

- 2) 加えた総量を記録し、空試験の際は同量加える。
- 3) 塩化銀とチオシアン酸銀の沈殿を分離するために加える。

出典

「乳児用調製粉乳の表示許可の取扱いについて」(平成 57 年衛栄第 44 号)

新規追加-5 イノシトール

(1) 微生物定量法

① 試薬

・イノシトール標準溶液:イノシトール 50mg を 25% (V/V) エタノール溶液に溶かし、正確に 200ml とする。さらに、水で希釈して 5 μ g/ml となるようにする。

・使用菌株: *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9080)

・イノシトール測定用培地 (1L 中, pH5.0 \pm 0.1)

カザミノ酸	10g
塩酸ピリドキシン	500 μ g
塩酸チアミン	500 μ g
パントテン酸カルシウム	5mg
ビオチン	50 μ g
塩化カリウム	850mg
グルコース	100g
塩化カルシウム	250mg
硫酸マグネシウム	250mg
硫酸マンガン	5mg
リン酸二水素カリウム	1.1g
塩化第二鉄	5mg
クエン酸カリウム	10g
クエン酸	2g
硫酸アンモニウム	7.5g

定量用培地は調製したものが市販されている。^{注1)}

・菌保存用培地 (1L 中, pH5.0 \pm 0.1)

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

・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

② 接種菌液の調製

Saccharomyces cerevisiae の保存菌株を前培養培地に接種し、30℃で 20 時間程度培養する。

培養後菌体を1白金耳とり、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0.5~1g^{注2)}を精密に量り、18%塩酸25mlを加え、6~20時間還流加熱する。冷却後、ろ過し、減圧蒸留して塩酸を除く。これを水で溶解し、10mol/L水酸化ナトリウムでpH5.0~6.0に調整する。水で正確に100mlとし、ろ過する。更に最終溶液中のイノシトールの濃度が検量線の範囲内に入るように水で希釈し、試験溶液とする。

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及び水を加えて全量を5mlとする。別に検量線作成のため、イノシトール標準溶液(0~7.5 μ g相当量^{注3)})を試験管2本ずつにとり、それぞれに測定用培地2.5ml及び水を加えて全量を5mlとする。121℃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 μ l)ずつを無菌的に接種し、30℃で20時間程度振とう培養する。

培養後、増殖度を600nmの濁度を用いて測定する。^{注4)}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、試験溶液中のイノシトール量を求める。

計算式

試料中のイノシトール含有量(mg/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イノシトール含量(μ g)

V: 定容量 N: 希釈値 W: 秤取量(g)

[注]

1) INOSITOL ASSAY MEDIUM: Becton, Dickinson and Company

2) 試料が均質であれば、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。

3) 予め標準溶液濃度及び生育の相関範囲を確認しておく。必要であれば標準溶液濃度を変更してもよい。

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する必要がある。

新規追加-6 カフェイン^{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(紫外可視分光光度計付)
- ・振とう機
- ・ロータリーエバポレーター
- ・回収率確認用内標準溶液: 100 mL容のメスフラスコにベンゾトリアゾール100 mgを正確

にはかり取り，メタノールに溶解して 100 mL に定容し，回収率確認用内標準溶液 (1,000 $\mu\text{g/mL}$) とする。

- ・カフェイン標準原液：カフェイン (105 $^{\circ}\text{C}$ ，1 時間乾燥) 100 mg を正確にはかり取り，メタノールに溶解して 100 mL に定容し，標準原液 (1,000 $\mu\text{g/mL}$) とする。
- ・カフェイン標準溶液^{注 3)}：標準原液 10 mL 及び回収率確認用内標準溶液 10 mL を容量 100 mL のメスフラスコに正確にはかり取り，メタノールを加えて 100 mL に定容し，標準溶液[Ⓐ] (ベンゾトリアゾール 100 $\mu\text{g/mL}$ ，カフェイン 100 $\mu\text{g/mL}$) とする。次に，標準原液 5 mL，2 mL 及び 1 mL を容量 100 mL のメスフラスコにそれぞれ正確に取り，メタノールを加えて 100 mL に定容し，標準溶液[Ⓑ] (50 $\mu\text{g/mL}$)，標準溶液[Ⓒ] (20 $\mu\text{g/mL}$) 及び標準溶液[Ⓓ] (10 $\mu\text{g/mL}$) とする。さらに，標準溶液[Ⓑ] から 10 mL，標準溶液[Ⓓ] から 10 mL 及び 5 mL を容量 100 mL のメスフラスコに正確に取り，メタノールを加えて 100 mL に定容し，標準溶液[Ⓔ] (5 $\mu\text{g/mL}$)，標準溶液[Ⓕ] (1 $\mu\text{g/mL}$) 及び標準溶液[Ⓖ] (0.5 $\mu\text{g/mL}$) とする。
- ・ベンゾトリアゾール溶液：ベンゾトリアゾール 0.5 g を正確にはかり取り，1% (W/V) 水酸化ナトリウム溶液に溶解して 1,000 mL とする。
- ・n-ヘキサン-酢酸エチルの混液 (2 : 8 V/V)
- ・硫酸ナトリウム (無水)

② 試験溶液の調製^{注 4)}

1) 固体試料 (茶葉，コーヒー)

できるだけ細かく粉砕した試料 0.1~0.5 g を共栓付ガラス容器に正確にはかり取り，ベンゾトリアゾール溶液 5 mL を加え^{注 5)}，かき混ぜる。ついで，n-ヘキサン-酢酸エチル混液 80 mL を加え^{注 6)}，共栓をして振とう機で 5 分間振とう後，静置する。上澄み液を別の容器に移し替え，残さに n-ヘキサン-酢酸エチル混液 60 mL を加えて先と同様に操作し，上澄み液を合わせる。ロートの脚部に綿栓をし，硫酸ナトリウム (無水) 約 70 g を乗せ，先の上澄み液を残さとともにろ過する (受器：なす形フラスコ)。容器の内壁を少量の n-ヘキサン-酢酸エチル混液で洗浄し，洗液も全てろ過する。ロータリーエバポレーターで n-ヘキサン-酢酸エチル混液を留去 (減圧，40 $^{\circ}\text{C}$) し，残さにメタノール 10~20 mL を加えて溶解した後，適宜定容^{注 7)} して試験溶液とする。

