

[注]

1) 本試験法はけん化処理後、 α -トコフェロールを有機溶媒で抽出する方法であるため、食品中に酢酸 dl- α -トコフェロールのようなエステル型のビタミンEが含まれている場合はこれらに由来する量も含めた α -トコフェロールの合計量が求められる。

2) ビタミンE同族体セット（エーザイ製）又は同等品を用いる。 α -トコフェロールは国立衛生試験所日本薬局方標準品がある。

3) 試料中のマトリックスの影響により抽出が不十分となる場合は、抽出溶媒に2-プロパノールを添加することで改善する場合がある。

4) 標準溶液を保存する場合は、予め保存安定性データを確認し保存条件及び保存期間を設定する。

5) 保存中の酸化が懸念される場合は、予めデータを確認したうえで、ブチルヒドロキシトルエン（BHT）またはエトキシキン等の酸化防止剤を添加すると良い。

6) 予めデータを確認し、検量線の直線性が確認できれば、標準溶液の濃度範囲は適宜変更可能である。

7) 試料が生鮮食品の場合、そのまま粉砕するとビタミンEが分解する恐れがあるので、試料にピロガロール、水及び必要に応じてエタノールを加えミル等で均一化処理を行うとよい。予めデータを確認出来れば、採取量は適宜変更してもよいが、最終溶液中の濃度が検量線の範囲に入るようにする。また、粉砕による試料の均一化が困難な場合は、上記生鮮食品の場合と同様に均一化処理を行ってから採取するか、または試料採取量を増やし、抽出容量も採取量に合わせてスケールアップするとよい。

8) 試料を十分湿潤させるため、予めデータを確認した上で、添加する1%塩化ナトリウム溶液の量を適宜変更してもよい。ただし、けん化後に加える1%塩化ナトリウムの量を合計で23mlになるように調整する。なお、試料がデンプン質のものなどでは、抽出が不十分になるため、1%塩化ナトリウム溶液を添加できない場合がある。

9) 試料中のマトリックスや添加された酢酸 dl- α -トコフェロールなどの影響でけん化が不十分となる場合は、予めデータを確認したうえで水酸化カリウム溶液の液量を適宜変更するか、または試料採取量を減らす必要がある。

10) 必要に応じて試験溶液をメンブランフィルターでろ過することで、試料溶液中の不溶物を除くことが出来る。また、クロマトグラム上でトコフェロールのピークに妨害成分の重なりのある場合は、予めデータを確認したうえで、固相抽出カラム（BOND ELUT LRC-C18 500MG VARIAN社など）を用い、以下の精製を行なうことで改善されることがある。

試験溶液の一部を取り、溶媒を留去し、メタノール-水混液（9:1 V/V）5ml に溶解し、予めメタノール-水混液（9:1 V/V）10ml でコンディショニングしたBOND ELUT LRC-C18 カートリッジに流し入れ、カラム上部の液がなくなる直前にメタノール-水混液（9:1 V/V）5ml を加え洗浄する。更に1回洗浄後、メタノール5ml で溶出し、溶出液の溶媒を留去後、一定量のヘキサンに再溶解し試験溶液とする。

1.1-2) JASCO Finepak SIL 5（日本分光製）又は相当品を用いる。

その他のカラム充填剤と移動相の他の条件は参考文献 1), 2) 等を参照のこと。

1 2) 測定中の α -トコフェロールの安定性が悪い場合、予めデータを十分確認したうえで、移動相に酸化防止剤(ブチルヒドロキシトルエン(BHT)など)を添加するとよい。

[参考文献]

- 1) 日本ビタミン学会編：ビタミンハンドブック③(ビタミン分析法)，p. 27 (1989)，化学同人
- 2) 五十嵐脩編：ビタミンE—基礎と臨床—，p. 14 (1985)，医歯薬出版
- 3) 氏家隆，武山哲茂，近藤あゆみ，廣江玲子，森光昭：ビタミン，65，393-397 (1991)

32 ビタミンK (フィロキノン，メナキノン-4，メナキノン-7)

(1) 高速液体クロマトグラフ法

① 機器，試薬

- ・高速液体クロマトグラフ：蛍光検出器付き
- ・カラム：逆相型
- ・還元カラム：白金黒^{注1)}
- ・アセトン，ヘキサン，ジエチルエーテル，エタノール：残留農薬試験用^{注2)}
- ・ビタミンK₁ (フィロキノン)，ビタミンK₂ (メナキノン-4)，ビタミンK₂ (メナキノン-7) 標準品^{注3)}
- ・シリカゲルカラム：シリカゲル(20g)をヘキサンで懸濁し，ガラスカラム(内径20mm，高さ300mm)に充填する^{注4)}。
- ・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

② 試験溶液の調製^{注5)}

試料 0.1~2g^{注6)}をガラス製乳鉢に精密に量り，海砂 1g 及び水 5ml を加え混合する。アセトン^{注7)} 20ml を徐々に加え磨碎混合する^{注8)}。ガラスフィルターでろ過し，残留物を乳鉢に戻す。残留物にアセトン^{注7)}を加え抽出を繰り返す^{注9)}。

アセトン溶液を分液漏斗に移し，ジエチルエーテル^{注10)} 100ml を加え混合する。水約 50ml を徐々に加え，ジエチルエーテル層を分離する。水層を別の分液漏斗に移し，ジエチルエーテル 100ml を加え軽く振とうする。ジエチルエーテル層を合わせ，水 50ml で軽く振り洗浄する。硫酸ナトリウム(無水)を漏斗上に入れ，ジエチルエーテル層を通し脱水した後，溶媒を減圧濃縮する。高速液体クロマトグラフによる測定の妨害となる成分を含む場合は必要に応じ，以下の精製を行う。残留物をヘキサン約 5ml に溶解し，シリカゲルカラム^{注11)}に注ぐ。ヘキサン—ジエチルエーテル (97 : 3 V/V) 200ml^{注12)}でビタミンKを溶出する。溶出液を減圧留去後，ビタミンK₁またはビタミンK₂の濃度が検量線の範囲内となるようにエタノール 2ml~5ml を正確に加えて溶解し，試験溶液とする。

③ 標準溶液の調製

標準品 10mg を精密に量りエタノールに溶かし，正確に 100ml とする。更に，エタノールで 25，50，75 及び 100ng/ml となるように希釈する^{注13)}。

