

第3章 ビタミン

I. 脂溶性ビタミン

20 レチノール

20-1. 高速液体クロマトグラフ法

適用

食品全般に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

高速液体クロマトグラフ（紫外吸光度検出器付き）

弧動式振り混ぜ機

恒温水槽

遠心分離機

ロータリーエバポレーター

褐色遠心管

褐色なす形フラスコ

クロマト管

(2) 試薬

パルミチン酸レチノール標準液 高速液体クロマトグラフ用（注1）：和光純薬工業（株）

ピロガロール：特級

水酸化カリウム：特級

塩化ナトリウム：特級

活性アルミナ：Merck, Art.1097

酢酸エチル：残留農薬試験用

ヘキサン：残留農薬試験用

石油エーテル：残留農薬試験用

ジエチルエーテル：残留農薬試験用

エタノール：残留農薬試験用

メタノール：高速液体クロマトグラフ用

2-プロパノール：特級

2, 6-ジ-*tert*-ブチル-4-メチルフェノール（BHT）：特級（注2）

dl- α -トコフェロール：特級（注2）

0.05 g/L dl- α -トコフェロール-エタノール溶液

10 g/L 塩化ナトリウム溶液

600 g/L 水酸化カリウム溶液

ヘキサン-2-プロパノール-酢酸エチル混液（9：1.5：1 v/v/v, 約24 mg/L BHT 含有）

石油エーテル-ジエチルエーテル混液 (95 : 5 v/v)

石油エーテル-ジエチルエーテル混液 (8 : 2 v/v)

メタノール-水混液 (88 : 12 v/v)。

(3) 標準溶液の調製

パルミチン酸レチノール 1 カプセルを試料と同様にけん化し、不けん化物を抽出する。溶媒留去後、レチノールを 2-プロパノール 100 mL に溶解して標準原液とする。標準原液を 2-プロパノールで適宜希釈し、レチノール濃度で 2 ~ 3 µg/mL の希釈標準液を調製し、この液について 325 nm の吸光度を測定する。次式により希釈標準液のレチノール濃度を求める。

$$\text{レチノール濃度 (}\mu\text{g/mL)} = \frac{E \times 549}{100}$$

E : 希釈標準溶液の 325 nm における吸光度 (対照 : 2-プロパノール・1 cm セル)

標準原液を 0.05 g/L dl- α -トコフェロール-エタノール溶液で希釈し、約 0.006 ~ 3 µg/mL の溶液を数点調製し、高速液体クロマトグラフ用標準溶液とする。

(4) 操 作

1) けん化

試料を十分に均質化し、その 0.5 ~ 1.5 g (W) (注 3) を容量 60 mL 共栓褐色遠心管に正確にはかりとり、10 g/L 塩化ナトリウム溶液 2 mL (注 4) を加えてかき混ぜる。ピロガロール 0.3 g, エタノール 10 mL, 水酸化カリウム 2 g 及び 600 g/L 水酸化カリウム溶液 1 mL (注 5) を加え、70 °C 水浴中できき混ぜながら、30 分間加熱する。

2) 抽 出

けん化後、冷水中で速やかに室温まで冷却し、10 g/L 塩化ナトリウム溶液 20 mL 及びヘキサン-2-プロパノール-酢酸エチル混液 (9 : 1.5 : 1 v/v/v, 約 24 mg/L BHT 含有) 14 mL を加える。栓をして振り混ぜ機で 5 分間振り混ぜ、1500 回転/分で 5 分間遠心分離後、上層を褐色なす形フラスコに移す。残った水層にヘキサン-2-プロパノール-酢酸エチル混液 (9 : 1.5 : 1 v/v/v, 約 24 mg/L BHT 含有) 14 mL を加え、同様の操作を 2 回繰り返す。抽出液を合わせ、ロータリーエバポレーターで溶媒を減圧留去する。残留物を石油エーテル 5 mL に溶かし、カラムクロマトグラフィー用試料溶液とする。

3) カラムクロマトグラフィー (注 6)

内径 1 cm のクロマト管に、あらかじめ弱活性化したアルミナを石油エーテルにけん濁させて、約 7 cm の高さまで充填する。これに 2) の溶液を静かに流し入れ、約 1 mL/分の速さで流出する。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。続いて石油エーテル-ジエチルエーテル混液 (95 : 5 v/v) で不純物を溶出させる。受器に褐色なす形フラスコを置き石油エーテル-ジエチルエーテル混液 (8 : 2 v/v) を流し入れ、レチノール画分を溶出する。

4) 試料溶液

溶出液をロータリーエバポレーターで減圧留去する。残留物に、試料溶液の濃度が検量線の範囲内になるようにエタノールを加えて溶解し、試料溶液 (V) とする。

5) 高速液体クロマトグラフィー

[操作条件例]

カラム : 内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, ODS 系逆相型カラム (例えば, ナカライテスク Cosmosil C₁₈)

移動相 : メタノール-水混液 (88 : 12 v/v)

流速：1.0 mL/分

温度：40℃

波長：325 nm

6) 測定

試料溶液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する。同様にレチノール標準溶液20 μLを注入し、レチノールの検量線を作成する。

(5) 計算

$$\text{レチノール含量 (}\mu\text{g/100 g)} = C \times V \times N \times \frac{100}{W}$$

C ：検量線より求めた試料溶液中のレチノール濃度 (μg/mL)

V ：試料溶液量 (mL)

N ：希釈率

W ：試料採取量 (g)

注 解

(注1) パルミチン酸レチノールは0.550 μgが1国際単位 (IU) に相当する。20カプセル入りで市販している。

(注2) BHT及びdl-α-トコフェロールは酸化防止剤として加える。

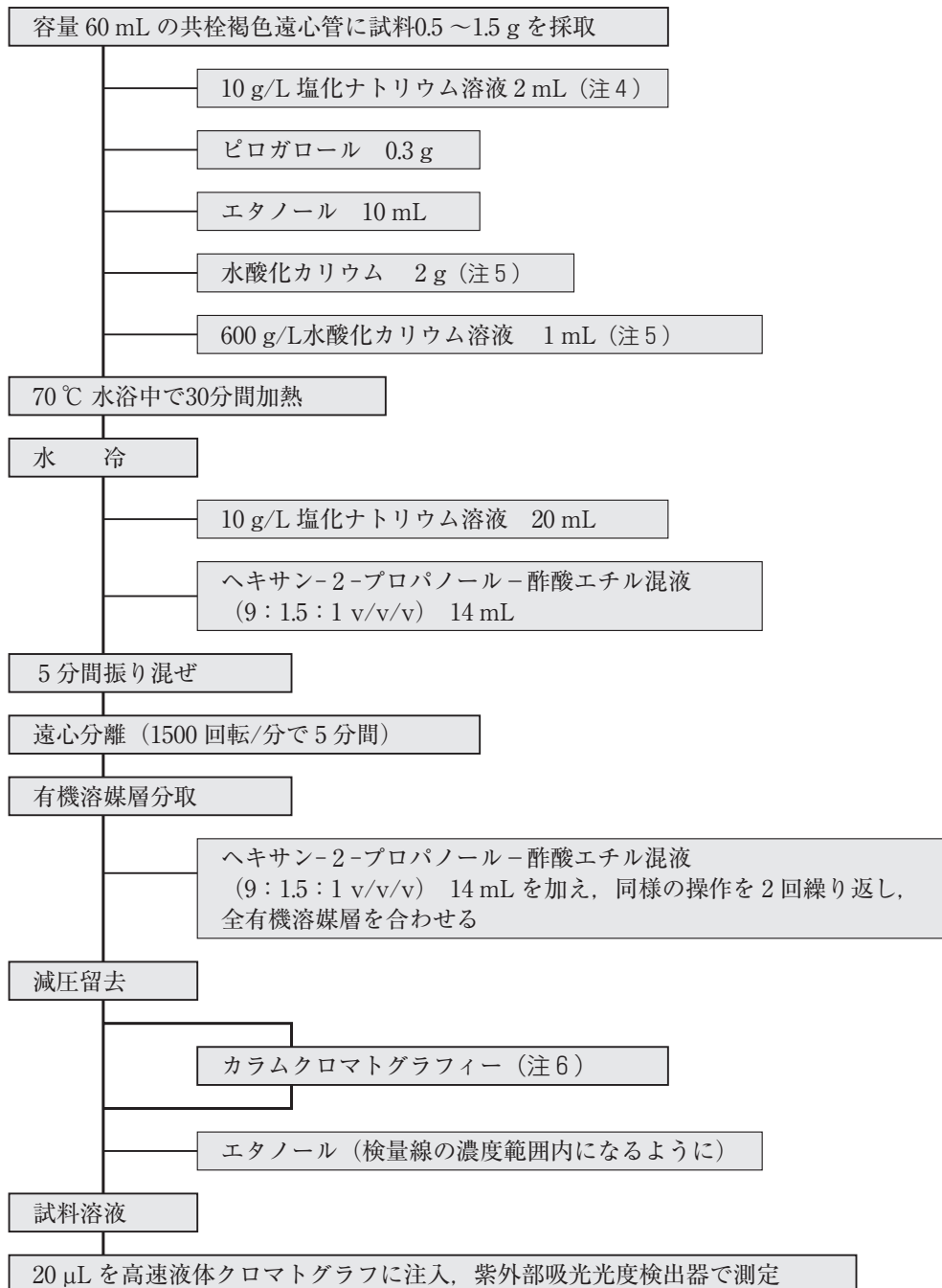
(注3) 含量の少ない場合 (牛乳など) は、試料採取量を2 g程度まで増やすことで、検出感度及び再現性を向上させることができる。

(注4) 肉類や惣菜など、油分の多い試料については1 mLとする。添加する水分が多いと、油分が分離してけん化が充分に行われないためである。また、試料が穀類の場合、塩化ナトリウム溶液を加えることにより試料が凝固する場合がある。このような試料においては塩化ナトリウム溶液は加えない。

(注5) 肉類や惣菜など、油分の多い試料については、けん化不足を防ぐため、加えるアルカリの量を増やす場合がある (水酸化カリウム3 g, 600 g/L水酸化カリウム溶液2 mLなど)。

(注6) アルミナカラムクロマトグラフィーは、妨害ピークを認めない場合は省略することができる。アルミナの弱活性化は、水約10%を加え、よく振り混ぜ混合して、乾燥剤を入れないデシケーター中で一夜放置し、平衡状態にしてから用いる。

レチノール定量法・フローチャート



21

α -カロテン、 β -カロテン及び β -クリプトキサンチン

21-1. 高速液体クロマトグラフ法

適用

食品全般に用いる。ただし、野菜類、果実類、藻類、香辛料及び調理加工食品類は HAET（注1）抽出法を行い、穀類（注2）、いも及びでん粉類（注2）、種実類、豆類、きのこ類、菓子類（注3）、嗜好飲料類、油脂類、魚介類（注4）、肉類、卵類、乳類並びに調味料類は直接けん化法を行う。

測定方法

(1) 装置及び器具

高速液体クロマトグラフ（可視部吸光光度検出器付き）

弧動式振り混ぜ機

縦型振り混ぜ機

恒温水槽

遠心分離機

ロータリーエバポレーター

褐色遠心管

なす形フラスコ

白色広口全量フラスコ

超音波発生器

(2) 試薬

α -カロテン標準品 高速液体クロマトグラフ用：和光純薬工業（株）

β -カロテン標準品 高速液体クロマトグラフ用：和光純薬工業（株）

β -クリプトキサンチン標準品：Extrasynthese. Inc 製

ピロガロール：特級

塩化ナトリウム：特級

水酸化カリウム：特級

エタノール：残留農薬試験用又は特級

ヘキサン：残留農薬試験用

アセトン：特級

トルエン：特級

酢酸エチル：残留農薬試験用

2-プロパノール：特級

石油エーテル：残留農薬試験用

シクロヘキサン：特級

アセトニトリル：残留農薬試験用

テトラヒドロフラン：特級

メタノール：高速液体クロマトグラフ用

酢酸：特級

2,6-ジ-*tert*-ブチル-4-メチルフェノール（BHT）：特級（注5）

dl- α -トコフェロール：特級（注5）

HAET（注1）

エタノール-HAET 混液（6：4 v/v）

600 g/L 水酸化カリウム溶液

10 g/L 塩化ナトリウム溶液

ヘキサン-2-プロパノール-酢酸エチル混液（9：1.5：1 v/v/v，約24 mg/L BHT 含有）

アセトニトリル-メタノール-テトラヒドロフラン-酢酸混液（55：40：5：0.1 v/v/v/v，0.05 g/L dl- α -トコフェロール含有）

（3）標準溶液の調製

（a） α -カロテン標準溶液

α -カロテン標準品 5 mg を石油エーテルに溶解し，100 mL に定容し標準原液とする。この標準原液を石油エーテルで25倍に希釈し444 nm の吸光度を測定する。 α -カロテンの吸光係数（ $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2800$ ）を用いて標準原液中の α -カロテン濃度を求める。

$$\text{標準原液の } \alpha\text{-カロテン濃度 } (\mu\text{g/mL}) = \frac{E \times 10000}{2800} \times 25$$

E ：標準原液の444 nm における吸光度（対照：石油エーテル，1 cm セル）

標準原液をエタノール-HAET 混液（6：4 v/v）で希釈して約0.006～3 $\mu\text{g/mL}$ の溶液を数点調製し，高速液体クロマトグラフ用標準溶液とする。

（b） β -カロテン標準溶液

β -カロテン標準品20 mg をシクロヘキサンに溶解し，100 mL に定容し標準原液とする。この標準原液をシクロヘキサンで50倍に希釈し，455 nm の吸光度を測定する。 β -カロテンの吸光係数（ $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2500$ ）を用いて標準原液中の β -カロテン濃度を求める。

$$\text{標準原液の } \beta\text{-カロテン濃度 } (\mu\text{g/mL}) = \frac{E \times 10000}{2500} \times 50$$

E = 標準溶液の455 nm における吸光度（対照：シクロヘキサン，1 cm セル）

標準原液をエタノール-HAET 混液（6：4 v/v）で希釈して約0.006～8 $\mu\text{g/mL}$ の溶液を数点調製し，高速液体クロマトグラフ用標準溶液とする。

（c） β -クリプトキサンチン標準溶液

β -クリプトキサンチン標準品 1 mg を HAET 5 mL で溶解した後，ヘキサンで50 mL に定容し標準原液とする。この標準原液をヘキサンで10倍に希釈し，450 nm の吸光度を測定する。 β -クリプトキサンチンの吸光係数 $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2460$ を用いて標準溶液中の β -クリプトキサンチン濃度を求める。

$$\text{標準原液の } \beta\text{-クリプトキサンチン濃度 } (\mu\text{g/mL}) = \frac{E \times 10000}{2460} \times 10$$

E ：標準溶液の450 nm における吸光度（対照：ヘキサン，1 cm セル）

標準原液をエタノール-HAET 混液（6：4 v/v）で希釈して約0.006～1.5 $\mu\text{g/mL}$ の溶液を数点調

製し、高速液体クロマトグラフ用標準溶液とする。

(4) 操 作

1) 前 処 理

(a) HAET 抽出法 (試料が野菜類、果物類及び藻類などの場合)

試料を十分に均質化し(注6)、その0.5~8 g (W) (注7) を容量100 mL 白色広口全量フラスコに正確にはかりとり、ピロガロール 2 g、水 5 mL (注8)、HAET40 mL (注9) 及びエタノール20 mL を加える。栓をして縦型振り混ぜ機で15 分間振とうする。エタノールで定容し、超音波槽に10 分間放置する(注10)。抽出液10 mL (注11) を容量60 mL 共栓褐色遠心管にとり、エタノール10 mL 及び600 g/L 水酸化カリウム溶液 2 mL (注11) を加え、70 °C の水浴中でときどき攪拌しながら、30分間加熱する(注12)。

(b) 直接けん化法 (試料が野菜や果物を含まない場合)

試料を十分に均質化し、その約0.5~2 g (W) を容量60 mL 共栓褐色遠心管に正確にはかりとり、ピロガロール0.3 g、10 g/L 塩化ナトリウム溶液 2 mL、エタノール10 mL、水酸化カリウム 2 g 及び600 g/L 水酸化カリウム溶液 1 mL を加え、70 °C の水浴中でときどき攪拌しながら、30分間加熱する。

2) 抽 出

けん化後、冷水中で速やかに室温まで冷却し、10 g/L 塩化ナトリウム溶液20 mL、ヘキサン-2-プロパノール-酢酸エチル混液 (9 : 1.5 : 1 v/v/v、約24 mg/L BHT 含有) 14 mL を加える。栓をして振り混ぜ機で5分間振り混ぜ、1500回転/分で5分間遠心分離後、上層をなす形フラスコに移す。残った水層にヘキサン-2-プロパノール-酢酸エチル混液 (9 : 1.5 : 1 v/v/v、約24 mg/L BHT 含有) 14 mL を加え、同様の操作を2回繰り返す。抽出液を合わせ、ロータリーエバポレーターで減圧留去する。残留物に試料溶液の濃度が検量線の範囲内になるようにエタノールを加えて溶解し、試料溶液 (V) とする。

3) 高速液体クロマトグラフィー

[操作条件例]

カラム：内径4.6 mm、長さ250 mm、ODS系逆相型カラム (例えば、Inertsil ODS-4, 5 µm)。

移動相：アセトニトリル-メタノール-テトラヒドロフラン-酢酸混液 (55 : 40 : 5 : 0.1 v/v/v/v、0.05 g/L dl- α -トコフェロール含有)

流速：1.5 mL/分

温度：40 °C

波長：455 nm

4) 測 定

試料溶液20 µL を高速液体クロマトグラフに注入し、 α -カロテン、 β -カロテン及び β -クリプトキサンチンのピーク面積を測定する。同様に α -カロテン、 β -カロテン及び β -クリプトキサンチン標準溶液をそれぞれ20 µL 注入し、 α -カロテン、 β -カロテン及び β -クリプトキサンチンの検量線を作成する。

(5) 計 算

$$\alpha-, \beta\text{-カロテンまたは}\beta\text{-クリプトキサンチン含量 } (\mu\text{g}/100 \text{ g}) = C \times V \times N \times \frac{100}{W}$$

C：検量線より求めた試料溶液中の α -、 β -カロテンまたは β -クリプトキサンチン濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

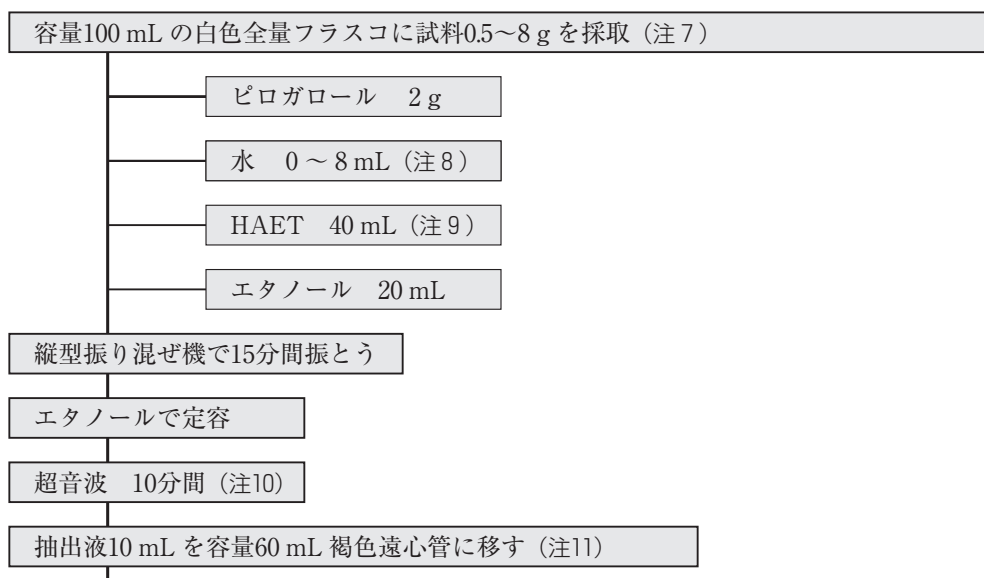
V：定容量 (mL)

