

(別紙)

## 食品表示基準について（新旧対照表）

改正後（新）	改正前（旧）
<p>食品表示基準について（平成27年3月30日消食表第139号）</p> <p>（総則関係）（略）</p> <p>（加工食品）</p> <p>1 義務表示事項</p> <p>（1）～（4）（略）</p> <p>（5）栄養成分の量及び熱量</p> <p>①～③（略）</p> <p>④ 表示された含有量については、当該食品の期限内において、一定値をもって表示されている場合は、<u>食品表示基準別表第9第3欄に掲げる方法で得られた値が、その表示した一定値を基準とした同表第4欄に掲げる許容差の範囲内</u>、また、下限値及び上限値で表示されている場合は、その幅の中に含まれていなければならない。</p> <p>ただし、合理的な推定により得られた値を記載する場合は除く。</p> <p>⑤～⑪（略）</p> <p>（6）～（15）（略）</p> <p>2・3（略）</p> <p>4 任意表示</p> <p>（1）（略）</p> <p>（2）栄養成分の補給ができる旨及び栄養成分又は熱量の適切な摂取ができる旨</p> <p>①・②（略）</p> <p>③ 栄養成分又は熱量の適切な摂取ができる旨</p> <p>ア 含まない旨の表示（食品表示基準第7条の表の栄養成分又は熱量の適切な摂取ができる旨の項の1）とは、「無」、「ゼロ」、「ノン」その他これに類する表示をいうものであり、「不使用」、「無添加」は該当しないものであること。</p> <p>「ノンシュガー」、「シュガーレス」のような表示は、糖類に係る含まない旨の表示の基準が適用されるものであること。</p> <p>低い旨の表示（食品表示基準第7条の表の栄養成分又は熱量の適切な摂取ができる旨の項の2）とは、「低」、「ひかえめ」、「少」、「ライト」その他これに類する表示をいうものであること。</p> <p>適切な摂取ができる旨の表示の基準が適用される栄養成分及び熱量は、</p>	<p>食品表示基準について（平成27年3月30日消食表第139号）</p> <p>（総則関係）（略）</p> <p>（加工食品）</p> <p>1 義務表示事項</p> <p>（1）～（4）（略）</p> <p>（5）栄養成分の量及び熱量</p> <p>①～③（略）</p> <p>④ 表示された含有量については、当該食品の期限内において、一定値をもって表示されている場合は、許容差の範囲内、また、下限値及び上限値で表示されている場合は、その幅の中に含まれていなければならない。</p> <p>ただし、合理的な推定により得られた値を記載する場合は除く。</p> <p>⑤～⑪（略）</p> <p>（6）～（15）（略）</p> <p>2・3（略）</p> <p>4 任意表示</p> <p>（1）（略）</p> <p>（2）栄養成分の補給ができる旨及び栄養成分又は熱量の適切な摂取ができる旨</p> <p>①・②（略）</p> <p>③ 栄養成分又は熱量の適切な摂取ができる旨</p> <p>ア 含まない旨の表示（食品表示基準第7条の表の栄養成分又は熱量の適切な摂取ができる旨の項の1）とは、「無」、「ゼロ」、「ノン」その他これに類する表示をいうものであり、「不使用」、「無添加」は該当しないものであること。</p> <p>「ノンシュガー」、「シュガーレス」のような表示は、糖類に係る含まない旨の表示の基準が適用されるものであること。</p> <p>低い旨の表示（食品表示基準第7条の表の栄養成分又は熱量の適切な摂取ができる旨の項の2）とは、「低」、「ひかえめ」、「少」、「ライト」、<u>「ダイエット」</u>その他これに類する表示をいうものであること。</p> <p>適切な摂取ができる旨の表示の基準が適用される栄養成分及び熱量は、</p>

あくまで「国民の栄養摂取の状況からみてその過剰な摂取が国民の健康の保持増進を妨げている」（健康増進法第16条の2第2項第2号ロ）ものであって、そもそも栄養成分や熱量である以上、エネルギーを供給し、又は生命の維持・成長に必要な不可欠なものであり、本来、有害な成分でないことは当然であること。

イ～エ (略)

(3)～(4) (略)

5～7 (略)

(生鮮食品)～(添加物) (略)

(附則)

施行の際に加工食品の製造所又は加工所で製造過程にある加工食品（令和4年4月1日以降に販売予定であり、長期醸造されている酒類や果実酢等）については、令和4年4月1日以降もなお従前の例によることができるが、消費者への情報提供の観点から、可能な限り当該基準に基づく原料原産地表示を行うことが望ましい。

別添 添加物1-1 ～ 別添 添加物2-3 (略)

別添 栄養成分等の分析方法等

通則.....	1
1 (略)	
2 脂質.....	8
(1) <u>ゲルベル法</u> .....	8
(2) <u>溶媒抽出-重量法</u> .....	9
<u>1) エーテル抽出法</u> .....	9
<u>2) クロロホルム・メタノール混液抽出法</u> .....	12
<u>3) 酸分解法</u> .....	13
<u>4) レーゼゴットリーブ法</u> .....	15
<u>5) 酸・アンモニア分解法</u> .....	16
3 飽和脂肪酸及び不飽和脂肪酸.....	18
(1) ガスクロマトグラフ法.....	18
1) 脂質の抽出Ⅰ（けん化法）.....	19
2) 脂質の抽出Ⅱ（酸分解法）.....	20
3) 脂肪酸メチルエステルの調製.....	21

あくまで「国民の栄養摂取の状況からみてその過剰な摂取が国民の健康の保持増進を妨げている」（健康増進法第16条の2第2項第2号ロ）ものであって、そもそも栄養成分や熱量である以上、エネルギーを供給し、又は生命の維持・成長に必要な不可欠なものであり、本来、有害な成分でないことは当然であること。

イ～エ (略)

(3)～(4) (略)

5～7 (略)

(生鮮食品)～(添加物) (略)

(附則)

平成29年9月1日に施行した食品表示基準の経過措置期間は、令和4年3月31日までであるが、計画的に当該基準に基づく原料原産地表示に移行することが望ましい。また、施行の際に加工食品の製造所又は加工所で製造過程にある加工食品（令和4年4月1日以降に販売予定であり、長期醸造されている酒類や果実酢等）については、令和4年4月1日以降もなお従前の例によることができるが、消費者への情報提供の観点から、可能な限り当該基準に基づく原料原産地表示を行うことが望ましい。

別添 添加物1-1 ～ 別添 添加物2-3 (略)

別添 栄養成分等の分析方法等

通則.....	1
1 (略)	
2 脂質.....	6
(1) <u>エーテル抽出法</u> .....	7
(2) <u>クロロホルム・メタノール混液抽出法</u> .....	9
(3) <u>ゲルベル法</u> .....	10
(新設)	
(4) <u>酸分解法</u> .....	11
(5) <u>レーゼゴットリーブ法</u> .....	13
(新設)	
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.....	16

4) ガスクロマトグラフィー.....	<u>22</u>	4) ガスクロマトグラフィー.....	<u>17</u>
4 コレステロール.....	<u>24</u>	4 コレステロール.....	<u>19</u>
(1) ガスクロマトグラフ法.....	<u>24</u>	(1) ガスクロマトグラフ法.....	<u>19</u>
5 炭水化物.....	<u>27</u>	5 炭水化物.....	<u>22</u>
ア 灰分.....	<u>27</u>	ア 灰分.....	<u>22</u>
(1) 酢酸マグネシウム灰化法.....	<u>28</u>	(1) 酢酸マグネシウム添加灰化法.....	<u>22</u>
(2) 直接灰化法.....	<u>29</u>	(2) 直接灰化法.....	<u>23</u>
(3) 硫酸添加灰化法.....	<u>30</u>	(3) 硫酸添加灰化法.....	<u>25</u>
イ 水分.....	<u>31</u>	イ 水分.....	<u>26</u>
(1) カールフィッシャー法.....	<u>31</u>	(1) カールフィッシャー法.....	<u>26</u>
(2) 乾燥助剤法.....	<u>34</u>	(2) 乾燥助剤法.....	<u>29</u>
(3) 減圧加熱乾燥法.....	<u>35</u>	(3) 減圧加熱乾燥法.....	<u>30</u>
(4) 常圧加熱乾燥法.....	<u>36</u>	(4) 常圧加熱乾燥法.....	<u>31</u>
(5) プラスチックフィルム法.....	<u>38</u>	(5) プラスチックフィルム法.....	<u>33</u>
6 糖質.....	<u>39</u>	6 糖質.....	<u>34</u>
7 糖類.....	<u>39</u>	7 糖類.....	<u>34</u>
(1) ガスクロマトグラフ法.....	<u>40</u>	(1) ガスクロマトグラフ法.....	<u>35</u>
(2) 高速液体クロマトグラフ法.....	<u>42</u>	(2) 高速液体クロマトグラフ法.....	<u>37</u>
<u>(削除)</u>		<u>1) 単糖類、二糖類及びオリゴ糖類.....</u>	<u>37</u>
<u>(削除)</u>		<u>2) 糖アルコール類.....</u>	<u>40</u>
8 食物繊維.....	<u>45</u>	8 食物繊維.....	<u>42</u>
(1) プロスキー法 (酵素-重量法).....	<u>45</u>	(1) プロスキー法 (酵素-重量法).....	<u>43</u>
(2) 高速液体クロマトグラフ法 (酵素-HPLC法).....	<u>49</u>	(2) 高速液体クロマトグラフ法 (酵素-HPLC法).....	<u>47</u>
9 亜鉛.....	<u>53</u>	9 亜鉛.....	<u>50</u>
(1) 原子吸光光度法.....	<u>53</u>	(1) 原子吸光光度法.....	<u>51</u>
(2) キレート抽出-原子吸光光度法.....	<u>54</u>	(2) キレート抽出-原子吸光光度法.....	<u>51</u>
(3) 誘導結合プラズマ発光分析法.....	<u>56</u>	(3) 誘導結合プラズマ発光分析法.....	<u>53</u>
10 カリウム.....	<u>57</u>	10 カリウム.....	<u>54</u>
(1) 原子吸光光度法 (灰化法).....	<u>57</u>	(1) 原子吸光光度法 (灰化法).....	<u>54</u>
(2) 原子吸光光度法 (塩酸抽出法).....	<u>58</u>	(2) 原子吸光光度法 (塩酸抽出法).....	<u>55</u>
(3) 誘導結合プラズマ発光分析法.....	<u>59</u>	(3) 誘導結合プラズマ発光分析法.....	<u>55</u>
11 カルシウム.....	<u>60</u>	11 カルシウム.....	<u>57</u>
(1) 過マンガン酸カリウム容量法.....	<u>60</u>	(1) 過マンガン酸カリウム容量法.....	<u>57</u>
(2) 原子吸光光度法.....	<u>61</u>	(2) 原子吸光光度法.....	<u>58</u>
(3) 誘導結合プラズマ発光分析法.....	<u>62</u>	(3) 誘導結合プラズマ発光分析法.....	<u>59</u>
12 クロム.....	<u>64</u>	12 クロム.....	<u>60</u>
(1) キレート抽出-原子吸光光度法.....	<u>64</u>	(1) キレート抽出-原子吸光光度法.....	<u>60</u>
(2) 誘導結合プラズマ発光分析法.....	<u>65</u>	(2) 誘導結合プラズマ発光分析法.....	<u>62</u>
<u>(3) 誘導結合プラズマ質量分析法.....</u>	<u>67</u>	<u>(新設)</u>	
13 セレン.....	<u>69</u>	13 セレン.....	<u>63</u>

(1) 蛍光光度法.....	69	(1) 蛍光光度法.....	63
(2) 水素化物 - 原子吸光光度法.....	70	(2) 水素化物 - 原子吸光光度法.....	65
<u>(3) 誘導結合プラズマ質量分析法.....</u>	<u>71</u>	<u>(新設)</u>	
14 鉄.....	74	14 鉄.....	66
(1) オルトフェナントロリン吸光光度法.....	74	(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.....	75	(2) 原子吸光光度法.....	67
(3) 誘導結合プラズマ発光分析法.....	76	(3) 誘導結合プラズマ発光分析法.....	68
15 銅.....	77	15 銅.....	69
(1) 原子吸光光度法.....	77	(1) 原子吸光光度法.....	69
(2) キレート抽出-原子吸光光度法.....	78	(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.....	80	(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).....	81	16 ナトリウム(食塩相当量).....	72
(1) 原子吸光光度法(灰化法).....	81	(1) 原子吸光光度法(灰化法).....	72
(2) 原子吸光光度法(塩酸抽出法).....	82	(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.....	83	(3) 誘導結合プラズマ発光分析法.....	74
17 マグネシウム.....	84	17 マグネシウム.....	75
(1) 原子吸光光度法.....	84	(1) 原子吸光光度法.....	75
(2) 誘導結合プラズマ発光分析法.....	85	(2) 誘導結合プラズマ発光分析法.....	76
18 マンガン.....	87	18 マンガン.....	77
(1) 原子吸光光度法.....	87	(1) 原子吸光光度法.....	77
(2) キレート抽出-原子吸光光度法.....	88	(2) キレート抽出-原子吸光光度法.....	78
(3) 誘導結合プラズマ発光分析法.....	89	(3) 誘導結合プラズマ発光分析法.....	80
19 モリブデン.....	90	19 モリブデン.....	81
(1) 誘導結合プラズマ質量分析法.....	90	(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.....	92	(2) 誘導結合プラズマ発光分析法.....	83
20 ヨウ素.....	95	20 ヨウ素.....	85
(1) 滴定法.....	95	(1) 滴定法.....	85
(2) ガスクロマトグラフ法.....	96	(2) ガスクロマトグラフ法.....	86
<u>(3) 誘導結合プラズマ質量分析法.....</u>	<u>97</u>	<u>(新設)</u>	
21 リン.....	99	21 リン.....	87
(1) バナドモリブデン酸吸光光度法.....	99	(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.....	100	(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.....	102	(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).....	103	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.....	104	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.....	104	(1) 高速液体クロマトグラフ法.....	92
(2) 微生物学的定量法.....	105	(2) 微生物学的定量法.....	93
イ トリプトファン.....	107	イ トリプトファン.....	95
(1) 高速液体クロマトグラフ法.....	107	(1) 高速液体クロマトグラフ法.....	95
23 パントテン酸.....	108	23 パントテン酸.....	96

