
	(1) 滴定法	85
	(2) ガスクロマトグラフ法	86
21	リン	87
	(1) バナドモリブデン酸吸光光度法	87
	(2) モリブデンブルー吸光光度法	89
	(3) 誘導結合プラズマ発光分析法	90
22	ナイアシン (ナイアシン当量として)	91
	ア ニコチン酸及びニコチン酸アミド	92
	(1) 高速液体クロマトグラフ法	92
	(2) 微生物学的定量法	93
	イ トリプトファン	95

	(1) 高速液体クロマトグラフ法 .....	95
23	パントテン酸 .....	96
	(1) 微生物学的定量法 .....	96
24	ビオチン .....	100
	(1) 微生物学的定量法 .....	100
25	ビタミンA (レチノール活性当量として) .....	102
	ア レチノール (ビタミンAアルコール) .....	103
	(1) 高速液体クロマトグラフ法 .....	103
	イ カロテン .....	106
	(1) 吸光光度法：総カロテン .....	106
	(2) 高速液体クロマトグラフ法： $\alpha$ -カロテン、 $\beta$ -カロテン ....	107
26	ビタミンB <sub>1</sub> .....	110
	(1) 高速液体クロマトグラフ法 .....	111
	(2) チオクローム法 .....	113
27	ビタミンB <sub>2</sub> .....	115
	(1) 高速液体クロマトグラフ法 .....	115
	(2) ルミフラビン法 .....	117
28	ビタミンB <sub>6</sub> .....	118
	(1) 微生物学的定量法 .....	118
29	ビタミンB <sub>12</sub> .....	121
	(1) 微生物学的定量法 .....	121
30	ビタミンC.....	123
	(1) 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン法 .....	124
	(2) インドフェノール・キシレン法 .....	126
	(3) 高速液体クロマトグラフ法 .....	127
	(4) 酸化還元滴定法 .....	130
	(5) 逆相高速液体クロマトグラフ法 .....	131
31	ビタミンD.....	133
	(1) 高速液体クロマトグラフ法 .....	133
32	ビタミンE.....	136

	(1) 高速液体クロマトグラフ法 .....	136
33	ビタミン K.....	137
	(1) 高速液体クロマトグラフ法 .....	138
34	葉酸 .....	139
	(1) 微生物学的定量法 .....	139
35	熱量 .....	142
	(1) 修正アトウォーター法 .....	142
	(2) アルコール .....	143
	1) 浮ひょう法 .....	143
	2) 振動式密度計法 .....	144
	3) ガスクロマトグラフ法 .....	144
	4) 酸化法 1 .....	145
	5) 酸化法 2 .....	146
	(3) 飽和脂肪酸の熱量 .....	148
	(4) 有機酸 .....	148
	(5) 難消化性糖質のエネルギー換算係数 .....	149
	(6) 食物繊維のエネルギー換算係数 .....	151

## 通則

- 1 食品表示基準（平成 27 年内閣府令第 10 号）別表第 9 の第 3 欄に掲げる方法の詳細（以下「規定の方法」という。）は、本通知によることとする。
- 2 規定の方法に代わる方法で、それが規定の方法と同等以上の真度及び精度がある場合（簡易・迅速な試験法を用いる場合を含むが、別表第 9 の第 3 欄に掲げる方法名の範囲内に限る。）は、その方法を用いることができる<sup>注1)</sup>。ただし、その結果について疑いのある場合は、規定の方法で最終の判定を行う。
- 3 試験の本質に影響のない限り、試験法の細部については変更することができる（規定の方法として各章に示された操作にて、測定成分の抽出、妨害成分との分離、試験菌株の成育等に不具合が生じる場合等は、試験の本質に影響のない範囲内で、試験法の細部を変更することができる。）。
- 4 主な計量の単位は次の記号を用いる。

メートル	m
センチメートル	cm
ミリメートル	mm
マイクロメートル	μm
グラム	g
ミリグラム	mg
マイクログラム	μg
ナノグラム	ng
セルシウス度	°C
モル	mol
ミリモル	mmol
リットル	L
ミリリットル	mL
マイクロリットル	μL
モル毎リットル	mol/L
ミリモル毎リットル	mmol/L

- 5 質量分率を示すには%、質量百万分率を示すには ppm の記号を用いる。溶液 100 mL 中の物質含量 (g) を示すには w/v% の記号を用いる。液体 100 mL 中の物質含量 (mL) を示すには v/v% を用いる。
- 6 試験に用いる水は、原水を超ろ過（逆浸透、限外ろ過）、イオン交換、蒸留又はそれらの組み合わせにより精製した水とし、試験を妨害する物質を含まないなど、試験に適した水を用いる。
- 7 溶質名の次に溶液と記載し、特にその溶媒名を示さないものは水溶液を示す。
- 8 1 mol/L 塩酸、50 v/v% エタノールなど液状の試薬名に単に濃度を示したものは、水を用いて希釈したものを示す。
- 9 溶液の濃度を（1→2）（1→4）等と記載したものは、固形の物質は 1 g、液状の物質は 1 mL を溶媒に溶かして全量をそれぞれ 2 mL、4 mL 等とする割合を

示す。また、混液を（9:1）、（5:4:1）等と記載したものは、液状の物質の9容量と1容量の混液、5容量と4容量と1容量の混液等を示す。

- 10 質量を「精密に量る」とは、1 mg 又は 0.1 mg まで量ることを意味する。
- 11 容量を「正確に加える」等と記載した場合は、全量ピペット、ビュレット又はこれらと同等以上の精度のある体積計を用いて計量することを意味する。また、「正確に 100 mL とする」「定容する」等と記載した場合は、全量フラスコを用いて操作する。
- 12 試験によって得られる値は、表示値より 1 桁下まで求め、その多く求めた 1 桁について四捨五入し、表示値の許容差の範囲と比較することにより判定を行う。
- 13 ろ過は、別に規定するもののほか、ろ紙（JIS 5 種 A 又は同等品）を用いて行う。
- 14 デシケーターは、乾燥材を入れて用いる。デシケーター用の乾燥剤として硫酸、シリカゲル、塩化カルシウム、五酸化リン等がある。青色シリカゲルの場合、コバルト塩の青色が減退したら、135 °C で 2 ～ 3 時間乾燥し再生して使用することができる。
- 15 当該食品の栄養成分の量及び熱量が 100 mL 等の容量当たりの量で表示されている場合、試料を容量で量りとることにより定量結果を得ることができる。

[注]

- 1) 通常の食品と形態又は成分組成が大きく異なる食品（カプセル、錠剤等の食品、食品添加物等）、通常の食品に存在しない形態の栄養成分（油溶性ビタミン C 誘導体等）を強化した食品等が想定される。

## 1 たんぱく質

### (1) 窒素定量換算法

食品中のたんぱく質の定量では、全窒素を定量し、それに一定の係数<sup>注1)</sup>を乗じて得たたんぱく質量とする<sup>注2)</sup>。

[注]

1) 窒素・たんぱく質換算係数を次表に示す。

下記以外の食品については、窒素・たんぱく質換算係数として 6.25 を用いる。

食 品 名	換算係数
アーモンド	5.18
アマランサス、ナッツ類(アーモンド、ブラジルナッツ、らっかせいを除く。)、種実類(あさ、えごま、かぼちゃ、けし、ごま、すいか、はす、ひし、ひまわり)	5.30
ブラジルナッツ、らっかせい	5.46
ふかひれ、ゼラチン、臍(うし)、豚足、軟骨(ぶた、にわとり)	5.55
小麦粉、フランスパン、うどん・そうめん類、中華めん類、マカロニ・スパゲティ類、ふ類、小麦たんぱく、ぎょうざの皮、しゅうまいの皮	5.70
だいず、だいず製品(豆腐竹輪を除く。)、えだまめ、だいずもやし、しょうゆ類、みそ類	5.71
小麦(はいが)	5.80
オートミール、おおむぎ、小麦(玄穀、全粒粉)、ライ麦	5.83
こめ、こめ製品(赤飯を除く。)	5.95
乳、乳製品、バター類、マーガリン類	6.38

なお、平成 32 年 3 月 31 日までに製造され、加工され、又は輸入される加工食品(業務用加工食品を除く。)及び添加物(業務用添加物を除く。)並びに同日までに販売される業務用加工食品及び業務用添加物は、食品表示基準附則第 2 条の規定による廃止前の栄養表示基準に基づく栄養表示において用いられ、一般化されている数値を用いることもできる。

さらに、本表に記載されていない食品については、窒素・たんぱく質換算係数として、最新版の日本食品標準成分表に記載されている数値を用いることもできる。

2) 食品中の窒素化合物は必ずしもたんぱく質のみでなく、食品によっては多量のアミノ酸類、アミド類、プリン塩基類及びクレアチン類等を



含有することもあるが、一般的には全窒素をたんぱく質に由来するものとみなし換算する。

したがって、たんぱく質以外の窒素成分を豊富に含む食品（例えば、白子のように核酸を豊富に含む食品、大豆レシチン含有食品のように含窒素脂質であるレシチンを豊富に含む食品）にあつては、本法の適用が必ずしも妥当ではない点を留意すべきである。

なお、緑茶、紅茶、コーヒー、ココア等カフェインやテオブロミンを比較的多く含むもの及びアセスルファム K 及びアスパルテーム等の窒素を含む合成甘味料を主体とする食品等の場合には、これらを別に定量して補正することが多い。

## 1) ケルダール法

### ① 装置及び器具<sup>注1)</sup>

- ・ドラフト
- ・200 mL 容ケルダール分解フラスコ
- ・分解用加熱装置：ガス又は電熱式の分解用架台を用いる。200 mL の水と4～5粒の沸騰石を入れた分解フラスコを載せて加熱するとき、約5分で沸騰し始めるように調節できる熱源が必要。
- ・アンモニア直接蒸留装置
- ・ビュレット：テフロンコック付き、容量25 mL 以下で0.05 mL の刻線付きのもの。

### ② 試薬<sup>注1) 注2)</sup>

- ・硫酸カリウム：特級、粉状のもの。
- ・硫酸銅(Ⅱ)五水和物：特級、12メッシュ以上に粉砕したもの。
- ・濃硫酸：特級
- ・水酸化ナトリウム：特級
- ・ホウ酸：特級
- ・分解促進剤：硫酸カリウムと硫酸銅(Ⅱ)五水和物を9:1の質量比で混合。
- ・沸騰石：10～12メッシュ程度の粒度のもの。
- ・30 w/v%水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム300 g を水約500 mL に溶解した後、さらに水を加えて1 L に希釈したもの。
- ・4%ホウ酸溶液：ホウ酸40 g を水960 mL に加温溶解し、冷却したもの。
- ・混合指示薬：0.2 w/v%メチルレッドと0.2 w/v%プロムクレゾールグリーン<sup>注3)</sup>の95 v/v%エタノール溶液を1:5の容量比で混合したもの。
- ・0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準溶液：水酸化ナトリウム約4.5 g を量り、水約950 mL を加えて溶かし、新たに調製した水酸化バリウム飽和溶液を、沈殿が生じなくなるまで加える。液をよく振り混ぜた後、密栓し、一夜放置する。上澄み液を傾斜するか、又は液をろ過する。本液は、ゴム栓で密栓するか、又は二酸化炭素吸接管（ソーダ管）を付けた瓶に保存し、度々

標定し直す<sup>注4)</sup>。

・0.05 mol/L 硫酸標準溶液：濃硫酸約 28 mL に水を加えて 10 L に定容する。  
これを 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準溶液で標定した後、使用する。

・シヨ糖：特級

③ 測定<sup>注1)</sup>

試料の適量 (W g) をケルダール分解フラスコに精密に量り、分解促進剤<sup>注5)</sup> 5 g を加え、次いで濃硫酸 15 mL を加え、穏やかに振り混ぜた後、弱火で加熱する。分解が始まると、液は黒化し泡立つ<sup>注6)</sup>。黒色粘稠液になったら加熱を強める。反応が進むと、亜硫酸ガスと炭酸ガスを発生しながら液は徐々に黒褐色から褐色になり、最後に青色ないし青緑色で澄明な液になる<sup>注7)</sup>。さらに、1～2時間強熱を続けて分解を完了させる。

冷却後、分解液に脱イオン水約 120 mL を加え、沸騰石数個又は粒状亜鉛を少量加えてから、静かに 30 w/v%水酸化ナトリウム溶液 70 mL を加えて、蒸留装置に連結させる。蒸留液の留出口に 4%ホウ酸溶液 40 mL<sup>注8)</sup> を入れた三角フラスコを留出口がホウ酸溶液の液面より下にあるように装着した後、加熱蒸留し、液量が 120 mL になったら留出口を液面から離し、さらに 150 mL まで蒸留する。

蒸留液に混合指示薬を数滴加え、0.05 mol/L 硫酸標準溶液で滴定する。青色、青緑色を経て汚無色から桃色になったところを終点とする (V<sub>1</sub> mL)。別に空試験として試料の代わりにシヨ糖を試料と同量採取し、前記同様に操作して分解、蒸留、次いで滴定する (V<sub>0</sub> mL)。

④ 計算

$$\text{試料中の窒素含量 (g/100 g)} = \frac{0.0014 \times (V_1 - V_0) \times f}{W} \times 100$$

f：0.05 mol/L 硫酸標準溶液のファクター

試料中のたんぱく質含量 (g/100 g)

$$= \text{試料中の窒素含量 (g/100 g)} \times \text{窒素・たんぱく質換算係数}$$

[注]

- 1) 窒素定量換算法には、多種多様な改変・改良法がある。ここに示した機器、試薬及び測定操作は、比較的広く用いられている条件の1つに過ぎない。また、窒素定量換算法の操作の一部を自動化した機器も市販されており、活用できる。
- 2) 試薬は原則として特級を用いる。1級で差し支えないが、その場合は購入試薬の空試験を行ってから使用すること。
- 3) 終点近くの汚無色が滴定時に明らかに出現するように、2つの指示薬溶液のいずれかを追加する。
- 4) 食品、添加物等の規格基準（昭和 34 年厚生省告示第 370 号）の第 2 添加物の一般試験法の C「試薬・試液」又は第十六改正日本薬局方 一

般試験法「容量分析用標準液」の方法により標定する。

- 5) 分解促進剤、硫酸カリウム、二酸化チタン、硫酸銅（Ⅱ）五水和物を 20:1:1 の質量比で混合したもの 5.5 g を用いてもよい。
- 6) でんぷん、糖、脂質含量の多い試料は発泡が激しく、分解フラスコからあふれることがあるため、最初のうちは加熱に注意する。
- 7) 分解に要する時間は、試料によって異なるが、通常 1～2 時間で終了する。
- 8) ホウ酸は、滴定に直接関与しないので、ホウ酸溶液の濃度及び採取量を厳密にする必要はない。受器中のホウ酸が 40 °C 以上に加温されるとアンモニアの吸収が不完全になる。

## 2) 燃焼法

### ① 装置及び器具

- ・燃焼法全窒素測定装置：次のアからエまでに掲げる能力を有するもの<sup>注1)</sup>
  - ア 酸素（純度 99.9% 以上のもの）中で試料を熱分解するため、最低 870 °C 以上の操作温度を保持できる燃焼炉を持つこと。
  - イ 熱伝導度検出器による窒素（N<sub>2</sub>）の測定のため、遊離した窒素（N<sub>2</sub>）を他の燃焼生成物から分離することができる構造を持つこと。
  - ウ 窒素酸化物（NO<sub>x</sub>）を窒素（N<sub>2</sub>）に変換する機構を持つこと。
  - エ ニコチン酸を用いて 10 回繰り返し測定したときの窒素分の平均値が理論値±0.15% であり、相対標準偏差が 1.3% 以下であること。

### ② 試薬

- ・ニコチン酸：純度 99% 以上のもの。
- ・検量線作成用標準品：エチレンジアミン四酢酸（EDTA）又は DL-アスパラギン酸（純度 99% 以上で窒素率が記載されたもの）<sup>注2)</sup>。

### ③ 測定

固形の試料の場合、粉砕機で粉砕し均質化する。試料の適量<sup>注3)</sup>を 0.1 mg 以下の単位まで正確に量りとり、装置に適した方法で測定する。あらかじめ 0.1 mg 以下の単位まで正確に量りとった検量線作成用標準品を測定して得られた検量線から試料中の窒素含量（g/100 g）を算出する。

### ④ 計算

$$\begin{aligned} & \text{試料中のたんぱく質含量 (g/100 g)} \\ & = \text{試料中の窒素含量 (g/100 g)} \times \text{窒素・たんぱく質換算係数} \end{aligned}$$

#### [注]

- 1) 乾燥スープ、しょうゆ等塩分濃度が高い試料を測定する場合は、ナトリウムの酸化物、遊離した塩素等による腐食を防止する対策がとられていること。
- 2) ニコチン酸を除く、他の同純度の標準品を用いることもできる。
- 3) 通常 200～500 mg を採取する。

## 2 脂質

ジエチルエーテル（以下「エーテル」という。）、石油エーテル等の溶剤に可溶な成分の総量を脂質とする<sup>注1)</sup>。

### [注]

1) 脂溶性ビタミン、カロテノイド等も脂質として定量される。通常の食品においては、脂溶性ビタミン、カロテノイド等の含量は、脂質含量と比較してごくわずかであるため、脂質に含めて定量を行う。ただし、脂溶性ビタミン、カロテノイド等を多量に含む錠剤・カプセル等のサプリメントや食品添加物等、その寄与が無視できない場合、脂溶性ビタミン、カロテノイド等の含量を差し引いて脂質とすることができる。

### (1) エーテル抽出法<sup>注1)</sup>

#### ① 適用される食品

一般食品、特に比較的脂質含量が高く、組織成分と結合している脂質が少なく、かつ乾燥時粉末又は容易に粉砕し得る状態にある食品に適用される。

このため、試料を直接粉砕するか又は適当な前処理を行って、水分等を除去し、脂質を抽出しやすい乾燥状態にした後、ソックスレー抽出器を用いて抽出する<sup>注2)</sup>。

#### ② 装置及び器具

- ・電気恒温水槽<sup>注3)</sup>：温度調節範囲が 50～80 °C
- ・電気定温乾燥器：温度調節範囲が 80～120 °C
- ・ソックスレー抽出器：試料採取量に応じて抽出管のサイズや、受器のフラスコの容量を選択する。
- ・円筒ろ紙：直径及び長さは、抽出管のサイズに応じて選択する<sup>注4)</sup>。
- ・デシケーター：乾燥剤を入れておく。

#### ③ 試薬

- ・けいそう土：セライト No. 545<sup>注5)</sup>。
- ・エーテル：特級
- ・硫酸ナトリウム（無水）：特級
- ・硫酸銅溶液：硫酸銅（Ⅱ）五水和物（特級）70 g を水に溶かして 1 L とする。
- ・水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム（特級）10 g を水に溶かして 1 L とする。

#### ④ 試料の調製

##### 1) 乾燥試料

そのまま円筒ろ紙に移して 100～105 °C の電気乾燥器で 2～3 時間乾燥するか、又は試料をビーカーに精密に量り、水を加えて組織を膨潤させてからけいそう土又は硫酸ナトリウム（無水）を加えて脱水し、乳鉢中で粉

砕して円筒ろ紙に移す。ビーカー及び乳鉢は少量のエーテルを含ませた脱脂綿でふき取り、脱脂綿ごと円筒ろ紙に入れる。水分量が多く、たんぱく質に富む肉、魚又は種実類のうち、脂質含量の多いものでは、均質化した調製試料にけいそう土又は硫酸ナトリウム（無水）を同様に脱水した後、乾燥し、乳鉢中で粉碎して円筒ろ紙に移す。

## 2) みそ類、納豆類

調製試料 10 g を精密に量り、100 mL の熱水で溶解する。あらかじめろ紙を敷いたブフナー漏斗に水に懸濁した 5 g のけいそう土を流し込んでけいそう土層を作り、試料液をこれですく過す。試料を吸着したけいそう土を乳鉢に移し、硫酸ナトリウム（無水）30 g を加えてよく混ぜて円筒ろ紙に移す。

## 3) ジャム、果実類等

あめ状やゼリー状で粉末になりにくく、かつ多量の糖及び有機酸を含む食品、例えばジャム、ゼリー又は果実類ソース類の場合は、温湯 200 mL を加えて溶解し、冷却後、硫酸銅溶液 10 mL を加えて混和し、かき混ぜながら水酸化ナトリウム溶液をリトマス試験紙の中性又は微酸性になるまで加える。沈降させ、ろ紙上に沈殿物を集める。これを 100 °C の定温乾燥器に入れて 2 時間乾燥した後、円筒ろ紙に入れる。

## 4) マヨネーズ、ドレッシング

水分測定後の試料をそのまま用いる。

## ⑤ 測定

粉碎又は前処理が必要な試料の場合は、上記②の調製を行った後、試料を円筒ろ紙に入れる<sup>注6)</sup>。その上に脱脂綿を軽く詰め、抽出管に入れる。受器のフラスコは前もって 100~105 °C の電気定温乾燥器で 1~2 時間乾燥し、デシケーターに移し、1 時間放冷した後、0.1 mg まで量って恒量 (W<sub>0</sub> g) を求める。これにエーテル<sup>注7)</sup>を約 2/3 容入れ、冷却管を連結して電気恒温水槽上で 8~16 時間抽出を行う<sup>注8)</sup>。

抽出終了後、手早く抽出管を取りはずして、円筒ろ紙をピンセットで抜き出し、再び冷却管に連結して、電気恒温水槽上で加温し、フラスコ中のエーテルがほとんど全部抽出管に移ったら、フラスコを取り外してさらに加温し、フラスコ中のエーテルを完全に蒸発させる。フラスコの外側をガーゼでふき、100~105 °C の電気定温乾燥器に入れ、1 時間乾燥し、デシケーターに移して放冷後秤量し、恒量 (W<sub>1</sub> g) を求める。

## ⑥ 計算

$$\text{試料中の脂質含量 (g/100 g)} = \frac{W_1 - W_0}{W} \times 100$$

W : 試料採取量 (g)

[注]

1) ここに記載するもののほか、乳及び乳製品の成分規格等に関する省

令（昭和 26 年厚生省令第 52 号）ではバター及びバターオイルの乳脂肪分を石油エーテルで、マーガリン類の日本農林規格（昭和 60 年農林水産省告示第 932 号）ではマーガリンの油脂含有率をエーテルで直接抽出する方法等がある。

- 2) 乾燥が不十分な場合は、抽出が不完全になるか、逆に水分と一緒に水溶性物質が溶出したりする。しかし、長時間の乾燥や高温での乾燥は、脂肪酸の酸化や揮発による成分変化を誘発したり、組織を変化させて脂質が抽出されにくくなることがある。
- 3) 電熱式脂肪抽出装置（防爆型）も用いることがある。
- 4) No. 84（アドバンテック東洋）又は同等品を用いる。
- 5) Fisher Scientific Co.製等
- 6) 試料は円筒ろ紙の 2/3 以上占めてはならない。
- 7) コーヒー焙豆、インスタントコーヒーは、AOAC 法、19 版（30.1.17）に準じてエチルエーテルの代わりに石油エーテルを用いて抽出する。
- 8) みそ類及び納豆類は、ソックスレー抽出器で 10 時間抽出する。

(2) クロロホルム・メタノール混液抽出法<sup>注1)</sup>

① 適用される食品

大豆及び大豆製品（みそ類、納豆類は除く。）、卵類のように、リン脂質等の極性脂質を含む食品に適用される。

② 装置及び器具

- ・電気恒温水槽：温度調節範囲が 50～80℃
- ・電気定温乾燥器：温度調節範囲が 80～120℃
- ・デシケーター：乾燥剤を入れておく。
- ・遠心分離機：3,000 回転/分で操作でき、50 mL 容の遠心管が 4～8 本かけられるものを用いる。
- ・遠心管：50 mL 容の共栓付きガラス遠心管（直径 35 mm、高さ 100 mm 程度のもの）を用いる。
- ・抽出装置：還流冷却管と 200 mL 容の共通すり合わせ三角フラスコからなる装置。
- ・秤量瓶：直径 45 mm、高さ 45 mm でふた付きのガラス製のものを用いる。
- ・ガラスろ過器：ブフナー漏斗形 11G-3、フィルター板直径 40 mm、容量 60 mL～100 mL のものを用いる。
- ・なす形フラスコ：300 mL 容の共栓付きなす形フラスコ<sup>注2)</sup>

③ 試薬

- ・クロロホルム：特級、97 v/v%以上のものを用いる。
- ・メタノール：特級、96 v/v%以上のものを用いる。
- ・クロロホルム・メタノール混液（2:1）：クロロホルム 2 容に対してメタノール 1 容を加え、混和する。

- ・石油エーテル：特級
- ・硫酸ナトリウム（無水）：特級、120～135℃で1～2時間乾燥後、ポリエチレン瓶等に保存する。

#### ④ 測定

試料の適量を200 mL容共栓三角フラスコに精密に量り（W g）<sup>注3)</sup>、クロロホルム・メタノール混液（2:1）50～60 mLを加え、還流冷却管を接続した後、65℃に調節した恒温水槽の中に入れる。穏やかに沸騰を始めた後、そのまま約1時間抽出を行う。抽出終了後、冷却管から三角フラスコを取りはずし、ガラスろ過器を用いて300 mL容共栓なす形フラスコに抽出液をろ過し、次いでクロロホルム・メタノール混液で抽出に用いた三角フラスコとガラスろ過器を洗い、洗液はろ液に合わせる。

捕集したろ液からクロロホルム・メタノール混液を留去させ、フラスコを傾けたときに内容物が粘性を示す程度に濃縮して、乾固させない。

冷却した後、石油エーテル25 mLを正確に加えて内容物を溶解させ、さらに硫酸ナトリウム（無水）5～15 gを加え、栓をして1分間振り混ぜた後、素早く遠心管に移し、遠心分離（3,000回転/分、5分間）する。あらかじめ100～105℃の電気定温乾燥器で1時間乾燥後、デシケーター中で45分間放冷し、恒量（W<sub>0</sub> g）とした秤量瓶に遠心上澄み液10 mLを速やかに正確に量り、石油エーテルを留去した後100～105℃の電気定温乾燥器で1時間乾燥し、デシケーター中で45分間放冷後、秤量して恒量（W<sub>1</sub> g）を求める。

#### ⑤ 計算

$$\text{試料中の脂質含量(g/100 g)} = \frac{(W_1 - W_0) \times 2.5}{W} \times 100$$

2.5：石油エーテル25 mL中の10 mLを採取して乾燥を行ったので、係数として2.5を乗ずる。

#### [注]

- 1) クロロホルムは発がん性のある環境汚染物質であることから、局所排気装置を備えた設備で取り扱う等十分な安全衛生上の配慮が必要である。
- 2) 200～300 mL容共栓付き三角フラスコを用いてもよい。
- 3) 乾燥試料には水2～3 mLを加え、水分の多い場合は、適量のけいそう土を加えて水分量を調節する。

### (3) ゲルベル法

#### ① 適用される食品

牛乳、脱脂乳及び加工乳等乳及び乳製品に適用される<sup>注1)</sup>。

#### ② 装置及び器具

- ・ゲルベル用遠心分離機
- ・ゲルベル乳脂計

- ・牛乳用ピペット：容量 11 mL を用いる。
- ・硫酸用ピペット：容量 10 mL を用いる。
- ・電気恒温水槽：65 °C に調節できるものを用いる。

### ③ 試薬

- ・硫酸：15 °C で比重 1.820～1.825 (90～91 %) のものを用いる。
- ・アミルアルコール：沸点が 128～132 °C で、比重が 15 °C で約 0.81 のもの。あらかじめ 2 mL について水 11 mL を用い、牛乳の場合と同様にして空試験を行い、一夜放置して油状物の分離を認めないものを用いる。

### ④ 測定

硫酸 10 mL を硫酸用ピペットを用いて、なるべく管壁をぬらさないように、ゲルベル乳脂計に注入し、次に乳試料 11 mL を牛乳用ピペットを用いて管壁に沿って徐々に硫酸上に層積し、さらに、アミルアルコール 1 mL を加え、ゴム栓をする。牛乳と硫酸が反応して高熱を発生するから厚い布で乳脂計を巻いて握り、親指で栓を押さえて振り、乳を溶解した後、65 °C の温湯中に 15 分間浸す。次に 3～5 分間 700 回転/分以上の回転数で遠心分離する。さらに、65 °C の温湯中に 5 分間浸して温度を一定にし、脂肪層を読み取る。この読みは脂肪の質量% (g/100 g) を示す<sup>注2)</sup>。

#### [注]

- 1) 乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（昭和 26 年厚生省令第 52 号）に規定されている。
- 2) 乳脂計の目盛りは 8 % が 1 mL に相当し、1 % 目盛りが 0.125 mL になるように作られている。11 mL のピペットを用いた場合、0.1 mL がピペットの内壁に付着するとして、10.9 mL の牛乳が実際の測定に用いられていることになる。牛乳の平均比重を 1.032 とすると 10.9 mL の牛乳は 11.25 g に相当する。60 °C 付近における牛乳脂肪の比重は 0.9 であるので、その 1 mL は 0.9 g に相当する。

したがって、牛乳脂肪 1 mL は、 $(0.9/11.25) \times 100 = 8\%$  となり、0.125 mL が 1 % に相当する計算になる。

#### [参考文献]

- 1) 日本薬学会編：“乳製品試験法・注解”，46，金原出版（1984）

## (4) 酸分解法

### ① 適用される食品

組織に結合又は包含されている脂質（複合脂質）を相対的に多く含む食品で、例えば穀類、パン、マカロニ類、いも及びでんぷん類、脂質含量の少ない種実類、豆類、野菜類、卵類、きのこ類、藻類、調理加工食品等に適用される。

### ② 装置及び器具

- ・電気恒温水槽：温度調節範囲が 50～80 °C



- ・電気定温乾燥器：温度調節範囲が 80～120 °C
- ・デシケーター：乾燥剤を入れておく。
- ・抽出管：マジョニア管又はレーリッヒ管を用いる。
- ・溶媒留去用電気恒温水槽：温度調節範囲が 30～80 °C
- ・ロータリーエバポレーター：一式

### ③ 試薬

- ・エーテル：特級
- ・エタノール：95 v/v%、特級
- ・濃塩酸：特級
- ・塩酸 (25→36)：濃塩酸 25 容に水 11 容を加えたもの。
- ・石油エーテル：特級

### ④ 測定

試料の適量（乾物として 1～2 g 以下）を 50 mL 容のビーカーに精密に量り（W g）、エタノール 2 mL を加えて、ガラス棒でよく混和する。次いで、乾燥試料のときは塩酸 (25→36)、多水分試料のときは濃塩酸 10 mL を加えて十分に混和し、時計皿で覆って 70～80 °C の電気恒温水槽上で 30～40 分間時々かき混ぜながら加温する。放冷後、内容物をマジョニア管又はレーリッヒ管に移し、ビーカーとガラス棒をエタノール 10 mL で洗い、さらにエーテル 25 mL で洗浄し、洗液は先の抽出管に集める<sup>注1)</sup>。栓をして軽く振って混和した後、栓をゆっくり回してエーテルのガスを抜く。再び栓をして 30 秒間激しく振り混ぜる。次いで、石油エーテル 25 mL を加え、同様にして 30 秒間激しく振り混ぜる。上層が透明になるまで静置した後、脱脂綿を詰めた漏斗でろ過する。ろ液はあらかじめ 100～105 °C の電気定温乾燥器で 1 時間乾燥後デシケーター中で 1 時間放冷し、恒量 (W<sub>0</sub> g) にしたフラスコに集める。管内の水層に再びエーテルと石油エーテル各 20 mL ずつの混液を加え、上記と同様に操作した後静置し、エーテル層を同様にろ過してフラスコに集める。さらに、エーテルと石油エーテル各 15 mL ずつの混液を加え、この操作をもう一度繰り返した後、抽出管の先端、栓及び漏斗の先端をエーテル・石油エーテルの等量混液で十分に洗いこれも集める。混液を捕集したフラスコをロータリーエバポレーターに連結し、70～80 °C の溶媒留去用電気恒温水槽中で加温して溶媒を留去し、混液がわずかになったら電気恒温水槽で残りの混液を十分に留去する。フラスコの外側をガーゼでふき、100～105 °C の電気定温乾燥器中で 1 時間乾燥後、デシケーターに移し、1 時間放冷して秤量する。乾燥、放冷、秤量の操作を繰り返し、恒量 (W<sub>1</sub> g) を求める<sup>注2)</sup>。

### ⑤ 計算

$$\text{試料中の脂質含量 (g/100 g)} = \frac{W_1 - W_0}{W} \times 100$$

[注]

- 1) 水層の全量が約 25 mL より少なくなるように液量を調節する。

2) フラスコにエーテル又は石油エーテルを加えて穏やかに加温し、抽出物が可溶性物質であることを確認する。もし、不溶物が含まれている場合は、エーテル又は石油エーテルでフラスコを洗浄し、別のフラスコに移して溶媒留去、秤量を行う。又は、不溶物が生成してくる可能性があると予想される場合は、あらかじめエーテル及び石油エーテル層を分液漏斗等に全量移し、水による洗浄操作を2～3回行う。硫酸ナトリウム（無水）等で脱水ろ過しながらエーテル層をフラスコに集め、溶媒を留去して恒量を求める。

(5) レーゼゴットリーブ法

① 適用される食品

主として牛乳及び乳製品に用いられるが、乳脂肪を含む食品及び比較的脂質含量の高い液状又は乳状の食品にも適用される<sup>注1)</sup>。

② 装置及び器具

- ・電気恒温水槽：温度調節範囲が 50～80 °C
- ・電気定温乾燥器：温度調節範囲が 80～120 °C
- ・デシケーター：乾燥剤を入れておく。
- ・抽出管：マジョニア管又はレーリッヒ管を用いる。
- ・溶媒留去用電気恒温水槽：温度調節範囲が 30～80 °C
- ・ロータリーエバポレーター：一式

③ 試薬

- ・エーテル：特級
- ・エタノール：95 v/v%、特級
- ・石油エーテル：特級
- ・アンモニア水：25 % (20 °Cでの比重約 0.91) のもの。

④ 試料の調製

- ・全粉乳、クリームパウダー、加糖粉乳、乳児用調製粉乳、乳飲料、発酵乳及び乳酸菌飲料：そのまま使用する。
- ・アイスクリーム類：よく混合し、固形物を含まない場合の試料で試験を行うときは、ふるい分けの方法で固形物を取り除く。
- ・濃縮乳、練乳：試料 20 g を量り、温水で希釈し、100 mL に定容し、その 10 mL を用いる。

⑤ 測定

試料の適量を小型ビーカーに精密に量り (W g)、粉末試料の場合は温湯約 4 mL を加え、十分にかき混ぜながら試料を溶解して抽出管に移し、さらに 3 mL の温湯で2回洗う。液体試料の場合は、適量の温湯で抽出管に移す<sup>注2)</sup>。次に、アンモニア水 1.5～2 mL 及びエタノール 10 mL を用いて順次ビーカーを洗い、洗液を抽出管に加え、その度に栓をしてよく混ぜ合わせる<sup>注3)</sup>。エーテル 25 mL を加え、栓をして軽く混合した後、栓を回転してガス抜き

穴からエーテルのガスを抜く。再び栓をして約 30 秒間激しく振り混ぜる。次いで、石油エーテル 25 mL を加え、同様にして 30 秒間激しく振り混ぜる。上層が透明になるまで静置した後、脱脂綿を詰めた漏斗でろ過する。ろ液はあらかじめ 100~105 °C の電気定温乾燥器で 1 時間乾燥後デシケーター中で 1 時間放冷し、恒量 ( $W_0$  g) にしたフラスコに集める。管内の水層に再びエーテルと石油エーテル各 20 mL ずつの混液を加え、上記と同様に操作した後静置し、エーテル層を同様にろ過してフラスコに集める。さらに、エーテルと石油エーテル各 15 mL ずつの混液を加え、この操作をもう一度繰り返した後、抽出管の先端、栓及び漏斗の先端をエーテル・石油エーテルの等量混液で十分に洗いこれも集める。混液を捕集したフラスコをロータリーエバポレーターに連結し、70~80 °C の溶媒留去用電気恒温水槽中で加温して溶媒を留去し、混液がわずかになったら電気恒温水槽で残りの混液を十分に留去する。フラスコの外側をガーゼでふき、100~105 °C の電気定温乾燥器中で 1 時間乾燥後、デシケーターに移し、1 時間放冷して秤量する。乾燥、放冷、秤量の操作を繰り返し、恒量 ( $W_1$  g) を求める。

#### ⑥ 計算

$$\text{試料中の脂質含量 (g/100 g)} = \frac{W_1 - W_0}{W} \times 100$$

#### [注]

- 1) 豆乳にこの方法が適用されることもある。  
レーゼゴットリーブ法が記載されているものには、乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（昭和 26 年厚生省令第 52 号）等がある。
- 2) 酸分解法と同様に、水層の全量が約 25 mL より少なくなるように液量を調節する。
- 3) アイスクリーム類は、試料 4 g を小型ビーカーに量り水 3 mL を加えてよく混ぜ合わせ、抽出管に移す。ビーカーは水 3 mL でよく洗い、その洗液は抽出管に加えて振り混ぜる。アンモニア水及びエタノールを加えたならば、抽出管を 60 °C の水浴中で時々振り混ぜながら、20 分間加熱する。  
チーズ類は、試料 1 g を 100 mL 容トールビーカー又はコニカルビーカーに量り、水 9 mL、濃アンモニア水 1 mL を加え、ガラス棒で練り、均一な乳濁液とする。これを温めて軟らかくした後、濃塩酸で中和し、さらに塩酸 10 mL を加えて十分に混和する。精製白砂又は沸騰石を少量加え、時計皿で覆って約 5 分間弱く煮沸する。冷却後、酸分解法と同様に抽出管に移す。

### 3 飽和脂肪酸及び不飽和脂肪酸

#### (1) ガスクロマトグラフ法

脂肪酸は直鎖炭化水素のモノカルボン酸で、総炭素数が 4~36 のものを測

定対象とする。飽和脂肪酸は炭素鎖に二重結合を有さない脂肪酸であり、不飽和脂肪酸は炭素鎖に1個以上の二重結合を有する脂肪酸（ただし、トランス脂肪酸を除く。）である。また、炭素鎖に2個以上の二重結合を有する脂肪酸のうち、メチル基末端から数えた最初の二重結合が3番目の位置にあるものがn-3系脂肪酸、6番目の位置にあるものがn-6系脂肪酸である。

本試験法により個々の飽和脂肪酸含量を測定し、それらの総和を飽和脂肪酸量とする。また、個々の不飽和脂肪酸含量を測定し、それらの総和から不飽和脂肪酸の総量並びにn-3系脂肪酸及びn-6系脂肪酸の総量も同様に定量することができる。

## 1) 脂質の抽出I（けん化法）

### ① 適用される食品

魚介類や肉類等多糖類の含量が少ない食品<sup>注1)</sup>に適用される。

### ② 装置及び器具

- ・ホットプレート
- ・ロータリーエバポレーター：一式

### ③ 試薬

- ・ヘプタデカン酸：純度98%以上のもの
- ・水酸化カリウム：特級
- ・エタノール：95 v/v%、特級
- ・1 mol/L 水酸化カリウム - エタノール溶液（ただし、エタノールには水5 v/v%を合む。）
- ・ジエチルエーテル：特級
- ・ヘキサン：特級
- ・ピロガロール：特級
- ・30 w/v% 硫酸：特級
- ・硫酸ナトリウム（無水）：特級
- ・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

### ④ 操作

共栓付き三角フラスコに試料0.5～5g（脂肪酸として20～100mg）を精密に量り、ヘプタデカン酸5～30mgを精密に加える。1 mol/L 水酸化カリウム - エタノール溶液50 mL及びピロガロール0.5gを加え、冷却器を付しホットプレート上で穏やかに30分間加熱けん化する。室温まで冷やし分液漏斗に水150 mLで移す。30 w/v%硫酸を加え、pHを約2としてジエチルエーテル - ヘキサン（1:1）100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ水40 mLで4回洗浄した後硫酸ナトリウム（無水）で乾燥する。これをろ過して硫酸ナトリウムを除き、なす形フラスコに抽出液を集め、溶媒をロータリーエバポレーターで留去（40℃以下）する。

[注]

1) 糖質のグリコシド結合は、酸には弱いがアルカリにはかなり安定である。アルカリによる分解は、還元末端から糖残基が1つずつ離れていく形をとり、時間が掛かるとともに不完全になるため、けん化法は穀類等多糖類を多く含む食品には適さない。

また、酪酸等の低級脂肪酸は、分析操作におけるその挙動が他の脂肪酸（高級脂肪酸）と異なる（例えば、水に可溶であること、揮発性が高いこと。）。したがって、本法は、後述の脂質の抽出Ⅱの方法を合め低級脂肪酸を多く含む食品には適さない。乳脂肪を含む菓子類、乳類等で、飽和脂肪酸の総量に対して、酪酸等の低級脂肪酸の寄与が無視できない場合は、最新版の「日本食品標準成分表分析マニュアル」に記載された方法に準拠して測定を行う。

## 2) 脂質の抽出Ⅱ（酸分解法）

### ① 適用される食品

穀類等、多糖類を多く含む食品に適用される。

### ② 装置及び器具

- ・ウォーターバス
- ・ロータリーエバポレーター：一式

### ③ 試薬

- ・ヘプタデカン酸：純度98%以上のもの
- ・塩酸溶液：濃塩酸（特級）と水を25：11の容量比で混合する。
- ・ジエチルエーテル：特級
- ・石油エーテル：特級
- ・硫酸ナトリウム（無水）：特級
- ・その他の試薬は、特に指定のない限り特級を用いる。

### ④ 操作

ビーカーに試料0.5～5g（脂肪酸として20～100mg）を量り、ヘプタデカン酸5～30mgを正確に加える。エタノール5mLを加えガラス棒で混和する。塩酸溶液25mLを加え、水浴（80℃）中で、蒸発を防ぐため時計皿を載せ、時々かくはんしながら30分間加熱<sup>注1)</sup>する。放冷後、分液漏斗に移し、エタノール20mLとジエチルエーテル60mLを加え振とうする。次いで石油エーテル60mLを加え振とうする。下層を別の分液漏斗に移し、ジエチルエーテル-石油エーテル（1：1）60mLで2回、同様に振とう抽出する。抽出液を合わせ水40mLで4回洗浄した後硫酸ナトリウム（無水）で乾燥する。これをろ過して硫酸ナトリウムを除き、なす形フラスコに抽出液を集め、溶媒をロータリーエバポレーターで留去（40℃以下）する。

#### [注]

1) 塩酸溶液による分解では、温度が高くなると多価不飽和脂肪酸の分解が促進されるので、正しく温度を調節する。

### 3) 脂肪酸メチルエステルの調製

#### ① 装置及び器具

- ・オイルバス又はアルミブロックヒーター
- ・スクリーキャップ (テフロンをコーティングしたもの) 付き試験管 : 12 mL 容

#### ② 試薬

- ・メタノール : 特級
- ・水酸化ナトリウム : 特級
- ・0.5 mol/L 水酸化ナトリウム - メタノール溶液
- ・三フッ化ホウ素 - メタノール試薬 (濃度約 14%) : ガスクロマトグラフ用
- ・ヘキサン : 特級
- ・塩化ナトリウム : 特級
- ・飽和塩化ナトリウム溶液
- ・その他の試薬は、特に指定のない限り特級を用いる。