2) 液体試料 (浸出液，飲料等)

試料 0.1~3 g を共栓付試験管 (10~25 mL 容) に正確にはかり取り，直接メタノール 5~20 mL を加えて振とう混合し，しばらく静置した上澄み液を試験溶液とする。

③ 測定

試験溶液 5 μL を下記操作条件の高速液体クロマトグラフに注入し，得られたクロマトグラム上のカフェインのピーク高さ又は面積を求める。同時にカフェイン標準溶液[Ⓐ]，[Ⓑ]，[Ⓒ]，[Ⓓ]，[Ⓔ]，[Ⓕ]及び[Ⓖ]のそれぞれ 5 μL ずつを高速液体クロマトグラフに注入して得られる検量線から，試料中のカフェイン含量を求める。

④ 高速液体クロマトグラフの操作条件例

- ・カラム：内径 3~4.6 mm，長さ 250 mm，逆相型カラム^{注 8)} (例えば，Capcell Pak C₁₈)

MG, 粒子径 5 μm)

- ・移動相^{注9)}: a. 0.01 mol/L 酢酸アンモニウム溶液-メタノール混液 (10 : 1)
b. 0.03 mol/L 酢酸緩衝溶液 (pH 4) -アセトニトリル混液 (850 : 30)
- ・流量 : 0.8~2.0 ml/min の一定流量
- ・カラム温度 : 40~50℃ の一定温度
- ・測定波長 : 270 nm

⑤ 計算

$$\text{カフェイン量 (g/100g)} = \frac{A \times V}{W \times 10^6} \times 100$$

A: 検量線から求めた試験溶液中のカフェイン濃度 (μg/mL)

V: 試験溶液量 (mL)

W: 試料採取量 (g)

[注]

- 1) 「1 たんぱく質」の[注] 2), 「6 糖質」の[注] 4) ならびに「34 熱量」の[注] 3) において, 記載のある「カフェインを別途定量し, 糖質 (炭水化物), たんぱく質量から差し引く」場合に本法を用いる。
- 2) 五訂増補 日本食品標準成分表 分析マニュアル 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 資料, p.124
- 3) 検量線の作成に用いる標準溶液の組成と標準原液からの作成方法を一覧表にまとめると, 下表のようになる。なお, 直線性があり, かつ予めデータを十分に確認しておくことでこの範囲を広げることも可能である。

標準溶液	濃度 (μg/mL)	分取する溶液及び分取量	定容量	ベンゾトリアゾール濃度
Ⓐ	100	標準原液 10 mL	100 mL	100 μg/mL
Ⓑ	50	標準原液 5 mL	100 mL	なし
Ⓒ	20	標準原液 2 mL	100 mL	なし
Ⓓ	10	標準原液 1 mL	100 mL	なし
Ⓔ	5	標準溶液Ⓑ 10 mL	100 mL	なし
Ⓕ	1	標準溶液Ⓓ 10 mL	100 mL	なし
Ⓖ	0.5	標準溶液Ⓓ 5 mL	100 mL	なし

定容溶媒 : メタノール

- 4) 緑茶類, 紅茶, ウーロン茶, コーヒーなどの固体試料は振とう抽出, 試料がこれらの浸出液である場合には, 希釈法による。

- 5) ベンゾトリアゾールは、カフェインに擬して抽出操作による損失を確認するために加えるもので、いわゆる内標準物質に似せて使用する。最終試験溶液中のベンゾトリアゾール濃度を測定することにより、試験操作を通じてのカフェインの回収率確認に代えることができる。従って、抽出操作及び HPLC を通じて類似の挙動を示すものであれば、ベンゾトリアゾール以外の物質を使用してもよい。また、ベンゾトリアゾールの回収率が 80~110%の範囲にあることが確認できれば、回収率をカフェイン含有量算出には考慮しない。

ベンゾトリアゾールを 1% (W/V) 水酸化ナトリウム溶液として添加するのは、試料を湿潤させ抽出溶媒が浸透しやすくすることにより抽出効率を高めるとともに、定量の妨害を緩和するためである(アルカリ性で抽出すると妨害が少ない)。

- 6) カフェインの溶解性を考慮すれば最も適当な抽出溶媒は、熱水またはクロロホルムである。本法の溶媒のほうが熱水よりろ過および濃縮操作が容易であること、またクロロホルムは毒性及び環境汚染の面から採用を断念し、n-ヘキサン-酢酸エチル混液を採用した。次表にn-ヘキサンと酢酸エチルの混合比率を変えて抽出効果を調べた例を示す。

なお、熱水抽出を用いる場合は HPLC 測定の際の溶解溶媒および標準溶液を水で調製する必要があり、ベンゾトリアゾールも使用しない。

n-ヘキサン-酢酸エチル混液の抽出効果

抽出溶媒	抽出率(%)*
酢酸エチル	96
n-ヘキサン-酢酸エチル(2:8 V/V)	97
n-ヘキサン-酢酸エチル(4:6 V/V)	89
n-ヘキサン-酢酸エチル(6:4 V/V)	77
n-ヘキサン-酢酸エチル(8:2 V/V)	64
n-ヘキサン	20
クロロホルム	100