(1) 微生物学的定量法.....	<a href="#">108</a>	(1) 微生物学的定量法.....	<a href="#">96</a>
24 ビオチン.....	<a href="#">112</a>	24 ビオチン.....	<a href="#">100</a>
(1) 微生物学的定量法.....	<a href="#">112</a>	(1) 微生物学的定量法.....	<a href="#">100</a>
25 ビタミン A (レチノール活性当量として).....	<a href="#">115</a>	25 ビタミン A (レチノール活性当量として).....	<a href="#">102</a>
ア レチノール (ビタミンAアルコール).....	<a href="#">116</a>	ア レチノール (ビタミンAアルコール).....	<a href="#">103</a>
(1) 高速液体クロマトグラフ法.....	<a href="#">116</a>	(1) 高速液体クロマトグラフ法.....	<a href="#">103</a>
イ カロテン.....	<a href="#">119</a>	イ カロテン.....	<a href="#">106</a>
(1) 吸光光度法：総カロテン.....	<a href="#">119</a>	(1) 吸光光度法：総カロテン.....	<a href="#">106</a>
(2) 高速液体クロマトグラフ法： $\alpha$ -カロテン、 $\beta$ -カロテン.....	<a href="#">120</a>	(2) 高速液体クロマトグラフ法： $\alpha$ -カロテン、 $\beta$ -カロテン.....	<a href="#">107</a>
26 ビタミン B <sub>1</sub> .....	<a href="#">124</a>	26 ビタミン B <sub>1</sub> .....	<a href="#">110</a>
(1) 高速液体クロマトグラフ法.....	<a href="#">124</a>	(1) 高速液体クロマトグラフ法.....	<a href="#">111</a>
(2) チオクローム法.....	<a href="#">127</a>	(2) チオクローム法.....	<a href="#">113</a>
27 ビタミン B <sub>2</sub> .....	<a href="#">129</a>	27 ビタミン B <sub>2</sub> .....	<a href="#">115</a>
(1) 高速液体クロマトグラフ法.....	<a href="#">129</a>	(1) 高速液体クロマトグラフ法.....	<a href="#">115</a>
(2) ルミフラビン法.....	<a href="#">131</a>	(2) ルミフラビン法.....	<a href="#">117</a>
28 ビタミン B <sub>6</sub> .....	<a href="#">132</a>	28 ビタミン B <sub>6</sub> .....	<a href="#">118</a>
(1) 微生物学的定量法.....	<a href="#">132</a>	(1) 微生物学的定量法.....	<a href="#">118</a>
29 ビタミン B <sub>12</sub> .....	<a href="#">135</a>	29 ビタミン B <sub>12</sub> .....	<a href="#">121</a>
(1) 微生物学的定量法.....	<a href="#">135</a>	(1) 微生物学的定量法.....	<a href="#">121</a>
30 ビタミン C.....	<a href="#">138</a>	30 ビタミン C.....	<a href="#">123</a>
(1) 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン法.....	<a href="#">138</a>	(1) 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン法.....	<a href="#">124</a>
(2) インドフェノール・キシレン法.....	<a href="#">140</a>	(2) インドフェノール・キシレン法.....	<a href="#">126</a>
(3) 高速液体クロマトグラフ法.....	<a href="#">141</a>	(3) 高速液体クロマトグラフ法.....	<a href="#">127</a>
(4) 酸化還元滴定法.....	<a href="#">143</a>	(4) 酸化還元滴定法.....	<a href="#">130</a>
(5) 逆相高速液体クロマトグラフ法.....	<a href="#">144</a>	(5) 逆相高速液体クロマトグラフ法.....	<a href="#">131</a>
31 ビタミン D.....	<a href="#">146</a>	31 ビタミン D.....	<a href="#">133</a>
(1) 高速液体クロマトグラフ法.....	<a href="#">146</a>	(1) 高速液体クロマトグラフ法.....	<a href="#">133</a>
32 ビタミン E.....	<a href="#">149</a>	32 ビタミン E.....	<a href="#">136</a>
(1) 高速液体クロマトグラフ法.....	<a href="#">149</a>	(1) 高速液体クロマトグラフ法.....	<a href="#">136</a>
33 ビタミン K.....	<a href="#">151</a>	33 ビタミン K.....	<a href="#">137</a>
(1) 高速液体クロマトグラフ法.....	<a href="#">151</a>	(1) 高速液体クロマトグラフ法.....	<a href="#">138</a>
34 葉酸.....	<a href="#">153</a>	34 葉酸.....	<a href="#">139</a>
(1) 微生物学的定量法.....	<a href="#">153</a>	(1) 微生物学的定量法.....	<a href="#">139</a>
35 熱量.....	<a href="#">157</a>	35 熱量.....	<a href="#">142</a>
(1) 修正アトウォーター法.....	<a href="#">157</a>	(1) 修正アトウォーター法.....	<a href="#">142</a>
(2) アルコール.....	<a href="#">157</a>	(2) アルコール.....	<a href="#">143</a>
1) 浮ひよう法.....	<a href="#">158</a>	1) 浮ひよう法.....	<a href="#">143</a>
2) 振動式密度計法.....	<a href="#">158</a>	2) 振動式密度計法.....	<a href="#">144</a>
3) ガスクロマトグラフ法.....	<a href="#">159</a>	3) ガスクロマトグラフ法.....	<a href="#">144</a>
4) 酸化法 1.....	<a href="#">159</a>	4) 酸化法 1.....	<a href="#">145</a>

5) 酸化法 2	160
(3) 飽和脂肪酸の熱量	162
(4) 有機酸	162
1) 高速液体クロマトグラフ法	162
(5) 糖アルコール類	164
(6) 難消化性糖質のエネルギー換算係数	167
(7) 食物繊維のエネルギー換算係数	168

通則

1～8 (略)

9 試験に用いる次の試薬は、別に規定する場合を除き、「特級」、「精密分析用」、「高速液体クロマトグラフ用」、「原子吸光分析用」等の市販試薬を用い、試験を妨害する物質を含まないなど、試験に適したものをを用いる。

塩酸、硫酸、硝酸、酢酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア水、クロロホルム、n-ヘキサン、アセトン、ジエチルエーテル、塩化ナトリウム、過酸化水素、過塩素酸、イソプロピルアルコール、エタノール、メタノール、アセトニトリル、酢酸エチル

10 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1g、液状の物質は1mLを溶媒に溶かして全量をそれぞれ2mL、4mL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。試薬名(a+b)と記載したものは、水(b容量)に試薬(a容量)を加えて調製した溶液を示す。

11・12 (略)

13 本通知に記載された、試料採取量、定容量、希釈倍数、検量線の濃度範囲、検量線の測定点数、内標準物質の種類、内標準溶液の濃度、内標準溶液の添加量は例示であり、必要に応じて変更する。

14 必要に応じて空試験(試料を用いず、あるいは試料と同量の水等を用いて、試料の試験操作と同じ方法で空試験溶液を調製して測定を行う試験)を実施して、試験操作由来のきょう雑物のないことを確認する。

15～17 (略)

18 「恒量」とは、別に規定する場合を除き、追加乾燥又は強熱の前後2回の秤量差が、目安として、0.5mg以下であることをいう。

19 当該食品の栄養成分の量及び熱量が100mL等の容量当たりの量で表示されている場合、試料を容量で量り取ることにより定量結果を得ることができる。

20 ガスクロマトグラフィー及び高速液体クロマトグラフィーにおける分析条件は、一例を示したもので、適切なクロマトグラムが得られるように、カラムの内径、カラムの長さ、カラムの温度、流速、注入量、移動相溶媒の混合比率、グラジエント条件、昇温条件等を調整する。

[注]

5) 酸化法 2	146
(3) 飽和脂肪酸の熱量	148
(4) 有機酸	148
(新設)	
(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
(新設)	

通則

1～8 (略)

(新設)

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1g、液状の物質は1mLを溶媒に溶かして全量をそれぞれ2mL、4mL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・11 (略)

(新設)

(新設)

12～14 (略)

(新設)

15 当該食品の栄養成分の量及び熱量が100mL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。

(新設)

[注]

1) (略)

1 たんぱく質

(1) 窒素定量換算法

(略)

[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。

(略)

なお、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。また、アミノ酸サプリメントや食品添加物等で、製品に含まれる含窒素化合物の分子式が明確な場合は、たんぱく質として利用されるアミノ酸については分子式から窒素・たんぱく質換算係数を算出し使用しても良い。それ以外の含窒素化合物については、窒素・たんぱく質換算係数を0とする。

2) (略)

[参考文献]

1) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会食品成分委員会編：“日本食品標準成分表2015年版（七訂）分析マニュアル・解説”，45カフェイン，238-241（2016）

2) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会食品成分委員会編：“日本食品標準成分表2015年版（七訂）分析マニュアル・解説”，47テオブロミン，246-248（2016）

3) 厚生労働省医薬局食品保健部基準課長通知：食品中のアセスルファムカリウム分析法について，平成13年12月28日食基発第58号（2001）

4) 43 アスパルテーム、食品衛生検査指針 食品添加物編，216-220（2003）

1) ケルダール法

① 装置及び器具<sup>注1)</sup>

- ・ドラフト
- ・200 ~500 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

1) (略)

1 たんぱく質

(1) 窒素定量換算法

(略)

[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。

(略)

なお、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) (略)

(新設)

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 又は同等品。

② 試薬<sup>注1)</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
- ・水酸化ナトリウム
- ・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の質量比で混合したもの。タブレット状に成形された市販品（ケルタブC、株式会社アクタック等）を用いても良い。
- ・沸騰石：10～12メッシュ程度の粒度のもの。
- ・粒状亜鉛：20メッシュ程度より大きい粒度のもの。
- ・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1Lに希釈したもの。市販の30～40 w/v%水酸化ナトリウム溶液を使用しても良い。
- ・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2)</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<sup>注2)</sup>。調製済み市販品（026-14573、富士フィルム和光純薬等）を使用しても良い。
- ・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、又は二酸化炭素吸収管（ソーダ管）を付けた瓶に保存し、度々標定し直す<sup>注3)</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。市販のファクターが記載された0.05 mol/L硫酸を使用しても良い。
- ・シヨ糖：特級

③ 測定<sup>注1)</sup>

試料の適量0.5～2.0g (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4)</sup> 5g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。また、必要に応じて、30 w/v%過酸化水素水を加えても良い。分解が始まると、液は黒化し泡立つ<sup>注5)</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6)</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

・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)</sup> <sup>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1L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2)</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<sup>注3)</sup>。
- ・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、又は二酸化炭素吸収管（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> 5g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7)</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 ( $V_1$  mL)。別に空試験として試料を用いず、あるいは試料の代わりにショ糖等を用いて、前記同様に操作して分解、蒸留、次いで滴定する ( $V_0$  mL)。

#### ④ 計算

(略)

[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。自動化した装置を使用する場合の試薬及び測定操作等については、装置に付属の説明書等に従う。

(削除)

2) (略)

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添加物の一般試験法のC「試薬・試液」又は第十八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。

4) 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。タブレット状に成形された市販品(ケルタブCT、株式会社アクタック等)も利用できる。

5)~7) (略)

#### 2) 燃焼法

①・② (略)

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(200~500 mg)<sup>注3)</sup>を0.1 mg以下の単位まで正確に量り取り、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取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<sup>注4)</sup>。

④ 計算 (略)

[注]

1)・2) (略)

(削除)

3) 採取量は装置に付属の取扱説明書等に従う。

4) 燃焼法では、葉菜類等の硝酸態窒素も測り込まれる。必要に応じて、別に硝酸態窒素を求め、差し引くことにより、たんばく質に由来する窒素を

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 ( $V_1$  mL)。別に空試験として試料の代わりにショ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 ( $V_0$  mL)。

#### ④ 計算

(略)

[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) (略)

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)~8) (略)

#### 2) 燃焼法

①・② (略)

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 (略)

[注]

1)・2) (略)

3) 通常200~500 mgを採取する。

(新設)

(新設)

計算する。

[参考文献]

- 1) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会食品成分委員会編：“日本食品標準成分表2015年版（七訂）分析マニュアル・解説”，42硝酸イオン，226-229（2016）

2 脂質

エーテル、石油エーテル等の溶剤に可溶性成分の総量を脂質とする<sup>注1)</sup>。

[注]

- 1) (略)

(1) ゲルベル法

① 適用される食品

牛乳、特別牛乳、殺菌山羊乳、低脂肪牛乳、無脂肪牛乳及び加工乳に適用される<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℃に調節できるものを用いる。

③ 試薬

- ・硫酸：15℃で比重1.820～1.825（90～91％）のものを用いる。
- ・アミルアルコール：比重が15℃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℃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℃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。

(新設)

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性成分の総量を脂質とする<sup>注1)</sup>。

[注]

- 1) (略)

(新設)

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）

### (2) 溶媒抽出—重量法

#### 1) エーテル抽出法<sup>注1)</sup>

- ① (略)
- ② 装置及び器具
  - ・電気恒温水槽
  - ・電気定温乾燥器
  - ・ソックスレー抽出器<sup>注3)</sup>：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
  - ・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、肉類、魚類、種実類

そのまま円筒ろ紙に移して100～105 °Cの電気定温乾燥器で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、乳鉢中で粉碎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）を加えて同様に脱水した後、100～105 °Cの電気定温乾燥器で2～3時間乾燥し、乳鉢中で粉碎して円筒ろ紙に移す。

### (新設)

#### (1) エーテル抽出法<sup>注1)</sup>

- ① (略)
- 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、乳鉢中で粉碎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5gのけいそう土を流し込んでけいそう土層を作り、試料液をこれですすぐ。漏斗ごと電熱式乾燥器等で乾燥した後、試料を吸着したけいそう土を乳鉢に移し、必要に応じて硫酸ナトリウム（無水）を適量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pH6.0前後になるまで加える。沈降させ、ろ紙上に沈殿物を集める。これを100～105℃の電気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

ビーカー等にけいそう土約10 gをとり、これに適量の試料を加えてよく混和した後、電熱式乾燥器等で乾燥し、乳鉢中で粉碎して円筒ろ紙に移す。

⑤ 測定

粉碎又は前処理が必要な試料の場合は、上記④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℃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50～70℃の電気恒温水槽上で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℃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<sup>注9)</sup>。

⑥ (略)

[注]

1)・2) (略)

3) 通則第2項に基づき、エーテルを循環させてエーテル可溶成分を抽出できるように設計された自動分析装置を用いることもできる。

4)～8) (略)

9) 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思われる場合は、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

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5gのけいそう土を流し込んでけいそう土層を作り、試料液をこれですすぐ。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℃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℃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℃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 (略)

[注]

1)・2) (略)

3) 電熱式脂肪抽出装置（防爆型）も用いることがある。

4)～8) (略)

(新設)

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。

2) クロロホルム・メタノール混液抽出法<sup>注1)</sup>

① (略)

② 装置及び器具

・ドラフト

- ・電気恒温水槽
- ・電気定温乾燥器
- ・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60～100 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>

・ロータリーエバポレーター：一式

③ 試薬

- ・クロロホルム：97 v/v%以上のものを用いる。
- ・メタノール：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・メタノール混液をロータリーエバポレータ

(2) クロロホルム・メタノール混液抽出法<sup>注1)</sup>

① (略)

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

一で留去させ、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60分間放冷し、恒量（ $W_0$  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60分間放冷後、秤量して恒量（ $W_1$  g）を求める。

⑤（略）

[注]（略）

（削除）

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（ $W_0$  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（ $W_1$  g）を求める。

⑤（略）

[注]（略）

（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℃に調節できるものを用いる。

③ 試薬

・硫酸：15℃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℃で、比重が15℃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℃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℃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

### 3) 酸分解法

#### ① (略)

#### ② 装置及び器具

- ・電気恒温水槽
- ・電気定温乾燥器
- ・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。

#### ・分液漏斗

- ・ロータリーエバポレーター：一式

#### ③ 試薬

- ・エーテル
- ・エタノール：95 v/v%
- ・濃塩酸
- ・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1～2g以下)を50 mL容のビーカーに注1)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℃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注2)。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、あらかじめ適量の水(目安として30 mL)を入れた分液漏斗にエーテル層を集める。抽出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分

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℃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 (略)

#### 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。
- ・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℃

- ・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1～2g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℃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注1)。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℃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

液漏斗に集める。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、抽出管の先端及び栓をエーテル・石油エーテルの等量混液で十分に洗いこれも集める。混液を捕集した分液漏斗を十分に振り混ぜた後、静置して分離した水層を捨てる。エーテル層に水 30 mL を加え、同様の操作を1～2回行う<sup>注3)</sup>。漏斗に、ろ紙を折って入れ、この中に硫酸ナトリウム(無水)約10 g を乗せたものを準備し、ここへ、水洗が終わったエーテル層を分液漏斗から流下し、脱水、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。分液漏斗及び漏斗はエーテル・石油エーテルの等量混液で洗い込み、これも同様に脱水、ろ過してエーテル層と合わせる。フラスコをロータリーエバポレーターで溶媒留去し、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て放冷後秤量し、恒量(W<sub>1</sub> g)を求める<sup>注4)</sup>。

⑤ (略)

[注]

- 1) 直接マジョニア管に採取し、エタノール、塩酸で壁に付着した試料を洗い入れ、加温分解することもできる。
- 2) 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) エーテル層にエーテル・石油エーテル(1:1)に不溶の物質が含まれないと予想される場合は、水洗操作を省略することができる。
- 4) 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・石油エーテル(1:1)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。

#### 4) レーゼゴットリーブ法

① (略)

② 装置及び器具

- ・電気恒温水槽
- ・電気定温乾燥器
- ・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
- ・ロータリーエバポレーター：一式

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 (略)

[注]

(新設)

- 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。

(新設)

- 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思われる場合は、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 (略)

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
- ・エタノール：95 v/v%
- ・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：固形物を含む場合の試料で試験を行うときは、良く混合してから用いる。
- ・濃縮乳、練乳：試料20 gを量り、必要に応じて、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注2)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注3)。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注4)。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<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で溶媒留去し、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。

⑥ (略)

[注]

- 1) 豆乳にこの方法が適用されることもある。

2) 試料を直接マジョニア管に採取し、その後の操作を行うこともできる。

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注3)。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注4)。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<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でに連結し、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。

