

4 分析マニュアル（ヨウ素等 5 成分・ポリフェノール）

本成分表収載の成分項目の分析方法については、「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）に掲げるもののほか、次に掲げるところによった。

1) ヨウ素

誘導結合プラズマ質量分析法

[適用]

食品全般に用いる。

[測定方法]

(1) 装置及び器具

誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) : Agilent 7500ce 同等性能のもの (四重極、コリジョンセルなど分子イオン干渉を除去する機能が装備されたもの)

試料分解容器 : メタルフリーポリプロピレン製容器 (50 mL 容)

(SCP Science 製 DigiTUBES 同等品)

遠心分離器 : コクサン H-80F 同等品 (スイングローター使用)

(2) 試薬

ヨウ素標準溶液 : ヨウ化カリウム (試薬特級、シグマアルドリッチジャパン) を 0.1308 g 採取し、イオン交換水を用いて 100 mL に定容したものをヨウ素標準原液 1000 $\mu\text{g/mL}$ とする。ヨウ素標準原液 1000 $\mu\text{g/mL}$ をイオン交換水で 1 $\mu\text{g/mL}$ としたものを 10、25、50、250 及び 500 μL とり、各々に 25 %TMAH 1 mL を添加した後、50 mL 容メタルフリーポリプロピレン製容器に定容する。これらを 10 mL 分取し 2 $\mu\text{g/mL}$ テルル溶液を 100 μL 加えたものをヨウ素標準溶液とする。

テトラメチルアンモニウムヒドロキシド (TMAH) :

超高純度分析用試薬 (TAMAPURE-AA(25 %))等ヨウ素濃度が 1 ppb 以下のもの)

テルル溶液 :

市販のテルル標準原液 1000 $\mu\text{g/mL}$ を 0.5 mL とり、イオン交換水で 250 mL としたものを。

(3) 試料溶液の調製

試料 0.5~3(W) g を 50 mL 容メタルフリーポリプロピレン製容器に採り、0.5 %テトラメチルアンモニウムヒドロキシド (TMAH) 溶液 50 mL を加え、蓋をしてよく混和し、60 $^{\circ}\text{C}$ で 1 夜放置する。放冷後、1972 \times g (ローター半径 19.6 cm の場合 3000 rpm) で 10 分間遠心分離した後、上澄み液を 10 mL をとり、2 $\mu\text{g/mL}$ テルル溶液を 100 μL 加えたものを試料溶液とする。

(4) ICP-MS 測定条件 (一例)

機 種 : Agilent 7500ce

[アジレント・テクノロジー株式会社]

導入速度 : 1.0 mL/min

プラズマ条件 : RF パワー ; 1.6 kW

プラズマガス ; 15 L/min (アルゴン)

キャリアガス ; 0.70 L/min (アルゴン)

メイクアップガス ; 0.29 L/min (アルゴン)

リアクションガス ; ヘリウム

ネブライザ : Micro Mist ネブライザ

測定質量数 : 127 (内標 : テルル 128)

ガスモード : ノンガスモード

(5) 測定

測定用標準溶液について ICP-MS を用い、それぞれ内標準物質とのイオンカウント比を求め、ヨウ素の濃度により検量線を作成する。

同様に、試料溶液を測定し、あらかじめ作成した検量線から試料溶液中のヨウ素濃度(A)を求める。

(6) 計算

$$\text{ヨウ素含有量}(\mu\text{g}/100\text{g}) = A \times F \times 50 / W \times 1 / 10$$

A : 試料溶液のヨウ素濃度(ng/mL)

F : 標準溶液のファクター

W : 試料採取量(g)

2) セレン、クロム及びモリブデン

誘導結合プラズマ質量分析法

〔適用〕

食品全般に用いる。

〔測定方法〕

(1) 装置及び器具

誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) : Agilent 7500ce 同等性能のもの (四重極、コリジョンセルなど分子イオン干渉を除去する機能が装備されたもの)

マイクロ波分解装置 : 最大試料 1 g 分解が可能な容器を処理でき、内部温度センサー等を装備し、温度コントロールが可能なもの (Milestone 社製 ETHOS1 同等品)

(2) 試薬

セレン、クロム及びモリブデンの混合標準溶液 : セレン、クロム及びモリブデンの混合標準溶液 (Multi-Element Standard Cr・Mo・Se 10 µg/mL、SCP Science 製) をイオン交換水で 1 µg/mL に希釈したものを混合標準溶液とする。混合標準溶液の 10、25、50、250 及び 500 µL を分取し、各々に硝酸 5 mL、酢酸 1 mL 並びにガリウム 0.2 µg/mL、インジウム 0.2 µg/mL 及びテルル 2 µg/mL の混合溶液を 500 µL 添加し、イオン交換水で 50 mL に定容する。

