別紙１－１

宇宙日本食認証に係る微生物検査の操作手順
（原料食品用）

2006年11月

１．範囲（Scope）

本文書は宇宙日本食の原料食品（Raw Materials）に適用する微生物規格と検査手順を定めるものである。

２．検査実施者

原料食品を対象とする微生物検査は基本的に食品製造者が実施する。ただし，認定を受けた食品検査機関に委託することも可能とする。

３．サンプリング手順（Sampling Procedures）

3.1　検体数（Sample Size）

検体数はロット毎に５検体（できれば製造日の異なるもの５検体）とする。検体は無作為に１５ｇ以上ずつを採取し，５検体を個々に検査する。（ただし，サルモネラに係る検査については，５検体を１つに混合して検査する。）

４．検査規格（Test Specification）

4.1 検査項目（Microorganism Tested）

食品原材料の種類に応じて規定された微生物検査を行う。

4.2 検査手順（Test Procedures）

4.2.1 一般細菌数（Total Aerobic Plate Count）

一般細菌数は 2001 年版の「Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods」のセクション 7.62 に記載されている混釈平板法(Pour Plate Method)を用いて測定する。

4.2.2 大腸菌群数（*Coliform* Test）

大腸菌群数は 3M 社のペトリフィルム法（CC プレート/大腸菌群数測定用）により測定する。

4.2.3　腸管出血性大腸菌 O157（EHEC O157:H）

腸管出血性大腸菌 O157 は、2001 年版の「Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods」のセクション 35.242 に記載されている、１．増菌培養、２．分離、３．確認試験の３ステップにより検査する。５検体を１つに混合して，検査を行う。

4.2.4 コアグラーゼ陽性ブドウ球菌（Coagulase Positive *Staphylococci*）

コアグラーゼ陽性ブドウ球菌は 2001 年版の「Compendium of Methods for the

Microbiological Examination of Foods」のセクション 39.53 に記載されているベアードパーカー寒天培地を用いる平板塗抹法（Surface Plating Procedure）で測定する。

4.2.5 サルモネラ（*Salmonellae*）

サルモネラは 2001 年版の「Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods」のセクション 37.5 に記載されている参照方法を用いて測定する。5検体を1つに混合して，サルモネラ検査を行う。

4.2.6 酵母及びカビ（Yeast and Mold）

酵母とカビは，3M 社のペトリフィルム法（YM プレート/カビ・酵母測定用）により測定する。平板で *Aspergillus flavus* parasiticus 群の有無について，肉眼及び顕微鏡観察する。

4.3 結果の判定（Evaluation of Results）

4.3.1 一般細菌数（Total Aerobic Plate Count）

一般細菌数が5検体のうちどれか1つでも1グラム当たり 20,000 CFU を超えるものがあれば，そのロット全体を不合格とする。また，5検体が 20,000 CFU 未満であっても，1グラム当たり 10,000 CFU を超すものが2検体以上あれば，やはりロット全体を不合格とする。

4.3.2 大腸菌群数（*Coliform* Test）

5検体のうちどれか1検体でも1グラム当たり 100 CFU を超えたら，そのロットは不合格とする。また5検体が1グラム当たり 100 CFU より少なくても，2検体以上 10 CFU を超えるものがあれば不合格とする。

4.3.3 腸管出血性大腸菌 O157

陽性と出たロットは，不合格とする。

4.3.4 コアグラーゼ陽性ブドウ球菌（Coagulase Positive *Staphylococci*）

5検体のうちどれか1検体でも1グラム当たりコアグラーゼ陽性ブドウ球菌が 100 個を超える場合は，そのロットは不合格とする。また5検体が1グラム当たり 100 個より少なくても2検体以上 10 個を超えるロットは不合格とする。

4.3.5 サルモネラ（*Salmonellae*）

陽性と出たロットは，不合格とする。

4.3.6 酵母及びカビ（Yeast and Mold）

5検体のうちどれか1検体でも，酵母・カビ数が1グラム当たり1000個を超していれば当該ロットは不合格である。また1グラム当たり1000個より少なくても，2検体以上1グラム当たり100個を超えるロットば不合格とする。5検体中，2検体以上，1グラム当たり10個の *Aspergillus flavus* parasiticus 群が検出されるロットは不合格とする。

5．報告（Reporting）

報告書には次の事項を含める。

検体の名称，ロット番号，ロットサイズ（製品全数），検体番号，検体採取日時及び採取者名，検査担当者名及び結果「不合格」の検査結果が得られた場合，食品検査機関は速やかに食品製造所に報告すること。

参考文献（References）

(1) American Public Health Association: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, Forth Edition, 2001: Frances Pouch Downes and Keith Ito, Editors, 800 I St., NW., Washington, DC.

(2) FDA Bacteriological Analytical Manual, 8thed Revision A, 1998. AOAC International, Gaithersburg, MD.

(3) FDA/CFSAN Bacteriological Analytical Manual Online: Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, US

(4) International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Association of Microbiological Societies: Microorganisms in Foods 7, 2002. 233 Spring Street New York, NY.

(5) Microbiology Products: 3M Health Care Limited, 33-1, Tamagawadai 2-chome, Setagaya-ku, Tokyo, JP

別紙１－２

宇宙日本食認証に係る微生物検査の操作手順
(最終製品用)

2006年11月

1．範囲（Scope）

本文書は商業的に無菌でない食品（Non-Commercially Sterilized Foods）に分類される宇宙日本食（ただし，最終製品　Finished Product）に適用する微生物規格と検査手順を定めるものである。

2．サンプリング手順（Sampling Procedure）

検体数はロット毎に５検体（できれば製造日の異なるもの５検体）とする。検体は無作為に採取し，認定を受けた食品検査機関に提出する。食品検査機関は５検体を個々に検査する。

3．検査規格（Test Specification）

3.1 検査項目（Microorganism Tested）

一般細菌数（Total Aerobic Plate Count）を測定する。

3.2 検査手順（Test Procedures）

一般細菌数は、2001 年版の「Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods」のセクション 7.62 に記載されている混釈平板法（Pour Plate Method）を用いて測定する。

3.3 結果の判定（Evaluation of Results）

一般細菌数が 5 検体のうちどれか１つでも 1 グラム当たり 20,000CFU を超えるものがあれば，そのロット全体を不合格とする。また，5 検体が 20,000CFU 未満であっても，1 グラム当たり 10,000CFU を超すものが 2 検体以上あれば，やはりロット全体を不合格とする。

4．報告（Reporting）

報告書には次の事項を含める。

検体の名称，ロット番号，ロットサイズ（製品全数），検体番号，検体採取日時及び各採取者名，検査担当者名及び結果「不合格」の検査結果が得られた場合，食品検査機関は速やかに食品製造所に報告すること。

参考文献 (References)

(1) American Public Health Association: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, Forth Edition, 2001: Frances Pouch Downes and Keith Ito, Editors, 800 I St., NW., Washington, DC.

(2) FDA Bacteriological Analytical Manual, 8th ed Revision A, 1998. AOAC International, Gaithersburg, MD.

(3) FDA/CFSAN Bacteriological Analytical Manual Online: Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, US

(4) International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Association of Microbiological Societies: Microorganisms in Foods 7, 2002. 233 Spring Street New York, NY.

(5) Microbiology Products: 3M Health Care Limited, 33-1, Tamagawadai 2-chome, Setagaya-ku, Tokyo, JP

以　上

別紙２－１

宇宙日本食認証に係る包装完全性検査の手順

(減圧検査)

2013年7月

1　範囲（Scope）

本文書は宇宙日本食の包装完全性検査(減圧検査)に係る規格と検査手順を定めるものである。

2　検査実施者

包装完全性検査（減圧検査）は、基本的には申請企業(製造企業を含む)(以下、申請企業とする。)が実施する。

3　検体数

全数を検査対象とする。

4　検査規格（Test Specification）

4.1　検査法の種類

包装完全性検査(減圧検査)においては、目視検査（Visual Observation Testing）と減圧検査（Vacuum Integrity Testing）の２種の検査を実施する。

4.2　検査内容と責任範囲

申請企業と検査機関の責任範囲は、図１に示すとおりとする。

(1) 減圧検査の前後に実施する目視検査及び減圧検査については、申請企業の責任範囲とし、外部機関及び検査機関の他、申請企業の自社設備での実施も可能とする。但し、試験の精度を証明する書面の提出を求める場合がある。

(2) 検査機関においては、官能検査等を実施する前に包装完全性を確認するための目視検査を実施する。

4.3　検査手順(Test Procedures)

(1) 目視検査の手順を、別紙 2-1-1 宇宙日本食認証に係る目視検査手順に示す。

(2) 減圧検査の手順を、別紙 2-1-2 宇宙日本食認証に係る減圧検査手順に示す。

4.4　試験結果の判定（Evaluation of Results）

(1) 申請企業の目視検査

申請企業の目視検査において「包装が不完全」と判断された製品は、官能検査の対象品から除くものとする。

(2) 検査機関の目視検査

申請企業は、検査機関の目視検査で「包装が不完全」と判断されたロットに対して、検査機関が行った全ての検査結果を認証申請書から除くものとする。

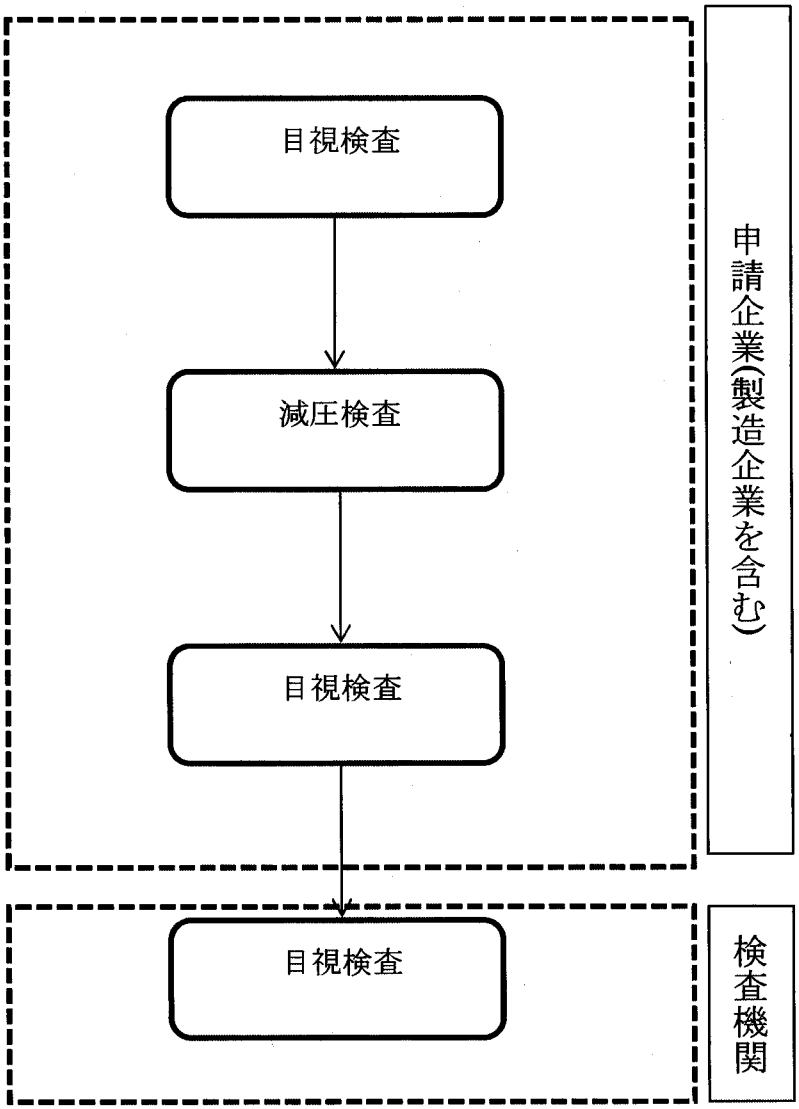


図１　包装の完全性検査にかかる食品製造者と検査機関の責任範囲

5．報告（Reporting）

(1) 申請企業の報告

申請企業は、全数検査済みであることを証明するため、及び「包装が不完全」と判断された製品(不合格品)の数を明らかにするための報告書をロット毎に作成しなければならない。報告書は、申請企業の所定の様式とするが、次の事項を含めるものとする。

「品目名(食品名)」、「ロット番号」、「ロットサイズ(製品全数)」、「検査日時」、「検査担当者名及び結果」

また、減圧検査の結果は、以下に示す様式に記述し、申請書と共に提出すること。

・品質検査として実施する減圧検査　：様式 11(3)

・保存性検査として実施する減圧検査　：様式 12(3)

(2) 検査機関の報告

検査機関は、食品製造者及び検査機関の目視検査で「包装が不完全」と判断されたロット番号を認証申請書該当検査結果欄に記載しなければならない。報告書の形式は、検査機関の様式によるものとする。

以　上

別紙２－１－１

宇宙日本食認証に係る目視検査手順

2013年6月

1　範囲（Scope）

本文書は宇宙日本食認証に係る目視検査に関する規格と検査手順を定めるものである。

2　検体数

全数を検査対象とする。

3　検査規格（Test Specification）

3.1　検査手順（Test Procedures）

3.1.1 目視検査（Visual Observation Testing）

3.1.1.1　申請企業の検査

申請企業は、減圧検査等において、目視検査を実施し、チェックシート１及び２に記録する。目視検査で確認すべき項目を以下に示す。

(1) 試験/検査前後での目視検査項目

宇宙日本食認証に係る目視検査において確認すべき事項は、以下のとおりとする。

① シールの完全性（シールに不良箇所などが無いかを確認）

② ピンホールによる漏れ（外から圧力を加える時，液漏れなどが無いかを確認）

③ 外装の異常（外装の変形、結露、変色及び異物などの異常がないことを確認）

(2) 減圧検査中の目視検査項目

減圧検査中に試料が目視で確認できない場合は、「試験/検査後の目視検査」で置き換えることが出来る。

① ピンホールによる漏れ(包装容器表面から液漏れ等が無いことを確認)

② 包装容器の挙動（含気の容器では、減圧中に容器が膨張すること確認出来ること。また、脱気容器では、同一ロットの試料が同様の挙動をしめすこと。）

3.1.1.2　検査機関の検査

検査機関にて包装の完全性検査の目視検査を実施し、チェックシート 3 に記録する。確認すべき事項は、以下のとおりとする。

① シールの完全性（シールに不良箇所などが無いかを確認）

② ピンホールによる漏れ（外から圧力を加える時，液漏れなどが無いかを確認）

③ 外装の異常（外装の変形、結露、変色及び異物などの異常がないことを確認）

④ ２重包装食品において、官能検査等で外装袋を開封する検体は、以下の項目の目視確認を行いチェックシート３に記録する。

(ア)外装袋内面に、結露、変色及び異物付着等の異常がないこと。

(イ)内袋に、ピンホールによる漏れ、変色及び異物付着等の異常のないこと。

3.1.2　結果の報告

目視検査の結果を記録したチェックシートは、当該試験/検査の結果を記録した様式の付属書として申請書に含めて提出すること。

参考文献 (References)

(1) Association of Official Analytical Chemists. 1989. Classification of Visible Exterior Flexible Package Defects. Arlington, VA.

(2) Association of Official Analytical Chemists. 1984. Classification of Visible Exterior Can Defects. Arlington, VA.

以　上

チェックシート1

試験/検査(試験)機器検査チェックリスト

食品名

中請企業名

検査日　開始時刻

検査員署名

機体	品目名	ロット番号	シリアル番号	検査項目						備考
				シールの完全性	ピンホールによる割れ	外観の異常				
						貨物の有無	緩衝の有無	貨色の有無	異物の有無	
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										

記載: (1) 判定は○(合格)、×(不合格)、△(保留)に分けて行う。

チェックシート2　　減圧検査中の目視検査チェックリスト

食品名		検査日	開始時刻	:
申請企業名		検査員署名		

検体	品目名	ロット番号	シリアル番号	検査項目		備考
				ピンホールによる漏れの有無	包装容器の形態	
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						

記載：(1) 判定は○(合格)、×(不合格)、△(保留)に分けて行う。
(2) 容器の形態、金属の容器では、減圧中に容器が膨張することが確認できること、また、脱気容器では、同一ロットの検体が同様の形態をしめすことを確認する。

別紙２－１－２

宇宙日本食認証に係る減圧検査手順

2013年7月

1　範囲（Scope）

本文書は宇宙日本食に係る減圧検査に関する規格と検査手順を定めるものである。

2　検体数

製品の全数を検査対象とする。

3　検査規格（Test Specification）

3.1　減圧検査の目的

申請企業が実施する減圧検査(Vaccum Integrity Testing)の目的は、①製品の品質検査の一環として包装にリークがなく完全性が確認されている。②保存性検査を実施した後、包装が完全に密封されているかどうか確認のためである。必ず、官能検査を実施する前は、減圧検査を実施することとする。

3.2　減圧検査手順（Vacumm Integrity Testing ）

(1)減圧環境

圧力レベル：450mmHg 以下

時間：1 分間放置する

(2)確認項目

減圧検査時に確認するべき目視検査項目をチェックシート 2 に基づき確認する。詳細は、別紙 2-1-1　宇宙日本食認証に係る目視検査手順を参照すること。

4　報告（Reporting）

減圧検査の結果は、以下に示す様式に記述し、申請書と共に提出すること。(別紙 2-1 宇宙日本食認証に係る包装完全性検査の操作手順を参照のこと)

・品質検査として実施する減圧検査　：様式 11(3)

・保存性検査として実施する減圧検査　：様式 12(3)

参考文献（References）

(1) Association of Official Analytical Chemists. 1989. Classification of Visible Exterior Flexible Package Defects. Arlington, VA.