⑥ (略)

[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。  
(新設)

3) 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。

4) 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。

#### 5) 酸・アンモニア分解法<sup>注1)</sup>

##### ① 適用される食品

チーズ類に用いる。

##### ② 装置及び器具

- ・ホットプレート
- ・電気定温乾燥器
- ・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。
- ・分液漏斗
- ・電気恒温水槽
- ・ロータリーエバポレーター：一式

##### ③ 試薬

- ・アンモニア水溶液（1：9）：アンモニア水1容と水9容を混和する。
- ・塩酸
- ・エーテル
- ・石油エーテル：特級
- ・エーテル－石油エーテル混液（1：1 v/v）
- ・硫酸ナトリウム（無水）：特級

##### ④ 測定

試料（W）を100 mLコニカルビーカーに量り取り、アンモニア水溶液10 mLを加え、ガラス棒でよくつぶして均質の乳濁液にする<sup>注2)</sup>。塩酸11 mLを加え、時計皿でふたをして、ときどきかき混ぜながらホットプレートで加熱分解する<sup>注3)</sup>。冷却後、分解物を抽出管に移し、ビーカー、ガラス棒を少量の水で洗い、洗液も分解液と合わせる<sup>注4)</sup>。栓をして軽く振って混和した後、栓をゆっくり回してジエチルエーテルのガスを抜く。再び栓をして栓の頭部を指で押さえ、30秒間振り混ぜる。ガス抜き操作後、石油エーテル25 mLを加え、同様にして30秒

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。

#### (新設)

間激しく振り混ぜる。上層が透明になるまで静置した後、あらかじめ水30 mLを入れた分液漏斗に移す。残った水層にジエチルエーテル—石油エーテル混液（1：1v/v）30 mLを加え、前と同様に操作してエーテル混液層を分液漏斗に移す。この操作を2回繰り返した後、マジョニア管の口の部分と栓をエーテル混液で洗い、これも分液漏斗のエーテル混液に合わせる。分液漏斗のエーテル混液と水を十分に振り混ぜた後、静置して分離した水層を捨てる。エーテル混液に水30 mLを加え、同様に操作する。同様の操作を1～2回行う<sup>注5)</sup>。漏斗に、ろ紙を折って入れ、この中に硫酸ナトリウム（無水）約10 gを乗せたものを準備し、ここへ、水洗が終わったエーテル層を分液漏斗から流下し、脱水、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。分液漏斗及び漏斗はエーテル・石油エーテルの等量混液で洗い込み、これも同様に脱水、ろ過してエーテル層と合わせる。フラスコをロータリーエバポレーターで溶媒留去し、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<sup>注6)</sup>。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て放冷後秤量し、恒量（W<sub>1</sub> g）を求める。

#### ⑤ 計算

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

W<sub>0</sub>: 恒量とした脂質びんの質量 (g)

W<sub>1</sub>: 脂質を抽出した乾燥後の脂質びん質量 (g)

W: 試料採取量 (g)

#### [注]

- 1) 別名Schmid-Bondzski-Ratzlaff法といい、酸分解法とレーゼゴットリーブ法を組み合わせた方法で、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）ではプロセスチーズなどに適用されている。
- 2) 溶けにくいときには、時計皿でふたをして水浴上で温めながらつぶす。
- 3) 電気コンロにセラミック板を敷いて突沸しないように注意しながら加熱してもよい。加熱は穏やかに沸騰し始めてから5～6分間程度が目安である。分解が十分に進むと酸分解法と同様に分解溶液がサラサラとした感じの褐色液体になる。純粋なチーズの場合、あまり濃い色は付かない。
- 4) マジョニア管の頸以下に収まる程度（22～23mL）に液量を加減する。もし、液量が多くなりそうときは、コニカルビーカーを水浴上に置き、時計皿をとって水分を蒸発させる。
- 5) エーテル層に不溶の物質が含まれないと予想される場合は、水洗操作を省略することができる。
- 6) エーテル混液をほとんど留去した残留物中に、黒いタール状のものが認められるときは、分解物が水とともに混入したためであり、定量値増大

の誤差となるので、ジエチルエーテル—石油エーテル混液（1：1v/v）20mLを加えて加温溶解し、ろ過して混液を別のフラスコに集める。元のフラスコは混液で数回洗浄し、同様にして別のフラスコに集め、混液の留去操作を行う。

### 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4～24のものを食品表示基準における測定対象とする<sup>註1)</sup>。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<sup>註2)</sup>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。

#### [注]

1) 原則として、日本食品標準成分表脂肪酸成分表編に記載されている脂肪酸を測定対象とする。

2) トランス脂肪酸の含有量を表示する場合は、トランス脂肪酸の情報開示に関する指針（平成23年2月21日消費者庁）に従う。同指針では、脂肪酸とトランス脂肪酸を分別定量できる方法としてAOCS Ce1h-05 及びAOAC 996.06 がある。

#### [参考文献]

1) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会食品成分委員会編：“日本食品標準成分表2015年版（七訂）脂肪酸成分表編”，表2 脂肪酸成分表の脂肪酸名、記号及び分子量，5-6（2015）

2) AOCS Official Method Ce 1h-05: cis-, trans-, Saturated, Monounsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids in Vegetable or Non-Ruminant Animal Oils and Fats by Capillary GLC

3) AOAC Official Method 996.06: Fat (Total, Saturated, and Unsaturated) in Foods. Hydrolytic Extraction Gas Chromatographic Method

#### 1) 脂質の抽出 I（けん化法）

①・②（略）

③ 試薬

・ヘプタデカン酸：純度98%以上のもの

・内標準溶液：ヘプタデカン酸を5 mg/mLの濃度となるようにn-ヘキサンに溶

### 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。

#### (新設)

#### (新設)

#### 1) 脂質の抽出 I（けん化法）

①・②（略）

③ 試薬

・ヘプタデカン酸：純度98%以上のもの

解する。

- ・水酸化カリウム
- ・エタノール：95 v/v%
- ・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 %を含む。）：水酸化カリウム5.6 gをエタノールに溶解し100 mLにする。
- ・エーテル
- ・ヘキサン
- ・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内標準溶液 1～6 mL（ヘプタデカン酸として 5～30 mg）を正確に量り取り、溶媒を留去する。試料0.5～5 g（脂肪酸として20～100 mg）を精密に量る。 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0.5 gを加え、必要に応じて沸騰石を加えた後、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の方法を含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。

[参考文献]

- 1) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会食品成分委員会編：「日本食品標準成分表2015年版（七訂）分析マニュアル・解説」, 38-2-3 プロピルエステル化法, 203-205 (2016)

- ・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 %を含む。）
- ・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0.5～5 g（脂肪酸として 20～100 mg）を精密に量り、ヘプタデカン酸 5～30 mg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0.5 g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の方法を含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。

(新設)

## 2) 脂質の抽出Ⅱ (酸分解法)

①・② (略)

### ③ 試薬

- ・ヘプタデカン酸：純度98 %以上のもの
- ・内標準溶液：ヘプタデカン酸を5 mg/mL の濃度となるようにヘキサンに溶解する。
- ・塩酸溶液：濃塩酸と水を25：11の容量比で混合する。
- ・エーテル
- ・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<sup>注1)</sup>に内標準溶液1~6 mL (ヘプタデカン酸として5~30 mg) を正確に量り取り、溶媒を留去する。試料0.5~5 g (脂肪酸として20~100 mg) を精密に量る。エタノール5 mLを加えガラス棒で混和する。塩酸溶液25 mL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2)</sup>する。放冷後、分液漏斗に移し、エタノール20 mLとジエチルエーテル60 mLを加え振とうする。次いで石油エーテル60 mL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)60 mLで2回、同様に振とう抽出する。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)で脱水する。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) 試料を直接マジョニア管に採取し、その後の操作を行うこともできる。

2) 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 (略)

### ② 試薬

- ・メタノール
- ・水酸化ナトリウム
- ・0.5 mol/L水酸化ナトリウム-メタノール溶液：水酸化ナトリウム2 gをメタノールに溶解し100 mLにする。
- ・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
- ・塩化ナトリウム
- ・飽和塩化ナトリウム溶液

## 2) 脂質の抽出Ⅱ (酸分解法)

①・② (略)

### 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0.5~5 g (脂肪酸として20~100 mg) を量り、ヘプタデカン酸5~30 mgを正確に加える。エタノール5 mLを加えガラス棒で混和する。塩酸溶液25 mL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20 mLとジエチルエーテル60 mLを加え振とうする。次いで石油エーテル60 mL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)60 mLで2回、同様に振とう抽出する。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]

(新設)

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 (略)

### 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 (略)

[注] (略)

4) ガスクロマトグラフィー

①～④ (略)

[注]

1)・2) (略)

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が、標準品が入手できない場合等は文献値を引用しても良い。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) (略)

2) W.R.Morrison, S.L.Tan and K.D.Hargin : J.Sci.Food Agri., 31, 329 (1980)

3) (略)

4) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会食品成分委員会編：“日本食品標準成分表2015年版(七訂)分析マニュアル・解説”，感度補正係数の求め方，199-200 (2016)

5) AOCS Official Method Ce 1h-05: cis-,trans-,Saturated, Monounsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids in Vegetable or Non-Ruminant Animal Oils and Fats by Capillary GLC

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 (参考)  
(略)

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

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%

・その他の試薬は、特に指定のない限り特級を用いる。

③ (略)

[注] (略)

4) ガスクロマトグラフィー

①～④ (略)

[注]

1)・2) (略)

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) (略)

2) W.R.Morrison, S.L.Tan and K.D.Hargin : J.Sci.Food Agri., 31, 329 (1980)

3) (略)

(新設)

(新設)

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  
(略)

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、フェ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- $\alpha$ -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
- ・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。）：水酸化カリウム5.6 gをエタノールに溶解し100 mLにする。
- ・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、必要に応じて沸騰石を加えた後、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 (略)

⑤ 測定

試験溶液の一定量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>

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  $\mu$ m (CP-Sil 8 CB、アジレント・テクノロジー (株) 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 (ヘリウム、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

注入量：1  $\mu$ L

⑥ (略)

[注] (略)

[参考文献] (略)

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

- ・5- $\alpha$ -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 (略)

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 (略)

[注] (略)

[参考文献] (略)

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] (略)

[参考文献]

- 1) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会食品成分委員会編：“日本食品標準成分表2015年版（七訂）分析マニュアル・解説”，46タンニン，242-245（2016）
- 2) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会食品成分委員会編：“日本食品標準成分表2015年版（七訂）分析マニュアル・解説”，48ポリフェノール，249-251（2016）

ア 灰分

(略)

[注] (略)

(1) 酢酸マグネシウム添加灰化法<sup>注1)</sup>

① (略)

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程度の磁製のつぼを用いる。
- ・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
- ・メタノール
- ・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、温度が200 °C近くまで放冷された後、灰化容器を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 (略)

[注] (略)

いて算出する<sup>注3) 注4)</sup>。

[注] (略)

(新設)

ア 灰分

(略)

[注] (略)

(1) 酢酸マグネシウム添加灰化法<sup>注1)</sup>

① (略)

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程度の磁製のつぼを用いる。
- ・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 (略)

[注] (略)

(2) 直接灰化法

①～③ (略)

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 (1～3 g程度、液体の場合は5 mL程度) 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 5～6時間を目安として 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 (略)

[注] (略)

(3) 硫酸添加灰化法<sup>注1)</sup>

①・② (略)

③ 試薬

・濃硫酸

④・⑤ (略)

[注] (略)

イ 水分<sup>注1)</sup>

(略)

[注] (略)

(1) カールフィッシャー法<sup>注1)</sup>

(略)

(2) 直接灰化法

①～③ (略)

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 (略)

[注] (略)

(3) 硫酸添加灰化法<sup>注1)</sup>

①・② (略)

③ 試薬

・濃硫酸 : 特級

④・⑤ (略)

[注] (略)

イ 水分<sup>注1)</sup>

(略)

[注] (略)

(1) カールフィッシャー法<sup>注1)</sup>

(略)

① (略)

② 試薬<sup>注2)</sup>

- ・カールフィッシャー試液<sup>注3)</sup>
- ・メタノール(脱水)：水分が0.05 w/v%以下のもの
- ・水・メタノール標準溶液<sup>注4)</sup>

③ 測定<sup>注2)</sup>

(略)

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。次に水分の適量(5~30 mg 程度)を含む試料を精密に量り(W 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 mL)。

2) (略)

④ (略)

[注]

1) (略)

2) 自動化した装置を使用する場合の試薬及び測定操作等については、装置に付属の説明書等に従う。

3)・4) (略)

[参考文献] (略)

(2) 乾燥助剤法

① (略)

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<sup>注2)</sup>。
- ・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3)</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4)</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2~3g)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る。必要があれば、水浴上で<sup>注5)</sup>加熱<sup>注5)</sup>や少量の水を加えて混和を促す。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)。

① (略)

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

(略)

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 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 mL)。

2) (略)

④ (略)

[注]

1) (略)

(新設)

2)・3) (略)

[参考文献] (略)

(2) 乾燥助剤法

① (略)

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2~3g)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<sup>注4)</sup>加熱<sup>注4)</sup>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 (略)

[注]

1) (略)

2) 必要に応じて、ふた付きの秤量容器を用いる。その際は、容器にふたをしたとき、この中に斜めにして入る長さのかき混ぜ用ガラス棒を秤量容器ごとに用意する。

3) ~ 5) (略)

(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0.0007~0.0133 MPa の真空度で、熱によって変化しやすい食品は60~70℃で、比較的安定な食品は90~100℃で加熱する。

② (略)

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2~3g) を精密に量り ( $W_1$  g)、ふたをわずかにずらし<sup>註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、所定の真空度に設定する<sup>註3)</sup>。一定時間 (約5時間) 減圧乾燥後に真空ポンプを止め、シリカゲルを充填した乾燥管等を用い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>註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 (略)

[注]

1) ~ 3) (略)

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、水分の定量値の変化が0.1 g/100 g 以下と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・② (略)

③ 測定

所定の温度に調節した電気定温乾燥器に秤量皿を入れ、1~2時間加熱後デ

⑤ (略)

[注]

1) (略)

(新設)

2) ~ 4) (略)

(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℃で、比較的安定な食品は90~100℃で加熱する。

② (略)

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2~3g) を精密に量り ( $W_1$  g)、ふたをわずかにずらし<sup>註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>註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>註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 (略)

[注]

1) ~ 3) (略)

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・② (略)

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

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 ~ 10 g) を素早く精密に量り、平らに広げ、ふたをし秤量 ( $W_1$  g) する。電気 定温乾燥器の中にふたをずらして入れる。電気 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 ( $W_2$  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>。加熱乾燥後に試料の色が変わったり、焦げ等が発生した場合は、加熱温度を下げるか、減圧加熱乾燥法を用いて再測定を行う。

④ (略)

[注]

1) (略)

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、水分の定量値の変化が 0.1 g/100 g 以下と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\*  
(略)

\* : 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。

\*\* : 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>

①~④ (略)

[注]

1)・2) (略)

3) 一般的なポリエチレンフィルム製袋の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) (略)

6 糖質

糖質は、当該食品の質量から、たんぱく質、脂質、食物繊維、灰分及び水分量を除

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) を素早く精密に量り、平らに広げ、ふたをし秤量 ( $W_1$  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 ( $W_2$  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 (略)

[注]

1) (略)

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\*  
(略)

\* : 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>

①~④ (略)

[注]

1)・2) (略)

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) (略)

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

いて算出する<sup>注1)</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) 当該食品の炭水化物量から食物繊維量を除く下記の計算式で算出することができる。なお、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。

試料中の糖質含量 (g/100 g)

= 炭水化物含量 (g/100 g) - 食物繊維含量 (g/100 g)

(削除)

(削除)

(削除)

(削除)

## 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。ブドウ糖、果糖、ガラクトース、ショ糖、麦芽糖及び乳糖の6糖を基本的な測定対象<sup>注1)</sup>とし、必要に応じて原材料由来の特徴的な糖類<sup>注2)</sup>及び添加した糖類についても測定対象とする。測定した個々の糖類含量の総和を糖類含量とする。

[注]