④ 測定

一定量の試験溶液（例 20 μl）を高速液体クロマトグラフに注入し、ビタミンK₁及びビタミンK₂のピーク高さまたは面積を測定する。あらかじめ同量の標準溶液 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、試料中のビタミンK₁及びビタミンK₂含量を求める。

⑤ 高速液体クロマトグラフ操作条件例

カラム：内径 4.6mm，長さ 150mm，ステンレス管^{注4)}

移動相：メタノール-エタノール（5：1 V/V）

検出器：蛍光分光光度計

測定波長：励起波長（Ex）320nm^{注15)}，蛍光波長（Em）430nm

還元カラム：白金黒

流量：0.8ml/min

温度：40℃

注入量：20 μl

⑥ 計算

$$\text{ビタミンK}_1 \text{ または ビタミンK}_2 \text{ 含量 } (\mu\text{g}/100\text{g}) = C \times V \times \frac{100}{W} \times 10^{-3}$$

$$\text{ビタミンK 含量 } (\mu\text{g}/100\text{g}) = C \times V \times 100/W$$

ただし、ビタミンK含量にメナキノ-7を含める場合は、次式によりメナキノ-4相当量に換算した量を合計する。

$$\text{メナキノ-4相当量 } (\mu\text{g}/100\text{g}) = \text{メナキノ-7 } (\mu\text{g}/100\text{g}) \times 444.7/649.0$$

C：検量線から求めた試験溶液中のビタミンK₁またはビタミンK₂の濃度（n μg/ml）。

V：定容量（ml）

W：試料採取量（g）

[注]

1) 内径 4.6mm，長さ 10mm。市販品がある（例、リックス医理科機器製、東亜電波工業製）。分離カラムと検出器の間に接続する。

2) 同等性が確認できれば、特級でも使用可能である。

3-2) ビタミンK₁（フィロキノ）は Sigma V-3501（シグマ社），ビタミンK₂（メナキノ-4）は Sigma V-9378（シグマ社），ビタミンK₂（メナキノ-7）は 133-14331（和光純薬工業）あるいはこれらの相当品を用いる。濃度は、ビタミンK₁（フィロキノ）及びビタミンK₂（メナキノ-4）の場合それぞれの標準品をイソオクタタンに溶解（1→100,000）して248.5nmの吸光度を測定し、ビタミンK₁（フィロキノ）はE・=425，ビタミンK₂（メナキノ-4）はE・=429を用いて濃度を算出検定する。

4-3) カラムクロマトグラフィー用シリカゲル Art. 7734（メルク製）。油脂0.8gを除くことが可能である。他に薄層クロマトグラフを用いる方法もある。

5-4) 育児用調製粉乳を対象とした。ただし、野菜類など脂質含量の低いものはシリカゲルカラムのサイズを小さくして試験溶液を調製することもできる [例：シリカゲル，5g；溶出液，ヘキ

サンジエチルエーテル (85:15V/V) 30ml]。

6) 試料の均一性が確認出来れば、採取量は適宜変更することが可能であるが、最終溶液中の濃度が検量線の範囲内に入るように希釈する。また、粉碎による試料の均一化が困難である場合は、試料に水及び必要に応じエタノールを加えミル等で均一化処理を行ってから採取するとよい。

7) アセトンでは抽出不足になる場合は抽出溶媒にメタノールまたはエタノール、もしくは2-プロパノールを使用すると改善される場合がある。ただし、メタノールまたはエタノールもしくは2-プロパノールを用いた場合はその後の液々分配でジエチルエーテルの代わりに、ヘキサン-酢酸エチル混液 (9:1 V/V) を使用する必要があるため、予めデータを確認すること。

8) 乳鉢の代わりにホモジナイザー、超音波発生装置又は振とう機を用いる場合もある。

9-5) 100ml 以内とする。

10) 予めデータを確認出来れば、代替溶媒としてヘキサン-酢酸エチル混液 (9:1 V/V) を用いることができる。

11) 予めデータを確認出来れば、ディスパーザブルミニカラム (例 Sep-Pak Silica) を用いることもできる。溶出液例: ヘキサン-ジエチルエーテル (85:15V/V) 30ml

12) 溶出量はシリカゲルの活性度により変化するので、事前に標準品を用いて回収を確認し、適宜溶出液量を調整する。

13) 予めデータを確認出来れば、検量線の直線性が確認できれば、標準溶液の濃度範囲は適宜変更可能である。

14-6) Cosmosil C₁₈ (ナカライテスク製) あるいは相当品を用いる。

15) 励起波長を 240nm にすると妨害物質の影響が少なくなる場合がある。

[参考文献]

- 1) 佐藤孝義, 八尋政利, 下田幸三, 浅居良輝, 浜本典男: 日本栄養・食糧学会誌, 38, 451 (1985)
- 2) 小高要, 氏家隆, 上野順士, 斎藤実: 日本栄養・食糧学会誌, 39, 124 (1986)
- 3) 坂野俊行, 野津本茂, 長岡忠義, 森本厚, 藤本恭子, 増田佐智子, 鈴木由希子, 平内三政: ビタミン, 62, 393 (1988)
- 4) 日本食品科学工学会, 新・食品分析法編集委員会編: “新・食品分析法”, 343 (1996), 光琳

33 葉酸

(1) 微生物定量法

① 試薬

・0.1mol/L リン酸緩衝液: リン酸二水素カリウム (特級) 13.61g, 水酸化ナトリウム (特級) 4.895.30g, アスコルビン酸 (特級) 20g を水 1L に加えて pH6.1 に調整する。

・葉酸標準溶液: 葉酸 (国立衛生試験所標準品 日本薬局方標準品) 100mg を 0.01mol/L 水酸化ナトリウム 25% (V/V) エタノール溶液に溶かし, 0.1mol/L 塩酸 (特級) で pH7~8 に調整後 25% (V/V) エタノール溶液で 100ml とする。更に, 0.1mol/L リン酸緩衝液で希釈し 2ng/ml の濃度に調整する。

・酵素溶液^{注1)}: 手キンパンクレアス^{注1)} トリ膵臓凍結乾燥末 0.3g に水 100ml を加え 10 分間かくはん後, 遠心分離する。その上澄み液に 10g の Dowex 1-X8 (Cl⁻) 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 (ATCC 7469)^{注2)}