* : クロロホルムの抽出率を 100%として表した。

- 7) 試料中の目的成分の濃度によって、最終試験溶液濃度が検量線の範囲に入るように希釈する。
- 8) 逆相型カラムとしては、Capcell Pak C₁₈以外に、たとえば、Mightysil RP-18, Inertsil ODS-3, YMC AM-312 などがある。
- 9) 移動相は 2 種類あるが、基本的に a. を用いて試験する。カフェインのピークが検出された場合、b. を用いて確認試験を行うと精度管理の面でより安心である。具体的には a. 及び b. を用いた時のカフェイン定量値がほぼ同じであることを確認する。同一条件の高速液体クロマトグラフを 2 台用意しておき、それぞれ異なる移動相で同時に試験すると便利である。

新規追加-7 タンニン

タンニンとは、植物に由来し、多数のフェノール性水酸基を持つ芳香属化合物の総称である。

(1) 酒石酸鉄吸光光度法

酒石酸鉄吸光光度法は緑茶のタンニンの公的な分析法として用いられている。抽出後、タンニンのフェノール性水酸基と鉄イオンで錯体を形成させ、それが呈する青色の吸光度により定量する。

① 機器、試薬

・分光光度計

・恒温水槽

・没食子酸エチル標準溶液：予め乾燥（100℃ 1時間）した没食子酸エチルの5, 10, 15, 20及び25mg/100 mL 溶液を調製する。

・酒石酸鉄試薬：硫酸第一鉄 100mg と酒石酸カリウムナトリウム 500mg を水に溶かして 100ml とする。

・リン酸緩衝液：1/15mol/L リン酸水素二ナトリウム溶液(11.867g/L)と 1/15mol/L リン酸二水素カリウム溶液(9.073g/L)を 84:16 の割合で混合し、pH メーターで pH7.5 になるように微調整する。

② 試料の調製

固形試料は粉碎機で粉碎する、液体試料はそのまま用いる。

③ 測定

試料を 0.1g(W)を 0.1mg まで三角フラスコにはかり取り、熱水 50～60ml を加え、80℃以上の恒温水槽で 30 分間加熱する。放冷後、全量フラスコに移して 100ml に定容(V)する^{注1)}。ろ紙(5種 A)を用いてろ過し、最初のろ液約 20ml を捨て^{注2)}、以後のろ液から 5ml(B)を容量 25ml の全量フラスコに採取する。酒石酸鉄試薬 5ml を加え、リン酸緩衝液で定容する。水 5ml を用いた試薬空試験を対照として、540nm の吸光度を測定し、検量線から没食子酸エチル量を求め、その値を 1.5 倍してタンニン量とする。

検量線の作成：容量 25ml 全量フラスコに水 5ml 及び没食子酸エチル標準液各 5ml をとり、これに酒石酸鉄試薬 5ml を加えた後、リン酸緩衝液で定容する。540nm の吸光度を測定し、没食子酸エチル量に対する吸光度をプロットして検量線を作成する。没食子酸エチル 1mg の示す吸光度は茶タンニン 1.5mg に相当する。

④ 計算

$$\text{タンニン含量(mg/100g)} = A \times 1.5 \times V / (W \times B) \times 100$$

A：検量線から求めた没食子酸エチル量 (mg)

V：定容量 (ml)

B：分取量 (ml)

W：試料採取量 (g)

[注]

- 1) 試料が茶抽出液の場合は 5～10ml をとり、水を加えて定容した後、茶葉と同様に操作する。
- 2) 最初のろ液を捨てるのは、ろ過を始めてしばらくはタンニンがろ紙に吸着されてろ液中のタンニン濃度が低くなるためである。

(2) フォーリン-デニス(Folin-Denis)法

フォーリン-デニス法^{注1)}は、フェノール性水酸基がモリブデン酸を還元して生じる青色の比色により定量する方法で、発酵茶、コーヒーに用いられる。

① 機器, 試薬

- ・分光光度計
- ・恒温水槽
- ・遠心分離機
- ・共栓付遠心管：25 mL容
- ・タンニン酸標準溶液：タンニン酸の0.5, 1.0, 1.5及び2.0 mg/100 mL溶液を調製する^{注2)}。
- ・フォーリン試薬：タングステン酸ナトリウム25 g, リンモリブデン酸5 g, リン酸12.5 mLに水180 mLを加えて2時間煮沸還流し, 冷後, 水で1 Lに定容する。
- ・10%炭酸ナトリウム溶液：炭酸ナトリウム10 gに水90 gを加える(用時調製)。

② 試験溶液の調製

試料1~5 g^{注3)}を三角フラスコ(150~200 mL容)に0.1mgまではかりとり, 熱水50~60 mLを加え, 沸騰させた水浴中^{注4)}で60分間抽出する。放冷後, 100 mL容の全量フラスコに移して水で定容する。ろ紙(5種A)を用いてろ過し, 最初のろ液約20 mLを捨て^{注5)}, 以後のろ液を試験溶液とする。

③ 測定

試験溶液5 mLを共栓付遠心管に分取する。他に水, タンニン酸標準溶液4種についてもそれぞれ5 mLずつを共栓付遠心管に分取し, 採取された試験溶液, 水, タンニン酸標準溶液のそれぞれにフォーリン試薬5 mLを加えて3分間放置する。10%炭酸ナトリウム溶液5 mLを加えて60分間放置後, 適宜遠心分離(3,000 rpm, 5分間)し, 上澄み液の700 nmまたは760 nmの吸光度を測定する。タンニン量は, 4種の標準溶液の測定値から得られる検量線を用い, タンニン酸量として求める。

④ 計算

$$\text{タンニン含量 (タンニン酸として mg/100g)} = \frac{C \times D \times V}{W} \times 100$$

C: 検量線から求めたタンニン酸濃度 (mg)

D: 希釈率 (倍数)

V: 定容量 (100 mL)

W: 試料採取量 (g)

[注]