ガリウム、インジウム及びテルルの混合溶液 : 市販のガリウム標準原液 1000 µg/mL 及びインジウム標準原液 1000 µg/mL 各々 0.5 mL 並びにテルル標準原液 1000 µg/mL を 5 mL とり、イオン交換水で 250 mL としたものを、さらに 25 mL とり、硝酸 2.5 mL を加えてイオン交換水で 250 mL としたもの。

硝酸 : 金属濃度 100 ppt 以下の超高純度試薬 (関東化学株式会社 Ultrapur-100 超高純度試薬 同等以上のもの)

酢酸 : 精密分析用

過酸化水素 : 特級

(3) 試料溶液の調整

試料 0.1~1(W) g を予め希硝酸で洗浄したマイクロ波分解容器に採り、硝酸 5 mL 及び過酸化水素 1 mL を加えて密封した後、表-1 の条件でマイクロ波分解を行った。放冷後、分解液をとり酢酸 1 mL 及び内標準溶液 (ガリウム 0.2 µg/mL、インジウム 0.2 µg/mL 及びテルル 2 µg/mL の混液) を 500 µL 添加し、イオン交換水を加えて 50 mL に定容する。

表-1 マイクロ波分解条件 (一例)

Stage	time(min.)	Temp(°C)	Power(W)
1	0	0	0
2	2	70	1000
3	5	50	0
4	20	200	1000
5	30	200	1000

(4) ICP-MS 測定条件 (一例)

機 種 : Agilent 7500ce

[アジレント・テクノロジー株式会社]

導入速度 : 1.0 mL/min

プラズマ条件 : RF パワー ; 1.6 kW

プラズマガス ; 15 L/min (アルゴン)

キャリアガス ; 0.70 L/min (アルゴン)

メイクアップガス ; 0.29 L/min (アルゴン)

リアクションガス ; ヘリウム

ネブライザ : Micro Mist ネブライザ

測定質量数 : クロム 52 (内標 : ガリウム 71)、モリブデン 98 (内標 : インジウム 115)、セレン 82 (又は 78) (内標 : テルル 128)

ガスモード : ヘリウムガスモード (クロム及びセレン 78)、ノンガスモード (モリブデン及びセレン 82)

(5) 測定

測定用標準溶液について ICP-MS を用い、それぞれ内標準物質とのイオンカウント比を求め、標準溶液の各元素の濃度により検量線を作成する。同様に、試料溶液を測定し、あらかじめ作成した検量線から試料溶液中の各元素濃度(A)を求める。ただし、セレンの測定において、食塩を高濃度に含む漬物や調味料及び海藻類は、質量数 78 で測定する。

(6) 計算

$$\text{各元素含有量}(\mu\text{g}/100\text{ g}) = A \times F \times 50 / W \times 1 / 10$$

A : 試料溶液の元素濃度(ng/mL)

F : 標準溶液のファクター

W : 試料採取量(g)

3) ビオチン

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とう機
 三角フラスコ
 孵卵器
 乾熱滅菌器
 オートクレーブ
 遠心分離器
 pHメーター
 マイクロプレートリーダー

(2) 試薬

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。

使用菌株：*Lactobacillus plantarum* (ATCC8014)

(3) 操作

① 基礎培地の調製

(a) 基礎培地：ビオチン定量用基礎培地

水 1000 mL に下記のを加え、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	0 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	400 µg		

(b)保存用培地：一般乳酸菌保存検出用培地

(c)接種用培地：一般乳酸菌接種用培地

② 接種菌溶液の調製

(a) *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 の保存菌株

保存用培地に培養保存しておいたものを用いる。

(b) 接種菌溶液

Lactobacillus plantarum の保存菌株を接種用培地に移植し、35 °Cで20時間増殖させる。増殖した菌体はよく懸濁させ、乾熱滅菌した遠心管に無菌的に移し、3000 rpm (1500 × g)、5分間遠心分離して菌体を集める。上澄み液を静かに傾斜して除き、これに滅菌生理食塩水を加えて菌体をもう一度懸濁させて再び遠心分離して菌体を洗浄する。この操作を2~3回繰り返した後、600 nmにおける透過率80~90%となるように滅菌生理食塩水で希釈し、接種菌溶液とする。

③ 試料溶液の調製

試料0.1~5 g (*W*)を、三角フラスコに精秤し、2 mol/Lあるいは3 mol/L 硫酸25 mLを加え、121 °Cで1時間オートクレーブで加圧抽出する。冷却後、5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液でpH 4.5に調整後、水を加えて100 mL(*V*)に定容し、ろ過する。ろ液25 mL(*a*)を分取して1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液でpH 6.8に調整後、水で50 mL(*b*)に定容し、ろ過して試料溶液とする。

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とう機で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で18時間程度培養する。培養後、マイクロプレートを十分に振とう機で攪拌した後、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