(2) Association of Official Analytical Chemists. 1984. Classification of Visible Exterior Can Defects. Arlington, VA.

以　上

別紙２－２

宇宙日本食認証に係る包装完全性検査の操作手順
（耐圧検査編）

2011年5月

1．範囲（Scope）

本文書は、宇宙日本食の最終製品に対して行われる耐圧試験の検査手順を定めたものである。

2．試験方法

2.1　検査対象

宇宙日本食の最終製品1ロットから任意に5個を選び検査対象とする。

2.2　試験方法

1000mmHg以上の圧力下に1分間以上放置し、目視により漏れの状況を観察する。

2.3　判定

目視により内容物の漏れの有無を検査し、検査対象1個でも漏れがあった場合は、そのロット全体を不合格とする。

以　上

別紙２－３

宇宙日本食認証に係る包装完全性検査の操作手順
（耐寒・耐熱検査編）

2011年5月

1．範囲（Scope）

本文書は、宇宙日本食の最終製品に対して行われる耐寒・耐熱検査の検査手順を定めたものである。

2．試験方法

2.1 検査対象

宇宙日本食の最終製品１ロットから任意に耐寒検査用、耐熱検査用それぞれ５個を選び検査対象とする。

2.2 試験方法

(1) 耐寒検査

マイナス50℃以下で2時間以上放置し、目視により破裂、漏れの無いことを確認する。

(2) 耐熱検査

50℃以上で2時間以上放置し、目視により破裂、漏れの無いことを確認する。

2.3 判定

目視により内容物の漏れの有無を検査し、検査対象１個でも破裂、漏れがあった場合は、そのロット全体を不合格とする。

以　上

別紙３－１

宇宙日本食認証に係る水分定量の操作手順

2006年11月

1．概要

申請食品の水分の定量は，「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について」（平成11年4月26日 衛新第13号, Analytical Methods for Nutrition Labeling in Japan）に準拠する。ただし，主として常圧加熱乾燥法，減圧加熱乾燥法あるいは乾燥助剤法を用いることとし，乾燥処理前後の重量差[注1)]を水分量とする。代表的な食品について通常用いる分析条件を表1に一覧にして示す。

2．常圧加熱乾燥法

本法は，比較的簡便な方法としてかなり広範囲の食品に適用できる。一般に100～135℃の範囲の一定の温度を用いる。

2.1. 機器

・電気定温乾燥器：60～150℃の温度範囲で，所定温度の±2℃に調整できるもの。
・アルミ製ひょう量皿：上部の直径55 mm，底部の直径50 mm，深さ25 mm，厚さ0.2～0.3 mm程度，ふたの深さは約10 mmで，そのうち5 mmぐらいが容器にはまるようになっているもの。
・デシケーター：あらかじめ乾燥剤（シリカゲル，塩化カルシウム，五酸化リンなど）を入れておくこと。

2.2. 操作

所定の温度に調整した定温乾燥器にひょう量皿を入れ，1～2時間加熱後デシケーターに移す。放冷して室温に達したら，直ちにひょう量する。再び加熱，放冷，ひょう量の操作を繰り返し恒量（W_0 g）を求める。次に，適量の試料（通常2～3 g）を素早く精密に量り（W_1 g），平らに広げ，ふたをわずかにずらし，所定の温度に調整した定温乾燥器に入れる。所定の時間乾燥した後，乾燥器中で素早くふたをし，デシケーターに移して放冷する。室温に達したら，直ちにひょう量する。一般には，恒量（W_2 g）が得られるまでこの操作を繰り返し行う。

2.3. 計算

$$\text{水分（g/100g）} = \frac{(W_1 - W_2)}{(W_1 - W_0)} \times 100$$

3．減圧加熱乾燥法

本法は，かなり広範囲の食品に基準的な方法として適用できる。特に100℃以上での加熱によって変化し易い食品に適している。一般に水銀柱 5～100 mm の減圧度で，熱によって容易に変化する食品では 60～70℃の一定温度で，多少熱に安定な食品では 90～100℃の一定温度で加熱する。

3.1. 機器

・減圧乾燥器
・真空ポンプ
・洗気ビン：濃硫酸を注入したもの。
・アルミ製ひょう量皿：常圧加熱乾燥法の場合に同じ。
・デシケーター：常圧加熱乾燥法の場合に同じ。

3.2. 操作

所定の温度に調整した定温乾燥器にひょう量皿を入れ，1～2 時間加熱後デシケーターに移す。放冷して室温に達したら，直ちにひょう量する。再び加熱，放冷，ひょう量の操作を繰り返し恒量（W_0 g）を求める。次に，適量の試料（通常 2～3 g）を素早く精密に量り（W_1 g），平らに広げ，ふたをわずかにずらし，所定の温度に調整した減圧乾燥器に入れ，真空ポンプで吸引しながら，所定の減圧度に設定する。一定時間（約 5 時間）減圧乾燥後に真空ポンプを止め，洗気ビン中の濃硫酸を通して除湿した空気を乾燥器内に静かに導入して常圧に戻し，ひょう量皿を取り出し，素早くふたをしてデシケーター中で放冷する。室温に達したら，直ちにひょう量する。一般には，恒量（W_2 g）が得られるまでこの操作を繰り返し行う。

3.3. 計算

$$\text{水分（g/100g）} = \frac{(W_1 - W_2)}{(W_1 - W_0)} \times 100$$

4．乾燥助剤法

本法も加熱乾燥法の一種で，加熱すると融解し，表面に堅い被膜が形成されて常圧加熱乾燥法や減圧加熱乾燥法では内部の水分が蒸発し難い食品などに適している。ケイ砂などの乾燥助剤を用いて表面積を大きくし，水蒸気が食品組織から抜け出易くしてから常圧加熱乾燥法や減圧加熱乾燥法を適用するものである。

4.1. 機器，試薬

・電気定温乾燥器または減圧乾燥器
・真空ポンプ：減圧加熱乾燥法を適用する場合に必要。
・洗気ビン：濃硫酸を注入したもの。（減圧加熱乾燥法を適用する場合に必要。）
・電気恒温水槽
・アルミ製ひょう量皿：上部の直径 **55 mm**，底部の直径 **55 mm**，深さ **40 mm** 程度のもの。
・ガラス棒
・デシケーター：常圧加熱乾燥法の場合に同じ。
・乾燥助剤：精製ケイ砂（**40～60** メッシュ）又はけいそう土。

4.2. 操作

ひょう量皿にケイ砂約 **30 g**，あるいはけいそう土約 **10 g** をとり，かき混ぜ用ガラス棒を1本入れ，所定の温度に調整した乾燥器で **1～2** 時間加熱した後にデシケーターに移す。放冷して室温に達したら，直ちにひょう量する。再び加熱，放冷，ひょう量の操作を繰り返し恒量（W_0 g）を求める。適量の試料（通常 **2～3 g**）を素早く精密に量る（W_1 g）。次いで，試料と乾燥助剤がよく混和するように，ガラス棒でかき混ぜながら恒温水槽上で加熱する。必要があれば，少量の水を加えて混和をうながす。その後の本乾燥は，試料によって常圧加熱乾燥法または減圧加熱乾燥法を適用し，室温まで放冷したら，直ちにひょう量する。一般には，恒量（W_2 g）が得られるまで加熱，放冷，ひょう量の操作を繰り返し行う。

4.3. 計算

$$\text{水分（g/100g）} = \frac{(W_1 - W_2)}{(W_1 - W_0)} \times 100$$

表１　宇宙日本食に想定されている食品に対応する乾燥条件

食　品　の　種　類	乾燥温度	乾燥時間
穀類，乾めん，せんべい類	135℃	3 時間
めし，生めん，ゆでめん，もち	135℃	2 時間
パン類（菓子パンなど異種材料を多くふくものを除く）	135℃	1 時間
魚介類およびその加工品	105℃	5 時間
肉類およびその加工品	135℃	2 時間
野菜，果実およびその加工品	V 70℃	5 時間
きのこ（生，乾燥品），海藻（生，乾燥品）	105℃	5 時間
あめ玉，キャンディー	V100℃	2 時間
クッキーなどの焼菓子，	V100℃	5 時間
ゼリー	V 70℃	5 時間
生，半生菓子	105℃	5 時間
干菓子，砂糖菓子，砂糖	105℃	3 時間
茶	98-100℃	5 時間
マヨネーズ，ドレッシング	105℃	3 時間
トマト加工品，しょうゆ，ソース，乾燥スープなど調味料	V 70℃	5 時間

注：① Vは減圧（vacuum）加熱乾燥法を示す。

② 調理加工食品類については，原則として主食材の試験方法を適用する。乾燥品は概ね常圧加熱乾燥（乾燥助剤なし）法，湿潤品は概ね常圧加熱乾燥（乾燥助剤あり）法または減圧加熱乾燥（乾燥助剤あり）法が適している。

【注】

1）水分以外の揮発成分（アルコール類，酢酸などの揮発酸類）が含まれる場合には，これらも水分として測り込まれるので，これらを別途に測定して差し引く必要がある。

以　上

別紙３－２

宇宙日本食認証に係るたん白質定量の操作手順

2006年11月

1．概要

申請食品のたんぱく質の定量は，「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について」（平成 11 年 4 月 26 日 衛新第 13 号，Analytical Methods for Nutrition Labeling in Japan）に準拠する。すなわち，全窒素を定量し，それに所定の窒素・たんぱく質換算係数[注1)]を乗じてたんぱく質とする。

2．機器[注2)]

・ドラフト
・ケルダール分解フラスコ
・分解用加熱装置：ガスまたは電熱式の加熱装置を用いる。水と沸騰石を入れた分解フラスコを加熱するとき，約 5 分で沸騰し始めるように調節できる熱源が必要。
・アンモニア直接蒸留装置
・滴定装置：ビュレットの場合は，テフロンコック付き，容量 25 ml 以下で 0.05 ml の刻線付きのもを用いる。

3．試薬[注2)]

・硫酸カリウム：特級，粉状のもの。
・硫酸銅（Ⅱ）五水和物：特級，12 メッシュ以上に粉砕したもの。
・濃硫酸：特級
・水酸化ナトリウム：特級
・ホウ酸：特級
・分解促進剤：硫酸カリウムと硫酸銅（Ⅱ）五水和物を 9：1 の割合で混合。
・沸騰石：10～12 メッシュ程度の粒度のもの。
・30%水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 300g を水約 500ml に溶解した後，さらに水を加えて 1L に定容したもの。
・4%ホウ酸溶液：ホウ酸 40g を水 960ml に加温溶解し，冷却したもの。
・混合指示薬：0.2%メチルレッドと 0.2%ブロムクレゾールグリーンの 95%エタノール溶液を 1：5 の割合で混合したもの。
・0.1mol/L 水酸化ナトリウム標準溶液：水酸化ナトリウム約 4.5g を量り，水約 950ml を加えて溶かし，新たに調製した水酸化バリウム飽和溶液を，沈殿が生じなくなるまで加える。液をよく振り混ぜた後，密栓し，一夜放置する。上澄み液を傾斜するか，又はろ過して集める。得られた液は，ゴム栓で密栓するか，又は二酸化炭素吸収管（ソーダ管）を付けた瓶に保存し，適宜評定し直す[注3)]。
・0.05mol/L 硫酸標準溶液：濃硫酸約 28ml に水を加えて 10L に定容する。これを 0.1mol/L 水酸化ナトリウム標準溶液で評定した後，使用する。
・ショ糖：特級

4．操作[注2)]

試料の適量（S g）をケルダール分解フラスコに精密に量り，分解促進剤 10g を加え[注4)]，次いで濃硫酸 15ml を加え，穏やかに振り混ぜた後，弱火で加熱する。分解が始まると，液は黒化して泡立つ。黒色粘稠液になったら加熱を強める。反応が進むと，亜硫酸ガスと炭酸ガスを発生しながら液は徐々に黒褐色から褐色になり，最後に青色ないし青緑色で澄明な液になる。更に，1～2 時間強熱を続けて分解を完了させる。

冷却後，分解液に脱イオン水約 120ml を加え，沸騰石数個又は粒状亜鉛を少量加えてから，静かに 30%水酸化ナトリウム溶液 70ml を加え，アンモニア直接蒸留装置に連結する。蒸留液の留出口に 4%ホウ酸溶液 40ml を入れた受器（三角フラスコなど）を留出口がホウ酸溶液の液面より下にあるように装着した後，加熱蒸留し，液量が 120ml になったら留出口を液面から離し，さらに液量が 150ml になるまで蒸留する。

蒸留液に混合指示薬を数滴加え，0.05mol/L 硫酸標準溶液で中和滴定する。青色，青緑色を経て汚無色から桃色になったところを終点とする（V_1ml）。別に空試験として試料の代わりにショ糖を試料と同量採取し，同様に操作して空試験滴定値（V_0ml）を得る。

5．計算

$$\text{総窒素（g/100g）} = \frac{(V_1 - V_0) \times f \times 1.4}{S \times 1000} \times 100$$

V_1：本試験で中和に要した硫酸標準溶液の量（ml）
V_0：空試験で中和に要した硫酸標準溶液の量（ml）
f：0.05mol/L 硫酸標準溶液のファクター
S：試料採取量（g）

たんぱく質（g/100g）＝ 窒素・たんぱく質換算係数×総窒素（g/100g）

【注】

1）窒素・たんぱく質換算係数を下表に示す。下表に記載のない食品については，窒素・たんぱく質換算係数として 6.25 を用いる。

食　品　名	換算係数	食　品　名	換算係数
小麦（玄穀），大麦，ライ麦，えん麦	5.83	アーモンド	5.18
小麦粉，うどん，マカロニ，スパゲティ	5.70	かぼちゃ，すいか，ひまわりの各種実	5.40
米	5.95	大豆，大豆製品（植物性たんぱく質，豆乳類を除く。），しょうゆ	5.71
そば	6.31		
落花生，ブラジルナッツ	5.46	乳，乳製品，マーガリン	6.38
くり，くるみ，ごま，その他のナッツ類	5.30	ゼラチン	5.55

2）ここに示す機器，試薬および操作は，比較的広く用いられている条件の１つであるが，多種多様な改変・改良条件がある。また，操作の一部を自動化した機器も市販されており，活用できる。

3）食品，添加物等の規格基準（昭和 34 年厚生省告示 370 号）の第 2 添加物の一般試験法の C「試薬・試液」または第十三改正日本薬局方 一般試験法「容量分析用標準液」の方法により評定する。

4）衛新第 13 号では分解促進剤の添加量を 5g としているが，分解が不十分となるケースもあるため，ここでは五訂日本食品標準成分表分析マニュアルで採用されている添加量（10g）を採用した。

分解促進剤として，硫酸カリウム，二酸化チタン，硫酸銅（Ⅱ）五水和物を 20：1：1 の割合で混合したもの 5.5g を用いてもよい。

以　上

別紙３－３

宇宙日本食認証に係る脂質定量の操作手順

2006年11月

1．概要

申請食品の脂質の定量は，「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について」（平成11年4月26日 衛新第13号, Analytical Methods for Nutrition Labeling in Japan）に準拠する。ただし，主としてジエチルエーテル抽出法または酸分解法を用いることとし，ジエチルエーテルに可溶な成分の総量または酸分解後にジエチルエーテル･石油エーテル混液で抽出される成分の総量を脂質量とする。

2．ジエチルエーテル抽出法

本法は，比較的脂質含量が高く，組織成分と結合している脂質が比較的少ない食品に適する。

2.1. 機器

・電気恒温水槽：温度調節範囲が50～95℃。
・電気定温乾燥器：温度調節範囲が80～120℃。
・ソックスレー抽出器：試料採取量に応じて抽出管のサイズや，受器のフラスコの容量を選択すること。
・円筒ろ紙：直径および長さは，抽出管のサイズに応じて選択すること。
・デシケーター：あらかじめ乾燥剤（シリカゲル，塩化カルシウム，五酸化リンなど）を入れておくこと。

2.2. 試薬[注2)]

・けいそう土：セライトNo.545
・ジエチルエーテル：特級
・硫酸ナトリウム（無水）：特級
・硫酸銅溶液：硫酸銅（II）五水和物（特級）70gを水に溶かして1Lとする。
・水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム10gを水に溶かして1Lとする。

2.3. 試料の調製

①乾燥粉末食品，凍結乾燥食品などの場合

試料をそのまま円筒ろ紙に移して100～105℃の電気乾燥器で1～3時間乾燥するか，または試料をビーカーに精密に量りとり，水を加えて組織を膨潤させてからけいそう土または硫酸ナトリウム（無水）を加えて脱水し，乳鉢中で粉砕して円筒ろ紙に移す。ビーカーおよび乳鉢は少量のジエチルエーテルを含ませた脱脂綿でふき取り，脱脂綿ごと円筒ろ紙に入れる。