1) 本法は, Folin 試薬(フェノール試薬)中のリンモリブデン酸がフェノール性水酸基により還元され, 青色を呈する反応を利用している。

本法は, AOAC International においてワイン及び蒸留酒中のタンニンの公的な分析法, AOAC Method 952.03 及び AOAC Method 955.25 として採用されている。また, 五訂増補 日本食品標準成分表 分析マニュアル 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 資料, p.128 にも掲載されている。

- 2) タンニン酸は予めカールフィッシャー法により水分を測定し、無水物としての量を採取する。
- 3) 試料採取量は、試料中のタンニン含量に応じ、適宜調整する、試料が抽出液の場合は5~10mlをとり、水を加えて100mlとした後、茶葉等と同様に操作する。
- 4) 検体によってはエタノール等を用いて抽出したほうが良い場合もある。その際は溶媒が沸騰する程度の温度で還流抽出する。
- 5) 最初のろ液を捨てるのは、ろ過を始めてしばらくはタンニンがろ紙に吸着されてろ液中のタンニン濃度が低くなるためである。

新規追加-8 テオプロミン^{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 (紫外可視分光光度計付)
- ・振とう器
- ・遠心分離器
- ・テオプロミン標準原液: テオプロミン (試薬特級) 0.040 g を精密にはかり取り、水に溶かして 200 mL に定容し、標準原液とする (200 $\mu\text{g/ml}$)。
- ・テオプロミン標準溶液: 標準原液を水で希釈して、テオプロミン 50 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ 及び 1 $\mu\text{g/mL}$ の標準溶液を調製する^{注3)}。

② 試験溶液の調製

1) 固体試料 (ココア粉末, チョコレート)

試料 (ココア粉末は 0.1~0.2 g, チョコレートは 0.2~0.5 g) を遠心管に精密にはかり取り、水 30 mL を加え、栓をして振り混ぜる (振とう器使用, 10 分間)。遠心分離 (2,500 回転/分, 5 分間) 後、上澄みを 100 mL 容メスフラスコに分取する。残さに再び水 30 mL を加え、前と同じ操作を繰り返す。更に残さに水 20 mL を加え、前と同じ操作を繰り返す、最終的に水で 100 mL に定容する。ここから 20 mL を遠心管に分取し、石油エーテル 10 mL を加え栓をして手で振り混ぜる。静置後、駒込ピペットで分取した水層をメンブランフィルターでろ過し、ろ液を試験溶液とする。

2) 液体試料 (ココア飲料等)

試料 (0.5~2 g) を 20 mL 容のメスフラスコに精密にはかり取り、水を加えて 20 mL に定容する。しばらく静置した上澄み液をメンブランフィルターでろ過し、ろ液を試験溶液^{注4)} とする。

③ 測定

試験溶液 10 μL を下記操作条件の高速液体クロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラム上のテオプロミンのピーク高さ又は面積を求める^{注5)}。同時にテオプロミン標準溶液それぞれの 10 μL ずつを高速液体クロマトグラフに注入して得られる検量線から、試料中のテオプロミン含量を求める。

④ 高速液体クロマトグラフの操作条件例

カラム: 内径 4.6~6.0 mm, 長さ 150 mm, 逆相型カラム

(例えば, YMC-Pack ODS-A AA12S05-1506WT (5 μm))

移動相: 2.5 % 酢酸-アセトニトリル (200:7 V/V)

または 2.5 % 酢酸-メタノール (10:1 V/V)

流速: 1.0 mL/分

カラム温度: 50℃

測定波長: 270 nm

⑤ 計算

$$\text{テオブロミン含量 (mg/100g)} = \frac{A \times V}{W \times 1000} \times 100$$

A: 検量線から求めた試験溶液中のテオブロミン濃度 (μg/mL)

V: 定容量 (mL)

W: 試料採取量 (g)

[注]

- 1) 「1 たんぱく質」の[注]2), 「6 糖質」の[注]4) ならびに「34 熱量」の[注]3) において, 記載のある「テオブロミンを別途定量し, 糖質 (炭水化物), たんぱく質量から差し引く」場合に本法を用いる
- 2) 五訂増補 日本食品標準成分表 分析マニュアル 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 資料, p.131
- 3) 直線性があり, かつ予めデータを十分に確認しておくことでこの範囲を広げることも可能である。
- 4) 試料中の目的成分の濃度によって, 最終試験溶液濃度が検量線の範囲に入るように希釈する。
- 5) HPLC のクロマトグラムにおいて, テオブロミンのピーク位置に妨害がないことを確認する。確認の方法には, 次の2つが考えられる。
 - ・HPLC を異なる2操作条件で実施し, 測定値に差がないことを確かめる。
 - ・ピークの半値幅が試料と標準品で等しいことを確かめる。

新規追加-9 その他

○ガム類の場合の抽出液調製法 (暫定案)

50ml 容ビーカーに細片化した試料の適当量 (0.5~5g) を精密に量り, 40℃の温水を適量 (通常試料の5倍量程度) を加え, 液性を水酸化ナトリウム溶液及び塩酸水溶液で中性にする。超音波, 振とうなどとともに, ガラス棒などで押しつぶしながら十分抽出を行なう。遠心分離後に, 上澄み液をメスフラスコに移し, 残分に同量の温水を加え, 繰り返し抽出を行う。遠心分離後に上澄み液をメスフラスコに併せた後, 水により定容して抽出液とする。

<参考文献>

特定保健用食品の申請・評価に関する指針解説平成12年2月21日 財団法人 日本健康栄養食品協会 特定保健用食品部 編集

○規定の操作の変更

食品の形態は多様であり，食品によっては規定の操作で抽出や精製等に不具合が生じるため，操作の追加を行う場合がある。また，食品によっては規定の操作の一部を省略し，分析の簡便迅速化を図れる場合がある。すでに明らかになっている事例については，規定の操作に追加あるいは省略を行う旨を脚注として記載した。このように，規定の方法から操作を一部変更することが可能であるが，その場合，標準品を用いた添加回収試験，繰り返し精度等のデータを確認する必要がある。また，測定結果に疑いのある場合，最終判定は規定の方法で行う。