・葉酸測定用培地 (1L 中, pH6. 8±0. 1)

| | |
|-------------|--------|
| カザミノ酸 | 10g |
| ブドウ糖 | 40g |
| L-アスパラギン | 600mg |
| 塩酸ピリドキシン | 4mg |
| L-システイン塩酸塩 | 500mg |
| 硫酸アデニン | 10mg |
| リン酸一水素カリウム | 1g |
| 硫酸マグネシウム | 400mg |
| 酢酸ナトリウム | 40g |
| 硫酸第一鉄 | 20mg |
| 硫酸マンガン | 15mg |
| ポリソルベート 80 | 100mg |
| ニコチン酸 | 800 μg |
| パラアミノ安息香酸 | 2mg |
| パントテン酸カルシウム | 800 μg |
| グルタチオン | 5mg |
| L-トリプトファン | 200mg |
| 塩酸グアニン | 10mg |
| ウラシル | 10mg |
| キサンチン | 20mg |
| リボフラビン | 1mg |
| 塩酸チアミン | 400 μg |
| ビオチン | 20 μg |
| リン酸二水素カリウム | 1g |
| 塩化ナトリウム | 20mg |

・乳酸菌保存用培地 (1L 中, pH6. 8±0. 1)

| | |
|------------|--------|
| 酵母エキス | 5. 5g |
| ブドウ糖 | 11. 0g |
| 硫酸第一鉄 | 5. 0mg |
| 酢酸ナトリウム | 10. 0g |
| 硫酸マンガン | 5. 0mg |
| ペプトン | 12. 5g |
| リン酸二水素カリウム | 0. 25g |
| リン酸一水素カリウム | 0. 25g |
| 硫酸マグネシウム | 0. 1g |
| 粉末寒天 | 20. 0g |

・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^{注3)}。

② 接種菌液の調製

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

③ 試験溶液の調製

試料2g^{注4)}を精密に量り、0.1mol/Lリン酸緩衝液50mlを加え、121℃で15分間オートクレーブ処理を行う。冷却後、0.1mol/Lリン酸緩衝液で100mlに定容し、遠心分離する。上澄み液25mlを正確に量り、酵素溶液5mlを加えて37℃の恒温水槽で2時間酵素処理を行う。その後42±100℃で1510分間オートクレーブ処理加熱し、を行い酵素反応を止める。冷却後、0.1mol/Lリン酸緩衝液で50mlに定容し、ろ過する。^{注5)}更に最終溶液中の葉酸の濃度が検量線の範囲内に入るように0.1mol/Lリン酸緩衝液で希釈し、試験溶液とする^{注6、7)}。

④ 測定

試験管2本ずつに試験溶液0.5、1及び2mlを正確に加え、次に各試験管に測定用培地2.5ml及び水0.1mol/Lリン酸緩衝液を加えて全量を5mlとする。別に検量線作成のため、葉酸標準溶液(0～3ng相当量^{注8)})を試験管2本ずつに正確にとり、それぞれに測定用培地2.5ml及び水0.1mol/Lリン酸緩衝液を加えて全量を5mlとする。121℃で5分間オートクレーブ処理を行い、冷却後、各試験管に接種菌液1滴(約30μl)ずつを無菌的に接種し、37℃で19時間程度恒温水槽に入れて培養する。

培養後、600nmの濁度を用いて測定する^{注9)}。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、試験溶液中の葉酸量を求める。

計算式

試料中の葉酸含有量(μg/100g) = $A \times N \times V \times 100 / (W \times 1000)$

A: 検量線より算出した試験溶液中の葉酸含量(ng)

V: 定容量 N: 希釈値 W: 秤取量(g)

[注]

1) ブタ腎臓コンジュガーゼ(Sigma-K-7250酵素溶液及び反応条件は一例を示した。酵素溶液には、Kidney acetone powder porcine, Type II: Sigma や)を用いてもよい。ラット血漿を用いてもよい。ただし、酵素反応条件を十分に検討し、データの確認を行い使用すること。なお内因性の葉酸除去にはDowex 1-X8(Cl⁻)の他に活性炭も使用できる。また、内因性の葉酸含量を事前に把握しておくことが望ましい。

2) 旧名称はLactobacillus caseiである。

3) BACTO FOLIC ACID CASEI MEDIUM: DIFCO Laboratories 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) 試料の均質性を確認出来れば、試料中の目的成分の濃度によって採取量は適宜変更すること

ができる。

5) 酵素反応条件については予めデータを確認し、至適条件を設定することで変更することができる。

4) 6) 葉酸含量の高い食品については、0.1mol/L 水酸化ナトリウム溶液で振とう抽出し、ろ過して得られたものを試験溶液とすることもできる。あるいは、紫外検出器付き高速液体クロマトグラフで定量することもできる。

高速液体クロマトグラフ操作条件例

測定波長 280nm

カラム TSK gel ODS-80 Ts (東ソー製)

移動相 0.003mol/L テトラブチルアンモニウムブロマイド含有 0.005mol/L 酢酸ナトリウム (pH6.5) : アセトニトリル (4:1 V/V)

流速 2.0ml/分

7) 高たんぱく性の食品などではプロテアーゼ処理が必要な場合がある。その場合は、コンジュガーゼ処理の前にプロテアーゼ処理を加える。また、葉酸が炭水化物と結合している場合には α -アマラーゼによる処理を組み込むと葉酸の回収がよくなることがある。

8) 予め標準溶液濃度と生育の相関範囲を確認しておく。必要であれば予めデータを確認した上で標準溶液濃度を変更することができる。

9) マイクロプレートを使用し、マイクロプレートリーダーで濁度を測定することもできる。マイクロプレートを使用する場合は試験菌の調製や、標準溶液および試験溶液の濃度を調整し、培養は嫌気条件下で行う必要がある。

[文献]

1) 柴田克己, 厚生労働省科学研究費補助金 効果的医療技術の確立推進臨床研究事業「日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究 平成15年度 総括・分担研究報告書, 2004; 77-8

2) Folate Content of Dairy Products Measured by Microbiological Assay with Trienzyme treatment : K. E. JOHNSTON, D. B. DIRIENZO, T. TAMURA, J. FOOD SCIENCE 67, 817 (2001)

3) 食品中の葉酸定量法: Trienzyme を中心として; 相曾健二, 水野安晴, K. E. JOHNSTON, 田村庸信, ビタミン 72 巻 9 号 1998

34 熱量

(1) 修正アトウォーター法 (変更なし 省略)

(2) アルコール (変更なし 省略)

(3) 飽和脂肪酸の熱量 (変更なし 省略)