②レトルト食品，缶詰食品などの場合

けいそう土または硫酸ナトリウム（無水）を加えて脱水し，乳鉢中で粉砕して円筒ろ紙

に移す。ビーカーおよび乳鉢は少量のジエチルエーテルを含ませた脱脂綿でふき取り，脱脂綿ごと円筒ろ紙に入れる。

③あめ，ゼリー飲料などの場合

温湯 200ml を加えて溶かし，冷却後，硫酸銅溶液 10ml を加えて混和し，かき混ぜながら水酸化ナトリウム溶液をリトマス試験紙が中性または微酸性を示すまで加える。生ずる沈殿を沈降させ，ろ紙上に集める。ろ紙上の沈殿をろ紙ごと 100℃の定温乾燥器に入れて 1～2 時間乾燥した後，円筒ろ紙に移し入れる。

④マヨネーズ，ケチャップ等の調味料類の場合

水分を測定した後の試料をそのまま用いる。

2.4. 操作

「2-3. 試料の調製」に示したような処理によって水分を除去し，乾燥状態にして脂質を抽出し易くした後，試料を円筒ろ紙に入れる。その上に脱脂綿を軽く詰め，抽出管に入れる。受器フラスコは前もって 100～105℃の電気定温乾燥器で 1～2 時間乾燥し，デシケーターに移し，1 時間放冷した後に 0.1mg まで量って恒量（W_0g）を求めておく。受器フラスコにジエチルエーテルを約 2/3 容入れ，冷却管を連結して電気恒温水槽上で 8～16 時間抽出を行う。

抽出終了後，手早く抽出管を取りはずして，円筒ろ紙をピンセットで取り出し，再び冷却管に連結して，電気恒温水槽上で加温を続け，受器フラスコ中のジエチルエーテルがほぼ全部抽出管に移ったところで，受器フラスコを冷却管から取りはずして更に加温し，受器フラスコ中のジエチルエーテルを完全に蒸散させる。受器フラスコの外側をガーゼでふき，100～105℃の電気定温乾燥器で 1 時間乾燥し，デシケーターに移して 1 時間放冷した後に 0.1mg まで量って恒量（W_1g）を求める。

2.5. 計算

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

S：試料採取量（g）

3．酸分解法

本法は，組織に結合あるいは包合されている脂質を相対的に多く含む食品（たとえば，穀類，豆類，野菜類，卵類，きのこ類，藻類など）に適する。

3.1. 機器

・電気恒温水槽：温度調節範囲が 50～95℃。
・電気定温乾燥器：温度調節範囲が 80～120℃。
・デシケーター：あらかじめ乾燥剤（シリカゲル，塩化カルシウム，五酸化リンなど）を入れておくこと。
・抽出管：マジョニア管またはレーリッヒ管を用いる。
・溶媒留去用電気恒温水槽：温度調節範囲が 30～80℃。
・ロータリーエバポレーター：一式

3.2. 試薬

・ジエチルエーテル：特級
・石油エーテル：特級
・エタノール：95%（v/v），特級
・濃塩酸：特級
・塩酸（25→36）：濃塩酸 25 容に水 11 容を加えたもの。

3.3. 操作

試料の適量（乾物として 1～2g 以下）を 50ml 容のビーカーに精密に量り（Sg），エタノール 2ml を加えてガラス棒でよく混和する。次いで，乾燥試料等のときは塩酸 (25→36)，多水分試料のときは濃塩酸 10ml を加えて十分に混和し，時計皿で覆って 80～95℃の電気恒温水槽上で 30～40 分間ときどきかき混ぜながら加温する。放冷後，内容物を抽出管（マジョニア管またはレーリッヒ管）に移し，ビーカーとガラス棒をエタノール 10ml で洗い，更にジエチルエーテル 25ml で洗浄し，洗液は先の抽出管に合わせる。栓をして軽く振って混和した後，栓をゆっくり回してジエチルエーテルのガスを抜く。再び栓をして 30 秒間激しく振り混ぜる。次いで，石油エーテル 25ml を加え，同様にして 30 秒間激しく振り混ぜる。上層が透明になるまで静置した後，脱脂綿を詰めた漏斗でろ過する。ろ液はあらかじめ 100～105℃の電気定温乾燥器で 1 時間乾燥後，デシケーター中で 1 時間放冷し，0.1mg まで量って恒量（W_0g）を求めたフラスコ（受器）に集める。抽出管内の水層に再びジエチルエーテルと石油エーテル各 20ml ずつの混液を加え，上記と同様に操作した後に静置し，混液層を同様にろ過して先のフラスコ（受器）に集める。更に，ジエチルエーテルと石油エーテル各 15ml ずつの混液を加え，この操作をもう一度繰り返した後，抽出管の先端，栓および漏斗の先端をジエチルエーテル-石油エーテルの当量混液で十分に洗い，この洗液も先のフラスコ（受器）に集める。

抽出液と洗液を捕集したフラスコをロータリーエバポレーターに取り付け，70～80℃の溶媒留去用電気恒温水槽中で加温して溶媒を十分に留去する。受器フラスコの外側をガーゼでふき，100～105℃の電気定温乾燥器中で 1 時間乾燥後，デシケーターに移して 1 時間

放冷した後に0.1mgまで量って恒量（W_1 g）を求める。

3.4. 計算

$$脂質（g/100g）= \frac{(W_1 - W_0)}{S} \times 100$$

S：試料採取量（g）

4．クロロホルム・メタノール混液抽出法

本法は，大豆および大豆製品（みそ類，納豆類は除く），卵類のように，リン脂質などの極性脂質を比較的多く含む食品に適する。

4.1. 機器

・電気恒温水槽：温度調節範囲が50～95℃。
・電気定温乾燥器：温度調節範囲が80～120℃。
・デシケーター：あらかじめ乾燥剤（シリカゲル，塩化カルシウム，五酸化リンなど）を入れておくこと。
・遠心分離機：3,000回転／分で操作でき，50 ml容の遠心管が4～8本かけられるものを用いる。
・遠心管：50 ml容の共栓付きガラス遠心管（直径 35 mm，高さ 100 mm程度のもの）を用いる。
・抽出装置：還流冷却管と200 ml容の共用すり合わせ三角フラスコからなる装置。
・ひょう量瓶：直径 45 mm，高さ 45 mmでふた付きのガラス製のものを用いる。
・ガラスろ過器：ブフナー漏斗形11G-3，フィルター板直径 40 mm，容量 60 ml～100 mlのものを用いる。
・なす形フラスコ：300 ml容の共栓付きなす形フラスコ

4.2. 試薬

・クロロホルム[注1)]：特級，97%（v/v））以上の純度のものを用いる。
・メタノール：特級，96%（v/v））以上の純度のものを用いる。
・クロロホルム・メタノール混液（2：1）：クロロホルム2容に対してメタノール1容を加え，混和する。
・石油エーテル：特級
・硫酸ナトリウム（無水）：特級，120 ml～135℃で1～2時間乾燥後，ポリエチレン瓶等に保存する。

4.3. 操作

試料の適量を200ml容共栓三角フラスコに精密に量り（Sg），クロロホルム・メタノール混液（2：1）50～60 mlを加え，還流冷却管を接続した後，65℃に調節した電気恒温水槽の中に入れる。穏やかに沸騰を始めたら，そのまま約1時間抽出を行う。抽出終了後，冷却管から三角フラスコを取りはずし，ガラスろ過器を用いて300 ml容共栓付きなす形フラスコに抽出液をろ過し，次いでクロロホルム・メタノール混液（2：1）で抽出に用いた三角フラスコとガラスろ過器を洗い，洗液はろ液に合わせる。

捕集したろ液からクロロホルム・メタノール混液を留去させ，フラスコを傾けたときに内容物が粘性を示す程度に濃縮して，乾固させない。

冷却した後，石油エーテル25mlを正確に加えて内容物を溶解させ，さらに硫酸ナトリウム（無水）5～15 gを加え，栓をして1分間振り混ぜた後。すばやく遠心管に移し，遠心分離（3,000回転/分，5分間）する。あらかじめ100～105℃の電気定温乾燥器で1時間乾燥後，デシケーター中で45分間放冷し，0.1mgまで量って恒量（W_0g）を求めたひょう量瓶に上澄み液10 mlをすみやかに正確に量り，石油エーテルを留去した後，100～105℃の電気定温乾燥器で1時間乾燥し，デシケーター中で45分間放冷後，0.1mgまでひょう量して恒量（W_1g）を求める。

4.4. 計算

$$\text{脂質（g/100g）} = \frac{(W_1 - W_0) \times 2.5}{S} \times 100$$

S：試料採取量（g）

2.5：石油エーテル25 ml中の10 mlを採取して乾燥を行うので，係数として2.5を乗ずる。

【注】

5）クロロホルムは発がん性のある環境汚染物質であることから，局所排気装置（ドラフト）を備えた設備で取り扱うなど，十分な安全衛生上の配慮が必要である。

以　上

別紙３－４

宇宙日本食認証に係る灰分定量の操作手順

2006年11月

1．概要

申請食品の灰分の定量は，「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について」（平成11年4月26日 衛新第13号, Analytical Methods for Nutrition Labeling in Japan）に準拠する。ただし，主として直接灰化法または酢酸マグネシウム添加灰化法を用いることとし，所定の温度（550～600℃）で灰化処理を行い，有機物および水分を除いて得られる残留物の総量を灰分とする。

2．直接灰化法

2.1. 機器

・灰化容器：直径6cm程度の磁製蒸発皿，または容量15～30ml程度の磁製るつぼ。
・電気炉：熱電対温度計付きのもので550～600℃±10℃に設定できるもの。
・デシケーター：あらかじめ乾燥剤（シリカゲル，塩化カルシウム，五酸化リンなど）を入れておくこと。

2.2. 試料の前処理

①穀類，豆類，その他②，③および④に該当しない乾燥食品など

特別な前処理は不要。

②灰化時に膨張して容器の外にあふれ出る恐れのある食品（砂糖，砂糖菓子の類，精製でんぷん，卵白，魚介類など）

予備灰化を行う。すなわち，あらかじめ，電気炉に入れる前に，弱火で灰化容器の下面を熱し，内容物があふれ出ないように注意しながら除々に予備的灰化させておくこと。

③液状食品，水分の多い食品（牛乳，果汁類，野菜類，果実類，畜肉類，魚介類など）

予備乾燥を行うこと。すなわち，あらかじめ湯浴上やホットプレート上などで加温して乾燥させておくこと。

④引火性の食品（油脂類など）

予備燃焼を行うこと。すなわち，十分に乾燥させた後，試料を加熱したり，加熱しつつ点火して燃焼させておくこと。

2.3. 操作

あらかじめ恒量（W_0g）を求めた灰化容器に，適量の試料を精密に量り採り（W_1g），必要な前処理を行った後，550～600℃に達した電気炉に入れ，白色またはこれに近い色になるまで灰化する。

灰化後，灰化容器を取り出し，温度が200℃近くまで放冷してデシケーターに移し，室温に戻った後に秤量する。同じ操作を恒量（W_2g）になるまで繰り返す。

2.4. 計算

$$灰分\ (g/100g) = \frac{(W_2 - W_0)}{(W_1 - W_0)} \times 100$$

3．酢酸マグネシウム添加灰化法

本法は，リン酸を多く含む試料に有効な方法で，米，小麦などの穀類およびその加工品に適する[注1)]。

3.1. 機器

・灰化容器：直径 6cm 程度の磁製蒸発皿，または容量 15～30ml 程度の磁製るつぼ。
・電気炉：熱電対温度計付きのもので 550～600℃±10℃に設定できるもの。
・デシケーター：あらかじめ乾燥剤（シリカゲル，塩化カルシウム，五酸化リンなど）を入れておくこと。

3.2. 試薬

・酢酸：特級
・酢酸マグネシウム：特級
・メタノール：特級
・酢酸マグネシウム溶液：酢酸マグネシウム 15g に脱イオン水約 150ml を加え，更に酢酸 2ml を添加し，かき混ぜながら湯浴上で加温して溶解する。これにメタノールを加えて 1L とする。

3.3. 操作

あらかじめ恒量（W_0g）を求めた灰化容器に，試料約３g を精密に量り採る（W_1g）。酢酸マグネシウム溶液 3ml を正確に量り，試料全体に均一にしみわたるように加える。約 5 分間放置して，過剰のメタノールを蒸発させ，更に予備乾燥した後，予備灰化（弱火で灰化容器の下面を熱し，内容物があふれ出ないように注意しながら除々に灰化させる操作）し，600℃に達した電気炉に入れ，3～4 時間灰化する。

灰化後，灰化容器を取り出し，温度が 200℃近くまで放冷してデシケーターに移し，室温に戻った後にひょう量する。同じ操作を恒量（W_2g）になるまで繰り返す。

別に酢酸マグネシウム 3ml を恒量（W_3g）を求めた灰化容器に量り採り，以下同様に灰化操作を行って空試験値（W_4g）を求める。

3.4. 計算

$$\text{灰分（g/100g）} = \frac{(W_2 - W_0) - (W_4 - W_3)}{(W_1 - W_0)} \times 100$$

【注】

1）過剰のリン酸を含む試料では，灰化時に灰が溶融して完全な灰化が困難となる。酢酸マグネシウム添加灰化法は，このリン酸を中和してマグネシウム塩とし，溶融を防いで迅速に灰化できる方法である。

以　上

別紙３－５

宇宙日本食認証に係る炭水化物定量の操作手順

2006年11月

1．概要

申請食品の炭水化物の定量は，「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について」（平成11年4月26日 衛新第13号，Analytical Methods for Nutrition Labeling in Japan）に準拠する。すなわち，当該食品の重量から，たんぱく質，脂質，灰分および水分量を除いて算出する。

2．計算

炭水化物（g/100g）＝100（g/100g）－（たんぱく質＋脂質＋灰分＋水分）（g/100g）

以　上

別紙３－６

宇宙日本食認証に係るエネルギー算定の操作手順

2006年11月

1．概要

申請食品のエネルギー（熱量）の算定は，「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について」（平成 11 年 4 月 26 日 衛新第 13 号，Analytical Methods for Nutrition Labeling in Japan）に準拠し，アトウォーター法によって算定する。すなわち，たんぱく質，脂質および炭水化物の量にそれぞれ次の係数を乗じたものの総和とする[注1)，注2)]。

たんぱく質　4 kcal/g
脂　　質　9 kcal/g
炭水化物　4 kcal/g

2．計算

エネルギー（kcal/100g）＝{4（kcal/g）×たんぱく質量（g/100g）}＋
{9（kcal/g）×脂質量（g/100g）}＋{4（kcal/g）×炭水化物量（g/100g）}

【注】

1）酢酸などの有機酸が含まれている食品にあっては，有機酸類を別途に定量した上で，定量値（g/100g）に 3 kcal/g を乗ずることも可能である。

2）茶にはタンニンとカフェインが 100g 当たりでそれぞれ 10g 前後と 3g 前後含まれている。また，コーヒーにもタンニンとカフェインが 100g 当たりでそれぞれ 12g 前後と 4g 前後含まれている。さらに，ココアにはタンニンとテオブロミンが 100g 当たりでそれぞれ 4g 前後と 2g 前後含まれている。これらの成分はエネルギーとして利用されないため，茶，コーヒーあるいはココア等の食品のエネルギー算定に際しては，これらの成分を別途に定量し，炭水化物量から差し引いても良い。

以　上

別紙３－７

宇宙日本食認証に係る
ビタミンA（レチノール）定量の操作手順

2006年11月

1．概要

申請食品のビタミンA(レチノール)の定量は，「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について」（平成11年4月26日 衛新第13号，Analytical Methods for Nutrition Labeling in Japan）に準拠する。すなわち，ピロガロール存在下のアルカリ性で試料を加熱けん化した後，不けん化物を有機溶剤で抽出し，高速液体クロマトグラフ法で定量する方法である。

2．器具及び装置

コーヒーミル
60 ml 容共栓付褐色遠沈管
薬さじ
ミクロスパーテル
化学天秤
水浴（70 ℃）
エッペンドルフピペット
ガラス棒
駒込ピペット
振とう機
遠心分離機
100 ml 容褐色ナス形フラスコ
減圧濃縮器（ロータリーエバポレーター）
ホールピペット
褐色メスフラスコ
シリンジフィルター（水系）
超音波発生器
高速液体クロマトグラフ(UV 検出器付)
高速液体クロマトグラフ用カラム：逆相型
（例）Cosmosil C18 Econopak φ4.6 mm×15 cm [ナカライテスク製]

3．試薬及び試液

3.1 試薬

dl-α-トコフェロール（試薬特級）
ピロガロール(試薬特級)
塩化ナトリウム(試薬特級)
水酸化カリウム(試薬特級)
ヘキサン(残留農薬試験用)

酢酸エチル(残留農薬試験用)
2-プロパノール(試薬特級)
エタノール(試薬特級)
エタノール(残留農薬試験用)
メタノール(残留農薬試験用)
ブチルヒドロキシトルエン(BHT) (試薬特級)
アルミナ (MERCK 社製 Aluminium oxide 90 active basic)

3.2 試液

アルミナヘキサン

ヘキサンをアルミナカラムで精製し不純物を取り除く。

60 %水酸化カリウム溶液

水酸化カリウム 60 g を冷しながら水(イオン交換水)を加えて溶かし，100 ml に定容する。

1 %塩化ナトリウム溶液

塩化ナトリウム 1 g を水(イオン交換水)に溶解し，100 ml とする。

240 ppmBHT 含有酢酸エチル

酢酸エチル 1000 ml に BHT 0.24 g を溶解する。

24 ppmBHT 含有ヘキサン-酢酸エチル混液(9:1 V/V)