II. 改訂案分析手順による妥当性確認結果

主要な項目である一般基礎栄養成分、脂肪酸、コレステロール、ビタミン、糖類、有機酸、ミネラル等について提案した改訂手順により分析法の妥当性を確認した結果を以下に示す。

1. 一般基礎栄養成分

水分、脂質、たんぱく質、灰分、食物繊維については定義分析であることから併行精度を算出した。

この結果、栄養表示基準に関わる分析法として十分な精度が確認された。なお、食物繊維（濃度レベル1.3g/100g）における相対標準偏差（10.7%）は本方法の定量下限（0.5g/100g程度）を考慮すれば許容範囲と判断された。

表-1 一般基礎成分の併行精度 測定結果

	食品マトリックス	試行数	平均値 (g/100g)	相対標準偏差(%)
水分	大豆プロテイン	10	4.61	1.5
脂質	大豆プロテイン	10	3.34	5.5
たんぱく質 ^{*1}	大豆プロテイン	10	6.87	0.45
灰分	大豆プロテイン	10	7.53	0.35
食物繊維	黒糖かりんとう	10	1.33	10.7

^{*1} 全窒素として

2. 脂肪酸

脂肪酸について併行精度、添加回収試験による真度並びに定量下限を検討した。

この結果、3種類の抽出条件とも栄養表示基準に関わる分析法として十分な精度、真度及び定量下限が確認された。

1) 併行精度

マトリックスとしてバター、きなこ、米を選び表-2に示した条件により併行精度を検討した。

なお、食品マトリックスとしてクロロホルムメタノール抽出法にはバターを、アルカリけん化抽出法についてはきなこを、酸分解抽出法については米を用いた。

表-2 脂肪酸の併行精度 測定結果

脂肪酸	食品マトリックス	試行数	平均値 (g/100g)	相対標準偏差	分析条件
6:0	バター	10	1.54	5.52	クロロホルム/メタノール抽出法
8:0	バター	10	0.99	3.42	クロロホルム/メタノール抽出法
10:0	バター	10	2.21	1.84	クロロホルム/メタノール抽出法
10:1	バター	10	0.20	2.21	クロロホルム/メタノール抽出法
12:0	バター	10	2.51	1.35	クロロホルム/メタノール抽出法
14:0	バター	10	8.01	1.41	クロロホルム/メタノール抽出法
14:1	バター	10	0.66	1.51	クロロホルム/メタノール抽出法
15:0	バター	10	0.80	1.41	クロロホルム/メタノール抽出法
16:0	バター	10	21.0	1.68	クロロホルム/メタノール抽出法
16:1	バター	10	1.00	1.71	クロロホルム/メタノール抽出法
17:0	バター	10	0.34	2.31	クロロホルム/メタノール抽出法
17:1	バター	10	0.20	16.5	クロロホルム/メタノール抽出法
18:0	バター	10	7.88	1.43	クロロホルム/メタノール抽出法
18:1	バター	10	16.4	1.52	クロロホルム/メタノール抽出法
18:2 n-6	バター	10	1.42	3.11	クロロホルム/メタノール抽出法
18:3 n-3	バター	10	0.33	1.93	クロロホルム/メタノール抽出法
20:0	バター	10	0.11	8.73	クロロホルム/メタノール抽出法
20:1	バター	10	0.13	11.2	クロロホルム/メタノール抽出法
14:0	きなこ	10	0.0178	2.913	アルカリけん化抽出法
16:0	きなこ	10	2.5149	0.769	アルカリけん化抽出法
18:0	きなこ	10	0.8861	0.865	アルカリけん化抽出法
18:1	きなこ	10	3.5138	0.859	アルカリけん化抽出法
18:2n-6	きなこ	10	10.9250	0.920	アルカリけん化抽出法
18:3n-3	きなこ	10	1.8412	1.156	アルカリけん化抽出法
20:0	きなこ	10	0.0739	1.312	アルカリけん化抽出法
20:1	きなこ	10	0.0353	21.234	アルカリけん化抽出法
22:0	きなこ	10	0.0845	1.309	アルカリけん化抽出法
24:0	きなこ	10	0.0283	4.767	アルカリけん化抽出法
14:0	米	10	0.0167	2.102	酸分解抽出法
16:0	米	10	0.2712	2.364	酸分解抽出法
18:0	米	10	0.0278	3.948	酸分解抽出法
18:1	米	10	0.2518	2.201	酸分解抽出法
18:2n-6	米	10	0.2997	2.111	酸分解抽出法

2) 真度

真度について標準品を所定の濃度となるように添加後に分析を試行3回行い、得られた結果から差し引き平均回収率を算出した。なお、食品マトリックスとしてクロロホルムメタノール抽出法及びアルカリけん化抽出法についてはプロテインパウダーを、酸分解抽出法についてはデンブンをを用いた。