#### ③ 操作

1) 又は 2) で得られた脂質 30 mg (最大 100 mg) を精密に量り、スクリーキャップ付き試験管にとる。0.5 mol/L 水酸化ナトリウム - メタノール溶液 1.5 mL を加え、容器内を窒素で置換した後キャップを締め混合してから 100 °C で 7 分間加熱する。冷却し、三フッ化ホウ素 - メタノール試薬 2 mL を加える。容器内を窒素で置換した後キャップを締め混合してから 100 °C で 5 分間加熱する。30~40 °C まで放冷し、ヘキサン 1 mL を加え容器内を窒素で置換した後 30 秒間激しく振とうする。次いで飽和塩化ナトリウム溶液 5 mL を加え容器内を窒素で置換し、よく振り混ぜる。ヘキサン層が分離したら別の試験管に移す。下層にさらにヘキサン 1 mL を加え、振とう抽出する。抽出液を合わせた後<sup>注1)</sup>、ヘキサンで定容とし試験溶液とする。

#### [注]

1) 脂肪酸メチルエステルの精製が必要な場合は以下のように行う。

カラム : シリカゲル 8 g (130 °C で 16 時間活性化したもの) クロマト管 (内径 1 cm)

溶出液 : ヘキサン 100 mL (洗浄)

: ヘキサン - ジエチルエーテル (98:2) 100 mL (脂肪酸メチルエステルの溶出)

### 4) ガスクロマトグラフィー

#### ① 装置及び器具

- ・ガスクロマトグラフ (水素炎イオン化検出器、スプリット/スプリットレス 注入口付き) 一式
- ・データ処理装置

- ・キャピラリーカラム：長さ 15～30 m、内径 0.2～0.32 mm、フューズドシリカキャピラリーにシアノプロピル系又はポリエチレングリコール - 20M 等の液相を結合させたもの。

② 試薬

- ・キャリアーガス：ヘリウム
- ・各種の脂肪酸メチルエステル：標準品としての品質を有するもの。

③ 測定

3) 脂肪酸メチルエステルの調製で調製した試験溶液を、ガスクロマトグラフに 0.5～1 μL 注入し、データ処置装置を用いてピーク面積を測定する。

<ガスクロマトグラフ操作条件例<sup>注1)</sup>>

カラム：J&W DB-23 0.25 mm×30 m, df. 0.25 μm 又は同等品

温度：注入口及び検出器 250 °C

カラム 60 °C (1分保持) → 6 °C/分 → 160 °C → 1.8 °C/分 → 200 °C

流量：2.0 mL/分

ガス流量：メイクアップガス：50 mL/分

注入モード：スプリットレス

④ 計算<sup>注2)</sup>

$$\text{試料中の脂肪酸含量 (g/100 g)} = \frac{A \times C \times K}{B \times W} \times 0.1$$

A：被定量脂肪酸メチルの面積

B：ヘプタデカン酸メチルの面積

C：ヘプタデカン酸の添加量 (mg)

K：感度補正係数<sup>注3)</sup>

W：試料採取量 (g)

[注]

1) スプリット注入法でも分析は可能である。以下に長さ 25～30 m、内径 0.20～0.35 mm のキャピラリーカラムを用いたときの操作例を示す。

温度：注入口 250 °C、検出器 270 °C

カラム 170 °C (0分保持) → 1 °C/分 → 225 °C

ガス流量：キャリアーガス 1.0～2.0 mL/分   メイクアップガス 50 mL/分

注入モード：スプリット (スプリット比：1/50)

2) 植物性の食品ではヘプタデカン酸メチルと重なるピークはほとんど認められないが、魚介類を含め動物性の食品には通常少量含まれる。この場合、内標準物質をトリコサン酸 (C23:0) に変えるか、又は試料に内標準物質を加えずに調製した脂肪酸メチルの試験溶液 (ブランク) を用意し、ここで得られたクロマトグラムに基づき計算により内標準物質のピーク面積から重なるピーク面積を差し引き補正する。

3) 被定量脂肪酸の感度補正係数は標準品を用いて測定する。ガスクロ

マトグラフ操作条件が適切ならば、通常の脂肪酸の感度補正係数は1に近い値となる。ただし、炭素鎖の短い脂肪酸は感度が低下し1より大きい値をとる。

[参考文献]

- 1) 科学技術庁資源調査会：“四訂日本食品標準成分表のフォローアップに関する調査報告Ⅱ—日本食品脂溶性成分表（脂肪酸、コレステロール、ビタミンE）—”、177（1989）
- 2) W.R.Morrison, S.L.Tan and K.D.Hargin : J.Sci.Food Agri., 31, 329（1980）
- 3) Official Methods of the American Oil Chemists' Society Ce 1 b-89

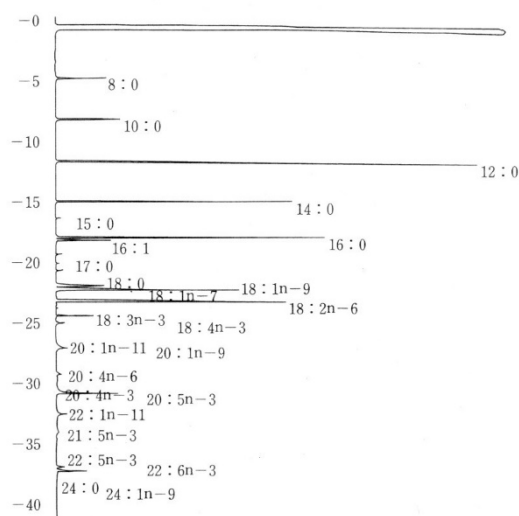


図-1 やし油、大豆油及び魚油を混合した試料のクロマトグラム

#### 4 コレステロール

(1) ガスクロマトグラフ法<sup>注1)</sup>

① 装置及び器具

- ・ガスクロマトグラフ：一式（水素イオン型検出器付き）
- ・ホットプレート
- ・ロータリーエバポレーター：一式
- ・キャピラリーカラム：長さ 15 m、内径 0.53 mm、フューズドシリカキャピラリーに 5%ジフェニール - 95%ジメチルシロキサン のポリマーを結合させたもの。膜厚 1.0~1.5 μm

② 試薬

- ・コレステロール：99%以上の純度を有するもの
- ・エタノール：95 v/v%、特級
- ・5-α-コレスタン - エタノール溶液：濃度 0.5 mg/mL
- ・水酸化カリウム：特級
- ・1 mol/L 水酸化カリウム - エタノール溶液（ただし、エタノールには 5 v/v% の水を含む。）



- ・石油エーテル：特級
- ・硫酸ナトリウム（無水）：特級
- ・その他の試薬は、特に指定のない限り特級を用いる。

### ③ 試験溶液の調製

試料 0.1～5 g（コレステロールとして約 1 mg）<sup>注2)</sup> を精密に量り、共栓付三角フラスコに入れる。内標準物質として 5- $\alpha$ -コレストタン - エタノール溶液 1 mL を正確に加える。次いで、1 mol/L 水酸化カリウム - エタノール溶液 50 mL を加え、冷却管を付し 1 時間穏やかに加熱けん化する。室温まで放冷後、水 50 mL 及び石油エーテル 50 mL で分液漏斗に移し、振とう抽出する。さらに、石油エーテル 50 mL で 2 回抽出する。抽出液を集め、水 40 mL で 4 回洗浄する。抽出液を硫酸ナトリウム（無水）で乾燥する。硫酸ナトリウムをろ過操作で除去した後、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固する<sup>注3)</sup>。残留物をヘキサンに溶かし 10 mL に定容し試験溶液とする。

### ④ 標準溶液の調製

段階的に濃度を変えたコレステロールに、5- $\alpha$ -コレストタンの一定量を加えたものを調製する。コレステロールの濃度は 3 段階以上を用意する<sup>注4)</sup>。

### ⑤ 測定

試験溶液 1  $\mu$ L をガスクロマトグラフに注入し、内標準物質に対するコレステロールのピーク面積比を求める。あらかじめ作成した検量線から試料中のコレステロール含量を求める。

<ガスクロマトグラフ操作条件例>

カラム：CP-Sil 8 CB（アジレントテクノロジー社製）又は同等品

温度：注入口及び検出器 280  $^{\circ}$ C

オープン 250  $^{\circ}$ C

流量：15 mL/分（コレステロールが 8～9 分に溶出するように調節する。）

注入モード：スプリットレス

### ⑥ 計算

$$\text{試料中のコレステロール含量 (mg/100 g)} = \frac{A \times 100}{W}$$

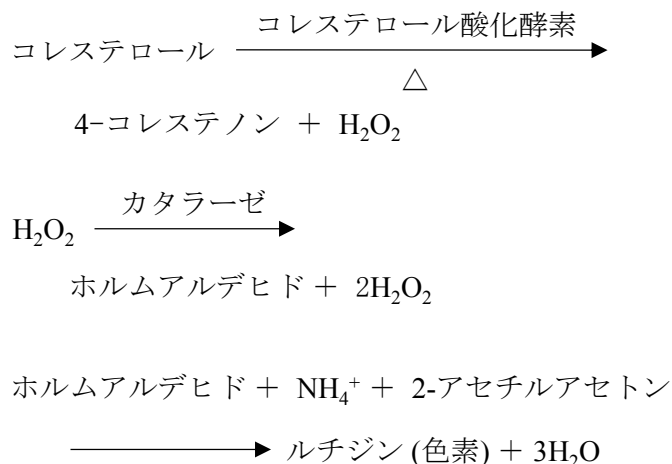
A：検量線から読み取ったコレステロール量 (mg)

W：試料採取量 (g)

[注]

- ここに示したガスクロマトグラフ法の他に有用な方法として酵素法がある。例えば、コレステロール酸化酵素を用い、下記の反応系で生成する色素（ルチジン）の量がコレステロールの量に比例するのを利用してコレステロールを定量する方法がある。なお、コレステロール酸化酵素は 3 位の炭素原子の水酸基が  $\beta$  配位をとっているステロール類なら全て酸化できるので、スチグマステロールやシトステロール等の植物性ステロール類（フィトステロール類）を含む食品に対しては、コレステ

ロール酸化酵素を用いる方法の適用は避けるべきである。また、コレステロール定量用の酵素法をキット化した製品も市販されている。



2) 試料採取量は 10 g まで増やせるが、この場合は、1 mol/L 水酸化カリウム - エタノール溶液、水及び石油エーテルを倍量用いる必要がある。また、試料採取量を 10 g にした場合は、1 mg/100 g のコレステロールの測定が可能である。

3) ガスクロマトグラム上、5- $\alpha$ -コレスタンやコレステロールに近似した位置にピークが認められ、測定の妨害となる場合は以下の方法で精製する。ただし、この操作で 5- $\alpha$ -コレスタンは除去されるため、精製操作後に新たに添加する必要がある。

ステロールの精製

シリカゲル（活性化：130 °C、16 時間）8 g をヘキサンで内径 1.5 cm のカラムに詰め、先の濃縮物を下記の条件で処理しステロール画分を得る。

第 1 溶出液：20 v/v% ジエチルエーテル - ヘキサン 150 mL：洗浄

第 2 溶出液：35 v/v% ジエチルエーテル - ヘキサン 150 mL：ステロール画分

4) 例えば、コレステロール 0.25、0.75 及び 2.0 mg に、5- $\alpha$ -コレスタン 0.5 mg を加え、ヘキサンで 10 mL とする。

[参考文献]

1) 科学技術庁資源調査会：“四訂日本食品標準成分表のフォローアップに関する調査報告Ⅱ－日本食品脂溶性成分表（脂肪酸、コレステロール、ビタミン E）－”、p.178（1989）

2) Adams M.L., Sullivan D.M., Smith R.L. and Richter E.F. : J.Assoc. Off. Anal. Chem., 69, 844（1986）

3) Kovacs M.I.P. : J. Cereal Sci., 11, 291（1990）

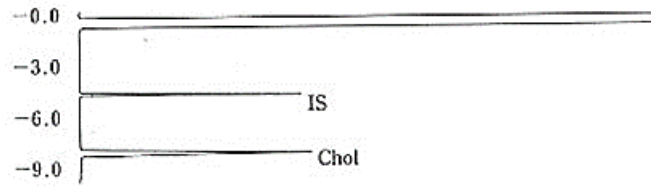


図-2 5- $\alpha$ -コレスタン (50 ng) とコレステロール (100 ng) のクロマトグラム

## 5 炭水化物

炭水化物は、当該食品の質量から、たんぱく質<sup>注1)</sup>、脂質、灰分<sup>注2)</sup>及び水分量を除いて算出する<sup>注3) 注4)</sup>。

### [注]

- 1) たんぱく質以外の窒素成分を豊富に含む食品（例えば、白子のように核酸を豊富に含む食品、大豆レシチン含有食品のように含窒素脂質であるレシチンを豊富に含む食品）にあつては、窒素定量換算法を適用して得られたたんぱく質量は実際量より過大である点に留意すべきである。
- 2) 大豆レシチン含有食品等含リン脂質であるレシチンを豊富に含む食品にあつては、リンが脂質と灰分の両方に重複して測り込まれる点に留意すべきである。
- 3) エネルギーとして利用されない成分（抹茶に含まれるタンニン及びカフェイン、ココアに含まれるテオブロミン、チョコレート及びココアに含まれるポリフェノール、錠剤・カプセル等のサプリメントに含まれる水溶性ビタミン等）が炭水化物として算出され、その寄与が無視できない場合、これらの成分を別途に測定し、差し引いたものを炭水化物とすることもある。なお、タンニン、カフェイン、テオブロミン及びポリフェノールの分析は「日本食品標準成分表分析マニュアル」に記載された方法に準拠する。
- 4) 差し引きの結果、数値が負の値となる場合は、炭水化物含量を0として差し支えない。

### ア 灰分

食品の灰分は、ある温度で灰化して有機物及び水分を除いた残留物の量とする<sup>注1)</sup>。

### [注]

- 1) 厳密には灰分と無機質の総量とは一致しない。例えば、有機物に由来する炭素が灰化中に炭酸塩になることがあり、また、塩素の一部が灰化によって失われることもある。それらの程度は試料中の無機質の組成と、灰化の温度や時間等によっても異なってくる。

(1) 酢酸マグネシウム添加灰化法<sup>注1)</sup>

① 適用される食品

リン酸を多く含む試料に有効な方法で、小麦粉を始めとして米、麦等の穀物及びその加工品に適用される。

② 装置及び器具

- ・灰化容器：直径6 cm程度の磁製蒸発皿、又は容量15～30 mL程度の磁製るつぼを用いる。
- ・電気炉：熱電対温度計付きのもので550～600±10 °Cに設定できるものを用いる。
- ・デシケーター：乾燥剤を入れておく。

③ 試薬

- ・酢酸：特級
- ・メタノール：特級
- ・酢酸マグネシウム溶液：酢酸マグネシウム（特級）15 gに脱イオン水約150 mLを加え、さらに酢酸2 mLを添加し、かき混ぜながら水浴上で加温して溶解する。これにメタノールを加えて1 Lとする。

④ 測定

あらかじめ恒量を求めた灰化容器 ( $W_0$  g) に、試料約3 gを精密に量る ( $W_1$  g)。酢酸マグネシウム溶液3 mLを正確に量り、試料全体に均一にしみわたるように加える。約5分間放置して、過剰のメタノールを蒸発させ、さらに予備乾燥した後、予備灰化し、600 °Cに達した電気炉に入れ、3～4時間灰化する。灰化後、灰化容器を取り出し、温度が200 °C近くまで放冷してデシケーターに移し、室温に戻った後秤量する。同じ操作を恒量 ( $W_2$  g) になるまで繰り返す。

別に酢酸マグネシウム溶液3 mLを恒量を求めた灰化容器 ( $W_3$  g) に量り、以下同様に灰化操作を行った後秤量 ( $W_4$  g) し、空試験値を求める。

⑤ 計算

$$\text{試料中の灰分含量 (g/100 g)} = \frac{(W_2 - W_0) - (W_4 - W_3)}{W_1 - W_0} \times 100$$

[注]

- 1) 過剰のリン酸を含む試料では、灰化時に灰が溶融して完全な灰化が困難となる。酢酸マグネシウム添加灰化法は、このリン酸を中和してマグネシウム塩とし、溶融を防いで迅速に灰化する方法である。

(2) 直接灰化法

① 適用される食品

550～600 °Cで試料を灰化したとき、恒量の得られる全食品に適用される。乾燥試料はそのまま、そのほかの試料は適当な前処理を行い、灰化しやすい状態にして適用する。

## ② 装置及び器具

- ・灰化容器：直径 6 cm 程度の磁製蒸発皿、又は容量 15～30 mL 程度の磁製るつぼを用いる。
- ・電気炉：熱電対温度計付きのもので 550～600±10 °C に設定できるものを用いる。
- ・デシケーター：乾燥剤を入れておく。

## ③ 試料の調製及び前処理

試料により、次のような前処置を行う。

### 1) 前処理不要なもの

穀類、豆類、そのほか以下に含まれない乾燥食品等。

### 2) 予備灰化を要するもの

予備灰化は、できれば全食品に適用するのがよい。特に、砂糖、砂糖菓子類、精製でんぷん、卵白、まぐろ、かつお、いか、えび等の魚介類等、灰化時にふくれて容器の外へあふれ出るおそれのあるものは、あらかじめ弱火で灰化容器の下面のみを熱し、内容物があふれ出ないように注意しながら徐々に灰化する必要がある。

### 3) 予備乾燥を必要とするもの

野菜、果実、多くの動物性食品のように、水分の多いものや酒、ジュース、牛乳等の液体試料は水浴上又は乾燥器内で水分を蒸発させる必要がある。

### 4) 予備燃焼を要するもの

油脂類、バター等は十分に乾燥後、試料を加熱し、あるいは加熱しつつ点火して燃焼させる必要がある。

## ④ 測定

あらかじめ恒量にした灰化容器 ( $W_0$ g) に、適量の試料を精密に量り ( $W_1$ g)、必要な前処理を行った後、550～600 °C の温度に達した電気炉に入れ、白色又はこれに近い色になるまで灰化する。灰化後、灰化容器を取り出し<sup>注1)</sup>、温度が 200 °C 近くになるまで放冷してからデシケーターに移し、室温に戻った後秤量する。同じ操作 (灰化、放冷、秤量) を恒量 ( $W_2$ g) になるまで繰り返す。

灰化した際に、炭塊の残存が認められる場合は灰に水を加えて溶かし、未灰化物を露出させた後水浴上で蒸発乾固する。次いで、水浴上又は 100 °C 程度のホットプレート上で十分に乾燥後、再び 550～600 °C で灰化を行い、恒量になるまで数回この操作を繰り返す。

また、残存する炭塊がかなり多い場合、放冷後熱水で灰を湿らせた後炭塊をガラス棒で突き砕き、熱水約 10 mL を加えてよくかき混ぜ、可溶物を抽出する。炭塊の量に応じ、7～9 cm のろ紙<sup>注2)</sup>を用いて、傾斜法にてろ過し、50 mL 容のビーカー中にろ液を集める。再び灰化容器に少量の熱水を加え、同様にろ過する。残渣をろ紙ごと灰化容器に移し、用いた漏斗を洗ってろ液

に合わせる。灰化容器は乾燥後、再び 550～600 °C で灰化を行い、炭塊が残るようならこの操作をもう一度行う。灰化、放冷後、先のろ液を灰化容器に移し少量の水でビーカーを洗ってこれも移し、水浴上又は 100 °C 程度のホットプレート上で蒸発乾固後、再び 550～600 °C で灰化し、恒量を求める。

⑤ 計算

$$\text{試料中の灰分含量 (g/100 g)} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times 100$$

[注]

- 1) 灰が舞い上がることもあるので、灰化容器にふたをしておくこと安全である。
- 2) JIS 5 種 A 又は 6 種相当のろ紙を用い、表示されているろ紙中の灰分量を試料灰分量から差し引く。無灰ろ紙を用いた場合、ろ紙の灰分は無視して差し支えない。

(3) 硫酸添加灰化法<sup>注1)</sup>

① 適用される食品

精製度の高い砂糖等に適用される。

② 装置及び器具

- ・灰化容器：直径 6 cm 程度の磁製蒸発皿、又は容量 15～30 mL 程度の磁製るつぼを用いる。
- ・デシケーター：乾燥剤を入れておく。
- ・電気炉：熱電対温度計付きのもので 550～800±10 °C に設定できるものを用いる。

③ 試薬

- ・濃硫酸：特級

④ 測定

あらかじめ恒量にした灰化容器 ( $W_0$  g) に、試料 5～30 g を精密に量る ( $W_1$  g)。液状試料の場合は水浴上で蒸発乾固する。試料に濃硫酸 0.5～5 mL を加え、加温して全体を炭化膨潤させた後、ゆっくりと加熱して過剰の硫酸を追い出す。灰化容器を電気炉に入れて 550 °C でほとんど炭素分のなくなるまで灰化する。冷却後、再び数滴の濃硫酸で湿らせ、800 °C で灰化する。灰化後、灰化容器を取り出し、アルミトレイ等の上で温度が 200 °C 近くになるまで放冷してデシケーターに移し、室温に戻った後、秤量する。

同じ操作を恒量 ( $W_2$  g) になるまで繰り返す。灰分含有率を硫酸灰分として算出する。

⑤ 計算

$$\text{試料中の硫酸灰分含量 (g/100 g)} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times 100$$

[注]

- 1) 硫酸添加灰化法が記載されているものには、製糖便覧、ICUMSA Methods (International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis) 等がある。

ただし、硫酸添加灰化法で得られる残留物は硫酸灰分であるため、灰分の多い黒糖、粗糖蜜等の試料では過大に評価されるので、これらの試料への適用は望ましくない。

## イ 水分<sup>注1)</sup>

代表的な水分の分析法にカールフィッシャー法と加熱乾燥法<sup>注2)</sup>がある。加熱乾燥法には減圧加熱乾燥法と常圧加熱乾燥法とがあり、さらにこれらの補完的な方法として乾燥助剤法とプラスチックフィルム法とがある。

### [注]

- 1) ここに記載するほか、水と混り合わない有機溶剤と試料を一緒に加熱し、共沸により留出する水の容量そのものを量り、水分とする蒸留法等がある。蒸留法はほとんどの食品に適用できるが、水分が非常に多いもの、又は非常に少ない試料には適さない。特に、香辛料及び水分含量の多い油脂食品に適用できる。
- 2) 水分以外の揮発成分（アルコール類、酢酸等の揮発酸）が含まれる場合には、これらも水分として測り込まれるので、これらのものを別途に測定し、差し引くことが必要である。

## (1) カールフィッシャー法<sup>注1)</sup>

カールフィッシャー法は、メタノール等の低級アルコール及びピリジン等の有機塩基の存在下で、水がヨウ素及び二酸化硫黄と次の式に示すように定量的に反応することを利用して水分を測定する方法である。



### ① 装置及び器具

- ・カールフィッシャー電気滴定装置：通例、自動ビュレット、滴定フラスコ、かき混ぜ機及び定電圧分極電流滴定装置又は定電流分極電位差滴定装置からなる。カールフィッシャー試液は吸湿性が非常に強いので、装置は外部からの吸湿を防ぐようにする。防湿には、シリカゲル又は水分滴定用塩化カルシウム等を用いる。

### ② 試薬

- ・カールフィッシャー試液<sup>注2)</sup>
- ・メタノール（脱水）：特級（水分が 0.05 w/v% 以下のもの）
- ・水・メタノール標準溶液<sup>注3)</sup>

### ③ 測定

カールフィッシャー試液による滴定は湿気を避けて行い、原則として、これを標定したときの温度と同一の温度で行う。被滴定液中に一对の白金電極

を浸し、可変抵抗器を適当に調節して電極間に微小電圧を加え、カールフィッシャー試液を滴下するとき変化する電流 ( $\mu\text{A}$ ) を測定し (定電圧分極電流滴定法)、滴定が進むにつれて回路中の電流が大きく変化し、数秒で再び元の位置に戻る。滴定の終点に達すると、この電流の変化が一定時間持続する (通例、30 秒間以上)。この状態になったときを滴定の終点とする。又は電極間に微小電流を流しておき、カールフィッシャー試液を滴下するとき変化する電位差 ( $\text{mV}$ ) を測定し (定電流分極電位差滴定法)、滴定が進むにつれて回路中の電圧計の値が数百ミリボルトの分極状態から急に減少し、消極状態となり数秒で再び元の位置に戻る。滴定の終点に達すると、消極状態が一定時間持続する (通例、30 秒間以上)。この状態になったときを滴定の終点とする。ただし、逆滴定により定電圧分極電流滴定法を用いる場合は、カールフィッシャー試液が過量に存在する間は電流計の針が振り切れ、終点に達すると急に元の位置に戻る。定電流分極電位差滴定法を用いる場合はカールフィッシャー試液が過量に存在する間はミリボルトメーターの値が元の位置にあり、終点に達すると一定の電圧がかかる。

カールフィッシャー試液による滴定は、次のいずれの方法によってもよい。

1) 直接滴定

カールフィッシャー用メタノール (脱水) 適量を乾燥滴定フラスコにとり、これをあらかじめカールフィッシャー試液で終点まで滴定してフラスコ内を無水の状態にしておく。次に水分 5~30 mg を含むような量の試料を精密に量り ( $W \text{ mg}$ )、速やかに滴定フラスコに入れ、かき混ぜて溶かし、激しくかき混ぜながらカールフィッシャー試液で終点まで滴定する ( $V \text{ mL}$ )。

2) 逆滴定

カールフィッシャー用メタノール (脱水) 適量を乾燥滴定フラスコにとり、これをあらかじめカールフィッシャー試液で終点まで滴定してフラスコ内を無水の状態にしておく。次に水分 5~30 mg を含むような量の試料を精密に量り ( $W' \text{ mg}$ )、速やかに滴定フラスコに入れ、過量のカールフィッシャー試液の一定量 ( $V' \text{ mL}$ ) を加え、かき混ぜて溶かし、激しくかき混ぜながら水・メタノール標準溶液で終点まで滴定する ( $H \text{ mL}$ )。

④ 計算

1) 直接滴定

$$\text{試料中の水分含量 (g/100 g)} = \frac{V \times f}{W} \times 100$$

2) 逆滴定

$$\text{試料中の水分含量 (g/100 g)} = \frac{V' \times f - H \times f'}{W'} \times 100$$

f: カールフィッシャー試液の 1 mL に対応する水 ( $\text{H}_2\text{O}$ ) の mg 数 (力価)



f : 水・メタノール標準溶液 1 mL 中の水 (H<sub>2</sub>O) の mg 数

[注]

- 1) 測定法には、容量測定法と電量測定法があるが、ここでは容量測定法の例を示した。容量測定法は、反応に必要なヨウ素を水分測定用試液に溶解させ、試料中の水と反応して消費されたヨウ素の滴定量より、水分を測定する方法である。電量法は、ヨウ化物イオンを混合した水分測定用試液を用い、電解によりヨウ素を発生させる。ヨウ素が定量的に水と反応することに基づき、電解に要した電気量より、水分を測定する方法である。いずれも装置、試薬の調製、取扱いに注意を要するので、取扱説明書等を参考にすること。

なお、アスコルビン酸やアルデヒド等還元力の強いものはヨウ素を消費するので、これらが多量に存在する試料には適さない。

- 2) 市販品を用いることができる（三菱化学製、カールフィッシャー試液 SS 等）。カールフィッシャー試液は通常ヨウ素、二酸化硫黄及びピリジンのモル比が 1:3:10 であり、これにメタノールが加わる。しかし、カールフィッシャー試液はメタノールが共存すると分解が速い。市販の試液はメタノールを含まないので、必ずメタノールを含む溶剤中で滴定する。

この試液の標定は以下のように行う。

標定：測定の操作法に従い、メタノール（脱水）25 mL を乾燥滴定フラスコに入れ、カールフィッシャー試液を終点まで注意して加える。次に水約 50 mg を精密に量って速やかに加え、湿気を遮り、カールフィッシャー試液で終点まで測定する。カールフィッシャー試液の 1 mL に対応する水 (H<sub>2</sub>O) の mg 数 f を次式によって求める。

$f = \text{水 (H}_2\text{O) の採取量 (mg)} / \text{水に対するカールフィッシャー試液の滴定量 (mL)}$

- 3) メタノール（脱水）500 mL を量り、1,000 mL の乾燥全量フラスコに入れ、水 2 mL を量って加え、メタノールを加えて 1,000 mL とする。この液の標定は、カールフィッシャー試液の標定に続いて行う。遮光して湿気を避け、冷所に保存する。

市販品を用いることができる（三菱化学製、標準水メタノール 2 mgH<sub>2</sub>O/mL (20°C)）。

水・メタノール標準溶液の標定は以下のように行う。

標定 測定の操作法に従い、メタノール（脱水）25 mL を乾燥滴定フラスコに入れ、カールフィッシャー試液を終点まで注意して加える。次にカールフィッシャー試液 10 mL を正確に量って加え、この水・メタノール標準溶液で終点まで滴定する。水・メタノール標準溶液 1 mL 中の水 (H<sub>2</sub>O) の mg 数 f を次式によって求める。

$f = (f \times 10) / \text{水・メタノール標準溶液の滴定量 (mL)}$

f: カールフィッシャー試液 1 mL に対応する水 (H<sub>2</sub>O) の mg 数

[参考文献]

- 1) 日本食品科学工学会 新・食品分析法編集委員会編：“新・食品分析法”, 24, 光琳 (1996)
- 2) 日本薬学会編：“衛生試験法・注解”, 258, 金原出版 (1990)
- 3) 食品、添加物等の規格基準 (昭和 34 年厚生省告示第 370 号) の第 2 添加物の B 一般試験法「水分測定法」(カールフィッシャー法)
- 4) 第十六改正日本薬局方 一般試験法「水分測定法」(カールフィッシャー法)

## (2) 乾燥助剤法

### ① 適用される食品

加熱すると融解し、表面に堅い被膜を形成し、内部の水分が蒸発しにくい食品に適用する。ケイ砂等の乾燥助剤を用いて表面積を大きくし、水蒸気が食品組織から抜け出る道を作って乾燥させる。

### ② 装置及び器具

- ・電気定温乾燥器<sup>注1)</sup> (又は真空乾燥器)
- ・秤量皿：アルミ製又はガラス製、上部の直径 55 mm、底部の直径 55 mm、深さ 40 mm 程度のもの。
- ・デシケーター：乾燥剤を入れておく。

### ③ 試薬

- ・乾燥助剤：精製ケイ砂 (40~60 メッシュ程度) 又はけいそう土<sup>注2)</sup>

### ④ 測定

秤量皿にケイ砂約 30 g、又はけいそう土約 10 g をとり、かき混ぜ用ガラス棒を 1 本入れ、所定の温度<sup>注3)</sup> で 1~2 時間乾燥後室温まで放冷し、試料を入れないときの恒量 (W<sub>0</sub> g) を求めておく。これに適量の試料 (通常 2~3 g) を採取し、秤量 (W<sub>1</sub> g) する。次いで、試料と乾燥助剤がよく混和するように、ガラス棒でかき混ぜながら水浴上で加熱する<sup>注4)</sup>。必要があれば、少量の水を加えて混和をうながす。その後の本乾燥は、試料によって常圧加熱乾燥法又は減圧加熱乾燥法を適用し、室温まで放冷し秤量する (W<sub>2</sub> g)。

### ⑤ 計算

$$\text{試料中の水分含量 (g/100 g)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100$$

[注]

- 1) 60~150 °C の温度範囲において所定の温度の ±2 °C に調節可能なもので、器内の温度分布の均一なものが望ましく、強制循環通風式が一般的に用いられる。
- 2) ケイ砂は種々の粒度のものが市販されている。吸湿性の高いものは、次のように精製する。すなわち、希塩酸 (1→4) を加え、水浴上で加

温し、希塩酸を除いた後、酸性反応がなくなるまで水洗する。これを乾燥後 600～700 °C に強熱した後、デシケーター中で放冷し、密栓して保存する。けいそう土（商品名：セライト）も吸湿性が少なければ、特に精製する必要はない。吸湿性の高いものは、約 2 倍量の希塩酸（1 → 2）を加えて沸騰前後の温度で数時間加温した後、酸性反応がなくなるまで水洗し、次いで約 135 °C で乾燥後、ポリエチレン容器等に保存する。

- 3) 試料を加熱乾燥するときと同じ温度で行う。
- 4) 本乾燥を 60 °C で行う試料のときは、水浴上の加熱温度も 60 °C 付近で行うが、非常に時間が掛かる。かき混ぜるとき、助剤が飛散しないよう細心の注意が必要である。

### (3) 減圧加熱乾燥法

#### ① 適用される食品

多くの食品に基準的な方法として適用できる。一般に水銀柱 5～100 mm の減圧度で、熱によって変化しやすい食品は 60～70 °C で、比較的安定な食品は 90～100 °C で加熱する。

#### ② 装置及び器具

- ・真空乾燥器
- ・アルミ製秤量皿<sup>注1)</sup>：上部の直径 55 mm、底部の直径 50 mm、深さ 25 mm、厚さ 0.2～0.3 mm 程度、ふたの深さは約 10 mm で、そのうち 5 mm ぐらいが容器にはまるようになっているもの。
- ・デシケーター：乾燥剤を入れておく。

#### ③ 測定

所定の温度に調節した定温乾燥器に秤量皿を入れ、1～2 時間加熱後デシケーターに移す。放冷して室温に達したら、直ちに秤量する。再び加熱、放冷、秤量の操作を繰り返し恒量 ( $W_0$  g) を求める。次に、適量の試料（通常 2～3 g）を精密に量り ( $W_1$  g)、ふたをわずかにずらし<sup>注2)</sup>、所定の温度に調節した真空乾燥器に入れ、真空ポンプで吸引しながら、所定の減圧度に設定する<sup>注3)</sup>。一定時間（約 5 時間）減圧乾燥後に真空ポンプを止め、洗気瓶中の濃硫酸を通して除湿した空気を乾燥器内に静かに導入して常圧に戻し、秤量皿を取り出し、ふたをしてデシケーター中で放冷後秤量する。一般には、恒量 ( $W_2$  g) に達するまで減圧、乾燥、放冷、秤量を繰り返す<sup>注4)</sup>。ケイ砂やけいそう土等の乾燥助剤を用いるべき食品は、乾燥助剤法の場合と同じ操作で、一度水浴上でほとんど乾燥させたものを所定の温度と減圧下で乾燥する。

#### ④ 計算

$$\text{試料中の水分含量 (g/100 g)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100$$

[注]

- 1) ガラス製のはかり瓶でもよいが、質量が大きいため、測定の真度に

影響する。

- 2) 乾燥終了後、急激に空気を入れて常圧に戻すと、試料が舞い上がることがある。軽い粉末等のときはふたを取らずに、ずらしたほうがよい。
- 3) 乾燥器の温度は、減圧にするといったん5℃ぐらい降下するが、徐々に設定温度に戻るなので、調節し直さずそのまま放置してよい。
- 4) 繰り返しの乾燥は、普通2時間ずつ行う。室温に達しないうちに秤量を行うと、空気の対流のため、実際の質量よりも軽く量られる。前後2回の質量差が0.5 mg 以下となったら恒量とみなす。試料によっては熱分解のために、秤量のたび、数 mg 以上質量減を来す場合があるので、水分 (%) として 0.1 %以内の増量になったときを恒量とみなすこともある。

#### (4) 常圧加熱乾燥法

##### ① 適用される食品

常圧加熱乾燥法は操作が容易であるため、多くの食品に適用される。一般に100～135℃の範囲の一定の加熱温度及び乾燥時間が適用される。減圧加熱乾燥法も含めた加熱乾燥法による水分定量条件の例を表1に示す。

##### ② 装置及び器具

- ・電気定温乾燥器<sup>注1)</sup>
- ・アルミ製秤量皿：上部の直径55 mm、底部の直径50 mm、深さ25 mm、厚さ0.2～0.3 mm程度、ふたの深さは約10 mmで、そのうち5 mmぐらいが容器にはまるようになっているもの。
- ・デシケーター：乾燥剤を入れておく。

##### ③ 測定

所定の温度に調節した定温乾燥器に秤量皿を入れ、1～2時間加熱後デシケーターに移す。放冷して室温に達したら、直ちに秤量する。再び加熱、放冷、秤量の操作を繰り返し恒量(W<sub>0</sub> g)を求める。次に、適量の試料(通常2～3 g)を素早く精密に量り、平らに広げ、ふたをし秤量(W<sub>1</sub> g)する。定温乾燥器の中にふたをずらして入れる。定温乾燥器が所定の温度に達してから、定められた時間乾燥後、乾燥器中で素早く容器にふたをし、デシケーターに移し放冷する。室温に達したら直ちに秤量する(W<sub>2</sub> g)。一般には、恒量が得られるまでこの操作を繰り返し行う<sup>注2)</sup>。

##### ④ 計算

$$\text{試料中の水分含量 (g/100 g)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100$$

[注]

- 1) 60～150℃の温度範囲において所定の温度の±2℃に調節可能なもので、器内の温度分布の均一なものが望ましく、強制循環通風式が一般的に用いられる。

2) 室温に達しないうちに秤量を行うと、空気の対流のため、実際の質量よりも軽く量られる。前後2回の質量差が0.5 mg 以下となったら恒量とみなす。試料によっては熱分解のために、秤量のたび、数 mg 以上質量減をきたす場合があるので、水分 (%) として 0.1 %以内の減量になったときを恒量とみなすこともある。

表1 加熱乾燥法による水分定量条件の例\*

食品群	乾燥温度 (°C)	乾燥時間 (時間)
穀粒、乾めん、せんべい類	135	3
穀粉（小麦粉、そば粉等）、でんぷん類	135	1 - 2
めし、生めん、ゆでめん	135	2
パン類（菓子パン等異種材料を多く含むものを除く）	135	1
いも類	100	5
切干しいも、乾燥マッシュポテト	105	3
大豆及び油の多い豆類（全粒）	130	3
その他の豆類	135	3
きな粉、脱脂大豆、凍豆腐	130	1
煮豆	V100**	5
油あげ、豆腐、納豆	100	5
みそ	V70	5
精製糖	105	3
液状糖、転化糖	V100	2 - 3
糖みつ	V90	3
油脂	105	1
種実（乾燥品、ロースト品）	130	1
くり、ぎんなん	130	2
魚介類及びその加工品	105	5
獣、鳥、鯨肉及びその加工品	135	2
卵	V100	5
液状乳、クリーム、アイスクリーム	98 - 100	3
発酵乳、乳酸菌飲料	V100	4
粉乳、練乳	98 - 100	3 - 4
チーズ	105	5
野菜、果実及びその加工品	V70	5
きのこ、海藻	105	5
甘酒、酒粕	V70	5
茶	98 - 100	5
コーヒー豆、ココア	105	5

しょうゆ、ソース、乾燥スープ等調味料	V70	5
生・半生菓子	105	5
洋菓子	V70	5

\* : 全ての食品を本表の食品群に当てはめることはできない。一般的には、原材料等を考慮し最適な条件を設定する必要がある。特に、加熱乾燥後の試料の色が変わったり、焦げ等が発生している場合は、加熱温度を下げる又は減圧加熱乾燥を採用する等、乾燥条件の検討が必要である。

\*\* : V は減圧加熱乾燥 (Vacuum) を示す。

#### (5) プラスチックフィルム法<sup>注1)</sup>

##### ① 適用される食品

粘質状、ペースト状等の食品に適用する。

##### ② 装置及び器具

- ・電気定温乾燥器<sup>注2)</sup> (又は真空乾燥器)
- ・ポリエチレンフィルム製袋: 硬質ポリエチレンフィルム製で、幅 5~7.5 cm、長さ 12~14 cm、厚さ 0.04~0.06 mm くらいの低圧~中圧重合のもの<sup>注3)</sup>。
- ・デシケーター: 乾燥剤を入れておく。

##### ③ 測定

袋の質量を精密に量り ( $W_0$  g)、これに適量の試料<sup>注4)</sup> を採取後、袋の口を三つ折りにして、秤量 ( $W_1$  g) する。丸い棒をローラーにして、袋の折りしろを残し、外側から試料を圧延し、試料を袋の内面に薄く伸ばす。袋の口を開き袋をふくらませ、乾燥中閉じないようにする。所定の温度に調節された電気定温乾燥器又は真空乾燥器に入れ、所定の時間加熱乾燥する。次いで、フィルム袋の口を三つ折りにして閉じ、クリップで止めてデシケーター中で放冷する。室温に達したらクリップをはずし、秤量 ( $W_2$  g) する。通常は、一度で恒量に達するが、必要ならば袋の口を開き、再び所定の時間乾燥を行い放冷、秤量を繰り返す。

##### ④ 計算

$$\text{試料中の水分含量 (g/100 g)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100$$

#### [注]

- 1) フィルム袋のみで乾燥する直接フィルム法と、乾燥助剤としてけいそう土を添加混合してフィルム袋で乾燥するけいそう土添加フィルム法がある。乾燥は常圧加熱及び減圧加熱のいずれも適用できるが、ポリエチレンフィルムの耐熱限度から加熱温度は 105 °C 以下に限定される。105 °C 以上の加熱乾燥が必要で、かつ粘質状の食品の水分測定にはアルミニウムはく製袋を用いて測定する方法もある。
- 2) 60~150 °C の温度範囲において所定の温度の $\pm 2$  °C に調節可能なもので、器内の温度分布の均一なものが望ましく、強制循環通風式が一般

的に用いられる。

- 3) 市販のハイゼックス（低圧法、三井東圧化学）、ショウレックス（中庄法、昭和油化）等は吸湿はごくわずかであるため、食品の水分測定には恒量を出す必要がなく、使用時に質量を量って用いる。ただし、プラスチックは静電気を帯びやすく、帯電すると秤量誤差が大きくなるので、不必要に擦ったりすることは避けなければならない。
- 4) 乾物量として1～2.5 g、袋の内面に薄く伸びる程度。

## 6 糖質

糖質は、当該食品の質量から、たんぱく質<sup>注1)</sup>、脂質、食物繊維<sup>注2)</sup>、灰分<sup>注3)</sup>及び水分量を除いて算出する<sup>注4)</sup> <sup>注5)</sup>。

ア たんぱく質、脂質、食物繊維

イ 灰分及び水分の分析方法等は、それぞれ1、2、8並びに5ア及びイによる。

### [注]

- 1) たんぱく質以外の窒素成分を豊富に含む食品（例えば、白子のように核酸を豊富に含む食品、大豆レシチン含有食品のように含窒素脂質であるレシチンを豊富に含む食品）にあつては、窒素定量換算法を適用して得られたたんぱく質量は実際量より過大である点に留意すべきである。
- 2) 食物繊維の分析法に用いるプロスキー法では、処理残渣中の灰分を補正することになっている。ところが、試料中にカルシウムが含まれると、これがプロスキー法で用いられるリン酸緩衝液と反応してリン酸カルシウムの沈殿を形成し、しかもリン酸カルシウムは結晶水を含むので灰分として100%回収できない。  
このため、「カルシウム含有食品」のようにカルシウムを豊富に含む食品にあつては、リン酸緩衝液を用いて得られた食物繊維量は実際量より過大である点に留意すべきである。
- 3) 大豆レシチン含有食品等含リン脂質であるレシチンを豊富に含む食品にあつては、リンが脂質と灰分の両方に重複して測り込まれる点に留意すべきである。
- 4) 抹茶にはタンニンとカフェインが100g当たりでそれぞれ約10gと約3g含まれている。また、ココアにはテオブロミンが100g当たりで2g前後含まれている。また、水溶性ビタミンも糖質として算出される。これらの成分はエネルギーとして利用されないため、糖質として算出され、その寄与が無視できない場合、これらの成分を別途に測定し、差し引いたものを糖質とすることもある。なお、タンニン、カフェイン、テオブロミン及びポリフェノールの分析は最新版の「日本食品標準成分表分析マニュアル」に記載された方法に準拠する。
- 5) 差引きの結果、数値が負の値となる場合は、糖質含量を0として差