アルミナヘキサン 900 ml に 240 ppmBHT 含有酢酸エチル 100 ml を加え混合する。

50 ppm dl-α-トコフェロール含有エタノール

エタノール 1000 ml に dl-α-トコフェロール 50 mg を溶解する。

4．標準品

パルミチン酸レチノール標準液[和光純薬工業株式会社]

4.1 標準原液の調製

4.1.1 調製

パルミチン酸レチノール標準液 1 カプセルを 60 ml 容共栓付褐色遠心管にとり，ピロガロール 0.3 g 及び 1 % 塩化ナトリウム溶液 1 ml を加え，50 ppm dl-α-トコフェロール含有エタノール 10 ml，水酸化カリウム粒 3 g 及び 60 %水酸化カリウム溶液 2 ml を加え， 70℃水浴中でガラス棒で 5 分に 1 回程度かき混ぜながら 30 分間加熱する。水冷後，1 %(W/V)塩化ナトリウム溶液 21 ml を加えた後， 24 ppmBHT 含有ヘキサン-酢酸エチル混液(9:1 V/V) 14m l を加える。 5 分間振とうし，2-プロパノール 2 ml を加え，遠心分離後，上層を 100 ml 容褐色ナス形フラスコに移す。水層を 24 ppm BHT 含有ヘキサン-酢酸エチル混液(9:1 V/V) 14 ml で更に 2 回，同様

に抽出する（但し，3回目の抽出時に加える 2-プロパノールは 1 ml とする）。合わせた抽出液を 40℃で減圧濃縮する。

この残留物に 2-プロパノール 5 ml を加え，超音波発生器で溶解し，100 ml 容褐色メスフラスコに２－プロパノールで定容したものを，標準原液とする。

4.1.2 純度検定及び濃度計算

（出典：日本薬局方 一般試験法 ビタミンA定量法 第2法）

ホールピペットと褐色メスフラスコを用い，標準原液を 2-プロパノールで 100 倍に希釈する。この溶液を検定溶液①とする。

同様に，標準原液を 2-プロパノールで 50 倍に希釈する。この溶液を検定溶液②とする。

2-プロパノールを対照にして，検定溶液①，②を分光光度計で 310(A1)，325(A2)及び 334(A3)nm のそれぞれの吸光度を 3 回ずつ測定し，これらの平均値を算出して，次式により標準原液のレチノール濃度を求める。

（純度検定）

補正係数 f＝6.815－2.555×{(A1)／(A2)}－4.260×{(A3)／(A2)}

（標準原液濃度）

レチノール（μg／ml） ＝ A 2／ 100 ×標準原液からの希釈率× 1830 × 0.3

ビタミンA効力（IU／ml） ＝ A2／ 100×標準原液からの希釈率 × 1830

検定溶液①及び②の補正係数 f が 1.030～0.970 の範囲にあり，かつ検定溶液①及び②から求めた標準原液濃度の差／平均が 0.01 以内の場合のみ，検定溶液①及び②の平均で標準原液濃度を算出する。

4.2 標準溶液の調製

標準原液を 2-プロパノールで 1ml 中レチノール約 10～15 μg 含むように希釈し，希釈溶液 S5 とする。さらに 50 ppm dl-α-トコフェロール含有エタノールで 1ml 中約 2，20，50，500，及び 2,500 ng 含むように希釈し，それぞれ標準溶液 S0，S1，S2，S3，S4 とする。

4.3 検定方法

新たに調製した標準溶液 S0，S1，S2，S3，S4 を高速液体クロマトグラフに注入し，作成された検量線の相関係数が 1～0.999 の範囲にあり，新旧の標準溶液の濃度/面積値比が 0.97～1.03 の範囲であれば合格とする。

高速液体クロマトグラフ操作条件（例）

カラム　：Cosmosil C 18　Econopak，φ4.6 mm×150 mm（ナカライテスク製）

移 動 相 ：メタノール及び水の混液（88:12　V／V）

測定波長：325 nm

流　　量 ：1.0 ml／min

温　　度：40℃

注 入 量：20 μl

4.4　保存

標準原液及び標準溶液は冷凍庫で保存し，使用期限は調製後 6ヶ月とする。

5．検体の調製

検体全量をミルで粉砕し均質化する。

6．試験操作

6.1　試料採取

調製した試料を 60 ml 容共栓付褐色遠沈管に 0.1～2 g 採取する。ピロガロール 0.3 g 及び 1 %塩化ナトリウム溶液を 0～2 ml 加え，次いで 50 ppm dl-α-トコフェロール含有エタノール 10 ml を加える。

6.2　けん化

水酸化カリウム粒 2～3 g 及び 60 %水酸化カリウム溶液 1～2 ml を加え，70 ℃の水浴中でガラス棒を用いて時々かき混ぜながら 30 分間加熱する。

6.3　抽出

水冷後，1 %(W/V)塩化ナトリウム溶液 20 ml を加えた後，24 ppmBHT 含有ヘキサン-酢酸エチル混液(9:1 V/V) 14 ml を加える。5 分間振とうし，2-プロパノール 2 ml を加え，遠心分離後，上層を 100 ml 容褐色ナス形フラスコに移す。水層を 24 ppm BHT 含有ヘキサン-酢酸エチル混液(9:1 V/V) 14 ml で更に 2 回，同様に抽出する（但し，3 回目の抽出時に加える 2-プロパノールは 1 ml とする）。合わせた抽出液を 40℃で減圧濃縮する。

6.4　希釈定容

エタノールで，レチノールが約 3～3000 ng/ml となるように希釈定容し，試験溶液とする。

7．測定

シリンジフィルターでろ過した試験溶液及び標準溶液S0,S2,S3,S4 各20 μlを高速液体クロマトグラフに注入する。

高速液体クロマトグラフ操作条件例

カ ラ ム　：Cosmosil C 18　Econopak，φ4.6 mm×150 mm（ナカライテスク製）

移 動 相 :メタノール及び水の混液（88:12 V/V）

測定波長：325 nm

流　　量 :1.0 ml/min

温　　度：40 ℃

注 入 量：20 μl

8．計算方法

試料中レチノール含量（μg/100g）＝ C × V × N × 100 / W / 1000

C：検量線から求めた試験溶液中のレチノール濃度（ng／ml）

V：定容量（ ml ）

N：希釈率

W：試料採取量（ g ）

検出限界：3 μg/100g

以　上

別紙３－８

宇宙日本食認証に係るα-,β-カロテン定量の操作手順（1）

2006年11月

1．概要

申請食品のビタミンAに係るα-カロテン，β-カロテンの定量は，「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について」（平成 11 年 4 月 26 日 衛新第 13 号，Analytical Methods for Nutrition Labeling in Japan）に準拠する。すなわち，ピロガロール存在下のアルカリ性で試料を加熱けん化した後，不けん化物を有機溶剤で抽出し，高速液体クロマトグラフ法で定量する方法である。

2．器具及び装置

水浴（70℃）
振とう機
減圧濃縮器（エバポレーター）
遠心分離機
化学天びん
超音波発生器
60ml 容共栓付褐色遠心管
100ml 容白色ナス型フラスコ
褐色メスフラスコ（10～100ml）
ホールピペット（1～20ml）
高速液体クロマトグラフ：紫外可視分光光度計付き
高速液体クロマトグラフ用カラム:逆相分配型,内径 2.0～4.6mm ,長さ 150mm～250mm

3．試薬及び試液

3.1 試薬

α-カロテン標準品：α-Carotene；高速液体クロマトグラフ用（和光純薬工業株式会社製）
β-カロテン標準品：β-Carotene；高速液体クロマトグラフ用（和光純薬工業株式会社製）
dl-α-Tocopherol（特級，関東化学株式会社製）
クロロホルム（残留農薬試験用）
エタノール（特級）（残留農薬試験用）
塩化ナトリウム（特級）
ピロガロール（特級）
水酸化カリウム（特級）
2,6-ジ-t-ブチル-4-メチルフェノール（ブチルヒドロキシトルエン，以下 BHT と略記）（特級）

ヘキサン（残留農薬試験用）
酢酸エチル（残留農薬試験用）
アセトン （残留農薬試験用）
トルエン（特級）
アルミナ（Merck 社製）Aluminium oxide 60

3.2 試液

・水酸化カリウム溶液：粒状水酸化カリウム（特級） 60g を冷却しながらイオン交換水を加えて溶解し 100ml 容のメスフラスコで定容する。

・ 50ppm dl-α-トコフェロール含有エタノール：エタノール(残留農薬試験用) 1000ml に dl-α-Tocopherol 50mg を溶解したもの。

・ アルミナヘキサン：ヘキサンをアルミナカラムに通し，過酸化物質を除去したもの。（以下「ヘキサン」と略記）

＊ アルミナの交換時期は 1 ヶ月とし，交換後 1 回目のヘキサンは 2 回アルミナに通す。

・ 240ppm BHT 含有酢酸エチル：酢酸エチル（残留農薬試験用）1000ml に BHT 0.24g を溶解したもの。

・ 24ppm BHT 含有ヘキサン-酢酸エチル混液：ヘキサン 900ml に対し 240ppm BHT 含有酢酸エチルを 100ml を混合したもの。（ヘキサン-酢酸エチル混液での抽出液 42ml 中に BHT を 1mg 含む）

・ 50ppm *dl*-α-トコフェロール含有 HAET ：ヘキサン，アセトン，エタノール及びトルエンを 10:7:6:7(V/V/V/V)の割合で混合した混液(以下 HAET という)500ml に *dl*-α- Tocopherol 25mg を溶かしたもの。

・ 50ppm *dl*-α-トコフェロール含有 40%HAET-エタノール ：HAET400ml 及びエタノール 600ml の混液に *dl*-α-Tocopherol 25mg を溶かしたもの。

＊ dl-α-Tocopherol や BHT を抽出溶媒に添加する理由はカロテンなどの酸化防止のためである。

4．試験方法

4.1 試料調製及び試料採取

検体全量をミルで粉砕して均一化した試料を 60ml 容共栓付褐色遠心管に精密に量り取りピロガロール 0.3g 及び 1%（W/V）塩化ナトリウム溶液 0～3ml（試料の状態による）を加え，50ppm dl-α-トコフェロール含有エタノール 10ml を加える。

ただし，前抽出の必要がある試料(野菜など)はエタノール，又は 40%HAET-エタノール溶液により前抽出(「宇宙日本食認証に係るα-，β-カロテン定量の操作手順(2) - HAET 混液前抽出法の手順 -」参照）後，抽出液 10ml を 60ml 容共栓付褐色遠心管に分取する。

4.2　けん化

水酸化カリウム粒 1～3g 及び水酸化カリウム溶液 1ml（前抽出があり，カロテン以外の色素が含まれる試料に対しては水酸化カリウム粒 1～2g 及び水酸化カリウム溶液 2ml）を加え，70℃水浴中でガラス棒で 5 分に 1 回程度かき混ぜながら 30 分間加熱する。

4.3　抽出

水冷後，1%(W/V)塩化ナトリウム溶液 19～22ml を加えた後， 24ppmBHT 含有ヘキサン-酢酸エチル混液(9:1 V/V) 14ml を加える。 5 分間振とうし，2-プロパノール 2ml を加え遠心分離 (1500 rpm, 5 分間)後，上層を 100ml 容白色ナス形フラスコに移す。水層を 24ppmBHT 含有ヘキサン-酢酸エチル混液(9:1 V/V) 14ml で更に 2 回，同様に抽出する（但し，3 回目の抽出時に加える 2-プロパノールは 1ml とする）。合わせた抽出液を約 40℃で減圧濃縮する。

注！　減圧濃縮時に完全に乾固させてしまうと分解し易くなるのでエバポレーターで乾固させない様にし，最後は窒素ガスを吹き付けて乾固させるようにする。

4.4　希釈定容

4.3 の残留物にエタノール又は 50ppm *dl*-α-トコ フェロール及び 0.1% BHT 含有 40%HAET-エタノールを加えα-カロテンは 0.01 μg/ml～4 μg/ml，

β-カロテンは 0.01μg/ml～8 μg/ml の範囲内になるように適宜希釈定容する。

＊ 含量が高く 50ml 容褐色メスフラスコ以上で定容する場合は残留物にエタノールよりもカロテンの溶解度の高いクロロホルム 5ml を加え，超音波処理をしてから，メスフラスコに移しエタノールで定容する。

5．測定

超音波処理後，シリンジフィルターでろ過した試験溶液を高速液体クロマトグラフに注入し，得られたα-及びβ-カロテンのピーク面積と，あらかじめ「宇宙日本食認証に係るα-，β-カロテン定量の操作手順 (3) - 標準溶液の調製手順 -」で調製されたα-及びβ-カロテン標準溶液を高速液体クロマトグラフに注入し，得られらピーク面積より作成した検量線から試料中のα-及びβ-カロテン含量を求める。

高速液体クロマトグラフ操作条件(例)

カ ラ ム: L-column ODS, 4.6mm×150mm, または 4.6mm×250mm

(財)化学物質評価研究機構

移 動 相: アセトニトリル，メタノール及びテトラヒドロフランの混液
(55:40:5 V/V/V)
(0.1% 酢酸及び 50ppm *dl*-α-Tocopherol 含有)
流　　量: 1.5ml/min
測定波長: 455nm
温　　度: 40℃
注 入 量: 20μl

6．計算

試料中のα-又はβ-カロテン含量(μg/100g)
= C × V × N × 100 / W

C:検量線から求めた試験溶液中の
α-又はβ-カロテン濃度(μg/ml)
V:定容量(ml)
N:希釈率
W:試料採取量(g)

＊　β-カロテンのシス体は，トランス体に含めて計算する。

7．検出限界

α-及び β-カロテンそれぞれについて　　6 μg/100g（下記「8．検出限界の設定」を参照)

注!　α-及びβ-カロテンの間で極端に濃度が違う場合は，含量の高い方の値の1/100を検出限界の目安とする。
たとえば，β-カロテンの濃度がα-カロテン濃度に比して大きい場合のα-カロテンの検出限界の目安は，下記のようになる。

β-カロテンの濃度	α-カロテンの検出限界
6～999 μg/100g	6 μg/100g
1000～4990 g/100g	10 μg/100g
5000～10000 μg/100g	50 μg/100g
10100～49900 μg/100g	100 μg/100g
50000～	500 μg/100g

8．検出限界の設定

試験溶液のα-カロテン含有量の測定下限濃度を標準溶液の0.01μg/mlとして6.の式より

0.01×1×10×100/2=5μg/100g

（試料 2g，定容 1ml　前抽出 100/10）　　検出限界 6μg/100g

試験溶液のβ-カロテン含有量の測定下限濃度を標準溶液の 0.01μg/ml として 6. の式より

0.01×1×10×100/2=5μg/100g

（試料 2g，定容 1ml　前抽出 100/10）　　検出限界 6μg/100g

以　上

別紙３－９

宇宙日本食認証に係るα-，β-カロテン定量の操作手順（2）

2006年11月

1．範囲（Scope）

本文書は宇宙日本食の宇宙日本食認証に係るα-，β-カロテン定量（HAET 混液前抽出）の操作手順に適用する微生物規格と検査手順を定めるものである。

2．適用する検体

植物由来の原料

3．器具及び装置

水浴（70℃）
振とう機
化学天びん
超音波発生器
100ml 容白色（または褐色）広口メスフラスコ
60 ml 容共栓付褐色遠沈管

4．試薬及び試液

4.1 試薬

dl-α-Tocopherol（特級，関東化学株式会社製，またはこれと同等のもの）
エタノール（特級）（残留農薬試験用）
ピロガロール（特級）
水酸化カリウム（特級）
2,6-ジ-t-ブチル-4-メチルフェノール（ブチルヒドロキシトルエン，以下 BHT と略記）（特級）
ヘキサン（残留農薬試験用）
アセトン （残留農薬試験用）
トルエン（特級）
アルミナ（Merck 社製）Aluminum oxide 60

4.2 試液

・50 ppm dl-α-トコフェロール含有エタノール：エタノール（残留農薬試験用）1000 ml に dl-α-Tocopherol 50mg を溶解したもの。
・アルミナ処理ヘキサン：ヘキサンをアルミナカラムに通し，過酸化物質を除去したもの（以下「ヘキサン」と略記）。アルミナの交換時期は 1 ヶ月とする。ただし、交換後 1 回目は 2 回のアルミナ処理が必要である。
・50 ppm dl-α-トコフェロール含有 HAET 混液:ヘキサン，アセトン，エタノール及び

トルエンを 10:7:6:7(V/V/V/V)の割合で混合した混液(以下, HAET 混液という)500 ml に dl-α-Tocopherol 25mg を溶解したもの。