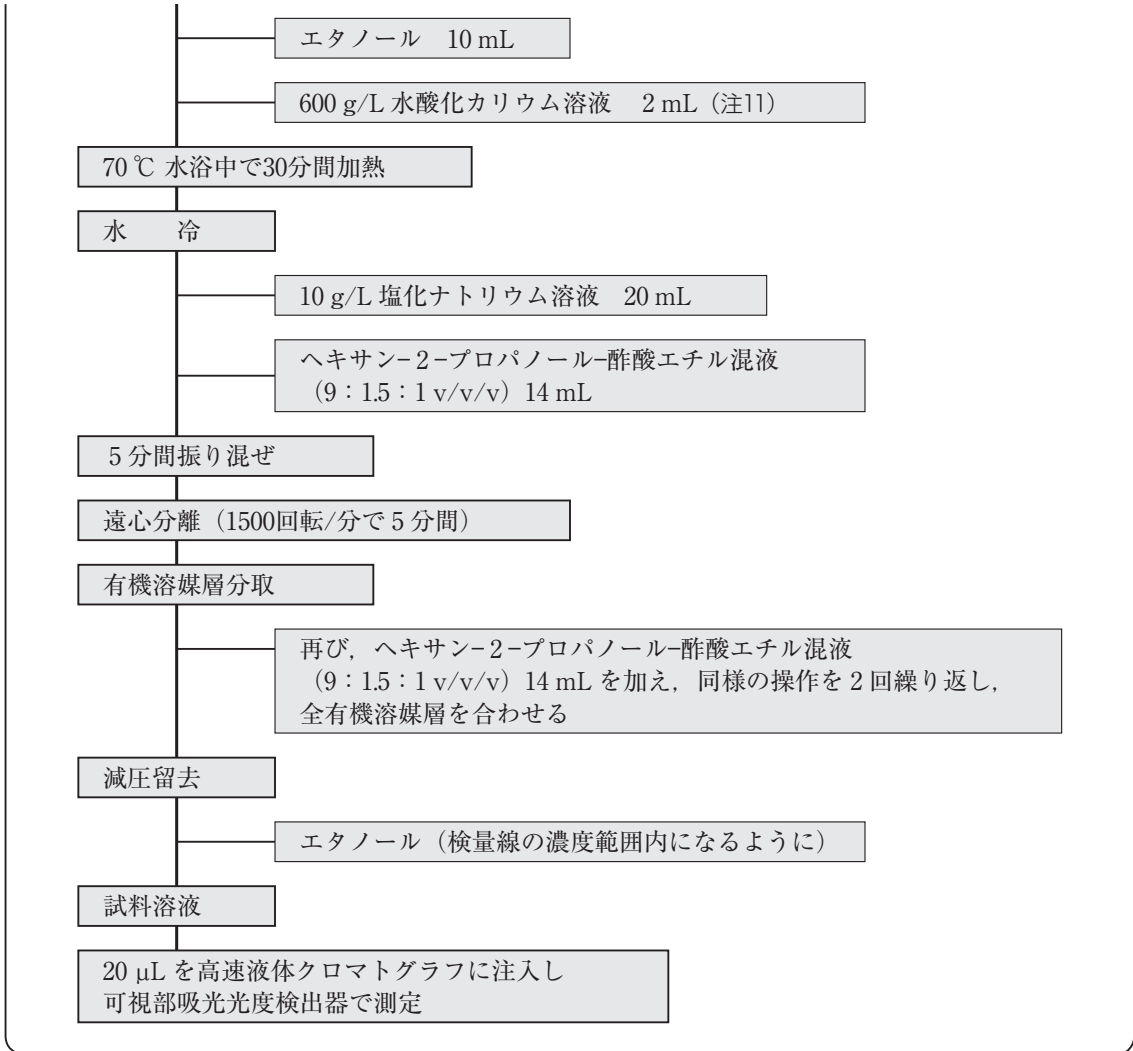
N : 希釈率
 W : 試料採取量 (g)

注 解

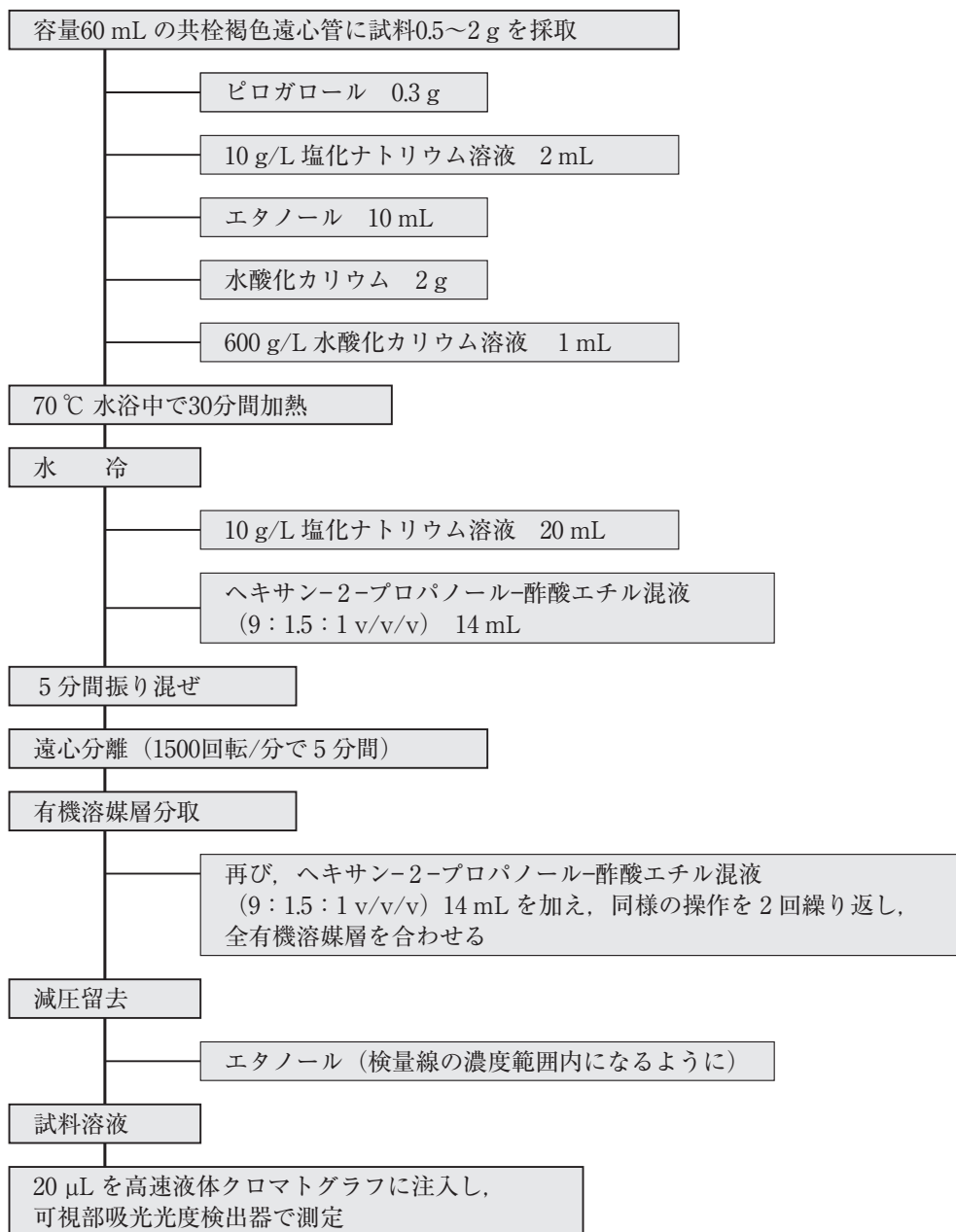
- (注1) ヘキサン, アセトン, エタノール及びトルエンの混液 (10:7:6:7 v/v/v/v)。
(注2) 乾燥品は水を試料質量の数倍加え, 膨潤後にけん化する。ただし, でん粉の多いものは膨潤を行わない。
(注3) ジャムを含む場合は HAET 抽出法による。
(注4) 水産練り製品で野菜を含むものは HAET 抽出法による。
(注5) BHT, dl- α -トコフェロールは酸化防止剤として加える。
(注6) 生の野菜類や果物類はそのまま粉碎するとカロテンの劣化が進む。粗切りにした後, ピロガロールを混ぜて粉碎することでカロテンの劣化を防ぐことができる。
(注7) 乾燥藻類や茶葉など, カロテン又はクリプトキサンチンの含量が多いものは 0.2~1 g 程度で充分である。水分の多い野菜類, 果実類は試料のばらつきを抑えるため 5~8 g を採取する。
(注8) 試料が水分を多く含む場合には水の添加は不要。試料が糖分を多く含む場合は有機溶媒を加えると固まる可能性があるため, 水を加えて薄めるとよい。水分の総量が 8 mL を超えると水分と有機溶媒が分離するので 8 mL を超えないようにする。試料が藻類の場合, 水を加えて 70℃ の水浴で 5 分程度加熱すると抽出しやすくなる。
(注9) 10 mL ずつ加え, そのたびによく攪拌する。
(注10) 色素が試料から抽出液に抜けていることを確認する。
(注11) カロテンやクリプトキサンチンの含量が低い試料の場合は抽出液を 20 mL 分取する。その場合は水酸化カリウム溶液 2 mL 及び水酸化カリウム 1 g を加える。エタノール 10 mL は加えない。
(注12) にんじん, にんじんジュースが試料の場合はけん化は省略できる。

**α -カロテン, β -カロテン及び β -クリプトキサンチン定量法・フローチャート-1
—HAET 抽出法—**





α-カロテン、β-カロテン及びβ-クリプトキサンチン定量法・フローチャート-2
—直接けん化法—



22 カルシフェロール（ビタミンD）

22-1. 高速液体クロマトグラフ法

適用

食品全般に用いる（注1）。

測定方法

（1）装置及び器具

高速液体クロマトグラフ（紫外部吸光光度検出器付き）

弧動式振り混ぜ機

恒温水槽

遠心分離機

ロータリーエバポレーター

褐色遠心管

褐色なす形フラスコ

フラクションコレクター

（2）試薬

エルゴカルシフェロール標準品：（一財）医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団

コレカルシフェロール標準品：（一財）医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団

エタノール：特級

2-プロパノール：特級

塩化ナトリウム：特級

ピロガロール：特級

6-エトキシ-2, 2, 4-トリメチル-1, 2-ジヒドロキノリン（エトキシキン）（注2）

dl- α -トコフェロール：特級（注2）

2, 6-ジ- ϵ -ブチル-4-メチルフェノール（BHT）：特級（注2）

水酸化カリウム：特級

アセトニトリル：残留農薬試験用，特級又は高速液体クロマトグラフ用

酢酸エチル：残留農薬試験用又は特級

ヘキサン：残留農薬試験用又は特級

10 g/L 塩化ナトリウム溶液

30 g/L ピロガロール-エタノール溶液（0.01 % エトキシキン及び0.005 % dl- α -トコフェロール含有）：用時調製

600 g/L 水酸化カリウム溶液

ヘキサン-酢酸エチル混液（9：1 v/v）

第1段階高速液体クロマトグラフ用移動相：ヘキサン-2-プロパノール（99：1 v/v，0.002 % エトキシキン含有）

第2段階高速液体クロマトグラフ用移動相：アセトニトリル-水混液（9：1 v/v）

（3）標準溶液の調製

結晶エルゴカルシフェロール（ビタミンD₂）及びコレカルシフェロール（ビタミンD₃）各50 mgを

それぞれヘキサン200 mLに溶かす。これらの溶液をそれぞれ一定量とり混合し、溶媒留去後、それぞれの濃度が0.25 µg/mLになるようにアセトニトリルで希釈し、カルシフェロール標準溶液とする（目安としてBHTを0.04 %添加する）。標準品はあらかじめエタノール溶液として230 nmの吸光度/265 nmの吸光度を測定し、0.65以下であることを確認する。

(4) 操 作

1) け ん 化

試料を十分に均質化し、その0.5～6 gを正確に遠心管にはかりとる。別に、カルシフェロール標準溶液2 mLを遠心管にはかりとり、試料と同様に以下の操作を行う。遠心管に10 g/L塩化ナトリウム溶液3 mL（注3）、30 g/Lピロガロール-エタノール溶液（0.01 % エトキシキン及び0.005 % dl- α -トコフェロール含有）10 mL、水酸化カリウム3 g及び600 g/L水酸化カリウム溶液2 mLを加え、70℃水中でときどき攪拌しながら60分間加熱する。

2) 抽 出

けん化後、冷水中で速やかに室温まで冷却し、10 g/L塩化ナトリウム溶液19 mL（注3）及びヘキサン-酢酸エチル混液（9：1 v/v）15 mLを加え、栓をして振り混ぜ機で5分間振り混ぜ、1500～3000回転/分で5分間遠心分離後、上層をなす形フラスコに移す。残った水層にヘキサン-酢酸エチル混液（9：1 v/v）15 mLを加え、同様の操作を2回繰り返す。抽出液を合わせ、ロータリーエバポレーターで減圧留去する。残留物をヘキサン500～5000 µL（ただし、カルシフェロール標準溶液の場合は1000 µL）に溶解し、カルシフェロール画分分取用試料溶液及びカルシフェロール画分分取用標準溶液とする。

3) 第1段階高速液体クロマトグラフィー

得られたカルシフェロール画分分取用試料溶液及びカルシフェロール画分分取用標準溶液の150 µLをフラクションコレクターを連結した高速液体クロマトグラフに注入し、カルシフェロール画分を分取する。

[操作条件例]

カラム：内径4.6～6.0 mm、長さ250 mm、順相型カラム（例えば、POLYGOSIL 60, 5 µm、内径4.6 mm、長さ250 mm（株）ケムコプラス）

移動相：ヘキサン-2-プロパノール混液（99：1 v/v、0.002 % エトキシキン含有）

流速：1.5 mL/分

波長：265 nm

カルシフェロール画分：標準カルシフェロールの保持時間の前後各45秒をフラクションコレクターを用いて分取する（実験の最初にカルシフェロール標準溶液を、そのまま高速液体クロマトグラフに注入し、カルシフェロールのピークが出現する保持時間を確認しておく）。

4) 第2段階高速液体クロマトグラフィー

第1段階で分取したカルシフェロール画分の溶媒を減圧留去し、残留物をアセトニトリル200 µLに溶解する。この100 µLを高速液体クロマトグラフに注入し、カルシフェロールのピークの高さを測定する。同様にカルシフェロール標準溶液100 µLを注入し、標準溶液のピーク高さから試料中の含量を求める。

[操作条件例]

カラム：内径4.6～6.0 mm、長さ150～250 mm、ODS系 逆相型カラム（例えば、Cadenza CL-C18, 内径4.6 mm、長さ150 mm（インタクト（株））

移動相：アセトニトリル-水混液（9：1 v/v）

流速：1.5 mL/分

波長：265 nm

(5) 計 算

$$\text{カルシフェロール含量 (}\mu\text{g/100 g)} = C \times V \times N \times \frac{100}{W}$$

C ：標準溶液との比で求めた試料溶液中のカルシフェロール濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

V ：カルシフェロール画分分取用試料溶液の定容量 (mL)

N ：希釈率

W ：試料採取量 (g)

注 解

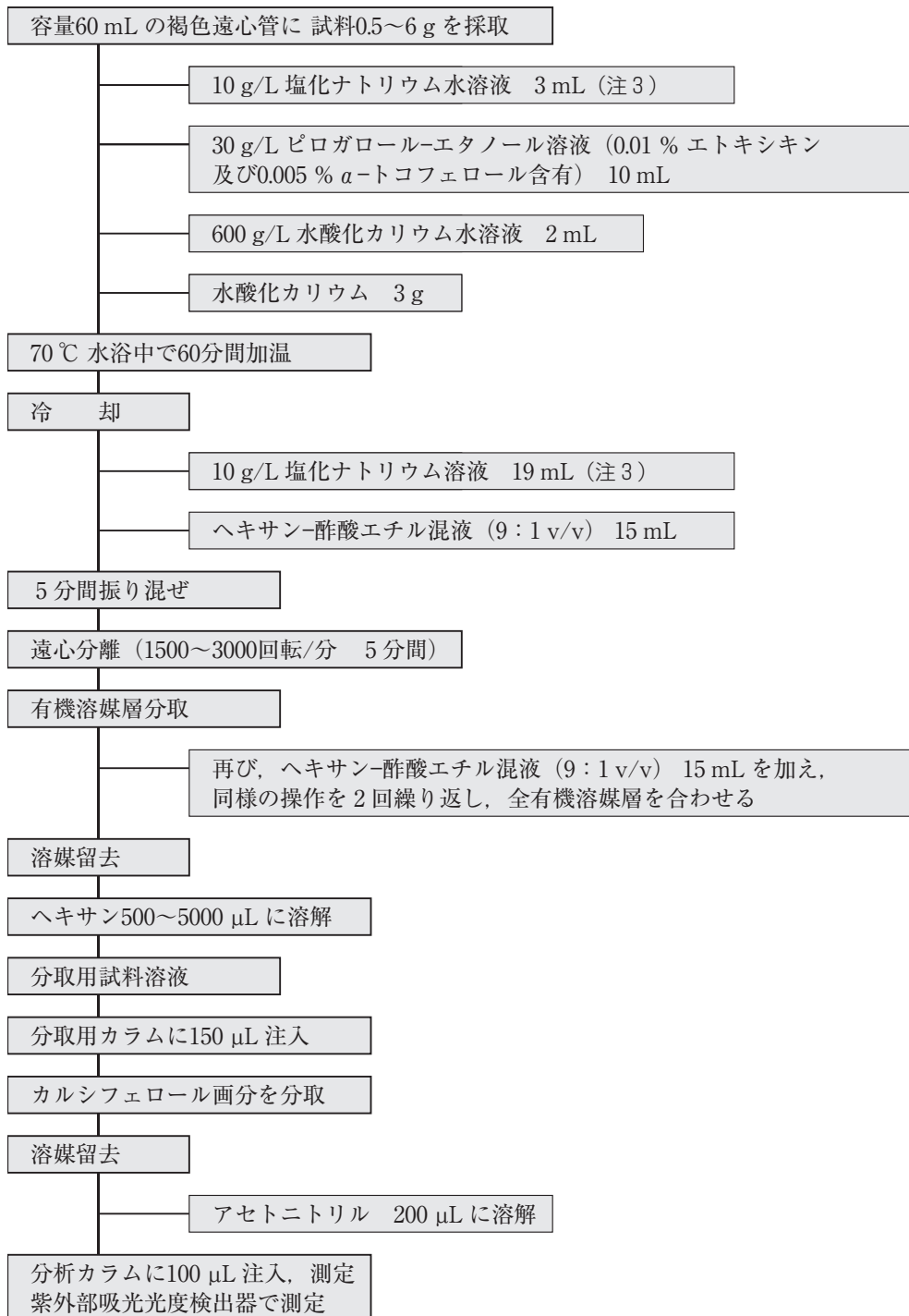
(注1) 卵類，乳類については，エルゴあるいはコレカルシフェロールよりも活性の高い代謝物（25-ヒドロキシカルシフェロール，24,25-ジヒドロキシカルシフェロール，1,25-ジヒドロキシカルシフェロール）が含まれている。

(注2) エトキシキン，dl- α -トコフェロール，BHT は酸化防止剤として加える。

(注3) 液体の場合は採取量に応じて5～7.5 mL加える。ただし，脂質含量が高く均質化処理時に水を加えた場合には加えないほうがよい。また，試料採取後に加えた10 g/L 塩化ナトリウム溶液の量により，けん化後は合計量として22 mLになるように適宜加える。

カルシフェロール定量法・フローチャート

(標準カルシフェロール0.25 µg を含むエタノール溶液について、以下の操作を同様に行う)



23 トコフェロール (ビタミン E)

23-1. 高速液体クロマトグラフ法

適用

食品全般に食品に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

高速液体クロマトグラフ (蛍光検出器付き)