(4) 有機酸^{注1)}

1) 高速液体クロマトグラフ法^{注2)}

① 機器, 試薬

・ 高速液体クロマトグラフ: 紫外分光光度計付

- ・ カラム：イオン排除，サイズ分離，分配・吸着の混合分離型
 - ・ クエン酸三ナトリウム二水和物：特級
 - ・ 酢酸ナトリウム（無水）：特級
 - ・ 60%過塩素酸：特級
- ② 試験溶液の調製
試料 5 g^{注3)}をメスフラスコに精密に量り，5%過塩素酸 5 mL を加え，水で 50 mL に定容する。必要に応じて検量線の範囲内に入るように水で希釈したものを試験溶液とする。
- ③ 標準溶液の調製
クエン酸三ナトリウム二水和物 0.3062 g と酢酸ナトリウム（無水）0.2732 g を正確に量り，水で 200 mL 定容とする。（各 0.5 mg/mL）この液 5，10 及び 25 mL を正確に量り，水で 50 mL に定容する。これらの液は 100，200 及び 500 μg/mL 濃度に相当する（冷蔵保存，6 ヶ月ごとに調製する）。
- ④ 測定
試験溶液及び標準溶液を下記操作条件の高速液体クロマトグラフに各一定量（例えば 20 μl）を注入し，ピーク高さ又は面積を測定する。標準溶液を注入して得られたピーク高さ又は面積から，試料中含量を算出する。
- ⑤ 高速液体クロマトグラフ操作条件例^{注4)}
カラム：内径 8.0 mm，長さ 500 mm，ステンレス製
移動相：3 mmol/L 過塩素酸
流量：1.0 mL/分
測定波長：220 nm^{注5)}
温度：40℃
- ⑥ 計算
- $$\text{試料中のクエン酸（酢酸）含量 (g/100 g)} = 0.5 \times \frac{A}{B} \times V \times N \times \frac{10^{-3}}{W} \times 100$$
- 0.5：クエン酸（酢酸）標準溶液の濃度 (mg/mL)
A：試験溶液のピーク面積またはピーク高さ
B：標準溶液のピーク面積またはピーク高さ
V：定容量 (mL)
N：希釈率
W：試料採取量 (g)

[注]

- 1) ここでは高速液体クロマトグラフ法によるクエン酸及び酢酸の定量法を解説する。
- 2) 本法は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できる。
現在，食酢の日本農林規格（昭和 54 年農林水産省告示第 801 号）では酢酸を滴定法で，ドレッシング類の日本農林規格（昭和 50 年農林水産省告示第 955 号）では，酢酸を滴定

法で、クエン酸をブチルエステル化後ガスクロマトグラフ法でそれぞれ定量している。滴定法はこれらの食品のように酢酸の含有量が高く、かつ妨害成分を含まない場合に限り適用できる。

なお、油脂を多く含むドレッシング類には以下の方法で高速液体クロマトグラフ用の試験溶液を調製することが勧められる。すなわち、試料 20 g を共栓付き三角フラスコに量り、水分の全量が 100 mL となるように水を加えた後、よく振とう混合する。遠心分離(3,000rpm, 10 分間)後、傾斜法ないし駒込ピペットを用いて水層を分液漏斗に移す。この水層部にヘキサン(特級) 50 mL を加えて静かに振とう後、静置して得た水層部を試験溶液とする。

*適当な一定量の水を加え、別途求めた試料の水分含量値を用いて水層量を補正し、定容量としてもよい。

- 3) 試料の均質性を確認出来れば、試料中の目的成分の濃度によって採取量は適宜変更することが出来る。
- 4) プレカラム Ionpak C-810 P をセットにした Shodex Ionpak C-811 (昭和電工製)、あるいは同等品を用いる。恒温槽のサイズが小さい場合は、Shodex Ionpak KC-811 (内径 8.0mm, 長さ 300mm) (昭和電工製)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。その他のカラム例として、TSKgel OA-pak, φ7.8 mm×300 mm [東ソー株式会社]などが挙げられる。
- 5) 有機酸以外にも 220 nm に吸収を持つ成分が食品中には多く存在するため、他の成分を計りこみやすい。この場合、可視部の吸収を測定することで有機酸に対する選択性を高めたポストカラム呈色・高速液体クロマトグラフ法 (以下参照) を用いることも出来る。

〈高速液体クロマトグラフ操作条件例〉

カラム：内径 8.0 mm, 長さ 500 mm, ステンレス製

移動相：3 mmol/L 過塩素酸

反応液：0.2 mmol/L ブロムチモールブルー含有

15 mmol/L リン酸水素二ナトリウム溶液

流量：移動相 1.0 mL/分, 反応液 1.4 mL/分

測定波長：445 nm

温度：40℃

新規追加-1 アミノ酸

(1) 15種アミノ酸(加水分解)<アミノ酸自動分析法^{注1)}>

アルギニン, リジン, ヒスチジン, フェニルアラニン, チロシン, ロイシン,
イソロイシン, バリン, アラニン, グリシン, プロリン, グルタミン酸^{注2)},
セリン, スレオニン, アスパラギン酸^{注2)}

① 機器, 試薬

- ・アミノ酸自動分析計
- ・恒温乾燥器
- ・ガラス細工用バーナー
- ・封管用試験管
- ・真空ポンプ
- ・アミノ酸混合標準溶液: アミノ酸混合標準液(和光純薬 Type H)をクエン酸ナトリウム緩衝液(pH 2.2)で希釈して各アミノ酸濃度が $0.1 \mu\text{mol/mL}$ となるようにする。
- ・20%塩酸: 精密分析用
- ・20%塩酸(0.04%(V/V) 2-メルカプトエタノール含有): 20%塩酸(精密分析用)
500 mL に 2-メルカプトエタノール 0.2 mL を加えて混合する。
- ・クエン酸ナトリウム緩衝液(pH 2.2): クエン酸三ナトリウム二水和物(アミノ酸自動分析用)980 g に水約 3.5 L を加えて溶かし, 36%塩酸(アミノ酸自動分析用) 約 700 mL 及びオクタン酸(アミノ酸自動分析用)5 mL を加え, 20%塩酸で pH 2.2 に調整した後, 水で 5 L に定容し, クエン酸ナトリウム緩衝液原液とする。
クエン酸ナトリウム緩衝液原液 500 mL にチオジエチレングリコール(アミノ酸自動分析用)100 mL 及び水 4 L を加え, 20%塩酸で pH 2.2 に調整した後, 水で 5 L に定容する。
- ・3 mol/L 水酸化ナトリウム溶液: 水酸化ナトリウム(特級)120 g を水に溶解し, 1 L に定容する。