・ 50 ppm dl-α-トコフェロール含有エタノール:エタノール 1L に dl-α-Tocopherol 50 mg を溶解したもの。

＊ カロテンの酸化防止のために dl-α-Tocopherol を添加。

5．抽出方法

5.1 HAET 混液振とう法（牧草法）：植物由来で細胞壁を含む検体

5.1.1 けん化抽出を必要とするもの

検体全量をミルで粉砕して均一化した試料を 100 ml 容広口メスフラスコに精密に量り取りピロガロール 3 g（必要があればイオン交換水 1～8 ml を加える。）及び 50 ppm dl-α-トコフェロール含有 HAET 混液 10 ml を加え，タッチミキサーを用いて試料を分散させる。さらに 50 ppm dl-α-トコフェロール含有 HAET 混液 30 ml を 3 回に分けて加えた後、50 ppm dl-α-トコフェロール含有エタノール 20 ml を 2 回に分けて加える。（試料が溶媒中に分散するようタッチミキサーを用いながら溶媒を加えていく。）その後、振とう機で 15 分間振とうし、50 ppm dl-α-トコフェロール含有エタノールで 100 ml に定容する。定容後、超音波発生器に 10 分間かけ、一晩暗所で静置し、試料中の色素が溶媒へ移行したことを確認する。この抽出液 10 ml または 20ml をホールピペットで 60 ml 容共栓付褐色遠沈管に分取する。以後，「宇宙日本食認証に係るα-，β-カロテン定量の操作手順（1）」の「4.2 けん化」以降の操作を行う。

5.1.2 けん化抽出不要のもの（高速液体クロマトグラフ法（以下「HPLC」と略記）

分析でカロテンのピークにキサントフィルのエステル類の妨害ピークの重なりがないもの）検体全量をミルで粉砕して均一化した試料を 100 ml 容広口メスフラスコに精密に量り取り（必要があればイオン交換水 1～8 ml を加える。）50 ppm dl-α-トコフェロール含有 HAET 混液 10 ml を加え，タッチミキサーを用いて試料を分散させる。さらに 50 ppm dl-α-トコフェロール含有 HAET 混液 30 ml を 3 回に分けて加えた後、50 ppm dl-α-トコフェロール含有エタノール 20 ml を 2 回に分けて加える。（試料が溶媒中に分散するようタッチミキサーを用いながら溶媒を加えていく。）その後、振とう機で 15 分間振とうし、50 ppm dl-α-トコフェロール含有エタノールで 100 ml に定容する。定容後、超音波発生器に 10 分間かけ、試料中の色素が溶媒へ移行したことを確認する。試料中の色素が完全に溶媒へ移行していない場合は，一晩暗所で静置した後、試料中の色素が溶媒へ移行したことを確認する。以後，「宇宙日本食認証に係るα-，β-カロテン定量の操作手順（1）」の「 5. 測定」以降の操作を行う。

6 HAET 混液超音波抽出法（人参法）：溶媒のみで抽出できるもの

6.1 けん化抽出を必要とするもの

検体全量をミルで粉砕して均一化した試料を 100 ml 容広口メスフラスコに精密に量り取りピロガロール 3 g（必要があればイオン交換水 1～8 ml を加える。）及び 50 ppm dl-α-トコフェロール含有 HAET 混液 10 ml を加え，タッチミキサーを用いて試料を分散させる。さらに 50 ppm dl-α-トコフェロール含有 HAET 混液 30 ml を 3 回に分けて加えた後、50 ppm dl-α-トコフェロール含有エタノールを少量ずつ加え，（試料が溶媒中に分散するようタッチミキサーを用いながら溶媒を加えていく。）50 ppm dl-α-トコフェロール含有エタノールで 100 ml に定容する。定容後、超音波発生器に 10 分間かけ、一晩暗所で静置し、試料中の色素が溶媒へ移行したことを確認する。この抽出液 10 ml または 20ml をホールピペットで 60 ml 容共栓付褐色遠沈管に分取する。以後，「宇宙日本食認証に係るα-，β-カロテン定量の操作手順（１）」の「4.2 けん化」以降の操作を行う。

6.2 けん化抽出不要のもの（HPLC 分析でカロテンのピークにキサントフィルのエステル類の妨害ピークの重なりのないもの）

検体全量をミルで粉砕して均一化した試料を 100 ml 容広口メスフラスコに精密に量り取り（必要があればイオン交換水 1～8 ml を加える。）50 ppm dl-α-トコフェロール含有 HAET 混液 10 ml を加え，タッチミキサーを用いて試料を分散させる。さらに 50 ppm dl-α-トコフェロール含有 HAET 混液 30 ml を 3 回に分けて加えた後、50 ppm dl-α-トコフェロール含有エタノールを少量ずつ加え，（試料が溶媒中に分散するようタッチミキサーを用いながら溶媒を加えていく。）50 ppm dl-α-トコフェロール含有エタノールで 100 ml に定容する。定容後、超音波発生器に 10 分間かけ、試料中の色素が溶媒へ移行したことを確認する。試料中の色素が完全に溶媒へ移行していない場合は，一晩暗所で静置し、試料中の色素が溶媒へ移行したことを確認する。以後，「宇宙日本食認証に係るα-，β-カロテン定量の操作手順（１）」の「 5. 測定」以降の操作を行う。

以　上

別紙３－１０

宇宙日本食認証に係るα-，β-カロテン定量の操作手順（3）

2006年11月

1．範囲（Scope）

本文書は宇宙日本食の宇宙日本食認証に係るα-，β-カロテン定量（標準溶液の調製）の操作手順に適用する微生物規格と検査手順を定めるものである。

2．器具及び装置

化学天びん
薬さじ
漏斗
ピンセット
ビーカー
超音波発生器
白色メスフラスコ(100 ml)
褐色メスフラスコ(20 ～100 ml)
ホールピペット(2 ～25 ml)
分光光度計:紫外部及び可視部の吸収が測定可能なもの
高速液体クロマトグラフ:紫外可視分光光度計付き
高速液体クロマトグラフ用カラム:逆相分配型，内径 4.6 mm，長さ 150 mm
(例:L-column ODS)

3．試薬及び試液

3.1 試薬

α-Carotene(高速液体クロマトグラフ用) 和光純薬工業(株)社製，またはこれと同等のもの

β-Carotene(高速液体クロマトグラフ用) 和光純薬工業(株)社製，またはこれと同等のもの

dl-α-Tocopherol(試薬特級) 関東化学
ブチルヒドロキシトルエン(試薬特級)
石油エーテル(残留農薬試験用)
エタノール(残留農薬試験用)
シクロヘキサン(試薬特級)

3.2 試液

0.1％BHT 含有エタノール:エタノール 1000 ml にブチルヒドロキシトルエン(以下 BHT とする)1g を溶かしたもの。

0.1% BHT 含有シクロヘキサン:シクロヘキサン 500ml に BHT 0.5g を溶かしたもの。

50 ppm *dl*-α-トコフェロール及び0.1% BHT含有石油エーテル:石油エーテル500 mlに *dl*-α-Tocopherol 25 mg及びBHT 0.5 gを溶かしたもの。

50ppm *dl*-α-トコフェロール及び0.1%BHT含有エタノール:エタノール1000mlに *dl*-α-Tocopherol 50mg及びBHT 1gを溶かしたもの。

4．調製方法

4.1　α-カロテン標準原液の調製

α-カロテン標準品容器の内容物を，ビーカー，ピンセット，超音波発生器を用いて0.1 % BHT含有石油エーテルで100 ml容白色メスフラスコに洗い込む。0.1 % BHT含有石油エーテルで定容し，α-カロテン標準原液とする。

ホールピペットと褐色メスフラスコを用い，標準原液を石油エーテルで，444 nmにおける吸光度が約0.2～0.7になるように正確に希釈したものを希釈溶液①とする。

同様に，ホールピペットと褐色メスフラスコを用い，標準原液を石油エーテルで，希釈溶液①の2分の1の濃度になるように希釈したものを希釈溶液②とする。

4.2　α-カロテン標準溶液の調製

ホールピペットと褐色メスフラスコを用い，50 ppm *dl*-α-トコフェロール及び0.1 % BHT 含有エタノールで標準原液を希釈しα-カロテン標準溶液を調製する。希釈率は以下のとおりである。

標準溶液(1)…S_3:標準原液を分取し，約4 μg/ml(4 μg/mlを超えない)になるように希釈。

標準溶液(2)…S_2:標準溶液(1)を分取し，標準溶液(1)の2分の1の濃度になるように希釈。

標準溶液(3)…S_1:標準溶液(2)を分取し，標準溶液(2)の10分の1の濃度になるように希釈。

標準溶液(4)…S_0:標準溶液(3)を分取し，標準溶液(3)の5分の1の濃度になるように希釈。

4.3　β-カロテン標準原液の調製

β-カロテン標準品容器の内容物を，ビーカー，ピンセット，超音波発生器を用いて0.1% BHT含有シクロヘキサンで100ml容白色メスフラスコに洗いこむ。0.1% BHT含有シクロヘキサンで定容し，β-カロテン標準原液とする。

ホールピペットと褐色メスフラスコを用い，標準原液をシクロヘキサンで，455 nmにおける吸光度が約0.2～0.7になるように正確に希釈したものを希釈溶液③とする。

同様に，ホールピペットと褐色メスフラスコを用い，標準原液をシクロヘキサンで，希釈溶液③の2分の1の濃度になるように希釈したものを希釈溶液④とする。

4.4　β-カロテン標準溶液の調製

ホールピペットと褐色メスフラスコを用い，50ppm *dl*-α-トコフェロール及び 0.1% BHT 含有エタノールで標準原液を希釈しβ-カロテン標準溶液を調製する。希釈率は以下のとおりである。

標準溶液(5)…S_4:標準原液を分取し，約 8μg/ml(8μg/ml を超えない)になるように希釈。

標準溶液(6)…S_3:標準原液を分取し，標準溶液(5)の約 2 分の 1 の濃度になるように希釈。

標準溶液(7)…S_2:標準溶液(2)を分取し，標準溶液(6)の 10 分の 1 の濃度になるように希釈。

標準溶液(8)…S_1:標準溶液(3)を分取し，標準溶液(7)の 10 分の 1 の濃度になるように希釈。

標準溶液(9)…S_0:標準溶液(4)を分取し，標準溶液(8)の 5 分の 1 の濃度になるように希釈。

5．標準原液濃度の測定

α-カロテン標準原液の場合には石油エーテルを，β-カロテン標準原液の場合にはシクロヘキサンを対照にして，希釈溶液①，②の 444 nm における吸光度，あるいは希釈溶液③，④の 455nm における吸光度を測定し，それぞれα-カロテン標準原液及びβ-カロテン標準原液の濃度を求める。

α-カロテン標準原液濃度(μg/ml)= A_1 / 2800 × 10000 × N

β-カロテン標準原液濃度(μg/ml)= A_2 / 2450 × 10000 × N

希釈溶液①及び②の平均よりα-カロテン標準原液濃度を，希釈溶液③及び④の平均よりβ-カロテン標準原液濃度をそれぞれ算出する。また，希釈溶液①及び②の濃度のばらつきが，あるいは希釈溶液③及び④の濃度のばらつきが 1 %を超えた場合には再希釈する。

A_1:希釈溶液①及び②の石油エーテルを対照にした 444 nm における吸光度

A_2:希釈溶液③及び④のシクロヘキサンを対照にした 455nm における吸光度

N :標準原液からの希釈率

6．標準溶液濃度の検定

6.1　α-カロテン標準溶液の検定

調製した標準溶液(1)～(4)を高速液体クロマトグラフに注入し，得られたクロマトグ

ラムの面積値より検量線を作成する。
現行の標準溶液(2):S_2を高速液体クロマトグラフに注入し，今回作成された検量線より現行の標準溶液(2):S_2の濃度を求める。

検定値(%) = C_1 / C_2 × 100

C_1:現行の標準溶液(2):S_2の濃度

C_2:検量線より求めた現行の標準溶液(2):S_2の濃度

6.2 β-カロテン標準溶液の検定

調製した標準溶液(5)～(9)を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の面積値より検量線を作成する。

現行の標準溶液(6):S_3を高速液体クロマトグラフに注入し，作成した検量線より現行の標準溶液(6):S_3の濃度を求める。

検定値(%) = C_3 / C_4 × 100

C_3:現行の標準溶液(6):S_3の濃度

C_4:検量線より求めた現行の標準溶液(6):S_3の濃度

〈高速液体クロマトグラフ操作条件例〉

カ ラ ム:L-column ODS, φ4.6 mm×150 mm または 250 mm, (財)化学物質評価研究機構

カラム温度:40 ℃または 50 ℃

移 動 相:アセトニトリル，メタノール及びテトラヒドロフランの混液
(55:40:5 V/V/V)(0.1 % 酢酸及び 50 ppm *dl*-α-Tocopherol 含有)

流 速:1.5 ml/min

波 長:455 nm

注 入 量:10～20 μl

6.3 判定

作成された検量線の相関係数が 1～0.999 の範囲にあり，検定値が 97～103 %の範囲にあれば検定合格とする。

7．保存

α-カロテン標準原液は冷凍で保存し，使用期限は調製後 3 ヶ月とする。

α-カロテン標準溶液は冷蔵で保存し，使用期限は調製後 3 ヶ月とする。

β-カロテン標準原液は冷凍で保存し，使用期限は調製後 2 ヶ月とする。

β-カロテン標準溶液は冷蔵で保存し，使用期限は調製後２ヶ月とする。

希釈溶液は，検定終了後廃棄する。

８．注解

通常分析には，α-カロテンでは標準溶液(2)：S_2，標準溶液(3)：S_1 及び標準溶液(4)：S_0 を，β-カロテンでは標準溶液(5)：S_4，標準溶液(6)：S_3，標準溶液(7)：S_2，標準溶液(9)：S_0 を使用する。

検量線の直線性が確認されれば，標準溶液(2)：S_2 のみ，あるいは標準溶液(6)：S_3 のみの１点検量線とし，定量計算を行なう。

標準原液及び標準溶液を調製する際に，*dl*-α-トコフェロールまたは BHT を溶媒に添加する理由は酸化を防止し劣化を防ぐためである。

標準品が溶解したことを確認するために，標準原液の調製，保存には白色のメスフラスコを用いる。

以　上

別紙３－１１

宇宙日本食認証に係るビタミンD定量の操作手順

2006年11月

1．概要

申請食品のビタミンDの定量は，「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について」（平成11年4月26日 衛新第13号，Analytical Methods for Nutrition Labeling in Japan）に準拠する。すなわち，ピロガロール存在下のアルカリ性で試料を加熱けん化した後，不けん化物を有機溶剤で抽出し，高速液体クロマトグラフ法で定量する方法である。

2．機器及び器具

ミル
化学天びん
汎用天びん
フラクションコレクター
マイクロピペット
振とう器
エバポレーター
湯浴
遠心分離機
遠心管（60 ml 容）
マイクロ精秤ロート
ドライサーモユニット
ナス形フラスコ（100 ml 容）
10 ml 容共栓付き試験管
高速液体クロマトグラフ(紫外分光光度計付)　分取用と定量用の各 1 台
高速液体クロマトグラフ用カラム：順相型
（例）　分析用： YMC-Pack SIL A-003　φ4.6 mm×25 cm
[株式会社 ワイエムシィ]
分取用： LICHROSORB Si60-5　φ4.6 mm×25 cm ［株式会社 ケムコ］
高速液体クロマトグラフ用カラム：逆相型
（例）　分析用： YMC-Pack ODS-AL　φ4.6 mm×25 cm ［株式会社 ワイエムシィ］
分取用： TSKgel ODS-120A　φ4.6 mm×25 cm ［東ソー株式会社］

3．試薬及び試液

3.1　試薬

イソプロピルアルコール(試薬特級)

エタノール(試薬特級)

塩化ナトリウム(試薬特級)

ピロガロール(試薬特級)

ブチルヒドロキシトルエン(BHT)（試薬特級)

水酸化カリウム(試薬特級)

アセトニトリル(残留農薬試験用)

エタノール(残留農薬試験用)

酢酸エチル(残留農薬試験用)

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)

メタノール(残留農薬試験用)

ヘキサン(HPLC 用)

アルミナ(Merck 社, Aluminium oxide 60)

α－トコフェロール(関東化学 鹿特級)

エトキシキン(東京化成工業)

3.2　試液

アルミナ処理ヘキサン

ヘキサン(残留農薬試験用)をアルミナを充填したカラム(φ4.0 cm×20 cm)を通過させ，過酸化物を除去したもの。(以下「ヘキサン」と略記)

1 %(W/V)エトキシキン,0.5 %(W/V) α－トコフェロール含有ヘキサン溶液

エトキシキン 1 g と α－トコフェロール 0.5 g にヘキサン 100 ml を加え溶解混合する。（使用期限は室温で２ヶ月とする。）

0.01 %(W/V)エトキシキン,0.005 %(W/V) α－トコフェロール及び 3 %(W/V)ピロガロール含有エタノール溶液

ピロガロール 3 g にエタノール 100 ml を加え溶解混合し,1 %(W/V)エトキシキン,0.5 %(W/V) α－トコフェロール含有ヘキサン溶液を 1 ml 添加する。

（使用期限は室温で 1 週間とする。）

60 %(W/V)水酸化カリウム溶液

水酸化カリウム 60 g を冷却しながらイオン交換水を加えて溶解し，100ml に定容する。

0.2 % BHT 含有ヘキサン溶液

BHT 100 mg にヘキサン 50 ml を加え溶解混合する。

8 % BHT 含有アセトニトリル溶液

BHT 4 g にアセトニトリル 50 ml を加え溶解混合する。

ヘキサン及び酢酸エチルの混液（9：1 V/V）

ヘキサン 900 ml に対し酢酸エチル 100 ml を混合する。

1 % エトキシキン含有ヘキサン溶液

エトキシキン 1 g にヘキサン(HPLC 用) 100 ml を加え溶解混合する。

0.004 % BHT 含有アセトニトリル及びメタノールの混液（9:1 V/V）

BHT 0.04 g にアセトニトリル 900 ml 及びメタノール 100 ml を加え溶解混合する。

0.002 %エトキシキン含有ヘキサン及びイソプロピルアルコールの混液(99:1 V/V)