弧動式振り混ぜ機

恒温水槽

ロータリーエバポレーター

遠心分離機

遠心管

褐色なす形フラスコ

褐色全量フラスコ

(2) 試薬

ビタミン E 定量用標準試薬 (α -、 β -、 γ -及び δ -トコフェロール) : エーザイ (株)

酢酸エチル : 残留農薬試験用

ヘキサン : 残留農薬試験用

エタノール : 特級

2-プロパノール : 特級

ピロガロール : 特級

水酸化カリウム : 特級

塩化ナトリウム : 特級

酢酸 : 特級

6-エトキシ-2, 2, 4-トリメチル-1, 2-ジヒドロキノリン (エトキシキン) (注1)

2, 6-ジ- α -ブチル-4-メチルフェノール (BHT) : 特級 (注1)

0.1 g/L エトキシキンのヘキサン溶液

10 g/L 塩化ナトリウム溶液

600 g/L 水酸化カリウム溶液

ヘキサン-2-プロパノール-酢酸エチル混液 (9 : 1.5 : 1 v/v/v, 約24 mg/L BHT 含有)

ヘキサン-2-プロパノール-酢酸混液 (1000 : 6 : 5 v/v/v, 約5 μ g/mL BHT 含有)

(3) 標準溶液の調製

各トコフェロール約200 mg をそれぞれ正確にはかりとり、エタノールを加え溶解後100 mL に溶解する。

これらの溶液をそれぞれ20 mL ずつ容量100 mL 褐色全量フラスコに分取し、エタノールで定容し、混合原液とする。混合原液をなす形フラスコに分取し、ロータリーエバポレーターを用いて減圧留去後、0.1 g/L エトキシキンのヘキサン溶液に溶解し各トコフェロール濃度約0.1~50 μ g/mL の溶液を数

点調製し、高速液体クロマトグラフ用標準溶液とする。

(4) 操 作

1) けん化

試料を十分に均質化し、その約0.5～3 g (*W*) を容量60 mL 遠心管に正確にはかりとり、10 g/L 塩化ナトリウム溶液 2 mL (注2) を加えてかき混ぜる。ピロガロール0.3 g, エタノール10 mL 及び600 g/L 水酸化カリウム溶液 2 mL を加え、70℃の水浴中でときどき攪拌しながら30分間加熱する。

2) 抽 出

けん化後、冷水中で速やかに室温まで冷却し、10 g/L 塩化ナトリウム溶液20 mL 及びヘキサン-2-プロパノール-酢酸エチル混液 (9 : 1.5 : 1 v/v/v, 約24 mg/L BHT 含有) 14 mL を加える。振り混ぜ機で5分間振り混ぜ、1500回転/分で5分間遠心分離後、上層をなす形フラスコに移す。残った水層にヘキサン-2-プロパノール-酢酸エチル混液 (9 : 1.5 : 1 v/v/v, 約24 mg/L BHT 含有) 14 mL を加え、同様の操作を2回繰り返す。抽出液を合わせ、ロータリーエバポレーターで溶媒を減圧留去する。残留物に、試料溶液の濃度が検量線の範囲内になるように0.1 g/L エトキシキンのヘキサン溶液を加えて溶解し、試料溶液 (*V*) とする。

3) 高速液体クロマトグラフィー

[操作条件例]

カラム：内径4.6 mm, 長さ250 mm, 順相カラム (例えば, YMC-Pack SIL-06 S-5)

移動相：ヘキサン-2-プロパノール-酢酸混液 (1000 : 6 : 5 v/v/v, 約5 µg/mL BHT 含有)

流速：1.5 mL/分

カラム温度：40℃

波長：励起波長298 nm, 測定波長325 nm

4) 測 定

試料溶液20 µL を高速液体クロマトグラフに注入し、各トコフェロールのピーク面積を測定する。同様にトコフェロール標準溶液20 µL を注入し、各トコフェロールの検量線を作成する。

(5) 計 算

$$\alpha-, \beta-, \gamma-, \delta\text{-トコフェロール含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times N \times 100}{1000 \times W}$$

C : 検量線より求めた試料溶液中の $\alpha-$, $\beta-$, $\gamma-$, $\delta-$ トコフェロール濃度 (µg/mL)

V : 試料溶液量 (mL)

N : 希釈率

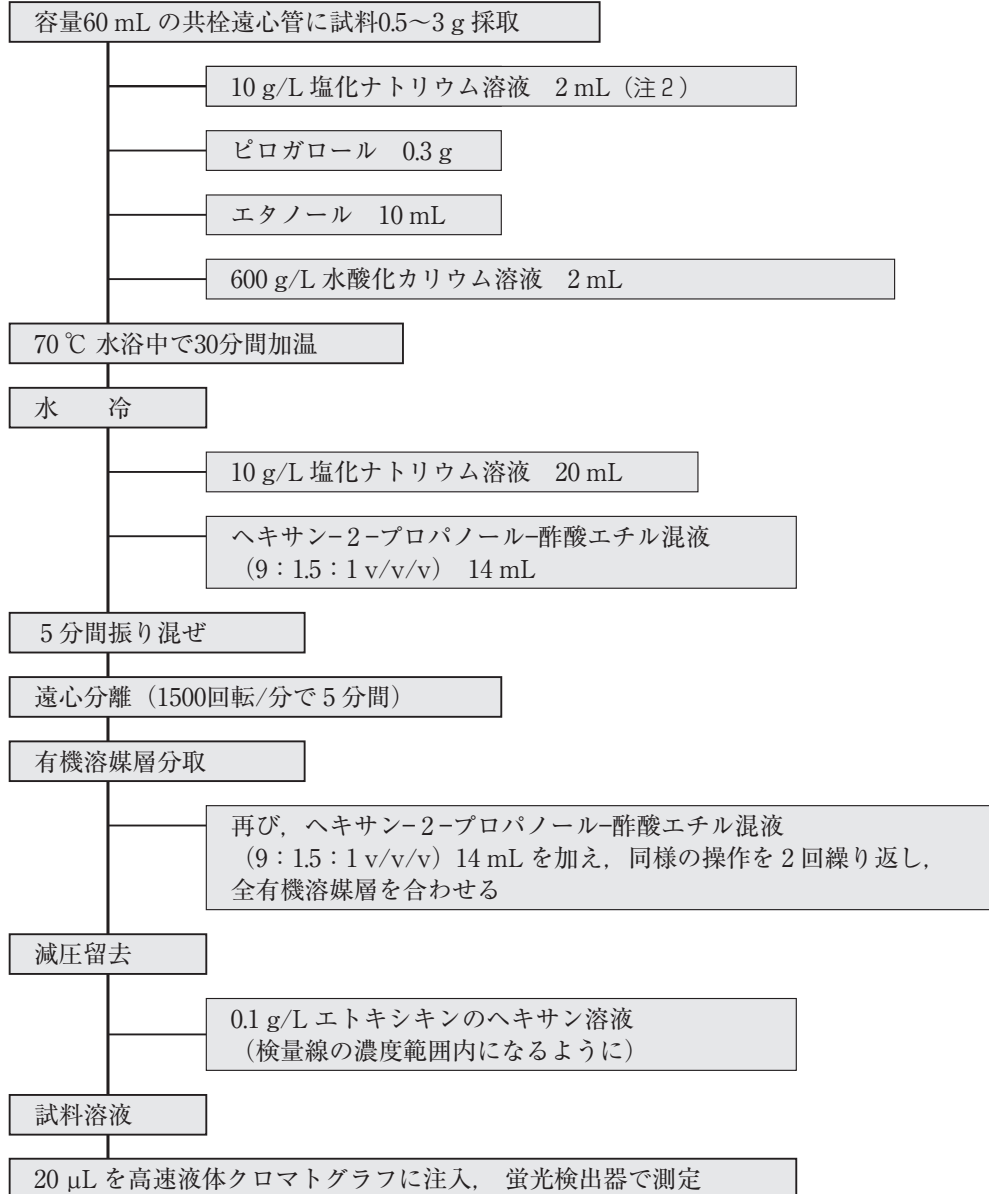
W : 試料採取量 (g)

注 解

(注1) エトキシキン, BHT は抗酸化剤として加える。

(注2) 10 g/L 塩化ナトリウム溶液は5 mL まで加えてよい。

トコフェロール定量法・フローチャート



24 フィロキノン及びメナキノン類 (ビタミン K)

24-1. 高速液体クロマトグラフ法

適用

食品全般に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

高速液体クロマトグラフ (蛍光検出器及びカラムスイッチングシステム付き)

弧動式振り混ぜ機

恒温水槽

遠心分離機

褐色遠心管 (注1)

ロータリーエバポレーター

Sep-pak シリカカートリッジ: ウォーターズ No.20520又は同等品

ボルテックスミキサー

超音波発生器

乳鉢

乳棒

ガラスろ過器

褐色なす形フラスコ (注1)

褐色全量フラスコ

褐色クロマト管

(2) 試薬

フィロキノン (ビタミン K₁) 標準品: (一財) 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団 (フィトナジオン標準品)

メナキノン-4 (ビタミン K₂) 標準品: (一財) 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団 (メナテトレノン標準品)

メナキノン-7 (ビタミン K₂) 標準品 高速液体クロマトグラフ用: 和光純薬工業 (株)

クエン酸一水和物: 特級

アセトン: 特級

硫酸ナトリウム (無水): 特級

2-プロパノール: 特級

ジエチルエーテル: 残留農薬試験用

ヘキサン: 残留農薬試験用

エタノール: 特級または残留農薬試験用

メタノール: 高速液体クロマトグラフ用

酢酸エチル: 残留農薬試験用

石油エーテル: 残留農薬試験用

シリカゲル: Merck, Art.7734

海砂

1% クエン酸溶液

ヘキサン-酢酸エチル混液 (9 : 1 v/v)

(3) 標準溶液の調製

フィロキノン標準溶液：フィロキノン標準品10 mg を容量100 mL 褐色全量フラスコに正確にはかりとり、2-プロパノールで定容する。2-プロパノールで希釈し約0.002~0.4 µg/mL の溶液を数点調製し、高速液体クロマトグラフ用標準溶液とする。

メナキノン-4 標準溶液：メナキノン-4 標準品10 mg を容量100 mL 褐色全量フラスコに正確にはかりとり、2-プロパノールで定容する。2-プロパノールで希釈し約0.002~0.4 µg/mL の溶液を数点調製し、高速液体クロマトグラフ用標準溶液とする。

メナキノン-7 標準溶液：メナキノン-7 標準品約20 mg を容量100 mL 褐色全量フラスコに正確にはかりとり、エタノール (残留農薬試験用) で定容する。2-プロパノールで希釈し約0.001~0.400 µg/mL の溶液を数点調製し、高速液体クロマトグラフ用標準溶液とする。

(4) 操 作

1) 抽 出

(a) 磨砕抽出法 (注2)

試料を十分に均質化し (注3)、その0.1~4 g を乳鉢に正確にはかりとり、イオン交換水2~3 mL、海砂適量及びメタノール約10 mL を加え乳棒で磨砕する。容量100 mL 褐色広口全量フラスコにガラスろ過器をセットし、吸引ろ過する。残留物を乳鉢に戻し、メタノール10 mL を入れ同じ操作を3回以上繰り返す。試料溶液の濃度が検量線の範囲内になるように、2-プロパノールでろ液を希釈する。

(b) アセトン浸漬法 (注4)

試料を十分に均質化し、その0.1~2 g を容量50 mL 褐色全量フラスコに正確にはかりとる。1% クエン酸溶液 (注5) 5 mL を加え、ボルテックスミキサーや超音波発生器などを用いて溶解又は分散させる。56℃の水浴中で5分間加熱し、アセトンを容量の8割程度加えて超音波発生器で10分間抽出した後、アセトンで定容する。抽出液を容量50 mL 共栓付き褐色遠心管に10 mL 又は20 mL はかりとり、分取量が10 mL の場合のみエタノール10 mL を加える。1% クエン酸溶液10 mL、ヘキサン-酢酸エチル混液 (9 : 1 v/v) 15 mL を加え栓をして振り混ぜ機で10分間振り混ぜる。1500回転/分で5分間遠心分離後、上層を褐色なす形フラスコに移す。残った水層にヘキサン-酢酸エチル混液 (9 : 1 v/v) 15 mL を加え振り混ぜ機で5分間振り混ぜる。1500回転/分で5分間遠心分離後、上層を褐色なす形フラスコに移す。同様の操作をさらに1回繰り返す。抽出液を合わせ、ロータリーエバポレーターで減圧留去する。

(c) 液-液分配法 (注6)

試料を十分に均質化し、その0.1~2 g を容量50 mL 共栓付き褐色遠心管に正確にはかりとり、1% クエン酸溶液5 mL を加え、ボルテックスミキサーや超音波発生器などを用いて溶解又は分散させる。56℃の水浴中で5分間加熱した後、さらに1% クエン酸溶液5 mL を加え、エタノール20 mL、ヘキサン-酢酸エチル混液 (9 : 1 v/v) 15 mL を加え栓をして振り混ぜ機で10分間振り混ぜる。1500回転/分で5分間遠心分離後、上層を褐色なす形フラスコに移す。残った水層にヘキサン-酢酸エチル混液 (9 : 1 v/v) 15 mL を加え振り混ぜ機で5分間振り混ぜる。1500回転/分で5分間遠心分離後、上層を褐色なす形フラスコに移す。同様の操作をさらに1回繰り返す。抽出液を合わせ、ロータリーエバポレーターで減圧留去する。

2) 精製 (注7)

(a) Sep-pakによる精製 (注8)

1) -b) c) の残留物に、ヘキサン 5 mL を加えて溶解し、Sep-pak シリカカートリッジに通す。次にヘキサン-ジエチルエーテル混液 (85:15 v/v) 30 mL を用い数回に分けてなす形フラスコを洗いながら Sep-pak シリカカートリッジに通す。全溶出液を褐色なす形フラスコに回収する。減圧留去し、残留物に試料溶液の濃度が検量線の範囲内になるように 2-プロパノールを加えて溶解し、試料溶液 (*M*) とする。

(b) シリカゲルカラムによる精製

褐色クロマト管 (内径1.0 cm, 長さ15 cm) に脱脂綿を詰め、シリカゲル 3 g をヘキサン湿式法で充填する。その上に硫酸ナトリウム (無水) を少量加える。1) -b) c) の残留物に、ヘキサン 10 mL を加えて溶解し、クロマト管に流し込む。さらにヘキサン 10 mL で洗い込む。ヘキサン-ジエチルエーテル混液 (85:15 V/V) 10 mL で残さを溶解させクロマト管に流し込む。同じ操作をさらに 2 回繰り返し、全溶出液を褐色なす形フラスコにはかりとる。減圧留去し、残留物に試料溶液の濃度が検量線の範囲内になるように 2-プロパノールを加えて溶解し、試料溶液 (*M*) とする。

3) 測定

試料溶液 50 μ L を高速液体クロマトグラフに注入し、ピーク面積を測定する。同様にフィロキノン、メナキノン-4 及びメナキノン-7 標準溶液 50 μ L を注入し、検量線を作成する。

4) 空試験値の測定 (注9)

高速液体クロマトグラフの系より還元カラムをはずした状態で試料溶液 50 μ L を高速液体クロマトグラフに注入し、空試験の測定を行う。

5) 高速液体クロマトグラフィー

[操作条件例]

(a) フィロキノン及びメナキノン-4

カラム: 内径4.6 mm, 長さ250 mm, ODS系逆相型カラム (例えば, L-Column)

還元カラム: 白金カラム (例えば, RC-10)

移動相: メタノール

流速: 0.8 mL/分

温度: 40 $^{\circ}$ C

励起波長: 240 nm (注10)

測定波長: 430 nm

(b) メナキノン-7

カラム: 内径4.6 mm, 長さ250 mm, ODS系カラム (例えば, L-Column)

還元カラム: 白金カラム (例えば, RC-10)

移動相: メタノール-エタノール (7:3 v/v)

流速: 1.0 mL/分

温度: 40 $^{\circ}$ C

励起波長: 240 nm (注10)

測定波長: 430 nm

(5) 計 算

$$\text{フィロキノン, メナキノン-4 又はメナキノン-7 含量}(\mu\text{g}/100\text{g}) = C \times V \times N \times \frac{100}{W}$$

C : 検量線より求めた試験溶液中のフィロキノン, メナキノン-4 又はメナキノン-7 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

V : 定容量 (mL)

N : 希釈率

W : 試料採取量 (g)

注 解

(注1) ビタミン K 類は紫外線により分解されるので、操作は褐色のガラス器具を使用する。

(注2) 納豆類, みそ類などに適用。

(注3) 納豆類は水を加えて粉碎混合すると均質化できる。

(注4) ほほすべての試料に適用。

(注5) ビタミン K は酸性下で安定なため, クエン酸を加える。

(注6) 緑色野菜類・肉類以外の一般食品に適用。

(注7) 抽出液中の定量妨害物質の種類や量によりカラム精製を実施する。精製方法の選択の基準を表 24-1 に示す。共存する妨害物質が少ない場合は精製操作を省略できる。

表24-1 精製方法

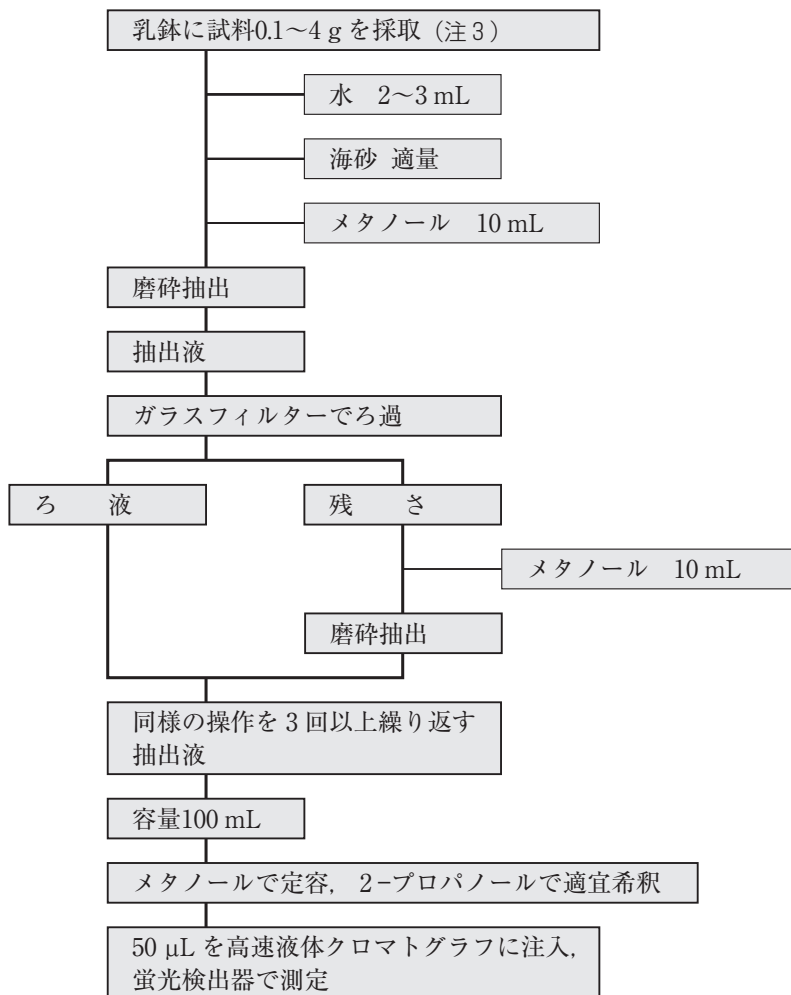
カラム精製の種類	適用検体など
(a) Sep-pak シリカ	植物由来の緑色が濃いもの
(b) シリカゲルカラム	油脂が多いもの及び Sep-pak シリカでは精製が不十分なもの

(注8) Sep-pak シリカカートリッジはあらかじめ, ヘキサン-ジエチルエーテル混液 (85 : 15 v/v) 20 mL, ヘキサン10 mL で順次洗浄しておく。