② 試験溶液の調製

試料 0.3~1.5 g を封管用試験管に精秤し, 20%塩酸(0.04%(V/V) 2-メルカプトエタノール含有) 20 mL を加える。この試験管を減圧下で 15 分間脱気後, 封管し, 110°C(恒温乾燥器)で 24 時間加水分解を行う。加水分解後, 冷却, 開管し, 加水分解液を 100 mL 容全量フラスコに移し水で定容する。定容した加水分解液の適当量を取り, 3 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH を 2.2 に調整後, クエン酸ナトリウム緩衝液(pH 2.2)で定容し $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターでろ過したものを試験溶液^{注3)}とする。

③ 測定

試料溶液 20~100 μL をアミノ酸自動分析計に注入し, 各アミノ酸のピーク面積またはピーク高さを測定する。標準溶液をアミノ酸自動分析計に注入して得られたピーク面積またはピーク高さから, 試料中の各アミノ酸含量を求める。

④ アミノ酸自動分析計^{注4)}の操作条件例

カラム: 強酸性陽イオン交換樹脂, ステンレス製^{注5)}

移動相：クエン酸ナトリウム緩衝液^{注6)}

反応液：ニンヒドリン試薬^{注7)}

波 長：570 nm または 440 nm

⑤ 計算

$$\text{試料中の各アミノ酸含量 (g/100 g)} = 0.1 \times \text{MW} \times \frac{A}{B} \times V \times N \times \frac{10^{-6}}{W} \times 100$$

0.1：標準溶液の濃度 ($\mu\text{mol/mL}$)

A：試験溶液のピーク面積またはピーク高さ

B：標準溶液のピーク面積またはピーク高さ

MW：各アミノ酸の分子量

V：定容量 (mL)

N：希釈倍数

W：試料採取量 (g)

[注]

- 1) 高速液体クロマトグラフィーによるオルトフタルアルデヒド(OPA)試薬を用いたポストカラム蛍光誘導体化法でも測定は可能である (以下に測定例を示す)。

<高速液体クロマトグラフ操作条件例>

カラム：Shim-pack Amino-Na, $\phi 100 \times 6.0$ mm [株式会社 島津製作所]

移動相：アミノ酸移動相キット(Na 型)グラジエント溶出法

[株式会社 島津製作所]

反応液：アミノ酸反応液キット[株式会社 島津製作所]

流量：移動相 0.4 ml/min, 反応液 0.2 ml/min

カラム温度：60℃

反応温度：60℃

検出：蛍光検出器 Ex 350 nm, Em 450 nm

- 2) アスパラギン、グルタミンは加水分解の際にそれぞれアスパラギン酸、グルタミン酸になるため、アスパラギン酸はアスパラギンを、グルタミン酸はグルタミンを含んだ量となる。
- 3) 標準溶液と比較してピークが小さい場合は、濃縮してもよい。加水分解液の適当量を取り、減圧濃縮乾固後、内容物をクエン酸ナトリウム緩衝液(pH 2.2)で溶解する。
- 4) アミノ酸自動分析計は JLC-500/V[日本電子株式会社], L-8800[株式会社日立製作所]あるいは相当品を用いる。
- 5) LCR-6[日本電子株式会社製]あるいは相当品を用いる。
- 6) クエン酸ナトリウム緩衝液(H-01, H-02, H-03, H-04) [日本電子株式会社] あるいは相当品を用いる。
- 7) 日本電子 200A 型アミノ酸分析機用[和光純薬工業株式会社] あるいは相当品を用いる。

- (2) シスチン及びメチオニン(加水分解)<アミノ酸自動分析法^{注1)}>

① 機器, 試薬

- ・アミノ酸自動分析計
- ・油浴
- ・冷蔵庫
- ・200 mL 容ナス形フラスコ
- ・ロータリーエバポレーター
- ・標準溶液：L-システイン酸(試薬特級)84.58 mg 及び DL-メチオニンスルホン(試薬特級) 90.60 mg を精秤する。0.01 mol/L 塩酸に溶解後, 200 mL に定容し, クエン酸ナトリウム緩衝液(pH 2.2)で 25 倍希釈する。(シスチン 0.05 μ mol/mL, メチオニン 0.1 μ mol/mL 相当)
- ・過ギ酸溶液：ギ酸(特級)と過酸化水素水(特級)を 9 : 1 の容量割合で混合し, 室温で 1 時間放置後使用する。
- ・20%塩酸：精密分析用
- ・クエン酸ナトリウム緩衝液(pH 2.2)：クエン酸三ナトリウム二水和物(アミノ酸自動分析用) 980 g に水約 3.5 L を加えて溶かし, 36%塩酸(アミノ酸自動分析用)約 700 mL 及びオクタン酸(アミノ酸自動分析用) 5 mL を加え, 20%塩酸で pH 2.2 に調整した後, 水で 5 L に定容し, クエン酸ナトリウム緩衝液原液とする。
クエン酸ナトリウム緩衝液原液 500 mL にチオジエチレングリコール(アミノ酸自動分析用) 100 mL 及び水 4 L を加え, 6 mol/L 塩酸で pH 2.2 に調整した後, 水で 5 L に定容する。

② 試験溶液の調製

試料 0.3~1.5 g を 200 mL 容ナス形フラスコに精秤し, 過ギ酸溶液 25 mL を加え, 冷蔵庫で 16 時間過ギ酸酸化を行う^{注2)}。酸化処理後, 減圧濃縮乾固し, 20%塩酸 50 mL を加え, 130~140°C 油浴中で 20 時間加水分解する。冷却後, 加水分解液を 100 mL 容全量フラスコに移し定容する。定容した加水分解液の適量を取り, 減圧濃縮乾固し, 内容物をクエン酸ナトリウム緩衝液(pH 2.2)で溶解し 0.45 μ m のフィルターでろ過したものを試験溶液とする。

③ 測定

試料溶液 20~100 μ L をアミノ酸自動分析計に注入し, システイン酸及びメチオニンスルホンのピーク面積またはピーク高さを測定する。標準溶液をアミノ酸自動分析計に注入して得られたピーク面積またはピーク高さから, 試料中のシスチン含量及びメチオニン含量を求める。

④ アミノ酸自動分析計^{注3)}の操作条件例

- カラム：強酸性陽イオン交換樹脂, ステンレス製^{注4)}
- 移動相：クエン酸リチウム緩衝液^{注5)}
- 反応液：ニンヒドリン試薬^{注6)}
- 波長：570 nm