ヘキサン(HPLC 用)990 ml にイソプロピルアルコール 10 ml を加え混合し，1 % エトキシキン含有ヘキサン溶液を 2 ml 添加する。

ヘキサン及びイソプロピルアルコールの混液（99.6:0.4 V/V）

ヘキサン(HPLC 用)996 ml にイソプロピルアルコール 4 ml を加え混合する。

アセトニトリル及び水の混液（9:1 V/V）

アセトニトリル 900 ml と蒸留水 100 ml を混合する。

アセトニトリル及び水の混液（89:11 V/V）

アセトニトリル 890 ml と蒸留水 110 ml を混合する。

4．標準品

ビタミンD_2標準品：エルゴカルシフェロール（国立医薬品食品衛生研究所）

ビタミンD_3標準品：コレカルシフェロール（国立医薬品食品衛生研究所）

4.1 標準原液の調製

1) ビタミンD_2標準原液

ビタミンD_2標準品 25 mg をマイクロ精秤ロートに精密に量りとり，100 ml 容褐色メスフラスコにヘキサンを用いてあけ込み，定容し標準原液とする。

（使用期限は冷凍保存下で調製後 1 年とする。）

2) ビタミンD_3標準原液

ビタミンD_3標準品 25 mg をマイクロ精秤ロートに精密に量りとり，100 ml 容褐色メスフラスコにヘキサンを用いてあけ込み，定容し標準原液とする。

（使用期限は冷凍保存下で調製後 1 年とする。）

4.2 標準溶液の調製

1) ビタミンD_2標準溶液［条件 1］

ビタミンD_2標準原液 2 ml を分注し，抗酸化剤として 0.2 % BHT 含有ヘキサン溶液を 1 ml 添加した後，ヘキサンを用いて 200 ml に定容し，標準溶液(2.5 μg/ml)とする。この標準溶液(2.5 μg/ml)の 20 ml を分注し，抗酸化剤として 0.2 % BHT 含有ヘキサン溶液を 1 ml 添加した後，ヘキサンを用いて 200 ml に定容したものを標準溶液(0.25 μg/ml)とする。

(使用期限は冷凍保存下で調製後 1 ヶ月とする。)

2) ビタミンD_3標準溶液 [条件 1]

ビタミンD_3標準原液 2 ml を分注し，抗酸化剤として 0.2 % BHT 含有ヘキサン溶液を 1 ml 添加した後，ヘキサンを用いて 200 ml に定容し，標準溶液(2.5 μg/ml)とする。この標準溶液(2.5 μg/ml)の 20 ml を分注し，抗酸化剤として 0.2 % BHT 含有ヘキサン溶液を 1 ml 添加した後，ヘキサンを用いて 200 ml に定容したものを標準溶液(0.25 μg/ml)とする。

(使用期限は冷凍保存下で調製後 1 ヶ月とする。)

3) ビタミンD_2及びビタミンD_3混合標準溶液 [条件 2]

ビタミンD_2標準原液及びビタミンD_3標準原液を 2 ml 分注し，窒素ガスで溶媒を完全に除去した後，抗酸化剤として 8 % BHT 含有アセトニトリル溶液を 1 ml 添加した後，アセトニトリルを用いて 200 ml に定容し，標準溶液(ビタミンD_2及びビタミンD_3各 2.5 μg/ml)とする。この標準溶液(ビタミンD_2及びビタミンD_3各 2.5 μg/ml)の 20 ml を分注し，抗酸化剤として 8 % BHT 含有アセトニトリル溶液を 1 ml 添加した後，アセトニトリルを用いて 200 ml に定容したものを標準溶液(ビタミンD_2及びビタミンD_3各 0.25 μg/ml)とする。(使用期限は冷凍保存下で調製後 1 ヶ月とする。)

4.3 検出限界確認用標準溶液の調製

1) ビタミンD_2検出限界確認用標準溶液 [条件 1]

4.2 1)のビタミンD_2標準溶液(0.25 μg/ml) 2 ml を分注し，抗酸化剤として 0.2 % BHT 含有ヘキサン溶液を 1 ml 添加した後，ヘキサンを用いて 200 ml に定容する(0.0025 μg/ml)。使用期限は冷凍保存下で調製後 1 ヶ月とする。

2) ビタミンD_3検出限界確認用標準溶液 [条件 1]

4.2 2)のビタミンD_3標準溶液(0.25 μg/ml) 2 ml を分注し，抗酸化剤として 0.2 % BHT 含有ヘキサン溶液を 1 ml 添加した後，ヘキサンを用いて 200 ml に定容する(0.0025 μg/ml)。使用期限は冷凍保存下で調製後 1 ヶ月とする。

3) ビタミンD_2及びビタミンD_3混合検出限界確認用標準溶液 [条件 2]

4.2 3)のビタミンD_2及びビタミンD_3混合標準溶液(各 0.25 μg/ml) 2 ml を分注し，抗酸化剤として 8 % BHT 含有アセトニトリル溶液を 1 ml 添加した後，アセトニトリルを用いて 200 ml に定容する(各 0.0025 μg/ml)。使用期限は冷凍保存下

で調製後1ヶ月とする。

4.4　標準原液の検定

ビタミンD_2標準原液及びビタミンD_3標準原液 4 ml をそれぞれ 100 ml 容褐色メスフラスコに分注する。窒素ガスで溶媒を完全に除去した後，残留農薬試験用エタノールを用いて定容する。この液の 265 nm の吸光度（A_1）と 230 nm の吸光度（A_2）を測定し，A_2/A_1が 0.65 以下であること及びA_1がビタミンD_2で 0.460～0.485，ビタミンD_3で 0.470～0.490 にあることを確認する。

4.5　標準溶液の検定

4.2 で調製した 0.25 μg/ml 及び 2.5 μg/ml の標準溶液を以下の HPLC 条件下で 100 μl 注入し，新旧の比率が 0.97～1.03 であれば使用可とする。

① ビタミンD_2標準溶液及びビタミンD_3標準溶液

カ ラ ム：YMC-Pack SIL A-003　φ4.6 mm×25 cm ［株式会社 ワイエムシィ］
移 動 相：ヘキサン及びイソプロピルアルコールの混液（99.6:0.4 V/V）
測定波長：265 nm
流　　量：1.5 ml/min
温　　度：15℃

② ビタミンD_2及びビタミンD_3混合標準溶液

カ ラ ム：YMC-Pack ODS-AL φ4.6 mm×25 cm ［株式会社 ワイエムシィ］
移 動 相：アセトニトリル及び水の混液（89:11 V/V）又は（9:1 V/V）
測定波長：265 nm
流　　量：1.5 ml/min
温　　度：50℃

5．検体の調製

検体全量をミルで粉砕し均質化する。

6．試験方法

6.1　試料採取

均質化した試料0.25～10 gを遠心管に精密に量りとり，1 %(W/V)塩化ナトリウム溶液 0～7.5 ml及び0.01 %(W/V)エトキシキン，0.005 %(W/V) α－トコフェロール及び3 %(W/V)ピロガロール含有エタノール溶液10 mlを加える。

6.2　けん化

次に60 % (W/V)水酸化カリウム溶液 2 mlと水酸化カリウム粒 3 gを加え，70℃の湯浴中でガラス棒でときどきかき混ぜながら 60分間加熱する。

6.3　抽出

水冷後，1 % (W/V)塩化ナトリウム溶液を合計で22 mlになるように加えてガラス棒を洗い込む。ヘキサン及び酢酸エチルの混液 (9:1 V/V) 15 mlを加え，5分間振とうする。遠心分離 (1500rpm，5分間) 後，抽出液 (上層) をナス形フラスコに移す。下層を，ヘキサン及び酢酸エチルの混液 (9:1 V/V) 15 mlで更に2回，同様に抽出する。抽出液を合わせ，エバポレーターを用いて減圧濃縮する。残留物をジエチルエーテルに溶解し，10 ml容共栓付き試験管に移した後，窒素気流下で溶媒を留去する。残留物を一定量 (0.5 ml～5 ml，V ml) のイソプロピルアルコール[条件 1]またはヘキサン[条件 2] に溶解し，分取用試験溶液とする。

同時に標準溶液(0.25μg/ml) 2 mlを量りとり，6.2～6.3のけん化，抽出，濃縮の処理を行い，イソプロピルアルコール[条件 1]またはヘキサン[条件 2]1 mlに溶解し，分取用標準溶液とする。

6.4　分取

[条件 1]

逆相型カラムを付けた高速液体クロマトグラフにフラクションコレクターを接続する。以下の条件で操作し，あらかじめビタミンD_2及びビタミンD_3混合標準溶液を注入し，保持時間を確認しておく。次に6.3で得られた分取用試験溶液及び分取用標準溶液 150 μlをそれぞれ以下の条件 (例) の分取用高速液体クロマトグラフに注入し，ビタミンDを含む画分[ビタミンD_3の保持時間の 2.6分前より 4.6分間(例)]を分取する。分取により得られた画分を，窒素気流下で溶媒を留去した後，残留物をマイクロピペットを用いてヘキサン (HPLC用) 200 μlに溶解し，定量用試験溶液及

び定量用標準溶液とする。

分取用高速液体クロマトグラフ操作条件（例）

カ ラ ム：TSKgel ODS-120A　φ4.6 mm×25 cm　[東ソー株式会社]

移 動 相：0.004 % BHT 含有アセトニトリル及びメタノールの混液（9:1 V/V）

測定波長：265 nm

流　　量：1.5 ml/min

温　　度：35℃

[条件 2]

順相型カラムを付けた高速液体クロマトグラフにフラクションコレクターを接続する。以下の条件で操作し，あらかじめビタミンD_3標準溶液を注入し，保持時間を確認しておく。次に 6.3 で得られた分取用試験溶液及び分取用標準溶液 150 μl をそれぞれ以下の条件の分取用高速液体クロマトグラフに注入し，ビタミンDを含む画分（ビタミンD_3の保持時間の 0.6 分前より 2.5 分間(例)）を分取する。窒素気流下で溶媒を留去した後，残留物をマイクロピペットを用いてアセトニトリル 200 μl に溶解し，定量用試験溶液及び定量用標準溶液とする。

分取用高速液体クロマトグラフ操作条件（例）

カ ラ ム：LICHROSORB Si60-5　φ4.6 mm×25 cm　[株式会社 ケムコ]

移 動 相：0.002 %エトキシキン含有ヘキサン及びイソプロピルアルコールの混液（99:1 V/V）

測定波長：265 nm

流　　量：1.5 ml/min

温　　度：40℃

6.5　定量

[条件 1]

順相型カラムを付けた高速液体クロマトグラフを以下の条件（例）で操作し，定量用試験溶液及び定量用標準溶液 100 μl を注入する。定量用標準溶液 100 μl を注入して得られた検量線より，試料中のビタミンD含量を求める。

高速液体クロマトグラフ操作条件（例）

カ ラ ム：YMC-Pack SIL A-003　φ4.6 mm×25 cm　[株式会社 ワイエムシィ]

移 動 相：ヘキサン及びイソプロピルアルコールの混液（99.6:0.4 V/V）

測定波長：265 nm

流　　量：1.5 ml/min
温　　度：15℃

［条件 2］

逆相型カラムを付けた高速液体クロマトグラフを以下の条件で操作し，定量用試験溶液及び定量用標準溶液 100 μl を注入する。定量用標準溶液 100 μl を注入して得られた検量線から，試料中のビタミンD含量を求める。

高速液体クロマトグラフ操作条件（例）

カ ラ ム：YMC-Pack ODS-AL　φ4.6 mm×25 cm ［株式会社 ワイエムシィ］
移 動 相：アセトニトリル及び水の混液（89:11 V/V）又は（9:1 V/V）
測定波長：265 nm
流　　量：1.5 ml/min
温　　度：50℃

7．計算

4.2 の標準溶液（2.5 μg/ml 及び 0.25 μg/ml）それぞれ 100 μl を 6.5 の高速液体クロマトグラフに注入し，濃度とピーク高の間に直線性があること（$0.97 \leqq \mathbf{A \times 10 \div B} \leqq 1.03$）を確認した後，次式により試料中のビタミンD（$D_2$ または D_3）含量を算出する。

ただし，A：標準溶液（0.25μg/ml）のピーク高
　　B：標準溶液（2.5μg/ml）のピーク高

ビタミンD（D_2 または D_3）（μg/100g）$= \mathbf{d \times 200/100 \times V \times N/0.15 \times 100/W}$

d：検量線から求めた定量用試験溶液 100 μl 中のビタミンD（D_2 または D_3）含量（μg）
V：定容量（ml）
N：希釈率
W：試料採取量（g）

8．検出限界及び単位

検出限界は飲料は 0.1 μg/100g，その他は 0.7 μg/100g とする。
単位はμg/100g 及び IU/100g（国際単位）で報告する。（1 μg＝40 IU）

9．　注解

［条件 1］

不けん化物を逆相条件の高速液体クロマトグラフに注入し，ビタミンD画分を精製分取した後，順相条件の高速液体クロマトグラフに注入し，定量する。ただし本試験法では，ビタミンD_2とビタミンD_3はピーク分離不能であるため，ビタミンD_3の定量用標準溶液を用い，試料中のビタミンD含量（ビタミンD_3相当量）を求める。

［条件 2］

不けん化物を順相条件の高速液体クロマトグラフに注入し，ビタミンD画分を精製分取した後，逆相条件の高速液体クロマトグラフに注入し，定量する。

本試験法ではビタミンD_2とビタミンD_3の個別定量が可能である為、それぞれの合計値をビタミンD含量として算出する。

＊　ビタミンD_2とビタミンD_3が共存する検体に関しては，［条件 1］での定量は不能な為，［条件 2］によりビタミンD含量を求める。

以　上

別紙３－１２

宇宙日本食認証に係るビタミンＥ定量の操作手順

2006年11月

１．概要

申請食品のビタミンEの定量は，「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について」（平成 11 年 4 月 26 日 衛新第 13 号，Analytical Methods for Nutrition Labeling in Japan）に準拠する。すなわち，ピロガロール存在下のアルカリ性で試料を加熱けん化した後，不けん化物を有機溶剤で抽出し，高速液体クロマトグラフ法で定量する方法である。

２．器具及び装置

ミル
60 ml 容遠沈管
薬さじ
ミクロスパーテル
気密保存びん
ガラス管
化学天秤
水浴（70 ℃）
エッペンドルフピペット
ガラス棒
駒込ピペット
振とう器
遠心分離機
100 ml 容褐色ナス型フラスコ
減圧濃縮器（ロータリーエバポレーター）
ホールピペット
褐色メスフラスコ
シリンジフィルター（非水系）
超音波発生器
高速液体クロマトグラフ(蛍光検出器付)
高速液体クロマトグラフ用カラム：順相型
（例）YMC-Pack SIL-06, 5μm, φ4.6 mm×25 cm [株式会社　ワイエムシィ]

3．試薬及び試液

3.1 試薬

ピロガロール(試薬特級)

塩化ナトリウム(試薬特級)

水酸化カリウム(試薬特級)

ヘキサン(残留農薬試験用)

酢酸エチル(残留農薬試験用)

2-プロパノール(試薬特級)

酢酸(試薬特級)

エタノール(試薬特級)

エタノール(残留農薬試験用)

メタノール(残留農薬試験用)

エトキシキン（東京化成工業)

アルミナ (MERCK 社製 Aluminium oxide 60)

3.2 試液

アルミナ処理ヘキサン

ヘキサンをアルミナカラムに通して不純物を取り除く。以下「ヘキサン」と略す。

3 %ピロガロール-エタノール溶液

エタノール 100 ml にピロガロール 3 g を加え溶解混合する。使用期限は 1 週間とする。

60 %水酸化カリウム溶液

水酸化カリウム 60 g を冷やしながら水(イオン交換水)を加えて溶かし，100 ml に定容する。

1 %塩化ナトリウム溶液

塩化ナトリウム 1 g を水(イオン交換水)に溶解し，100 ml とする。

0.01 % エトキシキン含有ヘキサン

ヘキサン 1 L にエトキシキン 0.1 g を加え溶解混合する。

ヘキサン-酢酸エチル混液(9:1 V/V)

ヘキサン 900 ml に酢酸エチル 100 ml を加え混合する。

ヘキサン，酢酸及び 2-プロパノールの混液 (1000:5:2 V/V/V)

ヘキサン 1 L に酢酸 5 ml 及び 2-プロパノール 2 ml を加える。

ヘキサン，2-プロパノール及び酢酸の混液(1000:6:5 V/V/V)

ヘキサン 1 L に 2-プロパノール 6 ml 及び酢酸 5 ml を加える。

4．標準品

α，β，γ及びδ-トコフェロール;

d-α，d-β，d-γ及びd-δ-トコフェロール[エーザイ株式会社]