- 1) 最新版の日本食品標準成分表炭水化物成分表編等から、検体に含まれていない事を示す合理的な根拠が得られる糖類については測定対象から除く

分量を除いて算出する<sup>注4) 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。

(新注)

ことができる。

2) 小麦製品・きのこと類等に含まれるトレハロースや、はちみつ・みそ等に  
含まれるイソマルトース等がある。

(1) ガスクロマトグラフ法<sup>注1)</sup>

(削除)

① (略)

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：特級

・水酸化ナトリウム

・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) 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 (略)

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<sup>注4)</sup>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の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) (略)

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>、GC用試験溶液とする。

4) (略)

⑤ (略)

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 m

(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 (略)

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 (略)

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の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) (略)

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) (略)

⑤ (略)

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 m

g/mL) 2 mLを加えて溶かした後、TMCS0.1 mL、HMDS 0.2 mLを加えて、室温で20～60分間反応させる<sup>注7)</sup>。

⑦ 測定

<ガスクロマトグラフ操作条件例<sup>注8)</sup>>

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

カラム温度：120～240℃(昇温)、6℃/分

注入口温度：250℃

キャリアーガス：窒素又はヘリウム40～60 mL/分

注入量：0.5～1 μL

⑧・⑨ (略)

[注]

1)～3) (略)

4) 試料に応じて、ホモジナイザー、乳鉢、振とう器等を用いて糖類の抽出を行っても良い。

5)～8) (略)

(2) 高速液体クロマトグラフ法

(削除)

① 装置及び器具

・ロータリーエバポレーター

・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：特級

・水酸化ナトリウム

・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 (略)

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

g/mL) 2 mLを加えて溶かした後、TMCS0.1 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 μL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、3mm×2m、ガラス製

カラム温度：120～240℃(昇温)、6℃/分

注入口温度：250℃

キャリアーガス：窒素又はヘリウム40～60 mL/分

⑧・⑨ (略)

[注]

1)～3) (略)

(新設)

4)～7) (略)

(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 (略)

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ロータリーエバポレーターで濃縮してHPLC用試験溶液とする。

2) ~ 4) (略)

⑤ (略)

⑥ 測定

HPLC試験溶液の一定量をHPLCに注入し、各糖のピーク高さ<sup>注9)</sup>を測定する。同様に各標準溶液の同量を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<sup>注10)</sup>>

(削除)

カラム: Wakosil 5NH<sub>2</sub> (富士フィルム和光純薬) 又は相当品<sup>注11)</sup>、内径4.6

mm、長さ250 mm、ステンレス製

移動相: アセトニトリル - 水 (75:25) <sup>注12)</sup>

検出器: 屈折率検出器

流速: 1.0 mL/分

温度: 室温

(削除)

⑦ (略)

[注]

1) ~ 5) (略)

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、8 食物繊維 (2) 高速液体クロマトグラフ法 (酵素-HPLC法) 等に記されたイオン交換樹脂によってもよい。

7) ~ 9) (略)

10) HPLC 操作条件を以下に変えることにより、オリゴ糖類の分析を行うこともできる。

カラム: Wakosil 5NH<sub>2</sub> (富士フィルム和光純薬) 又は相当品<sup>注11)</sup>、内径4.6 mm、長さ250 mm、ステンレス製

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) ~ 4) (略)

⑤ (略)

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 (略)

[注]

1) ~ 5) (略)

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) ~ 9) (略)

(新設)

移動相：アセトニトリル-水 (70:30) <sup>注12)</sup>

検出器：屈折率検出器

流速：1.0 mL/分

温度：室温

注入量：20  $\mu$ L

11) ~12) (略)

(削除)

10) ~11) (略)

## 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砕する。

### 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  $\mu$ m) 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  $\mu$ m) 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

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

8 食物繊維  
(略)

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℃、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  
(略)

(1) プロスキー法 (酵素-重量法) 注1)

① 装置及び器具

- ・凍結乾燥器
- ・乾燥器
- ・減圧乾燥器
- ・粉砕器
- ・ふるい
- ・るつぼ形ガラスろ過器：耐熱性るつぼ形ガラスろ過器G-2注2)をよく洗浄し、525±5℃で1時間加熱したものを用いる。けいそう土（セライト）約0.5 g注3)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±5℃で1時間加熱して恒量を求める。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リン酸緩衝液注4)：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に調整して1Lとする。
- ・熱安定α-アミラーゼ溶液：E-BLAAM (Megazyme製) 注5) 等注6) の熱安定のα-アミラーゼを用いる。冷蔵する。
- ・プロテアーゼ溶液：E-BSPRPD (Megazyme製) 注5) 等注6) のプロテアーゼを50 mg/mLとなるように、0.08 mol/Lリン酸緩衝液に溶解する。この溶液は用時調製する。
- ・アミログルコシダーゼ溶液：E-AMGDFNG (Megazyme製) 注5) 等注6) のアミログルコシダーゼを用いる。冷蔵する。
- ・ろ過助剤：富士フィルム和光純薬製等セライトNo. 545 (酸洗浄済み) 等を、525±5℃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%
- ・0.275 mol/L水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム11 gを水に溶かして1 Lとする。
- ・0.325 mol/L塩酸溶液：塩酸28 mLに水を加えて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、そのまま粉砕器で粉末とする。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

(1) プロスキー法 (酵素-重量法) 注1)

① 装置及び器具

- ・凍結乾燥器
- ・乾燥器
- ・減圧乾燥器
- ・粉砕器
- ・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注2)をよく洗浄し、525±5℃で加熱したものを用いる。けいそう土（セライト）約0.5 g注3)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±5℃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リン酸緩衝液注4)：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に調整して1Lとする。
- ・熱安定α-アミラーゼ溶液：ターマミル120L注5)を用いる。冷蔵する。
- ・プロテアーゼ溶液：プロセアーゼ注6)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注7)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注8) 等を、525±5℃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、そのまま粉砕器で粉末とする。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、粒度は目安として0.5 mm (30 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5gを200 mL容遠心管に精密に量り、1gにつき25 mLの石油エーテル、ジエチルエーテル、ヘキサン等の抽出溶媒を加え、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、測定操作の中にエーテルによる脱脂処理を組み込んでよい。

#### 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( $S_p$ 、 $S_A$  mg) 注7)、それぞれをトールビーカーに入れ、一方( $S_p$ )をたんぱく質測定用、他方( $S_A$ )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 注8)、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) (略)

##### 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に調整する。アミログルコシダーゼ溶液0.1 mLを加え 注9)、アルミニウムはくで覆い、60±2℃水浴中で振とうしながら30分間反応させる。

##### 4) (略)

##### 5) ろ過

78 v/v%エタノールによって、る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、95%エタノール10 mLで2回以上、アセトン10 mLで2回以上 注10)順次洗浄する。

##### 6) (略)

##### 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、窒素換算定量法によって残留物中の窒素含量を定量する。窒素・たんぱく質換算係数6.25を乗じてたんぱく質含量(P mg)を求める。

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5gを200 mL容遠心管に精密に量り、1g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( $S_p$ 、 $S_A$  mg) 注9)、それぞれをトールビーカーに入れ、一方( $S_p$ )をたんぱく質測定用、他方( $S_A$ )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 注10)、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) (略)

##### 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 注11)、アルミニウムはくで覆い、60±2℃水浴中で振とうしながら30分間反応させる。

##### 4) (略)

##### 5) ろ過

78 v/v%エタノールによって、る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 注12)順次洗浄する。

##### 6) (略)

##### 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、窒素換算定量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) (略)

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  $R_{PB}$  mg、 $R_{AB}$  mg、残留物中のたんぱく質含量 ( $P_B$  mg) 及び灰分含量 ( $A_B$  mg) を求める。注11)

⑤ (略)

[注]

1) ~ 4) (略)

(削除)

(削除)

(削除)

(削除)

5) Megazyme製のキット「K-TDFR」としても販売されている。

6) 酵素によっては、大麦及びえん麦由来のβ-グルカンを分解するエンドセルラーゼ(β-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。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。

7) ~ 11) (略)

(削除)

(削除)

[参考文献] (略)

(2) 高速液体クロマトグラフ法(酵素-HPLC法) 注1)

① (略)

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 μm)
- ・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 注3)
- ・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 注4) 注5)

③ 試薬

- ・ピラノースオキシダーゼ 注6)

8) (略)

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  $R_{PB}$  mg、 $R_{AB}$  mg、残留物中のたんぱく質含量 ( $P_B$  mg) 及び灰分含量 ( $A_B$  mg) を求める。注13)

⑤ (略)

[注]

1) ~ 4) (略)

5) Novozymes 製 注14) 等 注15)

6) E-BSPRT (Megazyme製) 注14) 等 注15)

7) E-AMGDF (Megazyme製) 注14) 等 注15)

8) Fisher Scientific Co. 製等

(新設)

(新設)

9) ~ 13) (略)

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β-グルカンを分解するエンドセルラーゼ(β-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] (略)

(2) 高速液体クロマトグラフ法(酵素-HPLC法) 注1)

① (略)

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 μm)
- ・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 注3)
- ・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 注4)

③ 試薬

- ・ピラノースオキシダーゼ 注5)

・その他の試薬は、特に指定のない限り特級を用いる。

④ (略)

⑤ 測定

1) たんぱく質、有機酸、無機塩類の除去<sup>注7)</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8)</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) (略)

⑥ (略)

[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9)</sup>。

2)～3) (略)

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(Na型)を使用する場合は、

・その他の試薬は、特に指定のない限り特級を用いる。

④ (略)

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) (略)

⑥ (略)

[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)～3) (略)

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

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) 陽イオン交換固相カラム (Bond Elut Jr SCX 等) に陰イオン交換固相カラム (Bond Elut PSA) を接続したのもも使用できる。

6) ピラノースオキシダーゼ法によるブドウ糖測定キット (データミナーGL-E: 日立化成ダイアグノスティクス・システムズ株式会社製) が市販されている。

7) ~ 9) (略)

[参考文献]

1) ~ 4) (略)

5) Anal. Sci., 35, 11, 1269-1274 (2019)

## 9 亜鉛

### (1) 原子吸光度法

① (略)

② 試薬

- ・塩酸
- ・塩酸 (1+1): 塩酸1容に対し水1容を加え混和する。
- ・塩酸 (1→40): 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塩酸 (1→40) 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、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸 (1→40) 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、蒸発乾固を行う。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 (V mL) し、試験溶液とする<sup>(注1)</sup>。

④ 測定

原子吸光度計を用いて、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、塩酸 (1→40) 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: 213.8 nm

⑤ (略)

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。

(新設)

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 (データミナーGL-E: 製協和メディックス (株) 製) が市販されている。

6) ~ 8) (略)

[参考文献]

1) ~ 4) (略)

(新設)

## 9 亜鉛

### (1) 原子吸光度法

① (略)

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 (V mL) し、試験溶液とする。

④ 測定

原子吸光度計を用いて、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: 213.8 nm

⑤ (略)

[注]

1) 必要に応じて塩酸(1+1)の添加量を調整して標準溶液と塩酸濃度を近付ける。

(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±10℃に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・水浴

・分液漏斗

・共栓試験管

② 試薬<sup>(注1)</sup>

- ・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

- ・塩酸(1+1)：塩酸1容に対し水1容を加え混和する。
- ・塩酸(1→40)：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塩酸(1→40)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、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸(1→40) 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、蒸発乾固を行う。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（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。

(新設)

(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±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

- ・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℃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（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 2滴を加え、溶液の色が黄色から緑色になるまで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>注2)</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>

フレーム：空気 - アセチレン

測定波長：213.8 nm

⑤ (略)

[注]

1) 試薬由来のコンタミネーションが影響する場合、あらかじめ溶媒抽出により精製するほうが望ましい。

2) (略)

(3) 誘導結合プラズマ発光分析法

① (略)

② 試薬

- ・塩酸
- ・塩酸 (1+1)：塩酸 1 容に対し水 1 容を加え混和する。
- ・塩酸 (1→40)：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塩酸 (1→40)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、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸 (1→40) 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、蒸発乾固を行う。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 (V mL) し、試験溶液とする<sup>注1)</sup>。

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

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>注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>

フレーム：空気 - アセチレン

測定波長：213.8 nm

⑤ (略)

[注]

(新設)

1) (略)

(3) 誘導結合プラズマ発光分析法

① (略)

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、先の全量フラスコへろ過する。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<sup>注2)</sup>。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<sup>注3)</sup>。

⑤ (略)

[注]

1) 必要に応じて塩酸(1+1)の添加量を調整して標準溶液と塩酸濃度を近付ける。

2) 必要に応じて他の波長を用いても良い。

3) 試料溶液中の元素組成の影響などにより測定時に物理干渉を受ける場合は、内標元素を用いて補正を行っても良い。

## 10 カリウム

(1) 原子吸光度法(灰化法)<sup>注1)</sup>

① (略)

② 試薬

- ・塩酸(1→4)、塩酸(1→40)：塩酸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塩酸(1→40)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℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸(1→4) 5 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、塩酸(1→4) 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、塩酸(1→40)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：766.5 nm

⑤ (略)

[注] (略)

(2) 原子吸光度法(塩酸抽出法)

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 (略)

(新設)

## 10 カリウム

(1) 原子吸光度法(灰化法)<sup>注1)</sup>

① (略)

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℃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：766.5 nm

⑤ (略)

[注] (略)

(2) 原子吸光度法(塩酸抽出法)

① (略)

② 試薬

- ・ 塩酸 (1→40) : 塩酸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 塩酸 (1→40) で希釈して用いる。

③ 試験溶液の調製

試料 2 g を精密に量り (W g)、ポリエチレン瓶に入れ、塩酸 (1→40) 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。

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  $\mu$ g/mL) を求める。このとき、濃度の高い試験溶液については、塩酸 (1→40) 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 : 766.5 nm

⑤ (略)

(3) 誘導結合プラズマ発光分析法

① (略)

② 試薬

- ・ 塩酸 (1→4)、塩酸 (1→40) : 塩酸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 塩酸 (1→40) 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 塩酸 (1→4) 5 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、塩酸 (1→4) 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、塩酸 (1→40) 200

① (略)

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 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。

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  $\mu$ 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>

フレーム : 空気 - アセチレン

測定波長 : 766.5 nm

⑤ (略)

(3) 誘導結合プラズマ発光分析法

① (略)

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 m

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。注1。

⑤ (略)

[注]

1) 必要に応じて他の波長を用いても良い。

11 カルシウム

(1) 過マンガン酸カリウム容量法

① (略)

② 試薬

- ・塩酸 (1+1)：塩酸 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 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1Lに定容し、暗所に一夜放置する。ガラスフィルター (3G-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 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、塩酸 (1→40) 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

L) 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 (略)

(新設)

11 カルシウム

(1) 過マンガン酸カリウム容量法

① (略)

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1Lに定容し、暗所に一夜放置する。ガラスフィルター (3G-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

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・⑤ (略)

## (2) 原子吸光度法

① (略)

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を塩酸(1→40)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1容に対し水1容を加え混和する。

・塩酸(1→40)：塩酸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塩酸(1→40)で希釈し、ストロンチウムとして0.5 w/v%になるように塩化ストロンチウム溶液を加える。

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、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸(1→40) 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 ( $V_1$  mL)、試験溶液とする注1)。

④ 測定

試験溶液の適当量 ( $V_2$  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、塩酸(1→40)で定容 ( $V_3$  mL) した後、原子吸光度計を用いて、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 ( $C$   $\mu$ 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>

フレーム：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 (略)

[注]

1) 必要に応じて塩酸(1+1)の添加量を調整して標準溶液と塩酸濃度を近付ける。

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・⑤ (略)

## (2) 原子吸光度法

① (略)

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 °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 ( $V_1$  mL)、試験溶液とする。

④ 測定

試験溶液の適当量 ( $V_2$  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 ( $V_3$  mL) した後、原子吸光度計を用いて、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 ( $C$   $\mu$ 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>

フレーム：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 (略)

(新設)

(3) 誘導結合プラズマ発光分析法

① (略)

② 試薬

- ・塩酸 (1+1) : 塩酸1容に対し水1容を加え混和する。
- ・塩酸 (1→40) : 塩酸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塩酸 (1→40) 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、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸 (1→40) 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入ろ過する。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1)</sup>。

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<sup>注2)</sup>。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<sup>注3)</sup>。

⑤ (略)

[注]