⑤ 計算

$$\text{試料中のシスチンまたはメチオニン含量 (g/100 g)} = 0.1 \times \text{MW} \times \frac{A}{B} \times V \times N \times \frac{10^{-6}}{W} \times 100$$

0.1 : 標準溶液の濃度 ($\mu\text{mol/mL}$)

A : 試験溶液のピーク面積またはピーク高さ

B : 標準溶液のピーク面積またはピーク高さ

MW : シスチン^{注7)}またはメチオニンの分子量

V : 定容量 (mL)

N : 希釈倍数

W : 試料採取量 (g)

[注]

- 1) 高速液体クロマトグラフィーによるオルトフタルアルデヒド(OPA)試薬を用いたポストカラム蛍光誘導体化法でも測定は可能である (以下に測定例を示す)。

<高速液体クロマトグラフ操作条件例>

カラム : Shim-pack Amino-Na, $\phi 100 \times 6.0$ mm [株式会社 島津製作所]

アンモニアトラップカラム : Shim-pack ISCo-30/S0504Na, $\phi 50 \times 4.0$ mm [株式会社 島津製作所]

移動相 : アミノ酸移動相キット(Na 型)グラジエント溶出法

[株式会社 島津製作所]

A 液 : くえん酸ナトリウム緩衝液

B 液 : ほう酸含有くえん酸ナトリウム緩衝液

C 液 : 水酸化ナトリウム溶液

反応液 : アミノ酸反応液キット [株式会社 島津製作所]

流量 : 移動相 0.5 ml/min, 反応液 0.2 ml/min

カラム温度 : 39°C

反応温度 : 60°C

検出 : 蛍光検出器 Ex 350 nm, Em 450 nm

- 2) シスチンはシステインが酸化されて 2 分子結合したものの。シスチン(システインを含む)及びメチオニンは塩酸による加水分解では破壊されるため、加水分解前に過ギ酸酸化を行い、それぞれ安定なシステイン酸及びメチオニンスルホンとする。
- 3) アミノ酸自動分析計は JLC-500/V[日本電子株式会社], L-8800[株式会社日立製作所]あるいは相当品を用いる。
- 4) LCR-6[日本電子株式会社製]あるいは相当品を用いる。
- 5) クエン酸リチウム緩衝液(P-11, P-12) [日本電子株式会社] あるいは相当品を用いる。ただし、P-11 は 20%塩酸で pH を 2.83 に調整後使用する。
- 6) 日本電子 200A 型アミノ酸分析機用[和光純薬工業株式会社] あるいは相当品を用いる。
- 7) シスチンの分子量は 1/2 量とし、120.15 を用いる。

(3) トリプトファン(加水分解)

21 ナイアシン (ナイアシン当量として) の項 <トリプトファンの定量>と同様に操作する。

[参考文献]

- 1) 科学技術庁資源調査会・資源調査所：“改訂日本食品アミノ酸組成表”，6-7(1986)
- 2) 文部科学省：“日本食品成分表 準拠 アミノ酸成分表 2010” (2010)

新規追加-2 比重

液状の食品において、各成分の数値を容量(100ml)あたりに換算する場合は、以下の方法により比重を測定し、重量(100g)あたりの結果に乗じて求める。

(1) 浮ひょう法

① 機器

- ・浮ひょう：通常は複数が組になっているものから、測定する比重が目盛り範囲に入るものを選ぶ。
- ・シリンダー：ガラス製で浮ひょうを浮かべたとき、浮ひょうの各部からシリンダーの内壁及び底部までの間が5 mm以上となるもの。
- ・温度計：目盛り0.5℃以下のもので、あらかじめ校正されているもの。
- ・かき混ぜ棒：シリンダー内の試料を十分にかき混ぜることのできるもの。
- ・恒温水槽：試料を入れたシリンダーを一定温度に保持できるもの。

② 測定

試料をシリンダーに取り、恒温水槽中に入れ測定温度になるよう静置する。かき混ぜ棒で試料を上下にかき混ぜ、試料の温度を測る。試料の温度が測定温度^註になったら、浮ひょうの上端を軽くつまみ、静かに試料中に浮かべる、静止した後、約2目盛り液中に沈めて手を離す。浮ひょうが静止した後、その示度を読み取る、浮ひょうの読み取り方は、規定方法の表記がないときはメニスカスの最上端を、水平面示度の表記があるものは液体主表面と目盛りの交点で読む。

[注]

- 1) 浮ひょうの目盛りを定めた基準の温度と、測定温度が異なる場合は温度補正が必要である。

(2) 振動式密度計法

① 装置

- ・振動式密度計

② 測定

振動式密度計の操作手順によって行う、一般的な操作手順は以下の要領である。

振動式密度計を測定温度に設定する、試料中に固形物、気泡が無いことを確認後、測定温度に調整する。振動式密度計の試料セルを水又は適当な溶媒で洗浄し、乾燥空気乾燥する。乾燥空気

及び水を用いて、機器の校正を行う。試料セルに試料を導入し、測定を行い計算により試料の比重を求める。

[注]

1)測定機器の例 京都電子工業株式会社：密度比重計 DA-100

[参考資料]

- 1) JIS Z 8804 「液体比重測定方法」
- 2) 日本醸造協会：“第四回改正 国税庁所定分析法注解”
- 3) 第十五改正 日本薬局方 一般試験法「比重及び密度測定法」

新規追加-3 モリブデン

(1) 誘導結合プラズマ質量分析法^{注1)}

① 機器

誘導結合プラズマ質量分析装置：一般的なすべての誘導結合プラズマ質量分析装置を用いることができる。

マイクロウェーブ分解装置：一般的なすべてのマイクロウェーブ分解装置を用いることができる。

② 試薬

硝酸：金属分析用超高純度試薬^{注2)}

過酸化水素水(30%)：原子吸光分析用^{注2)}

酢酸：特級^{注2)}

モリブデン標準溶液：市販の金属分析用標準溶液（MRA 又は JCSS 認定品）に水、硝酸及び酢酸を加えて、各々硝酸 10%、酢酸 2%、モリブデン 0.2, 0.5, 1.0, 5 ppb 濃度になるように各検量線用標準溶液を作成する^{注3)}。

③ 試験溶液の調製

試料 0.1~1g^{注4)} をマイクロウェーブ用分解容器^{注5)} に精密に量り、硝酸 5 ml 及び過酸化水素水 1 ml を加えて密封した後、マイクロウェーブ分解装置で分解する^{注6)}。放冷後、水を加えて分解液を取りだし、酢酸 1 ml を添加し、水で 50 ml としたものを試験溶液とする^{注7)}。