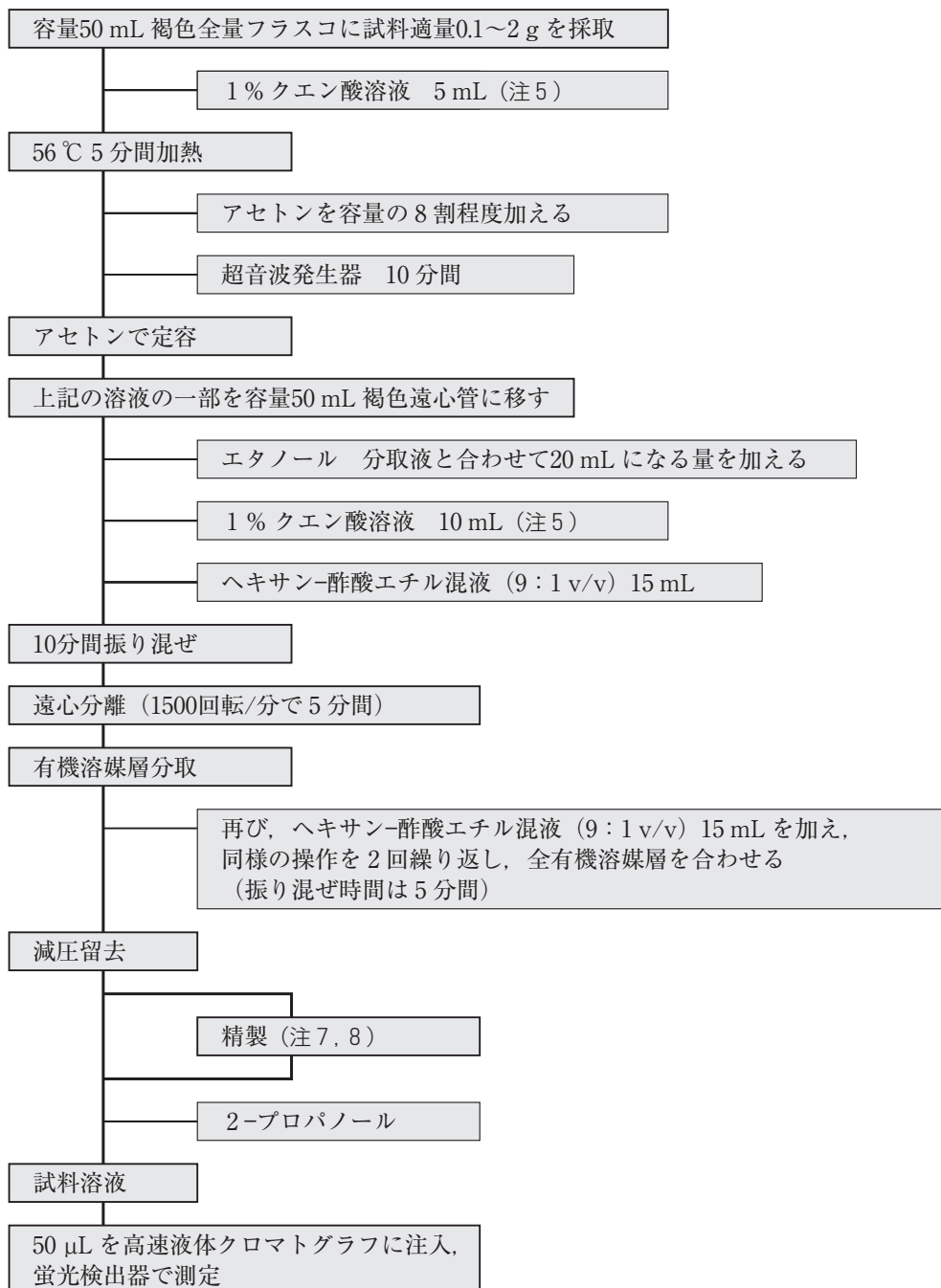
(注9) フィロキノン, メナキノン-4 またはメナキノン-7 の検出位置付近に妨害ピークがある場合に空試験値の測定を行う。

(注10) 320 nm も使えるが夾雑物のピークが検出される場合がある。

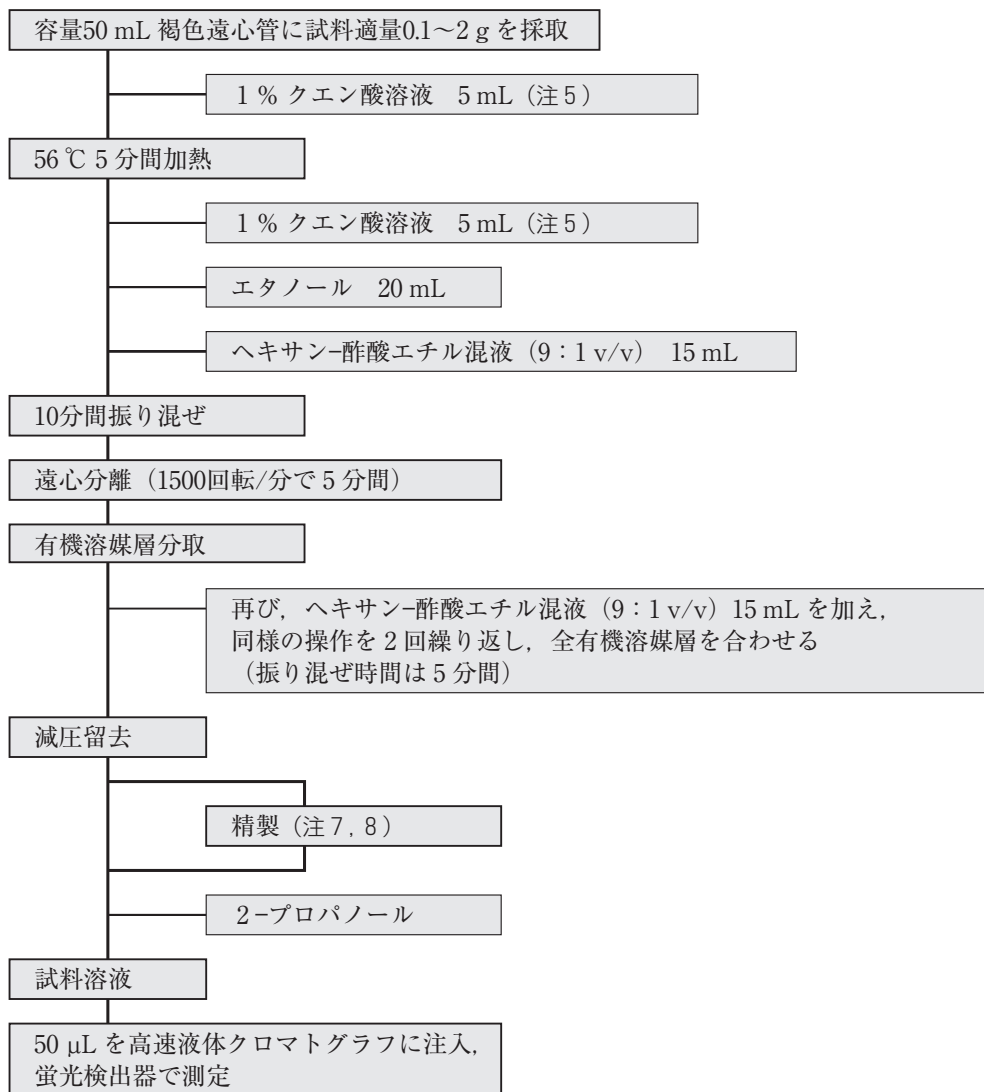
フィロキノン及びメナキノン類定量法・フローチャート-1
—磨砕抽出法—



フィロキノン及びメナキノン類定量法・フローチャート-2
—アセトン浸漬法—



フィロキノン及びメナキノン類定量法・フローチャート-3
—液-液分配法—



Ⅱ. 水溶性ビタミン

25 チアミン (ビタミン B₁)

25-1. 高速液体クロマトグラフ法

25-1-1. パームチットカラム精製—ポストカラム法

適用

食品全般に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

高速液体クロマトグラフ (蛍光検出器付き)

恒温水槽

恒温器

褐色抽出びん：容量100 mL

精製用褐色クロマト管：内径約7 mm

(2) 試薬

チアミン塩酸塩標準品：日本薬局方標準品「チアミン塩化物塩酸塩」((一財)医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団頒布)

ヒドロキシエチルチアミン (HET) 塩酸塩標準品：市販品 (和光純薬工業 (株))

塩酸：特級

酢酸：特級

酢酸ナトリウム三水和物：特級

チオ尿素：特級

リン酸加水分解酵素：ビタミン B₁・B₂定量用酸性ホスファターゼ (和光純薬工業 (株)) または同等品 (ホスファターゼ活性を有するもの)

陽イオン交換樹脂：パームチット, 活性ビタチェンジ ビタミン B₁定量用 (和光純薬工業 (株))

塩化カリウム：特級

水酸化ナトリウム：特級

フェリシアン化カリウム：特級

リン酸二水素ナトリウム二水和物：特級

過塩素酸ナトリウム (無水)：特級

過塩素酸：特級

メタノール：HPLC 用

4 mol/L 酢酸ナトリウム溶液：酢酸ナトリウム三水和物544 g を水に溶かして1 L とする。

酢酸緩衝液 (pH 4.5)：水1 L に50 % 酢酸10 mL と 4 mol/L 酢酸ナトリウム溶液20 mL を加える。

10 % チオ尿素溶液：チオ尿素100 g を水に溶かして1 L とする。

酵素溶液：酵素0.25 g を酢酸緩衝液 (pH 4.5) 10 mL に用時溶解し、ろ過または遠心分離して、その上澄み液を使用する。

25 % 塩化カリウム含有0.1 mol/L 塩酸溶液：塩化カリウム500 g と 1 mol/L 塩酸200 mL を水に溶か

して2000 mLとし、ろ過（ろ紙 JIS 2種）する。

チアミン塩酸塩標準原液：チアミン塩酸塩標準品を、105℃で2時間乾燥し、30分間デシケーターで放冷する。100 mgを容量1 L 全量フラスコにとり、1 mol/L 塩酸100 mLを加えて溶解した後、水で定容し、標準原液（100 µg/mL）とする。

チアミン塩酸塩標準溶液：チアミン塩酸塩標準原液を0.1 mol/L 塩酸で希釈し、1 µg/mLの標準溶液を調製する。

高速液体クロマトグラフ用チアミン塩酸塩標準溶液：チアミン塩酸塩標準溶液を加熱済み25%塩化カリウム含有0.1 mol/L 塩酸溶液で次のように希釈し、高速液体クロマトグラフ用チアミン塩酸塩標準溶液とする。

0.1 µg/mL 標準溶液：1 µg/mL 標準溶液 5 mLを50 mLに定容する。

0.02 µg/mL 標準溶液：0.1 µg/mL 標準溶液 5 mLを25 mLに定容する。

HET 塩酸塩標準原液：HET 塩酸塩標準品を、105℃で2時間乾燥し、30分間デシケーターで放冷する。100 mgを容量1 L 全量フラスコにとり、1 mol/L 塩酸100 mLを加えて溶解した後、水で定容し、標準原液（100 µg/mL）とする。

HET 塩酸塩標準溶液：HET 塩酸塩標準原液を0.1 mol/L 塩酸で希釈し、1 µg/mLの標準溶液を調製する。

高速液体クロマトグラフ用 HET 塩酸塩標準溶液：HET 塩酸塩標準溶液を加熱済み25%塩化カリウム含有0.1 mol/L 塩酸溶液で次のように希釈し、高速液体クロマトグラフ用 HET 塩酸塩標準溶液とする。

0.1 µg/mL 標準溶液：1 µg/mL 標準溶液 5 mLを50 mLに定容する。

0.02 µg/mL 標準溶液：0.1 µg/mL 標準溶液 5 mLを25 mLに定容する。

(3) 操 作

1) 抽 出

試料 2～6 g (W) (注1)を容量100 mL 褐色抽出びんにはかりとり、1 mol/L 塩酸を5 mL、10%チオ尿素溶液を1 mL加え、水を加えて約50 mLにした後、沸とう水浴中でときどきガラス棒でかき混ぜながら、15分間加熱抽出する。加熱抽出後、水冷して室温に戻し、4 mol/L 酢酸ナトリウム溶液でpH 4.5に調整する(注2)。酵素溶液3 mLを加え、酢酸緩衝液(pH 4.5)で100 mLに定容(V)し、38～42℃の恒温器中で、約16時間酵素分解を行う(注3)。室温に戻し、ろ過(ろ紙 JIS 6種)後、試料溶液とする。

2) 精 製

精製用クロマト管の下部に脱脂綿を詰め、水洗したパームチット1.6～1.7 gを水とともに流し込む。試料溶液25 mLを正確に加え、1 mL/分の速度で流し、さらに酢酸緩衝液(pH 4.5)約5 mLを加え、クロマト管壁内を洗い流す。水30～60 mLでカラムを洗浄した後、沸とう水約90 mLを注ぎ入れ、コックを全開して流出させ、カラムを温める。カラムが熱いうちに、沸とう直前の25%塩化カリウム含有0.1 mol/L 塩酸溶液をカラムに注加して、流速約2 mL/分で流し、チアミンを溶出させ、容量25 mL 全量フラスコに受ける(注4)。室温に戻し、25%塩化カリウム含有0.1 mol/L 塩酸溶液で25 mLとする。

3) 測定用試料溶液の調製

定容した液を25%塩化カリウム含有0.1 mol/L 塩酸溶液で適宜希釈する。

4) 高速液体クロマトグラフィー

[操作条件例]

カラム：内径4.6 mm、長さ250 mm、ODS系カラム（例えば、(一財)化学物質評価研究機構

L-column ODS)

移動相：メタノール-(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 (pH 2.2に調整)) 混液 (5 : 95 v/v) (注5)

流速：1 mL/分

反応液：0.03 % フェリシアン化カリウム-15 % 水酸化ナトリウム溶液, 0.5 mL/分

温度：40 °C

波長：励起波長375 nm, 蛍光波長440 nm

5) 測定

測定用試料溶液30 µL を高速液体クロマトグラフに注入し、ビタミン B₁ のピーク面積を測定する。同様にチアミン塩酸塩標準溶液 (0.1 µg/mL, 0.02 µg/mL) それぞれ30 µL を注入し、チアミン塩酸塩の検量線を作成する (注6)。

(4) 計算

$$\text{チアミン塩酸塩含量 (ビタミン B}_1\text{相当量) (mg/100 g)} = \frac{A \times V \times N}{W \times 1000} \times 100$$

A : 検量線より求めた試料溶液中のビタミン B₁ 濃度 (µg/mL)

V : 定容量 (mL)

N : 希釈倍数

W : 試料採取量 (g)

[ヒドロキシエチルチアミン (HET) を含む食品の場合] (注7)

HET 溶液を用いて定量を行う。HET 含量をビタミン B₁ に換算するには、モル換算係数0.8845 を乗じてビタミン B₁ 相当量とする。

$$\frac{\text{チアミン塩酸塩分子量 (337.28)}}{\text{HET 塩酸塩分子量 (381.33)}} = 0.8845$$

注 解

(注1) 生鮮食料品 (魚介類, きのこと類, 野菜類など) は, 新鮮な試料を入手次第, すぐに抽出することが重要である。特に魚介類においては, チアミナーゼ (アノイリナーゼ) を含むものが多く, 時間経過に伴いチアミンが分解される。また, きのこと類, 野菜類などでもチアミンの減少がみられるものがある。試料を粉碎, 調製することでチアミンの減少は加速される。これらに対しては0.1 mol/L 塩酸を試料 (対象食品の粗切りしたもの。質量測定しておく) が浸る程度に加え, 20分間沸とう加熱する。水冷後, 0.1 mol/L 塩酸で一定量とする。ホモジナイザーなどで粉碎後, この一部をはかりとり, 以下, 加熱抽出, 酵素分解操作を付加する。

(注2) アリチアミンを含む食品 (にんにくなど) は, 加熱抽出後, 塩酸システイン50 mg を添加し, pH 4.5に調整する。その後, 酵素分解操作以降を付加する。

(注3) 海藻類 (乾燥品のわかめ, こんぶなど) は, 多糖類が多いため一般にろ過が遅く, カラム精製に支障をきたす場合がある。また, 吸着などによりチアミンの回収が悪いことがあるので, 次のような方法がある。加熱抽出し, 定容せずに酵素分解操作を行った後, 濃塩酸 2 mL を加えて沸とう水浴中で30分間加熱する。水冷後, 水で定容する。この場合, 併行して添加回収試験を行うとよい。

(注4) パームチットカラム操作においては, 脱着液は沸とう直前まで加熱して使用する。しかし, あまり長く加熱すると, 塩濃度が上がり析出しやすくなるので注意する。この操作はカラムが熱いうち

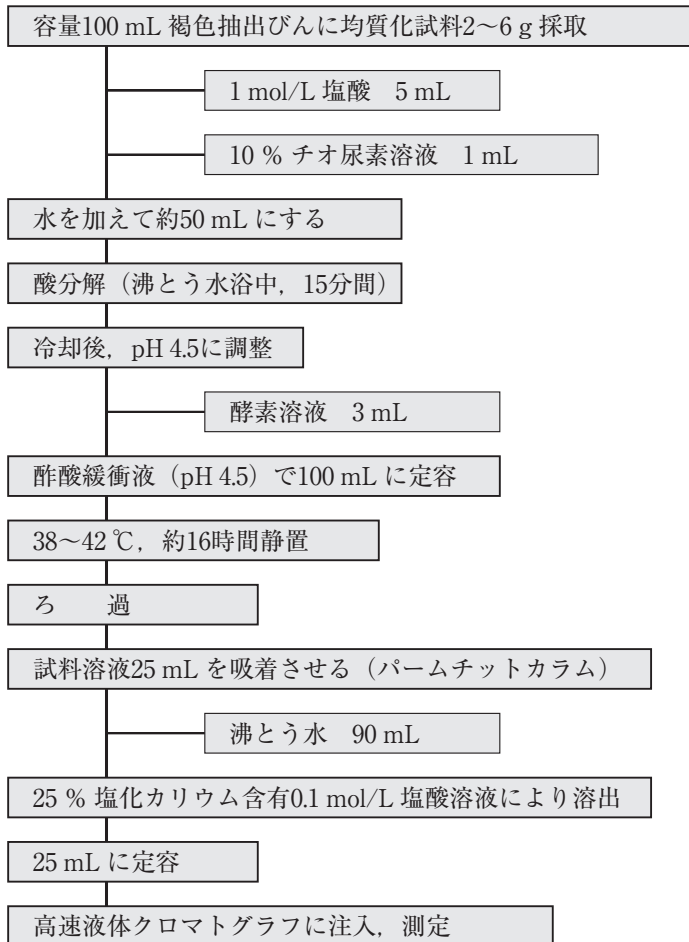
にすばやく行うことが大切である（カラムが冷えると塩化カリウムが析出し、カラムが詰まってしまう可能性がある）。

(注5) 0.01 mol/L リン酸二水素ナトリウムと、0.15 mol/L 過塩素酸ナトリウムを含む溶液を調製後、過塩素酸で pH 2.2 に調整する。これにメタノールを所定の割合で混合する。

(注6) 反応液にアルカリを使用するので、分析終了後は必ず経路を水洗する。

(注7) HET は豚肉、魚介類に多く含まれる。

チアミン定量法（パームチットカラム精製—ポストカラム法）・フローチャート



25-1-2. ミニカラム精製—ポストカラム法

適 用

食品全般に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

固相抽出用吸引マニホールド

シリンジ：10~25 mL

他は25-1-1. パームチットカラム精製—ポストカラム法と同じ。

ただし精製用褐色クロマト管は使用しない。

(2) 試 薬

メタノール及び25 % 塩化カリウム含有0.1 mol/L 塩酸溶液の混液 (2:8) : メタノール100 mL, 25 % 塩化カリウム含有0.1 mol/L 塩酸溶液400 mL を混合し攪拌する。