- 1) 必要に応じて塩酸 (1+1) の添加量を調整して標準溶液と塩酸濃度を近付ける。
- 2) 必要に応じて他の波長を用いても良い。
- 3) 試料溶液中の元素組成の影響などにより測定時に物理的干渉を受ける場合は、内標元素を用いて補正を行っても良い。

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

(3) 誘導結合プラズマ発光分析法

① (略)

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入ろ過する。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 (略)

(新設)

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

・分液漏斗

・共栓試験管

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。
- ・ アンモニア水：アンモニア水 (25.0～27.9 %) を水で2倍に希釈する。

・ 硝酸 (1→10)：硝酸 (60.0～61.0 %) を水で希釈して用いる。

・ 塩酸：塩酸 (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。

・ 塩酸 (1→40)：塩酸を水で希釈して用いる。

・ 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 塩酸 (1→40) 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 ℃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、塩酸 (1→40) 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、全量フラスコ中に入ろ過する。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、蒸発乾固を行う。

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入ろ過する。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。硝酸 (1→10) 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

・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 ℃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、全量フラスコ中に入ろ過する。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入ろ過する。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

でアンモニア水を滴下する (pH3.0~4.0)。時計皿でふた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、MIBK10 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>

フレーム：空気 - アセチレン

測定波長：357.9 nm

⑤ (略)

[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。なお、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：食品衛生学雑誌、382 (1990))。
- 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、フレー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。  
(削除)

## (2) 誘導結合プラズマ発光分析法

① (略)

② 試薬

- ・塩酸：塩酸 (35~37 %)
- ・塩酸 (1+1)：塩酸1容に対し水1容を加え混和する。
- ・塩酸 (1→40)：塩酸を水で希釈して用いる。
- ・クロム標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を塩酸 (1→40)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℃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、塩酸 (1→40) 20 mLを

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、MIBK10 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>

フレーム：空気 - アセチレン

測定波長：357.9 nm

⑤ (略)

[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、フレー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 (略)

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℃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

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。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、蒸発乾固を行う。

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<sup>注3)</sup>注4)。

#### 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5)</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<sup>注6)</sup>。測定波長206.15 nmを用いる<sup>注7)</sup>。

#### ⑤ （略）

[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。なお、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：食品衛生雑誌、382（1990））。

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) 必要に応じて塩酸（1+1）の添加量を調整して標準溶液と塩酸濃度を近付ける。

5) 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。

6) 試料溶液中の元素組成の影響などにより測定時に物理的干渉を受ける場合は、内標元素を用いて補正を行っても良い。

7) 必要に応じて他の波長を用いても良い。

（削除）

### （3）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）：四重極、コリジョンセルなど分子イオン干渉を除去する機能が装備されたもの。
- ・マイクロ波試料分解装置：最大試料1g分解が可能な容器を処理でき、内部温

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。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<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 （略）

[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。

（新設）

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。

（新設）

（新設）

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））

（新設）

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 (Mil estone社製ETHOS 1 同等品)

② 試薬

- ・塩酸
- ・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
- ・過酸化水素

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。

- ・クロム標準溶液<sup>注1)</sup>：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2)</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。
- ・ガリウム内標準溶液<sup>注1)</sup>：市販の原子吸光分析用標準溶液を希釈して、0.2 µg/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

試料0.1～1gをあらかじめ硝酸（1→10）で洗浄したマイクロ波分解容器<sup>注3)</sup>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（ガリウム0.2µg/mL）を500µLを含むように調製する。

④ 測定

クロム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：Agilent7500ce（アジレント・テクノロジー（株））

導入速度：1.0 mL/分

プラズマ条件：

RFパワー：1.6 kW

プラズマガス：15 L/分（アルゴン）

キャリアーガス：0.70 L/分（アルゴン）

メイクアップガス：0.29 L/分（アルゴン）

リアクションガス：ヘリウム

ネブライザー：Micro Mistネブライザー

測定質量数：クロム52（内標：ガリウム71）

ガスモード：ヘリウムガスモード<sup>注4)</sup>

⑤ 計算

$$\text{試料中のクロム含量 (}\mu\text{g/100 g)} = \frac{C \times F \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたクロムの濃度（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) セレン、クロム及びモリブデンの混合標準液を用いて、一斉定量を行うこともできる。その際は、ガリウム、インジウム及びテルルの混合内標準溶液を用いる。

2) 下限値は、機器により適宜変更する。

3) マイクロ波分解容器にあらかじめ硝酸 5 mLを加え、表の条件でマイクロ波分解を行い洗浄しておくことで空試験値を低減することができる。

4) クロムの質量数はアルゴンと溶液中の窒素又は酸素が反応した質量数と重なるため、ヘリウムガスモードを用いて測定する。

[参考文献]

1) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会食品成分委員会編：  
”日本食品標準成分表2015年版（七訂）分析マニュアル・解説”，17-3.  
誘導結合プラズマ質量分析法（セレン、クロム及びモリブデンの一斉分析法），105-106（2016）

### 13 セレン

#### (1) 蛍光光度法

##### ① 装置及び器具

- ・ 蛍光光度計
- ・ 分液漏斗
- ・ 共栓試験管

##### ② 試薬

- ・ 塩酸
- ・ アンモニア水
- ・ 過塩素酸
- ・ 硝酸
- ・ シクロヘキサン：特級

- ・ 塩酸 (1→40)、塩酸 (1→4)、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1L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塩酸 (1→40)で希釈して用いる。

##### ③ 試験溶液の調製

試料約1g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、塩酸 (1→4) 3 mLを加え、沸騰水浴中等で100 °C、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、塩酸 (1→4)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、

### 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1L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1g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

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、シクロヘキサン層を共栓試験管にとり、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 ( $C \mu\text{g/mL}$ ) 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 (略)

## (2) 水素化物 - 原子吸光光度法

① (略)

② 試薬

・ 塩酸

・ 硝酸

・ 過塩素酸

・ 塩酸 (1+1)：塩酸 1 容に対し水 1 容を加え混和する。

・ 塩酸 (1→40)、塩酸 (1→4)：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 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塩酸 (1→40) 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、塩酸 (1→4) 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・⑤ (略)

## (3) 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)：四重極、コリジョンセルなど分子イオン干渉を除去する機能が装備されたもの。

・ 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 (Mi1

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 ( $C \mu\text{g/mL}$ ) 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 (略)

## (2) 水素化物 - 原子吸光光度法

① (略)

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・⑤ (略)

## (新設)

estone社製ETHOS 1 同等品)

② 試薬

- ・塩酸
- ・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
- ・過酸化水素

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。

- ・セレン標準溶液<sup>注1)</sup>：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2)</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。
- ・テルル内標準溶液<sup>注1)</sup>：市販の原子吸光分析用標準溶液を希釈して、2000 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

試料0.1~1 gをあらかじめ硝酸（1→10）で洗浄したマイクロ波分解容器<sup>注3)</sup>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（テルル2 µg/mL）を500 µLを含むように調製する。

④ 測定

セレ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：Agilent7500ce (アジレント・テクノロジー (株))

導入速度：1.0 mL/分

プラズマ条件：

RFパワー：1.6 kW

プラズマガス：15 L/分 (アルゴン)

キャリアーガス：0.70 L/分 (アルゴン)

メイクアップガス：0.29 L/分 (アルゴン)

リアクションガス：ヘリウム

ネブライザー：Micro Mistネブライザー

測定質量数：セレン78 (内標：テルル128) <sup>注4)</sup>

ガスモード：ヘリウムガスモード<sup>注4)</sup>

⑤ 計算

$$\text{試料中のセレン含量 (}\mu\text{g/100 g)} = \frac{C \times F \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたセレンの濃度 (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) セレン標準溶液に変えて、セレン、クロム及びモリブデンの混合標準液を用いて、一斉定量を行うこともできる。その際は、テルル内標準溶液に変えて、ガリウム、インジウム及びテルルの混合内標準溶液を用いる。
- 2) 下限値は、機器により適宜変更する。
- 3) マイクロ波分解容器にあらかじめ硝酸 5 mLを加え、表の条件でマイクロ波分解を行い洗浄しておくことで空試験値を低減することができる。
- 4) 食塩や海藻類は微量ながら臭素を含んでおり、ノンガスモードでは溶液中の臭素と水素と反応しセレンの質量数82と重なってしまう。そのため、ヘリウムガスモードを用いて質量数78で測定する。通常の食品においてはヘリウムガスモードよりもノンガスモードのイオンカウント数が多く、精度よく測定できる。ノンガスモードで測定する場合は、質量数82で測定する。

[参考文献]

- 1) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会食品成分委員会編：

”日本食品標準成分表2015年版（七訂）分析マニュアル・解説”，17-3.  
誘導結合プラズマ質量分析法（セレン、クロム及びモリブデンの一斉分析法），105-106（2016）

#### 14 鉄

##### (1) オルトフェナントロリン吸光光度法

###### ① (略)

###### 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としたものを用いる。
- ・ 1/20 mol/L水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 1 gをエタノール500 mLに溶解する。
- ・ 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としたものを用いる。
- ・ 塩酸（1+1）：塩酸 1 容に対し水 1 容を加え混和する。
- ・ 塩酸（1→40）：塩酸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塩酸（1→40）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、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（1→40） 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、蒸発乾固を行う。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<sub>1</sub> mL）、試験溶液とする。

###### ④・⑤ (略)

##### (2) 原子吸光光度法

###### ① (略)

###### ② 試薬

- ・ 塩酸（1+1）：塩酸 1 容に対し水 1 容を加え混和する。

#### 14 鉄

##### (1) オルトフェナントロリン吸光光度法

###### ① (略)

###### 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<sub>1</sub> mL）、試験溶液とする。

###### ④・⑤ (略)

##### (2) 原子吸光光度法

###### ① (略)

###### ② 試薬

- ・ 塩酸（1→40） 塩酸（1+1）：塩酸（原子吸光分析用） 1 容に対し水 1 容を

- ・ 塩酸 (1→40) : 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 塩酸 (1→40) 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 又はホットプレート上 で蒸発乾固する。さらに、塩酸 (1→40) 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、蒸発乾固 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 注1)。

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  $\mu$ g/mL) を求める。このとき、濃度の高い試験溶液については、塩酸 (1→40) 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 : 248.3 nm

⑤ (略)

[注]

1) 必要に応じて塩酸 (1+1) の添加量を調整して標準溶液と塩酸濃度を近付ける。

(3) 誘導結合プラズマ発光分析法

① (略)

② 試薬

- ・ 塩酸 (1+1) : 塩酸 1 容に対し水 1 容を加え混和する。
- ・ 塩酸 (1→40) : 塩酸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 又はホットプレート上 で蒸発乾固する。さらに、塩酸 (1→40) 20 mL を加え、

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  $\mu$ 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>

フレーム : 空気 - アセチレン

測定波長 : 248.3 nm

⑤ (略)

(新設)

(3) 誘導結合プラズマ発光分析法

① (略)

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

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<sup>注1)</sup>。

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<sup>注2)</sup>。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<sup>注3)</sup>。

⑤ （略）

〔注〕

1) 必要に応じて塩酸（1+1）の添加量を調整して標準溶液と塩酸濃度を近付ける。

2) 必要に応じて他の波長を用いても良い。

3) 試料溶液中の元素組成の影響などにより測定時に物理干渉を受ける場合は、内標元素を用いて補正を行っても良い。

15 銅

(1) 原子吸光度法

① （略）

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。
- ・塩酸（1→40）：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塩酸（1→40）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℃の電気炉上で灰化する。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、塩酸（1→40） 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、蒸発乾固を行う。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<sup>注1)</sup>。

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 （略）

（新設）

15 銅

(1) 原子吸光度法

① （略）

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℃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℃）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 ( $C \mu\text{g/mL}$ ) を求める。このとき、濃度の高い試験溶液については、塩酸 (1→40) 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: 324.7 nm

⑤ (略)

[注]

1) 必要に応じて塩酸 (1+1) の添加量を調整して標準溶液と塩酸濃度を近付ける。

(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

・分液漏斗

・共栓試験管

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: 原子吸光分析用

・硝酸

・硫酸

・過塩素酸

・塩酸 (1+1): 塩酸 1 容に対し水 1 容を加え混和する。

・塩酸 (1→40): 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 塩酸 (1→40) で希釈して用

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>

フレーム: 空気 - アセチレン

測定波長: 324.7 nm

⑤ (略)

(新設)

(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。

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、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸 (1→40) 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)、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. (略)

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% APD C 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、酢酸ブチル層を共栓試験管に取り、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 (略)

[注] (略)

(3) 誘導結合プラズマ発光分析法

① (略)

② 試薬

- ・塩酸 (1+1) : 塩酸 1 容に対し水 1 容を加え混和する。
- ・塩酸 (1→40) : 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塩酸 (1→40) 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

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)、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. (略)

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% APD C 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 (略)

[注] (略)

(3) 誘導結合プラズマ発光分析法

① (略)

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

又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（1→40） 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<sup>注1）</sup>。

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<sup>注2）</sup>。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<sup>注3）</sup>。

⑤ （略）

[注]

1） 必要に応じて塩酸（1+1）の添加量を調整して標準溶液と塩酸濃度を近付ける。

2） 必要に応じて他の波長を用いても良い。

3） 試料溶液中の元素組成の影響などにより測定時に物理干渉を受ける場合は、内標元素を用いて補正を行っても良い。

16 ナトリウム（食塩相当量）  
（略）

（1） 原子吸光度法（灰化法）

① （略）

② 試薬

- ・塩酸（1→4）、塩酸（1→40）：塩酸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塩酸（1→40）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℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（1→4） 5 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、塩酸（1→4） 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

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

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 （略）

（新設）

16 ナトリウム（食塩相当量）  
（略）

（1） 原子吸光度法（灰化法）

① （略）

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℃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 ( $C \mu\text{g/mL}$ ) を求める。このとき、濃度の高い試験溶液については、塩酸 (1→40) 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 (略)

(2) 原子吸光光度法 (塩酸抽出法) 注1) 注2)

① (略)

② 試薬

- ・塩酸 (1→40): 塩酸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塩酸 (1→40) 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 (W g)、ポリエチレン瓶に入れ、塩酸 (1→40) 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。

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、塩酸 (1→40) 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 (略)

[注] (略)

(3) 誘導結合プラズマ発光分析法

① (略)

② 試薬

- ・塩酸 (1→4)、塩酸 (1→40): 塩酸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塩酸 (1→40) 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

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>

フレーム: 空気 - アセチレン

測定波長: 589.0 nm

⑤ (略)

(2) 原子吸光光度法 (塩酸抽出法) 注1) 注2)

① (略)

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 (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。

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>

フレーム: 空気 - アセチレン

測定波長: 589.0 nm

⑤ (略)

[注] (略)

(3) 誘導結合プラズマ発光分析法

① (略)

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℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸(1→4) 5 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、塩酸(1→4) 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、塩酸(1→40) 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<sup>注3)</sup>。

⑤ (略)

[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) 必要に応じて他の波長を用いても良い。

17 マグネシウム

(1) 原子吸光度法

① (略)

② 試薬

- ・塩酸
- ・塩酸(1+1)：塩酸1容に対し水1容を加え混和する。
- ・塩酸(1→40)：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を塩酸(1→40)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塩酸(1→40)で希釈し、ストロンチウムとして0.5 w/v%になるように塩化ストロンチウム溶液を加える。

③ 試験溶液の調製

後、500℃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 (略)

[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。
- (新設)

17 マグネシウム

(1) 原子吸光度法

① (略)

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、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸 (1→40) 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 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、塩酸 (1→40) で定容 ( $V_3$  mL) した後、原子吸光度計を用いて、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 ( $C$   $\mu$ 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>

フレーム：空気 - アセチレン

測定波長：285.2 nm

⑤ (略)

(2) 誘導結合プラズマ発光分析法

① (略)

② 試薬

- ・塩酸
- ・塩酸 (1+1)：塩酸1容に対し水1容を加え混和する。
- ・塩酸 (1→40)：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塩酸 (1→40) 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、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸 (1→40) 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。<sup>注1)</sup>

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 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 ( $V_3$  mL) した後、原子吸光度計を用いて、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 ( $C$   $\mu$ 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>

フレーム：空気 - アセチレン

測定波長：285.2 nm

⑤ (略)

(2) 誘導結合プラズマ発光分析法

① (略)