し支えない。

## 7 糖類

単糖類又は二糖類であって、糖アルコールでないものを糖類とする。

### (1) ガスクロマトグラフ法<sup>注1)</sup>

#### 1) 単糖類、二糖類及び糖アルコール類

##### ① 装置及び器具

- ・ガスクロマトグラフ (GC) : 水素炎イオン化検出器 (FID) 付き
- ・ロータリーエバポレーター
- ・充填カラム : ガスクロマトグラフィー用けいそう土を担体とし、50%トリフルオロプロピル-メチルシリコンを液相としたもの又は同等品。

##### ② 試薬

- ・標準品 : 水分を測定し<sup>注2)</sup>、無水物に換算する。
- ・エタノール、石油エーテル、水酸化ナトリウム : 特級
- ・50 v/v%エタノール : 99.5 v/v%エタノール - 水 (1:1)
- ・10 w/v%水酸化ナトリウム溶液
- ・ピリジン : 特級試薬に水酸化カリウム (粒状、特級) を加え、よく振り混ぜて脱水する。
- ・トリメチルクロロシラン (TMCS) : GC 用トリメチルシリル化試薬
- ・ヘキサメチルジシラザン (HMDS) : GC 用トリメチルシリル化試薬
- ・ピレン : 内標準物質

##### ③ 試料の調製

固体試料はコーヒーミル等で粉碎する。

##### ④ 試験溶液の調製

#### 1) 基本操作

50 mL 容ビーカーに試料の適当量 (0.5~5 g) を精密に量り (W g)、約 30 mL の水を加え、液性が酸性の場合には 10 w/v%水酸化ナトリウム溶液で中和する<sup>注3)</sup>。30 分間超音波抽出した後、水で全量を 50 mL 容全量フラスコに移して定容する (V mL)。不溶物がある場合はろ紙<sup>注4)</sup> でろ過し、ろ液をメンブランフィルター (0.45 μm) でろ過して試験溶液とする。不溶物の量が多い場合は、定容する前にろ紙でろ過し、ビーカー及びろ紙を水で洗浄してからろ液を集めて定容する。試験溶液は目的成分の濃度によって適宜希釈又は濃縮して (希釈倍数 : D) GC 用試験溶液とする。

#### 2) たんぱく質又は多糖類を多く含む食品の場合

水の代わりに 50 v/v%エタノールを用いて、1) と同様の操作を行う。

#### 3) 塩類を多く含む食品の場合

1) 又は 2) により調製した試験溶液 (水溶液にしたもの) 5~10 mL を採取して電気透析装置を用いて脱塩し<sup>注5)</sup>、GC 用試験溶液とする。



4) 脂質を多く含む食品の場合

50 mL 容の遠心管に試料の適当量 (0.5~5 g) を精密に量る (W g)。これに石油エーテル 40 mL を加えて、時々かくはんしながら 15 分間放置した後、遠心分離 (2,000 回転/分、10 分間) して上澄み液を傾斜法により除去する。この脱脂操作を再度繰り返した後、窒素気流中又は 40 °C の水浴中で残存する石油エーテル分を完全に蒸散させる。得られた残留物について、1) 又は 2) と同様の操作を行う。

⑤ 標準溶液の調製

標準品 100 mg を約 80 mL の水に溶解した後、変旋光 ( $\alpha \leftrightarrow \beta$ ) を平衡に達せしめるため約 80 °C の水浴中で 1 時間加熱する。冷後、水を加えて正確に 100 mL (濃度: 1 mg/mL) とする。

⑥ トリメチルシリル化

試験溶液の適量 (糖量として約 10 mg) を正確に量り、ロータリーエバポレーターを用いて水分を留去し、乾固させる。ピレンのピリジン溶液 (濃度: 0.2 mg/mL) 2 mL を加えて溶かした後、TMCS 0.1 mL、HMDS 0.2 mL を加えて、室温で 20~60 分間反応させる<sup>注6)</sup>。

⑦ 測定

反応液の 0.5~1  $\mu$ L を GC に注入する。

<ガスクロマトグラフ操作条件例<sup>注7)</sup>>

カラム: 3%Silicone DC QF-1、Chromosorb W (AW、DMCS) 60~80 メッシュ、3 mm $\times$ 2 m、ガラス製

カラム温度: 120~240 °C (昇温)、6 °C/分

注入口温度: 250 °C

キャリアーガス: 窒素又はヘリウム 40~60 mL/分

⑧ 検量線の作成

標準溶液の 0.5、1、2、3、5 mL をそれぞれ正確に量り、⑥~⑦の操作を試験溶液の場合と同時に行って検量線を作成する。

⑨ 計算

$$\text{試料中の各糖類含量 (g/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W} \times \frac{100}{1,000}$$

C: 検量線より求めた各糖類の濃度 (mg/mL)

V: 定容量 (mL)

D: 希釈倍数

W: 試料採取量 (g)

[注]

1) 糖類は一般に分子間の力が強いため揮発性が弱く、しかも熱にも不安定なため、直接 GC で定量することができない。そのために各種の揮発性誘導体に転換して、GC 分析に供する。

糖類の GC 用誘導体としてはトリメチルシリル (TMS) 誘導体、トリ

フルオロアセチル (TFA) 誘導体、アセチル (Ac) 誘導体、メチル (Me) 誘導体、また糖をオキシムにしてから誘導体とする方法等がある。現在、糖の揮発性誘導体としては TMS 誘導体が一般的である。

- 2) 通常カールフィッシャー法により測定する。標準品の量が少量の場合は、減圧加熱乾燥法（例えば 60 °C、5 時間）で乾燥したものをを用いる。
- 3) 酸性のまま抽出すると糖が一部分解してしまうおそれがあるため、あらかじめ pH5.0~7.0 に調整する。
- 4) JIS 5 種 B 又は同等品のろ紙を用いる。
- 5) GC 用試験溶液中にナトリウムイオン等が多量に存在すると、妨害ピークを与えたり、カラムの劣化原因にもなるので、脱塩処理を行ったほうがよい。脱塩の方法は、電気透析装置のほか、イオン交換樹脂によってもよい。
- 6) 糖がピリジンに溶解難い場合等は、加温しながら反応させる。反応液は塩化アンモニウムの析出によって白濁するが、上澄み液をそのまま GC に注入する。
- 7) TMS 誘導体を用いて、食品中の糖類を定量するのに適しているとされている充てん剤（液相）には、Silicone SE-30、Silicone OV-1、Silicone OV-101、Silicone SE-52、Silicone SE-54、Silicone OV-17、Silicone DC QF-1、Silicone XE-60 等がある。

## (2) 高速液体クロマトグラフ法

### 1) 単糖類、二糖類及びオリゴ糖類

#### ① 装置及び器具

- ・高速液体クロマトグラフ (HPLC) : 屈折率検出器付き<sup>注1)</sup>
- ・カラム<sup>注2)</sup> : アミノプロピル基を結合させたシリカゲルを充てんしたカラム

#### ② 試薬

- ・標準品 : 水分を測定し<sup>注3)</sup> 無水物に換算する。
- ・アセトニトリル : HPLC 用又は残留農薬用
- ・エタノール、石油エーテル、水酸化ナトリウム : 特級
- ・50 v/v%エタノール : 99.5 v/v%エタノール-水 (1:1)
- ・10 w/v%水酸化ナトリウム溶液

#### ③ 試料の調製

固体試料はコーヒーミル等で粉碎する。

#### ④ 試験溶液の調製

##### 1) 基本操作

50 mL 容ビーカーに試料の適当量 (0.5~5 g) を精密に量り (W g)、約 30 mL の水を加え、液性が酸性の場合には 10 w/v%水酸化ナトリウム溶液

で中和する<sup>注4)</sup>。30 分間超音波抽出した後、水で全量を 50 mL 容全量フラスコに移して定容する (V mL)。不溶物がある場合はろ紙<sup>注5)</sup> でろ過し、ろ液をメンブランフィルター (0.45 μm) でろ過して試験溶液とする。不溶物の量が多い場合は、定容する前にろ紙でろ過し、ビーカー及びろ紙を水で洗浄してからろ液を集めて定容する。試験溶液は目的成分の濃度によって適宜希釈又は濃縮して HPLC 用試験溶液とする。

2) たんぱく質又は多糖類を多く含む食品の場合

水の代わりに 50 v/v%エタノールを用いて 1) と同様の操作を行う。

3) 塩類を多く含む食品の場合

1) 又は 2) により調製した試験溶液 (水溶液にしたもの) 5~10 mL を採取して電気透析装置を用いて脱塩し<sup>注6)</sup>、HPLC 用試験溶液とする。

4) 脂質を多く含む食品の場合

50 mL 容の遠心管に試料の適当量 (0.5~5 g) を精密に量る (W g)。これに石油エーテル 40 mL を加えて、時々かくはんしながら 15 分間放置した後、遠心分離 (2,000 回転/分、10 分間) して上澄み液を傾斜法により除去する。この脱脂操作を再度繰り返した後、窒素気流中あるいは 40 °C の水浴中で残存する石油エーテル分を完全に蒸散させる。得られた残留物について、1) 又は 2) と同様の操作を行う。

⑤ 標準溶液の調製<sup>注7)</sup>

1) HPLC 用試験溶液の溶媒が水の場合

標準品各 100 mg を精密に量り、水に溶解して 25 mL に定容する。この液から 2、5 及び 10 mL を採取して、それぞれ水で 20 mL に定容する<sup>注8)</sup>。

2) HPLC 用試験溶液の溶媒が 50 v/v%エタノールの場合

標準品各 100 mg を精密に量り、50 v/v%エタノールに溶解して 25 mL に定容する。この液から 2、5 及び 10 mL を採取して、それぞれ 50 v/v%エタノールで 20 mL に定容する<sup>注8)</sup>。

⑥ 測定

HPLC 試験溶液の 20 μL を HPLC に注入し、各糖のピーク高さ<sup>注9)</sup> を測定する。同様に各標準溶液 20 μL を HPLC に注入して各糖のピーク高さを測定し、検量線を作成する。

<高速液体クロマトグラフ操作条件例>

1) 単糖類及び二糖類

カラム：Wakosil 5NH<sub>2</sub> (和光純薬工業) 又は相当品<sup>注10)</sup>、内径 4.6 mm、長さ 250 mm、ステンレス管

移動相：アセトニトリル - 水 (75:25) <sup>注11)</sup>

検出器：屈折率検出器

流速：1.0 mL/分

温度：室温

2) オリゴ糖類

カラム：Wakosil 5NH<sub>2</sub>（和光純薬工業）又は相当品<sup>注10</sup>、内径 4.6 mm、長さ 250 mm、ステンレス管

移動相：アセトニトリル - 水（70:30）<sup>注11</sup>

検出器：屈折率検出器

流速：1.0 mL/分

温度：室温

⑦ 計算

$$\text{試料中の各糖含量 (g/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W} \times \frac{100}{1,000}$$

C：検量線より求めた各糖類の濃度（mg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

[注]

- 1) 糖の検出には、屈折率検出器のほかに蛍光検出器（蛍光誘導体化が必要）又はパルス電気化学検出器等も利用できる。
- 2) 測定する糖の種類や試料により種々のカラムが利用可能であるが、ここでは汎用性の高い代表的なもののみを示す。
- 3) 通常カールフィッシャー法により測定する。標準品の量が少量の場合は、減圧加熱乾燥法（例えば 60℃、5 時間）で乾燥したものをを用いる。
- 4) 酸性のまま抽出すると糖が一部分解してしまうおそれがあるため、あらかじめ pH5.0～7.0 に調整する。
- 5) JIS 5 種 B 又は同等品のろ紙を用いる。
- 6) HPLC 用試験溶液中にナトリウムイオン等が多量に存在すると、妨害ピークを与えたり、カラムの劣化原因にもなるので、脱塩処理を行ったほうがよい。脱塩の方法は、電気透析装置のほか、イオン交換樹脂によってもよい。
- 7) 溶媒の種類はピーク高さに影響するので、HPLC 用試験溶液と標準溶液の溶媒を統一する必要がある。試験溶液にエタノール等揮発成分を含む場合、試験溶液を減圧乾固した後、水に再溶解することで、水で調製した標準溶液を使用することができる。
- 8) 標準溶液の濃度は、使用する検出器の感度を考慮して設定する。
- 9) 完全分離しないようなきょう雑ピークが認められる場合、ピーク面積測定では誤差が大きくなるのでピーク高さ測定を採用する。なお、試験溶液を適当な酵素（目的とする糖ときょう雑する糖の組み合わせによりアミログルコシダーゼ、β-フラクトシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ等を使い分ける。）で処理することにより、きょう雑ピークを除去できることがある。
- 10) Shodex Asahipak NH<sub>2</sub>P-50（昭和電工）等のアミノポリマ系カラムも

使用可能。

- 11) 適切な移動相の条件を調整すること。アミノシリカ系カラムは使用時間とともに徐々に溶出時間が短くなるので、溶出時間をほぼ一定に保つように混合比率を調整する。なお、アセトニトリルの割合を増やすと溶出は遅くなる。

## 2) 糖アルコール類

### ① 装置及び器具

- ・高速液体クロマトグラフ (HPLC) : 屈折率検出器付き<sup>注1)</sup>
- ・カラム<sup>注2)</sup> : アミノプロピル基を結合させたシリカゲルを充てんしたカラム又はスルホン化ポリスチレンゲル (鉛型又はカルシウム型) を充てんしたカラム

### ② 試薬

- ・標準品 : 水分を測定し<sup>注3)</sup> 無水物に換算する。
- ・アセトニトリル : HPLC 用又は残留農薬用
- ・エタノール、石油エーテル、水酸化ナトリウム : 特級
- ・50 v/v%エタノール : 99.5 v/v%エタノール-水 (1:1)
- ・10 w/v%水酸化ナトリウム溶液

### ③ 試料の調製

固体試料はコーヒーミル等で粉碎する。

### ④ 試験溶液の調製

#### 1) 基本操作

50 mL 容ビーカーに試料の適当量 (0.5~5 g) を精密に量り、約 30 mL の水を加え、液性が酸性の場合には 10 w/v%水酸化ナトリウム溶液で中和する。30 分間超音波抽出した後、水で全量を 50 mL 容全量フラスコに移して定容する。不溶物がある場合はろ紙<sup>注4)</sup> でろ過し、ろ液をメンブランフィルター (0.45 μm) でろ過して試験溶液とする。不溶物の量が多い場合は、定容する前にろ紙でろ過し、ビーカー及びろ紙を水で洗浄してからろ液を集めて定容する。試験溶液は目的成分の濃度によって適宜希釈又は濃縮して HPLC 用試験溶液とする。

#### 2) たんぱく質又は多糖類を多く含む食品の場合

水の代わりに 50 v/v%エタノールを用いて 1) と同様の操作を行う。ただし、配位子交換系カラムを使用する場合は、試験溶液の一定量を採取して一旦ロータリーエバポレーターで減圧乾固した後、残留物を一定量の水に溶かし、メンブランフィルター (0.45 μm) でろ過した液を HPLC 用試験溶液とする<sup>注5)</sup>。

#### 3) 塩類を多く含む食品の場合

1) 又は 2) により調製した試験溶液 (水溶液にしたもの) 5~10 mL を採取して電気透析装置を用いて脱塩し<sup>注6)</sup>、HPLC 用試験溶液とする。

4) 脂質を多く含む食品の場合

50 mL 容遠心管に試料の適当量 (0.5~5 g) を精密に量る。これに石油エーテル 40 mL を加えて、時々かくはんしながら 15 分間放置した後、遠心分離 (2,000 回転/分、10 分間) して上澄み液を傾斜法により除去する。この脱脂操作を再度繰り返した後、窒素気流中あるいは 40 °C の水浴中で残存する石油エーテル分を完全に蒸散させる。得られた残留物について、1) 又は 2) と同様の操作を行う。

⑤ 標準溶液の調製<sup>注7)</sup>

1) HPLC 用試験溶液の溶媒が水の場合

糖アルコール標準品各 100 mg を精密に量り、水に溶解して 25 mL に定容する。この液から 2、5 及び 10 mL を採取して、それぞれ水で 20 mL に定容する<sup>注8)</sup>。

2) HPLC 用試験溶液の溶媒が 50 v/v% エタノールの場合

糖アルコール標準品各 100 mg を精密に量り、50 v/v% エタノールに溶解して 25 mL に定容する。この液から 2、5 及び 10 mL を採取して、それぞれ 50 v/v% エタノールで 20 mL に定容する<sup>注8)</sup>。

⑥ 測定

HPLC 用試験溶液の一定量を HPLC に注入し、各糖アルコールのピーク高さ<sup>注9)</sup>を測定する。

同様に各標準溶液の一定量を HPLC に注入して各糖アルコールのピーク高さを測定し、検量線を作成する。

<高速液体クロマトグラフ操作条件例>

1) カラム: Wakosil 5NH<sub>2</sub> (和光純薬工業) 又は相当品<sup>注10)</sup>、内径 4.6 mm、長さ 250 mm、ステンレス管

移動相: アセトニトリル - 水 (75:25) <sup>注11)</sup>

検出器: 屈折率検出器

流速: 1.0 mL/分

温度: 室温

注入量: 20 µL

2) カラム: Aminex HPX-87P、Aminex HPX-87C (Bio-Rad) 又は相当品<sup>注12)</sup>、内径 7.8~8.0 mm、長さ 300 mm、ステンレス管

移動相: 水

検出器: 屈折率検出器

流速: 0.6 mL/分

温度: カラム 85 °C

注入量: 5 µL

⑦ 計算

$$\text{試料中の各糖アルコール含量 (g/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W} \times \frac{100}{1,000}$$

C：検量線より求めた各糖アルコール濃度 (mg/mL)

V：定容量 (mL)

D：希釈率

W：試料採取量 (g)

[注]

- 1) 糖アルコールの検出には、屈折率検出器のほかにパルス電気化学検出器等も利用できる。
- 2) 測定する糖アルコールの種類や試料により種々のカラムが利用可能であるが、ここでは汎用性の高い代表的なもののみを示す。
- 3) 通常カールフィッシャー法により測定する。標準品の量が少ない場合は、減圧加熱乾燥法（例えば 60 °C、5 時間）で乾燥したものをを用いる。
- 4) JIS 5 種 B 又は同等品のろ紙を用いる。
- 5) 配位子交換系カラムを使用する場合には移動相として水を流すため、HPLC 用試験溶液の溶媒を水に置換しておく。
- 6) HPLC 用試験溶液中にナトリウムイオン等が多量に存在すると、妨害ピークを与えたり、カラムの劣化原因にもなるので、脱塩処理を行ったほうがよい。脱塩の方法は、電気透析装置のほか、イオン交換樹脂によってもよい。
- 7) 溶媒の種類はピークの高さに影響するので、HPLC 用試験溶液と標準溶液の溶媒を統一する必要がある。試験溶液にエタノール等揮発成分を含む場合、試験溶液を減圧乾固した後、水に再溶解することで、水で調製した標準溶液を使用することができる。
- 8) 標準溶液の濃度は、使用する検出器の感度を考慮して設定する。
- 9) 完全分離しないようなきょう雑ピークが認められる場合、ピーク面積測定では誤差が大きくなるのでピーク高さ測定を採用する。
- 10) Shodex Asahipak NH<sub>2</sub>P-50（昭和電工）等のアミノポリマ系カラムも使用可能。
- 11) 適切な移動相の条件を調整すること。アミノシリカ系カラムは使用時間とともに徐々に溶出時間が短くなるので、溶出時間をほぼ一定に保つように混合比率を調整する。なお、アセトニトリルの割合を増やすと溶出は遅くなる。
- 12) 強陽イオン交換樹脂（スルホン化ポリスチレンゲル）を充てんしたカラムで、対イオンが鉛又はカルシウム型になっているもの。糖及び糖アルコールの水酸基が、鉛又はカルシウムイオンに配位する強さの差により分離される。

## 8 食物繊維

基本的にはプロスキー法（Proskey 法、酵素-重量法）によって定量されるもの、す

なわち熱安定  $\alpha$ -アミラーゼ、プロテアーゼ及びアミログルコシダーゼによる一連の処理によって分解されない多糖類及びリグニンを食物繊維とする。

また、食品の原材料として用いられる水溶性食物繊維の中には、一連の酵素処理後、約 80 v/v%のエタノール中では沈殿を生成しないため本法では定量できないものがあるが、それらについては示差屈折率検出器付き高速液体クロマトグラフ法で行う。

(1) プロスキー法 (酵素-重量法) <sup>注1)</sup>

① 装置及び器具

- ・凍結乾燥器
- ・乾燥器
- ・減圧乾燥器
- ・粉碎器
- ・ふるい：10 メッシュ
- ・るつぼ形ガラスろ過器：パイレックス製の耐熱性るつぼ形ガラスろ過器 G-2 <sup>注2)</sup> をよく洗浄し、 $525\pm 5$  °C で加熱したものをを用いる。けいそう土 (セライト) 約 0.5 g <sup>注3)</sup> を入れ、水 20 mL で3回以上、さらに 78 v/v%エタノール 20 mL で3回以上洗浄して風乾した後、 $130\pm 5$  °C で1時間加熱して恒量を 0.1 mg まで測定する。使用前までデシケーター中で保存する。
- ・ろ過装置：るつぼ形ガラスろ過器が装着できるもの。

② 試薬

- ・0.08 mol/L リン酸緩衝液<sup>注4)</sup>：リン酸水素二ナトリウム (特級) 1.400 g (2水塩の場合は 1.753 g, 12水塩の場合は 3.53 g) と、リン酸二水素ナトリウム 1水塩 (特級) 9.68 g (2水塩の場合は 10.94 g) を水に溶かし、pH を 6.0 に調製して 1 L とする。
- ・熱安定  $\alpha$ -アミラーゼ溶液：ターマミル 120L <sup>注5)</sup> を用いる。冷蔵する。
- ・プロテアーゼ溶液：プロセアーゼ<sup>注6)</sup> を 50 mg/mL となるように、0.08 mol/L リン酸緩衝液に溶解する。用時調製する。
- ・アミログルコシダーゼ溶液：アミログルコシダーゼ<sup>注7)</sup> を用いる。冷蔵する。
- ・ろ過助剤：酸洗浄されたもの (セライト No. 545 <sup>注8)</sup> 等を、 $525\pm 5$  °C で1時間以上加熱して用いる。粒度は 30~60 メッシュがよいが、細かい部分はるつぼ形ガラスろ過器とともに、洗浄することによって除かれる。
- ・エタノール：95 v/v%、特級
- ・その他の試薬は、特に指定のない限り特級を用いる。

③ 試料の調製

穀類、豆類、種実類等、水分の少ない食品では、そのまま粉碎器で粉末とする。果物や糖分の多い加工食品等、乾燥しにくい食品ではホモジナイザーで処理してそのまま試験操作に移る。野菜、きのこ類等水分が多く、そのま



までは均一化が難しい食品では、直接又はホモジナイザーで処理した後、凍結乾燥するか、70℃で一夜乾燥して粉末とする。いずれの場合も、本法では試料の粒度が定量値に影響するので、粒度は2 mm (10 メッシュ) 以下になるようにする。

固体試料でおよそ 10 %以上の脂質を含む場合は、脱脂を次のような操作によって行う。粉末試料の 5 g を 200 mL 容遠心管に精密に量り、1 g につき 25 mL の石油エーテルを加え、時々かくはんしながら 15 分間放置した後、遠心分離し、上澄み液をガラスろ過器 (G-3) に流し込む。さらに、同様の操作を 2 回繰り返す、最後は全量をガラスろ過器に流し込み、風乾後、秤量し粉末とする。

乾燥及び脱脂による質量の変化を記録し、それぞれ生試料に対しての減量割合を求める。脂質及び水分を多く含む試料では、あらかじめ脱脂試料を調製するのではなく、測定操作の中にジエチルエーテルによる脱脂処理を組み込んでもよい。

#### ④ 測定

##### 1) 熱安定 α-アミラーゼによる消化

試料 1 ~ 10 g を 0.0001 g まで精密に 2 つ量り (S<sub>P</sub>、S<sub>A</sub> mg) <sup>注9)</sup>、それぞれをトールビーカーに入れ、一方 (S<sub>P</sub>) をたんぱく質測定用、他方 (S<sub>A</sub>) を灰分測定用とする。それぞれのビーカーに 0.08 mol/L リン酸緩衝液 50 mL を加え <sup>注10)</sup>、pH が 6.0±0.5 であることを確認する。これに熱安定 α-アミラーゼ溶液 0.1 mL を加え、アルミニウムはくで覆い、沸騰水浴中に入れ、5 分ごとにかくはんしながら 30 分間放置する。

沸騰水浴は、ビーカーを入れることによって温度が低下しないように、十分な大きさを持つものが望ましい。小さな水浴を用いる場合は、水浴が再び沸騰し始めてから 30 分間放置する。

##### 2) プロテアーゼによる消化

ビーカーを冷却後、0.275 mol/L 水酸化ナトリウム溶液約 10 mL を加えて、pH 7.5±0.1 に調整する。プロテアーゼ溶液 0.1 mL を加え、ビーカーを再びアルミニウムはくで覆い、60±2 °C の水浴中で振とうしながら 30 分間反応させる。

##### 3) アミログルコシダーゼによる消化

ビーカーを冷却後、0.325 mol/L 塩酸約 10 mL を加え、pH 4.3±0.3 に調製する。アミログルコシダーゼ溶液 0.1 mL を加え <sup>注11)</sup>、アルミニウムはくで覆い、60±2 °C 水浴中で振とうしながら 30 分間反応させる。

##### 4) 沈殿の生成

室温において酵素反応液の 4 倍量に相当するエタノールを、60±2 °C に加温してから酵素反応液に加え、室温に正確に 60 分間放置して、食物繊維を沈殿させる。放置時間が長くなると、無機質の沈殿が生成して、ろ過に時間が掛かり、誤差の原因となる。

5) ろ過

78 v/v%エタノールによって、ろつぼ形ガラスろ過器のけいそう土を底に均一にしておく。吸引しながら食物繊維を含む酵素反応液をろ過器に流し込む。ビーカー及びろ過器を78 v/v%エタノール20 mLで3回、エタノール10 mLで2回以上、アセトン10 mLで2回以上<sup>注12)</sup> 順次洗浄する。

6) 乾燥・秤量

残留物を含むろ過器を一夜 105±5 °Cで乾燥し、デシケーター中で冷却後、0.1 mgまで秤量する。それぞれの質量を R<sub>p</sub> mg 及び R<sub>A</sub> mg とする。

7) 残留物中のたんぱく質の定量

たんぱく質測定用の残留物は、けいそう土とともにかき取り、ケルダール法によって残留物中の窒素含量を定量する。窒素系数 6.25 を乗じてタンパク質含量 (P mg) を求める。

8) 残留物中の灰分の定量

灰分測定用の残留物は、525±5 °Cで5時間灰化する。デシケーター中で冷却後、0.1 mgまで秤量し、残留物の灰分含量 (A mg) を求める。

9) 空試験

空試験は、試料を含まずに同様に操作し、それぞれ乾燥・秤量後の残留物を R<sub>PB</sub> mg、R<sub>AB</sub> mg、残留物中のたんぱく質含量 (P<sub>B</sub> mg) 及び灰分含量 (A<sub>B</sub> mg) を求める<sup>注13)</sup>

⑤ 計算

$$\text{ブランク (B mg)} = \frac{(R_{PB} + R_{AB}) - \left( \frac{P_B}{R_{PB}} + \frac{A_B}{R_{AB}} \right) (R_{PB} + R_{AB})}{2}$$

乾燥・脱脂試料中の食物繊維含量 (D g/100 g)

$$= \frac{(R_P + R_A) - \left( \frac{P}{R_P} + \frac{A}{R_A} \right) (R_P + R_A) - 2B}{S_p + S_A} \times 100$$

生試料中の食物繊維含量 (TDF g/100 g)

$$= D \left( 1 - \frac{W + F}{100} \right)$$

W : 乾燥減量 (%)

F : 脱脂減量 (%)

[注]

1) 食物繊維の定量法としては、ここに採用した酵素-重量法が簡便で、信頼性の高い方法である。

本法は、Aspら、Proskyらによって提案され、AOAC法として採用されて広く用いられるようになった。我が国でも衛生試験法・注解等に採用された。なお、動物性食品やきのこ類に含まれるキチンやキトサンは、食物繊維と考えられるが、窒素を含むため、本法では正確に定量されな

い。

「キトサン加工食品」のようにキトサンを豊富に含む食品では、この点に留意する必要がある。しかし、食物繊維の主たる給源となる食品は植物性食品であり、これらの食品の多くは、本法の適用にはほとんど問題はない。

また、食品の原材料として用いられる水溶性食物繊維の中には、一連の酵素処理後、約 80 v/v%のエタノール中では沈殿を生成しないための本法では正しく定量できないものがある。それらについては示差屈折率検出器付き高速液体クロマトグラフ法を適用する。

- 2) フィルターの直径約 4 cm のもの (2G2) がよい。
- 3) るつぼ形ガラスろ過器として 2G2 を使用する場合には、約 1 g 程度のけいそう土が必要。
- 4) カルシウムを豊富に含む食品の場合、リン酸緩衝液を用いるとリン酸カルシウムの沈殿が形成され、これが結晶水を含むと残渣の灰分を正しく補正できないために食物繊維量を過大に評価してしまうことがある。したがって、「カルシウム含有食品」のようにカルシウムを豊富に含む食品の場合には、リン酸緩衝液に代えて、MES-TRIS 緩衝液 (MES : 2- (N-Morpholino) ethanesulfonic acid、TRIS : Tris (hydroxymethyl) aminomethane) の使用が望ましい。なお、使用する熱安定  $\alpha$ -アミラーゼとプロテアーゼの種類及び反応 pH がリン酸緩衝液の場合と微妙に異なるので、詳細について AOAC Official Methods of Analysis の 32・1・17、AOAC Official Methods 991・43 を参照されたい。
- 5) Novozymes 製<sup>注14)</sup> 等<sup>注15)</sup>
- 6) E-BSPRT (Megazyme 製)<sup>注14)</sup> 等<sup>注15)</sup>
- 7) E-AMGDF (Megazyme 製)<sup>注14)</sup> 等<sup>注15)</sup>
- 8) Fisher Scientific Co.製等
- 9) 固形分として約 1 g 相当量を採取することを目安とするが、粘性が高く、ろ過操作が困難な試料の場合には、採取量を 0.1~0.5 g に下げた方がよい。S<sub>P</sub> と S<sub>A</sub> の差は 20 mg 以内でなければならない。
- 10) 試料採取量が多い場合は全量が約 50 mL になるように加える緩衝液の量を加減する。
- 11) 1998 年以降に市販されているもの (100 回分、10 mL の包装単位のもの) の添加量として示した。従来品 (100 回分、30 mL の包装単位のもの) では、添加量を 0.3 mL にすること。
- 12) 脂質の多い試料等では、アセトンによる洗浄を 30 mL ずつで 5 回程度に増やした方がよい。  
さらに、アセトンによる洗浄の後、ジエチルエーテル 10 mL で 3 回以上洗浄すれば、より効果的である。
- 13) 同一のロットの酵素に限り、10~20 回程度の繰返し測定値からブラ

ンク値を係数化してもよい。

- 14) Megazyme 製のキット「K-TDFR」としても販売されている。
- 15) 酵素によっては、大麦及びえん麦由来の $\beta$ -グルカンを分解するエンドセルラーゼ ( $\beta$ -グルカナーゼ) の混入が認められることが報告されている (参考文献3))。酵素が試料中の食物繊維の測定に適しているかどうかは参考文献3)に記載された方法により確認することができ、必要に応じ酵素条件を考慮すること。

[参考文献]

- 1) Asp, N.G., et. al : J. Agric. Food Chem., 31, 476 (1983)
- 2) Prosky, L., et. al : J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67, 1044 (1984) , 68, 677 (1985) , 69, 259 (1986)
- 3) AOAC International : “Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, 19th Ed”, 45.4.07, (1995)
- 4) 日本薬学会編 : “衛生試験法・注解”, 295, 金原出版 (1990)

(2) 高速液体クロマトグラフ法 (酵素-HPLC 法) <sup>注1)</sup>

① 適用される食品

プロスキー法では分析が困難とされる低分子水溶性食物繊維を含む食品に適用される。

本法では、まず、プロスキー法で食物繊維を定量する。次にろ過工程で発生するろ液についてイオン交換樹脂によりたんぱく質、有機酸類、無機塩類を除去し高速液体クロマトグラフィーに供し、得られるクロマトグラム上で食物繊維画分 (三糖類以上) と単糖類、二糖類画分とを分け、食物繊維画分とブドウ糖のピーク面積の比率を求める。同時に、内標準物質<sup>注2)</sup>としてでんぷんの分解等により生成するブドウ糖の質量を別途酵素法により求め、ピーク面積比率にブドウ糖質量を掛けることにより低分子水溶性食物繊維含量を求め、先にプロスキー法により求めた値と併せることにより総食物繊維を求める方法である。

② 装置及び器具

- ・ろ過装置 : ガラスろ過器が装着でき、ろ液が回収しやすいもの。
- ・ロータリーエバポレーター
- ・メンブランフィルター (0.45 $\mu$ m)
- ・高速液体クロマトグラフ : 脱気装置、屈折率検出器付き
- ・カラム : ゲルろ過系、又は配位子交換樹脂系<sup>注3)</sup>
- ・充填イオン交換樹脂カラム : OH 型及び H 型の 2 つの樹脂を 1 : 1 に混合したもの又は相当品<sup>注4)</sup>

③ 試薬

- ・ピラノースオキシダーゼ<sup>注5)</sup>
- ・その他の試薬は、特に指定のない限り特級を用いる。

#### ④ 試料の調製

(1) プロスキー法(酵素-重量法)の、④測定5)ろ過の操作で得られたろ液について、95 v/v%エタノール洗浄までの全量を定量的に回収し、ロータリーエバポレーターで濃縮し、エタノール分を除去した後 100 mL 定容とし低分子水溶性食物繊維を含む酵素処理液とする。酵素処理液に不溶物が含まれる場合にはろ過する。

#### ⑤ 測定

##### 1) たんぱく質、有機酸、無機塩類の除去<sup>注6)</sup>(イオン交換樹脂による)

上記の酵素処理液 50 mL をイオン交換樹脂 50 mL を充填したカラム(ガラス管、20 mm×300 mm)に SV1.0(通液速度:50 mL 溶液/1時間)で通液し、さらに蒸留水で押し出し、溶出液 200 mL とする。この溶液をロータリーエバポレーターを用いて濃縮し、水で適当な濃度(例えば、Brix 5 程度)に調整して孔径 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過し、高速液体クロマトグラフィーに供する。

##### 2) 高速液体クロマトグラフィー

1)で調製した試験溶液を次に示す高速液体クロマトグラフ操作条件で注入し、高速液体クロマトグラムを得る。内標準物質(ブドウ糖又は添加内標準物質)及び食物繊維画分<sup>注7)</sup>のピーク面積を求める。

<高速液体クロマトグラフ操作条件例>

カラム: TSKgel G2500PW<sub>XL</sub>(東ソー)、内径 7.8 mm、長さ 300 mm を 2 本直列に接続

カラム温度: 80 °C

移動相: 水

流速: 0.5 mL/分

注入量: 20 μL

##### 3) 内標準物質

1)で得られる酵素処理液中のブドウ糖をピラノースオキシダーゼで測定し、その含量を求め、標準物質とする。酵素処理後に既知質量の内標準物質(種々選択できるが、例えばグリセリン)を添加し同様の操作を行い、ブドウ糖に代わる標準物質とすることができる。ただし、この場合、当該内標準物質の感度をブドウ糖の感度に対して補正する必要がある<sup>注2)</sup>。

#### ⑥ 計算

低分子水溶性食物繊維質量 (B mg)

$$= \frac{\text{食物繊維のピーク面積}}{\text{ブドウ糖のピーク面積}}$$

× 酵素処理溶液中のブドウ糖質量 (mg)

低分子水溶性食物繊維質量 (C mg)

$$= \frac{\text{食物繊維のピーク面積}}{\text{添加内標準物質のピーク面積}}$$

× 補正係数 × 内標準物質質量 (mg)

乾燥・脱脂試料中の低分子水溶性食物繊維含量 (D g/100g)

$$= \frac{\text{食物繊維質量 B or C (mg)}}{\text{試料採取量 (mg)}} \times 100$$

生試料中の低分子水溶性食物繊維含量 (E g/100 g)

$$= D \left( 1 - \frac{\text{乾燥減量\%} + \text{脱脂減量\%}}{100} \right)$$

生試料中の総食物繊維含量 (g/100g) = プロスキー法で求めた食物繊維含量 (TDF g/100 g) + 低分子水溶性食物繊維含量 (E g/100 g)

[注]

1) 本法は、国際的に受け入れられているプロスキー法を基本とし、高速液体クロマトグラム上で食物繊維画分を測定する方法であり、「ヒトの消化酵素により分解されない食品成分」としての基本概念を大きく異にするものではない。それ以上に、最近の参考文献3)によると次世代の定量方法として酵素-HPLC法は期待されているものである。

本法に記載される酵素処理を行った場合、消化性のでんぷん、水飴、デキストリンはほぼ完全にブドウ糖にまで加水分解される。また、還元水飴もブドウ糖及びマルチトールとなり、二糖類までを糖類、また糖アルコールとするならば、ほぼ、完全に食物繊維から除去できる。しかし、難消化性のオリゴ糖を併用した食品の場合、単一カラムでは測定できなくなるため、別法、又は、他の概念を入れる必要がある<sup>注8)</sup>。

2) 試料の種類又は使用する分離カラムの種類によっては、高速液体クロマトグラム上で共存成分のピークがブドウ糖のピークを妨害する可能性があるため、ブドウ糖に代えてグリセリン等を内標準物質として添加する方法も用いて良い。ただし、その場合、添加内標準物質は酵素処理液を定容する際に既知質量を添加するものとする。なお、ブドウ糖と添加内標準物質の感度（同質量当りのピーク面積）に差があるため、ブドウ糖の感度を基準として添加内標準物質のピーク面積を補正する必要がある。補正は、あらかじめ求めた補正係数（有効数字2桁）を乗ずることによるものとする。例えば、同質量のグリセリンとブドウ糖の同

ークロマトグラフ操作条件におけるピーク面積比は、用いる操作条件で多少異なるものの、およそ 0.82:1 である。すなわち、補正係数として 0.82 に近い数値が得られることになる。補正係数は一度求めておけば、クロマトグラフ操作条件を変更しない限り同一の係数を用いて良い。グリセリン以外の物質を内標準とする場合についても同様である。

- 3) カラムは配位子交換系又はゲルろ過系のものを用いる。ただし、前者ではナトリウム型又はカルシウム型のもの（例えば、Ultron PS-80N、MCI-GEL CK08EC 等）が推奨できる。また、後者では 5,000 程度の排除限界分子量を持つもの（例えば、TSKgelG2500PW<sub>XL</sub>、Shodex Asahipak GS220HQ 等）を 2 本直列に接続して用いることを推奨する。
- 4) アンバーライト IRA-67 (OH 型) アンバーライト 200CT (H 型) : オルガノ (株) 製等がある。なお、アンバーライト 200CT (H 型) は販売時 Na 型なので、使用時に希塩酸で H 型に変換し、十分水洗して使用すること。
- 5) ピラノースオキシダーゼ法によるブドウ糖測定キット (デタミナー GL-E : 協和メディックス (株) 製) が市販されている。
- 6) 明らかに低分子水溶性食物繊維だけを使用した食品 (飲料等) についてはエタノール沈殿を行う前の酵素処理液についてイオン交換樹脂以降の操作をすることができる。
- 7) 原則として、三糖類のひとつであるマルトトリオースのピーク溶出位置を指標とし、これと同じかこれより前に溶出するものを食物繊維画分とする。
- 8) 消化性画分、難消化性オリゴ糖画分と食物繊維画分についての考え方 :

二糖類ピーク中には、ショ糖、乳糖が含まれる可能性があるので、三糖類以上のピークを難消化性画分 (難消化性オリゴ糖と食物繊維画分よりなる) とする。

この難消化性画分に難消化性オリゴ糖 (ただし、「35 熱量」の項においてエネルギー換算係数の設定されているもの) が含まれており、その含量表示がなされている試料の場合、オリゴ糖分析カラム (例えば、アミノプロピルカラム : 溶液 : アセトニトリル-水) を用い、HPLC により三糖類以上の難消化性オリゴ糖を定量し、難消化性画分より差し引いたものを食物繊維量とする。なお、難消化性オリゴ糖の中には食物繊維の定量操作の過程で部分的に分解される可能性のあるものもあるので、この点は酵素処理液 (ただし、酵素処理液自体は塩類等を含んでいるので、⑤ 1) の処理で得られる高速液体クロマトグラフィー用の液) で確認する必要がある。

#### [参考文献]

- 1) 日本農芸化学雑誌, 64, 3, 539 (1990)

- 2) J. Assoc. Off. Anal. Chem., 68, 677 (1985)
- 3) J. Assoc. Off. Anal. Chem., 78, 22 (1995)
- 4) 特定保健用食品試験検査マニュアル 低分子アルギン酸の項

## 9 亜鉛

### (1) 原子吸光光度法

#### ① 装置及び器具

- ・原子吸光光度計
- ・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 °C に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・水浴

#### ② 試薬

- ・塩酸：原子吸光分析用
- ・塩酸（1+1）：塩酸 1 容に対し水 1 容を加え混和する。
- ・1%塩酸：塩酸を水で希釈して用いる。
- ・亜鉛標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を 1%塩酸で希釈して用いる。

#### ③ 試験溶液の調製

試料 1～10 g をビーカーに精密に量り (W g)、電熱器上で予備灰化した後、500 °C の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（1+1）3 mL を加え、水浴上で蒸発乾固する。さらに、1%塩酸 20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 °C）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化、塩酸乾固を行う。塩酸（1+1）2 mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容（V mL）し、試験溶液とする。

#### ④ 測定

原子吸光光度計を用いて、試験溶液の吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線から試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求める。このとき、濃度の高い試験溶液については、1%塩酸を用いて、適当な濃度に希釈した後測定する（希釈倍数：D）。

<原子吸光測定条件例>

フレイム：空気 - アセチレン

測定波長：213.8 nm

#### ⑤ 計算

$$\text{試料中の亜鉛含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めた亜鉛の濃度（μg/mL）



V：定容量 (mL)  
D：希釈倍数  
W：試料採取量 (g)

(2) キレート抽出-原子吸光光度法

① 装置及び器具

- ・原子吸光光度計
- ・電気炉：熱電対温度計付きのもので  $500\pm 10$  °C に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・水浴

② 試薬

- ・25 w/v%クエン酸二アンモニウム溶液：クエン酸二アンモニウム（原子吸光分析用）25 g を水に溶かして 100 mL とする。
- ・10 w/v%ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム (DDTC) 溶液：DDTC（原子吸光分析用）10 g を水に溶かして 100 mL とする。この溶液は用時調製する。
- ・40 w/v%硫酸アンモニウム溶液：硫酸アンモニウム（原子吸光分析用）40 g を水に溶かして 100 mL とする。
- ・ブロムチモールブルー指示薬：0.1 w/v%エタノール溶液。
- ・塩酸、アンモニア水：原子吸光分析用
- ・塩酸（1+1）：塩酸 1 容に対し水 1 容を加え混和する。
- ・1%塩酸：塩酸を水で希釈して用いる。
- ・メチルイソブチルケトン（MIBK）：特級
- ・亜鉛標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を 1%塩酸で希釈して用いる。