表-3 脂肪酸の添加回収試験 測定結果

脂肪酸	食品マトリックス	添加濃度	差し引き平均回収率 (%)	分析条件
10:0	プロテインパウダー	0.05g/100g 相当	91.9	クロロホルム/メタノール法
13:0	プロテインパウダー	0.05g/100g 相当	97.6	クロロホルム/メタノール法
16:0	プロテインパウダー	0.05g/100g 相当	102	クロロホルム/メタノール法
18:0	プロテインパウダー	0.05g/100g 相当	101	クロロホルム/メタノール法
18:1 n-9	プロテインパウダー	0.05g/100g 相当	103	クロロホルム/メタノール法
18:2 n-6	プロテインパウダー	0.05g/100g 相当	96.4	クロロホルム/メタノール法
18:3 n-3	プロテインパウダー	0.05g/100g 相当	95.3	クロロホルム/メタノール法
23:0	プロテインパウダー	0.05g/100g 相当	95.0	クロロホルム/メタノール法
10:0	プロテインパウダー	0.05g/100g 相当	97.1	アルカリけん化法
13:0	プロテインパウダー	0.05g/100g 相当	97.9	アルカリけん化法
16:0	プロテインパウダー	0.05g/100g 相当	96.5	アルカリけん化法
18:0	プロテインパウダー	0.05g/100g 相当	99.0	アルカリけん化法
18:1 n-9	プロテインパウダー	0.05g/100g 相当	95.6	アルカリけん化法
18:2 n-6	プロテインパウダー	0.05g/100g 相当	95.9	アルカリけん化法
18:3 n-3	プロテインパウダー	0.05g/100g 相当	95.7	アルカリけん化法
23:0	プロテインパウダー	0.05g/100g 相当	95.3	アルカリけん化法
10:0	デンブン	0.05g/100g 相当	82.3	酸分解法
13:0	デンブン	0.05g/100g 相当	96.4	酸分解法
16:0	デンブン	0.05g/100g 相当	97.5	酸分解法
18:0	デンブン	0.05g/100g 相当	99.6	酸分解法
18:1 n-9	デンブン	0.05g/100g 相当	97.5	酸分解法
18:2 n-6	デンブン	0.05g/100g 相当	92.9	酸分解法
18:3 n-3	デンブン	0.05g/100g 相当	87.7	酸分解法
23:0	デンブン	0.05g/100g 相当	94.4	酸分解法

3) 定量下限

1) で示した精度確認のデータを基本として、各方法で検出された脂肪酸の中で最も含量の低い脂肪酸を用いて、その繰り返し試験の標準偏差を用いて算出した。この結果、定量下限は全ての条件で0.01g/100g程度と推定された。

3. コレステロール

コレステロールについては併行精度、添加回収試験による真度並びに定量下限を検討した。この際、食品マトリックスとして乳主原料食品、調製粉乳及び豆乳を用いた。

この結果、栄養表示基準に関わる分析法として十分な精度、真度及び定量下限が確認された。

1) 併行精度

表4にコレステロールの併行精度の結果を示した。

表4 コレステロールの併行精度 測定結果

項目	食品マトリックス	試行数	平均値 (mg/100g)	相対標準偏差	分析条件
コレステロール	乳主原料食品	10	76	1.30	精製なし
	調製粉乳	10	37	0.90	精製あり

2) 真度

表5にコレステロールの添加回収試験の結果を示した。

表5 コレステロールの添加回収試験 測定結果

項目	食品マトリックス	添加濃度	差し引き平均回収率 (%)	分析条件
コレステロール	乳主原料食品	76mg/100g 相当	94.4	精製なし
		37mg/100g 相当	92.7	精製あり
	豆乳	1mg/100g 相当	114	精製なし
		1mg/100g 相当	112	精製あり

3) 定量下限

0.01mg/mlの標準溶液のクロマトグラムからS/Nを算出し、その10倍の感度を基本として希釈率を考慮し、定量下限とした。この結果、定量下限は1mg/100g程度と推定された。

4. ビタミン

ビタミン類についてはビタミンA（レチノール、 α -カロテン、 β -カロテン、クリプトキサンチン）、ビタミンB1(チアミン塩酸塩)、ビタミンB2(リボフラビン)、ビタミンC(総アスコルビン酸)、ビタミンE (α -トコフェロール)、ビタミンK（フィロキノン、メナキノン4、メナキノン7）、ビタミンB6、ビタミンB12、葉酸、ナイアシン、パントテン酸、ピオチンについて表-6、7に示した条件により、併行精度、真度及び定量下限を検討した。また、機器分析項目については表-8に示した条件により定量下限を検討した。

この結果、全条件について栄養表示基準に関わる分析法として十分な精度、真度及び定量下限が確認された。

1) 併行精度

ビタミン類の併行精度の結果を表-6に示した。

表-6 ビタミン類の併行精度 測定結果

試験項目	食品マトリックス	濃度	相対標準偏差	試行数	分析条件
ビタミンA	—	—	—	—	—
レチノール	粉乳	1200 μ g/100g	1.6%	10	条件A Cosmosil 7C18, 4.6×150mm, メタノール-水(88:12), 1ml/min, 40°C, 325mm
			1.4%	10	条件B L-column ODS, 4.6×250mm, メタノール-水(92:8), 1ml/min, 40°C, 325mm
α -カロテン	粉末食品	150 μ g/100g	7.3%	10	条件A L-column ODS, 4.6×150mm, 7セプトリル-メタノール-THF(55:40:5), 1.5ml/min, 40°C, 455mm
			3.4%	10	条件B L-column ODS, 4.6×250mm, 7セプトリル-メタノール-THF(55:40:5), 1.5ml/min, 50°C, 455mm
β -カロテン	粉末食品	350 μ g/100g	3.5%	10	条件A L-column ODS, 4.6×150mm, 7セプトリル-メタノール-THF(55:40:5), 1.5ml/min, 40°C, 455mm
			2.1%	10	条件B L-column ODS, 4.6×250mm, 7セプトリル-メタノール-THF(55:40:5), 1.5ml/min, 50°C, 455mm
クリプトキサンチン	ラクトース	650 μ g/100g	2.1%	7	条件A L-column ODS, 4.6×250mm, 7セプトリル-メタノール-THF(55:40:5), 1.5ml/min, 50°C, 455mm
		65 μ g/100g	2.5%	7	条件B Cosmosil Cholesterol 4.6×250mm, 2本直列, 7セプトリル-メタノール-THF(55:40:5), 1ml/min, 60°C, 455mm
			1.8%	7	条件A L-column ODS, 4.6×250mm, 7セプトリル-メタノール-THF(55:40:5), 1.5ml/min, 50°C, 455mm
			2.1%	7	条件B Cosmosil Cholesterol 4.6×250mm, 2本直列, 7セプトリル-メタノール-THF(55:40:5), 1ml/min, 60°C, 455mm
ビタミンB1(チアミン塩酸塩)	粉乳	2.5 mg/100g	2.2%	10	条件A (カラムスイッチング法) L-column ODS, 4.6×250 mm (前処理カラム:CAPCELL MF SCX S-10 4.0×10 mm)