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

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<sup>注2)</sup>。測定波長は279.553 nmを用いる<sup>注3)</sup>。

⑤ (略)

[注]

1) 必要に応じて塩酸(1+1)の添加量を調整して標準溶液と塩酸濃度を近付ける。

2) 試料溶液中の元素組成の影響などにより測定時に物理干渉を受ける場合は、内標元素を用いて補正を行っても良い。

3) 必要に応じて他の波長を用いても良い。

18 マンガン

(1) 原子吸光度法

① (略)

② 試薬

- ・塩酸
- ・塩酸(1+1)：塩酸1容に対し水1容を加え混和する。
- ・塩酸(1→40)：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塩酸(1→40)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、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸(1→40) 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、蒸発乾固を行う。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50 mLに定容し(V mL)、試験溶液とする。

④ 測定

原子吸光度計を用いて、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、塩酸(1→40)を用いて、適当な濃度に希釈した後測定する(希釈倍数：D)。

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 (略)

(新設)

18 マンガン

(1) 原子吸光度法

① (略)

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℃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50 mLに定容し(V mL)、試験溶液とする。

④ 測定

原子吸光度計を用いて、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：279.5 nm

⑤ (略)

(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±10℃に設定できるものを用いる。
- ・ホットプレート
- ・水浴

・分液漏斗

・共栓試験管

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

- ・塩酸（1+1）：塩酸1容に対し水1容を加え混和する。
- ・塩酸（1→40）：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塩酸（1→40）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、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（1→40） 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、蒸発乾固を行う。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入ろ過する。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

<原子吸光測定条件例>

フレーム：空気 - アセチレン

測定波長：279.5 nm

⑤ (略)

(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±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

- ・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℃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、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入ろ過する。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。

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5分間振とうする。静置後、MIBK層を共栓試験管にと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  $\mu$ 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>

フレーム：空気 - アセチレン

測定波長：279.5 nm

⑤ (略)

(3) 誘導結合プラズマ発光分析法

① (略)

② 試薬

- ・塩酸
- ・塩酸 (1+1)：塩酸1容に対し水1容を加え混和する。
- ・塩酸 (1→40)：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塩酸 (1→40)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、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸 (1→40) 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、蒸発乾固を行う。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<sup>注1)</sup>。

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<sup>注2)</sup>。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  $\mu$

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5分間振とうする。静置後、MIBK層をとって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  $\mu$ 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>

フレーム：空気 - アセチレン

測定波長：279.5 nm

⑤ (略)

(3) 誘導結合プラズマ発光分析法

① (略)

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  $\mu$ g/mL

g/mL) を求める 注3)。

⑤ (略)

[注]

1) 必要に応じて塩酸(1+1)の添加量を調整して標準溶液と塩酸濃度を近付ける。

2) 試料溶液中の元素組成の影響などにより測定時に物理干渉を受ける場合は、内標元素を用いて補正を行っても良い。

3) 必要に応じて他の波長を用いても良い。

## 19 モリブデン

### (1) 誘導結合プラズマ質量分析法

① (略)

② 試薬

- ・塩酸
- ・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
- ・過酸化水素

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 注1)：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 注2)。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 注1)：市販の原子吸光分析用標準溶液を希釈して、0.2 μg/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℃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、塩酸(1→40)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、蒸発乾固を行う。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、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

L) を求める。

⑤ (略)

(新設)

## 19 モリブデン

### (1) 誘導結合プラズマ質量分析法

① (略)

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 注1)。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℃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℃)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、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0.1～1gをあらかじめ硝酸(1→10)で洗浄したマイクロ波分解容器<sup>(注3)</sup>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  
(略)

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：Agilent7500ce (アジレント・テクノロジー(株))

導入速度：1.0 mL/分

プラズマ条件：

RFパワー：1.6 kW

プラズマガス：15 L/分(アルゴン)

キャリアガス：0.70 L/分(アルゴン)

メイクアップガス：0.29 L/分(アルゴン)

ネブライザー：Micro Mist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 (略)

[注]

1) モリブデン標準溶液に変えて、セレン、クロム及びモリブデンの混合標準液を用いて、一斉定量を行うこともできる。その際は、インジウム内標準溶液に変えて、ガリウム、インジウム及びテルルの混合内標準溶液を用いる。

2) 下限値は、機器により適宜変更する。

3) マイクロ波分解容器にあらかじめ硝酸5 mLを加え、表の条件でマイクロ波分解を行い洗浄しておくことで空試験値を低減することができる。

[参考文献]

1) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会食品成分委員会編：“日本食品標準成分表2015年版(七訂)分析マニュアル・解説”，17-3.

試料0.1～1g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  
(略)

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 (略)

[注]

(新設)

1) 下限値は、機器により適宜変更する。

(新設)

[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

誘導結合プラズマ質量分析法（セレン、クロム及びモリブデンの一斉分析法）, 105-106 (2016)

(2) 誘導結合プラズマ発光分析法

① 装置及び器具

・電気炉：熱電対温度計付きのもので500±10℃に設定できるものを用いる。

・ホットプレート

・水浴

・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1g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（Mil estone社製ETHOS 1 同等品）

② 試薬

・塩酸

・塩酸（1+1）：塩酸1容に対し水1容を加え混和する。

・塩酸（1→40）：塩酸を水で希釈して用いる。

・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

・過酸化水素

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塩酸（1→40）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℃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、塩酸（1→40） 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、蒸発乾固を行う。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（注1）。

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、塩酸

(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1g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（Mil estone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℃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℃）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。

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

(1→40) 又は 硝酸 (1→10) 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0.1～1gをあらかじめ硝酸 (1→10) 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、塩酸 (1→40) 又は 硝酸 (1→10) 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  
(略)

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 (Cng/mL) を求める 注2)。

< ICP-AES測定条件例 >

機種 : iCAP7400 (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 : 0.5L/分 (アルゴン)

ネブライザーガス : 0.5L/分 (アルゴン)

ネブライザー : 標準ネブライザー

測定方式 : 同軸モード

測定波長 : 202.03 nm

⑤ (略)

[注]

1) 必要に応じて塩酸 (1+1) の添加量を調整して標準溶液と塩酸濃度を近付ける。

2) 試験溶液中の元素組成の影響などにより測定時に物理干渉を受ける場合は、内標元素を用いて補正を行っても良い。

20 ヨウ素

(1) 滴定法

① (略)

② 試薬

酸 又は 硝酸硝酸 (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0.1～1g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  
(略)

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 (Cng/mL) を求める。

< ICP-AES測定条件例 >

機種 : iCAP7400 (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 : 0.5L/分 (アルゴン)

ネブライザーガス : 0.5L/分 (アルゴン)

ネブライザー : 標準ネブライザー

測定方式 : 同軸モード

測定波長 : 202.03 nm

⑤ (略)

(新設)

20 ヨウ素

(1) 滴定法

① (略)

② 試薬

・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。

・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100 mLを徐々に滴下する。発生する塩素ガスを2w/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：水5容に対し硫酸1容を加え、混和する。

・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 （略）

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硫酸(1→6)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メーターを用いて硫酸(1→6)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、硫酸(1→6)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 （略）

(2) ガスクロマトグラフ法

①・② （略）

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。

・ヘキサシ

・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2w/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 （略）

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 （略）

(2) ガスクロマトグラフ法

①・② （略）

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。

・ヘキサシ：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：市販のイオンクロマトグラフ分析用等の標準溶液又はヨウ化カリウム（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。

④～⑥ （略）

[参考文献] （略）

### (3) 誘導結合プラズマ質量分析法

#### ① 装置及び器具

- ・遠心分離機<sup>注1)</sup>：スイングローター使用
- ・誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）：四重極、コリジョンセルなどの分子イオン干渉を除去する機能が装備されたもの
- ・試料抽出容器：メタルフリープラスチック製容器（容量50mL、SCP Science製、DigiTUBES同等品）

#### ② 試薬

- ・テトラメチルアンモニウムヒドロキシド（TMAH）：超高純度分析用試薬（TAMA PURE-AA（25%）などヨウ素濃度が1 ng/mL以下のもの）。イオン交換水で希釈して用いる。
- ・テルル溶液：市販のテルル標準溶液1000µg/mLを0.5mLとり、イオン交換水で250mLとする。
- ・ヨウ素標準溶液：市販のイオンクロマトグラフ分析用等の標準溶液を適宜希釈又はヨウ化カリウム（試薬特級）を0.1308g量り取り、イオン交換水を用いて100mLに定容したものをヨウ素標準原液1000µg/mLとする。ヨウ素標準原液1000µg/mLをイオン交換水で1µg/mLとしたものを10、25、50、250及び500µLとり、それぞれに25%TMAH1mLを添加した後、容量50 mLメタルフリープラスチック製容器に定容する。これらを10mL分取し2µg/mLテルル溶液を100µL加えたものをヨウ素標準溶液とする。

#### ③ 試料溶液の調製

試料0.5～3（W）gを容量50mLメタルフリープラスチック製容器にとり、0.5%TMAH溶液50 mLを加え、ふたをしてよく混和し、60℃で一晩放置する。放冷後、1972×g（ローター半径19.6 cmの場合3000回転/分）で10分間遠心分離した後、上澄み液10 mLをとり、2 µg/mLテルル溶液を100µL加えたものを試料溶液とする。

#### ④ 測定

測定用標準溶液についてICP-MSを用い、それぞれ内標準物質とのイオンカウント比を求め、ヨウ素の濃度により検量線を作成する。同様に、試料溶液を測定し、あらかじめ作成した検量線から試料溶液中のヨウ素濃度（A）を求める。

- ・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。

④～⑥ （略）

[参考文献] （略）

### (新設)

<ICP-MS 測定条件例>

機種：Agilent 7500ce (アジレント・テクノロジー (株))

導入速度：1.0 mL/分

プラズマ条件：

RF パワー：1.6 kW

プラズマガス：15 L/分 (アルゴン)

キャリアーガス：0.70 L/分 (アルゴン)

メイクアップガス：0.29 L/分 (アルゴン)

ネブライザー：Micro Mist ネブライザー

測定質量数：127 (内標準：テルル128)

ガスモード：ノンガスモード

⑤ 計算

$$\text{ヨウ素含量}(\mu\text{g} / 100\text{g}) = A \times f \times \frac{50}{W} \times \frac{1}{10}$$

A：試料溶液のヨウ素濃度 (ng/mL)

f：標準溶液のファクター

W：試料採取量 (g)

[注]

1) コクサンH-80F同等品

21 リン

(1) バナドモリブデン酸吸光光度法

① (略)

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1L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

・アンモニア水

・硝酸

・塩酸

・硫酸

・過塩素酸

・アンモニア水 (1+49)、硝酸 (1+9)、塩酸 (1+1)：各試薬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。

21 リン

(1) バナドモリブデン酸吸光光度法

① (略)

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1L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。

・塩酸（1→40）：塩酸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℃の電気炉中で灰化する<sup>注1</sup>。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、塩酸（1→40）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）、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. （略）

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、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 μg/mL）を求め、試料中の含量を算出する。

⑤ （略）

[注]

1) リンは500℃を超えると揮発するおそれがあるため、灰化に注意が必要である。

(2) モリブデンブルー吸光光度法

① （略）

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

・硫酸

・硫酸（2+1）：硫酸2容に対し水1容を加え混和する。

・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。

・アンモニア水

・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℃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）、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. （略）

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 μg/mL）を求め、試料中の含量を算出する。

⑤ （略）

（新設）

(2) モリブデンブルー吸光光度法

① （略）

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

・塩酸

・硝酸

・過塩素酸

・塩酸 (1→40) : 塩酸を水で希釈して用いる。

・アンモニア水 (1+49)、塩酸 (1+1) : 各試薬 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 ℃ 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、塩酸 (1→40) 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)、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. (略)

④・⑤ (略)

(3) 誘導結合プラズマ発光分析法

① (略)

② 試薬

・硝酸

・硫酸

・過塩素酸

・塩酸 (1+1) : 塩酸1容に対し水 1 容を加え混和する。

・塩酸 (1→40) : 塩酸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塩酸 (1→40) 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 ℃ 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、塩酸 (1→40) 20 mL を加え、

・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 ℃ 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)、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. (略)

④・⑤ (略)

(3) 誘導結合プラズマ発光分析法

① (略)

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 ℃ 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分間ホットブ

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<sup>注1)</sup>。

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. (略)

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<sup>注2)</sup>。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<sup>注3)</sup>。

⑤ (略)

[注]

1) 必要に応じて塩酸（1+1）の添加量を調整して標準溶液と塩酸濃度を近付ける。

2) 必要に応じて他の波長を用いても良い。

3) 試料溶液中の元素組成の影響などにより測定時に物理干渉を受ける場合は、内標元素を用いて補正を行っても良い。

22 ナイアシン（ナイアシン当量として）  
(略)

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。

②～⑥ (略)

(2) 微生物学的定量法

①・② (略)

③ 試薬

・0.5 mol/L硫酸：水35容に対し硫酸1容を加え、混和する。

・5 mol/L水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム20 gを水に溶かして100 mLとする。

・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、

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。

b. (略)

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 (略)

(新設)

22 ナイアシン（ナイアシン当量として）  
(略)

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。

②～⑥ (略)

(2) 微生物学的定量法

①・② (略)

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±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 μg
チアミン塩酸塩	200 μg
ビオチン	0.8 μg
p-アミノ安息香酸	200 μg
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	0.25g
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	20.0g

・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・⑤（略）

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

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±0.1）

カザミノ酸	14g
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 μg
チアミン塩酸塩	200 μg
ビオチン	0.8 μg
p-アミノ安息香酸	200 μg
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	20.0g

・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・⑤（略）

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 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2)</sup>。標準溶液の濁度より検量線を作成し<sup>注3)</sup>、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 （略）

[注]

1)・2) （略）

3) 直線回帰、ロジスティック回帰等から適切なフィッティング法を選択し、検量線を作成する。

[参考文献]

1) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会食品成分委員会編：“日本食品標準成分表2015年版（七訂）分析マニュアル・解説”，27 ナイアシン，150-152（2016）

2) 食品衛生学雑誌，59，3，141-145（2018）

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 （略）

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 μg/mL）。

・0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム0.4 gを水に溶かして100 mLとする。

・水酸化バリウム八水和物（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八水和物7.8 gを封管用試験管に精秤し、水4.5 mL及び60 %チオジェチレングリコール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 °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容量全量フラスコ（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）、適宜水で希釈する（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・⑤ （略）

[注] （略）

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 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 （略）

[注]

1)・2) （略）

（新設）

（新設）

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 （略）

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 μg/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 %チオジェチレングリコール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 °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容量全量フラスコ（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）、適宜水で希釈する（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・⑤ （略）

[注] （略）

(1) 微生物学的定量法

① (略)

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となるようにする。
- ・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で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) 5g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, Type I-S又は同等品)を水に溶かして2w/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。

・1 mol/L塩酸：塩酸1容に対し水11容を加え混和する。

・1 mol/L水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム4 g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(1L中、pH6.8±0.1)

カザミノ酸	14 g
L-シスチン	400mg
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

(1) 微生物学的定量法

① (略)

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となるようにする。
- ・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で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) 5g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, Type I-S又は同等品)を水に溶かして2w/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(1L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)	20g
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 (略)

④ 試験溶液の調製<sup>注5)</sup>

試料2g(Wg)を精秤してトリス塩酸緩衝液10 mLと水20 mLを加え、121℃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、2w/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℃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20 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10 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℃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℃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

硫酸マグネシウム	400 mg
硫酸第一鉄	20 mg
硫酸マンガン	20 m
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 (略)

④ 試験溶液の調製<sup>注5)</sup>

試料2g(Wg)を精秤してトリス塩酸緩衝液10 mLと水20 mLを加え、121℃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、2w/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℃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℃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℃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<sup>註7)</sup>、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  $\mu$ g/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 (略)

[注]

1) ~ 4) (略)

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 又は食品種 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2g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pH 6.8~7.0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及びパパイン(富士フィルム和光純薬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 液体等水分量の多い食品や、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部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。

7) 直線回帰、ロジスティック回帰等から適切なフィッティング法を選択し、検量線を作成する。

[参考文献]

1) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会食品成分委員会編:

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  $\mu$ g/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 (略)

[注]

1) ~ 4) (略)