③ 試験溶液の調製

試料 1～10 g をビーカーに精密に量り (W g)、電熱器上で予備灰化した後、500 °C の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（1+1）3 mL を加え、水浴上で蒸発乾固する。さらに、1%塩酸 20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 °C）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化、塩酸乾固を行う。塩酸（1+1）2 mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容 (V mL) し、必要に応じて水で適宜希釈して（希釈倍数：D）試験溶液とする。

④ 測定

試験溶液の適当量を正確に分液漏斗にとり、25 w/v%クエン酸二アンモニウム溶液 10 mL を加えた後、ブロムチモールブルー指示薬を用いてアンモニ

ア水で中和し、40 w/v%硫酸アンモニウム溶液 10 mL 及び水を加えて約 100 mL とする。10 w/v%DDTC 溶液<sup>註1)</sup> 10 mL を加え、5 分間放置後、MIBK 10 mL を正確に加え 5 分間振とうする。静置後、MIBK 層をとり原子吸光光度計を用いて吸光度を測定し、同様に操作して作成した検量線から試験溶液中の濃度 (C µg/mL) を求め、試料中の含量を算出する。

<原子吸光測定条件例>

フレイム：空気 - アセチレン

測定波長：213.8 nm

⑤ 計算

$$\text{試料中の亜鉛含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めた亜鉛の濃度 (µg/mL)

V：定容量 (mL)

D：希釈倍数

W：試料採取量 (g)

[注]

1) ピロリジンジチオカルバミン酸アンモニウム (APDC、原子吸光分析用) を用いることもできる。

(3) 誘導結合プラズマ発光分析法

① 装置及び器具

- ・誘導結合プラズマ発光分析装置：一般的な全ての誘導結合プラズマ発光分析装置を用いることができる。
- ・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 °C に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・水浴

② 試薬

- ・塩酸：原子吸光分析用
- ・塩酸 (1+1)：塩酸 1 容に対し水 1 容を加え混和する。
- ・1%塩酸：塩酸を水で希釈して用いる。
- ・亜鉛標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を 1%塩酸で希釈して、検量線作成用の 0.5、5.0 ppm の濃度の標準溶液を調製する。ポリエチレン又はポリプロピレン瓶に保存する。

③ 試験溶液の調製

試料 1 ~ 10 g をビーカーに精密に量り (W g)、電熱器上で予備灰化した後、500 °C の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸 (1+1) 3 mL を加え、水浴上で蒸発乾固する。さらに、1%塩酸 20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上 (150~200 °C) で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中へろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回

洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化、塩酸乾固を行う。塩酸（1+1）2 mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容（V mL）し、試験溶液とする。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、希釈するか（希釈倍数：D）標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

#### ④ 測定

誘導結合プラズマ発光分析装置を用いて、測定用試験溶液を直接ネブライザーで吸入噴霧して、アルゴンプラズマに導入して 213.856 nm における発光強度を測定する。あらかじめ作成した検量線から測定用試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求める。

#### ⑤ 計算

$$\text{試料中の亜鉛含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めた亜鉛の濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

## 10 カリウム

### (1) 原子吸光光度法（灰化法）<sup>注1)</sup>

#### ① 装置及び器具

- ・原子吸光光度計
- ・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 °C に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・水浴

#### ② 試薬

- ・10%塩酸、1%塩酸：塩酸（原子吸光分析用）を水で希釈して用いる。
- ・カリウム標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を1%塩酸で希釈して用いる。

#### ③ 試験溶液の調製

試料 1～10 g を石英ビーカーに精密に量り（W g）、電熱器上で予備灰化した後、500 °C の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に 10%塩酸 5 mL を加え、水浴上で蒸発乾固する。さらに、10%塩酸 5 mL を加え、時計皿で覆って 30 分間ホットプレート上で加温した後、ろ紙を用いて、50 mL 容ポリエチレン製全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを十分に洗浄した後、水で正確に 50 mL（V mL）とし、試験溶液とする。

#### ④ 測定

原子吸光光度計を用いて、試験溶液の吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線から試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求める。このとき、濃度の高い試験溶液については、1%塩酸を用いて、適当な濃度に希釈した後測定する（希釈倍数：D）。

<原子吸光測定条件例>

フレイム：空気 - アセチレン

測定波長：766.5 nm

⑤ 計算

$$\text{試料中のカリウム含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたカリウムの濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

[注]

1) 脂質含量の高い試料は灰化法が望ましい。

(2) 原子吸光光度法（塩酸抽出法）

① 装置及び器具

・原子吸光光度計

② 試薬

・1%塩酸：塩酸（原子吸光分析用）を水で希釈して用いる。

・カリウム標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を1%塩酸で希釈して用いる。

③ 試験溶液の調製

試料2gを精密に量り（Wg）、ポリエチレン瓶に入れ、1%塩酸200mL（V mL）を正確に加え、30分間振とうした後ろ過し、試験溶液とする。

④ 測定

原子吸光光度計を用いて、試験溶液の吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線から試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求める。このとき、濃度の高い試験溶液については、1%塩酸を用いて、適当な濃度に希釈した後測定する（希釈倍数：D）。

<原子吸光測定条件例>

フレイム：空気 - アセチレン

測定波長：766.5 nm

⑤ 計算

$$\text{試料中のカリウム含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたカリウムの濃度（μg/mL）

V : 定容量 (mL)  
D : 希釈倍数  
W : 試料採取量 (g)

(3) 誘導結合プラズマ発光分析法

① 装置及び器具

- ・誘導結合プラズマ発光分析装置：一般的な全ての誘導結合プラズマ発光分析装置を用いることができる。
- ・電気炉：熱電対温度計付きのもので  $500 \pm 10$  °C に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・水浴

② 試薬

- ・10%塩酸、1%塩酸：塩酸（原子吸光分析用）を水で希釈して用いる。
- ・カリウム標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を1%塩酸で希釈して、検量線作成用の50、500 ppmの濃度の標準溶液を調製する。ポリエチレン又はポリプロピレン瓶に保存する。

③ 試験溶液の調製

a. 灰化法

試料 1～10 g を石英ビーカーに精密に量り (W g)、電熱器上で予備灰化した後、500 °C の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に 10%塩酸 5 mL を加え、水浴上で蒸発乾固する。さらに、10%塩酸 5 mL を加え、時計皿で覆って 30 分間ホットプレート上で加温した後、ろ紙を用いて、50 mL 容ポリエチレン製全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを十分に洗浄した後、水で正確に 50 mL (V mL) とし、試験溶液とする。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、希釈するか（希釈倍数：D）標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

b. 塩酸抽出法

試料 2 g を精密に量り (W g)、ポリエチレン瓶に入れ、1%塩酸 200 mL (V mL) を正確に加え、30 分間振とうした後ろ過し、試験溶液とする。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、希釈するか（希釈倍数：D）標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

④ 測定

誘導結合プラズマ発光分析装置を用いて、測定用試験溶液を直接ネブライザーで吸入噴霧し、試験溶液の発光強度を測定し、あらかじめ作成した検量線から測定用試験溶液中の濃度 (C µg/mL) を求める。測定波長は 766.491 nm を用いる。

⑤ 計算

$$\text{試料中のカリウム含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたカリウムの濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )

V：定容量 (mL)

D：希釈倍数

W：試料採取量 (g)

## 11 カルシウム

### (1) 過マンガン酸カリウム容量法

#### ① 装置及び器具

- ・ビュレット：褐色、容量 25～50 mL、テフロンコック付き
- ・電気炉：熱電対温度計付きのもので  $500 \pm 10$  °C に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・水浴

#### ② 試薬

- ・塩酸 (1+1)：塩酸 (特級) 1 容に対し水 1 容を加え混和する。
- ・メチルレッド指示薬：0.1 w/v% エタノール溶液
- ・3 w/v% シュウ酸アンモニウム溶液：シュウ酸アンモニウム (特級) を水に溶解して用いる。
- ・尿素：特級
- ・アンモニア水 (1+49)：アンモニア水 (特級) 1 容に対し水 49 容を加え混和する。
- ・1/250 mol/L 過マンガン酸カリウム標準溶液：過マンガン酸カリウム (特級) 31.61 g に水 800 mL を加えて加温しながらかくはんし、溶解する。放冷後、水で 1 L に定容し、暗所に一夜放置する。ガラスフィルター (3 G-4) でろ過したものを水で 50 倍に希釈し、褐色瓶に保存する。1/100 mol/L シュウ酸ナトリウム標準溶液により標定してファクターを求める。
- ・シュウ酸ナトリウム：標準試薬
- ・硫酸 (1+25)：硫酸 (特級) 1 容に対し水 25 容を加え混和する。

#### ③ 試験溶液の調製

試料 1～10 g をビーカーに精密に量り (W g)、電熱器上で予備灰化した後、500 °C の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸 (1+1) 3 mL を加え、水浴上で蒸発乾固する。さらに、1% 塩酸 20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上 (150～200 °C) で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中へろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化し、塩酸 (1+1) 2 mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコへろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、

水で定容し (V<sub>1</sub> mL)、試験溶液とする。

④ 測定

試験溶液からカルシウムとして 3～8 mg を含む一定量 (V<sub>2</sub> mL) を 300 mL 容共栓付き三角フラスコに正確に分取し、メチルレッド指示薬数滴及び塩酸 (1+1) を総量として 3 mL になるように加えた後、3 w/v% シュウ酸アンモニウム溶液 10 mL 及び尿素約 4 g を加え、水で全量を約 100 mL とする。電熱器上で穏やかに加熱し、沸騰させ、溶液が赤色から黄色に変わったら加熱を止め、一夜放置する。生成したシュウ酸カルシウムの沈殿をガラスフィルター (3 G-4) 中に注ぎ、吸引ろ過する。アンモニア水 (1+49) 数 mL ずつで三角フラスコ及びガラスフィルターを数回洗う。ガラスフィルターを元の三角フラスコに付け、70～80 °C に加温してある硫酸 (1+25) をガラスフィルター中に注ぎ、沈殿を溶解し、吸引ろ過する。この操作を数回繰り返し、ガラスフィルター内の沈殿を完全に溶解して三角フラスコに集める。三角フラスコを 65～80 °C に加温して 1/250 mol/L 過マンガン酸カリウム標準溶液で滴定する (T mL)。30 秒経っても赤紫色が消失しないところを終点とする。

⑤ 計算

1/250 mol/L 過マンガン酸カリウム標準溶液 1 mL は、カルシウム 0.4008 mg に相当し、このとき試料中のカルシウム含量は次式により求める。

$$\text{試料中のカルシウム含量 (mg/100 g)} = \frac{T \times 0.4008 \times F}{W} \times \frac{V_1}{V_2} \times 100$$

T : 滴定に要した 1/250 mol/L 過マンガン酸カリウム標準溶液の量 (mL)

F : 1/250 mol/L 過マンガン酸カリウム標準溶液のファクター

V<sub>1</sub> : 定容量 (mL)

V<sub>2</sub> : 分取液量 (mL)

W : 試料採取量 (g)

(2) 原子吸光光度法

① 装置及び器具

- ・原子吸光光度計
- ・電気炉: 熱電対温度計付きのもので 500±10 °C に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・水浴

② 試薬

- ・塩化ストロンチウム溶液: 塩化ストロンチウム・六水和物 (原子吸光分析用) 38.04 g を 1% 塩酸に溶かして正確に 250 mL とする。この溶液は、ストロンチウムとして 5 w/v% となる。
- ・塩酸 (1+1): 塩酸 (特級) 1 容に対し水 1 容を加え混和する。
- ・1% 塩酸: 塩酸 (特級) を水で希釈して用いる。
- ・カルシウム標準溶液: 市販の原子吸光分析用標準溶液を 1% 塩酸で希釈し

て用いる。

### ③ 試験溶液の調製

試料 1～10 g をビーカーに精密に量り (W g)、電熱器上で予備灰化した後、500℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸 (1+1) 3 mL を加え、水浴上で蒸発乾固する。さらに、1%塩酸 20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上 (150～200℃) で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化し、塩酸 (1+1) 2 mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し (V<sub>1</sub> mL)、試験溶液とする。

### ④ 測定

試験溶液の適当量 (V<sub>2</sub> mL) を全量フラスコに正確に分取し、塩化ストロンチウム溶液を、ストロンチウムとして 0.5 w/v% になるように加え、1%塩酸で定容 (V<sub>3</sub> mL) した後、原子吸光光度計を用いて、吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線から測定用試験溶液中の濃度 (C µg/mL) を求め、試料中の含量を算出する。

<原子吸光測定条件例>

フレイム：亜酸化窒素 - アセチレン又は空気 - アセチレン

測定波長：422.7 nm

### ⑤ 計算

$$\text{試料中のカルシウム含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V_1}{W \times 10} \times \frac{V_3}{V_2}$$

C：検量線から求めたカルシウムの濃度 (µg/mL)

V<sub>1</sub>：試験溶液の定容量 (mL)

V<sub>2</sub>：分取液量 (mL)

V<sub>3</sub>：測定用試験溶液の定容量 (mL)

W：試料採取量 (g)

## (3) 誘導結合プラズマ発光分析法

### ① 装置及び器具

- ・誘導結合プラズマ発光分析装置：一般的な全ての誘導結合プラズマ発光分析装置を用いることができる。
- ・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10℃に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・水浴

### ② 試薬

- ・塩酸 (1+1)：塩酸 (特級) 1 容に対し水 1 容を加え混和する。
- ・1%塩酸：塩酸 (特級) を水で希釈して用いる。



- ・カルシウム標準溶液：市販の原子吸光分析標準溶液を1%塩酸で希釈して、検量線作成用の1.0, 10.0 ppmの濃度の標準溶液を調製する。ポリエチレン又はポリプロピレン瓶に保存する。

### ③ 試験溶液の調製

試料1～10 gをビーカーに精密に量り(W g)、電熱器上で予備灰化した後、500℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸(1+1) 3 mLを加え、水浴上で蒸発乾固する。さらに、1%塩酸20 mLを加え、時計皿で覆い30分間ホットプレート上(150～200℃)で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化し、塩酸(1+1) 2 mL及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し(V mL)、試験溶液とする。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、希釈するか(希釈倍数：D)標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

### ④ 測定

測定用試験溶液を、直接的に誘導結合プラズマ発光分析装置のネブライザーで吸入噴霧して、アルゴンプラズマに導入して、393.366 nmにおける発光強度を測定する。あらかじめ作成した検量線から試験溶液中の濃度(C µg/mL)を求める。

### ⑤ 計算

$$\text{試料中のカルシウム含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたカルシウムの濃度 (µg/mL)

V：定容量 (mL)

D：希釈倍数

W：試料採取量 (g)

## 12 クロム

### (1) キレート抽出-原子吸光光度法

#### ① 装置及び器具

- ・原子吸光光度計
- ・電気炉：熱電対温度計付きのもので500±10℃に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・水浴

#### ② 試薬

- ・2 w/v%ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム(DDTC)溶液：DDTC(原子吸光用)2 gを水に溶かして100 mLとする。この溶液は用時調製する。

- 10 w/v%ペルオキシ二硫酸アンモニウム溶液：ペルオキシ二硫酸アンモニウム（特級）10 g を水に溶かして 100 mL とする。
- 酢酸緩衝液：1 mol/L 酢酸（特級）59 mL と 1 mol/L 酢酸ナトリウム（特級）141 mL を混合し pH5.0 に調整する。
- 希アンモニア水：アンモニア水（原子吸光分析用 25.0～27.9%）を水で 2 倍に希釈する。
- 希硝酸：硝酸（原子吸光分析用 60.0～61.0%）を水で希釈して 10% とする。
- 塩酸：塩酸（原子吸光測定用 35.0～37.0%）
- 塩酸（1+1）：塩酸 1 容に対し水 1 容を加え混和する。
- 1%塩酸：塩酸を水で希釈して 1% とする。
- メチルイソブチルケトン（MIBK）：原子吸光分析用
- ブロムフェノールブルー指示薬：ブロムフェノールブルー 0.1 g を乳鉢に入れ、少量の 1/20 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて十分すり混ぜ、水に溶かして 250 mL とする。
- クロム標準溶液：原子吸光分析用金属溶液（JCSS 認定品）を 1%塩酸で希釈して用いる。

### ③ 試験溶液の調製

#### 乾式灰化法<sup>注1)</sup>

試料 1～10 g をビーカーに精密に量り（W g）、ホットプレート上<sup>注2)</sup> で予備灰化後 500 °C の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（1+1）3 mL を加え、水浴上で蒸発乾固する。さらに、1%塩酸 20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 °C）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗いこむ操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。ろ紙上に黒色の炭素が残っている場合は、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化、塩酸乾固を行う。

塩酸（1+1）2 mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し（V mL）、必要に応じて水で適宜希釈して（希釈倍数：D）試験溶液とする。

### ④ 測定<sup>注3)</sup>

試験溶液の適当量を正確に 100 mL ビーカーに分取する。希硝酸 10 mL を加えた後、ペルオキシ二硫酸アンモニウム溶液 5 mL を加える。ブロムフェノールブルー指示薬を数滴加え、溶液の色が黄色からくすんだ黄緑色に変わるまで希アンモニア水を滴下する。（pH3.0～4.0）。時計皿で蓋をして沸騰水浴上で 15 分加熱する。放冷後 100 mL の分液漏斗に移し水 45 mL を 3 回に分けビーカーを洗い、洗液を分液漏斗に合わせる。酢酸緩衝液 5 mL を加え振り混ぜる。DDTC 溶液 5 mL を加え、5 分放置後、MIBK 10 mL を正確に加え 5 分振とうする。静置後、MIBK 層を取り、原子吸光光度計を用いて吸光度<sup>注4)</sup> を測定し、同様に操作して作成した検量線から試験溶液中の濃度（C

μg/mL) を求め、試料中の含量を算出する。

<原子吸光測定条件例>

フレイム：空気 - アセチレン

測定波長：357.9 nm

⑤ 計算

$$\text{試料中のクロム含量 } (\mu\text{g}/100 \text{ g}) = \frac{C \times V \times D}{W} \times 100$$

C：検量線から求めたクロムの濃度 (μg/mL)

V：定容量 (mL)

D：希釈倍数

W：試料採取量 (g)

[注]

- 1) 灰化が難しい試料の場合は、試験溶液の調製を湿式灰化法によることができる<sup>注5)</sup>。
- 2) 赤外線ランプを併用すると炭化を早めることができる。
- 3) クロム含量が低い場合は、乾式灰化法で調製した試験溶液について、フレイムレス原子吸光法によることができる。ただし、試験溶液は硝酸溶液とする。
- 4) クロムは金属や酸による干渉があるため、MIBK 抽出とした。
- 5) この他の試験溶液調製法として、凍結乾燥後、低温灰化装置等を使うこともできる。

(池辺克彦、西宗高弘、田中涼一：食衛誌、382 (1990))

(2) 誘導結合プラズマ発光分析法

① 装置及び器具

- ・誘導結合プラズマ発光分析装置：一般的な全ての誘導結合プラズマ発光分析装置を用いることができる。
- ・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 °C に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・水浴

② 試薬

- ・塩酸：塩酸 (原子吸光測定用 35~37%)
- ・塩酸 (1+1)：塩酸 1 容に対し水 1 容を加え混和する。
- ・1%塩酸：塩酸を水で希釈して1%とする。
- ・クロム標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を1%塩酸で希釈して、検量線作成用の0.1、1.0 ppm 濃度の標準溶液を作製する。ポリエチレン又はポリプロピレン瓶に保存する。

③ 試験溶液の調製

乾式灰化法<sup>注1)</sup>

試料 1～10 g をビーカーに精密に量り (W g)、ホットプレート上<sup>注2)</sup> で予備灰化後 500 °C の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸 (1+1) 3 mL を加え、水浴上で蒸発乾固する。さらに、1 % 塩酸 20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上 (150～200 °C) で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。ろ紙上に黒色の炭素が残っている場合は、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化、塩酸乾固を行う。

塩酸 (1+1) 2 mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し (V mL)、試験溶液とする<sup>注3)</sup>。

#### ④ 測定

誘導結合プラズマ発光装置を用いて、測定用試験溶液を直接ネブライザーで吸入噴霧<sup>注4)</sup> し、試験溶液の発光強度を測定し、あらかじめ作成した検量線から測定用試験溶液中の濃度 (C µg/mL) を求める。測定波長 206.15 nm を用いる。

#### ⑤ 計算

$$\text{試料中のクロム含量 (}\mu\text{g/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W} \times 100$$

C : 検量線から求めたクロムの濃度 (µg/mL)

V : 定容量 (mL)

D : 希釈倍数

W : 試料採取量 (g)

#### [注]

- 1) 灰化が難しい試料の場合は、試験溶液の調製を湿式灰化法によることができる<sup>注5)</sup>。
- 2) 赤外線ランプを併用すると炭化を早めることができる。
- 3) 引き続き(1)、④に準じて MIBK による抽出を行った場合には MIBK 溶媒がネブライザーを詰まらせる原因となるためホットプレート上で MIBK を揮散させてから 1 % 硝酸に再溶解し測定用試験溶液とする。
- 4) 試料中のクロム含量が低い場合は、超音波ネブライザーを使用することができる。
- 5) この他の試験溶液調製法として、凍結乾燥後、低温灰化装置等を使うこともできる。

(池辺克彦、西宗高弘、田中涼一：食衛誌、382 (1990))

## 13 セレン

### (1) 蛍光光度法

#### ① 装置及び器具

・蛍光光度計

② 試薬

- ・硝酸、過塩素酸、塩酸、アンモニア水、シクロヘキサン：特級
- ・1%塩酸、10%塩酸、1 mol/L 塩酸：塩酸を水で希釈して用いる。
- ・10%アンモニア水：アンモニア水を水で希釈して用いる。
- ・0.1 mol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA) 溶液：EDTA (特級) 37.22 g を水に溶かして 1 L とする。
- ・20 w/v%塩酸ヒドロキシルアミン溶液：塩酸ヒドロキシルアミン (特級) 100 g を水に溶かして 500 mL とする。
- ・0.1 w/v%2,3-ジアミノナフタレン溶液：2,3-ジアミノナフタレン (特級) 0.1 g を 0.1 mol/L 塩酸 100 mL に溶かした後、50 °C で 30 分間加温する。放冷後、分液漏斗に移し、シクロヘキサン 10~20 mL を加え、5 分間振とうする。この操作を繰り返し行い、水層をろ過した後使用する。この溶液は用時調製する。
- ・セレン標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を 1%塩酸で希釈して用いる。

③ 試験溶液の調製

試料約 1 g をケルダールフラスコに精密に量り (W g)、硝酸 10 mL を加え、穏やかに加熱する。激しい反応が終了したら、過塩素酸 10 mL を加え、再び加熱する。内容液が褐色~黒色になったら直ちに硝酸 2 mL を加える。内容液が無色~淡黄色になったら、過塩素酸の白煙を生じるまで加熱を続ける。放冷後、ケルダールフラスコの内壁を水でよく洗い込み、過塩素酸の白煙が生じるまで再び加熱する。放冷後、10%塩酸 3 mL を加え、沸騰水浴中で 30 分間加温する。放冷後、溶液を全量フラスコに洗い流した後、水で定容し (V mL)、試験溶液とする。

④ 測定

試験溶液の適当量を正確に 100 mL 容トールビーカーに分取し、0.1 mol/L EDTA 溶液 4 mL 及び 20 w/v%塩酸ヒドロキシルアミン溶液 2 mL を加え、10%塩酸及び 10%アンモニア水を用いて pH1.0~1.5 に調整する。0.1 w/v%2,3-ジアミノナフタレン溶液 5 mL を加え混合後、50 °C の水浴中で 30 分間加温する。放冷後、200 mL 容分液漏斗に移し、シクロヘキサン 10 mL を加え 5 分間振とうした後、シクロヘキサン層の蛍光強度を測定する。同様に操作して作成した検量線から、試験溶液中の濃度 (C µg/mL) を求め、試料中の含量を算出する。

<蛍光光度計測定条件例>

励起波長：378 nm

蛍光波長：520 nm

⑤ 計算

$$\text{試料中のセレン含量 } (\mu\text{g}/100 \text{ g}) = \frac{C \times V \times D}{W} \times 100$$

C：検量線から求めたセレンの濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

V：定容量 (mL)

D：希釈倍数

W：試料採取量 (g)

(2) 水素化物 - 原子吸光光度法

① 装置及び器具

- ・原子吸光光度計
- ・セレン化水素発生装置

② 試薬

- ・硝酸、過塩素酸、塩酸：特級
- ・塩酸（1+1）：塩酸 1 容に対し水 1 容を加え混和する。
- ・1%塩酸、10%塩酸：塩酸を水で希釈して用いる。
- ・水素化ホウ素ナトリウム溶液：水素化ホウ素ナトリウム（特級）5 g 及び水酸化ナトリウム（特級）2.5 g を水に溶かして 500 mL とする。
- ・セレン標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を 1%塩酸で希釈して用いる。

③ 試験溶液の調製

試料約 1 g をケルダールフラスコに精密に量り (W g)、硝酸 10 mL を加え穏やかに加熱する。激しい反応が終了したら、過塩素酸 10 mL を加え、再び加熱する。内容液が褐色～黒色となったら直ちに硝酸 2 mL を加える。内容液が無色～淡黄色となったら、過塩素酸の白煙を生じるまで加熱を続ける。放冷後、ケルダールフラスコの内壁を水でよく洗い込み、過塩素酸の白煙が生じるまで再び加熱する。放冷後、10%塩酸 3 mL を加え、沸騰水浴中で 30 分間加温する。放冷後、溶液を全量フラスコに洗い流した後、水で定容し (V mL)、試験溶液とする。

④ 測定

試験溶液（濃度により希釈、希釈倍数：D）、塩酸（1+1）及び水素化ホウ素ナトリウム溶液を連続的にセレン化水素発生装置に導入し、さらに、発生したセレン化水素を加熱セルに導入する。原子吸光光度計を用いて吸光度を測定し、同様に操作して作成した検量線から、試験溶液中の濃度 (C  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を求め、試料中の含量を算出する。

<原子吸光測定条件例>

加熱セル温度：1,000 °C

測定波長：196.0 nm

⑤ 計算

$$\text{試料中のセレン含量 } (\mu\text{g}/100 \text{ g}) = \frac{C \times V \times D}{W} \times 100$$

C：検量線から求めたセレンの濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

V：定容量 (mL)

D：希釈倍数

W：試料採取量 (g)

## 14 鉄

### (1) オルトフェナントロリン吸光光度法

#### ① 装置及び器具

- ・分光光度計：510 nm の吸光度が測定できるもの。
- ・電気炉：熱電対温度計付きのもので  $500 \pm 10$  °C に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・水浴

#### ② 試薬

- ・1 w/v% アスコルビン酸溶液：アスコルビン酸（特級）1 g を水に溶かして 100 mL としたものをを用いる。
- ・0.5 w/v% o-フェナントロリン溶液：o-フェナントロリン（特級）1 g を水に溶かして 200 mL としたものをを用いる。
- ・25 w/v% クエン酸ナトリウム溶液：クエン酸ナトリウム（特級）50 g を水に溶かして 200 mL としたものをを用いる。
- ・ブロムフェノールブルー指示薬：ブロムフェノールブルー 0.1 g を乳鉢に入れ、少量の 1/20 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて十分すり混ぜ、水に溶かして 250 mL としたものをを用いる。
- ・塩酸（1+1）：塩酸（原子吸光分析用）1 容に対し水 1 容を加え混和する。
- ・1% 塩酸：塩酸（原子吸光分析用）を水で希釈して用いる。
- ・鉄標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を 1% 塩酸で希釈して用いる。

#### ③ 試験溶液の調製

試料 1 ~ 10 g をビーカーに精密に量り (W g)、電熱器上で予備灰化した後、500 °C の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（1+1）3 mL を加え、水浴上で蒸発乾固する。さらに、1% 塩酸 20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150 ~ 200 °C）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化、塩酸乾固を行う。塩酸（1+1）2 mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し ( $V_1$  mL)、試験溶液とする。

#### ④ 測定

試験溶液から適当量 ( $V_2$  mL) を 25 mL 容全量フラスコ及び三角フラスコ

に正確に同量ずつ分取する。全量フラスコに 1 w/v%アスコルビン酸溶液 1 mL 及び 0.5 w/v%o-フェナントロリン溶液 2 mL を加える。三角フラスコにはブロムフェノールブルー指示薬を数滴加え、溶液の色が黄色からくすんだ黄緑色に変わるまで (pH3.5~4.0) 25 w/v%クエン酸ナトリウム溶液を滴下する。この滴下量と同量の 25 w/v%クエン酸ナトリウム溶液を全量フラスコに加え、水で定容する (V<sub>3</sub> mL)。20 °C 以上で 3 時間放置後、波長 510 nm における吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線から測定用試験溶液中の濃度を求め、試料中の含量を算出する。

⑤ 計算

$$\text{試料中の鉄含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V_1}{W \times 10} \times \frac{V_3}{V_2}$$

C : 検量線から求めた鉄の濃度 (µg/mL)

V<sub>1</sub> : 試験溶液の定容量 (mL)

V<sub>2</sub> : 分取液量 (mL)

V<sub>3</sub> : 測定用試験溶液の定容量 (mL)

W : 試料採取量 (g)

(2) 原子吸光光度法

① 装置及び器具

- ・原子吸光光度計
- ・電気炉: 熱電対温度計付きのもので 500±10 °C に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・水浴

② 試薬

- ・塩酸 (1+1) : 塩酸 (原子吸光分析用) 1 容に対し水 1 容を加え混和する。
- ・1%塩酸 : 塩酸 (原子吸光分析用) を水で希釈して用いる。
- ・鉄標準溶液 : 市販の原子吸光分析用標準溶液を 1%塩酸で希釈して用いる。

③ 試験溶液の調製

試料 1 ~ 10 g をビーカーに精密に量り (W g)、電熱器上で予備灰化した後、500 °C の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸 (1+1) 3 mL を加え、水浴上で蒸発乾固する。さらに、1%塩酸 20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上 (150~200 °C) で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化、塩酸乾固を行う。塩酸 (1+1) 2 mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し (V mL)、試験溶液とする。

④ 測定

原子吸光光度計を用いて、試験溶液の吸光度を測定し、あらかじめ作成し



た検量線から試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求める。このとき、濃度の高い試験溶液については、1%塩酸を用いて、適当な濃度に希釈した後測定する（希釈倍数：D）。

<原子吸光測定条件例>

フレイム：空気 - アセチレン

測定波長：248.3 nm

⑤ 計算

$$\text{試料中の鉄含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めた鉄の濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

(3) 誘導結合プラズマ発光分析法

① 装置及び器具

- ・誘導結合プラズマ発光分析装置：一般的な全ての誘導結合プラズマ発光分析装置を用いることができる。
- ・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 °C に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・水浴

② 試薬

- ・塩酸（1+1）：塩酸（原子吸光分析用）1容に対し水1容を加え混和する。
- ・1%塩酸：塩酸（原子吸光分析用）を水で希釈して用いる。
- ・鉄標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を用い、適宜希釈して、検量線作成用の 1.0、10.0 ppm の濃度の標準溶液を調製する。ポリエチレン又はポリプロピレン瓶に保存する。

③ 試験溶液の調製

試料 1～10 g をビーカーに精密に量り（W g）、電熱器上で予備灰化した後、500 °C の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（1+1）3 mL を加え、水浴上で蒸発乾固する。さらに、1%塩酸 20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 °C）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中へろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化し、塩酸（1+1）2 mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコへろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し（V mL）、試験溶液とする。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、希釈するか（希釈倍数：D）標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要

がある。

④ 測定

測定用試験溶液を直接ネブライザーで吸入噴霧し、アルゴンプラズマに導入して、238.204 nm における発光強度を測定する。あらかじめ作成した検量線から試験溶液中の濃度 (C μg/mL) を求める。

⑤ 計算

$$\text{試料中の鉄含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C : 検量線から求めた鉄の濃度 (μg/mL)

V : 定容量 (mL)

D : 希釈倍数

W : 試料採取量 (g)

## 15 銅

(1) 原子吸光光度法

① 装置及び器具

- ・原子吸光光度計
- ・電気炉: 熱電対温度計付きのもので 500±10 °C に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・水浴

② 試薬

- ・塩酸: 特級
- ・塩酸 (1+1): 塩酸 1 容に対し水 1 容を加え混和する。
- ・1%塩酸: 塩酸を水で希釈して用いる。
- ・銅標準溶液: 市販の原子吸光分析用標準溶液を 1%塩酸で希釈して用いる。

③ 試験溶液の調製

試料 1 ~ 10 g をビーカーに精密に量り (W g)、電熱器上で予備灰化した後、500 °C の電気炉上で灰化する。放冷後、灰に塩酸 (1+1) 3 mL を加え、水浴上で蒸発乾固する。さらに、1%塩酸 20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上 (150~200 °C) で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中へろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化、塩酸乾固を行う。塩酸 (1+1) 2 mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコへろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し (V mL)、試験溶液とする。

④ 測定

原子吸光光度計を用いて、試験溶液の吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線から試験溶液中の濃度 (C μg/mL) を求める。このとき、濃度の高い試験溶液については、1%塩酸を用いて、適当な濃度に希釈した後測定す

る（希釈倍数：D）。

<原子吸光測定条件例>

フレイム：空気 - アセチレン

測定波長：324.7 nm

⑤ 計算

$$\text{試料中の銅含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めた銅の濃度（ $\mu\text{g/mL}$ ）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

(2) キレート抽出-原子吸光光度法

① 装置及び器具

- ・原子吸光光度計
- ・電気炉：熱電対温度計付きのもので  $500 \pm 10$  °C に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・水浴

② 試薬

- ・25 w/v%クエン酸二アンモニウム溶液：クエン酸二アンモニウム（原子吸光分析用）25 g を水に溶かして 100 mL とする。
- ・3 w/v%ピロリジンジチオカルバミン酸アンモニウム (APDC) 溶液：APDC（原子吸光分析用）3 g を水に溶かして 100 mL とする。この溶液は用時調製する。
- ・40 w/v%硫酸アンモニウム溶液：硫酸アンモニウム（原子吸光分析用）40 g を水に溶かして 100 mL とする。
- ・チモールブルー指示薬：0.1 w/v%エタノール溶液。
- ・塩酸、アンモニア水、硝酸、硫酸、過塩素酸：原子吸光分析用
- ・塩酸（1+1）：塩酸 1 容に対し水 1 容を加え混和する。
- ・1%塩酸：塩酸を水で希釈して用いる。
- ・酢酸ブチル：特級
- ・銅標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を 1%塩酸で希釈して用いる。

③ 試験溶液の調製

a. 乾式灰化法

試料 1 ~ 10 g をビーカーに精密に量り（W g）、電熱器上で予備灰化した後、500 °C の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（1+1）3 mL を加え、水浴上で蒸発乾固する。さらに、1%塩酸 20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150 ~ 200 °C）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中に入ろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビー

カーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化し、塩酸（1+1）2 mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し（V mL）、必要に応じて水で適宜希釈して（希釈倍数：D）試験溶液とする。

b. 湿式灰化法

試料 1～10 g をケルダールフラスコに精密に量り（W g）、硝酸 10 mL を加え穏やかに加熱する。激しい反応が終了したら、硝酸 10 mL 及び硫酸 5 mL を加え、再び加熱する。内容液が褐色～黒色になったら硝酸 2 mL を加える。内容液が無色～淡黄色になったら、過塩素酸 2 mL を加え、硫酸の白煙を生じるまで再び加熱する。放冷後、ケルダールフラスコの内壁を水でよく洗い込み、硫酸の白煙が生じるまで再び加熱する。放冷後、溶液を全量フラスコに洗い流した後、水で定容し（V mL）、必要に応じて水で適宜希釈して（希釈倍数：D）試験溶液とする。

④ 測定

試験溶液の適当量を正確に分液漏斗に取り、25 w/v%クエン酸二アンモニウム溶液 10 mL を加えた後、チモールブルー指示薬を用いてアンモニア水で中和し、40 w/v%硫酸アンモニウム溶液 10 mL 及び水を加えて約 100 mL とする。3 w/v%APDC 溶液 5 mL を加え、5 分間放置後、酢酸ブチル<sup>注1)</sup> 10 mL を正確に加え 5 分間振とうする。静置後、酢酸ブチル層を取り、原子吸光度計を用いて吸光度を測定し、同様に操作して作成した検量線から試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求め、試料中の含量を算出する。

<原子吸光測定条件例>

フレーム：空気 - アセチレン

測定波長：324.7 nm

⑤ 計算

$$\text{試料中の銅含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めた銅の濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

[注]

1) ジイソブチルケトン（DIBK、原子吸光分析用）を用いてもよい。

(3) 誘導結合プラズマ発光分析法

① 装置及び器具

- ・誘導結合プラズマ発光分析装置：一般的な全ての誘導結合プラズマ発光分析装置を用いることができる。

- ・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 °C に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・水浴

## ② 試薬

- ・塩酸（1+1）：塩酸（特級）1 容に対し水 1 容を加え混和する。
- ・1%塩酸：塩酸（特級）を水で希釈して用いる。
- ・銅標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を 1%塩酸で希釈して、検量線作成用の 0.1、1.0 ppm の濃度の標準溶液を調製する。ポリエチレン又はポリプロピレン瓶に保存する。

## ③ 試験溶液の調製

試料 1～10 g をビーカーに精密に量り (W g)、電熱器上で予備灰化した後、500 °C の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（1+1）3 mL を加え、水浴上で蒸発乾固する。さらに、1%塩酸 20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 °C）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化し、塩酸（1+1）2 mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し (V mL)、試験溶液とする。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、希釈するか（希釈倍数：D）標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

## ④ 測定

誘導結合プラズマ発光分析装置を用いて、測定用試験溶液を直接ネブライザーで吸入噴霧して、アルゴンプラズマに導入して 324.754 nm における発光強度を測定する。あらかじめ作成した検量線から測定用試験溶液中の濃度 (C µg/mL) を求める。

## ⑤ 計算

$$\text{試料中の銅含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めた銅の濃度 (µg/mL)

V：定容量 (mL)

D：希釈倍数

W：試料採取量 (g)

## 16 ナトリウム（食塩相当量）

食塩相当量は、ナトリウム量を定量し、以下のように計算する。

$$\text{食塩相当量 (g/100g)} = \text{食品中のナトリウム含量 (mg/100g)} \times \frac{2.54}{1,000}$$

(1) 原子吸光光度法 (灰化法)

① 装置及び器具

- ・原子吸光光度計
- ・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 °C に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・水浴

② 試薬

- ・10%塩酸、1%塩酸：塩酸（原子吸光分析用）を水で希釈して用いる。
- ・ナトリウム標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を1%塩酸で希釈して用いる。

③ 試験溶液の調製

試料 1～10 g を石英ビーカーに精密に量り (W g)、電熱器上で予備灰化した後、500 °C の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に 10%塩酸 5 mL を加え、水浴上で蒸発乾固する。さらに、10%塩酸 5 mL を加え、時計皿で覆って 30 分間ホットプレート上で加温した後、ろ紙を用いて、50 mL 容ポリエチレン製全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを十分に洗浄した後、水で定容し (V mL)、試験溶液とする。

④ 測定

原子吸光光度計を用いて、試験溶液の吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線から試験溶液中の濃度 (C µg/mL) を求める。このとき、濃度の高い試験溶液については、1%塩酸を用いて、適当な濃度に希釈した後測定する (希釈倍数：D)。

<原子吸光測定条件例>

フレーム：空気 - アセチレン

測定波長：589.0 nm

⑤ 計算

$$\text{試料中のナトリウム含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたナトリウムの濃度 (µg/mL)

V：定容量 (mL)

D：希釈倍数

W：試料採取量 (g)

(2) 原子吸光光度法 (塩酸抽出法) 注1) 注2)

① 装置及び器具

- ・原子吸光光度計

② 試薬

- ・1%塩酸：塩酸（原子吸光分析用）を水で希釈して用いる。

- ・ナトリウム標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を1%塩酸で希釈して用いる。

③ 試験溶液の調製

試料2gを精密に量り(Wg)、ポリエチレン瓶に入れ、1%塩酸200mL(V mL)を正確に加え、30分間振とうした後ろ過し、試験溶液とする。

④ 測定

原子吸光光度計を用いて、試験溶液の吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線から試験溶液中の濃度(C μg/mL)を求める。このとき、濃度の高い試験溶液については、1%塩酸を用いて、適当な濃度に希釈した後測定する(希釈倍数:D)。

<原子吸光測定条件例>

フレイム：空気-アセチレン

測定波長：589.0 nm

⑤ 計算

$$\text{試料中のナトリウム含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたナトリウムの濃度 (μg/mL)

V：定容量 (mL)

D：希釈倍数

W：試料採取量 (g)

[注]

- 1) 脂質含量の高い試料は灰化法が望ましい。
- 2) 塩酸抽出法については、ガラス器具はナトリウムの溶出があるので、一切用いない。

(3) 誘導結合プラズマ発光分析法

① 装置及び器具

- ・誘導結合プラズマ発光分析装置：一般的な全ての誘導結合プラズマ発光分析装置を用いることができる。
- ・電気炉：熱電対温度計付きのもので500±10℃に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・水浴

② 試薬

- ・10%塩酸、1%塩酸：塩酸(原子吸光分析用)を水で希釈して用いる。
- ・ナトリウム標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を1%塩酸で希釈して、検量線作成用の1.0、10.0 ppmの濃度の標準溶液を調製する。ポリエチレンあるいはポリプロピレン瓶に保存する。

③ 試験溶液の調製

a. 灰化法

試料 1～10 g を石英ビーカーに精密に量り (W g)、電熱器上で予備灰化した後、500 °C の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に 10 % 塩酸 5 mL を加え、水浴上で蒸発乾固する。さらに、10 % 塩酸 5 mL を加え、時計皿で覆って 30 分間ホットプレート上で加温した後、ろ紙を用いて、50 mL 容ポリエチレン製全量フラスコ中にもろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを十分に洗浄した後、水で定容し (V mL)、試験溶液とする。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、希釈するか (希釈倍数 : D) 標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

b. 塩酸抽出法<sup>注1) 注2)</sup>

試料 2 g を精密に量り (W g)、ポリエチレン瓶に入れ、1 % 塩酸 200 mL (V mL) を正確に加え、30 分間振とうした後ろ過し、試験溶液とする。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、希釈するか (希釈倍数 : D) 標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

④ 測定

誘導結合プラズマ発光分析装置を用いて、測定用試験溶液を直接ネブライザーで吸入噴霧し、試験溶液の発光強度を測定し、あらかじめ作成した検量線から測定用試験溶液中の濃度 (C µg/mL) を求める。測定波長は 588.995 nm を用いる。

⑤ 計算

$$\text{試料中のナトリウム含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C : 検量線から求めたナトリウムの濃度 (µg/mL)

V : 定容量 (mL)

D : 希釈倍数

W : 試料採取量 (g)

[注]

1) 脂質含量の高い試料は灰化法が望ましい。

2) 塩酸抽出法については、ガラス器具はナトリウムの溶出があるので、一切用いない。

## 17 マグネシウム

(1) 原子吸光光度法

① 装置及び器具

- ・原子吸光光度計
- ・電気炉 : 熱電対温度計付きのもので 500±10 °C に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート



- ・水浴
- ② 試薬
  - ・塩酸：原子吸光分析用
  - ・塩酸（1+1）：塩酸 1 容に対し水 1 容を加え混和する。
  - ・1%塩酸：塩酸を水で希釈して用いる。
  - ・塩化ストロンチウム溶液：塩化ストロンチウム・六水和物（原子吸光分析用）38.04 g を 1%塩酸に溶かして正確に 250 mL とする。この溶液は、ストロンチウムとして 5 w/v% となる。
  - ・マグネシウム標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を 1%塩酸で希釈して用いる。