							0.01 mol/L リン酸二水素ナトリウム溶液-0.15 mol/L 過塩素酸ナトリウム緩衝液(pH2.2)及びメタノールの混液(95:5) 1.0 ml/min, 40 °C, Ex375 nm, Em440 nm
						条件B (ミニカラム法)	L-column ODS, 4.6 ×250 mm
		1.6 %	10				0.01 mol/L リン酸二水素ナトリウム溶液-0.15 mol/L 過塩素酸ナトリウム緩衝液(pH 2.2)及びメタノールの混液(95:5) 1.0 ml/min, 40 °C, Ex375 nm, Em440 nm
						条件A	Develosil ODS-MG-5, 4.6 ×250 mm
		1.4 %	10				(ガード)カラム:Develosil ODS-MG 4.0 ×10 mm 酢酸緩衝液(pH4.5)及びメタノールの混液(65:35) 1.0 ml/min, 40 °C, Ex445 nm, Em530 nm
						条件B	Cosmosil 5C18-MS-II, 4.6×150 mm
		1.1 %	10				(ガード)カラム:Develosil ODS-MG 4.0 ×10 mm 酢酸緩衝液(pH4.5)及びメタノールの混液(65:35) 1.0 ml/min, 40 °C, Ex445 nm, Em530 nm
						条件A	Senshupak Silica-1100-N, 4.6 ×100 mm
		1.8 %	10				酢酸エチル,ヘキサン,酢酸及び水の混液(60:40:5:0.05) 1.5 ml/min, 35 °C, 495 nm
						条件B	Finepak SIL-5, 4.6 ×250 mm
		1.8 %	10				酢酸エチル,ヘキサン,酢酸及び水の混液(60:40:5:0.05) 1.5 ml/min, 40 °C, 495 nm
						条件A	YMC-Pack SIL-06 S-5µm, 4.6 ×150 mm
		1.9 %	10				(ガード)カラム:Mightysil Si 60(5µm), 4.6×5 mm) ヘキサン,酢酸及び 2-7°ロハ°ノールの混液(1000:5:2)(5 ppmBHT 含有) 1.5 ml/min, 40 °C, Ex298 nm, Em325 nm
						条件B	YMC-Pack SIL-06 S-5µm, 4.6 ×250 mm
		2.1 %	10				(ガード)カラム:Mightysil Si 60(5µm), 4.6×5 mm) ヘキサン,2-7°ロハ°ノール及び酢酸の混液(1000:6:5)(5 ppmBHT 含有) 1.5 ml/min, 40 °C, Ex298 nm, Em325 nm
						条件A	L-column ODS, 4.6 ×250mm, メタノール0.8ml/min, 40°C, Ex240nm, Em430nm
ビタミンB2(リボフラビン)	粉乳	2.5 mg/100g					
ビタミンC(総アスコルビン酸)	粉乳	130 mg/100g					
ビタミンE(α-トコフェロール)	粉乳	13 mg/100g					
ビタミンK	-	-					
フィロキノン	錠剤	3000 µg/100g	0.8 %	10		条件A	

メナキノン4	錠剤	3000 μ g/100g	0.6%	10	条件B	Develosil C30, 4.6×150mm, 流速)0.8ml/min, 40°C, Ex320nm, Em430nm
メナキノン7	錠剤	2000 μ g/100g	1.8%	10	条件A	L-column ODS, 4.6×250mm, 流速)0.8ml/min, 40°C, Ex240nm, Em430nm
			1.3%	10	条件B	Develosil C30, 4.6×150mm, 流速)0.8ml/min, 40°C, Ex320nm, Em430nm
			0.3%	10	条件A	Develosil C30, 4.6×150mm, 流速)0.8ml/min, 40°C, Ex240nm, Em430nm (7:3)
メナキノン7	錠剤	2000 μ g/100g	0.5%	10	条件B	L-column ODS, 4.6×250mm, 流速)0.8ml/min, 40°C, Ex240nm, Em430nm (7:3)
			0.6%	10	条件C	Develosil C30, 4.6×150mm, 流速)0.8ml/min, 40°C, Ex320nm, Em430nm
			5.9%	10	微生物定量法	
ビタミンB6	粉乳	0.35 mg/100g	5.9%	10	微生物定量法	
ビタミンB12	粉乳	3.5 μ g/100g	4.9%	10	微生物定量法	
葉酸	粉乳	130 μ g/100g	3.7%	10	微生物定量法	
パントテン酸	粉乳	4 mg/100g	4.7%	10	微生物定量法	
ナイアシン(ニコチン酸相当量)	粉乳	8 mg/100g	5.0%	10	微生物定量法	
ビオチン	粉乳	8 μ g/100g	2.4%	10	微生物定量法	