メタノール及び25 % 塩化カリウム含有0.1 mol/L 塩酸溶液の混液 (1:9) : メタノール50 mL, 25 % 塩化カリウム含有0.1 mol/L 塩酸溶液450 mL を混合し攪拌する。

チアミン塩酸塩標準溶液 : チアミン塩酸塩標準原液をメタノール及び25 % 塩化カリウム含有0.1 mol/L 塩酸溶液の混液 (1:9) で希釈し, 10 µg/mL, 1 µg/mL の標準溶液を調製する。

高速液体クロマトグラフ用チアミン塩酸塩標準溶液 : チアミン塩酸塩標準溶液をメタノール及び25 % 塩化カリウム含有0.1 mol/L 塩酸溶液の混液 (1:9) で次のように希釈し, 高速液体クロマトグラフ用チアミン塩酸塩標準溶液とする。

0.8 µg/mL 標準溶液 : 10 µg/mL 標準溶液 4 mL を50 mL に定容する。

0.05 µg/mL 標準溶液 : 1 µg/mL 標準溶液 5 mL を100 mL に定容する。

0.002 µg/mL 標準溶液 : 0.05 µg/mL 標準溶液 4 mL を100 mL に定容する。

HET 塩酸塩標準溶液 : HET 塩酸塩標準原液をメタノール及び25 % 塩化カリウム含有0.1 mol/L 塩酸溶液の混液 (1:9) で希釈し, 10 µg/mL, 1 µg/mL の標準溶液を調製する。

高速液体クロマトグラフ用 HET 塩酸塩標準溶液 : HET 塩酸塩標準溶液をメタノール及び25 % 塩化カリウム含有0.1 mol/L 塩酸溶液の混液 (1:9) で次のように希釈し, 高速液体クロマトグラフ用 HET 塩酸塩標準溶液とする。

0.8 µg/mL 標準溶液 : 10 µg/mL 標準溶液 4 mL を50 mL に定容する。

0.05 µg/mL 標準溶液 : 1 µg/mL 標準溶液 5 mL を100 mL に定容する。

0.002 µg/mL 標準溶液 : 0.05 µg/mL 標準溶液 4 mL を100 mL に定容する。

他は25-1-1. パームチットカラム精製—ポストカラム法と同じ。

(3) 操 作

1) 抽 出

25-1-1. パームチットカラム精製—ポストカラム法と同じ。

2) 精 製

固相抽出用吸引マニホールドにミニカラムとシリンジをセットし, 減圧下で吸引しながらメタノール, 水を5 mL ずつ流した後, 酢酸緩衝液 (pH 4.5) を15 mL 流し, カラムのコンディショニングを行う。試料溶液 2~20 mL を正確に加え, 減圧下で吸引しながらカラムに吸着させる。水5 mL を用いてシリンジの壁に付いた試料溶液を流し込み, 吸着及び洗浄をする。メタノール及び25 % 塩化カリウム含有0.1 mol/L 塩酸溶液の混液 (2:8) 10 mL を流し, 容量20 mL 全量フラスコにチアミン及び HET を脱着させ回収し, 25 % 塩化カリウム含有0.1 mol/L 塩酸溶液で定容する。

3) 測定用試料溶液の調製

定容した液をメタノール及び25 % 塩化カリウム含有0.1 mol/L 塩酸溶液の混液 (1:9) で適宜希釈する。

4) 高速液体クロマトグラフィー

[操作条件例]

25-1-1. パームチットカラム精製—ポストカラム法と同じ。

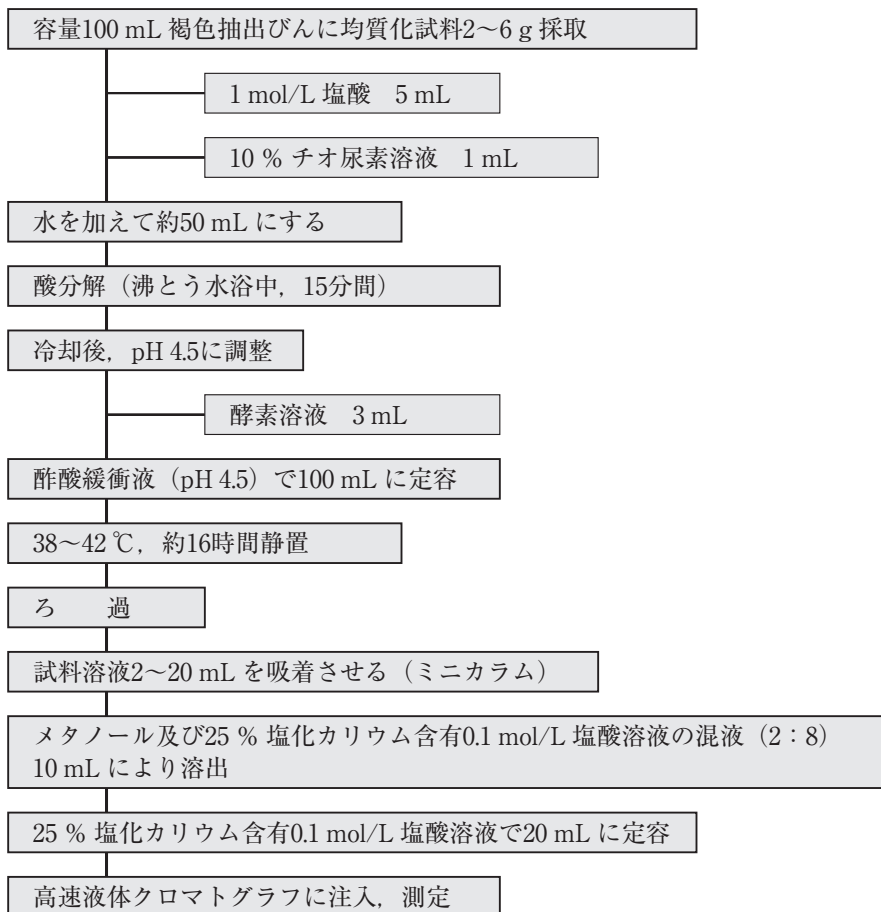
5) 測定

測定用試料溶液20 μ L を高速液体クロマトグラフに注入し、ビタミン B₁ のピーク面積を測定する。同時に高速液体クロマトグラフ用チアミン塩酸塩標準溶液をそれぞれ20 μ L 注入し、チアミン塩酸塩の検量線を作成する。

(4) 計算

25-1-1. パームチットカラム精製—ポストカラム法に同じ。

チアミン定量法（ミニカラム精製—ポストカラム法）・フローチャート



25-1-3. カラムスイッチング法

適 用

食品全般に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

25-1-1. パームチットカラム精製—ポストカラム法に同じ。

ただし精製用褐色クロマト管は使用しない。

(2) 試 薬

酢酸緩衝液 (pH 4.5, 0.1 % チオ尿素含有) : 水900 mL にチオ尿素1.1 g, 50 % 酢酸67.5 mL, 4 mol/L 酢酸ナトリウム溶液135 mL を加える。

チアミン塩酸塩標準溶液 : チアミン塩酸塩標準原液を酢酸緩衝液 (pH 4.5, 0.1 % チオ尿素含有) で希釈し, 10 µg/mL, 1 µg/mL の標準溶液を調製する。

高速液体クロマトグラフ用チアミン塩酸塩標準溶液 : チアミン塩酸塩標準溶液を酢酸緩衝液 (pH 4.5, 0.1 % チオ尿素含有) で次のように希釈し, 高速液体クロマトグラフ用チアミン塩酸塩標準溶液とする。

0.4 µg/mL 標準溶液 : 10 µg/mL 標準溶液 4 mL を100 mL に定容する。

0.05 µg/mL 標準溶液 : 1 µg/mL 標準溶液 5 mL を100 mL に定容する。

0.002 µg/mL 標準溶液 : 0.05 µg/mL 標準溶液 4 mL を100 mL に定容する。

HET 塩酸塩標準溶液 : HET 塩酸塩標準原液を酢酸緩衝液 (pH 4.5, 0.1 % チオ尿素含有) で希釈し, 10 µg/mL, 1 µg/mL の標準溶液を調製する。

高速液体クロマトグラフ用 HET 塩酸塩標準溶液 : HET 塩酸塩標準溶液を酢酸緩衝液 (pH 4.5, 0.1 % チオ尿素含有) で次のように希釈し, 高速液体クロマトグラフ用 HET 塩酸塩標準溶液とする。

0.4 µg/mL 標準溶液 : 10 µg/mL 標準溶液 4 mL を100 mL に定容する。

0.05 µg/mL 標準溶液 : 1 µg/mL 標準溶液 5 mL を100 mL に定容する。

0.002 µg/mL 標準溶液 : 0.05 µg/mL 標準溶液 4 mL を100 mL に定容する。

他は25-1-1. パームチットカラム精製—ポストカラム法と同じ。

ただし25 % 塩化カリウム含有0.1 mol/L 塩酸溶液は使用しない。

(3) 操 作

1) 抽 出

25-1-1. パームチットカラム精製—ポストカラム法と同じ (注1)。

2) 測定用試料溶液の調製

試料溶液を酢酸緩衝液 (pH 4.5, 0.1 % チオ尿素含有) で適宜希釈する。

3) 高速液体クロマトグラフィー

[操作条件例]

プレカラム : 内径4.0 mm, 長さ10 mm, 陽イオン交換カラム (例えば, (株) 資生堂 CAPCELL MF SCX S-5)

カラム : 内径4.6 mm, 長さ250 mm, ODS 系カラム (例えば, (一財) 化学物質評価研究機構 L-column ODS)

移動相 : メタノール—(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 (pH 2.2に調整)) 混液 (5 : 95 v/v)

流速 : 1 mL/分

反応液 : 0.03 % フェリシアン化カリウム—15 % 水酸化ナトリウム溶液, 0.5 mL/分

温度 : 40 °C

波長 : 励起波長375 nm, 蛍光波長440 nm

[カラムスイッチングプログラム例]

注入0分 : 測定用試料溶液注入, 水にのせてプレカラムへ吸着, 通過した水は廃液へ流れる。

注入2分後 : 水から移動相に切り替え, プレカラムからチアミン及び HET を脱着し, 同時に分析カラムへ流路を切り替え, 試料溶液をプレカラムから分析カラムに導入する。

注入6分後：廃液流路へ流路を切り替える（プレカラムを系からはずす）。

注入11分後：移動相から水に切り替え，プレカラムの洗浄及びコンディショニングを行う。

注入14.5分後：分析終了。

4) 測 定

測定用試料溶液20 μ L を高速液体クロマトグラフに注入し，ビタミン B₁ のピーク面積を測定する。同様に高速液体クロマトグラフ用チアミン塩酸塩標準溶液をそれぞれ20 μ L 注入し，チアミン塩酸塩の検量線を作成する。

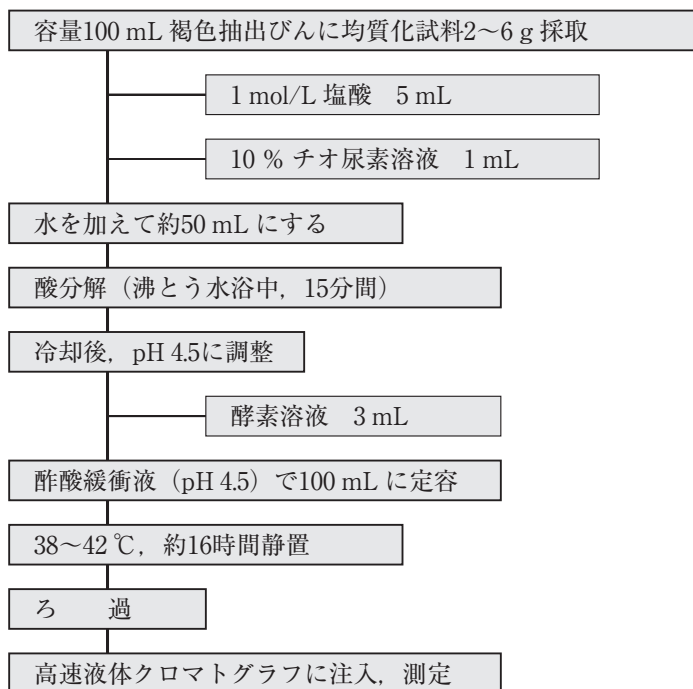
(4) 計 算

25-1-1. パームチットカラム精製—ポストカラム法に同じ。

注 解

(注1) 25-1-1. パームチットカラム精製—ポストカラム法の(注3)の方法は本法では適用不可。

チアミン定量法（カラムスイッチング法）・フローチャート



26 リボフラビン (ビタミン B₂)

26-1. 高速液体クロマトグラフ法

適用

食品全般に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

高速液体クロマトグラフ (蛍光検出器付き)

恒温水槽

恒温器

褐色抽出びん：容量100 mL

(2) 試 薬

リボフラビン標準品：日本薬局方標準品 ((一財) 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団頒布)

塩酸：特級

酢酸：特級

酢酸ナトリウム三水和物：特級

チオ尿素：特級

リン酸加水分解酵素：ビタミン B₁・B₂ 定量用酸性ホスファターゼ (和光純薬工業 (株)) または同等品 (ホスファターゼ活性を有するもの)

メタノール：HPLC 用

4 mol/L 酢酸ナトリウム溶液：酢酸ナトリウム三水和物544 g を水に溶かして 1 L とする。

酢酸緩衝液 (pH 4.5)：水 1 L に 50 % 酢酸 10 mL と 4 mol/L 酢酸ナトリウム溶液 20 mL を加える。

酢酸緩衝液 (pH 4.5, 0.1 % チオ尿素含有)：水 900 mL にチオ尿素 1.1 g, 50 % 酢酸 67.5 mL, 4 mol/L 酢酸ナトリウム溶液 135 mL を加える。

10 % チオ尿素溶液：チオ尿素 100 g を水に溶かして 1 L とする。

酵素溶液：酵素 0.25 g を酢酸緩衝液 (pH 4.5) 10 mL に用時溶解し、ろ過または遠心分離して、その上澄み液を使用する。

リボフラビン標準原液：リボフラビン標準品を 105 °C で 2 時間乾燥し、30 分間デシケーター中で放冷後、チオ尿素 1 g をとった容量 1 L 褐色全量フラスコに 50 mg をとり酢酸 4 mL を加え、さらに温水を用いて溶かす。冷却後、水で定容して標準原液 (50 µg/mL) とする。

高速液体クロマトグラフ用リボフラビン標準溶液：リボフラビン標準原液を酢酸緩衝液 (pH 4.5, 0.1 % チオ尿素含有) で次のように希釈し、高速液体クロマトグラフ用標準溶液とする。

1.0 µg/mL 標準溶液：標準原液 2 mL を 100 mL に定容する。

0.05 µg/mL 標準溶液：1.0 µg/mL 標準溶液 5 mL を 100 mL に定容する。

0.002 µg/mL 標準溶液：0.05 µg/mL 標準溶液 4 mL を 100 mL に定容する。

(3) 操 作

1) 抽 出

試料 2 ~ 6 g (W) を容量 100 mL 褐色抽出びんにはかりとり、1 mol/L 塩酸を 5 mL, 10 % チオ尿

素溶液を 1 mL 加え、水を加えて約 50 mL にした後、沸とう水浴中でときどきガラス棒でかき混ぜながら、15 分間加熱抽出する。加熱抽出後、水冷して室温に戻し、4 mol/L 酢酸ナトリウム溶液で pH 4.5 に調整する（注 1）。酵素溶液 3 mL（注 2）を加え、酢酸緩衝液（pH 4.5）で 100 mL に定容（ V ）し、38～42℃の恒温器中で約 16 時間酵素分解を行う（注 3）。室温に戻し、ろ過（ろ紙 JIS 6 種）後、試料溶液とする。

2) 測定用試料溶液の調製

試料溶液を酢酸緩衝液（pH 4.5, 0.1% チオ尿素含有）で適宜希釈する。

3) 高速液体クロマトグラフィー

[操作条件例]

ガードカラム：内径 4.6 mm, 長さ 10 mm, ODS 系カラム（例えば、野村化学（株）Develosil ODS-MG）

カラム：内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, ODS 系カラム（例えば、ナカライテスク（株）Cosmosil 5 C₁₈-MS-II）

移動相：メタノール-酢酸緩衝液（pH 4.5）（35：65 v/v）

流速：1.0 mL/分

温度：40℃

波長：励起波長 445 nm, 蛍光波長 530 nm

4) 測定

測定用試料溶液 20 μL を高速液体クロマトグラフに注入し、リボフラビンのピーク面積を測定する。同様にリボフラビン標準溶液をそれぞれ 20 μL 注入し、リボフラビンの検量線を作成する。

(4) 計算

$$\text{リボフラビン含量 (mg/100 g)} = \frac{A \times V \times N}{W \times 1000} \times 100$$

A ：検量線より求めた試料溶液中のリボフラビン濃度（μg/mL）

V ：定容量（mL）

N ：希釈倍率

W ：試料採取量（g）

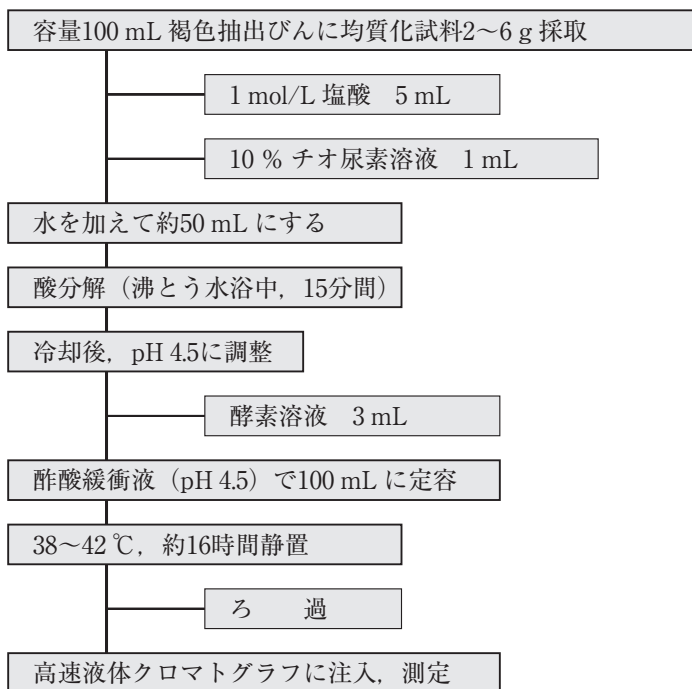
注 解

（注 1）アリチアミンを含む食品（にんにくなど）は、25-1-1. パームチットカラム精製—ポストカラム法の（注 2）の方法で調製した試料溶液をリボフラビンの測定に用いることができる。

（注 2）酵素溶液中には定量上無視できないリボフラビンが含まれることがある。そのため、あらかじめ使用酵素量由来分のリボフラビン量を測定し、定量値から差し引くために空試験を行う必要がある。

（注 3）海藻類（乾燥品のわかめ、こんぶなど）は、25-1-1. パームチットカラム精製—ポストカラム法の（注 3）の方法で調製した試料溶液をリボフラビンの測定に用いることができる。

リボフラビン定量法・フローチャート



27 ナイアシン

27-1. 微生物学的定量法

適用

食品全般に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

マイクロプレート
マイクロプレート振り混ぜ機
三角フラスコ
孵卵器
オートクレーブ
遠心分離機
pH メーター
マイクロプレートリーダー

(2) 試薬

ニコチン酸標準品：日本薬局方標準品（（一財）医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団頒布）

硫酸：特級

ニコチン酸標準原液：ニコチン酸標準品100 mg を25 % (v/v) エタノール溶液に溶かし100 mL とする。ニコチン酸として1 mg/mLになる。

ニコチン酸標準溶液：ニコチン酸標準原液を，用時，水で希釈し，0.1 µg/mL の濃度に調製する。

0.5 mol/L 硫酸溶液：濃硫酸30 mL を水1050 mL に徐々に加えて調製する。

(3) 操作

1) 基礎培地の調製（注1）

水1000 mL に下記のものに加え，水浴中で加熱溶解する。溶解後，pH 6.8±0.1に調整し，必要があればろ過する。

基礎培地組成

カザミノ酸	14 g	パントテン酸カルシウム	400 µg
ブドウ糖	40 g	パラアミノ安息香酸	200 µg
無水酢酸ナトリウム	20 g	塩酸ピリドキシン	800 µg
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	リン酸二水素カリウム	1 g
塩酸グアニン	20 mg	リン酸一水素カリウム	1 g
ウラシル	20 mg	硫酸マグネシウム	400 mg
リボフラビン	400 µg	硫酸第一鉄	20 mg
塩酸チアミン	200 µg	硫酸マンガン	20 mg
ビオチン	0.8 µg		