4.1 操作

使用する100 ml容褐色ナス型フラスコ，褐色メスフラスコ，エバポレーター用トラップ球，気密保存びんを予めヘキサンで洗浄し，窒素気流下で乾燥させる。

4.2 標準原液の調製

100 ml容褐色メスフラスコにミクロスパーテルを用いて各トコフェロール約0.1 gをそれぞれ正確に秤量し，エタノール(残留農薬試験用)を加え超音波処理し溶解後，100 mlとし，標準原液とする。

4.3 混合原液の調製

4.2で調製された標準原液各20 mlを，ホールピペットを用いて**100 ml**容褐色メスフラスコに分取し，エタノールで100 mlに定容し，混合原液とする。

4.4 標準溶液の調製

ホールピペットとメスフラスコを用いて，混合原液から各トコフェロールにおいて0.1～100 μg/mlの範囲の標準溶液S_1，S_2，S_3及びS_4を調製する。

(例)

混合原液25 mlをホールピペットで100 ml容褐色ナス型フラスコに分取し，ロータリーエバポレーターを用いて減圧留去後，窒素気流下で溶媒を完全に留去する。これに0.01 %エトキシキン含有ヘキサン溶液を加え，超音波処理し溶解後50 ml容褐色メスフラスコに移して，定容し，標準溶液S_4とする。

標準溶液S_4 20 mlをホールピペットで100 ml容褐色メスフラスコに分取後，0.01 %エトキシキン含有ヘキサン溶液で定容し，標準溶液S_3とする。

標準溶液S_4 2 mlをホールピペットで100 ml容褐色メスフラスコに分取後，0.01 %エトキシキン含有ヘキサン溶液で定容し，標準溶液S_2とする。

標準溶液S_2 5 mlをホールピペットで100 ml容褐色メスフラスコに分取後，0.01 %エトキシキン含有ヘキサン溶液で定容し，標準溶液S_1とする。

4.5 検定

新たに調製した標準溶液と現行の標準溶液を以下の高速液体クロマトグラフに注入する。新たに調製した標準溶液で作成された検量線の相関係数が1～0.999の範囲にあり，新旧の標準溶液のピーク面積比が97 %～103 %の範囲にあれば検定合格とする。

高速液体クロマトグラフ操作条件(例)

カラム: **YMC-Pack SIL-06, 5μm**, φ4.6 mm×25 cm [株式会社 ワイエムシィ]

移動相: ヘキサン，酢酸及び2-プロパノールの混液 (1000:5:2 V/V/V)または，
ヘキサン，2-プロパノール及び酢酸の混液(1000:6:5 V/V/V)

流　速: 1.5 ml/分

測定波長:励起波長 298 nm，蛍光波長 325 nm

温　度: 40 ℃

4.6 保存

標準原液，混合原液及び標準溶液 S_1～S_4 は気密保存びんに小分けして冷蔵保存する。

標準原液，混合原液の使用期限は調製後1年間とする。

標準溶液の使用期限は調製後6ヶ月間とする。

5　検体の調製

検体全量をミルで粉砕し均質化する。

6　試験操作

6.1 試料採取

調製した試料を60 ml容遠沈管に0.1～2 g採取する。

1 %塩化ナトリウム溶液を1～5 mlの範囲で加え，次いで3 %ピロガロール-エタノール溶液 10 mlを加える。

6.2 けん化

60 %水酸化カリウム溶液2 mlを加え，70 ℃の水浴中でガラス棒を用いて時々かき混ぜながら30分間加熱する。

6.3 抽出

けん化後，水冷し1 %塩化ナトリウム溶液を合計で23 mlになるように加え，ヘキサン-酢酸エチル混液(9:1 V/V)15 ml を加え，5 分間振とうし，遠心分離後，上層を100 ml容褐色ナス型フラスコに移す[1)]。

下層にヘキサン-酢酸エチル混液(9:1 V/V)15 mlを加え5分間振とうし，遠心分離後，上層を100 ml容褐色ナス型フラスコに合わせる。さらにもう一度下層にヘキサン-酢酸エチル混液(9:1 V/V)15 mlを加え同じ操作を繰り返す。

合わせた抽出液を減圧濃縮する。

注1)　遠心分離後，上層にエマルジョンができている場合はエタノールを少量加えると分離する。

6.4 希釈定容

0.01 % エトキシキン含有ヘキサンで，α，β，γ及びδ-トコフェロールがそれぞれ0.1～100 μg/ml となるように希釈定容し，試験溶液とする。

7　測定

シリンジフィルターでろ過した試験溶液及びα,β,γ及びδ-トコフェロール混合標準溶液 S1～S4 20 μl を高速液体クロマトグラフに注入する。

高速液体クロマトグラフ操作条件(例)

カラム: YMC-Pack SIL-06, 5μm, φ4.6 mm×25 cm ［株式会社 ワイエムシィ］

移動相: ヘキサン，酢酸及び2-プロパノールの混液 (1000:5:2 V/V/V)または，ヘキサン，2-プロパノール及び酢酸の混液(1000:6:5 V/V/V)

流　速: 1.5 ml/分

測定波長:励起波長 298 nm，蛍光波長 325 nm

温　度: 40 ℃

8　計算方法

8.1 α,β,γ及びδ-トコフェロール

標準溶液 S1～S3 の濃度とα,β,γ及びδ-トコフェロールのピーク面積又は高さから検量線を作成し，α,β,γ及びδ-トコフェロール含量を算出する。

更に，標準溶液S4についても同様に測定し，直線性の確認を行う。

試料中のα,β,γ及びδ-トコフェロール含量(mg/100g)=C×N×V/1000×100/W

C: 検量線から求められた試験溶液中のα,β,γ及びδ-トコフェロール濃度(μg/ml)

N: 希釈率

V: 定容量(ml)

W: 試料採取量(g)

8.2 検出限界

試験溶液のα，β，γ及びδ-トコフェロール含有量の測定下限の濃度を標準溶液の0.1 μg/ml として，8.1の式より検出限界を以下のように設定する。

0.1×1×5/1000×100/1=0.05 mg/100g

(試料 1 g,定容量 5 ml)　　検出限界　0.1 mg/100g

以　上

別紙３－１３

宇宙日本食認証に係るビタミンK定量の操作手順

2006年11月

1．概要

申請食品のビタミンKの定量は，「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について」（平成11年4月26日 衛新第13号，Analytical Methods for Nutrition Labeling in Japan）に準拠する。すなわち，アセトン，次いでヘキサン-酢酸エチル混液（9:1）で抽出し，必要に応じてシリカゲルカラムにて精製処理した後，高速液体クロマトグラフ法で定量する方法である。

2．器具及び装置

50ml容褐色ネジ口遠沈管
薬さじ
ミクロスパテール
ガラス管
化学天秤
湯浴
タッチミキサー
駒込ピペット
振とう機
遠心分離機
100ml容褐色ナス形フラスコ
減圧濃縮器（ロータリーエバポレーター）
ホールピペット(通常は2,5,10,20ml)
褐色メスフラスコ（通常は10,20,50,100ml)
褐色カラム管
ミニカラム（Sep-Pakシリカ，Waters）
10ml容共栓付き褐色試験管
超音波発生器
分光光度計
高速液体クロマトグラフ：蛍光分光光度計付き
分析カラム
逆相分配型：内径4.6mm，長さ150,250 mm（例）L-Column ODS，Develosil C30－UG-5
還元カラム：白金カラム

3．試薬及び試液

メタノール(高速液体クロマトグラフ用)
エタノール，メタノール，ヘキサン,酢酸エチル,ジエチルエーテル（以上,残留農薬

試験用)
エタノール, 2-プロパノール, 塩化ナトリウム, 硫酸ナトリウム(無水) (以上, 特級)
アセトン(電子工業用)
イソオクタン (吸光分析用)
シリカゲル 60(メルク社)
1%クエン酸水溶液:クエン酸 1 水和物(特級)5.46g をイオン交換水 500ml に溶解する。(室温保存, 使用期限; 1 週間)
ヘキサン及び酢酸エチルの混液(9:1):ヘキサン 900ml と酢酸エチル 100ml を混合する。(使用期限;1ヶ月)
ヘキサン及びジエチルエーテルの混液(85:15):ヘキサン 850ml とジエチルエーテル 150ml を混合する。(使用期限;1ヶ月)
ヘキサン及びジエチルエーテルの混液(97:3):ヘキサン 970ml とジエチルエーテル 30ml を混合する。(使用期限;1ヶ月)

4. 標準品
フィロキノン標準品:高速液体クロマトグラフ用(和光純薬工業株式会社)
メナキノン-4 標準品:高速液体クロマトグラフ用(和光純薬工業株式会社)

4.1 標準原液の調製方法
フィロキノン標準品,メナキノン-4 標準品 10mg をそれぞれ別の 100ml 褐色メスフラスコに精密に量り, イソオクタンに溶かし, 定容して標準原液とする。(濃度は約 100000ng/ml) 標準原液をイソオクタンで 10 倍に希釈し,イソオクタンを対照として,248.5nm における吸光度を測定する。フィロキノンは E(1%,1cm)=425, メナキノン-4 は E(1%,1cm)=429 を用いて, 以下の式により標準原液のフィロキノン,メナキノン-4 の濃度を求める。

標準原液のフィロキノン濃度(ng/ml)=A1×10000×1000×10/425
標準原液のメナキノン-4 濃度(ng/ml) =A2×10000×1000×10/429

A1:フィロキノンの 248.5nm における吸光度
A2:メナキノン-4 の 248.5nm における吸光度

ただし,吸光度から算出した濃度が採取量から算出した濃度より高い場合,採取量から算出した濃度を採用する。

4.2 フィロキノン及びメナキノン-4 混合標準溶液の調製方法
フィロキノン及びメナキノン-4 標準原液をそれぞれ合わせてエタノール*1 で 10 倍に希釈

し，標準溶液 S とする。(濃度は各々約 10000ng/ml)*2

標準溶液 S をエタノール*1 で 25 倍に希釈し,標準溶液 S4 とする。(濃度は各々約 400ng/ml)*3

標準溶液 S をエタノール*1 で 50 倍に希釈し,標準溶液 S3 とする。(濃度は各々約 200ng/ml)*4

標準溶液 S4 をエタノール*1 で 50 倍に希釈し,標準溶液 S2 とする。(濃度は各々約 8ng/ml)*5

標準溶液 S3 をエタノール*1 で 100 倍に希釈し,標準溶液 S1 とする。(濃度は各々約 2ng/ml)*6

4.3 キャリブレーション

新たに調製した標準溶液 S2,S3,S4 及び現行の標準溶液 S2,S3,S4 を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より標準溶液 S2,S3,S4 それぞれの新旧比を求める。

新旧比(%)=(C2/A2)/(C1/A1)×100

C1:現行の標準溶液の濃度(ng/ml)
C2:新たに調製した標準溶液の濃度(ng/ml)
A1:現行の標準溶液のピーク面積
A2:新たに調製した標準溶液のピーク面積

新旧比が 97～103%の範囲にあれば検定合格とする。

<高速液体クロマトグラフ操作条件例>

機　　種：880-PU[日本分光株式会社]
検 出 器：蛍光分光光度計 L-7480[株式会社 日立製作所]
カ ラ ム：L-column ODS, φ4.6mm×250mm [財団法人 化学物質評価研究機構]
移 動 相：メタノール（残留農薬試験用）
還元カラム：白金カラム RC-10-1 4.0mm×15mm[資生堂医理化テクノロジー株式会社]
温　　度：40℃
波　　長：励起 320nm，蛍光 430nm

4.4 保存

フィロキノン及びメナキノン-4 標準原液は冷凍保存し，使用期限は 1 年とする。

標準溶液は HPLC バイアルに小分けにして冷凍保存し,使用期限は 6 ヵ月とする。

バイアルに小分けにする際は光があたらないように暗室で実施する。

【注解】

*1 残留農薬試験用を用いる。

*2 フィロキノン及びメナキノン-4 標準原液をそれぞれ 10ml 分取し,100ml メスフラスコに定容するとよい。

*3 標準溶液 S を 10ml 分取し,250ml メスフラスコに定容するとよい。

*4 標準溶液 S を 5ml 分取し,250ml メスフラスコに定容するとよい。

*5 標準溶液 S4 を 5ml 分取し,250ml メスフラスコに定容するとよい。

*6 標準溶液 S3 を 2ml 分取し,200ml メスフラスコに定容するとよい。

5．試験方法*1

5.1 試料調製

検体全量をミルで粉砕し均質化する。

5.2 試料採取および 1%クエン酸水溶液，エタノールの添加

5.2.1 アセトンによる前抽出を行わない場合

試料が液体の場合は，均一化した試料 0.1～2g を褐色ネジ口遠沈管に精密に採取し，1%クエン酸水溶液 10ml を加えて攪拌後，エタノール 20ml を加える。

試料が液体以外の場合は，均一化した試料 0.1～2g を褐色ネジ口遠沈管に精密に採取し，1%クエン酸水溶液 10ml を加え湯浴中*2 で 5 分間加熱膨潤した後，エタノール 20ml を加える。試料が混ざりにくい時はタッチミキサーや超音波発生器などを用いて混ぜ合わせる。

5.2.2 アセトンによる前抽出を行う場合

試料が液体の場合は，均一化した試料 0.1～2g を褐色メスフラスコに精密に採取し，イオン交換水*3 を加えて攪拌後アセトンで定容し超音波発生器に 10 分間かけて抽出する。

試料が液体以外の場合は，均一化した試料 0.1～2g を褐色メスフラスコに精密に

採取し，イオン交換水を加え湯浴中で 5 分間加熱膨潤する。試料が混ざりにくい時はタッチミキサーや超音波発生器などを用いて混ぜ合わせる。アセトンで定容し，超音波発生器に 10 分間かけて抽出する。

褐色ネジ口遠沈管にこの定容液の一部を分取する(5～20ml)。1%クエン酸水溶液 10ml を加え，エタノール（分取量と合わせて 20ml になるように）加える。

5.3　抽出

ヘキサン及び酢酸エチルの混液(9：1)15ml を加えて 10 分間振とうする。遠心分離後(1500rpm, 5 分間) *4 上層を褐色ナス形フラスコに移す。下層にヘキサン及び酢酸エチルの混液(9：1)15ml を加えて 5 分間振とうし，遠心分離後(1500rpm, 5 分間) 上層を褐色ナス形フラスコに合わせる。同じ操作をさらに 1 回繰り返し，抽出液を合わせる。合わせた抽出液を減圧濃縮，乾固する。次のカラム精製を実施しない場合は 5.5 に移る。

5.4　カラム精製*5

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。カラム精製には Sep-Pak シリカ，シリカゲルオープンカラム及びシリカゲル高分離オープンカラム（長カラム）の 3 種類の方法がある。選択の基準を以下に示す。

カラム精製の種類	適用検体等
Sep-Pak シリカ	植物由来の緑色が濃いもの
オープンカラム	油脂が多いもの・Sep-Pak シリカでは精製が不十分なもの
長カラム	油・ソフトカプセル・オープンカラムでは精製が不十分なもの

5.4.1　Sep-Pak シリカによる精製

5.4.1.1　ヘキサン及びジエチルエーテルの混液(85:15)20ml 次にヘキサン 10ml で Sep-Pak シリカを洗浄する。

5.4.1.2　褐色ナス形フラスコを Sep-Pak シリカの下にセットする。

5.4.1.3　5.3 にヘキサン 5ml 程度を加え超音波発生器で残さを溶解させ，カラムに流し込む。

5.4.1.4　ヘキサン及びジエチルエーテルの混液(85:15)10ml を加え超音波発生器で残さを溶解させカラムに流し込む。

5.4.1.5　さらにヘキサン及びジエチルエーテルの混液(85:15)10ml で洗いこむ。もう一度繰り返す。全溶出液（ヘキサンも含む）を減圧濃縮，乾固する。

5.4.2　シリカゲルオープンカラムによる精製

5.4.2.1　褐色クロマト管（内径 1.5cm, 長さ 30cm）に脱脂綿を詰め，シリカゲル 3g 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。

5.4.2.2　5.3 にヘキサン 10ml 程度を加え超音波発生器で残さを溶解させ，カラムに

流し込む。さらにヘキサン 10ml で洗い込む。(この間に流出したヘキサンは捨てる)

5.4.2.3 褐色ナス形フラスコを褐色クロマト管の下にセットする。

5.4.2.4 ヘキサン及びジエチルエーテルの混液(85:15)10ml を加え超音波発生器で残さを溶解させカラムに流し込む。

5.4.2.5 さらにヘキサン及びジエチルエーテルの混液(85:15)10ml で洗いこむ。もう一度繰り返す。溶出液を減圧濃縮，乾固する。

5.4.3 シリカゲル長カラムによる精製

5.4.3.1 褐色クロマト管（内径 2cm, 長さ 30cm）に脱脂綿を詰め，シリカゲル 20g をヘキサン湿式法で充填する。褐色ナス形フラスコを褐色クロマト管の下にセットする。

5.4.3.2 5.3 にヘキサン 5ml 程度を加え超音波発生器で残さを溶解させ，褐色クロマト管に流し込む。

5.4.3.3 ヘキサン及びジエチルエーテルの混液(97:3)10ml を加え超音波発生器で残さを溶解させ褐色クロマト管に流し込む。

5.4.3.4 さらにヘキサン及びジエチルエーテルの混液(97:3)で洗いこみ，合計で 250ml を流下させ溶出させる。

5.4.3.5 溶出液を減圧濃縮，乾固する。

5.5 定容および希釈

フィロキノン, メナキノン-4 濃度が 400ng/ml 以下になるように*6，またメナキノン-5～11 についてはその濃度が $400\times MW_n/MW_4$ ng/ml 以下になるように一定量のエタノールを加え試験溶液とする。（残さが油状の時は 2-プロパノールを使用する。）