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2g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pH 6.8~7.0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部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。

(新設)

(新設)

”日本食品標準成分表2015年版（七訂）分析マニュアル・解説”，31パン  
トテン酸，164-167（2016）

2) 食品衛生学雑誌，59，3，141-145（2018）

## 24 ビオチン

### (1) 微生物学的定量法

#### ① (略)

#### 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となるようにする。

・2 mol/L硫酸：水8容に対し硫酸1容を加え、混和する。

・3 mol/L硫酸：水5容に対し硫酸1容を加え、混和する。

・5 mol/L水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム20 gを水に溶かして100 mLとする。

・1 mol/L水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム4 gを水に溶かして100 mLとする。

・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

## 24 ビオチン

### (1) 微生物学的定量法

#### ① (略)

#### 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となるようにする。

・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	5.0mg
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 (略)

④ 試験溶液の調製<sup>注4)</sup>

試料2gを精秤し(W g)、2mol/L又は3mol/L硫酸25 mLを加え<sup>注5)</sup>、121°Cで1時間オートクレーブで加圧分解する。冷却後、5mol/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)、1mol/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6)</sup>。標準溶液の濁度より検量線を作成し<sup>注7)</sup>、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 (略)

[注]

1)～3) (略)

4) ビオチン含量の高い食品又は主に遊離型のビオチンを含み、液体等水分の多い食品については、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。

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 (略)

④ 試験溶液の調製<sup>注4)</sup>

試料2gを精秤し(W g)、2mol/L又は3mol/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、5mol/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)、1mol/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 (略)

[注]

1)～3)

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) 酸分解不足の場合に 3 mol/L 硫酸を使用する。

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。

7) 直線回帰、ロジスティック回帰等から適切なフィッティング法を選択し、検量線を作成する。

[参考文献]

1) ~ 3) (略)

4) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会食品成分委員会編：“日本食品標準成分表2015年版（七訂）分析マニュアル・解説”，32 ビオチン，168-170（2016）

5) 食品衛生雑誌，59，3，141-145（2018）

25 ビタミンA（レチノール活性当量として）  
(略)

[注] (略)

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。

・振とう機

・遠心分離機

・ロータリーエバポレーター

② 試薬

- ・水酸化カリウム溶液：粒状水酸化カリウム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。

・標準レチノール：日本薬局方標準品「レチノールパルミチン酸エステル」又は同等品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に溶解した後、標準溶液の検定を行う。

・ピロガロール：特級

・エタノール

(新設)

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。

(新設)

[参考文献]

1) ~ 3) (略)

(新設)

(新設)

25 ビタミンA（レチノール活性当量として）  
(略)

[注] (略)

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 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1)</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

- ・塩化ナトリウム
- ・石油エーテル：特級
- ・ヘキサン
- ・酢酸エチル

- ・エーテル：過酸化物を含まないもの。
- ・メタノール
- ・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

試料約0.5 g<sup>注1)</sup>を60 mL容遠心管（共栓付き）に精密に量り（W g）、これに1 w/v%塩化ナトリウム溶液2 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20 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2) 注3)</sup>。

#### （削除）

### ④ （略）

### ⑤ 測定

試験溶液の一定量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 μg/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4)</sup>>

カラム：Cosmosil 5C<sub>18</sub>-MS-II（ナカライテスク製）あるいは相当品、内径4.

- ・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7gを石油エーテルに懸濁させ、約7cm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 （略）

### ⑤ 測定

試験溶液の一定量（例20 μL）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 μg/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 5C<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5)</sup>  
流量：1.0 mL/分  
温度：35 °C  
注入量:20 µL

⑥ (略)

[注]

(削除)  
(削除)

1) (略)

2) アルミナカラムクロマトグラフィー

活性アルミナ (Merck Art. 101097 (メルク社製) 又は同等品) 500 g に水50 mL を滴下して加え、振り混ぜて均一にし、密栓、一夜放置し、弱活性アルミナとする。活性度を測定し、一定の活性度のものを使用する。活性度は水の量を加減して調整する。活性度の測定においては、Yellow OB (FD&C Yellow No.4、Colour IndexNo.11390) 20 mg を石油エーテル 10 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。クロマト管 (内径10 mm、高さ250 mm、ガラスコック付き) 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。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。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。

3) ~ 5) (略)

イ カロテン

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 °C

⑥ (略)

[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) (略)

(新設)

4) ~ 6) (略)

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

・振とう機  
・遠心分離機  
・ロータリーエバポレーター

② 試薬

- ・水酸化カリウム溶液：粒状水酸化カリウム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：特級  
・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  
・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）、これに1w/v%塩化ナトリウム溶液2 mLを加えてかくはん後、3w/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℃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、1w/v%塩化ナトリウム溶液2.0 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℃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) (略)

④・⑤ (略)

[注]

- 1) (略)
- 2) Merck Art. 101097（メルク社製）又は同等品
- 3)・4) (略)

(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）、3w/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℃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、1w/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℃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) (略)

④・⑤ (略)

[注]

- 1) (略)
- 2) Merck Art. 1097（メルク社製）
- 3)・4) (略)

(2) 高速液体クロマトグラフ法： $\alpha$ -カロテン、 $\beta$ -カロテン<sup>注1)</sup> <sup>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。

・振とう機

・遠心分離機

・ロータリーエバポレーター

・超音波発生装置

② 試薬

- ・水酸化カリウム溶液：粒状水酸化カリウム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：特級

・エタノール

・塩化ナトリウム

・石油エーテル：特級

・シクロヘキサン：特級

・イソプロピルアルコール

・ヘキサン

・酢酸エチル

・メタノール

・クロロホルム

- ・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

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）、これに1 w/v%塩化ナトリウム溶液2 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20 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  $\mu$ 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、果物又は藻類等の場合は次の操作で試験溶液を得る。試料0.5～8

(2) 高速液体クロマトグラフ法： $\alpha$ -カロテン、 $\beta$ -カロテン<sup>注1)</sup> <sup>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。

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）、これに1 w/v%塩化ナトリウム溶液2 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  $\mu$ g/mLとなるように希釈し（希釈倍数：D）、試験溶液とする。

2) 野菜又はジュース場合は次の操作で試験溶液を得る。試料約2 gを60 mL

g を容量100 mL 全量フラスコに精密に量り (W g)、ピロガロール 2g、水 5mL、HEAT (n-ヘキサン：アセトン：エタノール：トルエン=10：7：6：7) 40 mL 及びエタノール20 mLを加え、15分間振とうする。エタノール液で定容し (V<sub>1</sub> mL)、10分間超音波槽で処理する。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、エタノール10 mL 及び60 %水酸化カリウム溶液 2mL を加え、70 °Cの水浴中で 30 分間加熱する。水冷後、1w/v%塩化ナトリウム溶液20 mL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β-カロテン含量の高い場合はけん化操作を省略する。

④ (略)

⑤ 測定

試験溶液の一定量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：InertsilODS-4 (ジーエルサイエンス製) あるいは相当品、内径4.6 mm、長さ250 mm、ステンレス製

移動相：アセトンニトリル-メタノール-テトラヒドロフラン-酢酸 (55:40:5:0.1、0.05 g/L α-トコフェロール含有)<sup>注5)</sup>

流量：1.5 mL/分

測定波長：455 nm

温度：40 °C

注入量:20 μL

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：検量線から求めた試験溶液の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

容の遠心管 (共栓付き) に精密に量り (W g)、3w/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3w/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、3w/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 1mLを加え、70 °Cの水浴中で30分間加熱する。水冷後、1w/v%塩化ナトリウム溶液23 mLとイソプロピルアルコール 6mL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β-カロテン含量の高い場合はけん化操作を省略する。

④ (略)

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、果物又は藻類等の場合の計算式)

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) (略)
- 2) クリプトキサンチンは、フナコシ0317S (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、=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 μg含むように調製する。
- 3) α-カロテン標準品は、富士フィルム和光純薬035-17981又は相当品を、β-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) α-カロテンとβ-カロテンの分離とともに、β-カロテンのシス体も分離する。シス体のβ-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β-カロテン値とする。
- 5) リコピンの含有量が少ない場合は、メタノール-クロロホルム(96:4)でも分析可能である。

[参考文献] (略)

26 ビタミンB<sub>1</sub>  
(略)

[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及びビスベンチアミンについては、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

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) (略)
- 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、=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 μg含むように調製する。
- 3) α-カロテン標準品は、和光純薬工業社035-17981又は相当品を、β-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) α-カロテンとβ-カロテンの分離とともに、β-カロテンのシス体も分離する。シス体のβ-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β-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 μg/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)(α-トコフェロールを50 μg/mL含む。)を使用した方がよい。

[参考文献] (略)

26 ビタミンB<sub>1</sub>  
(略)

[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

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) 2)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) (略)

2) 86 チアミン誘導体、食品衛生検査指針 食品添加物編, 429-436 (2003)

(1) 高速液体クロマトグラフ法<sup>注1)</sup>

① (略)

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」

・1 mol/L塩酸：塩酸1容に対し水11容を加え混和する。

・0.1 mol/L塩酸：塩酸1容に対し水120容を加え混和する。

・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2L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 (pH 2.2)：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2L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1L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。

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) (略)

(新設)

(1) 高速液体クロマトグラフ法<sup>注1)</sup>

① (略)

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2L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 (pH 2.2)：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2L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1L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レンジ (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<sup>注4) 注5)</sup>。

④ (略)

⑤ 測定

HPLC用試験溶液の一定量を高速液体クロマトグラフに注入し<sup>注6)</sup>、ビタミンB<sub>1</sub>のピーク高さを測定し、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、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 (略)

[注]

1) (略)

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 (富士フィルム和光純薬) 又は同等品 (ホスファターゼ活性を有するもの)。

3) (略)

4) 精製には、ミニカラム (陽イオン交換樹脂) を用いてもよい。

メーカーの説明に従ってコンディショニングしたBOND ELUT Jr, SCX500 mg (アジレント・テクノロジー (株)) 又は同等品に、2~20 mLの試験溶液 (チアミン20 µg以下) を通液し (V<sub>2</sub> mL)、5 mLの水で洗浄した後、10 mLのメタノール・脱着液 (1:4) 5 mLの水でメタノール・脱着液 (1:4) 溶出し、脱着液で定容 (V<sub>3</sub> mL) とし、適宜、メタノール・脱着液 (1:9) で希釈して (希釈倍数: D)、HPLC用試験溶液とする。

5) カラムスイッチング法を用いてもよい。

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レンジ (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 (略)

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) 注5)</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 (略)

[注]

1) (略)

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 (薬和光純薬工業) 又は同等品 (ホスファターゼ活性を有するもの)

3) (略)

(新設)

(新設)

6)～8) (略)

[参考文献]

1) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会食品成分委員会編：“日本食品標準成分表2015年版（七訂）分析マニュアル・解説”，25 チアミン（ビタミンB<sub>1</sub>），138-146（2016）

(2) チオクローム法

① (略)

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」

・0.1 mol/L塩酸：塩酸1容に対し水120容を加え混和する。

・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。

・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<sup>注4)</sup>。

④～⑥ (略)

[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（富士フィルム和光純薬）又は同等品（フォスファターゼ活性を有するもの）。

2)～3) (略)

4)～6) (略)

(新設)

(2) チオクローム法

① (略)

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。

④～⑥ (略)

[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)～3) (略)

4) 精製には、ミニカラム (陽イオン交換樹脂) を用いてもよい。メーカーの説明に従ってコンディショニングしたBOND ELUTJr. SCX500 mg (アジレント・テクノロジー (株)) 又は同等品に、2~20 mL の試験溶液 (チアミン 20 µg 以下) を通液し (V<sub>2</sub> mL)、5 mL の水で洗浄した後、10 mL のメタノール・脱着液 (1 : 4) 5 mLの水でメタノール・脱着液 (1 : 4) 溶出し、脱着液で定容 (V<sub>3</sub> mL) とし、適宜、メタノール・脱着液 (1 : 9) で希釈して (希釈倍数 : D)、HPLC 用試験溶液とする。

27 ビタミンB<sub>2</sub>  
(略)

[注]

1) 食品添加物として用いられるビタミンB<sub>2</sub>酪酸エステルは、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。

[参考文献]

- 1) 92 リボフラビン及びその誘導体、食品衛生検査指針 食品添加物編, 478-485 (2003)
- 2) (2) ビタミンB<sub>2</sub>、食品衛生検査指針 理化学編, 113-117 (2015)

(1) 高速液体クロマトグラフ法<sup>注1)</sup>

① (略)

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。
- ・0.1 mol/L塩酸 : 塩酸 1 容に対し水120容を加え混和する。
- ・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
- ・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

③・④ (略)

⑤ 測定

試験溶液の一定量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 5C<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)

(新設)

27 ビタミンB<sub>2</sub>  
(略)

[注]

1) 食品添加物として用いられるビタミンB<sub>2</sub>酪酸エステルは、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。

(新設)

(1) 高速液体クロマトグラフ法<sup>注1)</sup>

① (略)

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・④ (略)

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 5C<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 ℃

注入量：20 μL

⑥ (略)

[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 (富士フィルム和光純薬) 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。ピ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。

・振とう機

・蛍光灯

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 2L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。
- ・0.1 mol/L塩酸：塩酸 1容に対し水120容を加え混和する。
- ・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1L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：蛍光のないもの。
- ・無水硫酸ナトリウム
- ・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

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 ℃

注入量：20 μL

⑥ (略)

[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。ピ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 2L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1L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 試料（1～10 g）を100 ml容抽出瓶に精密に量り取る（Wg）。これに0.1mol/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℃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℃で一夜保温後、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。

④～⑥ （略）

[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（富士フィルム和光純薬）又は同等品（フォスファターゼ活性を有するもの）。

2) （略）

## 28 ビタミンB<sub>6</sub>

(1) 微生物学的定量法

① （略）

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。

・0.055 mol/L塩酸：塩酸1容に対し水210容を加え混和する。

・0.5 mol/L硫酸：硫酸1容に対し水35容を加え混和する。

・10 mol/L水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム40 gを水に溶かして100 mLとする。

・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>。

③ 試料（1～10 g）を100 ml容抽出瓶に精密に量りとる（Wg）。これに0.1mol/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℃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℃で一夜保温後、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。

④～⑥ （略）

[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) （略）

## 28 ビタミンB<sub>6</sub>

(1) 微生物学的定量法

① （略）

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・④（略）

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<sup>注5)</sup>、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の含量を算出する。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（略）

[注]

1)・2)（略）

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

・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・④（略）

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の含量を算出する。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（略）

[注]

1)・2)（略）

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。

5) 直線回帰、ロジスティック回帰等から適切なフィッティング法を選択し、検量線を作成する。

[参考文献]

1) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会食品成分委員会編：“日本食品標準成分表2015年版（七訂）分析マニュアル・解説”，28 ビタミンB<sub>6</sub>（ピリドキシン，ピリドキサル，ピリドキサミンなど），153-155（2016）

2) 食品衛生学雑誌，59，3，141-145（2018）

29 ビタミンB<sub>12</sub>

(1) 微生物学的定量法

① (略)

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合物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>註1)</sup> ATCC 7830 (NBRC 3376)

・ ビタミンB<sub>12</sub>測定用培地（1L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	<u>20</u> 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

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。

(新設)

(新設)

29 ビタミンB<sub>12</sub>

(1) 微生物学的定量法

① (略)

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合物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>註1)</sup> ATCC 7830 (NBRC 3376)

・ ビタミンB<sub>12</sub>測定用培地（1L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	<u>200</u> 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・④（略）

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>12</sub>標準溶液（0～0.15 ng相当量）を試験管 2 本ずつにとり、それぞれに測定用培地2.5 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、各試験管に接種菌液 1 滴（約30 μL）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<sup>注6)</sup>、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（略）

[注]

塩酸ピリドキシン	4 mg
塩酸ピリドキサール	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・④（略）

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>12</sub>標準溶液（0～0.15 ng相当量）を試験管 2 本ずつにとり、それぞれに測定用培地2.5 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、各試験管に接種菌液 1 滴（約30 μL）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600 nm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（略）

[注]

- 1) (略)
- 2) ビタミンB<sub>12</sub> 定量用基礎培地「ニッスイ」：日水製薬

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) ~ 5) (略)
- 6) 直線回帰、ロジスティック回帰等から適切なフィッティング法を選択し、検量線を作成する。