③ 試験溶液の調製

試料 1～10 g をビーカーに精密に量り (W g)、電熱器上で予備灰化した後、500 °C の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（1+1）3 mL を加え、水浴上で蒸発乾固する。さらに、1%塩酸 20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 °C）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化し、塩酸（1+1）2 mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で 50 mL に定容し (V<sub>1</sub> mL)、試験溶液とする。

④ 測定

試験溶液の適当量 (V<sub>2</sub> mL) を全量フラスコに正確に分取し、塩化ストロンチウム溶液を、ストロンチウムとして 0.5 w/v% になるように加え、1%塩酸で定容 (V<sub>3</sub> mL) した後、原子吸光光度計を用いて、吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線から測定用試験溶液中の濃度 (C μg/mL) を求め、試料中の含量を算出する。

<原子吸光測定条件例>

フレーム：空気 - アセチレン

測定波長：285.2 nm

⑤ 計算

$$\text{試料中のマグネシウム含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V_1}{W \times 10} \times \frac{V_3}{V_2}$$

C：検量線から求めたマグネシウムの濃度 (μg/mL)

V<sub>1</sub>：試験溶液の定容量 (mL)

V<sub>2</sub>：分取液量 (mL)

V<sub>3</sub>：測定用試験溶液の定容量 (mL)

W：試料採取量 (g)

(2) 誘導結合プラズマ発光分析法

① 装置及び器具

- ・誘導結合プラズマ発光分析装置：一般的な全ての誘導結合プラズマ発光分析装置を用いることができる。
- ・電気炉：熱電対温度計付きのもので  $500 \pm 10$  °C に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・水浴

② 試薬

- ・塩酸：原子吸光分析用
- ・塩酸（1+1）：塩酸 1 容に対し水 1 容を加え混和する。
- ・1%塩酸：塩酸を水で希釈して用いる。
- ・マグネシウム標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を 1%塩酸で希釈して、検量線作成用の 1.0、10.0 ppm の濃度の標準溶液を調製する。ポリエチレン又はポリプロピレン瓶に保存する。

③ 試験溶液の調製

試料 1 ~ 10 g をビーカーに精密に量り (W g)、電熱器上で予備灰化した後、500 °C の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（1+1）3 mL を加え、水浴上で蒸発乾固する。さらに、1%塩酸 20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150 ~ 200 °C）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化し、塩酸（1+1）2 mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し (V mL)、試験溶液とする。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、希釈するか（希釈倍数：D）標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

④ 測定

誘導結合プラズマ発光分析装置を用いて、測定用試験溶液を直接ネブライザーで吸入噴霧し、試験溶液の発光強度を測定し、あらかじめ作成した検量線から測定用試験溶液中の濃度 (C µg/mL) を求める。測定波長は 279.553 nm を用いる。

⑤ 計算

$$\text{試料中のマグネシウム含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたマグネシウムの濃度 (µg/mL)

V：定容量 (mL)

D：希釈倍数

W：試料採取量 (g)

## 18 マンガン

### (1) 原子吸光光度法

#### ① 装置及び器具

- ・原子吸光光度計
- ・電気炉：熱電対温度計付きのもので  $500 \pm 10$  °C に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・水浴

#### ② 試薬

- ・塩酸：原子吸光分析用
- ・塩酸（1+1）：塩酸 1 容に対し水 1 容を加え混和する。
- ・1%塩酸：塩酸を水で希釈して用いる。
- ・マンガン標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を 1%塩酸で希釈して用いる。

#### ③ 試験溶液の調製

試料 1 ~ 10 g をビーカーに精密に量り (W g)、電熱器上で予備灰化した後、500 °C の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸 (1+1) 3 mL を加え、水浴上で蒸発乾固する。さらに、1%塩酸 20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上 (150 ~ 200 °C) で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化、塩酸乾固を行う。塩酸 (1+1) 2 mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で 50 mL に定容し (V mL)、試験溶液とする。

#### ④ 測定

原子吸光光度計を用いて、試験溶液の吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線から試験溶液中の濃度 (C  $\mu\text{g/mL}$ ) を求める。このとき、濃度の高い試験溶液については、1%塩酸を用いて、適当な濃度に希釈した後測定する (希釈倍数 : D)。

<原子吸光測定条件例>

フレイム : 空気 - アセチレン

測定波長 : 279.5 nm

#### ⑤ 計算

$$\text{試料中のマンガン含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C : 検量線から求めた鉄の濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )

V : 定容量 (mL)

D : 希釈倍数

W : 試料採取量 (g)

## (2) キレート抽出-原子吸光光度法

### ① 装置及び器具

- ・原子吸光光度計
- ・電気炉：熱電対温度計付きのもので  $500 \pm 10$  °C に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・水浴

### ② 試薬

- ・25 w/v%クエン酸二アンモニウム溶液：クエン酸二アンモニウム（原子吸光分析用）25 g を水に溶かして 100 mL とする。
- ・10 w/v%ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム (DDTC) 溶液：DDTC（原子吸光分析用）10 g を水に溶かして 100 mL とする。この溶液は用時調製する。
- ・40 w/v%硫酸アンモニウム溶液：硫酸アンモニウム（原子吸光分析用）40 g を水に溶かして 100 mL とする。
- ・ブロムチモールブルー指示薬：0.1 w/v%エタノール溶液。
- ・塩酸、アンモニア水：原子吸光分析用
- ・塩酸（1+1）：塩酸 1 容に対し水 1 容を加え混和する。
- ・1%塩酸：塩酸を水で希釈して用いる。
- ・メチルイソブチルケトン（MIBK）：特級
- ・マンガン標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を 1%塩酸で希釈して用いる。

### ③ 試験溶液の調製

試料 1～10 g をビーカーに精密に量り (W g)、電熱器上で予備灰化した後、500 °C の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（1+1）3 mL を加え、水浴上で蒸発乾固する。さらに、1%塩酸 20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 °C）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化、塩酸乾固を行う。塩酸（1+1）2 mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容 (V mL) し、必要に応じて水で適宜希釈して（希釈倍数：D）試験溶液とする。

### ④ 測定

試験溶液の適当量を正確に分液漏斗にとり、25 w/v%クエン酸二アンモニウム溶液 10 mL を加えた後、ブロムチモールブルー指示薬を用いてアンモニア水で中和し、40 w/v%硫酸アンモニウム溶液 10 mL 及び水を加えて約 100 mL とする。10 w/v%DDTC 溶液 10 mL を加え、5 分間放置後、MIBK 10 mL を正確に加えて 5 分間振とうする。静置後、MIBK 層を取り原子吸光光度計を用いて吸光度を測定し、同様に操作して作成した検量線から試験溶液中の濃

度 (C  $\mu\text{g/mL}$ ) を求め、試料中の含量を算出する。

<原子吸光測定条件例>

フレイム：空気 - アセチレン

測定波長：279.5 nm

⑤ 計算

$$\text{試料中のマンガン含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたマンガンの濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )

V：定容量 (mL)

D：希釈倍数

W：試料採取量 (g)

(3) 誘導結合プラズマ発光分析法

① 装置及び器具

- ・誘導結合プラズマ発光分析装置：一般的な全ての誘導結合プラズマ発光分析装置を用いることができる。
- ・電気炉：熱電対温度計付きのもので  $500 \pm 10$  °C に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・水浴

② 試薬

- ・塩酸：原子吸光分析用
- ・塩酸 (1+1)：塩酸 1 容に対し水 1 容を加え混和する。
- ・1%塩酸：塩酸を水で希釈して用いる。
- ・マンガン標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を 1%塩酸で希釈して、検量線作成用の 0.1、1.0 ppm の濃度の標準溶液を調製する。ポリエチレンあるいはポリプロピレン瓶に保存する。

③ 試験溶液の調製

試料 1 ~ 10 g をビーカーに精密に量り (W g)、電熱器上で予備灰化した後、500 °C の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸 (1+1) 3 mL を加え、水浴上で蒸発乾固する。さらに、1%塩酸 20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上 (150 ~ 200 °C) で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化、塩酸乾固を行う。塩酸 (1+1) 2 mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容 (V mL) し、試験溶液とする。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、希釈するか (希釈倍数：D) 標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

④ 測定

誘導結合プラズマ発光分析装置を用いて、測定用試験溶液を直接ネブライザーで吸入噴霧して、アルゴンプラズマに導入して 257.610 nm における発光強度を測定する。あらかじめ作成した検量線から測定用試験溶液中の濃度 (C µg/mL) を求める。

⑤ 計算

$$\text{試料中のマンガン含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C : 検量線から求めたマンガンの濃度 (µg/mL)

V : 定容量 (mL)

D : 希釈倍数

W : 試料採取量 (g)

## 19 モリブデン

### (1) 誘導結合プラズマ質量分析法

#### ① 装置及び器具

- ・誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) : 一般的な全ての誘導結合プラズマ質量分析装置を用いることができる。
- ・マイクロ波試料分解装置 : 最大試料 1 g 分解が可能な容器を処理でき、内部温度センサーや圧力センサー等を装備し、温度コントロールが可能なもの (Milestone 社製 ETHOS 1 同等品)

#### ② 試薬

- ・塩酸 : 原子吸光分析用
- ・硝酸 : 金属濃度 100 ppt 以下の超高純度試薬 (関東化学株式会社 Ultrapur-100 超高純度試薬、同等以上のもの)
- ・酢酸 : 原子吸光分析用
- ・過酸化水素 : 特級

上記試薬については、同等以上のグレードのものを使用する。

- ・モリブデン標準溶液 : 市販の原子吸光分析用標準溶液を希釈し、検量線作成用として 0.1~10 ng/mL の標準溶液を調製する<sup>注1)</sup>。ポリエチレンあるいはポリプロピレン瓶に保存する。試験溶液の調製法に合わせた希釈溶媒を選択する。
- ・インジウム内標準溶液 : 市販の原子吸光分析用標準溶液を希釈して、200 ng/mL の濃度の標準溶液を調製する。ポリエチレンあるいはポリプロピレン瓶に保存する。

#### ③ 試験溶液の調製

試験溶液の調製に当たっては、以下に記す方法のどちらかを用いて行う。

##### a. 乾式灰化法

試料 1~10 g をビーカーに精密に量り (W g)、電熱器上で予備灰化した

後、500 °Cの電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（1+1）3 mLを加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、1%塩酸20 mLを加え、時計皿で覆い30分間ホットプレート上（150～200 °C）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化、塩酸乾固を行う。塩酸（1+1）2 mL及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、硝酸溶液で定容し（V mL）、試験溶液とする。

b. マイクロ波分解法

試料 0.1～1 g をあらかじめ希硝酸で洗浄したマイクロ波分解容器に採り（W g）、硝酸5 mL及び過酸化水素1 mLを加えて密封した後、次表の条件でマイクロ波分解を行う。放冷後、分解液に酢酸1 mLを添加し、ろ紙を用いてろ過し、イオン交換水を加えて50 mLに定容する（V mL）。

表 マイクロ波分解条件例

Stage	時間（分）	温度（°C）	強度（W）
1	0	0	0
2	2	70	1,000
3	5	50	0
4	20	200	1,000
5	30	200	1,000

ただし、最終溶液50 mL中に、内標準溶液（インジウム0.2 µg/mL）を500 µLを含むように調製する。

④ 測定

モリブデン測定用標準溶液について、内標準物質とのイオンカウント比をICP-MSを用い求め、標準溶液の濃度により検量線を作成する。同様に、試験溶液を測定し、あらかじめ作成した検量線から試験溶液中の濃度（C ng/mL）を求める。このとき、濃度の高い試験溶液については、適当な濃度に希釈（希釈倍数：D）した後測定する。

<ICP-MS 測定条件例>

機種：NexION 300D（パーキンエルマー株式会社）

導入速度：0.4 mL/分

プラズマ条件：

RF パワー 1.6 kW

プラズマガス 18 L/分（アルゴン）

キャリアガス 1.2 L/分（アルゴン）

メイクアップガス 1.02 L/分（アルゴン）

ネブライザー：標準ネブライザー

測定質量数：モリブデン 98（内標：インジウム 115）

ガスモード：ノンガスモード

⑤ 計算

$$\text{試料中のモリブデン含量 (}\mu\text{g/100 g)} = \frac{C \times F \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたモリブデンの濃度（ng/mL）

F：標準溶液のファクター

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

[注]

1) 下限値は、機器により適宜変更する。

[参考文献]

1) 日本食品標準成分表 2010、文部科学省科学技術学術審議会資源調査分科会、全国官報販売協同組合、2010

(2) 誘導結合プラズマ発光分析法

① 装置及び器具

- ・誘導結合プラズマ発光分析装置：一般的な全ての誘導結合プラズマ発光分析装置を用いることができる。
- ・マイクロ波試料分解装置：最大試料 1 g 分解が可能な容器を処理でき、内部温度センサーや圧力センサー等を装備し、温度コントロールが可能なもの（Milestone 社製 ETHOS 1 同等品）

② 試薬

- ・塩酸：原子吸光分析用
- ・硝酸：金属濃度 100 ppt 以下の超高純度試薬（関東化学株式会社 Ultrapur-100 超高純度試薬、同等以上のもの）
- ・酢酸：原子吸光分析用
- ・過酸化水素：特級

上記試薬については、同等以上のグレードのものを使用する。

- ・モリブデン標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を 1%塩酸で希釈し、検量線作成用として 10~2,000 ng/mL の標準溶液を調製する。ポリエチレンあるいはポリプロピレン瓶に保存する。測光方式の違いや感度により、標準溶液の濃度を適宜調整する。

③ 試験溶液の調製

試験溶液の調製に当たっては、以下に記す方法のどちらかを用いて行う。

a. 乾式灰化法

試料 1~10 g をビーカーに精密に量り（W g）、電熱器上で予備灰化した



後、500 °Cの電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（1+1）3 mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、1 %塩酸 20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 °C）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返す、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化、塩酸乾固を行う。塩酸（1+1）2 mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し（V mL）、試験溶液とする。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、1 %塩酸又は硝酸（1+9）で希釈するか（希釈倍数：D）標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

#### b. マイクロ波分解法

試料 0.1～1 g をあらかじめ希硝酸で洗浄したマイクロ波分解容器に採り（W g）、硝酸 5 mL 及び過酸化水素 1 mL を加えて密封した後、次表の条件でマイクロ波分解を行う。放冷後、分解液に酢酸 1 mL を添加し、ろ紙を用いてろ過し、イオン交換水を加えて 50 mL に定容する（V mL）。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、1 %塩酸又は硝酸（1+9）で希釈するか（希釈倍数：D）標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

表 マイクロ波分解条件例

Stage	時間 (分)	温度 (°C)	強度 (W)
1	0	0	0
2	2	70	1,000
3	5	50	0
4	20	200	1,000
5	30	200	1,000

#### ④ 測定

誘導結合プラズマ発光分析装置を用いて、測定用試験溶液を直接ネブライザーで吸入噴霧し、試験溶液の発光強度を測定し、あらかじめ作成した検量線から測定用試験溶液中の濃度（C ng/mL）を求める。

<ICP-AES 測定条件例>

機種：iCAP 7400（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）

試料導入ポンプ回転数：50 回転/分

RF パワー：1150 W

プラズマガス：12 L/分（アルゴン）

補助ガス：0.5 L/分（アルゴン）

ネブライザーガス：0.5 L/分（アルゴン）

ネブライザー：標準ネブライザー

測光方式：同軸モード

測定波長：202.03 nm

⑤ 計算

$$\text{試料中のモリブデン含量 } (\mu\text{g}/100 \text{ g}) = \frac{C \times F \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたモリブデンの濃度（ng/mL）

F：標準溶液のファクター

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

## 20 ヨウ素

### (1) 滴定法

#### ① 装置及び器具

- ・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 °C に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・pH 計

#### ② 試薬

- ・50%水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム（特級）を水に溶かして用いる。
- ・フェノールフタレイン指示薬：1 w/v%エタノール溶液。
- ・エタノール、ヨウ化カリウム：特級
- ・1 mol/L 次亜塩素酸ナトリウム溶液：過マンガン酸カリウム（特級）32 g を 200 mL 容三角フラスコに入れ、減圧下、塩酸（特級）100 mL を徐々に滴下する。発生する塩素ガスを 2 w/v%過マンガン酸カリウム溶液で洗い、さらに水で洗った後、水酸化ナトリウム（特級）44 g を水 200 mL に溶かした液に吸収させる（この溶液は約 2 mol/L である。）。0.05 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準溶液で滴定し、1 mol/L に調製したものを用いる。
- ・40 w/v%ギ酸ナトリウム溶液：ギ酸ナトリウム（特級）400 g に水を加えて 1 L とする。
- ・3 mol/L 硫酸：硫酸（特級）を水で希釈して用いる。
- ・0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準溶液：市販の標準溶液を用いる。
- ・でんぷん指示薬：可溶性でんぷん 1 g を沸騰水約 60 mL に溶かし、放冷後、塩化ナトリウム（特級）20 g を加え、水で 100 mL とする。

#### ③ 試験溶液の調製

試料 1～10 g をニッケルるつぼに精密に量り（W g）、50%水酸化ナトリウム溶液 2 mL 及びエタノール 5 mL を加え、電熱器上で予備灰化した後、

500 °Cの電気炉中で約3時間灰化する。放冷後、灰に水約20 mLを加え、時計皿で覆い30分間ホットプレート上で加温した後、ろ紙を用いて全量フラスコ中にろ過する。温水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びろつぼを十分に洗浄した後、水で50 mLに定容し（ $V_1$  mL）、試験溶液とする。

④ 測定

試験溶液の適当量（ $V_2$  mL）を正確に200 mL容コニカルビーカーに分取し、フェノールフタレイン指示薬を用いて3 mol/L硫酸で中和後、水で約70 mLとする。1 mol/L次亜塩素酸ナトリウム溶液1 mLを加え、pHメーターを用いて3 mol/L硫酸及び50%水酸化ナトリウム溶液でpHを1.7~2.0に調整後、5分間煮沸する。40 w/v%ギ酸ナトリウム溶液5 mLを加え、さらに5分間煮沸し、放冷後、ヨウ化カリウム0.5 g、3 mol/L硫酸6 mLを加え、5分間放置後、でんぷん溶液数滴を加え、0.01 mol/Lチオ硫酸ナトリウム標準溶液で滴定する（ $T$  mL）。溶液が30秒間無色を保つ点を終点とする。

⑤ 計算

0.01 mol/Lチオ硫酸ナトリウム標準溶液1 mLは、ヨウ素0.2115 mgに相当し、このとき、試料中のヨウ素含量は次式により求める。

$$\text{試料中のヨウ素含量 (mg/100 g)} = \frac{T \times 0.2115 \times F}{W} \times \frac{V_1}{V_2} \times 100$$

$T$  : 滴定に要した0.01 mol/Lチオ硫酸ナトリウム標準溶液の量 (mL)

$F$  : 0.01 mol/Lチオ硫酸ナトリウム標準溶液のファクター

$V_1$  : 定容量 (mL)

$V_2$  : 分取液量 (mL)

$W$  : 試料採取量 (g)

(2) ガスクロマトグラフ法

① 適用される食品

ヨウ素をヨードケトン誘導体（3-モノヨード-2-ブタノン）とし、ECD検出器付きガスクロマトグラフで測定する。ヨウ素含量の少ない場合に適用される。

② 装置及び器具

- ・ガスクロマトグラフ：ECD検出器付き
- ・電気炉：熱電対温度計付きのもので $500 \pm 10$  °Cに設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート

③ 試薬

- ・硫酸（1+1）：水1容に対し硫酸（原子吸光分析用）1容を加え、混和する。
- ・水酸化ナトリウム、エタノール、メチルエチルケトン：特級
- ・50%水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウムを水に溶かして用いる。
- ・ヘキサン：残留農薬分析用

- ・ 200 ppm 亜硝酸ナトリウム溶液：亜硝酸ナトリウム（特級）を水で希釈して用いる。
- ・ ヨウ素標準溶液：ヨウ化カリウム（特級）130.8 mg を正確に量り、水に溶かして正確に 100 mL としたものを標準原液とし、水で希釈して用いる。標準原液 1 mL 中にヨウ素 1 mg を含む。

#### ④ 試験溶液の調製

試料 1～10 g をニッケルるつぼに精密に量り (W g)、50%水酸化ナトリウム溶液 2 mL 及びエタノール 5 mL を加え、電熱器上で予備灰化した後、500 °C の電気炉中で約 3 時間灰化する。放冷後、灰に水約 20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上で加温した後、ろ紙を用いて全量フラスコ中にろ過する。温水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びるつぼを十分に洗浄した後、水で定容し (V mL)、試験溶液とする。

#### ⑤ 測定

試験溶液最大 10 mL を正確に共栓付き試験管に量り取り、硫酸 (1+1) 0.7 mL、メチルエチルケトン 0.5 mL 及び 200 ppm 亜硝酸ナトリウム溶液 0.5 mL を加え混和し、20 分間放置後、ヘキサン 20 mL を正確に加え、5 分間振とうする。ヘキサン層 2 µL を ECD-ガスクロマトグラフに注入する。標準溶液について同様に操作して作成した検量線から、試験溶液中の濃度 (C µg/mL) を求め、試料中の含量を算出する。

<ガスクロマトグラフ測定条件例>

検出器：ECD

カラム：20%DEGS+1%リン酸/Chromosorb WAW 60～80 mesh

ガラス管、3 mm×1.5 m

温度：試料注入口 250 °C、カラム 120 °C、検出器 250 °C

#### ⑥ 計算

$$\text{試料中のヨウ素含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたヨウ素の濃度 (µg/mL)

V：定容量 (mL)

D：希釈倍数

W：試料採取量 (g)

[参考文献]

- 1) 山野辺秀男ら：東京衛研年報、31-1、137 (1980)

## 21 リン

### (1) バナドモリブデン酸吸光光度法

#### ① 装置及び器具

- ・ 分光光度計：410 nm の吸光度が測定できるもの。
- ・ 電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 °C に設定できるものを用いる。

- ・ホットプレート
  - ・水浴
- ② 試薬
- ・発色試薬：メタバナジン酸アンモニウム（特級）1.12 g を水 200～300 mL に溶かし、硝酸（特級）250 mL を加える。この液にモリブデン酸アンモニウム（特級）27.0 g を水に溶かしたものをかくはんしながら加え、水で 1 L とする。褐色瓶に保存する。
  - ・フェノールフタレイン指示薬：1 w/v%エタノール溶液。
  - ・硝酸、硫酸、過塩素酸、塩酸：特級
  - ・アンモニア水（1+49）、硝酸（1+9）、塩酸（1+1）：各特級試薬 1 容に対し、水 49 容、9 容及び 1 容をそれぞれ加え、混和する。
  - ・リン標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を水で希釈して用いる。
- ③ 試験溶液の調製
- a. 乾式灰化法
- 試料 1～10 g をビーカーに精密に量り（W g）、電熱器上で予備灰化した後、500 °C の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（1+1）3 mL を加え、水浴上で蒸発乾固する。さらに、1%塩酸 20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 °C）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化し、塩酸（1+1）2 mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し（V mL）、必要に応じて水で適宜希釈して（希釈倍数：D）試験溶液とする。
- b. 湿式灰化法
- 試料 1～10 g をケルダールフラスコに精密に量り（W g）、硝酸 10 mL を加え穏やかに加熱する。激しい反応が終了したら、硝酸 10 mL 及び硫酸 5 mL を加え、再び加熱する。内容液が褐色～黒色となったら硝酸 2 mL を加える。内容液が無色～淡黄色となったら、過塩素酸 2 mL を加え、硫酸の白煙を生じるまで再び加熱する。放冷後、ケルダールフラスコの内壁を水でよく洗い込み、硫酸の白煙が生じるまで再び加熱する。放冷後、溶液を全量フラスコに洗い流した後、水で定容し（V mL）、必要に応じて水で適宜希釈して（希釈倍数：D）試験溶液とする。
- ④ 測定
- 試験溶液の適当量を正確に 100 mL 容全量フラスコに分取し、フェノールフタレイン指示薬を数滴加え、希アンモニア水（1+49）を微紅色を呈するまで加えた後、硝酸（1+9）で中和する。水で全量を約 70 mL とし、発色試薬 20 mL を加え、水で 100 mL とする。混和し 30 分間放置した後、波長 410 nm における吸光度を測定する。同様に操作して作成した検量線から、試

験溶液中の濃度 (C  $\mu\text{g/mL}$ ) を求め、試料中の含量を算出する。

⑤ 計算

$$\text{試料中のリン含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C : 検量線から求めたリンの濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )

V : 定容量 (mL)

D : 希釈倍数

W : 試料採取量 (g)

(2) モリブデンブルー吸光光度法

① 装置及び器具

- ・分光光度計 : 880 nm の吸光度が測定できるもの。
- ・電気炉 : 熱電対温度計付きのもので  $500 \pm 10$  °C に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・水浴

② 試薬

- ・p-ニトロフェノール指示薬 : 0.1 w/v% エタノール溶液。
- ・発色試薬 : モリブデン酸アンモニウム (特級) 6 g 及び酒石酸アンチモニルカリウム (特級) 0.24 g を加え、これに硫酸 (2+1) 120 mL を加え、次いでスルファミン酸アンモニウム (特級) 5 g を溶かして水で 500 mL とする。
- ・1 w/v% アスコルビン酸溶液 : L-アスコルビン酸 (特級) 1 g を水に溶かして 100 mL とする。
- ・塩酸、アンモニア水 : 特級
- ・アンモニア水 (1+49)、塩酸 (1+1) : 各特級試薬 1 容に対し、水 49 容及び 1 容をそれぞれ加え、混和する。
- ・リン標準溶液 : 市販の原子吸光分析用標準溶液を水で希釈して用いる。

③ 試験溶液の調製

a. 乾式灰化法

試料 1 ~ 10 g をビーカーに精密に量り (W g)、電熱器上で予備灰化した後、500 °C の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸 (1+1) 3 mL を加え、水浴上で蒸発乾固する。さらに、1 % 塩酸 20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上 ( $150 \sim 200$  °C) で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化し、塩酸 (1+1) 2 mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し (V mL)、必要に応じて水で適宜希釈して (希釈倍数 : D) 試験溶液とする。

## b. 湿式灰化法

試料 1～10 g をケルダールフラスコに精密に量り (W g)、硝酸 10 mL を加え穏やかに加熱する。激しい反応が終了したら、硝酸 10 mL 及び硫酸 5 mL を加え、再び加熱する。内容液が褐色～黒色になったら硝酸 2 mL を加える。内容液が無色～淡黄色になったら、過塩素酸 2 mL を加え再び硫酸の白煙を生じるまで加熱を続ける。放冷後、ケルダールフラスコの内壁を水でよく洗い込み、硫酸の白煙が生じるまで再び加熱する。放冷後、溶液を全量フラスコに洗い流した後、水で定容し (V mL)、必要に応じて水で適宜希釈して (希釈倍数 : D) 試験溶液とする。

### ④ 測定

試験溶液の適当量を正確に 50 mL 容全量フラスコに分取し、p-ニトロフェノール指示薬を数滴加え、アンモニア水 (1+49) をわずかに黄色を呈するまで加えた後、水で全量を約 40 mL とする。発色試薬 5 mL 及び 1 w/v% アスコルビン酸溶液 5 mL を加え、水で 50 mL とし、15 分間放置した後、波長 880 nm における吸光度を測定する。同様に操作して作成した検量線から試験溶液中の濃度 (C µg/mL) を求め、試料中の含量を算出する。

### ⑤ 計算

$$\text{試料中のリン含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C : 検量線から求めたリンの濃度 (µg/mL)

V : 定容量 (mL)

D : 希釈倍数

W : 試料採取量 (g)

## (3) 誘導結合プラズマ発光分析法

### ① 装置及び器具

- ・誘導結合プラズマ発光分析装置 : 一般的な全ての誘導結合プラズマ発光分析装置を用いることができる。
- ・電気炉 : 熱電対温度計付きのもので 500±10 °C に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・水浴

### ② 試薬

- ・塩酸 (1+1) : 塩酸 (特級) 1 容に対し水 1 容を加え混和する。
- ・1% 塩酸 : 塩酸 (特級) を水で希釈して用いる。
- ・リン標準溶液 : 市販の原子吸光分析用標準溶液を 1% 塩酸で希釈して、検量線作成用の 10、100 ppm の濃度の標準溶液を調製する。ポリエチレン又はポリプロピレン瓶に保存する。

### ③ 試験溶液の調製

#### a. 乾式灰化法

試料 1～10 g をビーカーに精密に量り (W g)、電熱器上で予備灰化した後、500 °C の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸 (1+1) 3 mL を加え、水浴上で蒸発乾固する。さらに、1 % 塩酸 20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上 (150～200 °C) で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化し、塩酸 (1+1) 2 mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し (V mL)、試験溶液とする。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、希釈するか (希釈倍数 : D) 標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

#### b. 湿式灰化法

試料 1～10 g をケルダールフラスコに精密に量り (W g)、硝酸 10 mL を加え穏やかに加熱する。激しい反応が終了したら、硝酸 10 mL 及び硫酸 5 mL を加え、再び加熱する。内容液が褐色～黒色となったら硝酸 2 mL を加える。内容液が無色～淡黄色となったら、過塩素酸 2 mL を加え、再び硫酸の白煙を生じるまで加熱を続ける。放冷後、ケルダールフラスコの内壁を水でよく洗い込み、硫酸の白煙が生じるまで再び加熱する。放冷後、溶液を全量フラスコに洗い流した後、水で定容し (V mL)、試験溶液とする。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、希釈するか (希釈倍数 : D) 標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

#### ④ 測定

誘導結合プラズマ発光分析装置を用いて、測定用試験溶液を直接ネブライザーで吸入噴霧して、アルゴンプラズマに導入して 213.618 nm における発光強度を測定する。あらかじめ作成した検量線から測定用試験溶液中の濃度 (C µg/mL) を求める。

#### ⑤ 計算

$$\text{試料中のリン含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C : 検量線から求めたリンの濃度 (µg/mL)

V : 定容量 (mL)

D : 希釈倍数

W : 試料採取量 (g)

## 22 ナイアシン (ナイアシン当量として)

ナイアシンはニコチン酸及びニコチン酸アミドを総称する名称である。なお、肝臓において質量比でトリプトファン 60 からナイアシン 1 を合成できるため、ニコ



チン酸とニコチン酸アミドの合計量に 1/60 トリプトファン量を加えたものをナイアシン当量とする。

$$\begin{aligned} & \text{食品中のナイアシン含量 (mg/100 g)} \\ &= \text{ニコチン酸 (mg/100 g)} + \text{ニコチン酸アミド (mg/100 g)} \\ &+ 1/60 \text{ トリプトファン (mg/100 g)} \\ &= \text{微生物学的定量法によるナイアシン (mg/100 g)} \\ &+ 1/60 \text{ トリプトファン (mg/100 g)} \end{aligned}$$

#### ア ニコチン酸及びニコチン酸アミド

##### (1) 高速液体クロマトグラフ法

###### ① 適用される食品

食品中にニコチン酸又はニコチン酸アミドが 100 g 当たり 1 mg 以上は含まれていて、さらにその存在形態が明らかな場合に適用される。

###### ② 装置及び器具

- ・高速液体クロマトグラフ (HPLC) : 紫外分光光度計付き
- ・カラム : 逆相型 (オクタデシルシリル基を結合させたシリカゲルを充てんしたカラム)

###### ③ 試薬

- ・ニコチン酸標準溶液 : 日本薬局方標準品を水に溶かして、2、5、10 及び 20 µg/mL 溶液を調製する。
- ・ニコチン酸アミド標準溶液 : 日本薬局方標準品を水に溶かして、2、5、10 及び 20 µg/mL 溶液を調製する。
- ・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

###### ④ 試験溶液の調製

試料の適量 (W g) を水で振とう又はホモジナイズ抽出する。得られた抽出液をろ過し、一定容とし (V mL)、適宜水で希釈して (希釈倍数 : D)、約 10 µg/mL 濃度の試験溶液とする。

###### ⑤ 測定

試験溶液の 20 µL を高速液体クロマトグラフに注入し、ニコチン酸又はニコチン酸アミドのピーク面積を測定し、あらかじめ同量の標準溶液を注入して得られた検量線を用いて試験溶液中の濃度 (C µg/mL) を求め、試料中のニコチン酸又はニコチン酸アミド含量を算出する。

<高速液体クロマトグラフ操作条件例>

###### 1) ニコチン酸

カラム : Inertsil ODS-2 (ジーエルサイエンス製) 又は同等品、内径 4.6 mm、長さ 150 mm、ステンレス製

移動相 : 3 mmol/L テトラブチルアンモニウムブロマイド含有 5 mmol/L 酢酸ナトリウム (pH5.0) :メタノール (9:1)

測定波長 : 260 nm

流量：1.5 mL/分

2) ニコチン酸アミド

カラム：Inertsil ODS-2（ジールサイエンス製）又は同等品、内径 4.6 mm、長さ 150 mm、ステンレス製。

移動相：10 mmol/L オクタンスルホン酸ナトリウム含有 20 mmol/L 酢酸ナトリウム（pH3.5）：メタノール（98:2）

測定波長：260 nm

流量：1.2 mL/分

⑥ 計算

$$\text{試料中のニコチン酸又はニコチン酸アミド含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたニコチン酸又はニコチン酸アミドの濃度（ $\mu\text{g/mL}$ ）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

(2) 微生物学的定量法

① 適用される食品

一般的な食品においては、ニコチン酸及びニコチン酸アミドを分別して定量する必要はなく、感度及び特異性に優れた微生物学的定量法が適用される。

② 装置及び器具

・分光光度計

③ 試薬

・ナイアシン標準溶液：ニコチン酸（日本薬局方標準品）100 mg を水に溶かし、希釈して正確に 100 mL とする。さらに、希釈して 50 ng/mL となるようにする。

・使用菌株：*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014（NBRC 3070）

・ナイアシン測定用培地（1 L 中、pH6.8 $\pm$ 0.1）

カザミノ酸	14 g
L-シスチン	400 mg
DL-トリプトファン	200 mg
アデニン硫酸塩	20 mg
グアニン塩酸塩	20 mg
ウラシル	20 mg
リボフラビン	400 $\mu\text{g}$
チアミン塩酸塩	200 $\mu\text{g}$
ビオチン	0.8 $\mu\text{g}$
p-アミノ安息香酸	200 $\mu\text{g}$

パントテン酸カルシウム	400 µg
ピリドキシン塩酸塩	800 µg
リン酸水素二カリウム	1 g
リン酸二水素カリウム	1 g
硫酸マグネシウム	400 mg
硫酸第一鉄	20 mg
硫酸マンガン	20 mg
酢酸ナトリウム	20 g
グルコース	40 g

・乳酸菌保存用培地（1 L 中、pH6.8±0.1）

酵母エキス	5.5 g
ペプトン	12.5 g
ブドウ糖	11.0 g
リン酸水素二カリウム	0.25 g
硫酸第一鉄	5.0 mg
リン酸二水素カリウム	0.25 g
酢酸ナトリウム（無水）	10.0 g
硫酸マグネシウム	0.1 g
硫酸マンガン	5.0 mg
粉末寒天	20.0 g

・前培養培地：上記培地より粉末寒天を除く。

なお各培地はそれぞれ調製したものが市販されている<sup>注1)</sup>。

・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

④ 接種菌液の調製

*Lactobacillus plantarum* の保存菌株を前培養培地に接種し、35 °Cで20時間程度培養する。この菌浮遊溶液を遠心分離し、600 nmにおける透過率が80～90%になるように滅菌生理食塩水で希釈し、接種菌液とする。

⑤ 試験溶液の調製

試料2 gを精密に量り（W g）、0.5 mol/L硫酸100 mLを加え、121 °Cで30分間オートクレーブ処理を行う。冷却後、5 mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH6.8に調整後、水で200 mLに定容し（V mL）、ろ過する。さらに、溶液1 mL中にナイアシンが10～20 ngを含むように水で希釈し（希釈倍数：D）、試験溶液とする。

⑥ 測定

試験管2本ずつに試験溶液0.5、1及び2 mLを正確に加え、次に各試験管に測定用培地2.5 mL及び水を加えて全量5 mLとする。別に検量線作成のため、ニコチン酸標準溶液（0～75 ng相当量）を試験管2本ずつに取り、それぞれに測定用培地2.5 mL及び水を加えて全量を5 mLとする。121 °Cで5分

間オートクレーブ処理を行い、冷却後、各試験管に接種菌溶液 1 滴 (約 30  $\mu$ L) ずつを無菌的に接種し、37  $^{\circ}$ C で 18 時間程度恒温槽又は恒温水槽に入れて培養する。

培養後、増殖度を 600 nm の濁度を用いて測定する<sup>注2)</sup>。標準溶液の濁度より検量線を作成し、これに試験溶液より得られた濁度を照合して、試験溶液中のナイアシン量 (ng/mL) を求め、試料中のナイアシン含量を算出する。

#### ⑦ 計算

$$\text{試料中のナイアシン含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10,000}$$

C : 検量線から求めたナイアシンの濃度 (ng/mL)

V : 定容量 (mL)

D : 希釈倍数

W : 試料採取量 (g)

#### [注]

- 1) ニコチン酸定量用基礎培地「ニッスイ」: 日水製薬  
一般乳酸菌保存検出用培地「ニッスイ」: 日水製薬  
一般乳酸菌接種用培地「ニッスイ」: 日水製薬 (前培養培地に同じ)
- 2) マイクロプレートを使用し、マイクロプレートリーダー (例えば、日本モレキュラーデバイス社製、スペクトラ MAX 型等) で濁度を測定することもできる。

### イ トリプトファン

#### (1) 高速液体クロマトグラフ法<sup>注1)</sup>

##### ① 装置及び器具

- ・高速液体クロマトグラフ (HPLC) : 蛍光検出器付き
- ・カラム : オクタデシルシリル基を結合させたシリカゲルを充てんしたカラム

##### ② 試薬

- ・標準溶液 : トリプトファン (特級) 50 mg を精秤する。0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液に溶解後、100 mL に定容し、水で 50 倍希釈する。(10  $\mu$ g/mL)
- ・水酸化バリウム (特級)
- ・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

##### ③ 試験溶液の調製

試料 0.1 ~ 1 g (W g) 及び水酸化バリウム 7.8 g を封管用試験管に精秤し、水 4.5 mL 及び 60%チオジエチレングリコール 0.5 mL を加え、沸騰水浴中で水酸化バリウムを加熱溶解する<sup>注2)</sup>。溶解後、減圧下で脱気し、封管後、110  $^{\circ}$ C (恒温乾燥機) で 12 時間加水分解する。冷却後、開管し、加水分解液を 50 mL 又は 100 mL 容全量フラスコ (1 w/v%フェノールフタレイン溶液を数滴加えておく) に移した後、微アルカリに調整、定容し (V mL)、適宜水で希

積する（希釈倍数：D）。0.45 μm のフィルターでろ過したものを試験溶液とする。

#### ④ 測定

試験溶液 20 μL を高速液体クロマトグラフに注入し、トリプトファンのピーク面積を測定し、あらかじめ同量の HPLC 用標準溶液を高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線から、試料中のトリプトファン含量（C μg/mL）を求める。

<高速液体クロマトグラフ操作条件例>

カラム：Inertsil ODS-2（ジーエルサイエンス製）又は同等品、内径 4.6mm、長さ 250mm、ステンレス製

移動相：10 mmol/L 過塩素酸-メタノール（92:8）

検出器：蛍光分光光度計

測定波長：励起波長 285 nm、蛍光波長：348 nm

流量：1.0 mL/分

温度：50 °C

#### ⑤ 計算

$$\text{試料中のトリプトファン含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたトリプトファンの濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

[注]

- 1) アミノ酸自動分析法でも測定できる。
- 2) トリプトファンは塩酸加水分解では破壊されるため、アルカリを用いた加水分解を行う。

## 23 パントテン酸

### (1) 微生物学的定量法

#### ① 装置及び器具

- ・分光光度計

#### ② 試薬

- ・パントテン酸カルシウム標準溶液：D-パントテン酸カルシウム標準品<sup>注1)</sup> 100 mg を 25 v/v%エタノール溶液に溶かし、正確に 100 mL とする。さらに、水で希釈して 0.1 μg/mL とする。
- ・ハト肝臓アミダーゼ溶液：ハト肝臓アセトンパウダー<sup>注2)</sup>（Sigma L8376 又は同等品）10 g に、氷冷した 0.02 mol/L 炭酸水素カリウム水溶液 50 mL を加え、氷冷しながらすり鉢等につぶして懸濁液とする。この懸濁液を氷冷した 0.02 mol/L 炭酸水素カリウム水溶液 50 mL で遠心管に移し、冷却しな

がら遠心分離（3,000 回転/分、10 分間）する。上澄み液にイオン交換樹脂（Dowex 1×8）5 g を加え、約 1 時間氷冷しながらかくはんする。冷却遠心分離、イオン交換樹脂の添加及び氷冷攪拌の操作を 3 回繰り返す。さらに冷却遠心分離（3,000 回転/分、10 分間）を行って得られる上澄み液をハト肝臓アミダーゼ溶液とする。

- アルカリホスファターゼ溶液：アルカリホスファターゼ（Sigma P7640, TypeI-S 又は同等品）を水に溶かして 2 w/v% とする。
- トリス塩酸緩衝液：2-アミノ-2-（ヒドロキシメチル）-1,3-プロパンジオール（特級）24.2 g を水 200 mL に溶かし、30 %塩酸溶液で pH8.3 に調整する。
- 炭酸水素ナトリウム溶液：炭酸水素ナトリウム（特級）850 mg を水に溶かして 100 mL とする。

- 使用菌株：*Lactobacillus plantarum*<sup>注3)</sup> ATCC 8014（NBRC 3070）

- パントテン酸測定用培地（1 L 中、pH6.8±0.1）

カザミノ酸	14 g
L-シスチン	400 mg
DL-トリプトファン	200 mg
硫酸アデニン	20 mg
塩酸グアニン	20 mg
ウラシル	20 mg
塩酸チアミン	200 µg
リボフラビン	400 µg
パラアミノ安息香酸	200 µg
ビオチン	0.8 µg
ニコチン酸	1 mg
塩酸ピリドキシン	800 µg
リン酸二水素カリウム	1 g
リン酸一水素カリウム	1 g
硫酸マグネシウム	400 mg
硫酸第一鉄	20 mg
硫酸マンガン	20 mg
酢酸ナトリウム（無水）	20 g
グルコース	40 g

- 乳酸菌保存用培地（1 L 中、pH6.8±0.1）

酵母エキス	5.5 g
ペプトン	12.5 g
ブドウ糖	11.0 g
リン酸一水素カリウム	0.25 g
硫酸第一鉄	5.0 mg
リン酸二水素カリウム	0.25 g
酢酸ナトリウム（無水）	10 g
硫酸マグネシウム	0.1 g
硫酸マンガン	5.0 mg
粉末寒天	20.0 g

- ・前培養培地：上記培地より粉末寒天を除く。

なお各培地はそれぞれ調製したものが市販されている<sup>注4)</sup>。

- ・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

### ③ 接種菌液の調製

*Lactobacillus plantarum* の保存菌株を前培養培地に接種し、35 °Cで20時間程度培養する。この菌浮遊溶液を遠心分離し、600 nmにおける透過率が80～90%になるように滅菌生理食塩水で希釈し、接種菌液とする。