2) 真度

ビタミン類の添加回収試験の結果を表-7に示した。

表-7 ビタミン類の添加回収試験 測定結果

試験項目	食品マトリックス	含有量	添加量	試行数	差し引き回収率	分析条件など
ビタミンA	—	—	—	—	—	—
レチノール	調製粉乳	1200 μ g/100g	試料と同等量	9	101.1% 98.7%	条件A 条件B
α -カロテン	粉末食品	145 μ g/100g	試料と同等量	9	93.5% 89.9%	条件A 条件B
β -カロテン	粉末食品	350 μ g/100g	試料と同等量	9	94.8% 96.3%	条件A 条件B
クリプトキサンチン	ラクトース	ND	650 μ g/100g	9	95.1% 96.3%	条件A 条件B
			65 μ g/100g	9	95.6% 97.3%	条件A 条件B
ビタミンB1(チアミン塩酸塩)	調製粉乳	2.5 mg/100g	試料と同等量	9	100.1% 98.2%	条件A 条件B
ビタミンB2(リボフラビン)	粉乳	2.5 mg/100g	試料と同等量	9	95.4% 94.3%	条件A 条件B
ビタミンC(総アスコルビン酸)	粉乳	130 mg/100g	試料と同等量	9	101.9% 100.1%	条件A 条件B
ビタミンE(α -トコフェロール)	粉乳	13 mg/100g	試料と同等量	9	105.2% 105.7%	条件A 条件B
ビタミンK	—	—	—	—	—	—
フィロキノン	錠剤	ND	3000 μ g/100g	10	98.6% 99.4%	条件A 条件B
メナキノン-4	錠剤	3000 μ g/100g	試料と同等量	10	98.7% 99.9%	条件A 条件B
メナキノン-7	錠剤	ND	2000 μ g/100g	10	100.0% 100.1% 99.9%	条件A 条件B 条件C
ビタミンB6	ラクトース	ND	6 μ g	3	103.6%	微生物定量法
ビタミンB12	ラクトース	ND	0.06 μ g	3	99.3%	微生物定量法
葉酸	ラクトース	ND	1.5 μ g	3	94.6%	微生物定量法
パントテン酸	ラクトース	ND	40 μ g	3	91.0%	微生物定量法
ナイアシン(ニコチン酸相当量)	ラクトース	ND	30 μ g	3	101.6%	微生物定量法
ビオチン	大麦	2.5 μ g/100g	試料と同等量	3	102.1%	微生物定量法

- 3) 定量下限の推定
表-8に定量下限の推定結果（微生物定量法項目以外）を示した。

表-8 ビタミン類の定量下限推定結果（微生物定量法項目以外）

試験項目	分析条件	確認方法	推定量下限
ビタミンA	—	—	—
レチノール	条件A	検量線6点の残渣の標準偏差	3 µg/100g
	条件B	同上	3 µg/100g
α-カロテン	条件A	S/N=10(試行回数7)	6 µg/100g
	条件B	同上	6 µg/100g
β-カロテン	条件A	S/N=10(試行回数7)	6 µg/100g
	条件B	同上	6 µg/100g
クリプトキサンチン	条件A	S/N=10(試行回数10)	6 µg/100g
	条件B	同上	6 µg/100g
ビタミンB1(チアミン塩酸塩)	条件A	S/N=10(試行回数10)	0.01 mg/100g
	条件B	同上	0.01 mg/100g
ビタミンB2(リボフラビン)	条件A	S/N=10(試行回数10)	0.01 mg/100g
	条件B	同上	0.01 mg/100g
ビタミンC(総アスコルビン酸)	条件A	S/N=10(試行回数10)	1 mg/100g
	条件B	同上	1 mg/100g
ビタミンE(α-トコフェロール)	条件A	S/N=10(試行回数7)	0.1 mg/100g
	条件B	同上	0.1 mg/100g
ビタミンK	—	—	—
フィロキノン	条件A	S/N=10(試行回数10)	1 µg/100g
	条件B	同上	1 µg/100g
メナキノン-4	条件A	S/N=10(試行回数10)	1 µg/100g
	条件B	同上	1 µg/100g
メナキノン-7	条件A	S/N=10(試行回数10)	5 µg/100g
	条件B	同上	5 µg/100g
	条件C	同上	5 µg/100g

5. 糖類

単糖として果糖，ブドウ糖，二糖としてシヨ糖，麦芽糖，乳糖について表-8, 9に示した条件により，併行精度と添加回収試験（試行3回）による真度の確認並びに定量下限の推定を行った。

この結果，栄養表示基準に関わる分析法として十分な精度，真度及び定量下限が確認された。

1) 併行精度

糖類の併行精度の結果を表-8に示した。

表-9 糖類の併行精度測定結果

試験項目	食品マトリックス	濃度	試行数	相対標準偏差	分析条件など
果糖	デンブン	2g/100g	10	2.65%	水抽出，示差屈折計
果糖	デンブン	2g/100g	10	3.10%	水抽出，蛍光検出器
果糖	デンブン	2g/100g	10	1.95%	50%エタノール抽出，示差屈折計
果糖	デンブン	2g/100g	10	1.78%	50%エタノール抽出，蛍光検出器
ブドウ糖	デンブン	2g/100g	10	2.80%	水抽出，示差屈折計
ブドウ糖	デンブン	2g/100g	10	2.96%	水抽出，蛍光検出器
ブドウ糖	デンブン	2g/100g	10	2.89%	50%エタノール抽出，示差屈折計
ブドウ糖	デンブン	2g/100g	10	1.53%	50%エタノール抽出，蛍光検出器
シヨ糖	デンブン	2g/100g	10	2.39%	水抽出，示差屈折計
シヨ糖	デンブン	2g/100g	10	2.87%	50%エタノール抽出，示差屈折計
麦芽糖	デンブン	2g/100g	10	1.97%	水抽出，示差屈折計
麦芽糖	デンブン	2g/100g	10	2.30%	水抽出，蛍光検出器
麦芽糖	デンブン	2g/100g	10	2.01%	50%エタノール抽出，示差屈折計
麦芽糖	デンブン	2g/100g	10	1.85%	50%エタノール抽出，蛍光検出器
乳糖	デンブン	2g/100g	10	2.10%	水抽出，示差屈折計
乳糖	デンブン	2g/100g	10	2.64%	水抽出，蛍光検出器
乳糖	デンブン	2g/100g	10	2.98%	50%エタノール抽出，示差屈折計
乳糖	デンブン	2g/100g	10	1.34%	50%エタノール抽出，蛍光検出器