2) 接種菌溶液の調製

(a) 接種菌用培地（注2）

水100 mL に酵母エキス0.55 g を溶かし，これにペプトン1.25 g，ブドウ糖1.1 g，リン酸二水素カリ

ウム 0.025 g, リン酸水素二カリウム 0.025 g, 酢酸ナトリウム 1.0 g, 硫酸マグネシウム 0.01 g, 硫酸マンガン 0.5 mg, 硫酸第一鉄 0.5 mg を加え pH 6.8 に調整した後, 水浴上で加熱溶解する。溶解後かき混ぜ, この液約 4 mL ずつを試験管に分注し, 121 °C で 10 分間加圧滅菌後, 放冷する。

(b) 接種菌溶液

Lactobacillus plantarum ATCC 8014 の保存菌株を接種菌用培地に継代し, 37 °C ± 1 °C で 20 時間 ± 3 時間培養する。さらに接種用培地に継代し, 37 °C ± 1 °C で 20 時間 ± 3 時間培養する。培養した菌浮遊液を遠心分離し, 滅菌生理食塩水で 2 回洗浄する。洗浄後, 滅菌生理食塩水で希釈し, 接種菌溶液とする。

3) 試料溶液の調製

試料 (W) を三角フラスコにはかりとる。0.5 mol/L 硫酸 100 mL 又は 50 mL を加え, 121 °C で 30 分間加圧抽出する。冷却後, pH 6.8 に調整する。水で 200 mL 又は 100 mL に定容 (V) し, ろ過 (ろ紙 JIS 2 種) する。必要に応じて, 測定時さらに水を加えて, 希釈し, 試料溶液とする。

4) 測定

検量線作成のため, ニコチン酸標準溶液 (0.1 µg/mL) 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 40 及び 60 µL をマイクロプレートの 2 ウェルずつにとり, それぞれに接種菌溶液を含む基礎培地 0.15 mL 及び水を加えて全量を 0.25 mL とする。別に 1 試料溶液につき 3 段階の希釈液 (試料溶液 20, 40, 80 µL) を 2 ウェルずつにとる。次に接種菌溶液を含む基礎培地 0.15 mL 及び水を加えて全量を 0.25 mL にする。マイクロプレートを振り混ぜ機で 2 ~ 3 分攪拌し, マイクロプレートリーダーでブランクを測定した後, 37 °C ± 1 °C で 18 時間 ± 3 時間培養 (培養条件: 嫌気培養) する。培養後, マイクロプレートを十分に振り混ぜ機で攪拌した後, 菌の増殖をマイクロプレートリーダー (600 nm の吸光度を測定) で測定する。検量線はマイクロプレートの各ウェルに加えたニコチン酸の量と濁度 (吸光度) をプロットして作成する。この検量線を用いて試料溶液のニコチン酸含量を求める。また各試料中のニコチン酸含量については, 各試料溶液から得られたそれぞれの値がそれらの平均値より ± 10 % 以内であることを確認してから, 改めてこれらの平均値を求め, これを試料中のナイアシン含量とする (注 3)。

(4) 計算

$$\text{ナイアシン含量 (mg/100 g)} = (A \times V \times N) \times \frac{100}{W \times 1000000}$$

A: 検量線より求めた試料溶液 1 mL 中のナイアシン濃度 (ng/mL)

V: 定容量 (mL)

N: 希釈倍数

W: 試料採取量 (g)

注 解

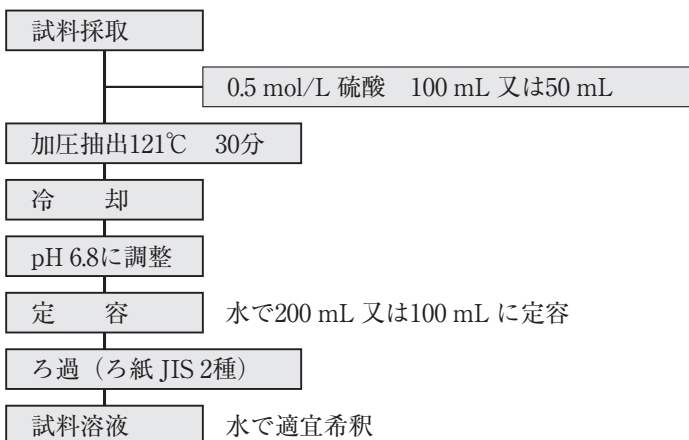
(注 1) 日水製薬 (株) ほかから既成培地が市販されている。日水製薬 (株) の場合, 「ニコチン酸定量用基礎培地」が使用できる。

(注 2) 日水製薬 (株) ほかから既成培地が市販されている。日水製薬 (株) の場合, 「一般乳酸菌接種用培地」が使用できる。

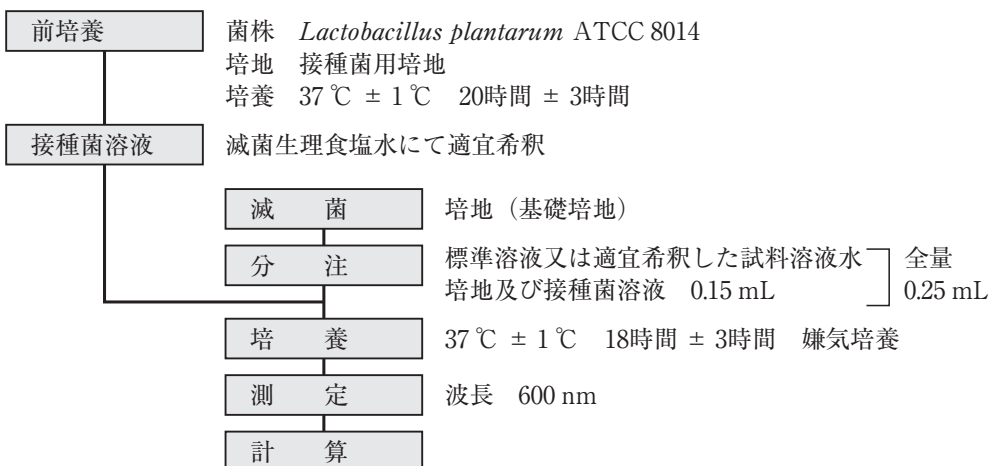
(注 3) 得られた各値の中で, それらの平均値から ± 10 % 以内の 4 点以上の値を用いて計算する。

ナイアシン定量法・フローチャート

[試料溶液の調製]



[培養・測定]



28

ビタミン B₆ (ピリドキシン, ピリ
ドキサール, ピリドキサミンなど)

28-1. 微生物学的定量法

適用

食品全般に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

マイクロプレート

マイクロプレート振り混ぜ機

三角フラスコ

孵卵器

オートクレーブ

遠心分離機

pH メーター

マイクロプレートリーダー

(2) 試 薬

ピリドキシン塩酸塩標準品：日本薬局方標準品（（一財）医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団頒布）

ピリドキシン塩酸塩標準溶液：ピリドキシン塩酸塩標準品（日本薬局方標準品を、25%（v/v）エタノール溶液に溶かし、その1 mL が塩酸ピリドキシンとして5 ng を含むように、用時、水で希釈して調製する。

0.055 mol/L 塩酸：塩酸25 mL を水5425 mL に徐々に加えて調製する。

0.5 mol/L 硫酸：硫酸30 mL を水1050 mL に徐々に加えて調製する。

(3) 操 作

1) 基礎培地の調製（注1）

水1000 mL に下記のを溶かし、pH 5.0 ± 0.1 に調整し、必要があればろ過する。

基礎培地組成

カザミノ酸	4 g	塩化カルシウム	125 mg
イノシトール	25 mg	硫酸マグネシウム	125 mg
塩酸チアミン	250 μg	硫酸マンガン	2.5 mg
ニコチン酸	2.5 mg	リン酸二水素カリウム	550 mg
パントテン酸カルシウム	2.5 mg	塩化第二鉄	2.5 mg
ピオチン	8 μg	クエン酸カリウム	5 g
塩化カリウム	425 mg	クエン酸	1 g
ブドウ糖	50g		

2) 接種菌溶液の調製

(a) 接種菌用培地（注2）

水100 mL にブドウ糖2.0 g を溶かし、これに酵母エキス0.2 g, 硫酸マグネシウム0.05 g, ペプトン0.5 g, リン酸二水素カリウム0.1 g を加え pH 5.7 に調整した後、水浴上で加熱溶解する。溶解後かき混ぜ、この液約4 mL ずつを試験管に分注し、121 °C で15~20分間加圧滅菌後、放冷する。

(b) 接種菌溶液

Saccharomyces cerevisiae ATCC 9080 (注3) の保存菌株を接種菌用培地に継代し、 $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ で20時間 \pm 3時間培養する。さらに接種用培地に継代し、 $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ で20時間 \pm 3時間培養する。培養した菌浮遊液を遠心分離し、滅菌生理食塩水で2回洗浄する。洗浄後、滅菌生理食塩水で希釈し、接種菌溶液とする。

3) 試料溶液の調製

試料 (W) を三角フラスコにはかりとる。動物性試料の場合は 0.055 mol/L 塩酸溶液 180 mL 又は 70 mL を加え、 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ で4時間加圧抽出する。植物性試料の場合は 0.5 mol/L 硫酸 180 mL 又は 70 mL を加え、 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ で1時間加圧抽出する。冷却後、 $\text{pH} 5.0$ に調整する。水で 250 mL 又は 100 mL に定容 (V) し、ろ過 (ろ紙 JIS 2種) する。必要に応じて、測定時さらに水を加えて、希釈し、試料溶液とする。

4) 測定

検量線作成のため、ピリドキシン塩酸塩標準溶液 (5 ng/mL) $0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 40$ 及び $60\text{ }\mu\text{L}$ をマイクロプレートの2ウェルずつにとり、それぞれに接種菌溶液を含む基礎培地 0.10 mL 及び水を加えて全量を 0.20 mL とする。別に1試料溶液につき3段階の希釈液 (試料溶液 $20, 40, 80\text{ }\mu\text{L}$)を2ウェルずつにとる。次に接種菌溶液を含む基礎培地 0.10 mL 及び水を加えて全量を 0.20 mL にする。マイクロプレートを振り混ぜ機で2~3分攪拌し、マイクロプレートリーダーでブランクを測定した後、 $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ で21時間 \pm 3時間培養 (培養条件: 好気培養) する。培養後、マイクロプレートを十分に振り混ぜ機で攪拌した後、菌の増殖をマイクロプレートリーダー (600 nmの吸光度を測定) で測定する。検量線はマイクロプレートの各ウェルに加えたピリドキシン塩酸塩の量と濁度 (吸光度) をプロットして作成する。この検量線を用いて試料溶液のピリドキシン塩酸塩含量を求める。また各試料中のピリドキシン塩酸塩含量については、各試料溶液から得られたそれぞれの値がそれらの平均値より $\pm 10\%$ 以内にあることを確認してから、改めてこれらの平均値を求め、これを試料中のピリドキシン塩酸塩含量とする。

(4) 計算

$$\text{ビタミン B}_6 \text{含量 (mg/100 g)} = (A \times V \times N) \times 0.8227 \times \frac{100}{W \times 1000000}$$

A : 検量線より求めた試料溶液 1 mL 中のピリドキシン塩酸塩濃度 (ng/mL)

V : 定容量 (mL)

N : 希釈倍数

W : 試料採取量 (g)

注 解

(注1) 日水製薬 (株) ほかから既成培地が市販されている。日水製薬 (株) の場合、「ビタミン B₆ 定量用基礎培地」が使用できる。

(注2) 日水製薬 (株) ほかから既成培地が市販されている。日水製薬 (株) の場合、「ブドウ糖ペプトン培地」が使用できる。

(注3) 本法で用いる酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080) は、ピリドキシン、ピリドキサル及びピリドキサミンに対して、同程度の菌の増殖を示す。

ビタミン B₆ 定量法・フローチャート

[試料溶液の調製]

試料採取

(動物性試料の場合)
0.055 mol/L 塩酸
180 mL 又は 70 mL

(植物性試料の場合)
0.5 mol/L 硫酸
180 mL 又は 70 mL

(動物性試料の場合)
121 °C 4 時間

(植物性試料の場合)
121 °C 1 時間

加圧抽出

冷 却

pH 5.0 に調整

定 容

水で 250 mL 又は 100 mL に定容

ろ過 (ろ紙 JIS 2 種)

試料溶液

水で適宜希釈

[培養・測定]

前培養

菌 株 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080
培 地 接種菌用培地
培 養 30 °C ± 1 °C 20 時間 ± 3 時間

接種菌溶液

滅菌生理食塩水にて適宜希釈

滅 菌

培地 (基礎培地)

分 注

標準溶液又は適宜希釈した試料溶液水 } 全量
培地及び接種菌溶液 0.10 mL } 0.20 mL

培 養

30 °C ± 1 °C 21 時間 ± 3 時間 好気培養

測 定

波長 600 nm

計 算

29 ビタミン B₁₂ (コバラミン類)

29-1. 微生物学的定量法

適用

食品全般に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

マイクロプレート

マイクロプレート振り混ぜ機

三角フラスコ

孵卵器

オートクレーブ

遠心分離機

pH メーター

マイクロプレートリーダー

(2) 試 薬

シアノコバラミン標準品：日本薬局方標準品（(一財)医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団頒布）

シアノコバラミン標準溶液：シアノコバラミン標準品を25% (v/v) エタノール溶液に溶かし、その1 mL がシアノコバラミン0.1 ng を含むように、用時、水で調製する。シアノコバラミンは、使用する標準品中に水分が含まれるため、日本薬局方に従い乾燥減量を求め（注1）、これからファクターを算出して補正する。

酢酸緩衝液：酢酸75 mL と酢酸ナトリウム三水和物133 g を水に溶かし、酢酸で pH 4.5 に調整し、水を加えて2000 mL とする。

0.05 mg/mL シアン化カリウム溶液：シアン化カリウム50 mg を0.2% (w/v) 水酸化ナトリウム溶液に溶かし、100 mL にする。

(3) 操 作

1) 基礎培地の調製（注2）

水1000 mL に下記のを溶かし、水浴上で加熱溶解する。溶解後、pH 6.0 ± 0.2 に調整し、必要があればろ過する。

基礎培地組成

カザミノ酸	15 g	ニコチン酸	2 mg
ブドウ糖	40 g	パラアミノ安息香酸	2 mg
アスパラギン酸	0.2 g	パントテン酸カルシウム	1 mg
酢酸ナトリウム	20 g	塩酸ピリドキシリン	4 mg
アスコルビン酸	4 g	塩酸ピリドキサール	4 mg
L-シスチン	0.4 g	塩酸ピリドキサミン	800 µg
DL-トリプトファン	0.4 g	葉酸	200 µg
硫酸アデニン	20 mg	リン酸二水素カリウム	1 g
塩酸グアニン	20 mg	リン酸一水素カリウム	1 g

ウラシル	20 mg	硫酸マグネシウム	0.4 g
キサンチン	20 mg	塩化ナトリウム	20 mg
リボフラビン	1 mg	硫酸第一鉄	20 mg
塩酸チアミン	1 mg	硫酸マンガン	20 mg
ビオチン	10 µg	ポリソルベート 80	2 g

2) 接種菌溶液の調製

(a) 接種菌用培地 (注3)

水100 mL に酵母エキス0.85 g を溶かし、これにペプトン0.85 g, ブドウ糖1.1 g, リン酸二水素カリウム 0.2 g, トマトジュース末0.37 g 及びポリソルベート0.1 g を加え、水浴上で加熱溶解した後、pH 6.8に調製する。この液約 4 mL ずつを試験管に分注し、121 °C で10分間加圧滅菌した後、放冷する。

(b) 接種菌溶液

Lactobacillus delbrueckii subsp. *lactis* ATCC 7830 の保存菌株を接種菌用培地に接種し、37 °C ± 1 °C で20時間 ± 3 時間培養する。さらに接種用培地に継代し、37 °C ± 1 °C で9時間 ± 3 時間培養する。培養した菌浮遊液を遠心分離し、滅菌生理食塩水で2回洗浄する。洗浄後、滅菌生理食塩水で希釈し、接種菌溶液とする。

3) 試料溶液の調製

試料 (W) を三角フラスコにはかりとる。水40 mL, 酢酸緩衝液10 mL 及び0.05 mg/mL シアン化カリウム溶液0.4 mL (注4) を加え、100 °C で30分間抽出する。冷却後、10 % (w/v) メタリン酸溶液 0.6 mL を加え、水で100 mL に定容 (V) し、ろ過する。

(a) 試料溶液 A (ビタミン B₁₂測定用)

ろ液25 mL 又は40 mL (a) をはかりとり、pH 6.0に調整した後、水で50 mL に定容 (b) し、ろ過 (ろ紙 JIS 2種) する。必要に応じて、測定時さらに水を加えて、希釈し、試料溶液とする。

(b) 試料溶液 B (アルカリ耐性因子測定用・魚類以外に適用)

ろ液25 mL 又は40 mL (a) をはかりとり、pH 11~12に調整した後、121 °C で30分間加熱する。冷却後、pH 6.0に調整し、水で50 mL に定容 (b) し、ろ過 (ろ紙 JIS 2種) する。必要に応じて、測定時さらに水を加えて、希釈し、試料溶液とする。

4) 測定

検量線作成のため、シアノコバラミン標準溶液 0, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 400 及び 600 µL を試験管 2 本ずつにとり、それぞれに基礎培地 1 mL 及び水を加えて全量を 2 mL とする。別に本試験のため、試料溶液 A 及び試料溶液 B 200, 400 及び 800 µL をそれぞれ試験管 2 本ずつにとり、次に各試験管に基礎培地 1 mL 及び水を加えて全量を 2 mL とする。121 °C で5分間加熱滅菌し、冷却後、各試験管に接種菌溶液 1 滴 (20 µL) ずつを無菌的に接種し、37 °C ± 1 °C で19時間 ± 3 時間培養する。培養後、試験管から200 µL ずつマイクロプレートに分注し、マイクロプレートを十分に振り混ぜ機で攪拌後、濁度を600 nm の吸光度を用いて測定する。検量線はシアノコバラミンの量と濁度 (吸光度) をプロットして作成する。この検量線を用いて試料溶液のシアノコバラミン含量を求める。また各試料中のシアノコバラミン含量については、各試料溶液から得られたそれぞれの値がそれらの平均値より ± 10 % 以内にあることを確認してから、改めてこれらの平均値を求め、試料溶液 A から求めたビタミン B₁₂量より試料溶液 B から求めたアルカリ耐性因子量を差し引き、試料中の含量を算出する。

(4) 計 算

$$\text{ビタミン B}_{12}\text{量 (}\mu\text{g/100 g)} = (A \times V \times N \times b) \times \frac{100}{(a \times W \times 1000)}$$

$$\text{アルカリ耐性因子含量 (}\mu\text{g/100 g)} = (B \times V \times N \times b) \times \frac{100}{(a \times W \times 1000)}$$

$$\text{ビタミン B}_{12}\text{含量 (}\mu\text{g/100 g)} = (\text{ビタミン B}_{12}\text{量}) - (\text{アルカリ耐性因子含量})$$

A : 検量線より求めた試料溶液 1 mL 中のビタミン B₁₂濃度 (ng/mL)

B : 検量線より求めた試料溶液 1 mL 中のアルカリ耐性因子濃度 (ng/mL)

V : 定容量 (mL)