### ④ 試験溶液の調製<sup>注5)</sup>

試料2 g (W g) を精秤してトリス塩酸緩衝液10 mLと水20 mLを加え、121 °Cで15分間加圧抽出する。冷却後、水を加えて全量を50 mLとし (V<sub>1</sub> mL)、その5 mL (V<sub>2</sub> mL) を試験管に分取して炭酸水素ナトリウム溶液0.1 mL、2 w/v%アルカリホスファターゼ水溶液0.4 mL、ハト肝臓アミダーゼ溶液0.2 mLを加え、静かに混合する。トルエンを2～3滴加え、37 °Cで15時間反応させる。10分間煮沸して反応を止め、冷却後、1 mol/L塩酸でpH4.5にした後、水を加えて全量を14 mLとし (V<sub>3</sub> mL)、遠心分離 (12,000回転/分、10分間) する。上澄み液7 mL (V<sub>4</sub> mL) を分取して1 mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH6.8に調整後、水を加えて全量を25 mLとする (V<sub>5</sub> mL)。さらに溶液1 mL中にパントテン酸が20～40 ng含まれるように水で希釈し (希釈倍数：D)、試験溶液とする。

### ⑤ 測定

試験管2本ずつに試験溶液0.5、1.0及び2.0 mLを正確に加え、次に試験管に測定用培地2.5 mL及び水を加えて全量を5 mLとする。別に検量線作成のため、パントテン酸カルシウム標準溶液 (0～0.15 µg相当量) を試験管2本ずつに取り、それぞれに測定用培地2.5 mL及び水を加えて全量を5 mLとする。121°Cで5分間オートクレーブ処理を行い、冷却後、各試験管に接種菌溶液1滴 (約30 µL) ずつを無菌的に接種し、37 °Cで18時間程度恒温槽又は恒温水槽に入れて培養する。

培養後、増殖度を600 nmの濁度を用いて測定する<sup>注6)</sup>。標準溶液の濁度より検量線を作成し、これに試験溶液より得られた濁度を照合して、試験溶液

中のパントテン酸カルシウム濃度 (C µg/mL) を求め、試料中のパントテン酸カルシウム含量を算出する。得られた値に係数 0.92 を掛けてパントテン酸量とする。

⑥ 計算

$$\text{試料中のパントテン酸含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V_1 \times D \times V_3 \times V_5}{V_2 \times V_4 \times W \times 10} \times 0.92$$

C : 検量線から求めたパントテン酸カルシウムの濃度 (µg/mL)

V<sub>1</sub>~V<sub>5</sub> : 定容量 (mL) 又は分取量 (mL)

D : 希釈倍数

W : 試料採取量 (g)

[注]

- 1) 片山化学 特級、又は同等品を用いる。
- 2) ハト肝臓アセトンパウダー中にはパントテン酸関連化合物が含まれているため、あらかじめイオン交換樹脂処理によりこれを除去しておく必要がある。
- 3) 旧名称は、*Lactobacillus arabinosus* である。この菌は遊離パントテン酸にしか応答しないので、CoA (コエンザイム A) 関連化合物等の結合型パントテン酸はあらかじめハト肝臓アミダーゼとアルカリホスファターゼで分解処理して遊離型に誘導しておく必要がある。
- 4) パントテン酸定量用基礎培地「ニッスイ」: 日水製薬  
一般乳酸菌保存検出用培地「ニッスイ」: 日水製薬  
一般乳酸菌接種用培地「ニッスイ」: 日水製薬 (前培養培地に同じ)
- 5) CoA 関連化合物等の結合型パントテン酸があまり多くない場合の試験溶液の調製は、パントテン酸の含量に応じて以下の2種の簡易法のいずれかによってもよい。

① パントテン酸含量が比較的少ない場合の簡易調製法

試料 2 g を精秤して水 50 mL を加え、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH6.8~7.0 に調整し、121°C で 15 分間オートクレーブで加圧抽出する。冷却後、2.5 mol/L 酢酸ナトリウム溶液 2 mL、タカジアスターゼ原末 (第一三共 2500~5000 unit/g) 又は同等品 100 mg 及びパパイイン (和光純薬工業 Code No.164-00172、Activity : 0.5 unit/g) 100 mg を加え、1 mol/L 塩酸で pH4.5 にした後、トルエンを 2~3 滴加え、37 °C で 24 時間酵素分解を行う。反応後、10 分間煮沸して酵素反応を停止し、冷却後、10%メタリン酸 0.3 mL を加えて 100 mL に定容し、ろ過する。ろ液 25 mL を分取して 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH6.8 に調整後、水を加えて 50 mL に定容してろ過し、さらに溶液 1 mL 中にパントテン酸が 20~40 ng 含まれるように水で希釈し、試験溶液とする。

② パントテン酸含量が比較的多い場合の簡易調製法



パントテン酸カルシウム等が添加されていてパントテン酸が高含量の場合には、単純に水で振とう抽出し、ろ過して得られるろ液を 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH6.8 に調整し、試験溶液とする。この場合には、微生物学的定量法の他に紫外検出器付き高速液体クロマトグラフで定量する方法も適用できるが、食品表示基準における分析方法は、微生物学的定量法とする。

<高速液体クロマトグラフ操作条件例>

測定波長：210 nm

カラム：J'sphere ODS-M80（ワイエムシィ製）又は同等品

移動相：0.01 mol/L リン酸二水素カリウム-メタノール（95:5）

流量：1.0 mL/分

- 6) マイクロプレートを使用し、マイクロプレートリーダー（例えば、日本モレキュラーデバイス社製、スペクトラ MAX 型等）で濁度を測定することもできる。

## 24 ビオチン

### (1) 微生物学的定量法

#### ① 装置及び器具

- ・分光光度計

#### ② 試薬

- ・ビオチン標準溶液：D-ビオチン標準品<sup>注1)</sup> 20 mg を 25 v/v%エタノール溶液に溶かし、正確に 200 mL とする。さらに、水で希釈して 0.5 ng/mL とするようになる。
- ・使用菌株：*Lactobacillus plantarum*<sup>注2)</sup> ATCC 8014（NBRC 3070）
- ・ビオチン測定用培地（1 L 中、pH6.8±0.1）

カザミノ酸	14 g
L-シスチン	400 mg
DL-トリプトファン	200 mg
硫酸アデニン	20 mg
塩酸グアニン	20 mg
ウラシル	20 mg
塩酸チアミン	200 µg
リボフラビン	400 µg
パラアミノ安息香酸	200 µg
パントテン酸カルシウム	400 µg
ニコチン酸	1 mg
塩酸ピリドキシン	800 µg
リン酸二水素カリウム	1 g
リン酸一水素カリウム	1 g

硫酸マグネシウム	400 mg
硫酸第一鉄	20 mg
硫酸マンガン	20 mg
酢酸ナトリウム（無水）	20 g
グルコース	40 g

・乳酸菌保存用培地（1 L 中、pH6.8±0.1）

酵母エキス	5.5 g
ペプトン	12.5 g
ブドウ糖	11.0 g
リン酸一水素カリウム	0.25 g
硫酸第一鉄	5.0 mg
リン酸二水素カリウム	0.25 g
酢酸ナトリウム（無水）	10 g
硫酸マグネシウム	0.1 g
硫酸マンガン	5.0 mg
粉末寒天	20.0 g

- ・前培養培地：上記培地より粉末寒天を除く。

なお各培地はそれぞれ調製したものが市販されている<sup>注3)</sup>。

- ・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

③ 接種菌液の調製

*Lactobacillus plantarum* の保存菌株を前培養培地に接種し、35 °Cで20時間程度培養する。この菌浮遊溶液を遠心分離し、600 nmにおける透過率が80～90%になるように滅菌生理食塩水で希釈し、接種菌液とする。

④ 試験溶液の調製<sup>注4)</sup>

試料2gを精秤し（Wg）、2 mol/L又は3 mol/L硫酸25 mLを加え、121°Cで1時間オートクレーブで加圧分解する。冷却後、5 mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH4.5に調整後、水を加えて100 mLに定容し（V<sub>1</sub> mL）、ろ過する。ろ液25 mLを分取して（V<sub>2</sub> mL）、1 mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH6.8に調整後、50 mLに定容し（V<sub>3</sub> mL）、さらに最終溶液中のビオチン濃度が検量線の範囲内に入るように水で希釈して（希釈倍数：D）、ろ過して試験溶液とする。

⑤ 測定

試験管2本ずつに試験溶液0.5、1.0及び2.0 mLを正確に加え、次に各試験管に測定用培地2.5 mL及び水を加えて全量を5 mLとする。別に検量線作成のため、ビオチン標準溶液（0～0.75 ng相当量）を試験管2本ずつに取り、それぞれに測定用培地2.5 mL及び水を加えて全量を5 mLとする。121°Cで5分間オートクレーブ処理を行い、冷却後、各試験管に接種菌溶液1滴（約30 µL）ずつを無菌的に接種し、37°Cで18時間程度恒温槽又は恒温水槽に入れて培養する。

培養後、増殖度を 600 nm の濁度を用いて測定する<sup>注5)</sup>。標準溶液の濁度より検量線を作成し、これに試験溶液より得られた濁度を照合して、試験溶液中のビオチンの濃度 (C ng/mL) を求め、試料中のビオチン含量を算出する。

⑥ 計算

$$\text{試料中のビオチン含量 } (\mu\text{g}/100 \text{ g}) = \frac{C \times V_1 \times D \times V_3}{V_2 \times W \times 10}$$

C : 検量線から求めたビオチンの濃度 (ng/mL)

V<sub>1</sub>~V<sub>3</sub> : 定容量 (mL) 又は分取量 (mL)

D : 希釈倍数

W : 試料採取量 (g)

[注]

- 1) 関東化学 特級、又は同等品を用いる。
- 2) 旧名称は、*Lactobacillus arabinosus* である。
- 3) ビオチン定量用基礎培地「ニッスイ」：日水製薬  
一般乳酸菌保存検出用培地「ニッスイ」：日水製薬  
一般乳酸菌接種用培地「ニッスイ」：日水製薬（前培養培地に同じ）
- 4) ビオチン含量の高い食品については、水で振とう抽出し、ろ過して得られたろ液を 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH6.8 に調整し、試験溶液とすることもできる。また、この場合、ビオチンを紫外外部吸収又は蛍光を有する誘導体に導いた後、勾配溶出液体クロマトグラフ法で定量する方法も適用できる（詳細は下記の文献に譲る）が、食品表示基準における分析方法は、微生物学的定量法とする。
- 5) マイクロプレートを使用し、マイクロプレートリーダー（例えば、日本モレキュラーデバイス社製、スペクトラ MAX 型等）で濁度を測定することもできる。

[参考文献]

- 1) Desbene, P.L., Coustal, S. and Frappier, F. : Anal. Biochem., 128, 359 (1983)
- 2) 金沢良昭、中野貴彦、田中英樹：日本化学会誌, 434 (1984)
- 3) Yoshida, T., Uetake, A., Nakai, C. Nimura, N. and Kinoshita, T. : J. Chromatogr., 456, 421 (1988)

## 25 ビタミン A (レチノール活性当量として)

ビタミンは生物効力に対する名称である。定量の対象としては、主にビタミン A 効力を示すレチノール、 $\alpha$ -カロテン及び $\beta$ -カロテンとし、その定量値はレチノール活性当量として表す。なお、レチノール 1  $\mu\text{g}$  は、 $\alpha$ -カロテン 24  $\mu\text{g}$ 、 $\beta$ -カロテン 12  $\mu\text{g}$  にそれぞれ相当する<sup>注1) 注2)</sup>。

試料中のビタミン A 含量 ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

$$\begin{aligned} &= \text{レチノール } (\mu\text{g}/100\text{ g}) + \frac{1}{12} \text{総カロテン } (\mu\text{g}/100\text{ g}) \\ &= \text{レチノール } (\mu\text{g}/100\text{ g}) + \frac{1}{24} \alpha\text{-カロテン } (\mu\text{g}/100\text{ g}) \\ &\quad + \frac{1}{12} \beta\text{-カロテン } (\mu\text{g}/100\text{ g}) \end{aligned}$$

[注]

- 1) クリプトキサンチンのように  $\alpha$ -カロテン、 $\beta$ -カロテン以外の成分でビタミン A 効力を有するものを多く含む食品にあっては、それらの成分も分離・測定してレチノール当量に合算する。クリプトキサンチンの高速液体クロマトグラフの条件は、イ カロテンの定量 (2) 高速液体クロマトグラフ法： $\alpha$ -カロテン、 $\beta$ -カロテンに同じである。なお、クリプトキサンチンの生物効力については、 $24\ \mu\text{g}$  がレチノール  $1\ \mu\text{g}$  に相当する。
- 2) 錠剤・カプセル等のサプリメントとして摂取する  $\beta$ -カロテンは、ビタミン A としての生体利用率が  $1/2$  程度なので、 $2\ \mu\text{g}$  がレチノール  $1\ \mu\text{g}$  に相当し、食品由来の  $\beta$ -カロテンとは扱いが異なる。

ア レチノール (ビタミン A アルコール)

(1) 高速液体クロマトグラフ法

① 装置及び器具

- ・高速液体クロマトグラフ：紫外分光光度計付き
- ・カラム：逆相型 (オクタデシルシリル基を結合させたシリカゲルを充てんしたカラム)
- ・分光光度計：紫外部の吸収が測定可能なもの。
- ・クロマト管：内径  $10\text{ mm}$ 、高さ  $250\text{ mm}$ 、ガラスコック付き

② 試薬

- ・水酸化カリウム溶液：粒状水酸化カリウム (特級)  $60\text{ g}$  を冷却しながら水を加えて溶解し、正確に  $100\text{ mL}$  とする。
- ・弱活性アルミナ：活性アルミナ<sup>注1)</sup>  $500\text{ g}$  に水  $50\text{ mL}$  を滴下して加え、振り混ぜて均一にし、密栓、一夜放置する。活性度を測定し、一定の活性度<sup>注2)</sup> のものを使用する。活性度は水の量を加減して調整する。
- ・標準レチノール：パルミチン酸レチノールを次の試験法に従ってけん化抽出し、標準溶液の検定を行う。フリーのレチノールを使用する場合でもイソプロピルアルコール (特級) に溶解した後、標準溶液の検定を行う。
- ・ピロガロール、エタノール、塩化ナトリウム、石油エーテル：特級
- ・ヘキサン、酢酸エチル：残留農薬試験用
- ・ジエチルエーテル：過酸化物を含まないもの。

- ・メタノール：高速液体クロマトグラフ用
- ・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

### ③ 試験溶液の調製

#### 1) けん化

試料約 0.5 g<sup>注3)</sup> を 60 mL 容遠心管（共栓付き）に精密に量り（W g）、3 w/v%ピロガロール-エタノール溶液 10 mL と水酸化カリウム溶液 1 mL を加え、70 °C水浴中でガラス棒で時々かき混ぜながら 30 分間加熱する。水冷後、1 w/v%塩化ナトリウム溶液 22.5 mL を加えた後、ヘキサン-酢酸エチル混液（9:1）15 mL を加える。5 分間振とうし、遠心分離後、駒込ピペットで上層を 100 mL 容なす形フラスコに移す。水層をヘキサン-酢酸エチル混液（9:1）15 mL でさらに 2 回、同様に抽出する。抽出液を合わせ 40°Cで減圧濃縮する。

残留物をエタノールに溶解し（V mL）、レチノールとして約 0.3 µg/mL となるように希釈し（希釈倍数：D）、試験溶液とする。

高速液体クロマトグラフによる測定において妨害成分の影響が出る場合は、残留物を石油エーテル（特級）5 mL に溶解し、以下に示すアルミナカラムを用いた精製を行う<sup>注4)</sup>。

#### 2) アルミナカラムクロマトグラフィー

クロマト管にあらかじめ活性度を調整したアルミナ約 7 g を石油エーテルに懸濁させ、約 7 cm の高さに充填する。受器に 100 mL 容なす形フラスコを置き、カラムの上に先の残留物の石油エーテル溶液を静かに流し入れ、流量 1 mL/分で流出する。カラム上部の液がなくなる直前に石油エーテル 5 mL を加え、さらに 3 回繰り返す（カロテン画分）。次に、受器を別の 100 mL 容褐色なす形フラスコに替える。石油エーテル-エーテル混液（9:1）を約 30 mL 流す。得られた溶出液を、40 °Cで減圧濃縮する（レチノール画分）。残留物に一定量のエタノールを加え溶解する（V mL）。1 mL 中レチノールを約 0.3 µg 含むようにエタノールで希釈し（希釈倍数：D）、試験溶液とする。

### ④ 標準溶液の調製

10~20 mg 程度を精密に量り取り、試料と同様に、③、1) の方法に従ってけん化抽出した標準レチノールをイソプロピルアルコールに溶解し、1 mL 中にレチノールとして 2~3 µg になるように希釈し、分光光度計で 325 nm の吸光度を測定する。次式により希釈した標準溶液のレチノール濃度を求める。

$$\text{レチノール } (\mu\text{g/mL}) = \frac{A}{100} \times 1830 \times 0.3$$

A：希釈した標準溶液の 325 nm における吸光度（対照：イソプロピルアルコール、1 cm セル）

標準レチノールをエタノールで 1 mL 中 0.05、0.1、0.2 及び 0.5 µg になる

ように希釈し、標準溶液とする。

⑤ 測定

試験溶液の一定量（例 20  $\mu\text{L}$ ）を高速液体クロマトグラフに注入し、レチノールのピーク面積を測定し、あらかじめ同量の標準溶液を高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線から試験溶液中の濃度（C  $\mu\text{g/mL}$ ）を求め、これを用いて試料中のレチノール含量を算出する。

<高速液体クロマトグラフ操作条件例<sup>注5)</sup>>

カラム：Cosmosil 5 C<sub>18</sub>-MS-II（ナカライテスク製）あるいは相当品、内径 4.6 mm、長さ 150 mm、ステンレス製

移動相：メタノール-水（92:8）

測定波長：325 nm<sup>注6)</sup>

流量：1.0 mL/分

温度：35  $^{\circ}\text{C}$

⑥ 計算

$$\text{試料中のレチノール含量 } (\mu\text{g}/100 \text{ g}) = \frac{C \times V \times D \times 100}{W}$$

C：検量線から求めたレチノールの濃度（ $\mu\text{g/mL}$ ）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

[注]

1) Merck Art.1097（メルク社製）

2) Yellow OB（FD&C Yellow No.4、Colour Index No.11390）20 mg を石油エーテル 100 mL に溶解し、保存溶液とする。保存溶液 10 mL を石油エーテルで 100 mL とし試験溶液とする。弱活性アルミナを石油エーテルで懸濁し、カラム 10 cm の高さに詰める。

試験溶液 1 mL をカラムに通し、石油エーテル-エーテル混液（9:1）を流し、黄色がカラムから落ち切るまでの容量（mL）をもって活性度の指標とする。通常、約 12 mL で溶出する。

3) レチノール含量が低い試料の場合、試料採取量を 1～2 g にする。その場合、3 w/v%ピロガロール含有エタノール液 10 mL と水酸化カリウム溶液 1 mL のほか、さらに粒状水酸化カリウム 2 g を加えてけん化する。

4) アルミナカラムによる精製処理は、共存する妨害物の除去に効果的である反面、分析精度を低下させる。したがって、妨害物が少ない場合には、むしろこの処理を省略した方が良いこともある。

5) レチノールには、多くの異性体が存在する。13-シス体は自然界に多く存在し、加熱処理によっても生じる。13-シス体は、all-トランス体に

比べて生物効力は75%といわれている。13-シス体を分別定量する場合は、順相系カラムを用いた高速液体クロマトグラフ条件が適当である。しかし、標準の13-シス-レチノールは得るのが難しく、不安定なので注意を要する。

- 6) レチノールの測定に蛍光検出器を用いた例も報告されている。ここで、紫外吸収検出器を用いているのは、all-トランス体と13-シス体は吸光係数が近似しており、13-シス体を含めたレチノール含量を求めるには都合がよいためである。

## イ カロテン

### (1) 吸光光度法：総カロテン<sup>注1)</sup>

#### ① 装置及び器具

- ・分光光度計：可視部の吸収が測定可能なもの。
- ・クロマト管：内径10 mm、高さ250 mm、ガラスコック付き

#### ② 試薬

- ・水酸化カリウム溶液：粒状水酸化カリウム（特級）60 gを冷却しながら水を加えて溶解し、正確に100 mLとする。
- ・弱活性アルミナ：活性アルミナ<sup>注2)</sup> 500 gに水50 mLを滴下して加え、振り混ぜて均一にし、密栓、一夜放置する。活性度を測定し、一定の活性度<sup>注3)</sup>のものを使用する。活性度は水の量を加減して調整する。
- ・ピロガロール、エタノール、塩化ナトリウム、石油エーテル：特級
- ・ヘキサン、酢酸エチル：残留農薬試験用
- ・ジエチルエーテル：過酸化物を含まないもの。
- ・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

#### ③ 試験溶液の調製

##### 1) けん化

試料約0.5 gを60 mL容遠心管（共栓付き）に精密に量り（W g）、3 w/v%ピロガロール-エタノール溶液10 mLと水酸化カリウム溶液1 mLを加え、70 °C水浴中でガラス棒で時々かき混ぜながら30分間加熱する。水冷却後、1 w/v%塩化ナトリウム溶液22.5 mLを加えた後、ヘキサン-酢酸エチル混液（9:1）15 mLを加える。5分間振とうし、遠心分離後、駒込ピペットで上層を100 mL容なす形フラスコに移す。水層をヘキサン-酢酸エチル混液（9:1）15 mLでさらに2回、同様に抽出する。抽出液を合わせ40°Cで減圧濃縮する。

残留物を石油エーテル（特級）5 mLに溶解し、以下に示すアルミナカラムに供する。

##### 2) アルミナカラムクロマトグラフィー

クロマト管にあらかじめ活性度を調整したアルミナ約7 gを石油エーテルに懸濁させ、約7 cmの高さに充填する。受器に100 mL容なす形フラス

コを置き、カラムの上に先の残留物の石油エーテル溶液を静かに流し入れ、流量 1 mL/分で流出する。カラム上部の液がなくなる直前に石油エーテル 5 mL を加え、さらに 3 回繰り返す（カロテン画分）。

カロテン画分<sup>注4)</sup>を 40 °C で減圧濃縮する。残留物を一定量のヘキサンに溶解し (V mL)、1 mL 中にカロテンを約 1 µg 含むようにヘキサンで希釈する (希釈倍数 : D)。

④ 測定

分光光度計によりヘキサンを対照にして、試験溶液の 453 nm の吸光度を測定する。

⑤ 計算

β-カロテンの吸光係数 $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2592$  (溶媒、ヘキサン) を用いて次式により試料中の含量を求める。

$$\text{試料中の総カロテン含量 } (\mu\text{g}/100 \text{ g}) = A \times \frac{1000000}{2592} \times \frac{V \times D}{W}$$

A : 試験溶液の吸光度

V : 定容量 (mL)

D : 希釈倍率

W : 試料摂取量 (g)

[注]

1) トマト加工品等リコピンを多く含む食品は、アルミナカラムクロマトグラフィーでリコピンとカロテンを分離することは困難である。高速液体クロマトグラフ法により、α-カロテンと β-カロテンを分離・測定し、その合計を総カロテンとした方がよい。

2) Merck Art.1097 (メルク社製)

3) Yellow OB (FD&C Yellow No.4、Colour Index No.11390) 20 mg を石油エーテル 100 mL に溶解し、保存溶液とする。保存溶液 10 mL を石油エーテルで 100 mL とし試験溶液とする。弱活性アルミナを石油エーテルで懸濁し、カラム 10 cm の高さに詰める。

試験溶液 1 mL をカラムに通し、石油エーテル - エーテル混液 (9 : 1) を流し、黄色がカラムから落ち切るまでの容量 (mL) をもって活性度の指標とする。通常、約 12 mL で溶出する。

4) 弱活性アルミナカラム処理では、カロテンの異性体 (α、β、γ) は分離しないため、測定値は総カロテンとなる。

(2) 高速液体クロマトグラフ法 : α-カロテン、β-カロテン<sup>注1) 注2)</sup>

① 装置及び器具

- ・高速液体クロマトグラフ : 紫外可視分光光度計付き
- ・カラム : 逆相型 (オクタデシルシリル基を結合させたシリカゲルを充てんしたカラム)



- ・分光光度計：紫外部の吸収が測定可能なもの。
- ・クロマト管：内径 10 mm、高さ 250 mm、ガラスコック付き

## ② 試薬

- ・水酸化カリウム溶液：粒状水酸化カリウム（特級）60 g を冷却しながら水を加えて溶解し、正確に 100 mL とする。
- ・ $\alpha$ -カロテン標準溶液： $\alpha$ -カロテン標準品<sup>注3)</sup>
- ・ $\beta$ -カロテン標準溶液： $\beta$ -カロテン標準品<sup>注3)</sup>
- ・ピロガロール、エタノール、塩化ナトリウム、石油エーテル、シクロヘキサン、イソプロピルアルコール：特級
- ・ヘキサン、酢酸エチル：残留農薬試験用
- ・メタノール、クロロホルム：高速液体クロマトグラフ用
- ・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

## ③ 試験溶液の調製

- 1) 試料約 0.5 g を 60 mL 容遠心管（共栓付き）に精密に量り（W g）、3 w/v%ピロガロール-エタノール溶液 10 mL と水酸化カリウム溶液 1 mL を加え、70 °C 水浴中でガラス棒で時々かき混ぜながら 30 分間加熱する。水冷後、1 w/v%塩化ナトリウム溶液 22.5 mL を加えた後、ヘキサン-酢酸エチル混液（9:1）15 mL を加える。5 分間振とうし、遠心分離後、駒込ピペットで上層を 100 mL 容なす形フラスコに移す。水層をヘキサン-酢酸エチル混液（9:1）15 mL でさらに 2 回、同様に抽出する。抽出液を合わせ 40°C で減圧濃縮する。

残留物をエタノールに溶解し（V mL）、 $\beta$ -カロテンとして約 2～4  $\mu\text{g/mL}$  となるように希釈し（希釈倍数：D）、試験溶液とする。

- 2) 野菜又はジュースの場合は次の操作で試験溶液を得る。試料約 2 g を 60 mL 容の遠心管（共栓付き）に精密に量り（W g）、3 w/v%ピロガロール含有エタノール溶液 20 mL と無水硫酸ナトリウム 10 g を加え、5 分間振とうする。遠心分離後、上澄み液を 100 mL 容全量フラスコにとる。残留物に 3 w/v %ピロガロール含有エタノール溶液 20 mL を加え、同様に抽出を行う。同様の操作をさらに 1 回繰り返した後、3 w/v %ピロガロール含有エタノール液で定容する（V<sub>1</sub> mL）。溶液の一部（10 mL、V<sub>2</sub> mL）を 60 mL 容の遠心管（共栓付き）に正確に量り、60 %水酸化カリウム溶液 1 mL を加え、70 °C の水浴中で 30 分間加熱する。水冷後、1 w/v%塩化ナトリウム溶液 23 mL とイソプロピルアルコール 6 mL 及びヘキサン-酢酸エチル混液（9:1）15 mL を加える。5 分間振とうし、遠心分離後、駒込ピペットで上澄み液を 100 mL 容のなす形フラスコに移す。水層をヘキサン-酢酸エチル混液（9:1）15 mL でさらに 2 回、同様に抽出する。抽出液を合わせ 40 °C で減圧濃縮する。残留物をエタノールに溶解し（V<sub>3</sub> mL）、必要に応じてエタノールで適宜希釈して（希釈倍数：D）試験溶液とする。ただし、ニンジンジュースのように  $\beta$ -カロテ

ン含量の高い場合はけん化操作を省略する。

④ 標準溶液の調製

α-カロテン標準品 5 mg を精密に量り、石油エーテルで 100 mL に定容し、標準溶液 A とする。標準溶液 A 2 mL を正確に量り、石油エーテルで 100 mL に定容し、444 nm の吸光度を測定する。α-カロテンの吸光係数を  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2,800$  として標準溶液 A 中の α-カロテン濃度を求める。標準溶液 A をエタノールで希釈し、α-カロテンを 1 mL 中に 0.5、1.0、2.0 及び 4.0 µg 含む溶液を調製し、α-カロテン標準溶液とする。

β-カロテン標準品 20 mg を精密に量り、シクロヘキサンの 100 mL に定容し、標準溶液 B とする。標準溶液 B 2 mL を正確に量り、シクロヘキサンで 200 mL に定容し、455 nm の吸光度を測定する。β-カロテンの吸光係数を  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2,500$  として標準溶液 B 中の β-カロテン濃度を求める。標準溶液 B をエタノールで希釈し、β-カロテンを 1 mL 中に 0.5、1.0、2.0 及び 4.0 µg 含む溶液を調製し、β-カロテン標準溶液とする。

⑤ 測定

試験溶液 20 µL を高速液体クロマトグラフに注入し、α-カロテン及び β-カロテンのピーク面積をそれぞれ測定し、あらかじめ標準溶液 20 µL を高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線から、試験溶液中の α-カロテン及び β-カロテン濃度 (C µg/mL) を求める。

<高速液体クロマトグラフ操作条件例<sup>注4)</sup>>

カラム：TSKgel ODS 120A (東ソー製) あるいは相当品、内径 4.6 mm、長さ 150 mm、ステンレス製<sup>注5)</sup>

移動相：メタノール-クロロホルム (96:4)

流量：1.5 mL/分

測定波長：455 nm

温度：40 °C

⑥ 計算

試料中の α-カロテン (又は β-カロテン) 含量 (µg/100g)

$$= \frac{C \times V \times D}{W} \times 100$$

C：検量線から求めた α-カロテン (又は β-カロテン) の濃度 (µg/mL)

V：定容量 (mL)

D：希釈倍数

W：試料採取量 (g)

(野菜又はジュースの場合の計算式)

試料中の α-カロテン (又は β-カロテン) 含量 (µg/100g)

$$= \frac{C \times V_1 \times D \times V_3}{W \times V_2} \times 100$$

C：検量線から求めた試験溶液の α-カロテン (又は β-カロテン) 濃度 (µg/mL)

V<sub>1</sub>~V<sub>3</sub> : 定容量又は分取量 (mL)

D : 希釈倍数

W : 試料採取量 (g)

[注]

- 1) トマト加工品等リコピンを多く含む食品は、アルミナカラムクロマトグラフィーでリコピンとカロテンを分離することは困難である。高速液体クロマトグラフ法により、 $\alpha$ -カロテンと  $\beta$ -カロテンを分離・測定し、その合計を総カロテンとした方がよい。
- 2) クリプトキサンチンは、フナコシ 82-0003-17 (EXTRASYTESE 社製) 又は相当品を用いる。濃度はクリプトキサンチンを石油エーテルに溶解し、452 nm の吸光度を測定し、 $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2,386$  を用いて検定する。検量線作成用の標準溶液は、検定に用いた標準溶液を分取し、溶媒留去後、エタノールの一定量に溶解し、クリプトキサンチンを 1 mL 中に 0.5、1.0 及び 2.0  $\mu\text{g}$  含むように調製する。
- 3)  $\alpha$ -カロテン標準品は、和光純薬工業社 035-17981 又は相当品を、 $\beta$ -カロテン標準品には、Merck Art 2236 (メルク社製) 又は相当品を用いる。
- 4)  $\alpha$ -カロテンと  $\beta$ -カロテンの分離とともに、 $\beta$ -カロテンのシス体も分離する。シス体の  $\beta$ -カロテンはニンジンや藻類の抽出物中に多量に存在しているため、ここでは 9-シス体と 13-シス体のピーク面積値を all-トランス体の面積値に合わせて  $\beta$ -カロテン値とする。また、クロマトグラムの再現性が悪いときは移動相にパルミチン酸アスコルビルを 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度で加えると改善される。
- 5) リコピンを多く含むものはアセトニトリル-メタノール-テトラヒドロフラン (55:40:5) ( $\alpha$ -トコフェロールを 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  含む。) を使用した方がよい。

[参考文献]

- 1) 大森正忠、武藤泰敏：“ビタミンハンドブック、③ビタミン分析法” 日本ビタミン学会編, 1, 化学同人 (1989)
- 2) 勝井五一郎：“ビタミン学実験法[ I ]”, 日本ビタミン学会編, 14, 東京化学同人 (1983)
- 3) Quakenbush, F.W. : J. Liq. Chrom., 10, 643 (1987)
- 4) 月田潔：ビタミン, 58, 185 (1984)
- 5) 氏家隆、飯田栄子、小高要、新藤寛美、上野順士：ビタミン, 64, 187 (1990)

## 26 ビタミン B<sub>1</sub>

ビタミン B<sub>1</sub> は遊離型及びリン酸エステルとして存在するチアミンを定量し、チアミン塩酸塩の量として表す<sup>注1)</sup>。

[注]

1) 食品添加物として許可されているビタミン B<sub>1</sub>類のうち、ジベンゾイルチアミン、ビスベンチアミン、チアミンセチル硫酸塩、チアミンチオシアン酸塩、チアミンナフタレン-1,5-ジスルホン酸塩及びチアミンラウリル硫酸塩については、以下に示す試験法では検出できない。これらの成分を定量する場合は、それぞれ異なる試験溶液の調製法が必要となる。ジベンゾイルチアミンを含む総ビタミン B<sub>1</sub>の定量法として、参考文献 1) の方法が報告されている。

また、ヒドロキシエチルチアミン (HET) のように生体内のピルビン酸代謝の中間体で生体チアミンの一形態として存在するものもある。HET は総チアミンの概念に含まれ、フェリシアン化カリウムによるチオクローム蛍光法では、チアミンとの合計量で求めることができる。

[参考文献]

1) 吉田幹彦、菱山隆、五十嵐友二：日本食品科学工学会誌, 55, 421 (2008)

(1) 高速液体クロマトグラフ法<sup>注1)</sup>

① 装置及び器具

- ・高速液体クロマトグラフ (HPLC) : 蛍光検出器付き
- ・反応ポンプ
- ・カラム : 逆相型 (オクタデシルシリル基を結合させたシリカゲルを充てんしたカラム)
- ・ガラス器具は褐色のものを使用する。

② 試薬

- ・標準ビタミン B<sub>1</sub> : 日本薬局方標準品「チアミン塩化物塩酸塩標準品」
- ・酢酸緩衝液 (pH4.5) : 4 mol/L 酢酸ナトリウム溶液 40 mL、50 %酢酸溶液 20 mL を水 2 L に溶解し、必要に応じ、ろ過又は遠心分離して、その上澄み液を使用する。
- ・酵素溶液 : 酵素<sup>注2)</sup> 0.5 g を酢酸緩衝液 (pH4.5) 10 mL に用時溶解し、ろ過又は遠心分離して、その上澄み液を使用する。
- ・パームチット : 活性ビタチェンジ (吸着剤) ビタミン B<sub>1</sub> 定量用
- ・0.01 mol/L リン酸二水素ナトリウム-0.15 mol/L 過塩素酸ナトリウム混液 (pH2.2) : リン酸二水素ナトリウム (無水、特級) 2.4 g、過塩素酸ナトリウム (無水、特級) 36.7 g を水を加えて溶かし 2 L とする。pH メーターを用い、過塩素酸で pH2.2 に調整する。
- ・25 w/v%塩化カリウム-0.1 mol/L 塩酸溶液 (脱着液) : 濃塩酸 8.5 mL を 25 w/v %塩化カリウム溶液 1 L に加える。
- ・0.01 %フェリシアン化カリウム-15 %水酸化ナトリウム溶液 : フェリシアン化カリウム (特級) 10 mg を 100 mL 容褐色全量フラスコに量りとり、15 %水酸化ナトリウム溶液を加えて 100 mL とする。用時ごとに調製する。

- ・メタノール：HPLC 用
- ・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

### ③ 試験溶液の調製

試料（1～10 g）を 100 mL 容抽出瓶<sup>注3)</sup>に精密に量り取る（W g）。これに 0.1 mol/L 塩酸 50 mL を加え、30 分間沸騰水浴中で加熱し、時々かくはんしながら抽出する。50 °C 以下に冷却し、4 mol/L 酢酸ナトリウム溶液で pH4.0～4.5 とする。酵素溶液 5 mL を加え、37 °C で一夜保温後、酢酸緩衝液（pH4.5）で全量を 100 mL とし（V<sub>1</sub> mL）、試験溶液とする。

水を用いて活性ビタチェンジ（1.5 g）を詰めたカラムに、試験溶液の適当量（V<sub>2</sub> mL、ビタミン B<sub>1</sub> 5 µg 以内を含有）を正確に注ぎ、流量 1 mL/分で吸着させる。吸着管内壁を水 5 mL で洗い、次に沸騰水 30～60 mL でカラムを洗った後、沸騰した脱着液を 1 秒 1 滴（3 mL/分）で流し、溶出液約 25 mL を分取する。室温に戻し、脱着液で 25 mL 定容（V<sub>3</sub> mL）とし、適宜脱着液で希釈して（希釈倍数：D）、HPLC 用試験溶液とする。

### ④ 標準溶液の調製

#### 1) 標準原液

標準ビタミン B<sub>1</sub> を 105 °C で 2 時間乾燥し、30 分間デシケーター内で放冷後、1 L 容の褐色全量フラスコに 100 mg を精密に量り、1 mol/L 塩酸 50 mL を加えて溶解した後、水で定容する（100 µg/mL、冷暗所で 6 か月は安定、6 か月置きに調製する。）。

#### 2) 標準溶液

標準原液 5 mL を 500 mL 容の褐色全量フラスコに正確に量り、0.1 mol/L 塩酸で定容する（1 µg/mL、1 か月おきに調製し直す。）。

#### 3) HPLC 用標準溶液

標準溶液を加熱済み 25% 塩化カリウム-0.1 mol/L 塩酸溶液で希釈し、0.1、0.05 及び 0.02 µg/mL とする。

### ⑤ 測定

HPLC 用試験溶液 20 µL を高速液体クロマトグラフに注入し<sup>注4)</sup>、ビタミン B<sub>1</sub> のピーク高さを測定し、あらかじめ HPLC 用標準溶液 20 µL を高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線から、HPLC 用試験溶液中の濃度（C µg/mL）を求め、これを用いて試料中のビタミン B<sub>1</sub> 含量を求める。

<高速液体クロマトグラフ操作条件例>

カラム：L-Column ODS（財団法人化学物質評価研究機構）又は相当品、内径 4.6 mm、長さ 150 mm、ステンレス製

移動相：[0.01 mol/L リン酸二水素ナトリウム-0.15 mol/L 過塩素酸ナトリウム混液（pH2.2）]-メタノール（9：1）

検出器：蛍光分光光度計<sup>注5)</sup>

測定波長：励起波長 375 nm、蛍光波長 440 nm

流量：0.8 mL/分

反応液：0.01 %フェリシアン化カリウム-15 %水酸化ナトリウム溶液 0.4 mL/分<sup>注6)</sup>

反応管：内径 0.8 mm、長さ 100 cm

⑥ 計算

$$\text{試料中のビタミンB}_1\text{含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V_1 \times D}{W \times 10} \times \frac{V_3}{V_2}$$

C：検量線から求めたビタミン B<sub>1</sub> の濃度 (μg/mL)

V<sub>1</sub>～V<sub>3</sub>：定容量又は分取量 (mL)

D：希釈倍数

W：試料採取量 (g)

[注]

- 1) 高速液体クロマトグラフに注入し、ビタミン B<sub>1</sub> リン酸エステルのそれぞれに対応するチオクロームを生成させるポストカラム定量法がある。しかし、食品中のビタミン B<sub>1</sub> リン酸エステルは全て遊離のビタミン B<sub>1</sub> になってから吸収されるため、酵素分解で全て遊離のビタミン B<sub>1</sub> とした後、ポストカラム法を用いて定量する。別の方法として、ブロムシアンないしフェリシアン化カリウムでチオクロームとし、溶媒抽出して高速液体クロマトグラフに注入し、この蛍光を測定するプレカラム法もある。反応ポンプを必要としない長所を持つが、試料により反応率に影響を受ける欠点がある。
- 2) 例えばビタミン B<sub>1</sub>・B<sub>2</sub> 定量用酸性ホスファターゼ (和光純薬工業) 又は同等品 (フォスファターゼ活性を有するもの)
- 3) 褐色ガラス製で、容量 100 mL に刻線の付いた共栓付き抽出瓶。ビーカーと全量フラスコを代わりに用いてもよい。
- 4) ためし打ち等をして、標準溶液 0.1 μg/mL と同じくらいになるように希釈を考える。パームチットカラム負荷のときの吸着絶対量は約 10 μg なので、4 倍以上の希釈を必要とする場合はもう一度パームチットカラムからやり直して値を比較する。
- 5) 感度を向上させるためには検出器のセル容量の大きいものがよい (例えば 12 μL)。
- 6) 水酸化ナトリウムの濃度は、1～20 % の範囲では高いほどよいが、反応管内の詰まりを防ぐため 15 % にしている。フェリシアン化カリウム濃度は 0.001～0.01 % で高い感度を示す。試薬の安定性から 0.01 % にしている。反応温度は、30～50 °C で差がない。反応管をカラムオープン内に入れ、カラムと同じ温度で行うと便利である。

分析終了後は必ず反応ポンプ、HPLC 側ポンプとも 30 分間以上水洗する。終了後、カラムをメタノール等で置換しておく。

(2) チオクローム法

① 装置及び器具

- ・蛍光光度計：励起波長 360 nm、蛍光波長 435 nm で測定可能なもの。
- ・ガラス器具は褐色のものを使用する。

② 試薬

- ・標準ビタミン B<sub>1</sub>：日本薬局方標準品「塩酸チアミン標準品」
- ・酢酸緩衝液 (pH4.5)：4 mol/L 酢酸ナトリウム溶液 40 mL、50 %酢酸溶液 20 mL を水 2 L に溶解し、ろ過又は遠心分離して、その上澄み液を使用する。
- ・酵素溶液：酵素<sup>注1)</sup> 0.5 g を酢酸緩衝液 (pH4.5) 10 mL に用時溶解し、ろ過又は遠心分離して、その上澄み液を使用する。
- ・パームチット：活性ビタチェンジ (吸着剤) ビタミン B<sub>1</sub> 定量用
- ・25 w/v%塩化カリウム-0.1 mol/L 塩酸溶液 (脱着液)：濃塩酸 8.5 mL を 25 w/v %塩化カリウム溶液 1 L に加える。
- ・1 w/v%フェリシアン化カリウム液：フェリシアン化カリウム (特級) 100 mg を 10 mL 容褐色全量フラスコに量り取り、水を加えて 10 mL とする。用時ごとに調製する。
- ・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

③ 試験溶液の調製

試料 (1 ~ 10 g) を 100 mL 容抽出瓶<sup>注2)</sup> に精密に量り取る (W g)。これに 0.1 mol/L 塩酸 50 mL を加え、30 分間沸騰水浴中で加熱し、時々かくはんしながら抽出する。50 °C 以下に冷却し、4 mol/L 酢酸ナトリウム溶液で pH4.0 ~ 4.5 とする。酵素溶液 5 mL を加え、37 °C で一夜保温後、酢酸緩衝液 (pH4.5) で全量を 100 mL とし (V<sub>1</sub> mL)、試験溶液とする。

水を用いて活性ビタチェンジ (1.5 g) を詰めたカラムに、試験溶液の適当量 (V<sub>2</sub> mL、ビタミン B<sub>1</sub> 5 µg 以内を含有) を正確に注ぎ、流量 1 mL/分で吸着させる。吸着管内壁を水 5 mL で洗い、次に沸騰水 30 ~ 60 mL でカラムを洗った後、沸騰した脱着液を 1 秒 1 滴 (3 mL/分) で流し、溶出液約 25 mL を分取する。室温に戻し、脱着液で 25 mL 定容 (V<sub>3</sub> mL) とし、適宜脱着液で希釈して (希釈倍数：D)<sup>注3)</sup>、測定用試験溶液とする。