[参考文献]

- 1) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会食品成分委員会編：“日本食品標準成分表2015年版（七訂）分析マニュアル・解説”，29 ビタミンB<sub>12</sub>（コバラミン類），156-159（2016）
- 2) 食品衛生学雑誌，59，3，141-145（2018）

30 ビタミンC

ビタミンCは、L-アスコルビン酸（還元型ビタミンC）及びL-デヒドロアスコルビン酸（酸化型ビタミンC）を測定の対象とし、その測定値の合計とする。

(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。

・遠心分離機

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
- ・2w/v%チオ尿素含有5%メタリン酸溶液：チオ尿素（特級）2gを5%メタリン酸で溶解し、100 mLとする。
- ・4.5 mol/L硫酸：硫酸1容に対し水3容を加え混和する。
- ・ヒドラジン溶液：2,4-ジニトロフェニルヒドラジン（特級）2g<sup>註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

- 1) (略)
- 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) ~ 5) (略)
- (新設)

(新設)

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
- ・2w/v%チオ尿素含有5%メタリン酸溶液：チオ尿素（特級）2g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）2g<sup>註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

試料（1～5 g）を精密に量り（W g）、5%メタリン酸溶液と海砂（必要に応じて加える。）を加え、乳鉢等で十分にすりつぶす<sup>注2)</sup>。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 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）、試験溶液とする。

（削除）

### ④ （略）

### ⑤ 測定

#### 1) 試験溶液

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、2)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 μg/mL）を求める。

（削除）

### 2) （略）

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<sub>1</sub> g）、5%メタリン酸溶液と海砂（必要に応じて加える。）を加え、乳鉢等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<sub>1</sub> 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<sub>1</sub>）、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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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 （略）

### 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) （略）

⑥ 計算

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

C：検量線から求めた総ビタミンCの濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )

V：定容量 (mL)

D：希釈倍数

W：試料採取量 (g)

(削除)

[注]

1) (略)

2) 必要に応じて海砂を加える。その際は、遠心分離又はろ過により海砂を除いてから定容する。

(2) インドフェノール・キシレン法

①～⑥ (略)

[注] (略)

(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)

・遠心分離機

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

・2w/v%チオ尿素含有5%メタリン酸溶液：チオ尿素 (特級) 2gを5%メタリン酸で溶解し、100 mLとする。

・4.5 mol/L硫酸：硫酸1容に対し水3容を加え混和する。

・ヒドラジン溶液：2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (特級) 2g<sup>注2)</sup>を4.5 mo

⑥ 計算

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

$C_1$ ：検量線から求めた総ビタミンCの濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )

$V_1$ ：定容量 (mL)

$D_1$ ：希釈倍数

$W_1$ ：試料採取量 (g)

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

$C_2$ ：検量線から求めた酸化型ビタミンCの濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )

$V_2$ ：定容量 (mL)

$D_2$ ：希釈倍数

$W_2$ ：試料採取量 (g)

[注]

1) (略)

(新設)

(2) インドフェノール・キシレン法

①～⑥ (略)

[注] (略)

(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

・2w/v%チオ尿素含有5%メタリン酸溶液：チオ尿素 (特級) 2g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) 2g<sup>注2)</sup>を4.5 mo

1/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

試料（1～5 g）を精密に量り（ $W$  g）、5%メタリン酸溶液と海砂（必要に応じて加える。）を加え、乳鉢等で十分にすりつぶす<sup>注3)</sup>。5%メタリン酸溶液を加えてよく混和し50 mLに定容する（ $V$  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： $D$ ）、試験溶液とする。

（削除）

### ④ （略）

### ⑤ オサゾンの生成

#### 1) 試験溶液

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 °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、生成したオサゾンを抽出する。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。

（削除）

#### 2) （略）

### ⑥ 測定

試験溶液一定量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。

1/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、乳鉢等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 （略）

### 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 °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、生成したオサゾンを抽出する。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) （略）

### ⑥ 測定

試験溶液20  $\mu$ L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  $\mu$ 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4)</sup>>

カラム：Silica 2150-N (100) (センシユール科学) あるいは相当品、内径 6.0 mm、長さ150 mm、ステンレス製

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

注入量：20 μL

⑦ 計算

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

C：検量線から求めた総ビタミンCの濃度 (μg/mL)

V：定容量 (mL)

D：希釈倍数

W：試料採取量 (g)

(削除)

[注]

1)・2) (略)

3) 必要に応じて海砂を加える。その際は、遠心分離又はろ過により海砂を除いてから定容する。

4) (略)

(4) 酸化還元滴定法

①・② (略)

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 1g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、上澄み液を用いる。この溶液は用時調製する。

<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) (センシユール科学) 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)

[注]

1)・2) (略)

(新設)

3) (略)

(4) 酸化還元滴定法

①・② (略)

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 1g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℃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・⑤（略）

#### (5) 逆相高速液体クロマトグラフ法

①～③（略）

④ 試験溶液の調製

1)（略）

2) 粉体及び固体食品（半液状食品を含む）

試料を粉砕してその約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、ろ液又は上澄み液は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（略）

⑥ 測定<sup>注2)</sup>

試験溶液一定量を、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<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℃

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

- ・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℃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・⑤

#### (5) 逆相高速液体クロマトグラフ法

①～③（略）

④ 試験溶液の調製

1)（略）

2) 粉体及び固体食品（半液状食品を含む）

試料を粉砕してその約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、ろ液又は上澄み液は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（略）

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℃

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

注入量：10  $\mu$ L

- ⑦ (略)  
[注] (略)

31 ビタミンD  
(略)

(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。

・遠心分離機

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> 又は同等品を用いる。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  $\mu$ g/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

・エーテル

- ・1 w/v%ピロガロール-エタノール溶液：ピロガロール1gにエタノール100 mLを加え溶解する。この溶液は用時調製する。
- ・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1L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>注3)</sup>

- 1) (略)  
2) 分取<sup>注5)</sup>

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 (略)  
[注] (略)

31 ビタミンD  
(略)

(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  $\mu$ g/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1g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1L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

- 1) (略)  
2) 分取

(略)

④ 測定 注5)

測定用試験溶液の一定量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、あらかじめ同量の測定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、試験溶液中の濃度 (C  $\mu\text{g/mL}$ ) 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

注入量:100  $\mu\text{L}$

⑤ (略)

[注]

1) ~ 4) (略)

5) ③-2) 分取の操作を順相高速液体クロマトグラフで行い、④測定の操作を逆相高速液体クロマトグラフで行うことで、ビタミンD<sub>2</sub> とD<sub>3</sub>のピークが分離し、それぞれの標準品を用いて分別定量することができる。

[参考文献]

1) ~ 2) (略)

3) 竹林純他：ビタミン, 85, 645 (2011)

4) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会食品成分委員会編：“日本食品標準成分表2015年版(七訂)分析マニュアル・解説”, 22 カルシフェロール (ビタミンD), 124-127 (2016)

32 ビタミンE  
(略)

(1) 高速液体クロマトグラフ法

① (略)

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

・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

(略)

④ 測定

測定用試験溶液100  $\mu\text{L}$ 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  $\mu\text{L}$ 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、試験溶液中の濃度 (C  $\mu\text{g/mL}$ ) 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 (略)

[注]

1) ~ 4) (略)

(新設)

[参考文献]

1) ~ 2) (略)

(新設)

(新設)

32 ビタミンE  
(略)

(1) 高速液体クロマトグラフ法

① (略)

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2 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20 mL及びヘキサン-酢酸エチル混液(9:1) 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**なす**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) (略)

④ 標準溶液の調製

1) (略)

2) HPLC用標準溶液

一定量の $\alpha$ -トコフェロール標準原液を褐色**なす**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  $\mu$ L) をHPLCに注入し、試料中の $\alpha$ -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 $\alpha$ -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  $\mu$ g/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

**注入量: 5~50  $\mu$ L**

⑥ (略)

[注] (略)

33 ビタミンK

(略)

(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

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) (略)

④ 標準溶液の調製

1) (略)

2) HPLC用標準溶液

一定量の $\alpha$ -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  $\mu$ L) をHPLCに注入し、試料中の $\alpha$ -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 $\alpha$ -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  $\mu$ g/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 (略)

[注] (略)

33 ビタミンK

(略)

(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>

・遠心分離機

② (略)

③ 試験溶液の調製<sup>注4)</sup>

あらかじめ均質化した試料0.1～1g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。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n-ヘキサン5 mLに溶解し、ミニカラムを用いた精製を行う<sup>注5)</sup>。

④ (略)

⑤ 測定

試験溶液の一定量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 μm、

内径4.6 mm、長さ150 mm、ステンレス製

還元カラム：RC-10 (Shiseido) あるいは相当品、内径4.6 mm、長さ15 mm、

ステンレス製

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<sup>分</sup>  
析用)

移動相2：メタノール：エタノール (50:50、メナキノン-7 分析用)

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6)</sup>

流量：1.0 mL/分

温度：40 °C

注入量：50 μL

⑥ (略)

[注]

1)・2) (略)

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 (富士フィルム和光純薬) 又はこれらの相当品を用いる。

4) 野菜類、肉類、藻類、納豆、みそ類等を主食材とする食品については、日本食品標準成分表2015年版(七訂)分析マニュアル(24 フィロキノン

たカラム)

・還元カラム：白金黒<sup>注2)</sup>

② (略)

③ 試験溶液の調製<sup>注4)</sup>

あらかじめ均質化した試料0.1～1g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 (略)

⑤ 測定

試験溶液50 μL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 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 μm、

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 (略)

[注]

1)・2) (略)

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。

(新設)

及びメナキノン類（ビタミンK），131-137）に記載の抽出方法を用いることができる。

5） 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）を用いてきょう雑物を除去する。メーカーの説明に従ってコンディショニングしたSep-pak silica 690 mg（ウオーターズ、WAT020520）又は同等品に、試験溶液の全量を通液し、さらに30 mLのヘキサン・ジエチルエーテル混液（85:15）で数回に分けて容器を共洗いしながらカートリッジに通液する。全溶出液を回収し、減圧留去の後、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。

6） 一部きょう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) ～ 3) (略)
- 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 (略)
- ② 試薬

- ・ 0.1 mol/Lリン酸緩衝液：リン酸二水素カリウム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1L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：トリ胨臓凍結乾燥粉末<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（1L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

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) ～ 3) (略)
- 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 (略)
- 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1L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（1L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 $\mu$ g
パラアミノ安息香酸	2 mg
パントテン酸カルシウム	800 $\mu$ g
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
キサンチン	20 mg
リボフラビン	1 mg
塩酸チアミン	400 $\mu$ g
ビオチン	20 $\mu$ g
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 $\pm$ 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。

③ （略）

④ 試験溶液の調製<sup>注3)</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<sup>注4)</sup>。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 ~

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 $\mu$ g
パラアミノ安息香酸	2 mg
パントテン酸カルシウム	800 $\mu$ g
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
キサンチン	20 mg
リボフラビン	1 mg
塩酸チアミン	400 $\mu$ g
ビオチン	20 $\mu$ g
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 $\pm$ 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 （略）

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<sup>注4)</sup>。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 注3)

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2.5 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 注6)。標準溶液の濁度より検量線を作成し 注6)、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 (略)

[注]

1) (略)

2) 旧名称は *Lactobacillus casei* である。

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

(削除)

3) (略)

4) タンパク含量が多く葉酸と結合していると考えられる場合は、プロテアーゼ処理として以下の操作を行っても良い。

「冷却後、プロテアーゼ溶液1 mLを加え37 °Cで2時間保温し、オートクレーブで100 °C、10分間加熱する。」

5) (略)

6) 直線回帰、ロジスティック回帰等から適切なフィッティング法を選択し、検量線を作成する。

[参考文献]

1) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会食品成分委員会編：“日本食品標準成分表2015年版（七訂）分析マニュアル・解説”，30 葉酸，160-163（2016）

2) 食品衛生学雑誌，59，3，141-145（2018）

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 注1)。

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 注4)

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2.5 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 注6)。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 (略)

[注]

1) (略)

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「ニッスイ」：日水製薬

一般乳酸菌接種用培地「ニッスイ」：日水製薬

4) (略)

(新設)

5) (略)

(新設)

(新設)

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 注1)。

- ① たんぱく質 4kcal/g
- ② 脂質 9kcal/g
- ③ 炭水化物 4kcal/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、7kcal/gを、有機酸<sup>注3)</sup>については、3kcal/gを、難消化性糖質については、適切なエネルギー換算係数<sup>注4)</sup>を用いる。また、食物繊維については2kcal/g又は素材に応じた適切なエネルギー換算係数を用いて算出すること。

なお、難消化性糖質及び食物繊維のエネルギー換算係数として (6) 及び (7) に掲げる表の係数を用いても差し支えない。

[注] (略)

- (2) アルコール<sup>注1)</sup>  
(略)

[注] (略)

1) 浮ひょう法

- ①・② (略)
- 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<sup>注1)</sup>、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。

[注]

1) アルコール度数が高い試料は留液の採取量を以下を目安に多くする(アルコール度数22未満のときは93 mL以上、14未満のときは87 mL以上)。

2) 振動式密度計法

- ①～③ (略)

3) ガスクロマトグラフ法<sup>注1)</sup>

- ①～④ (略)

[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のエチルアルコールを質量で量り 取れば質量百分率の定量結果が得られる。

- ① たんぱく質 4kcal/g
- ② 脂質 9kcal/g
- ③ 炭水化物 4kcal/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、7kcal/gを、有機酸<sup>注3)</sup>については、3kcal/gを、難消化性糖質については、適切なエネルギー換算係数<sup>注4)</sup>を用いる。また、食物繊維については2kcal/g又は素材に応じた適切なエネルギー換算係数を用いて算出すること。

なお、難消化性糖質及び食物繊維のエネルギー換算係数として (5) 及び (6) に掲げる表の係数を用いても差し支えない。

[注] (略)

- (2) アルコール<sup>注1)</sup>  
(略)

[注] (略)

1) 浮ひょう法

- ①・② (略)
- 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。

(新設)

2) 振動式密度計法

- ①～③ (略)

3) ガスクロマトグラフ法<sup>注1)</sup>

- ①～④ (略)

[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の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>

①～④ (略)

[注] (略)

5) 酸化法 2 <sup>注1)</sup>

①・② (略)

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℃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。

・濃硫酸

・8 w/v%ヨウ化カリウム溶液：ヨウ化カリウム80 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は次式により計算する。

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 (略)

[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) (略)

[参考文献] (略)

(3) 飽和脂肪酸の熱量

4) 酸化法 1 <sup>注1)</sup>

①～④ (略)

[注] (略)

5) 酸化法 2 <sup>注1)</sup>

①・② (略)

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℃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。

・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は次式により計算する。

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 (略)

[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は、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) (略)

[参考文献] (略)

(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>

(削除)

①～⑥ (略)

[注]

1)・2) (略)

3) プレカラムRSpak KC-810PをセットにしたShodex RSpak KC-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) 糖アルコール類

① 装置及び器具

- ・ロータリーエバポレーター
- ・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砕する。

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

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。

②～⑦ (略)

[注]

1)・2) (略)

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。

(新設)

分間超音波抽出した後、水で全量を50 mL容量フル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、ピ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ロータリーエバポレーターで濃縮して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<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℃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同量を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 5NH2 (富士フイルム和光純薬) 又は相当品<sup>注10)</sup>、内径

4.6 mm、長さ250 mm、ステンレス製

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  $\mu$ L

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、ステンレス製

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  $^{\circ}$ C

注入量：5  $\mu$ L

#### ⑦ 計算

$$\text{試料中の各糖アルコール含量 (g/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W} \times \frac{100}{1000}$$

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  $^{\circ}$ 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、8 食物繊維（2）高速液体クロマトグラフ法（酵素-HPLC法）等に記された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 NH2P-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。

(6)・(7) (略)

別添 アレルゲンを含む食品に関する表示 ～ 別添 Shellfish Growing Areas Classified for Harvest for Human Consumption in Accordance with Regulation 48 of the Animal Products (略)

(5)・(6) (略)

別添 アレルゲンを含む食品に関する表示 ～ 別添 Shellfish Growing Areas Classified for Harvest for Human Consumption in Accordance with Regulation 48 of the Animal Products (略)