④ 測定

誘導結合プラズマ質量分析装置を用いて、試験溶液のイオンカウントを測定し、あらかじめ作成した検量線から測定用試験溶液中の濃度を求める^{注8)}。

⑤ 計算

モリブデン含量 ($\mu\text{g}/100\text{g}$) = $A \times V \times P \times W^{-1} \times 10^{-1}$

A：検量線から求めたモリブデンの濃度 (ng/ml)

V：最終液量 (ml)

P：希釈率

W：試料採取量 (g)

[注]

- 1) 試料中の濃度が微量の場合に適用する。
- 2) 予め測定元素の汚染がないことを確認した後、他の等級の試薬を使用してもよい。
- 3) 予めデータを確認した後、装置の性能により検量線の直線性が確認できる範囲で変更してもよい。また、MRA 又は JCSS 認定の金属混合標準溶液を使用してもよい。低濃度の標準溶液は用時調製とし、器具からの汚染がないようにする。
- 4) 予めデータを確認した後、試料採取量を増減してもよい。
- 5) 使用する器具は希硝酸で洗浄し、汚染がないようにする。
- 6) 分解条件については、予めデータを確認して設定する。
- 7) 検量線用標準溶液及び測定用試験溶液に内部標準元素を添加して内部標準法により補正する。内部標準元素及び測定質量数は、予めデータを確認し選択する。目的物質の濃度によって定容量を変更してもよい。
- 8) 予めデータを確認した後、測定質量数、測定モードなどの条件設定を行う。

新規追加-4 塩素

(1) モール法

① 試薬

- ・硝酸 (特級)
- ・クロム酸カリウム (特級)
- ・炭酸ナトリウム (特級)
- ・フェノールフタレイン (特級)
- ・エタノール (特級 99.5%)
- ・塩化ナトリウム (容量分析用標準物質)
- ・硝酸銀 (特級)
- ・10% 硝酸：硝酸を水で希釈して用いる。
- ・10% クロム酸カリウム溶液：クロム酸カリウム 10g を水に溶解して 100ml とする。
- ・10% 炭酸ナトリウム溶液：炭酸ナトリウム 50g を水に溶かして 500ml とする。
- ・0.1% フェノールフタレイン：フェノールフタレイン 0.1g をエタノールに溶かして 100ml とする。
- ・0.1 mol/L 塩化ナトリウム標準溶液：塩化ナトリウム (容量分析用標準物質) を塩化ナトリウム相当量として 1.4610g を精密に量りとり、水に溶かして正確に 250 ml とする。
- ・0.1 mol/L 硝酸銀標準溶液：硝酸銀 17 g を水に溶解し 1000ml とし、遮光保存する。以下の方法でファクターを算出し、補正する。

0.1 mol/L 塩化ナトリウム標準溶液 10.0ml に 10 % クロム酸カリウム溶液数滴加え、

0.1 mol/L 硝酸銀標準溶液で滴定し、赤褐色を認めた時を終点とする。

$$F_{\text{AgNO}_3} = F_{\text{NaCl}} \times 10/T$$

F_{AgNO_3} : 0.1 mol/L 硝酸銀標準溶液のファクター

F_{NaCl} : 0.1 mol/L 塩化ナトリウム標準溶液のファクター

T : 0.1 mol/L 硝酸銀標準溶液の滴定量 (ml)

② 試験溶液の調製

試料 1~20g をビーカー^{注1)}に正確に量りとり, 10%炭酸ナトリウム溶液 3~10ml を加え^{注2)}, 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, 灰に水を加え, 100℃以下^{注3)}で加温する。0.1%フェノールフタレインを加え, ろ紙^{注4)}を用いて, メスフラスコ中にろ過する^{注5)}。水で洗い込む操作を繰り返し, ろ液及び洗液を合わせ, 水で定容し, 試験溶液とする^{注6)}。

③ 測定

試験溶液の適当量を三角フラスコに正確に分取し, 10%硝酸にて中和する^{注7)}。10%クロム酸カリウム溶液を数滴加えた後, 0.1mol/L 硝酸銀標準溶液で滴定し, わずかに赤褐色を認めた時を終点とする。

④ 計算

0.1mol/L 硝酸銀標準溶液 1ml は, 塩素 0.003545g に相当し, このとき, 試料中の塩素含量は次式により求める。

$$\text{塩素含量 (mg/100g)} = T \times 0.003545 \times F \times P \times 1/W \times 100 \times 1000$$

T : 滴定に要した 0.1mol/L 硝酸銀標準溶液の量 (ml)

F : 0.1mol/L 硝酸銀標準溶液のファクター

P : 分取率

W : 試料採取量 (g)

[注]

1) ニッケルるつぼ, 白金皿, アルミ箔カップなどを用いても良い。

2) ガラス棒などを用い 10%炭酸ナトリウム溶液と試料をよくなじませる。試料にしみわたらない場合は, 水を加え, 十分に混和する。

3) ホットプレート, 水浴などの加温器具を使用する。

4) JIS5 種A又は同等品のろ紙を用いる。

5) 黒い灰が多い場合は, ろ紙及びろ紙上の残さを乾燥後, 500℃の電気炉中で約 1 時間灰化し, その灰を水に溶解, 加温後, 先の溶液とあわせる

6) アルカリ性でないと塩素が揮発している可能性があるため, 微紅色を呈することを確認する。塩素含有量が少ない場合は, 測定用三角フラスコに直接ろ過したのち, ③の中和から実施してもよい。

7) 中和により液量が過剰になる場合は, 硝酸濃度を変更しても良い。

出典

日本食品科学工学会 食品分析法編集委員会編：食品分析法，光琳 363-373 (1982)

(2) 電位差滴定法

① 機器，試薬

・電位差測定装置

・硝酸（特級）

・10% 硝酸：硝酸を水で希釈して用いる。

・1% Tween20 溶液：Tween20 1g を水に溶かして 100ml とする。

・0.1 mol/L 塩化ナトリウム標準溶液：塩化ナトリウム（容量分析用標準物質）を塩化ナトリウム相当量として 1.4610g を精密に量りとり，水に溶かして正確に 250 ml とする。