④ 標準溶液の調製

標準ビタミン B<sub>1</sub> を 105 °C で 2 時間乾燥し、30 分間デシケーター内で放冷後、0.1 mol/L 塩酸で 1 µg/mL となるように調製する。

⑤ 測定

試験溶液 5 mL を 3 本の試験管に取る (a、b、c)。a には標準溶液 (1 µg/mL) 1 mL を加え、b 及び c には水 1 mL を加える。a 及び b に 1 w/v%フェリシアン化カリウム液 0.3 mL を加え、c には水 0.3 mL を加える。次に、各試験管に 30 %水酸化ナトリウム溶液 3 mL を加え、よく振り混ぜる。次に、ベンゼン-ブタノール (75 : 25) 15 mL を加え、1 分間よく振り混ぜた後、分離した有機溶媒層を取る。これに無水硫酸ナトリウム約 2 g を加え、脱水後、有機

溶媒層の蛍光を測定する。励起波長 360 nm、蛍光波長 435 nm で a の蛍光光度計の目盛りを 100% とし、b 及び c を測定し、試料中のビタミン B<sub>1</sub> 含量を求める。

⑥ 計算

$$\text{測定用試験溶液のビタミンB}_1\text{の濃度 } (\mu\text{g/mL}) = \frac{b - c}{a - b} \times \frac{1}{5}$$

a、b 及び c : a、b 及び c の蛍光光度計の目盛り

$$\text{試料中のビタミンB}_1\text{含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V_1 \times D}{W \times 10} \times \frac{V_3}{V_2}$$

C : 測定用試験溶液のビタミン B<sub>1</sub> の濃度 (μg/mL)

V<sub>1</sub>~V<sub>3</sub> : 定容量又は分取量 (mL)

D : 希釈倍数

W : 試料採取量 (g)

[注]

- 1) 例えばビタミン B<sub>1</sub>・B<sub>2</sub> 定量用酸性ホスファターゼ (和光純薬工業) 又は同等品 (フォスファターゼ活性を有するもの)
- 2) 褐色ガラス製で、容量 100 mL に刻線の付いた共栓付き抽出瓶。ビーカーと全量フラスコを代わりに用いてもよい。
- 3) 約 0.2 μg/mL となるように希釈を考える。パームチットカラム負荷のときの吸着絶対量は約 10 μg なので、2 倍以上の希釈を必要とする場合はもう一度パームチットカラムからやり直して値を比較する。

## 27 ビタミン B<sub>2</sub>

ビタミン B<sub>2</sub> は遊離型及びリン酸エステルとして存在するリボフラビンを定量し、遊離のリボフラビンの量として表す<sup>注1)</sup>。

[注]

- 1) 食品添加物として用いられるビタミン B<sub>2</sub> 酞酸エステルは、酸分解することで総ビタミン B<sub>2</sub> として求めることができる。

(1) 高速液体クロマトグラフ法<sup>注1)</sup>

① 装置及び器具

- ・高速液体クロマトグラフ (HPLC) : 蛍光検出器付き
- ・カラム : 逆相型 (オクタデシルシリル基を結合させたシリカゲルを充てんしたカラム)
- ・ガラス器具は褐色のものを使用する。

② 試薬

- ・標準ビタミン B<sub>2</sub> : 日本薬局方標準品「リボフラビン標準品」を使用する。
- ・酢酸緩衝液 (pH4.5) : 4 mol/L 酢酸ナトリウム溶液 40 mL、50 %酢酸溶液 20 mL を水 2 L に溶解し、ろ過又は遠心分離して、その上澄み液を使用す



る。

- ・酵素溶液：酵素<sup>注2)</sup> 0.5 g を酢酸緩衝液 (pH4.5) 10 mL に用時溶解し、ろ過又は遠心分離して、その上澄み液を使用する。
- ・メタノール：HPLC 用
- ・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

③ 試験溶液の調製<sup>注3)</sup>

試料 (1 ~ 10 g) を 100 mL 容抽出瓶<sup>注4)</sup> に精密に量り取る (W g)。これに 0.1 mol/L 塩酸 50 mL を加え、30 分間沸騰水浴中で加熱し、時々かくはんしながら抽出する。50 °C 以下に冷却し、4 mol/L 酢酸ナトリウム溶液で pH4.0 ~ 4.5 とする。酵素溶液 5 mL を加え、37 °C で一夜保温後、酢酸緩衝液 (pH4.5) で全量を 100 mL とし (V mL)、適宜酢酸緩衝液 (pH4.5) で希釈して (希釈倍数 : D)、試験溶液とする。

④ 標準溶液の調製

1) 標準原液

標準ビタミン B<sub>2</sub> を 105 °C で 2 時間乾燥し、30 分間デシケーター内で放冷後、1 L 容の褐色全量フラスコに 50 mg を精密に量り取る。酢酸 4 mL と温水約 700 mL を加え超音波にかけながら溶かす。冷却後、水で定容する (50 µg/mL、冷暗所で 6 か月は安定、6 か月ごとに調製する)。

2) 標準溶液

標準原液 4 mL を 200 mL 容の褐色全量フラスコに正確に量り、酢酸緩衝液 (pH4.5) で定容する (1.0 µg/mL、用時ごとに調製する)。

3) HPLC 用標準溶液

標準溶液を酢酸緩衝液 (pH4.5) で希釈し、0.1、0.05 及び 0.02 µg/mL とする。

⑤ 測定

試験溶液 20 µL を高速液体クロマトグラフに注入し、ビタミン B<sub>2</sub> のピーク高さを測定し、あらかじめ HPLC 用標準溶液 20 µL を高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線から、試験溶液中の濃度 (C µg/mL) を求め、試料中のビタミン B<sub>2</sub> 含量を求める。

< 高速液体クロマトグラフ操作条件例<sup>注5)</sup> >

カラム：Cosmosil 5 C<sub>18</sub>-MS-II (ナカライテスク製) 又は相当品、内径 4.6 mm、長さ 150 mm、ステンレス製

移動相：酢酸緩衝液 (pH4.5) -メタノール (65:35)

検出器：蛍光分光光度計

測定波長：励起波長 445 nm、蛍光波長 530 nm

流量：1.0 mL/分

温度：35 °C

⑥ 計算

$$\text{試料中のビタミンB}_2\text{含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたビタミン B<sub>2</sub> の濃度 (μg/mL)

V：定容量 (mL)

D：希釈倍数

W：試料採取量 (g)

[注]

- 1) 酵素分解なしで高速液体クロマトグラフに注入し、ビタミン B<sub>2</sub> リン酸エステルを分別定量する方法もあるが、食品中のビタミン B<sub>2</sub> リン酸エステルは、大部分が遊離のビタミン B<sub>2</sub> になってから吸収されるため、ここでは酵素分解で全て遊離ビタミン B<sub>2</sub> とした後定量する。
- 2) 例えばビタミン B<sub>1</sub>・B<sub>2</sub> 定量用酸性ホスファターゼ (和光純薬工業) 又は同等品 (フォスファターゼ活性を有するもの)
- 3) 酵素分解に使用する酵素の中にビタミン B<sub>2</sub> が含まれている場合は、ロットごとに含量を求めて補正する必要がある。
- 4) 褐色ガラス製で、容量 100 mL に刻線の付いた共栓付き抽出瓶。ビーカーと全量フラスコを代わりに用いてもよい。
- 5) 感度を向上させるためには検出器のセル容量の大きいものがよい (例えば 12 μL)。

## (2) ルミフラビン法

### ① 装置及び器具

- ・蛍光光度計：励起波長 440 nm、蛍光波長 525 nm で測定可能なもの。
- ・ガラス器具は褐色のものを使用する。

### ② 試薬

- ・標準ビタミン B<sub>2</sub>：日本薬局方標準品「リボフラビン標準品」を使用する。
- ・酢酸緩衝液 (pH4.5)：4 mol/L 酢酸ナトリウム溶液 40 mL、50%酢酸溶液 20 mL を水 2 L に溶解し、ろ過又は遠心分離して、その上澄み液を使用する。
- ・酵素溶液：酵素<sup>注1)</sup> 0.5 g を酢酸緩衝液 (pH4.5) 10 mL に用時溶解し、ろ過又は遠心分離して、その上澄み液を使用する。
- ・1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム (特級) 41.7 g を水で溶かし 1 L とする。
- ・4 w/v% 過マンガン酸カリウム溶液：褐色瓶に保存する。
- ・3 v/v% 過酸化水素水：過酸化水素水を水で希釈する。
- ・クロロホルム：特級、蛍光のないもの。
- ・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

### ③ 試験溶液の調製

試料 (1 ~ 10 g) を 100 mL 容抽出瓶<sup>注2)</sup> に精密に量り取る (W g)。これに

0.1 mol/L 塩酸 50 mL を加え、30 分間沸騰水浴中で加熱し、時々かくはんしながら抽出する。50 °C 以下に冷却し、4 mol/L 酢酸ナトリウム溶液で pH4.0 ~4.5 とする。酵素溶液 5 mL を加え、37 °C で一夜保温後、酢酸緩衝液 (pH4.5) で全量を 100 mL とし (V mL)、適宜酢酸緩衝液 (pH4.5) で希釈して (希釈倍数 : D)、リボフラビン 0.1~0.3 µg/mL を含む試験溶液とする。

④ 標準溶液の調製

標準ビタミン B<sub>2</sub> を 105 °C で 2 時間乾燥し、30 分間デシケーター内で放冷後、15 mg を精密に量り取り、酢酸 3 mL に溶かし、水で 1,000 mL に定容する。この溶液を 0.3 % 酢酸で希釈し、1 µg/mL を調製する。

⑤ 測定

試験溶液 5 mL を 3 本の試験管に取る (a、b、c) (c は褐色試験管)。a には標準溶液 (1 µg/mL) 1 mL を、b 及び c には水 1 mL を正確に加える。それぞれに 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL を加え、a 及び b は蛍光灯 (20 W × 2 本、試験管までの距離 10 cm) で 1 時間照射し、c は暗所に静置する。1 時間後 a、b 及び c に酢酸 0.5 mL を加える。次に a、b 及び c に 4 w/v% 過マンガン酸カリウム溶液 0.5 mL を加え、混合後 1 分間放置する。次に 3 v/v% 過酸化水素水 0.5 mL を加える。クロロホルムを正確に 10 mL 加え、5 分間振とうする。上層を除き、クロロホルム層に無水硫酸ナトリウム約 2 g を加えて脱水する。a の蛍光光度計の目盛を 100% とし、b 及び c を測定し、試料中のビタミン B<sub>2</sub> 含量を求める。

⑥ 計算

$$\text{試験溶液のビタミンB}_2\text{の濃度 } (\mu\text{g/mL}) = \frac{b - c}{a - b} \times \frac{1}{5}$$

a、b 及び c : a、b 及び c の蛍光光度計の目盛り

$$\text{試料中のビタミンB}_2\text{含量} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C : 試験溶液のビタミン B<sub>2</sub> の濃度 (µg/mL)

V : 定容量 (mL)

D : 希釈倍数

W : 試料採取量 (g)

[注]

- 1) 例えばビタミン B<sub>1</sub>・B<sub>2</sub> 定量用酸性ホスファターゼ (和光純薬工業) 又は同等品 (フォスファターゼ活性を有するもの)
- 2) 褐色ガラス製で、容量 100 mL に刻線の付いた共栓付き抽出瓶。ビーカーと全量フラスコを代わりに用いてもよい。

## 28 ビタミン B<sub>6</sub>

### (1) 微生物学的定量法

#### ① 装置及び器具

- ・分光光度計

## ② 試薬

- ・ピリドキシン標準溶液：塩酸ピリドキシン（日本薬局方標準品）100 mg を 25 v/v%エタノール溶液に溶かし、正確に 100 mL とする。さらに、水で希釈して 5 ng/mL となるようにする。
- ・使用菌株：*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080（NBRC 0565）
- ・ビタミン B<sub>6</sub>測定用培地（1 L 中、pH5.0±0.1）

カザミノ酸	8 g
イノシトール	50 mg
塩酸チアミン	500 μg
ニコチン酸	5 mg
パントテン酸カルシウム	5 mg
ビオチン	16 μg
塩化カリウム	850 mg
グルコース	100 g
塩化カルシウム	250 mg
硫酸マグネシウム	250 mg
硫酸マンガン	5 mg
リン酸二水素カリウム	1.1 g
塩化第二鉄	5 mg
クエン酸カリウム	10 g
クエン酸	2 g

定量用培地は調製したものが市販されている<sup>注1)</sup>。

- ・菌保存用培地（1 L 中、pH5.0±0.1）

ペプトン	5 g
酵母エキス	3 g
グルコース	10 g
粉末寒天	3 g
麦芽エキス	3 g

- ・前培養培地：菌保存用培地に同じ。
- ・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

## ③ 接種菌液の調製

*Saccharomyces cerevisiae* の保存菌株を前培養培地に接種し、30 °Cで 20 時間程度培養する。培養後菌体を 1 白金耳とり、600 nm における透過率 80～90 %となるように滅菌生理食塩水で希釈し、接種菌液とする。

## ④ 試験溶液の調製

試料 2 g を精密に量り（W g）、0.055 mol/L 塩酸 180 mL を加え、121 °C、4 時間又は 0.5 mol/L 硫酸 180 mL を加え、121°C、1 時間オートクレーブ処理を行う<sup>注2)</sup>。冷却後、10 mol/L 水酸化ナトリウムで pH5.0 に調整する。これ

を 250 mL 容の全量フラスコに移し、水で正確に 250 mL とし (V mL)、ろ過する。さらに溶液 1 mL 中にビタミン B<sub>6</sub> が 1 ~ 3 ng となるように水で希釈し (希釈倍数 : D)、試験溶液とする<sup>注3)</sup>。

⑤ 測定

試験管 2 本ずつに試験溶液 0.5、1 及び 2 mL を正確に加え、次に各試験管に測定用培地 2.5 mL 及び水を加えて全量を 5 mL とする。別に検量線作成のため、ビタミン B<sub>6</sub> 標準溶液 (0 ~ 7.5 ng 相当量) を試験管 2 本ずつに取り、それぞれに測定用培地 2.5 mL 及び水を加えて全量を 5 mL とする。100 °C で 15 分間オートクレーブ処理を行い、冷却後、各試験管に接種菌液 1 滴 (約 30 µL) ずつを無菌的に接種し、30 °C で 20 時間程度振とう培養する。

培養後、増殖度を 600 nm の濁度を用いて測定する<sup>注4)</sup>。標準溶液の濁度より検量線を作成し、これに試験溶液より得られた濁度を照合して、試験溶液中の塩酸ピリドキシンの濃度 (C ng/mL) を求め、試料中の塩酸ピリドキシン含量を算出する。得られた値に係数 0.8227 を掛けてビタミン B<sub>6</sub> 量とする。

⑥ 計算

$$\text{試料中のビタミンB}_6\text{含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10,000} \times 0.8227$$

C : 検量線から求めた塩酸ピリドキシンの濃度 (ng/mL)

V : 定容量 (mL)

D : 希釈倍数

W : 試料採取量 (g)

[注]

- 1) ビタミン B<sub>6</sub> 定量用基礎培地「ニッスイ」: 日水製薬
- 2) 通常、動物性食品は 0.055 mol/L 塩酸、植物性食品は 0.5 mol/L 硫酸を用いる。
- 3) ビタミン B<sub>6</sub> 含量の高い食品については、0.055 mol/L 塩酸で振とう抽出し、ろ過して得られたろ液を試験溶液とすることもできる。又は水で振とう抽出し、得られた抽出液中の塩酸ピリドキシンを紫外部検出器付き又は蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフで定量することも可能であるが、食品表示基準における分析方法は、微生物学的定量法とする。

高速液体クロマトグラフ操作条件例

測定波長	290 nm	Ex 295 nm Em 405 nm
カラム	Inertsil ODS-2 (ジーエルサイエンス製)	
移動相	0.05 mol/L 過塩素酸	
流量	1.2 mL/分	

- 4) マイクロプレートを使用し、マイクロプレートリーダー（例えば、日本モレキュラーデバイス社製、スペクトラ MAX 型等）で濁度を測定することもできる。

## 29 ビタミン B<sub>12</sub>

### (1) 微生物学的定量法

#### ① 装置及び器具

- ・分光光度計

#### ② 試薬

- ・ビタミン B<sub>12</sub> 標準溶液：シアノコバラミン（日本薬局方標準品）10 mg を 25 v/v%エタノール溶液に溶かし正確に 100 mL とする。さらに、水で希釈して 0.1 ng/mL となるようにする。
- ・酢酸ナトリウム緩衝液：酢酸 19.8 mL、酢酸ナトリウム三水和物 38.56 g を水 500 mL に溶解する（pH4.5）。
- ・シアン化カリウム溶液：シアン化カリウム結晶を 0.2 w/v%水酸化ナトリウム溶液に溶解し、0.5 mg/mL の溶液を調製する。
- ・使用菌株：*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* <sup>注1)</sup> ATCC 7830 (NBRC 3376)
- ・ビタミン B<sub>12</sub> 測定用培地（1 L 中、pH6.0±0.1）

カザミノ酸	15 g
L-シスチン	400 mg
DL-トリプトファン	400 mg
硫酸アデニン	20 mg
塩酸グアニン	20 mg
ウラシル	200 mg
キサンチン	20 mg
塩酸チアミン	1 mg
リボフラビン	1 mg
ビオチン	10 µg
ニコチン酸	2 mg
パラアミノ安息香酸	2 mg
パントテン酸カルシウム	1 mg
塩酸ピリドキシン	4 mg
塩酸ピリドキサーール	4 mg
塩酸ピリドキサミン	800 µg
葉酸	200 µg
リン酸二水素カリウム	1 g
リン酸一水素カリウム	1 g
硫酸マグネシウム	400 mg
硫酸鉄	20 mg

硫酸マンガン	20 mg
塩化ナトリウム	20 mg
L-アスパラギン	200 mg
グルコース	40 g
酢酸ナトリウム	20 g
アスコルビン酸	4 g
ポリソルベート 80	2 g

・菌保存用培地（1 L 中、pH6.8±0.1）

酵母エキス	8.5 g
グルコース	11.0 g
トマトジュース粉	3.7 g
粉末寒天	15.0 g
ペプトン	8.5 g
リン酸二水素カリウム	2.0 g
ポリソルベート 80	1.0 g

・前培養培地：上記培地より粉末寒天を除く。

なお各培地はそれぞれ調製したものが市販されている<sup>注2)</sup>。

・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

③ 接種菌液の調製

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* の保存菌株を前培養培地に接種し、37 °Cで20時間程度培養する。この菌浮遊溶液を遠心分離し、滅菌生理食塩水で2回洗浄する。洗浄後、600 nmにおける透過率80~90%となるように滅菌生理食塩水で希釈し、接種菌液とする。

④ 試験溶液の調製<sup>注3) 注4)</sup>

試料2gを精密に量り(Wg)、酢酸ナトリウム緩衝液10mL、水40mL及びシアン化カリウム溶液0.4mLを加える。100 °Cで30分間加熱した後、冷却し、10%メタリン酸0.6mLを加え、正確に100mLとしたものをろ過する(V<sub>1</sub>mL)。ろ液の一定量(V<sub>2</sub>mL)を正確に取りpH6.0に調整した後、水で正確に定容する(V<sub>3</sub>mL)。さらに溶液1mL中にビタミンB<sub>12</sub>が0.02~0.04ng含むよう水で希釈し(希釈倍数:D)、試験溶液とする。

⑤ 測定

試験管2本ずつに試験溶液0.5、1及び2mLを正確に加え、次に各試験管に測定用培地2.5mL及び水を加えて全量を5mLとする。別に検量線作成のため、ビタミンB<sub>12</sub>標準溶液(0~0.15ng相当量)を試験管2本ずつにとり、それぞれに測定用培地2.5mL及び水を加えて全量を5mLとする。121 °Cで5分間オートクレーブ処理を行い、冷却後、各試験管に接種菌液1滴(約30μL)ずつを無菌的に接種し、37 °Cで22時間程度恒温槽又は恒温水槽に入れて培養する。

培養後、増殖度を600nmの濁度を用いて測定する<sup>注5)</sup>。標準溶液の吸光度

より検量線を作成し、これに試験溶液より得られた濁度を照合して、試験溶液中のシアノコバラミンの濃度 (C ng/mL) を求め、試料中のビタミン B<sub>12</sub> 含量を算出する。

⑥ 計算

$$\text{試料中のビタミンB}_{12}\text{含量 (}\mu\text{g/100 g)} = \frac{C \times V_1 \times D}{W \times 10} \times \frac{V_3}{V_2}$$

C : 検量線から求めたシアノコバラミンの濃度 (ng/mL)

V<sub>1</sub>~V<sub>3</sub> : 定容量 (mL) 又は分取量 (mL)

D : 希釈倍数

W : 試料採取量 (g)

[注]

- 1) 旧名称は、*Lactobacillus leichmannii* である。
- 2) B<sub>12</sub> ASSAY MEDIUM USP (Cat No. 245710) : Becton,Dickinson and Company

ライヒマニ保存用培地「ニッスイ」: 日水製薬

ライヒマニ接種用培地「ニッスイ」: 日水製薬 (前培養培地に同じ)

- 3) ヌクレオチドなどの含量が高く、サンプルブランクを測定するために熱アルカリ処理を必要とする場合には、試験溶液を 25 mL 分取し、そこへ 10 mol/L の水酸化ナトリウム 1 mL を加え、pH がアルカリ側にあることを確認した後にオートクレーブで 121°C、30 分間加熱処理を行う。
- 4) ビタミン B<sub>12</sub> 含量の高い食品については、水で振とう抽出し、ろ過して得られたろ液の pH を調整し、試験溶液とすることもできる。

また、シアノコバラミンを紫外線-可視検出器付高速液体クロマトグラフで定量することも可能であるが、食品表示基準における分析方法は、微生物学的定量法とする。

高速液体クロマトグラフ操作条件例

測定波長	550 nm
カラム	Inertsil ODS-2 (ジーエルサイエンス製)
移動相	0.05 mol/L 酢酸アンモニウム:アセトニトリル (9:1)
流量	1.2 mL/分

- 5) マイクロプレートを使用し、マイクロプレートリーダー (例えば、日本モレキュラーデバイス社製、スペクトラ MAX 型等) で濁度を測定することもできる。

### 30 ビタミン C

2,4-ジニトロフェニルヒドラジン法及び高速液体クロマトグラフ法では酸化型ビ



タミン C 及び総ビタミン C を定量でき、その差から還元型ビタミン C 含量が求められる。他のビタミン C の定量法としては、インドフェノール滴定法及びインドフェノール・キシレン法がある。これらは直接、還元型ビタミン C を定量する方法である。ただし、インドフェノール滴定法は終点判断がしにくい着色試験溶液には適用できない。また、第 8 版食品添加物公定書において「L-アスコルビン酸」の定量に用いられるヨウ素滴定法がある。ヨウ素滴定法も還元型アスコルビン酸を定量する方法であり、L-アスコルビン酸原体のように高含量のものに限って適用できる。ただし、食品表示基準における分析方法は、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン法、インドフェノール・キシレン法、高速液体クロマトグラフ法又は酸化還元滴定法とする。

(1) 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン法

① 装置及び器具

- ・分光光度計：540 nm の吸光度が測定できるもの。

② 試薬

- ・標準ビタミン C：日本薬局方標準品「L-アスコルビン酸標準品」又は同等品を用いる。
- ・メタリン酸：特級
- ・2 w/v%チオ尿素含有 5%メタリン酸溶液：チオ尿素（特級）2 g を 5%メタリン酸で溶解し、100 mL とする。
- ・ヒドラジン溶液：2,4-ジニトロフェニルヒドラジン（特級）2 g<sup>注1</sup> を 4.5 mol/L 硫酸に溶解し、100 mL とする。冷暗所に保存し、2 週間ごとに調製する。
- ・インドフェノール溶液：2,6-ジクロロフェノールインドフェノールナトリウム二水和物 100 mg を温水に溶解し、50 mL とする。
- ・海砂：市販の海砂を蒸留水で洗い強熱する。
- ・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

③ 試験溶液の調製

1) 総ビタミン C 定量用試験溶液

試料（1～5 g）を精密に量り（ $W_1$  g）、5%メタリン酸溶液と海砂（必要に応じて加える。）を加え、乳鉢で十分にすりつぶす。5%メタリン酸溶液を加えてよく混和し 50 mL に定容する（ $V_1$  mL）。遠心分離（3,000 回転/分、10 分間程度）を行い、この上澄み液を必要に応じて 5%メタリン酸溶液で適宜希釈して（希釈倍数： $D_1$ ）、試験溶液とする。

2) 酸化型ビタミン C 定量用試験溶液

1) と同様に試料を精密に量り（ $W_2$  g）、ビタミン C 酸化防止のために、2 w/v%チオ尿素含有 5%メタリン酸溶液 40 mL と海砂を加え、均一にすりつぶす。さらに、2 w/v%チオ尿素含有 5%メタリン酸溶液を加えてよく混合し、50 mL に定容する（ $V_2$  mL）。遠心分離（3,000 回転/分、10 分間程

度)を行い、この上澄み液を必要に応じて2 w/v%チオ尿素含有5%メタリン酸溶液で適宜希釈して(希釈倍数: D<sub>2</sub>)、試験溶液とする。

④ 標準溶液の調製

1) 標準原液

標準ビタミン C 100 mg を精密に量り、5%メタリン酸溶液に溶解し、100 mL に定容する(冷蔵保存、3週間ごとに調製する)。

2) 標準溶液

標準原液を5%メタリン酸溶液で希釈し、5.0、10及び20 µg/mL の溶液を調製する(用時ごとに調製する)。

⑤ 測定

1) 総ビタミン C

総ビタミン C 定量用試験溶液 2 mL を主検用と盲検用の2本の共栓付き試験管に正確に量り、インドフェノール溶液を滴下(ピンク色を1分間保つ量)する。次に、それぞれの試験管に2 w/v%チオ尿素含有5%メタリン酸溶液 2 mL を加える。

主検用の試験管にヒドラジン溶液 1 mL を加え、混和後、50 °Cの恒温水槽中に1時間静置する。盲検用の試験管には、ヒドラジン溶液を加えず、同様に50 °Cで1時間放置する。

反応後直ちに試験管を氷水中で冷却する。85%硫酸をビュレットに入れ、試験管を氷水中で振りながら、その85%硫酸 5 mL を徐々に加える。盲検用の試験管にはヒドラジン溶液 1 mL を加えよく混和する。

30分間室温に放置後、540 nm の吸光度を測定する。主検と盲検の吸光度の差と、3)により作成する検量線から、試験溶液中の総ビタミン C 濃度(C<sub>1</sub> µg/mL)を求める。

2) 酸化型ビタミン C

酸化型ビタミン C 定量用試験溶液 2 mL を主検用と盲検用の2本の共栓付き試験管に正確に量り、それぞれの試験管に5%メタリン酸溶液 2 mL を加える。以降、上記1)のヒドラジン溶液を加える以降の操作を行い、540 nm の吸光度を測定する。主検と盲検の吸光度の差と、3)により作成する検量線から、試験溶液中の酸化型ビタミン C 濃度(C<sub>2</sub> µg/mL)を求める。

3) 標準溶液

各濃度の標準溶液 2 mL について1)と同様の操作を行い、540 nm の吸光度を測定し、主検と盲検の吸光度の差から検量線を作成する。

⑥ 計算

$$\text{試料中の総ビタミン C 含量 (mg/100 g)} = \frac{C_1 \times V_1 \times D_1}{W_1 \times 10}$$

C<sub>1</sub>: 検量線から求めた総ビタミン C の濃度 (µg/mL)

V<sub>1</sub>: 定容量 (mL)

D<sub>1</sub> : 希釈倍数

W<sub>1</sub> : 試料採取量 (g)

$$\text{試料中の酸化型ビタミン C 含量 (mg/100 g)} = \frac{C_2 \times V_2 \times D_2}{W_2 \times 10}$$

C<sub>2</sub> : 検量線から求めた酸化型ビタミン C の濃度 (μg/mL)

V<sub>2</sub> : 定容量 (mL)

D<sub>2</sub> : 希釈倍数

W<sub>2</sub> : 試料採取量 (g)

$$\begin{aligned} \text{試料中の還元型ビタミン C 含量 (mg/100g)} \\ &= \text{総ビタミン C 含量 (mg/100g)} \\ &\quad - \text{酸化型ビタミン C 含量 (mg/100g)} \end{aligned}$$

[注]

1) 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの市販試薬は安定剤として水を約 50%含んでいるので、4g 採取する必要がある。

## (2) インドフェノール・キシレン法

### ① 適用される食品

ぶどう、いちごのように赤色系の色素を含有する果汁のビタミン C の定量に用いられる。

2,6-ジクロロフェノールインドフェノールと果汁中のアスコルビン酸の反応の結果残存する 2,6-ジクロロフェノールインドフェノールをキシレンに転溶することにより果汁に固有の色素と分離し、一定量の試料による還元量をビタミン C 標準溶液による還元量と比較定量する。

### ② 装置及び器具

- ・分光光度計 : 500 nm の吸光度を測定できるもの。
- ・30 mL 共栓試験管

### ③ 試薬

- ・6 w/v%メタリン酸溶液 : メタリン酸 6 g を水に溶解して 100 mL とする。
- ・ビタミン C 標準溶液 : 結晶 L-アスコルビン酸 (日本薬局方標準品又は同等品) 2 mg に 2 w/v%メタリン酸 (6 w/v%メタリン酸 100 mL に水を加えて 300 mL とする) を加えて 100 mL とする。
- ・色素溶液 : 2,6-ジクロロインドフェノールナトリウム 25 mg を水に溶解して 200 mL とする。
- ・酢酸緩衝液 : 無水酢酸ナトリウム (特級) 30 g、水 70 mL 及び酢酸 (特級) 100 mL を混合する。
- ・キシレン : 特級

### ④ 試験溶液の調製

試料 10 g (W g) に 6 w/v%メタリン酸溶液を加えて 100 mL とし (V mL)、必要があればろ過又は遠心分離し、上澄み液を試験溶液とする。溶液 1 mL 中にアスコルビン酸を 0.02 mg 程度含むように、6 w/v%メタリン酸溶液で希釈する (希釈倍数 : D)。

⑤ 測定

30 mL 共栓試験管 3 本を用意し、試験管 a に試験溶液 5 mL、b に 6 w/v%メタリン酸溶液 5 mL、c にビタミン C 標準溶液 5 mL を正確に取り、次にそれぞれの試験管に酢酸緩衝液 2 mL と色素溶液 2 mL ずつを手早く正確に加えて軽く振りまぜる。

直ちにそれぞれの試験管にキシレン 10 mL ずつを正確に加え、栓をして 30 秒間振りまぜた後静置してキシレン層を分離させる。

試験管 a、b、c から取ったキシレン層をセルに取り、分光光度計により 500 nm における吸光度を測定する<sup>注1)</sup>。

⑥ 計算

試験管 a、b、c のキシレン層の吸光度をそれぞれ A、B、C とすれば試料中のビタミン C は次式により計算される。

$$\text{試料中のビタミン C 含量 (mg/100 g)} = \frac{B - A}{B - C} \times \frac{K \times V \times D}{W} \times 100$$

K : ビタミン C 標準溶液 1 mL 中のビタミン C mg 数 (正確に調製された場合は 0.02)

V : 定容量 (mL)

D : 希釈倍数

W : 試料採取量 (g)

[注]

1) キシレン可溶性色素が検液中に混在するときは、吸光度測定に妨害が起きるので、キシレン抽出液の吸光度をいったん測定後、半飽和ヒドロキノンアセトン溶液を 2 滴加え混合後再び測定し、その差をもってインドフェノール色素の吸光度とする。

(3) 高速液体クロマトグラフ法<sup>注1)</sup>

① 装置及び器具

- ・高速液体クロマトグラフ (HPLC) : 紫外可視分光光度計付き
- ・カラム : 順相型 (シリカゲルを充てんしたカラム)

② 試薬

- ・標準ビタミン C : 日本薬局方標準品「L-アスコルビン酸標準品」又は同等品を用いる。
- ・メタリン酸 : 特級
- ・2 w/v%チオ尿素含有 5 %メタリン酸溶液 : チオ尿素 (特級) 2 g を 5 %メタリン酸で溶解し、100 mL とする。

- ・ヒドラジン溶液：2,4-ジニトロフェニルヒドラジン（特級）2 g<sup>注2</sup>を4.5 mol/L 硫酸に溶解し、100 mL とする。冷暗所に保存し、2週間ごとに調製する。
- ・インドフェノール溶液：2,6-ジクロロフェノールインドフェノールナトリウム二水和物 100 mg を温水に溶解し、50 mL とする。
- ・海砂：市販の海砂を蒸留水で洗い強熱する。
- ・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

### ③ 試験溶液の調製

#### 1) 総ビタミンC 定量用試験溶液

試料（1～5 g）を精密に量り（ $W_1$  g）、5%メタリン酸溶液と海砂（必要に応じて加える。）を加え、乳鉢で十分にすりつぶす。5%メタリン酸溶液を加えてよく混和し50 mL に定容する（ $V_1$  mL）。遠心分離（3,000回転/分、10分間程度）を行い、この上澄み液を必要に応じて5%メタリン酸溶液で適宜希釈して（希釈倍数： $D_1$ ）、試験溶液とする。

#### 2) 酸化型ビタミンC 定量用試験溶液

1)と同様に試料を精密に量り（ $W_2$  g）、ビタミンC 酸化防止のために、2 w/v%チオ尿素含有5%メタリン酸溶液 40 mL と海砂を加え、均一にすりつぶす。さらに、2 w/v%チオ尿素含有5%メタリン酸溶液を加えてよく混合し、50 mL に定容する（ $V_2$  mL）。遠心分離（3,000回転/分、10分間程度）を行い、この上澄み液を必要に応じて2 w/v%チオ尿素含有5%メタリン酸溶液で適宜希釈して（希釈倍数： $D_2$ ）、試験溶液とする。

### ④ 標準溶液の調製

#### 1) 標準原液

標準ビタミンC 100 mg を100 mL 容全量フラスコに精密に量り取り、5%メタリン酸溶液で溶解し100 mL に定容する（冷蔵保存、3週間ごとに調製する。）。

#### 2) 標準溶液

標準原液5 mL を50 mL 容全量フラスコに正確に量り、5%メタリン酸溶液で定容する（100  $\mu$ g/mL、用時ごとに調製する。）。

#### 3) 測定用標準溶液

標準溶液を5%メタリン酸溶液で希釈し、2.0、5.0 及び10  $\mu$ g/mL とする（用時ごとに調製する。）。

### ⑤ オサゾンの生成

#### 1) 総ビタミンC

総ビタミンC 定量用試験溶液2 mL を共栓付き試験管に正確に量り、インドフェノール溶液を滴下（ピンク色を1分間保つ量）する。2 w/v%チオ尿素含有5%メタリン酸溶液2 mL を正確に加えた後、ヒドラジン溶液0.5 mL を加え、混和後、50  $^{\circ}$ Cの恒温水槽中に1時間静置する。反応後、直ちに試験管を室温まで冷却する。酢酸エチル（残留農薬分析用）2 mL を加

え、振とう機で1時間振とうし、生成したオサゾン抽出する。静置後、上層を共栓付き小試験管に移し、無水硫酸ナトリウム約0.5 gを加え、軽く振って脱水する。これを試験溶液とする。

## 2) 酸化型ビタミンC

酸化型ビタミンC定量用試験溶液2 mLを共栓付き試験管に正確に量り、それぞれの試験管に5%メタリン酸溶液2 mLを加える。以降、上記1)のヒドラジン溶液0.5 mLを加える以降の操作を行い、試験溶液を得る。

## 3) 標準溶液

各濃度の測定用標準溶液2 mLについて1)と同様の操作を行い、HPLC用標準溶液を得る。

## ⑥ 測定

試験溶液20 μLを高速液体クロマトグラフに注入し、ビタミンCのオサゾンのピーク面積を測定し、あらかじめHPLC用標準溶液20 μLを高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線を用いて試験溶液中の濃度を求め、試料中のビタミンC含量を算出する。

<高速液体クロマトグラフ操作条件例<sup>注3)</sup>>

カラム：Silica 2150-N (100) (センシユー科学) あるいは相当品、内径 6.0 mm、長さ 150 mm、ステンレス製<sup>注4)</sup>

移動相：酢酸エチル-ヘキサン-酢酸 (5:4:1)

検出器：紫外可視分光光度計

測定波長：495 nm

流量：1.5 mL/分

温度：35 °C

## ⑦ 計算

$$\text{試料中の総ビタミンC含量 (mg/100 g)} = \frac{C_1 \times V_1 \times D_1}{W_1 \times 10}$$

C<sub>1</sub>：検量線から求めた総ビタミンCの濃度 (μg/mL)

V<sub>1</sub>：定容量 (mL)

D<sub>1</sub>：希釈倍数

W<sub>1</sub>：試料採取量 (g)

$$\text{試料中の酸化型ビタミンC含量 (mg/100 g)} = \frac{C_2 \times V_2 \times D_2}{W_2 \times 10}$$

C<sub>2</sub>：検量線から求めた酸化型ビタミンCの濃度 (μg/mL)

V<sub>2</sub>：定容量 (mL)

D<sub>2</sub>：希釈倍数

W<sub>2</sub>：試料採取量 (g)

$$\begin{aligned} & \text{試料中の還元型ビタミン C 含量 (mg/100g)} \\ &= \text{総ビタミン C 含量 (mg/100g)} \\ & - \text{酸化型ビタミン C 含量 (mg/100g)} \end{aligned}$$

[注]

- 1) 適当な還元剤、例えばジチオスレイトール、2,3-ジメルカプト-1-プロピルアルコール、硫化水素などで酸化型ビタミン C を還元して、強い紫外線吸収を示す還元型ビタミン C にし、高速液体クロマトグラフを用いて測定することで総ビタミン C を求める方法もある。また逆に、活性炭などで酸化後、1,2-フェニレンジアミンを加え、キノキサリン化合物に誘導体化して蛍光を測定する方法もある。

なお、アスコルビン酸脂肪酸エステルは、0.02 w/v%アスコルビン酸含有メタノールで抽出し高速液体クロマトグラフ法により測定できる。測定条件の例を次に示す。

カラム：Partisil ODS-3 5 μm、内径 4.6 mm、長さ 250 mm

移動相：メタノール-0.05 mol/L リン酸二水素ナトリウム溶液 (pH2.0)  
(85:15)

流量：1.0 mL/分

測定波長：254 nm

- 2) 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの市販試薬は安定剤として水を約 50%含んでいるので、4 g 採取する必要がある。

- 3) 本測定条件では、アスコルビン酸とエリソルビン酸の分別はできない。エリソルビン酸の分別定量をする場合の測定条件の例を次に示す。

移動相：ヘキサン-酢酸エチル-プロピルアルコール-酢酸 (40:30:2:1)

保持時間：アスコルビン酸は約 10 分間、エリソルビン酸は約 10.5 分間

(4) 酸化還元滴定法

① 適用される食品

ビタミン C 含量が著しく高く、かつビタミン C 以外にヨウ素を還元する物質が含まれない食品に適用される。

② 装置及び器具

- ・ビュレット：テフロンコック付き、容量 50 mL 以下で 0.1 mL の刻線付きのもの (褐色)。

③ 試薬

- ・メタリン酸：特級
- ・でんぷん (溶性)：特級
- ・でんぷん試液：でんぷん 1 g を量り、冷水 10 mL を加えてよくすり混ぜ、これを熱湯 200 mL 中にかき混ぜながら徐々に加え、液が半透明となるまで煮沸し、放冷し、静置した後、上澄液を用いる。用時調製する。

- ・ヨウ化カリウム：特級
- ・ヨウ素：特級
- ・0.05 mol/L ヨウ素溶液：1,000 mL 中ヨウ素（I、原子量 126.90）12.690 g を含む。ヨウ素 14 g を量り、ヨウ化カリウム溶液（9→25）100 mL を加えて溶かし、塩酸 3 滴及び水を加えて 1,000 mL とする。本液は、共栓瓶に保存し、度々標定し直す。標定は次のように行いファクターを求める。

標定：三酸化ヒ素（標準試薬）を粉末とし、100 °C で恒量になるまで乾燥した後、その約 0.15 g を精密に量り、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 20 mL を加え、必要があれば加熱して溶かす。次に水約 40 mL 及びメチルオレンジ試液 2 滴を加え、さらに液の黄色が淡紅色となるまで塩酸（1→4）を加える。さらに炭酸水素ナトリウム 2 g、水約 50 mL 及びでんぷん試液 3 mL を加えた後、このヨウ素溶液で液が持続する青色を呈するまで滴定する。

0.05 mol/L ヨウ素溶液 1 mL = 4.946 mgAs<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

- ・その他の試薬は、特に指定のない限り特級を用いる。

#### ④ 測定

試料のビタミン C 200~300 mg に相当する量を精密に量り（W g）、メタリン酸溶液（1→50）50 mL を加えて溶かし、0.05 mol/L ヨウ素溶液で滴定する（指示薬でんぷん試液）（T mL）。

#### ⑤ 計算

0.05 mol/L ヨウ素溶液 1 mL はビタミン C（L-アスコルビン酸）8.806 mg に相当する。

$$\text{試料中のビタミン C 含量 (mg/100 g)} = 8.806 \times \frac{f \times T}{W} \times 100$$

T：滴定量（mL）

W：試料採取量（g）

f：0.05 mol/L ヨウ素溶液ファクター

### (5) 逆相高速液体クロマトグラフ法

#### ① 適用される食品

L-アスコルビン酸 2-グルコシドを含む食品に適用される。

#### ② 装置及び器具

- ・高速液体クロマトグラフ：紫外部吸収検出器付き
- ・遠心分離機
- ・逆相型（オクタデシルシリル基を結合させたシリカゲルを充てんしたカラム）

#### ③ 試薬

- ・アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用
- ・リン酸二水素カリウム：特級



- ・テトラブチルアンモニウムヒドロキシド：特級、10%水溶液
- ・リン酸溶液：20%水溶液

#### ④ 試験溶液の調製

##### 1) 液状食品（不溶物をほとんど含まないもの）

試料約 5.0 g を精密に量り（W g）、移動相<sup>注1)</sup>を加えて正確に 50 mL とする（V mL）。不溶物がある場合は遠心分離し、必要に応じて移動相で適宜希釈して（希釈倍数：D）、メンブランフィルター（0.45 μm）でろ過したものを試料液とする。

##### 2) 粉体及び固体食品（半液状食品を含む）

試料を粉碎してその約 5.0 g を精密に量り（W g）、移動相 30 mL を加えて 10 分間かくはん又は振とうする。不溶物がある場合はろ過又は遠心分離し、ろ液又は上澄液は 50 mL 容全量フラスコ等の受器に捕集する。ろ過残渣又は沈殿を少量の移動相で数回洗浄し、洗液も先の受器に合わせて捕集し、さらに移動相を加えて正確に 50 mL とする（V mL）。この液を必要に応じて移動相で適宜希釈して（希釈倍数：D）、メンブランフィルター（0.45 μm）でろ過したものを試料液とする。

#### ⑤ 標準溶液の調製

L-アスコルビン酸 2-グルコシド約 0.10 g を精密に量り、移動相<sup>注1)</sup>を加えて溶かして正確に 100 mL とする。その 20 mL を正確に量り、移動相を加えて正確に 200 mL としたものを標準溶液とする（この液 1 mL は、L-アスコルビン酸 2-グルコシド約 100 μg を含む）。標準溶液 1～50 mL を正確に量り、移動相を加えて正確に 100 mL とし、検量線用標準溶液とする（この液 1 mL は、L-アスコルビン酸 2-グルコシド約 1～50 μg を含む）。