N : 希釈倍数

W : 試料採取量 (g)

a, b : 分取量 (mL) 又は定容量 (mL)

注 解

(注1) 乾燥減量12%以下(0.05g, 減圧0.67kPa(5mmHg)以下, 五酸化リン, 100℃, 4時間)(日本薬局方)。

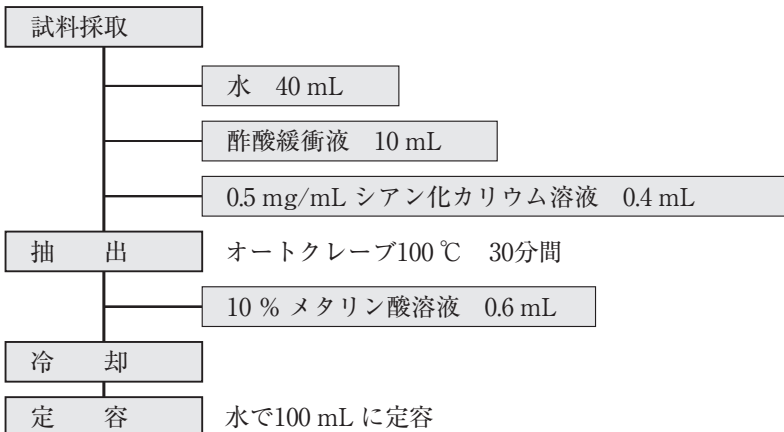
(注2) 日水製薬(株)ほかから既成培地が市販されている。日水製薬(株)の場合, 「ビタミンB₁₂定量基礎培地」が使用できる。

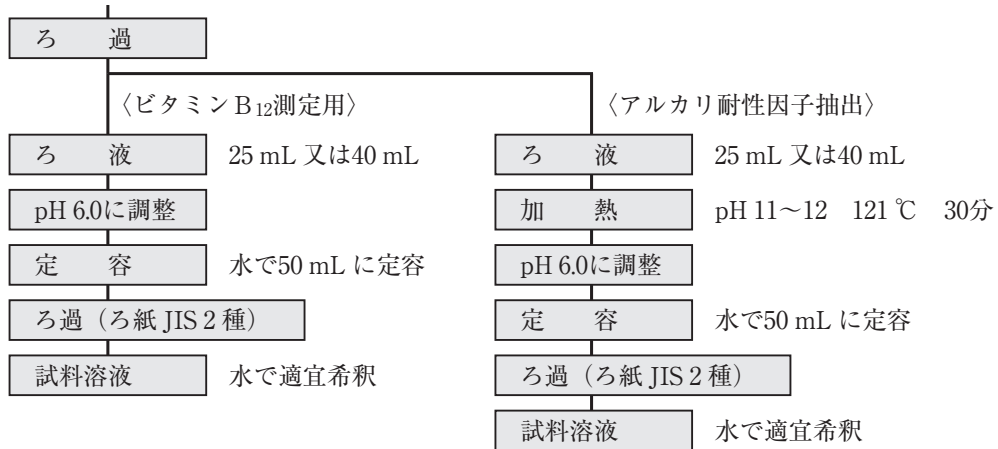
(注3) 日水製薬(株)ほかから既成培地が市販されている。日水製薬(株)の場合, 「ライヒマニ接種用培地」が使用できる。

(注4) 推定されるB₁₂含量の1000倍以上のシアン化カリウム量であること。

ビタミンB₁₂定量法・フローチャート

【試料溶液の調製】





[培養・測定]



*アルカリ耐性因子を差し引いたものをビタミンB₁₂とする。

30 葉 酸

30-1. 微生物学的定量法

適 用

食品全般に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

マイクロプレート

マイクロプレート振り混ぜ機

三角フラスコ

孵卵器

オートクレーブ

遠心分離機

pH メーター

マイクロプレートリーダー

(2) 試 薬

葉酸標準品：日本薬局方標準品（（一財）医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団頒布）

葉酸標準原液：葉酸標準品200 mgを全量フラスコにはかりとり、25 % (v/v) エタノール溶液約100 mLで洗い込み、10 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を2～3滴加えて溶解させる。1 mol/L 塩酸溶液でpH 7.0に調整し、25 % (v/v) エタノール溶液で200 mLに定容し、これを原液（1000 µg/mL）とする。葉酸は、使用する標準品中に水分が含まれるため、日本薬局方に従い乾燥減量を求め、これからファクターを算出して補正する。

葉酸標準溶液：葉酸標準原液を0.1 mol/L リン酸緩衝液（pH 6.1）で希釈し、1 ng/mLの濃度に調製する。

アスコルビン酸：特級

イオン交換樹脂（Dowex 1 X 8）：樹脂をイオン交換水で洗浄する。

プロテアーゼ溶液：科研製薬製アクチナーゼ E（1000000単位/g）を0.1 %（w/v）溶液として用いる。

コンジュガーゼ溶液：容量1000 mL三角フラスコにトリ豚臓凍結乾燥末6 gを入れる。水1000 mLを加え、10分間攪拌後、容量250 mL遠心管に入れ、3000回転/分で遠心分離する。容量1000 mL三角フラスコにDowex 1 X 8（Cl⁻）100 gを入れ遠心分離した上澄みを加え、冷所で1時間攪拌する。その後、容量250 mL遠心管に入れ、3000回転/分で遠心分離した上澄みを酵素溶液とする（注1）。

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5.30 g、アスコルビン酸20 gを水1000 mLに加えてpH 6.1に調整する。

(3) 操 作

1) 基礎培地の調製（注2）

水1000 mLに下記のもの、Tween 80を0.4 mL加え、水浴中で加熱溶解する。

基礎培地組成

グルコース	40.0 g	ビオチン	0.8 µg
カゼイン酸分解物	12.0 g	パントテン酸カルシウム	400 µg
DL-アラニン	0.4 g	ニコチン酸	0.002 g
L-アスパラギン	0.2 g	ピリドキシン塩酸塩	0.004 g
L-シスチン	0.2 g	リボフラビン	0.002 g
DL-トリプトファン	0.2 g	チアミン塩酸塩	0.002 g
アデニン	0.02 g	リン酸水素二カリウム	1.0 g
グアニン	0.02 g	硫酸第一鉄	0.02 g
ウラシル	0.02 g	リン酸二水素カリウム	1.0 g
キサントシン	0.01 g	硫酸マグネシウム	0.4 g
α-アミノ安息香酸	200 µg	硫酸マンガン	0.02 g
酢酸ナトリウム (無水)	20.0 g	塩化ナトリウム	0.02 g

2) 接種菌溶液の調製

(a) 接種菌用培地 (市販培地を用いてもよい)

水100 mL に酵母エキス0.55 g を溶かし、これにペプトン1.25 g, ブドウ糖1.1 g, リン酸二水素カリウム0.025 g, リン酸水素二カリウム0.025 g, 酢酸ナトリウム1.0 g, 硫酸マグネシウム0.01 g, 硫酸マンガン0.5 mg, 硫酸第一鉄0.5 mg を加え pH6.8 に調整した後、水浴上で加熱溶解する。溶解後かき混ぜ、この液約4 mL ずつを試験管に分注し、121 °C で10分間加圧滅菌後、放冷する。

(b) 接種菌溶液

Lactobacillus rhamnosus ATCC 7469 の保存菌株を接種菌用培地に継代し、37 °C ± 1 °C で20時間 ± 3 時間培養する。さらに接種用培地に継代し、37 °C ± 1 °C で20時間 ± 3 時間培養する。培養した菌浮遊液を遠心分離し、滅菌生理食塩水で2回洗浄する。洗浄後、滅菌生理食塩水で希釈し、接種菌溶液とする。

3) 試料溶液の調製

試料 (W) を三角フラスコにはかりとる。0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 6.1) 40 mL を加え、121 °C で15分間加圧抽出する。冷却後、プロテアーゼ溶液1 mL を加え37 °C ± 1 °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。冷却後、コンジュガーゼ溶液5 mL 及びシステイン塩酸塩溶液2.5 mL を加え、さらにトルエン2 ~ 3 滴を加えて37 °C ± 1 °C, 15 ~ 20時間反応させる。これをオートクレーブで100 °C, 10分間加熱し、冷却後、リン酸緩衝液で100 mL に定容 (V) し、ろ過 (ろ紙 JIS 2 種) する。必要に応じて、測定時さらにリン酸緩衝液を加えて、希釈し、試料溶液とする。

4) 測定

検量線作成のため、葉酸標準溶液 (1 ng/mL) 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 40 及び60 µL をマイクロプレートの2ウェルずつにとり、それぞれに接種菌溶液を含む基礎培地0.10 mL 及び水を加えて全量を0.20 mL とする。別に1試料溶液につき3段階の希釈液 (試料溶液20, 40, 80 µL) を2ウェルずつにとる。次に接種菌溶液を含む基礎培地0.10 mL 及び水を加えて全量を0.20 mL にする。マイクロプレートを振り混ぜ機で2 ~ 3分攪拌し、マイクロプレートリーダーでブランクを測定した後、37 °C ± 1 °C で20時間 ± 3 時間培養 (培養条件: 嫌気培養) する。培養後、マイクロプレートを十分に振り混ぜ機で攪拌した後、菌の増殖をマイクロプレートリーダー (600 nm の吸光度を測定) で測定する。検量線はマイクロプレートの各ウェルに加えた葉酸の量と濁度 (吸光度) をプロットして作成する。この検量線を用いて試料溶液の葉酸含量を求める。また各試料中の葉酸含量については、各試料溶液から得られたそれぞれの値がそれらの平均値より ± 10 % 以内であることを確認してから、改めてこれらの平均値を求め、これを試料中の葉酸含量とする。

(4) 計 算

$$\text{葉酸含量 (}\mu\text{g/100 g)} = (A \times V \times N) \times \frac{100}{(W \times 1000)}$$

A : 検量線より求めた試料溶液 1 mL 中の葉酸濃度 (ng/mL)

V : 定容量 (mL)

N : 希釈倍数

W : 試料採取量 (g)

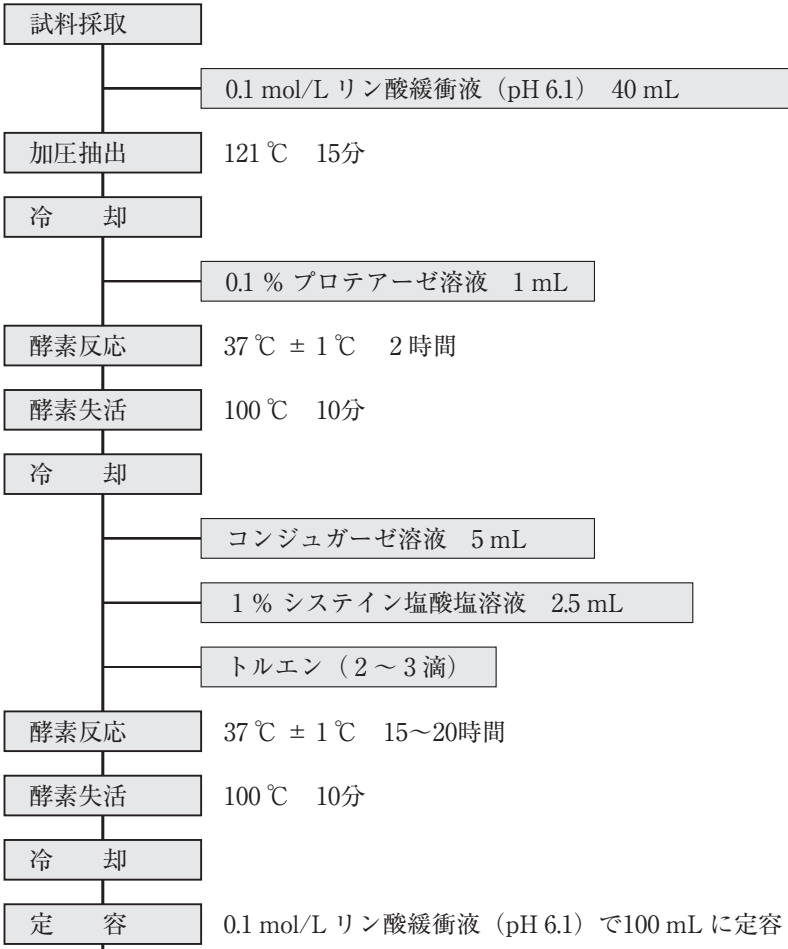
注 解

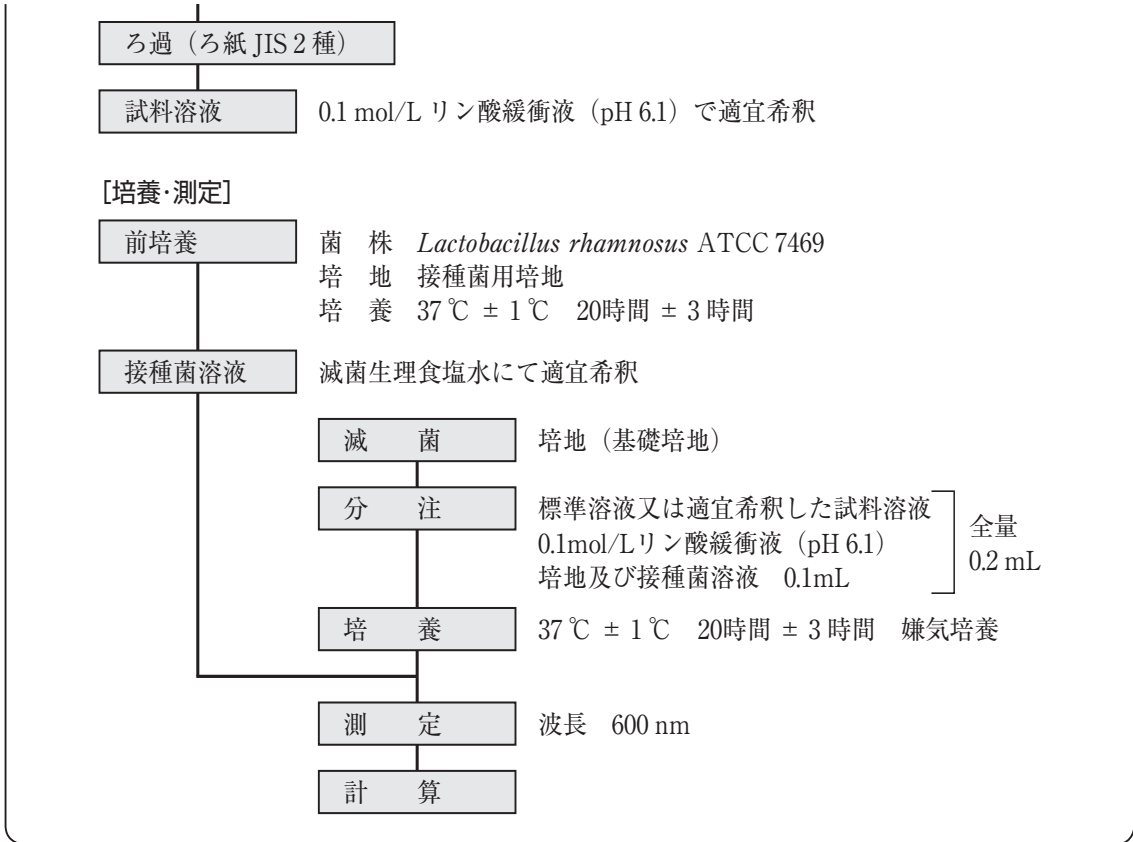
(注1) 酵素溶液には、Kidney acetone powder porcine, Type II (Sigma 社製) を用いてもよい。

(注2) Folic Acid Casei Medium (BD) を用いてもよい。

葉酸定量法・フローチャート

[試料溶液の調製]





31 パントテン酸

31-1. 微生物学的定量法

適用

食品全般に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

マイクロプレート

マイクロプレート振り混ぜ機

三角フラスコ

孵卵器

オートクレーブ

遠心分離機

pH メーター

マイクロプレートリーダー

(2) 試薬

パントテン酸カルシウム標準品：日本薬局方標準品（（一財）医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団頒布）

パントテン酸カルシウム標準原液：パントテン酸カルシウム標準品100 mg を、25 % (v/v) エタノール溶液に溶かし、100 mL（パントテン酸カルシウムとして1 mg/mL）とする。

パントテン酸カルシウム標準溶液：パントテン酸カルシウム標準原液を用時、水で希釈し、50 ng/mL の濃度に調製する。

ハト肝臓アセトンパウダー：Liver acetone powder, PIGEON, Sigma 社製又は同等品

ハト肝臓アミダーゼ溶液の調製：ハト肝臓のアセトンパウダー10 g に、水冷した0.02 mol/L 炭酸水素カリウム水溶液50 mL を加え、水冷しながらすり鉢でつぶし、懸濁液をつくる。これを50 mL の水冷した0.02 mol/L 炭酸水素カリウム溶液で遠心管に移し、3000回転/分、10分間、冷却遠心分離する。上澄み液に活性化したイオン交換樹脂5 g を加え、1時間水冷しながらかき混ぜる。この操作を3回繰り返す。3000回転/分、10分間冷却遠心分離し、その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：Phosphatase alkaline bovine and calf intestinal Mucosa Type 1 (pfs), Sigma 社製又は同等品

アルカリホスファターゼ溶液：2 % (w/v) 水溶液

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

イオン交換樹脂 (Dowex 1 X 8)：イオン交換樹脂100 g に、1 mol/L 塩酸溶液1 L を加え、10分間かき混ぜる。JIS 5種 A のろ紙を用いて吸引ろ過する。1 mol/L 水酸化カリウム溶液1 L を加えて10分間かき混ぜ、先と同様にろ過して水洗する。再び1 mol/L 塩酸溶液1 L を加え、同様に吸引ろ過する。水で塩酸を十分に洗い流し、同様に吸引ろ過する。これに水を加えて、トリス塩酸緩衝液を用いて pH 8.0 に調整する。冷蔵庫で懸濁液を保管し、2日以内に使用する。

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24.2 g を水

200 mL に溶解する。18 % 塩酸溶液で pH 8.3 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 850 mg を水に溶かし、100 mL とする。

(3) 操 作

1) 基礎培地の調製 (注1)

水 1000 mL に下記のものに加え、水浴中で加熱溶解する。溶解後、pH 7.1 に調整する。

基礎培地組成

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

2) 接種菌溶液の調製

(a) 接種菌用培地 (市販培地を用いてもよい)

水 100 mL に酵母エキス 0.55 g を溶かし、これにペプトン 1.25 g, ブドウ糖 1.1 g, リン酸二水素カリウム 0.025 g, リン酸水素二カリウム 0.025 g, 酢酸ナトリウム 1.0 g, 硫酸マグネシウム 0.01 g, 硫酸マンガン 0.5 mg, 硫酸第一鉄 0.5 mg を加え pH 6.8 に調整した後、水浴上で加熱溶解する。溶解後かき混ぜ、この液約 4 mL ずつを試験管に分注し、121 °C で 10 分間加圧滅菌後、放冷する。

(b) 接種菌溶液

Lactobacillus plantarum ATCC 8014 の保存菌株を接種菌用培地に継代し、37 °C ± 1 °C で 20 時間 ± 3 時間培養する。さらに接種用培地に継代し、37 °C ± 1 °C で 20 時間 ± 3 時間培養する。培養した菌浮遊液を遠心分離し、滅菌生理食塩水で 2 回洗浄する。洗浄後、滅菌生理食塩水で希釈し、接種菌溶液とする。

3) 試料溶液の調製

試料 (W) にトリス塩酸緩衝液 10 mL を加え、121 °C 15 分間加圧抽出する。冷却後、水で 100 mL に定容 (V) する。次に 25 mL 又は 40 mL (a) をはかりとり、炭酸水素ナトリウム溶液 0.1 mL 又は 0.16 mL, 2 % (w/v) アルカリホスファターゼ溶液 0.4 mL 又は 0.64 mL, ハト肝臓アミダーゼ溶液 0.2 mL 又は 0.32 mL を添加し、静かに混合する。その後トルエンを 2 ~ 3 滴加え、37 °C ± 1 °C で 15 時間保温し、オートクレーブで 100 °C, 10 分間加熱する。冷却後、pH 4.5 に調整し、水で 50 mL (b) に定容し、ろ過する。ろ液 25 mL 又は 40 mL (c) をはかりとり、pH 6.8 に調整した後、水で 50 mL (d) に定容し、ろ過 (ろ紙 JIS 2 種) する。必要に応じて、測定時さらに水を加えて、希釈し、試料溶液とする。