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

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)

4) ポリフェノール

フォーリン・チオカルト法

〔適用〕

チョコレート、ココア類に用いる。

〔測定方法〕

(1) 装置及び器具

分光光度計

振り混ぜ器

遠心分離器

ロータリーエバポレーター

蒸気乾燥機

ナス型フラスコ：容量 100 mL

全量フラスコ：容量 50 mL、100 mL

(2) 試薬

n-ヘキサン：特級

メタノール：特級

フォーリン・チオカルト、フェノール試薬

20%炭酸ナトリウム溶液：特級、70~80℃で加温し、かき混ぜ溶解する。

エピカテキン標準品

(3) 操作

① 脱脂

a. バッチ法 (1)

試料約 10(W) g を遠心管に正確にはかり取り、5 倍量の *n*-ヘキサンを加え、振り混ぜ器により 30 分振り混ぜ抽出する。遠心分離器により 3000 rpm で 15 分間遠心分離し、上澄みのヘキサン溶液をあらかじめ重量をはかった容量 100 mL のナス型フラスコにとる (必要なら、5 種 B のろ紙を通過させる)。この操作を 3 回繰り返す。脱脂試料は、風乾、又は 60℃以下の蒸気乾燥機内でヘキサンを完全に除去し、ポリフェノール抽出用試料とする。抽出脂質含有ヘキサンはロータリーエバポレーターを用いて減圧濃縮し、試料と同様に蒸気乾燥機内でヘキサンを完全に除去し、デシケーター内に 30 分以上静置後重量をはかり、試料中の脂質重量(L g)を測定する。

b. バッチ法 (2)

試料約 1(W) g を遠心管に正確にはかり取り、上記同様に処理し、その全量をポリフェノール抽出用試料とする。水分が多い試料でも水分、脂質の補正を必要としない方法である。

c. ソックスレー法

試料約 5(W) g をろ紙 (5 種 B、直径 185 mm) に正確にはかり取り、円筒ろ紙 (No.84、28 × 100 mm) に挿入し、ソックスレー抽出器により、ヘキサン抽出 (恒温水槽温度 83~85℃) を 12 時間行う。バッチ法と同様に脂質重量(L g)を測定し、脱脂試料を得る。

② 抽出

脱脂試料 $0.5(W_1)$ g を容量 100 mL のナス型フラスコに正確にはかり取り、50%メタノール 50 mL を加え、82~85 °C で 1 時間還流抽出を行う。冷却、静置後、50%メタノール層を遠心管に移し、3000 rpm で 15 分間遠心分離し、上澄みを 100(V) mL 全量フラスコに移す。35~40 mL の 50%メタノールを用いて、遠心管の残さ試料を先のナス型フラスコに戻す。再度還流抽出を 1 時間行い、冷却、遠心分離し、洗浄液を含めて先の 100 mL 全量フラスコに移し、50%メタノールで定容とする。

③ 測定

50 mL 全量フラスコに水約 35 mL 及び先の抽出試料溶液 0.5 mL を正確に採取する。次にフォーリン・チオカルト、フェノール試薬を 5 mL 加え、かき混ぜ、静置 1 分後に 20%炭酸ナトリウム溶液を 5 mL 加え（発泡するので注意する）、直ちに水で定容とする。かき混ぜ後 1 時間静置し、分光光度計で、765 nm の吸光度を測定する。あらかじめ、検量線作成用エピカテキン標準溶液 (0.05 mg/mL~0.4 mg/mL) から 0.5 mL を正確に採取し、上記と同様に測定して作成した検量線から抽出試料溶液中のポリフェノール濃度 (A mg/mL) を求める。

検量線作成用標準溶液の作製: エピカテキン 100 mg を褐色 100 mL 全量フラスコに正確にはかり取り、15 mL のメタノールで溶解後、水 15 mL を加え、50%メタノールで定容する。50%メタノールで希釈して、0.05 mg/mL~0.4 mg/mL の標準溶液を作製する。

④ 水分測定

水分による補正を行うため、試料を別に採取して水分を測定し、水分値 (M g/100 g) を得る。また、脱脂試料を別に採取して水分を測定し、水分値 (M_1 g/100 g) を得る。

(4) 計算

ポリフェノール含量(mg/100 g)

$$= A \times V \times [(W(100 - M)/100 - L)/[W_1(100 - M_1)/100]] \times 100/W$$

ただし、脱脂にバッチ法 (2) を用いる場合は、 $[(W(100 - M)/100 - L)/[W_1(100 - M_1)/100]]$ の項は省略する。

注記

ポリフェノールの測定法としてこのほかに五訂成分表 (初版) 作成当時使用されたプルシアンブルー法は、現在、全国チョコレート業公正取引協議会が設定した表示基準の測定法には含まれていないので、省略した。