#### ⑥ 測定<sup>注2)</sup>

試験溶液 10 μl を正確に量り、高速液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積と、あらかじめ標準溶液 10 μL を高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線<sup>注3)</sup>を用いて試験溶液中の L-アスコルビン酸 2-グルコシド濃度（C μg/mL）を求め、試料中の L-アスコルビン酸 2-グルコシド含量（mg/100g）を計算する。

<高速液体クロマトグラフ操作条件例<sup>注4)</sup>>

カラム：TSKgel ODS-80Ts QA（東ソー）又は相当品、内径 4.6 mm、長さ 250 mm、ステンレス製

カラム温度：40 °C

移動相：水 800 mL にリン酸二水素カリウム 1.4 g とテトラブチルアンモニウムヒドロキシド 26 mL を加え、リン酸水溶液で pH5.2 に調整した後、水で 1,000 mL とする。この液 900 mL とアセトニトリル 100 mL を混和したもの。

流速：0.8 mL/分

測定波長：260 nm

## ⑦ 計算

$$\text{試料中の L-アスコルビン酸 2-グルコシド含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C : 検量線から求めた L-アスコルビン酸 2-グルコシドの濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )

V : 定容量 (mL)

D : 希釈倍数

W : 試料採取量 (g)

試料中のビタミン C 総含量 (mg/100 g) = ビタミン C 含量 (mg/100 g)

+ 0.5207 × L-アスコルビン酸 2-グルコシド含量 (mg/100 g)

0.5207 : L-アスコルビン酸の分子量 (176.12) を L-アスコルビン酸 2-グルコシドの分子量 (338.26) で除した係数。

### [注]

- 1) L-アスコルビン酸 2-グルコシドは、水、5%メタリン酸溶液に比べ、移動相に溶かしたときに最も安定である。
- 2) 本法のほかに、次の条件でも測定できる。  
カラム充てん剤 : アミノプロピル基を化学結合したシリカゲル、カラム管 : 内径 4.6 mm 長さ 250 mm、移動相 : アセトニトリル/リン酸二水素カリウム・0.5 v/v%リン酸溶液 (5.44→1000) の混液 (60:40)、流速 : 0.7 mL/分、そのほかの条件は本法と同じ。この条件で測定したときの検出下限は 0.25 mg/100 g である。
- 3) 試料液の濃度が検量線の濃度範囲を超える場合、試料液を移動相で適宜希釈するか、試料採取量を減らして試験する。
- 4) 本法の検出下限は 0.10 mg/100 g である。なお、清涼飲料水、飴及び錠菓における添加回収率は 98.2~99.1 % である。

## 31 ビタミン D

本試験法は、エルゴカルシフェロール (ビタミン D<sub>2</sub>) 及びコレカルシフェロール (ビタミン D<sub>3</sub>) を定量の対象とし、両者を一括してビタミン D として定量する。

### (1) 高速液体クロマトグラフ法

#### ① 装置及び器具

- ・高速液体クロマトグラフ (HPLC) : 分取用と測定用の 2 台あったほうがよい。紫外分光光度計付き (254nm の固定波長のもの、又は波長が可変のものは 265nm で使用する)。含量の少ない試料の定量用検出器には、最高感度が 0.001 以上のものが必要である。
- ・カラム : 逆相型 (オクタデシルシリル基を結合させたシリカゲルを充てんしたカラム) 及び順相型 (シリカゲルを充てんしたカラム) の 2 本
- ・ガラス器具は褐色のものを用いる。

## ② 試薬

- ・標準ビタミンD：日本薬局方標準品「エルゴカルシフェロール」（ビタミンD<sub>2</sub>）又は「コレカルシフェロール」（ビタミンD<sub>3</sub>）<sup>注1)</sup>を用いる。植物性食品の分析にはビタミンD<sub>2</sub>を、動物性食品の場合にはビタミンD<sub>3</sub>を用いる。強化食品<sup>注2)</sup>に関しては、添加された製剤に応じて、ビタミンD<sub>2</sub>又はビタミンD<sub>3</sub>を用いる。なお、添加製剤が不明の場合はビタミンD<sub>3</sub>を用いる。
- ・ビタミンD標準溶液：エタノールで0.2 µg/mLになるように溶解する。
- ・ヘキサン、酢酸エチル、アセトニトリル、ジエチルエーテル：残留農薬試験用
- ・1 w/v%ピロガロール-エタノール溶液：ピロガロール1 g にエタノール100 mLを加え溶解する。用時調製とする。
- ・60 w/v%水酸化カリウム溶液：水酸化カリウム600 g に冷却しながら水を加えて溶解し、正確に1 Lとする。
- ・その他の試薬は、特に指定のない限り特級を用いる。

## ③ 試験溶液の調製<sup>3)</sup>

### 1) けん化<sup>注4)</sup>

試料が油状の場合は0.2～0.5 g、粉末の場合は1～2 g、液体の場合は5～10 gを60 mL容共栓付き遠心管に精密に量る（W g）。粉末については1 w/v%塩化ナトリウム溶液3～5 mLを加え、70 °Cで3分間膨潤させる。

1 w/v%ピロガロール-エタノール溶液10 mL、60 w/v%水酸化カリウム溶液2 mL、水酸化カリウム2 gを加え、70 °C水浴中でガラス棒で時々かき混ぜながら1時間加熱する。冷水中で速やかに室温まで冷却する。1 w/v%塩化ナトリウム溶液を合計で22 mLになるように加え（例えば、粉末の試料で、けん化の前に3 mL加えた場合は19 mLを加える。また液体の試料10 gを採取した場合は12 mLを加える。）、酢酸エチル-ヘキサン混液（1：9）15 mLを加えて栓をし、5分間振とうする。遠心分離（1,500回転/分、5分間）後、駒込ピペットで上層を100 mL容なす形フラスコに移す。水層を酢酸エチル-ヘキサン混液（1：9）15 mLでさらに2回、同様に抽出する。抽出液を合わせ35 °Cで減圧濃縮する。残留物をジエチルエーテルに溶解し、10 mL容共栓付き試験管に移した後、窒素気流下で溶媒を留去する。残留物をメタノール-アセトニトリル（1：9）の適量（0.5 mL以上）に正確に溶解し（V mL）、必要に応じてメタノール-アセトニトリル（1：9）で適宜希釈して（希釈倍数：D）試験溶液とする。

試料と同時にビタミンD標準溶液1、2、4 mLをそれぞれ正確に量り、けん化処理を行う。

### 2) 分取

逆相型カラム（Nucleosil 5 C 18（ナーゲル社製）、内径7.5 mm、長さ300 mmあるいは相当品）を付けた高速液体クロマトグラフに紫外検出器、

フラクションコレクター（ドロップカウンター）を連結する。高速液体クロマトグラフの条件は、移動相にメタノール-アセトニトリル（1:9）を用い、流量は 1.5 mL/分とする。あらかじめ、けん化していない標準ビタミン D を高速液体クロマトグラフに注入し、保持時間を確認しておく。

次に、1) で得られた試験溶液及びビタミン D 標準溶液 150 µL をそれぞれ高速液体クロマトグラフに注入し、ビタミン D を含む画分（保持時間の前後約 90 秒間）を分取する。減圧濃縮後、残留物をヘキサン-イソプロピルアルコール（99.6:0.4）200 µL に溶解し、測定用試験溶液及び測定用標準溶液とする。

#### ④ 測定

測定用試験溶液 100 µL を順相型カラムを付けた高速液体クロマトグラフに注入し、ビタミン D のピーク高さを測定し、あらかじめ測定用標準溶液 100 µL を高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線から、試験溶液中の濃度（C µg/mL）を求め、試料中のビタミン D 含量を求める。

<高速液体クロマトグラフ操作条件例>

カラム：Nucleosil 100-5（ナーゲル社製）又は相当品、内径 4.6 mm、長さ 250 mm、ステンレス製

移動相：ヘキサン-イソプロピルアルコール（99.6:0.4）

測定波長：254 nm 又は 265 nm

流量：1.6 mL/分

温度：室温

#### ⑤ 計算

$$\text{試料中のビタミン D 含量 (}\mu\text{g/100 g)} = \frac{C \times V \times D \times 100}{W}$$

C：検量線から求めたビタミン D の濃度（µg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

[注]

1) 標準ビタミン D は、エタノールに溶かしたときの 230 nm と 265 nm の吸光度比（ $A_{230}/A_{265}$ ）が 0.60 以下のものを使用する。

また標準ビタミン D は、窒素ガス又はアルゴンガスで空気を置換して -20 °C に保存すれば、1～2 年安定である。

2) 近年、加工食品のビタミン D の強化にはビタミン D<sub>3</sub> が使用されることが多い。

3) ここに示した試料採取量等によって得られる定量下限は、固体試料で 0.3～0.8 µg/100 g であり、液体試料で 0.2 µg/100 g 程度である。なお、試験溶液の調製の操作を 2 倍にスケールアップすることによって、定量下限を上記の 1/2 程度にすることは可能である。

- 4) ビタミンDはけん化時に一部がプレビタミンDに熱異性化される。本法は標準ビタミンDを試料と同条件でけん化することにより異性化される分を相殺し、定量するものである。

[参考文献]

- 1) 小林正、岡野登志夫：“ビタミン学実験法[ I ]”，日本ビタミン学会編，94，東京化学同人（1983）
- 2) 森田公平、福澤有紀子、小高要、氏家隆：ビタミン，68，6（1994）

## 32 ビタミンE

食品中のビタミンEは、 $\alpha$ -トコフェロールを定量の対象とする。

### (1) 高速液体クロマトグラフ法

#### ① 装置及び器具

- ・高速液体クロマトグラフ（HPLC）：蛍光検出器付き
- ・カラム：順相型（シリカゲルを充てんしたカラム）

#### ② 試薬

- ・標準ビタミンE：日本薬局方標準品「 $\alpha$ -トコフェロール」又は同等品を用いる。
- ・ヘキサン-酢酸エチル混液：ヘキサン-酢酸エチル（9：1）
- ・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

#### ③ 試験溶液の調製

##### 1) 一般食品の場合

試料約 0.5 g を 60 mL 容の遠心管に精密に量り取る (W g)。これに 1 w/v%塩化ナトリウム溶液 0.5 mL を加えてかくはん後、3 w/v%ピロガロール-エタノール溶液 10 mL 及び 60 w/v%水酸化カリウム溶液 1 mL を加え、70 °C で 30 分間けん化する。速やかに冷却後、1 w/v%塩化ナトリウム溶液を 22.5 mL 及びヘキサン-酢酸エチル混液 15 mL を加え、栓をして 5 分間激しく振とうし、不けん化物を抽出する。2,000 回転/分で 5 分間遠心分離し、上層をナス形フラスコに移す。下層はヘキサン-酢酸エチル混液 15 mL でさらに 2 回同様に抽出する。得られた上層を集め、減圧濃縮後、一定量のヘキサンに溶解し (V mL)、必要に応じてヘキサンで適宜希釈して (希釈倍数：D)、試験溶液とする。

##### 2) 油脂の場合

試料が油脂の場合は、1) のけん化操作を省き HPLC に直接注入することができる。この場合、油脂約 1 g を精密に量り取り (W g)、一定量のヘキサンに溶解・定容 (V mL) し、必要に応じてヘキサンで適宜希釈して (希釈倍数：D)、試験溶液とする。

#### ④ 標準溶液の調製

##### 1) 標準原液

α-トコフェロール 20 mg を褐色全量フラスコに精密に量り、エタノールで溶解して正確に 50 mL とする。冷蔵保存し、6 か月ごとに調製する。

## 2) HPLC 用標準溶液

一定量の α-トコフェロール標準原液を褐色ナス形フラスコ又は褐色全量フラスコに正確に量り、溶媒を濃縮乾固又は窒素気流下で留去した後、ヘキサンに溶解する。全量フラスコを用いて正確に希釈し、HPLC 用標準溶液とする。冷蔵保存し、1 か月ごとに調製する。

## ⑤ 測定

試験溶液の一定量（5～50 μL）を HPLC に注入し、試料中の α-トコフェロールのピーク面積を測定する。同様に HPLC 用標準溶液を HPLC に注入し、ピーク面積から α-トコフェロールの検量線を作成する。検量線から試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求め、試料中のビタミン E 含量を求める。

<高速液体クロマトグラフ操作条件例<sup>注1)</sup>>

カラム：JASCO Finepak SIL 5（日本分光製）又は相当品、内径 4.6 mm、長さ 250 mm、ステンレス製

移動相：酢酸-イソプロピルアルコール-ヘキサン（5:6:1000）

検出器：励起波長（Ex）298 nm

蛍光波長（Em）325 nm

流量：1.2 mL/分

温度：40 °C

## ⑥ 計算

$$\text{試料中のビタミン E 含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めた α-トコフェロールの濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

[注]

- 1) その他のカラム充填剤と移動相の他の条件は文献 1)、2) 等を参照のこと。

[参考文献]

- 1) 日本ビタミン学会編：ビタミンハンドブック③（ビタミン分析法），p.27（1989），化学同人
- 2) 五十嵐脩編：ビタミン E—基礎と臨床—，p.14（1985），医歯薬出版

## 33 ビタミン K

食品中のビタミン K は、フィロキノン（ビタミン K<sub>1</sub>）及びメナキノン-4 及びメナキノン-7（ビタミン K<sub>2</sub>）を定量の対象とする。

メナキノン-7 については、メナキノン-4 相当量に換算し、ビタミン K 総量を求

める。

メナキノ-4 相当量 ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

$$= 0.6852 \times \text{メナキノ-7 含量} (\mu\text{g}/100\text{ g})$$

0.6852: メナキノ-4 の分子量 (444.7) をメナキノ-7 の分子量 (649.0) で除した係数。

(1) 高速液体クロマトグラフ法

① 装置及び器具<sup>注1)</sup>

- ・高速液体クロマトグラフ: 蛍光検出器付き
- ・カラム: 逆相型 (オクタデシルシリル基を結合させたシリカゲルを充てんしたカラム)
- ・還元カラム: 白金黒<sup>注2)</sup>

② 試薬

- ・メタノール、エタノール: 高速液体クロマトグラフィー用
- ・ビタミン K<sub>1</sub> (フィロキノ)、ビタミン K<sub>2</sub> (メナキノ-4、メナキノ-7) 標準品<sup>注3)</sup>
- ・その他の試薬は、特に指定のない限り特級を用いる。

③ 試験溶液の調製<sup>注4)</sup>

あらかじめ均質化した試料 0.1~1 g を遠沈管に精密に量り (W g)、50 v/v% 2-プロパノール水溶液及び n-ヘキサン各 10 mL を加え、室温にて 300 回/分で 10 分間振とう抽出する。室温にて 3,000 回転/分で 5 分間遠心分離した上層を分取する。残渣に n-ヘキサンのみを 10 mL 加え、計 3 回同様の振とう抽出、遠心操作を繰り返して上層を合わせ、溶媒を減圧濃縮する。残留物を 2-プロパノールを用いて定容し (V mL)、必要に応じて 2-プロパノールで適宜希釈して (希釈倍数: D)、試験溶液とする。

④ 標準溶液の調製

標準品 10 mg を精密に量り 2-プロパノールに溶かし、正確に 100 mL とする。さらに、2-プロパノールで 1、2.5、10、25 及び 100 ng/mL となるように希釈する。

⑤ 測定

試験溶液 50  $\mu\text{L}$  を高速液体クロマトグラフに注入し、ビタミン K<sub>1</sub> 及びビタミン K<sub>2</sub> のピーク面積を測定する。あらかじめ標準溶液 50  $\mu\text{L}$  を高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線から、試料中のビタミン K<sub>1</sub> 及びビタミン K<sub>2</sub> 含量を求める。

<高速液体クロマトグラフ操作条件例>

分析カラム: Inertsil ODS-3 (GL Sciences 製) 又は相当品、粒子径 5  $\mu\text{m}$ 、  
内径 4.6 mm、長さ 150 mm、ステンレス管

還元カラム: RC-10 (Shiseido) あるいは相当品、内径 4.6 mm、長さ 15 mm、  
ステンレス管

移動相 1：メタノール:エタノール (95:5、メナキノン-4 及びフィロキノン)

移動相 2：メタノール:エタノール (50:50、メナキノン-7)

検出器：蛍光分光光度計

測定波長：励起波長 (Ex) 320 nm、蛍光波長 (Em) 430 nm <sup>注5)</sup>

流量：1.0 mL/分

温度：40 °C

## ⑥ 計算

$$\text{試料中のビタミンK}_1\text{又はK}_2\text{含量 (}\mu\text{g/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めた試験溶液中のビタミン K<sub>1</sub> 又はビタミン K<sub>2</sub> の濃度 (ng/mL)

V：定容量 (mL)

D：希釈倍数

W：試料採取量 (g)

### [注]

- 1) ビタミン K は、光により分解することから、操作時遮光器具を用いる。
- 2) 内径 4.6 mm、長さ 15 mm。市販品がある (例、Shiseido 製)。分離カラムと検出器の間に接続する。カラムは、使用により劣化することから、標準品の使用をもって効力を確認する。
- 3) ビタミン K<sub>1</sub> 及び K<sub>2</sub> は、高速液体クロマトグラフ用標準品 (和光純薬製) 又はこれらの相当品を用いる。
- 4) 極性成分を多く含み、測定対象物が定量できない場合、シリカゲル固相抽出カートリッジ (Sep-pak silica cartridge、waters 等) を用いて夾雑物を除去する。
- 5) 一部夾雑物の影響により精確に測定できないものがある。その際は、Ex= 240 nm、Em= 430 nm を使用する。

### [参考文献]

- 1) 佐藤孝義、八尋政利、下田幸三、浅居良輝、浜本典男：日本栄養・食糧学会誌, 38, 451 (1985)
- 2) 小高要、氏家隆、上野順士、斎藤実：日本栄養・食糧学会誌, 39, 124 (1986)
- 3) 坂野俊行、野津本茂、長岡忠義、森本厚、藤本恭子、増田佐智子、鈴木由希子、平内三政：ビタミン, 62, 393 (1988)
- 4) Kamao et al.: J Nutr Sci Vitaminol, 53, 464 (2007)
- 5) Usui et al.: J Chromatogr A 935(1-2), 3, (2001)

## 34 葉酸

### (1) 微生物学的定量法



① 装置及び器具

- ・分光光度計

② 試薬

- ・0.1 mol/L リン酸緩衝液：リン酸二水素カリウム（特級）13.61 g、水酸化ナトリウム（特級）5.30 g、アスコルビン酸（特級）20 g を水 1 L に加えて pH6.1 に調整する。
- ・葉酸標準溶液：葉酸（日本薬局方標準品）100 mg を 0.01 mol/L 水酸化ナトリウム 25 v/v%エタノール溶液に溶かし、0.1 mol/L 塩酸（特級）で pH7.0 ~8.0 に調整後 25 v/v%エタノール溶液で 100 mL とする。さらに、0.1 mol/L リン酸緩衝液で希釈し 2 ng/ml の濃度に調製する。
- ・酵素溶液：トリ胨臓凍結乾燥末<sup>注1)</sup> に水 100 mL を加え、10 分間かくはん後、遠心分離する。その上澄み液に 10 g の Dowex 1-X8 (Cl<sup>-</sup>) を加え冷所で 1 時間かくはんする。その後遠心分離した上澄み液を酵素溶液とする。
- ・使用菌株：*Lactobacillus rhamnosus*<sup>注2)</sup> ATCC 7469 (NBRC 3425)
- ・葉酸測定用培地（1 L 中、pH6.8±0.1）

カザミノ酸	10 g
ブドウ糖	40 g
L-アスパラギン	600 mg
塩酸ピリドキシン	4 mg
L-システイン塩酸塩	500 mg
硫酸アデニン	10 mg
リン酸一水素カリウム	1 g
硫酸マグネシウム	400 mg
酢酸ナトリウム	40 g
硫酸第一鉄	20 mg
硫酸マンガン	15 mg
ポリソルベート 80	100 mg
ニコチン酸	800 µg
パラアミノ安息香酸	2 mg
パントテン酸カルシウム	800 µg
グルタチオン	5 mg
L-トリプトファン	200 mg
塩酸グアニン	10 mg
ウラシル	10 mg
キサントシン	20 mg
リボフラビン	1 mg
塩酸チアミン	400 µg
ビオチン	20 µg
リン酸二水素カリウム	1 g

- |                            |        |
|----------------------------|--------|
| 塩化ナトリウム                    | 20 mg  |
| ・乳酸菌保存用培地（1 L 中、pH6.8±0.1） |        |
| 酵母エキス                      | 5.5 g  |
| ブドウ糖                       | 11.0 g |
| 硫酸第一鉄                      | 5.0 mg |
| 酢酸ナトリウム                    | 10.0 g |
| 硫酸マンガン                     | 5.0 mg |
| ペプトン                       | 12.5 g |
| リン酸二水素カリウム                 | 0.25 g |
| リン酸一水素カリウム                 | 0.25 g |
| 硫酸マグネシウム                   | 0.1 g  |
| 粉末寒天                       | 20.0 g |
- ・前培養培地：上記培地より粉末寒天を除く。
- 各培地はそれぞれ調製されたものが市販されている<sup>注3)</sup>

### ③ 接種菌液の調製

*Lactobacillus rhamnosus* 保存菌株を前培養培地に接種し、37 °Cで 20 時間程度培養する。この菌浮遊溶液を遠心分離し、滅菌生理食塩水で 2 回洗浄する。洗浄後、600 nm における透過率 80~90 %となるように滅菌生理食塩水で希釈し、接種菌液とする。

### ④ 試験溶液の調製<sup>注4)</sup>

試料 2 g を精密に量り (W g)、0.1 mol/L リン酸緩衝液 50 mL を加え、121 °C で 15 分間オートクレーブ処理を行う。冷却後、0.1 mol/L リン酸緩衝液で 100 mL に定容し (V<sub>1</sub> mL)、遠心分離する。上澄み液 25 mL を正確に量り (V<sub>2</sub> mL)、酵素溶液 5 ml を加えて 37 °C の恒温水槽で 2 時間酵素処理を行う。その後 121 °C で 15 分間オートクレーブ処理を行い酵素反応を止める。冷却後、0.1 mol/L リン酸緩衝液で 50 mL に定容し、ろ過する (V<sub>3</sub> mL)。さらに溶液 1 mL 中に葉酸を 0.5~1.0 ng 含むように 0.1 mol/L リン酸緩衝液で希釈し (希釈倍数 : D)、試験溶液とする。

### ⑤ 測定<sup>注4)</sup>

試験管 2 本ずつに試験溶液 0.5、1 及び 2 mL を正確に加え、次に各試験管に測定用培地 2.5 mL 及び水を加えて全量を 5 mL とする。別に検量線作成のため、葉酸標準溶液 (0~3 ng 相当量) を試験管 2 本ずつに正確に取り、それぞれに測定用培地 2.5 mL 及び 0.1 mol/L リン酸緩衝液を加えて全量を 5 mL とする。121 °C で 5 分間オートクレーブ処理を行い、冷却後、各試験管に接種菌液 1 滴 (約 30 µL) ずつを無菌的に接種し、37 °C で 19 時間程度恒温槽又は恒温水槽に入れて培養する。

培養後、600 nm の濁度を用いて測定する<sup>注5)</sup>。標準溶液の濁度より検量線を作成し、これに試験溶液より得られた濁度を照合して、試験溶液中の葉酸の濃度 (ng/mL) を求め、試料中の葉酸含量を算出する。

⑥ 計算

$$\text{試料中の葉酸含量 } (\mu\text{g}/100 \text{ g}) = \frac{C \times V_1 \times D \times V_3}{V_2 \times W \times 10}$$

C：検量線から求めた葉酸の濃度 (ng/mL)

V<sub>1</sub>～V<sub>3</sub>：定容量 (mL) 又は分取量 (mL)

D：希釈倍数

W：試料採取量 (g)

[注]

- 1) 酵素溶液には、Kidney acetone powder porcine、Type II (Sigma) を用いてもよい。
- 2) 旧名称は *Lactobacillus casei* である。
- 3) FOLIC ACID CASEI MEDIUM：Becton, Dickinson and Company  
 一般乳酸菌保存検出用培地「ニッサイ」：日水製薬  
 一般乳酸菌接種用培地「ニッサイ」：日水製薬
- 4) 葉酸含量の高い食品については、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で振とう抽出し、ろ過して得られたものを試験溶液とすることもできる。又は、紫外部検出器付き高速液体クロマトグラフで定量することもできるが、食品表示基準における分析方法は、微生物学的定量法とする。

高速液体クロマトグラフ操作条件例

測定波長	280 nm
カラム	TSK gel ODS-80 Ts (東ソー製)
移動相	0.003 mol/L テトラブチルアンモニウムブロマイド含有 0.005 mol/L 酢酸ナトリウム (pH6.5) :アセトニトリル (4:1)
流量	2.0 mL/分

- 5) マイクロプレートを使用し、マイクロプレートリーダー (例えば、日本モレキュラーデバイス社製、スペクトラ MAX 型等) で濁度を測定することもできる。

### 35 熱量

(1) 修正アトウォーター法

熱量の算出は、定量したたんぱく質、脂質及び炭水化物の量にそれぞれ次の係数を乗じたものの総和とする<sup>注1)</sup>。

- ① たんぱく質 4 kcal/g
- ② 脂質 9 kcal/g
- ③ 炭水化物 4 kcal/g

また、糖質と食物繊維の含量を記載している場合にあつては、熱量の算出に当たっては糖質と食物繊維の総和を用いて計算すること。

この場合、糖質については③の係数を用いて計算すること。ただし、アルコール<sup>注2)</sup>については、7 kcal/g を、有機酸<sup>注3)</sup>については、3 kcal/g を、難消化性糖質については、難消化性糖質エネルギー係数を用いる。また、食物繊維については（6）によるエネルギー換算係数を用いて算出すること。

[注]

- 1) きくいも、こんにゃく、藻類及びきのこ類の熱量に当たっては、アトウォーター係数による総エネルギー値に0.5を乗じて算出すること。
- 2) アルコールについては、浮ひょう法、振動式密度計法、ガスクロマトグラフ法又は酸化法により定量すること。
- 3) 有機酸については、高速液体クロマトグラフ法により定量すること。

## (2) アルコール<sup>注1)</sup>

酒類では一般に、浮ひょう法、振動式密度計法又はガスクロマトグラフ法を用い、アルコール分が2度以下の場合には振動式密度計法、ガスクロマトグラフ法又は酸化法を用いる。その他の加工食品ではガスクロマトグラフ法又は酸化法が用いられる<sup>注2)</sup>。

[注]

- 1) 酒税法ではアルコール分とは温度15℃において原容量の100分中に含有するエチルアルコールの容量（体積百分率）をいう。

酒類のアルコール分の定量法は、国税庁所定分析法に詳細が厳密に規定されているので参考にすること。

栄養表示基準においてはエチルアルコールのエネルギー換算係数は7 kcal/g となっているので、得られるアルコール分を比重等により補正し、試料の体積当たり又は質量当たりのエチルアルコールの質量を求める。

- 2) ここに示した浮ひょう法、振動式密度計法、ガスクロマトグラフ法及び酸化法の他に有用な方法として酵素法がある。これは、酵素反応系を用い、生成するアルデヒドや NADH の量を測定することでエタノールを特異的に定量するものである。

アルコール脱水素酵素は、四級以上の脂肪族アルコールにも作用するため、これらを含む食品への上記反応系の適用は避けねばならない。なお、エタノール定量用の酵素法をキット化した製品も市販されている。

### 1) 浮ひょう法

#### ① 適用される食品

アルコール分が2度以上の酒類に適用される。

#### ② 装置及び器具

- ・酒精度浮ひょう
- ・アルコール分定量用蒸留装置

③ 測定

15℃で試料を100 mL 容全量フラスコの画線まで取り、これを約300～500 mL 容フラスコに移し、この全量フラスコを毎回15 mL 内外の水で2回洗い洗液をフラスコ内に合併し、冷却器に連結し、その全量フラスコを受器とし蒸留する。留液が約70 mL (所要時間は約20分) に達したとき蒸留を止め、水を加えて15℃において画線まで満し、よくふり混ぜてシリンダーに移した後、15℃において酒精度浮ひょうを用いてその示度を読み、アルコール分の度数とする。

2) 振動式密度計法

① 適用される食品

酒類に適用される。

② 装置及び器具

- ・振動式密度計
- ・アルコール分定量用蒸留装置

③ 測定

15℃で試料を100 mL 容全量フラスコの画線まで取り、これを約300～500 mL 容フラスコに移し、この全量フラスコを毎回15 mL 内外の水で2回洗い洗液をフラスコ内に合併し、冷却器に連結し、その全量フラスコを受器とし蒸留する。留液が約70 mL (所要時間は約20分) に達したとき蒸留を止め、水を加えて15℃において画線まで満し、よくふり混ぜてシリンダーに移した後、振動式密度計を用いて15℃における密度を測定し、アルコール分の度数に換算する。

3) ガスクロマトグラフ法<sup>注1)</sup>

① 適用される食品

酒類及びその他の加工食品に適用される。

② 装置及び器具

- ・ガスクロマトグラフ：水素炎イオン化検出器付き

③ 試薬

- ・エチルアルコール標準溶液：エチルアルコール（特級）を水で希釈し、20 v/v%溶液とする。
- ・アセトン溶液：アセトン（特級）を水で希釈し、1 v/v 溶液とする。

④ 測定及び計算

15℃において、エチルアルコール標準溶液0.5 mL にアセトン溶液10 mL を加えてよく混合し、この1～2 μL をガスクロマトグラフに注入し、得られるアセトンとエチルアルコールのピーク面積から次式により補正係数(F)

を算出する。

$$F = \frac{\text{アセトンのピーク面積}}{\text{エチルアルコールのピーク面積}}$$

次に、試料 0.5 mL にアセトン溶液 10 mL を加え同様に処理して得られるアセトンとエチルアルコールのピーク面積から、次式により試料中のアルコール分を求める。

$$\text{アルコール分 (度)} = F \times \frac{\text{エチルアルコールのピーク面積}}{\text{アセトンのピーク面積}} \times 20$$

<ガスクロマトグラフ操作条件例>

カラム:内径 3 mm、長さ 2 m, 固定相 ポリエチレングリコール 1000 (10%、60~80 メッシュ)

注入口温度: 150~200 °C

カラム温度: 100 °C

ガス流量: 窒素、30~40 mL/分

[注]

1) 加工食品の場合は、試料に水を加えて蒸留後ガスクロマトグラフ法を用いて定量することができる。その際、試料及び標準溶液用エチルアルコールを質量で量りとれば質量百分率の定量結果が得られる。

#### 4) 酸化法 1 <sup>注1)</sup>

##### ① 適用される食品

アルコール分が 2 度以下の酒類に適用される。

##### ② 装置及び器具

- ・アルコール分定量用蒸留装置

##### ③ 試薬

- ・重クロム酸カリウム溶液: 重クロム酸カリウム (特級) 33.816 g を水に溶かして 1 L とする。
- ・濃硫酸
- ・85%リン酸
- ・指示薬: ジフェニルアミンスルホン酸バリウム 0.5 g に水を加えて 100 mL とし、上澄み液を使用する。
- ・硫酸第一鉄アンモニウム溶液: 硫酸第一鉄アンモニウム[(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>・FeSO<sub>4</sub>・6H<sub>2</sub>O] 135.1 g を濃硫酸 20 mL と水に溶かして 1 L とする。

##### ④ 測定

試料を 100 mL 容全量フラスコの画線まで取り (V<sub>1</sub> mL)、これを約 300~500 mL 容フラスコに移し、この全量フラスコを毎回 15 mL 内外の水で 2 回洗い洗液をフラスコ内に合併し、冷却器に連結し蒸留する。留液が約 70 mL

(所要時間は約 20 分) に達したとき蒸留を止め、水を加えてアルコール分が 2 度以下になるように留液を調製する ( $V_2$  mL)。300 mL 容三角フラスコに重クロム酸カリウム溶液 10 mL、濃硫酸 5 mL を入れ、これに調製した留液 5 mL を正確に加え、静かに混合密栓して 15 分間放置する。次に水 165 mL、リン酸 18 mL、指示薬 0.5 mL を加え、硫酸第一鉄アンモニウム溶液で青紫色が緑色になるまで滴定し、その滴定値を  $n$  mL とする。

水 5 mL を同様に処理して得た滴定値を  $N$  mL とすれば、アルコール分は次式により求められる。

$$\text{アルコール分 (度)} = 2 \times \left(1 - \frac{n}{N}\right) \times \frac{V_2}{V_1}$$

[注]

1) 本法の原理は硫酸酸性で過剰の一定濃度の重クロム酸カリウムを加えてエチルアルコールを酢酸に酸化し、残余の重クロム酸カリウムに一定濃度の硫酸第一鉄アンモニウム溶液を加えて還元し、消費した硫酸第一鉄アンモニウムの量から試料中のエチルアルコール含量を求めるものである。

クロムを含む試薬を使用するので、その取扱いには十分な注意が必要である。

5) 酸化法 2<sup>注1)</sup>

① 適用される食品

酒類及びその他の加工食品に適用される。

② 装置及び器具

- ・水蒸気蒸留装置

③ 試薬

- ・沈降炭酸カルシウム

- ・1/30 mol/L 重クロム酸カリウム溶液：重クロム酸カリウム（特級）を粉末とし、150 °C で乾燥し、デシケーターに入れて冷却後、約 9.8 g を精密に量り、水に溶解して正確に 1 L とする。

1/30 mol/L 重クロム酸カリウムのファクター F は次式により計算する。

$$F = \frac{\text{重クロム酸カリウムの採取量 (g)}}{9.807}$$

- ・濃硫酸：特級

- ・8 w/v% ヨウ化カリウム溶液：ヨウ化カリウム 8 g を水に溶かして 1 L とし、褐色瓶に貯える。これにチオ硫酸ナトリウム溶液 1 ~ 2 滴を加えておく。

- ・1/10 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液：チオ硫酸ナトリウム 25 g を量り、水に溶かして 1 L とし、褐色瓶に貯える。

この溶液は保存中にファクターが変化するので、滴定の都度、次のようにファクターを検定する必要がある。

1/30 mol/L 重クロム酸カリウム溶液 10 mL を正確に量り、濃硫酸 10 mL を加え、静かに振りまぜる。

このとき発熱するから静かに取り扱う。1 時間放置した後、水 100 mL と 8 w/v% ヨウ化カリウム溶液 6.5 mL を加え、手早く 1/10 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定する。終点に近くなると遊離するヨウ素の茶褐色が薄くなる。このようになってから指示薬として、1% でんぷん溶液を約 1 mL 加え、ヨウ素でんぷんの紫色が消滅するまで滴定する。

1/10 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液のファクター F' は次式により計算する。

$$F' = \frac{10 \times 2 \times F}{1/10 \text{ mol/L チオ硫酸ナトリウムの滴定量 (mL)}}$$

F : 1/30 mol/L 重クロム酸カリウム溶液のファクター

・指示薬 : 可溶性でんぷん 1 g を水 100 mL で加熱溶解し、ろ紙でろ過する。

#### ④ 測定

試料 10 mL を正確に量り (S mL)、炭酸カルシウム 1 g 及び水 100 mL を加えて水蒸気蒸留する。蒸留の速度は 15 分間で約 100 mL 程度の留液を得る。水を加えて 100 mL の定容とする。留液 10 mL を正確に量り、1/30 mol/L 重クロム酸カリウム 10 mL を正確に加え (K mL)、さらに濃硫酸 10 mL を静かに加える<sup>注2)</sup>。1 時間静置し、反応を完結させた後、栓をとり、水 100 mL を加える。これにヨウ化カリウム溶液 6.5 mL を添加し、遊離するヨウ素を速やかに 1/10 mol/L チオ硫酸ナトリウムで滴定し (H mL)、次式により試料中のアルコール分を算出する。

1/30 mol/L 重クロム酸カリウム溶液 1 mL に対応するアルコールは 0.0023 g である。

$$\text{アルコール分 (g/100 mL)} = \frac{\left(K \times F - \frac{H}{2} \times F'\right) \times 0.0023}{S} \times 100$$

K : 1/30 mol/L 重クロム酸カリウム溶液の採取量 (mL)

F : 1/30 mol/L 重クロム酸カリウム溶液のファクター

H : 1/10 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液の滴定量 (mL)

F' : 1/10 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液のファクター

S : 試料の採取量 (mL)

#### [注]

- 1) 本法は、アルコール分を容量当たりの質量で求めている。操作の詳細は参考文献 2 を参考にした。本法の原理をみそ等の加工食品に応用する場合 (参考文献 3) は、試料の適量を質量で量って試験することにより、アルコール分の質量百分率を求めることができる。



- 2) このとき発熱するので注意しながら静かに混合し、軽く混合する。また、反応液が緑褐色にとどまればよいが、褐色味のない青緑色となるような場合は、留液の採取量を 5 mL とし、1/30 mol/L 重クロム酸カリウム 10 mL、濃硫酸 10 mL を加える。

[参考文献]

- 1) 西谷尚道監修、注解編集委員会：“第 4 回改正国税庁所定分析法注解”、財団法人日本醸造協会（1993）
- 2) 財団法人日本醤油研究所 しょうゆ試験法編集委員会：“しょうゆ試験法”、醬協通信社（1985）
- 3) 全国味噌技術会：“改訂 基準味噌分析法”昌平堂印刷（1975）

(3) 飽和脂肪酸の熱量

飽和脂肪酸の熱量を算定する必要がある場合として、飽和脂肪酸の「低い旨」の表示の妥当性を判断する場合、コレステロールの「含まない旨」、「低い旨」あるいは「低減された旨」の表示の妥当性を判断する場合等がある。

各飽和脂肪酸の量を合計し、係数 1.05 を乗じてトリグリセライド量に換算する。得られたトリグリセライド量 (g) にエネルギー換算係数 9 kcal/g を乗じて飽和脂肪酸の熱量 (kcal) とする。

(4) 有機酸<sup>注1)</sup>

1) 高速液体クロマトグラフ法<sup>注2)</sup>

① 適用される食品

食酢中の酢酸の定量、又は比較的高含量のクエン酸を含む果汁等の定量に適用される。

② 装置及び器具

- ・高速液体クロマトグラフ：紫外分光光度計付き
- ・カラム：イオン排除、サイズ分離、分配・吸着の混合分離型・水

③ 試薬

- ・クエン酸三ナトリウム二水和物：特級
- ・酢酸ナトリウム（無水）：特級
- ・60%過塩素酸：特級

④ 試験溶液の調製

試料 5 g を全量フラスコに精密に量り (W g)、5%過塩素酸 5 mL を加え、水で 50 mL に定容する (V mL)。これを必要に応じて検量線の範囲内に入るように水で希釈したものを試験溶液とする (希釈倍数：D)。

⑤ 標準溶液の調製

酢酸ナトリウム（無水）0.2732 g とクエン酸三ナトリウム二水和物 0.3062 g を正確に量り、水で 200 mL 定容とする。この液 5、10 及び 25 mL を正確に量り、水で 50 mL に定容する。これらの液は 100、200 及び 500 µg/mL 濃

度に相当する（冷蔵保存、6か月ごとに調製する）。

⑥ 測定

試験溶液及び標準溶液各一定量（例えば 20 μL）を高速液体クロマトグラフに注入し、ピーク高さを測定する。検量線から得た回帰式に代入して濃度（C μg/mL）を求めた後、試料中含量を算出する。

<高速液体クロマトグラフ操作条件例<sup>注3)</sup>>

カラム：内径 8.0 mm、長さ 500 mm、ステンレス製

移動相：3 mmol/L 過塩素酸

流量：1.0 mL/分

測定波長：220 nm

温度：40 °C

⑦ 計算

$$\text{試料中の酢酸（クエン酸）含量 (g/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10,000}$$

C：検量線から求めた試験溶液の酢酸（クエン酸）濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

[注]

1) ここでは高速液体クロマトグラフ法による酢酸及びクエン酸の定量法を解説する。

2) 油脂を多く含むドレッシング類には、以下の方法で高速液体クロマトグラフ用の試験溶液を調製することが勧められる。

すなわち、試料 20 g を共栓付き三角フラスコに量り、水分の全量が 100 mL となるように水を加えた後、よく振とう混合する。遠心分離（3,000 回転/分、10 分間）後、傾斜法ないし駒込ピペットを用いて水層を分液漏斗に移す。この水層部にヘキサン（特級）50 mL を加えて静かに振とう後、静置して得た水層部を試験溶液とする。

\* 適当な一定量の水を加え、別途求めた試料の水分含量値を用いて水層量を補正し、定容量としてもよい。

3) プレカラム RSpak C-810P をセットにした Shodex RSpak C-811（昭和電工(株)製）、又は同等品を用いる。恒温槽のサイズが小さい場合は、Shodex RSpak KC-811（内径 8.0 mm、長さ 300 mm）（昭和電工(株)製）がある。ピーク形状、分離程度を調べ、必要があればカラム温度を変えるか、異なるカラムを用いた分離条件等を設定する必要がある。

(5) 難消化性糖質のエネルギー換算係数

次表のとおり。

難消化性糖質のエネルギー換算係数

難消化性糖質	エネルギー換算係数 (kcal/g)
エリスリトール スクラロース	0
ソルボース マンニトール ガラクトピラノシル (β1-3) グルコピラノース ガラクトピラノシル (β1-6) グルコピラノース ラクチュロース イソマルチトール パラチニット マルチトール ラクチトール ガラクトピラノシル (β1-6) ガラクトピラノシル (β1-4) グルコピラノース ガラクトピラノシル (β1-3) ガラクトピラノシル (β1-4) グルコピラノース ガラクトシルスクロース (別名 ラクトスクロ ース) ガラクトシルラクトース キシロトリオース ケストース ラフィノース マルトトリイトール キシロビオース ゲンチオトリオース ゲンチオビオース スタキオース ニストース ゲンチオテトラオース フラクトフラノシルニストース α-サイクロデキストリン β-サイクロデキストリン マルトシル β-サイクロデキストリン	2
ソルビトール テアンデオリゴ マルトテトライトール キシリトール	3

(6) 食物繊維のエネルギー換算係数

糖質及び食物繊維をもって栄養成分表示を行う場合の食物繊維の熱量換算に当たっては、①に記載のある食物繊維素材については①によることとし、①に記載のない食物繊維素材については②によること。ただし、①又は②に該当しない素材については2 kcal/g とすること。

① 次表の左欄に掲げる食物繊維素材については、右欄のエネルギー換算係数を使用すること。

食物繊維素材名	エネルギー換算係数 (kcal/g)
寒天 キサントガム サイリウム種皮 ジュランガム セルロース 低分子アルギン酸ナトリウム ポリデキストロース	0
アラビアガム 難消化性デキストリン ビートファイバー	1
グァーガム (グァーフラワー、グァルガム) グァーガム酵素分解物 小麦胚芽 湿熱処理でんぷん (難消化性でんぷん) 水溶性大豆食物繊維 (WSSF) タマリンドシードガム プルラン	2

② 次に掲げる食物繊維のエネルギー換算係数の設定に関する考え方に従うこと。

- 1) 大腸に到達して完全にはっ酵されるものは2 kcal/g とする。
- 2) はっ酵分解を受けない食物繊維は、原則として0 kcal/g とする。
- 3) はっ酵分解率<sup>注1)</sup>が明らかな食物繊維については、以下による。  
はっ酵分解率が25%未満のもの0 kcal/g  
はっ酵分解率が25%以上、75%未満のもの：1 kcal/g  
はっ酵分解率が75%以上のもの：2 kcal/g

[注]

- 1) はっ酵分解率は人を用いた出納実験によって求めることができる。