4) 測 定

検量線作成のため、パントテン酸カルシウム標準溶液 (50 ng/mL) 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 40 及び 60 µL をマイクロプレートの 2 ウェルずつにとり、それぞれに接種菌溶液を含む基礎培地 0.15 mL 及び水を加えて全量を 0.25 mL とする。別に 1 試料溶液につき 3 段階の希釈液 (試料溶液 20, 40, 及び 80 µL) を 2 ウェルずつにとる。次に接種菌溶液を含む基礎培地 0.15 mL 及び水を加えて全量を 0.25 mL にする。マイクロプレートを振り混ぜ機で 2 ~ 3 分攪拌し、マイクロプレートリーダーで

ランクを測定した後、35℃±2℃で20時間±3時間培養（培養条件：嫌気培養）する。培養後、マイクロプレート十分に振り混ぜ機で攪拌した後、菌の増殖をマイクロプレートリーダー（600 nmの吸光度を測定）で測定する。検量線はマイクロプレートの各ウェルに加えたパントテン酸カルシウムの量と濁度（吸光度）をプロットして作成する。この検量線を用いて試料溶液のパントテン酸カルシウム含量を求める（注2）。また各試料中のパントテン酸カルシウム含量については、各試料溶液から得られたそれぞれの値がそれらの平均値より±10%以内であることを確認してから、改めてこれらの平均値を求め、これを試料中のパントテン酸カルシウム含量とする。

(4) 計 算

$$\text{パントテン酸含量 (mg/100 g)} = (A \times V \times N \times b \times d) \times 0.92 \times \frac{100}{a \times c \times W \times 1000000}$$

A：検量線より求めた試料溶液 1 mL 中のパントテン酸カルシウム濃度 (ng/mL)

V：定容量 (mL)

N：希釈倍数

W：試料採取量 (g)

a, b, c, d：分取量 (mL) 又は定容量 (mL)

注 解

(注1) 日水製薬（株）ほかから既成培地が市販されている。日水製薬（株）の場合、「パントテン酸定量基礎培地」が使用できる。

(注2) 酵素ブランク溶液を調製し、パントテン酸含量から差し引く必要がある。

パントテン酸定量法・フローチャート

【試料溶液の調製】

試料採取

水 20 mL

トリス塩酸緩衝液 10 mL

加圧抽出 121℃ 15分

冷 却

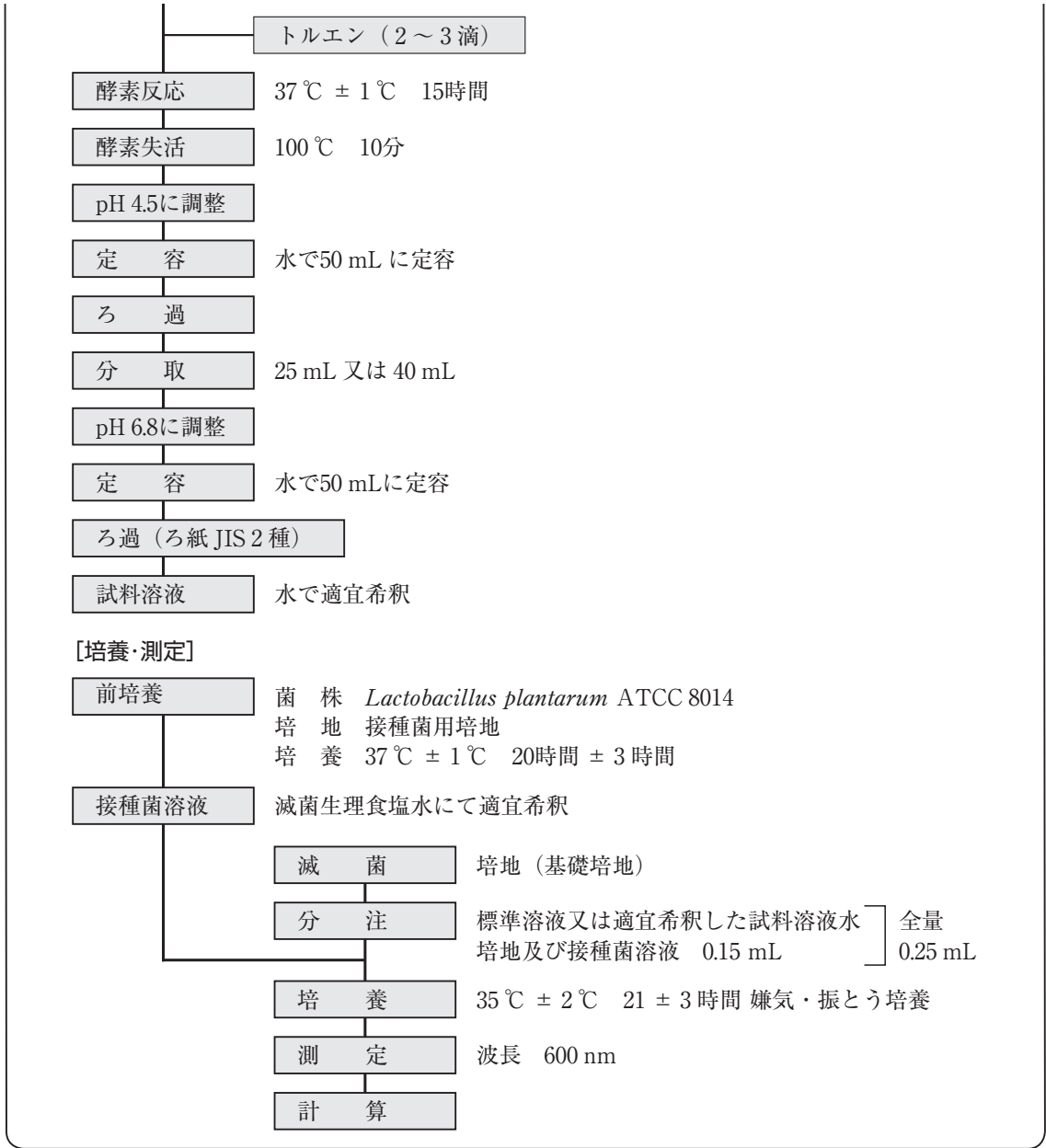
定 容 水で100 mL に定容

分 取 25 mL 又は 40 mL

炭酸水素ナトリウム溶液 0.1 mL 又は 0.16 mL

2% アルカリホスファターゼ溶液 0.4 mL 又は 0.64 mL

ハト肝臓アミダーゼ溶液 0.2 mL 又は 0.32 mL



32 ビオチン

32-1. 微生物学的定量法

適用

食品全般に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

マイクロプレート
マイクロプレート振り混ぜ機
三角フラスコ
孵卵器
オートクレーブ
遠心分離機
pH メーター
マイクロプレートリーダー

(2) 試 薬

D-ビオチン標準品：特級（関東化学（株））または同等品

ビオチン標準溶液：D-ビオチン標準品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0.2 ng/mL となるようにする。

2 mol/L 硫酸：硫酸100 mL を水800 mL に徐々に加えて調製する。

3 mol/L 硫酸：硫酸100 mL を水500 mL に徐々に加えて調製する。

(3) 操 作

1) 基礎培地の調製（注1）

水1000 mL に下記のものに加え、水浴中で加熱溶解する。溶解後、pH 7.1に調整する。

基礎培地組成

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

2) 接種菌溶液の調製

(a) 接種菌用培地（市販培地を用いてもよい）

水100 mL に酵母エキス0.55 g を溶かし、これにペプトン1.25 g, ブドウ糖1.1 g, リン酸二水素カリウム0.025 g, リン酸水素二カリウム0.025 g, 酢酸ナトリウム1.0 g, 硫酸マグネシウム0.01 g, 硫酸

マンガン0.5 mg, 硫酸第一鉄0.5 mg を加え pH 6.8に調整した後, 水浴上で加熱溶解する。溶解後かき混ぜ, この液約 4 mL ずつを試験管に分注し, 121 °Cで10分間加圧滅菌後, 放冷する。

(b) 接種菌溶液

Lactobacillus plantarum ATCC 8014 の保存菌株を接種菌用培地に継代し, 37 °C ± 1 °Cで20時間 ± 3 時間培養する。さらに接種用培地に継代し, 37 °C ± 1 °Cで20時間 ± 3 時間培養する。培養した菌浮遊液を遠心分離し, 滅菌生理食塩水で2回洗浄する。洗浄後, 滅菌生理食塩水で希釈し, 接種菌溶液とする。

3) 試料溶液の調製

試料 (*W*) を三角フラスコにはかりとる。2 mol/L 硫酸又は 3 mol/L 硫酸25 mL を加え, 121 °Cで1 時間加圧抽出する。冷却後, pH 4.5に調整し, 水で100 mL に定容 (*V*) し, ろ過する。ろ液25 mL 又は40 mL (*a*) をはかりとり, pH 6.8に調整した後, 水で50 mL (*b*) に定容し, ろ過 (ろ紙 JIS 2 種) する。必要に応じて, 測定時さらに水を加えて, 希釈し, 試料溶液とする。

4) 測定

検量線作成のため, ビオチン標準溶液 (0.2 ng/mL) 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 40 及び 60 µL をマイクロプレートの2 ウェルずつにとり, それぞれに接種菌溶液を含む基礎培地0.15 mL 及び水を加えて全量を0.25 mL とする。別に1 試料溶液につき3 段階の希釈液 (試料溶液20, 40, 80 µL) を2 ウェルずつにとる。次に接種菌溶液を含む基礎培地0.15 mL 及び水を加えて全量を0.25 mL にする。マイクロプレートを振り混ぜ機で2 ~ 3 分攪拌し, マイクロプレートリーダーでブランクを測定した後, 35 °C ± 2 °Cで21時間 ± 3 時間培養 (培養条件: 微好気培養) する。培養後, マイクロプレートを十分に振り混ぜ機で攪拌した後, 菌の増殖をマイクロプレートリーダー (600 nm の吸光度を測定) で測定する。検量線はマイクロプレートの各ウェルに加えたビオチンの量と濁度 (吸光度) をプロットして作成する。この検量線を用いて試料溶液のビオチン含量を求める。また各試料中のビオチン酸含量については, 各試料溶液から得られたそれぞれの値がそれらの平均値より ± 10 % 以内にあることを確認してから, 改めてこれらの平均値を求め, これを試料中のビオチン含量とする。

(4) 計算

$$\text{ビオチン含量 (}\mu\text{g/100 g)} = (A \times V \times N \times b) \times \frac{100}{a \times W \times 1000}$$

A: 検量線より求めた試料溶液 1 mL 中のビオチン濃度 (ng/mL)

V: 定容量 (mL)

N: 希釈倍数

W: 試料採取量 (g)

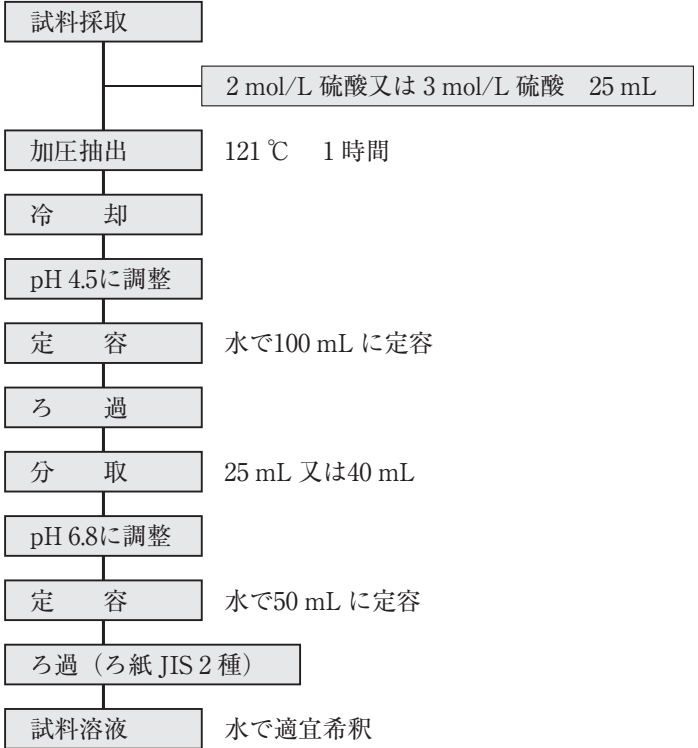
a, b: 分取量 (mL) 又は定容量 (mL)

注 解

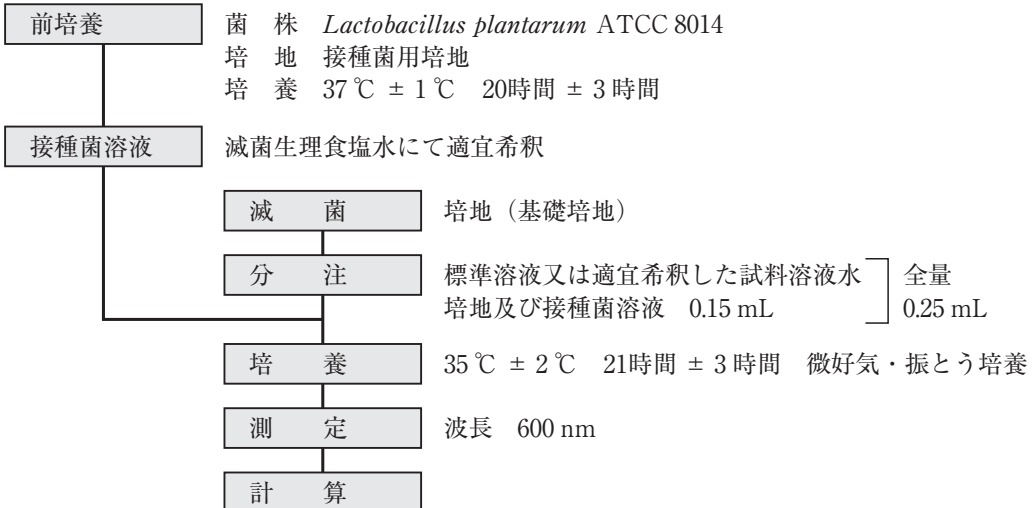
(注1) 日水製薬 (株) ほかから既成培地が市販されている。日水製薬 (株) の場合, 「ビオチン定量用基礎培地」が使用できる。

ビオチン定量法・フローチャート

[試料溶液の調製]



[培養・測定]



33 アスコルビン酸 (ビタミンC)

33-1. 高速液体クロマトグラフ法

適用

食品全般に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

高速液体クロマトグラフ (可視部吸光光度検出器付き)

弧動式振り混ぜ機

恒温器

遠心分離機

ホモジナイザー

共栓試験管

遠心管

(2) 試薬

アスコルビン酸標準品：日本薬局方標準品 ((一財) 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団 頒布)

メタリン酸：特級

硫酸：特級

2, 4-ジニトロフェニルヒドラジン：特級

チオ尿素：特級

酢酸エチル：残留農薬試験用

酢酸：特級

n-ヘキサン：残留農薬試験用

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：2, 6-ジクロロインドフェノールナトリウム塩水和物 (Sigma 社製) 又は同等品

硫酸ナトリウム (無水)：特級

2% (w/v) チオ尿素-メタリン酸溶液：10% メタリン酸溶液50 mL にチオ尿素 2 g を溶解し、水を加えて100mL とする。

2% (w/v) 2, 4-ジニトロフェニルヒドラジン-4.5 mol/L 硫酸溶液：2, 4-ジニトロフェニルヒドラジン 4 g を4.5 mol/L 硫酸に溶解し、100 mL とした後、ろ過 (ろ紙 JIS 2 種) する。冷暗所に保存し、約 1 カ月間使用が可能である。

アスコルビン酸標準原液：アスコルビン酸標準品100 mg を容量100 mL 全量フラスコにとり、5% (w/v) メタリン酸溶液で定容し、標準原液 (1 mg/mL) とする。

アスコルビン酸標準溶液：アスコルビン酸標準原液を用時 5% (w/v) メタリン酸溶液で次のように希釈し、標準溶液とする。

100 µg/mL 標準溶液：標準原液10 mL を100 mL に定容する。

10 µg/mL 標準溶液：100 µg/mL 標準溶液10 mL を100 mL に定容する。

0.4 µg/mL 標準溶液：10 µg/mL 標準溶液 4 mL を100 mL に定容する。

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0.2 gを温水に溶解し，100 mLとした後，ろ過（ろ紙JIS 2種）する。冷暗所に保存し，約1カ月間保存が可能である。

(3) 操 作

1) 抽 出

試料2～6 g (*W*) を容量50 mL 遠心管にはかりとり，5 % (w/v) メタリン酸溶液を加え，ホモジナイズ抽出する。5 % (w/v) メタリン酸溶液で洗い込み，50 mL に定容 (*V*) し，遠心分離 (1500回転/分，5分間)，ろ過（ろ紙JIS 3種）する。液体試料は，2～10 g を容量50 mL 全量フラスコにはかりとり，5 % (w/v) メタリン酸溶液で定容し，ろ過する。

2) 試料溶液の調製

抽出後のろ液を5 % (w/v) メタリン酸溶液で適宜希釈して，共栓小試験管に1 mL 分注し，5 % (w/v) メタリン酸溶液1 mLを加える。インドフェノール溶液を（30秒間経過しても色が消えなくなるまで）滴下し，2 % (w/v) チオ尿素-メタリン酸溶液2 mLを加え，最後に2 % (w/v) 2, 4-ジニトロフェニルヒドラジン-4.5 mol/L 硫酸溶液0.5 mLを加え，よく振り混ぜる。試験管に栓をし，38～42℃の恒温器中で約16時間静置し，オサゾンを生じた後，室温に戻す。酢酸エチル3 mLを加えて30分間振り混ぜ，生成したオサゾン酢酸エチル層に転溶する。静置後，下層を除き，硫酸ナトリウム（無水）で酢酸エチル層を脱水し，試料溶液とする。

3) 高速液体クロマトグラフ用アスコルビン酸標準溶液（以下，HPLC用標準溶液）の調製

100 μg/mL，10 μg/mL，0.4 μg/mL アスコルビン酸標準溶液をそれぞれ共栓小試験管に1 mL 分注し，5 % (w/v) メタリン酸溶液1 mLを加える。（3）2）と同様にインドフェノールを滴下し，以降も同様に調製した液をHPLC用標準溶液とする。

4) 測 定

試料溶液10 μL を高速液体クロマトグラフに注入し，アスコルビン酸のピーク高さを測定する。同様にHPLC用標準溶液をそれぞれ10 μL 注入し，アスコルビン酸の検量線を作成する。

5) 高速液体クロマトグラフィ

[操作条件例]

カラム：内径4.6 mm，長さ100 mm，シリカゲル，順相系カラム（例えば，（株）センシユール科学 Senshu PAK Silica-1100-N (100)）

移動相：酢酸エチル-*n*-ヘキサン-酢酸-水の混液（60：40：5：0.5 v/v/v/v）（注1）

流速：1.5 mL/分

温度：40℃

波長：495 nm

(4) 計 算

$$\text{アスコルビン酸含量 (mg/100 g)} = \frac{A \times V \times N}{W \times 1000} \times 100$$

A：検量線より求めた試料溶液中のアスコルビン酸濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

N：希釈倍数

W：試料の採取量（g）

注 解

(注1) 食肉加工品には酸化防止剤としてエリスルビン酸を使用する場合がある。2, 4-ジニトロフェニルヒドラジンとの反応で生成するオサゾン、次の移動相条件で分離できる。

酢酸-*n*-プロパノール-酢酸エチル-*n*-ヘキサン混液 (0.1 : 0.2 : 3 : 4 v/v/v/v)

アスコルビン酸定量法・フローチャート