・0.1 mol/L 硝酸銀標準溶液^{注1)}：硝酸銀 17 g を水に溶解し 1000ml とし，遮光保存する。以下の方法でファクターを算出し，補正する。

電位差測定装置にて 0.1 mol/L 塩化ナトリウム標準溶液 10.0ml を硝酸添加後 0.1 mol/L 硝酸銀標準溶液で滴定し，滴定曲線の終点から滴定量を算出する。

$$F_{\text{AgNO}_3} = F_{\text{NaCl}} \times 10/T$$

F_{AgNO_3} ：0.1 mol/L 硝酸銀標準溶液のファクター

F_{NaCl} ：0.1 mol/L 塩化ナトリウム標準溶液のファクター

T：0.1 mol/L 硝酸銀標準溶液の滴定量 (ml)

② 試験溶液の調製

a. 水溶解法

試料 0.1~20g をメスフラスコに量り，水で定容し，ろ紙^{注2)}を用いてろ過したものを試験溶液とする。塩素含有量が少ない場合は，試料を直接，測定用容器に採取しても良い。

b. 灰化法

(1) ②に準拠して操作する。

③ 測定

試験溶液の適当量をビーカー^{注3)}に分取し，約 50ml になるように水を加えた後，硝酸又は 10% 硝酸で pH を 3 以下に調整^{注4)}する。この測定用試験溶液を電位差滴定装置にて滴定する。

④ 計算

0.1 mol/L 硝酸銀標準溶液 1ml は，塩素 0.003545g に相当し，このとき，試料中の塩素含量は次式により求める。

$$\text{塩素含量 (mg/100g)} = T \times 0.003545 \times F \times P \times 1/W \times 100 \times 10^3$$

T : 滴定に要した 0.1mol/L 硝酸銀標準溶液の量 (ml)

F : 0.1mol/L 硝酸銀標準溶液のファクター

P : 分取率

W : 試料採取量 (g)

[注]

- 1) 硝酸銀標準溶液は 0.08~0.12mol/L の範囲で用いる事ができる。その場合は、同濃度の塩化ナトリウム標準溶液でファクターを算出する。
- 2) JIS5 種A又は同等品のろ紙を用いる。
- 3) ガラス製もしくは樹脂製容器を使用することができる。
- 4) pH 試験紙などを用いて確認する。油分が多い場合は、1%Tween20 溶液 1ml を加える。

出典

日本食品科学工学会 食品分析法編集委員会編：食品分析法，光琳 363-372 (1982)

AOAC Official Methods : 50.1.10, 986.26 (2005)

(3) ホルハルト法

① 試薬

・硝酸 (特級)

・硫酸アンモニウム鉄 (Ⅲ) ・12 水和物 (鉄ミョウバン)

・ジエチルエーテル (特級)

・過マンガン酸カリウム (特級)

・サッカロース (特級)

・塩化ナトリウム (容量分析用標準物質)

・硝酸銀 (特級)

・チオシアン酸カリウム (特級)

・鉄ミョウバン指示薬

硫酸アンモニウム鉄 (Ⅲ) ・12 水和物 10g を水 85ml に溶解し，硝酸 2ml を加え，ろ過 (5A ろ紙) する。

・5 %過マンガン酸カリウム溶液

過マンガン酸カリウム 25g を水に溶解し，500ml とする。

・0.1 mol/L 塩化ナトリウム標準溶液：塩化ナトリウム (容量分析用標準物質) を塩化ナトリウム相当量として 1.4610g を精密に量りとり，水に溶かして正確に 250 ml とする。

・0.1mol/L 硝酸銀標準溶液：硝酸銀 17 g を水に溶解し 1000ml とし，遮光保存する。

ファクター算出

0.1mol/L 塩化ナトリウム標準溶液 10.0ml に 10 % クロム酸カリウム溶液数滴加え，

0.1mol/L 硝酸銀標準溶液で滴定し、赤褐色を認めた時を終点とする。

$$F_{\text{AgNO}_3} = F_{\text{NaCl}} \times 10/T$$

F_{AgNO_3} : 0.1 mol/L 硝酸銀標準溶液のファクター

F_{NaCl} : 0.1 mol/L 塩化ナトリウム標準溶液のファクター

T : 0.1 mol/L 硝酸銀標準溶液の滴定量 (ml)

・0.1mol/L チオシアン化カリウム溶液^{注1)} : チオシアン化カリウム約 9.7g を水に溶解して 1L とする。

ファクターの算出

0.1mol/L 硝酸銀標準溶液 10.0ml に硝酸 3ml, 鉄ミョウバン指示薬 1m を加え, 0.1mol/L チオシアン酸カリウム標準溶液で滴定し, 淡褐色を認めた時を終点とする。

$$F_{\text{SCN}} = F_{\text{AgNO}_3} \times 10/T$$

F_{SCN} : 0.1 mol/L チオシアン酸カリウム標準溶液のファクター

F_{AgNO_3} : 0.1 mol/L 硝酸銀標準溶液のファクター

T : 0.1 mol/L チオシアン酸カリウム標準溶液の滴定量 (ml)

② 操作

試料約 2g を 300ml 容三角フラスコに正確に量りとり 0.1mol/L 硝酸銀溶液 10ml を正確に加え, さらに濃硝酸 15ml を加え加熱する。これに 5%過マンガン酸カリウム溶液^{注2)}を少量ずつ加えながら内容液が無色～淡黄色の透明になるまで加熱分解し, 放冷後, 水を加えて約 100ml とする。エーテル 25ml^{注3)}と 10%鉄ミョウバン指示薬 1ml を加えて混和したのち, チオシアン化カリウム溶液を用いて滴定する。30 秒たっても消失しない淡褐色が現れたところを終点とする。

別に 0.1mol/L 硝酸銀溶液 10ml, 濃硝酸 15ml 及び試料の分解に要した量とほぼ同量の 5%過マンガン酸カリウム溶液を 300ml 容三角フラスコに入れて加熱し, これにショ糖を少量ずつ加え過マンガン酸カリウムの色を消失させる。以下同様に操作し, 空試験を行う。

③ 計算

試料中の塩素含量を次式により求める。

$$\text{塩素の含有量 (mg/100g)} = (T_b - T_s) \times 0.003545 \times F \times 1/W \times 100 \times 1000$$

T_b : 空試験の滴定に要した 0.1 mol/L チオシアン酸カリウム標準溶液の量 (ml)

T_s : 試料の滴定に要した 0.1 mol/L チオシアン酸カリウム標準溶液 (ml)

F : 0.1 mol/L チオシアン酸カリウム標準溶液のファクター

W : 試料採取量 (g)

[注]

1) 市販の 0.1 mol/L チオシアン酸カリウム溶液を用いても良い。