MW_n: メナキノン-n の分子量

MW_4: メナキノン-4 の分子量

5.6 測定

試験溶液 20・1*7 を以下の条件の高速液体クロマトグラフに注入し, フィロキノン及びメナキノン-4 のピーク面積を測定する。あらかじめ標準溶液 S1(約 2ng/ml)，S2(約 8ng/ml)，S3(約 200ng/ml)，S4(約 400ng/ml)を各 20・1*7 高速液体クロマトグラフに注入して，直線性を確認する。得られた検量線(S2, S3 の折れ線)から試験溶液中の濃度を求め，これを用いて試料中のフィロキノン及びメナキノン-4 含量を算出する。メナキノン-5～11 はメナキノン-4 標準溶液に対するピーク面積比を求め，次いで分子量比で補正して算出する。

高速液体クロマトグラフ操作条件例

ポ ン プ：880-PU[日本分光株式会社]

検　出　器：蛍光分光光度計 RF-10AXL[株式会社 島津製作所]
カ　ラ　ム：L-column ODS φ4.6mm×250mm [財団法人 化学物質評価研究機構]
移　動　相：メタノール またはメタノール及びエタノールの混液(2:1)
還元カラム：白金カラム RC-10-1 4.0mm×15mm[資生堂医理化テクノロジー株式会社]
温　　度：40℃
波　　長：励起 320nm, 蛍光 430nm

【注解】
*1 ビタミンKは光に弱いため、光にあてないように注意する。
*2 湯浴の温度は50～70℃程度。カプセルの場合50℃では溶けにくいため70℃程度が好ましい。
*3 イオン交換水の量は、検体が完全に溶けるよう全抽出液の8～20%程度加える。
*4 エマルジョンができる場合,塩化ナトリウムを少量加える。
*5 Sep-Pak シリカ及びシリカゲルのロットNo.が変更になったときは必ず溶出試験を実施して溶出位置を確認する。
*6 検出限界を1・g/100gとするには標準溶液S1を最小検出濃度とすると1gサンプリング,5ml定容となる。
*7 通常は20・1であるが, 低検出限界等により変化することもある。

6．計算

6.1 フィロキノン及びメナキノン-4

試料中のフィロキノン, メナキノン-4含有量(・g/100g) = C×V×N×100/1000/W

C:検量線から求めた試験溶液中のフィロキノン, メナキノン-4濃度(ng/ml)
V:定容量(ml)
N:希釈率
W:試料採取量(g)

6.2 メナキノン-5～11

メナキノン-5～11はメナキノン-4標準溶液の検量線及び各メナキノンの分子量比から算出する。

試料中のメナキノン-5～11 含有量 = $[An \times MW_n/MW_4 \times C_4/A_4] \times V \times N \times 100/1000/W$

A_n :メナキノン-nのピーク面積

MW_n:メナキノン-n の分子量

C_4:メナキノン-4 の S3 の濃度

A_4:メナキノン-4 の S3 の面積

V :定容量(ml)

N :希釈率

W :試料採取量(g)

6.3 検出限界

フィロキノン及びメナキノン-4～11 の検出限界は 1・g/100g である。ただし，フィロキノン及びメナキノン-4～11 の同時分析の場合において，各成分含量に 100 倍を超える差がある場合は，検出限界を以下の通りにする。

一番含量が高いもの	検出限界
～500・g/100g	1・g/100g
500～999・g/100g	5・g/100g
1,000～4,990・g/100g	10・g/100g
5,000～9,990・g/100g	50・g/100g
10,000～49,900・g/100g	100・g/100g
50,000～99,900・g/100g	500・g/100g

以　上

別紙３－１４

宇宙日本食認証に係るビタミンB_1定量の操作手順

2006年11月

1．概要

申請食品のビタミン B_1 の定量は，「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について」（平成 11 年 4 月 26 日 衛新第 13 号，Analytical Methods for Nutrition Labeling in Japan）に準拠する。すなわち，塩酸酸性下で加熱抽出し，酵素処理にてリン酸エステル型ビタミン B_1 を遊離型に変換した後，陽イオン交換カラム処理にて精製し，高速液体クロマトグラフ法で定量する方法である。

2．器具及び装置

高速液体クロマトグラフ(以下「HPLC」と略す。)：蛍光検出器付
超音波発生器
振とう機
汎用天秤
化学天秤
遠心分離機
ウォーターバス(40～100℃)
恒温器(38～42℃)
乾燥器(105℃)
マニホールド
デシケーター
アスピレーター
オートビュレット
自動ピペッター
電熱器
500 ml 容取手付きガラスビーカー
カラム管
メスシリンダー(20～1000 ml)
共栓付きメスシリンダー(500～1000 ml)
褐色抽出瓶(100 ml)
褐色メスフラスコ(20～1000 ml)
試薬ビン(120～1000 ml)
白色メスフラスコ(20～25 ml)
メスピペット(20 ml)
ホールピペット(2～25 ml)
駒込ピペット(3～10 ml)
ポリ容器(20～1000 ml)
三角フラスコ(1000 ml)

ビーカー(50～5000 ml)
シリンジ(10～35 ml)
ミクロフィルター(0.45 ・m)
マイクロ精秤ロート
アルミ乾燥皿
3 L容ガロンビン
ガラスウール
攪拌棒
ピンセット
pH 試験紙(BCG, TB)
漏斗
ろ紙(No.6, No.2)
カラム管立て
抽出瓶立て
バイアル
バイアル立て
洗ビン(500～1000 ml)

3．試薬

酢酸(特級)
フェリシアン化カリウム(特級)
塩酸(特級)
メタノール(残留農薬試験用)
60 %過塩素酸(特級)
塩化カリウム(特級)
酢酸ナトリウム三水和物(特級)
リン酸二水素ナトリウム二水和物(特級)
水酸化ナトリウム(特級)
過塩素酸ナトリウム無水物(特級)
チオ尿素(特級)
トルエン(特級)
タカヂアスターゼB(ビタミンB1定量用，三共株式会社)
活性ビタチェンジ(パームチット， ビタミンB1定量用，和光純薬工業株式会社)
BOND ELUT Jr. SCX 500 mg(強酸性陽イオン交換基，Varian)

4．試液とその調製方法

1 mol/L 塩酸

1000 ml 容共栓付メスシリンダーに，イオン交換水約 900 ml をとり，100 ml 容メスシリンダーで，塩酸 95 ml を加えた後，イオン交換水で 1000 ml に定容。ドラフト内で行う。(室温保存，使用期限 2 ヶ月)

0.1 mol/L 塩酸

1000 ml 容共栓付メスシリンダーに，1 mol/L 塩酸を 100 ml とり，イオン交換水で 1000 ml に定容。(室温保存，使用期限 2 ヶ月)

酢酸ナトリウム溶液

5000 ml 容ビーカーに，酢酸ナトリウム三水和物 1088 g をとり，1000 ml 容メスシリンダーで，イオン交換水 2000 ml を加え溶解する。(室温保存，使用期限 2 ヶ月)

50 %酢酸溶液

500 ml 容共栓付メスシリンダーに，酢酸 250 ml をとり，イオン交換水で 500 ml に定容。ドラフト内で行う。(室温保存，使用期限 2 ヶ月)

酢酸緩衝液(pH 4.5)

2000 ml 容ビーカーに，1000 ml 容メスシリンダーで，イオン交換水 2000 ml をとり，50 ml 容メスシリンダーで，酢酸ナトリウム溶液 40 ml 及び 50 %酢酸溶液 20 ml を加え撹拌する。pH 試験紙(BCG)で pH 4.5 であることを確認し，pH 4.5 でない場合は酢酸ナトリウム溶液及び 50 %酢酸溶液で調整する。(冷蔵保存，使用期限 2 ヶ月)

酢酸緩衝液(pH 4.5，0.1 %チオ尿素含有)

5000 ml 容ビーカーに，チオ尿素 3 g をとり，1000 ml 容メスシリンダーで，イオン交換水 3000 ml，500 ml 容メスシリンダーで，酢酸ナトリウム溶液 450 ml 及び 50 %酢酸溶液 225 ml を加える。pH 試験紙(BCG)で pH 4.5 であることを確認し，pH 4.5 でない場合は酢酸ナトリウム溶液及び 50 %酢酸溶液で調整する。(冷蔵保存，使用期限 2 ヶ月)

2.5 %タカヂアスターゼ溶液

250 ml ポリ容器に，タカヂアスターゼ B 2.5 g をとり，100 ml 容メスシリンダーで，酢酸緩衝液(pH 4.5)を 100 ml 加えよく混合した後，遠心分離(1500 rpm，10 分)を行い，その上澄み液を用いる。(用時調製)

10 %チオ尿素溶液

1000 ml 容三角フラスコに，チオ尿素 100 g をとり，1000 ml 容メスシリンダーで，イオン交換水 1000 ml を加え溶解する。(室温保存，使用期限 2 ヶ月)

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)

5000 ml 容ビーカーに，過塩素酸ナトリウム(無水)55.10 g 及びリン酸二水素ナトリウム二水和物 4.68 g をとり，1000 ml 容メスシリンダーで，イオン交換水 3000 ml を加える。メスピペットを用い，60 %過塩素酸を約 1.8 ml 加え，pH 試験紙(TB)で pH 2.2 であることを確認し，調整する。(室温保存，使用期限 2 ヶ月)

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)：HPLC 用移動相

3 L 容ガロンビンに，1000 ml 容メスシリンダーで，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)を 2850 ml，200 ml 容メスシリンダーでメタノール 150 ml を加え，よく攪拌する。(室温保存，使用期限 2 ヶ月)

10 %メタノール溶液：HPLC 洗浄液

1000 ml 容試薬瓶に，100 ml 容メスシリンダーでメタノール 100 ml を加え，1000 ml 容メスシリンダーでイオン交換水 900 ml を加えよく攪拌する。(室温保存，使用期限 2 ヶ月)

15 %水酸化ナトリウム溶液

1000 ml 容三角フラスコ又はポリ容器に，水酸化ナトリウム 156 g をとり，1000 ml 容メスシリンダーで，イオン交換水 1000 ml を加え溶解する。ドラフト内で行う。(室温保存，使用期限 2 ヶ月)

30 %水酸化ナトリウム溶液

1000 ml 試薬ビンに，水酸化ナトリウム 312 g をとり，1000 ml 容メスシリンダーで，イオン交換水 1000 ml を加え溶解する。ドラフト内で行う。(室温保存，使用期限 2 ヶ月)

0.01 %フェリシアン化カリウム含有 15 %水酸化ナトリウム溶液：HPLC 反応液

500 ml 容試薬瓶に，フェリシアン化カリウム 0.050 g をとり，500 ml 容メスシリンダーで，15 %水酸化ナトリウム溶液 500 ml を加え溶解する。(室温暗所保存，使用期限 1 週間)

25 %塩化カリウム含有 0.1 mol/L 塩酸溶液(以下「パームチットカラム用脱着液」と略す。)

5000 ml 容ビーカーに，塩化カリウム 1000 g をとり，1000 ml 容メスシリンダーで，イオン交換水 3600 ml 及び 1 mol/L 塩酸 400 ml を加えて溶解する。ひだ折りろ紙(No. 2)でろ過する。(室温保存，使用期限 2 ヶ月)

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)：

ミニカラム用脱着液 1000 ml 容褐色メスフラスコに，1000 ml 容メスシリンダーでメタノール 200 ml 及び 25 %塩化カリウム含有 0.1 mol/L 塩酸溶液 800 ml を加え攪拌する。(室温保存，使用期限 2 ヶ月)

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)

1000 ml容褐色メスフラスコに，1000 ml容メスシリンダーで，メタノール100 ml及び25 %塩化カリウム含有0.1 mol/L塩酸溶液900 mlを加え撹拌する。(室温保存，使用期限2ヶ月)

5．標準品

塩酸チアミン標準品(日本薬局方標準品，財団法人 日本公定書協会，冷蔵保存，使用期限入手後3ヶ年)

ヒドロキシエチルチアミン塩酸塩標準品(和光純薬工業株式会社，冷蔵保存，使用期限入手後3ヶ年)

6．標準原液及び標準溶液の調製とその検定方法

6.1　標準原液の調製方法

チアミン塩酸塩標準原液(100 ・g/ml)

塩酸チアミン標準品をアルミ製秤量皿にとり，105℃で 2 時間乾燥し，30 分間デシケーターで放冷後，100 mg をマイクロ精秤ロートに精秤し，イオン交換水で 1000 ml 容褐色メスフラスコに洗い込む。1 mol/L 塩酸 100 ml を加え，イオン交換水で定容する。(冷蔵保存，使用期限1ヶ年)

ヒドロキシエチルチアミン塩酸塩標準原液(100・g/ml)

ヒドロキシエチルチアミン塩酸塩標準品をアルミ製秤量皿にとり，105℃で2時間乾燥し，30分間デシケーターで放冷後，100 mgをマイクロ精秤ロートに精秤し，イオン交換水で 1000 ml 容褐色メスフラスコに洗い込む。1 mol/L塩酸100 mlを加え，イオン交換水で定容する。(冷蔵保存，使用期限1ヶ年)

6.2　標準溶液の調製方法

6.2.1　パームチットカラム用標準溶液の調製方法

希釈溶媒は25 %塩化カリウム含有0.1 mol/L塩酸溶液を用い，チアミン塩酸塩及びヒドロキシエチルチアミン塩酸塩の標準原液が同量ずつ含まれるようにして，以下の各濃度の溶液を調製する。(冷蔵保存，使用期限2ヶ月)

標準溶液Std1(1.0 ・g/ml)

チアミン塩酸塩及びヒドロキシエチルチアミン塩酸塩の標準原液を，100倍希釈(希釈例；250/2.5+2.5)。

標準溶液Std2(0.8 ・g/ml)

チアミン塩酸塩及びヒドロキシエチルチアミン塩酸塩の標準原液を，125

倍希釈(希釈例；250/2+2)。

標準溶液 Std3(0.2 ・g/ml)

標準溶液 Std1 を，5 倍希釈(希釈例：250/50)。

標準溶液 Std4(0.1 ・g/ml)

標準溶液 Std1 を，10 倍希釈(希釈例：250/25)。

標準溶液 Std5(0.02 ・g/ml)

標準溶液 Std1 を，50 倍希釈(希釈例：250/5)。

標準溶液 Std6(0.002 ・g/ml)

標準溶液 Std5 を，10 倍希釈(希釈例：250/25)。

6.2.2　ミニカラム用標準溶液の調製方法

定容時にメタノールを 10 %含む様にし，パームチット用標準溶液の調製方法に準じて調製する。(冷蔵保存，使用期限 2 ヶ月)

標準溶液 Std7(0.8 ・g/ml)

チアミン塩酸塩及びヒドロキシエチルチアミン塩酸塩の標準原液を，125 倍希釈(希釈例：250/2+2+メタノール 25 ml)。

標準溶液 Std8(0.2 ・g/ml)

標準溶液 Std1 を，5 倍希釈(希釈例：250/50+メタノール 25 ml)。

標準溶液 Std9(0.1 ・g/ml)

標準溶液 Std1 を，10 倍希釈(希釈例：250/25+メタノール 25 ml)。

標準溶液 Std10(0.02 ・g/ml)

標準溶液 Std1 を，50 倍希釈(希釈例：250/5+メタノール 25 ml)。

標準溶液 Std11(0.002 ・g/ml)

標準溶液 Std10 を，10 倍希釈(希釈例：250/25+メタノール 25 ml)。

6.2.3　カラムスイッチング用標準溶液の調製方法

pH 4.5 になる様に酢酸緩衝液(pH 4.5，0.1 %チオ尿素含有)で希釈し，パームチット用標準溶液の調製方法に準じて調製する。(冷蔵保存，使用期限 1 ヶ月)

標準溶液 Std12(10 ・g/ml)

チアミン塩酸塩及びヒドロキシエチルチアミン塩酸塩の標準原液を，10 倍希釈(希釈例：100/10+10)。

標準溶液 Std13(0.4 ・g/ml)

標準溶液 Std12 を，25 倍希釈(希釈例：250/10)。

標準溶液 Std14(0.2 ・g/ml)

標準溶液 Std12 を，50 倍希釈(希釈例：250/5)。

標準溶液 Std15(0.1 ・g/ml)

標準溶液 Std12 を，100 倍希釈(希釈例：250/2・5)。

標準溶液 Std16(0.02 ・g/ml)

標準溶液 Std14 を，10 倍希釈(希釈例：250/25)。

標準溶液 Std17(0.002 ・g/ml)

標準溶液 Std16 を，10 倍希釈(希釈例：250/25)。

6.3　検定方法

標準原液及び標準溶液調製時には，HPLC を用いて新・旧標準溶液を測定する。ピーク面積(あるいは高さ)の新旧比が 0.97～1.03 であれば合格とし，標準溶液管理簿に記録する。

7．検体の調製及び均質化

検体全量をミルで粉砕し均質化する。ミルによる均質化で不十分の場合には，検体及び検体と同重量または 2 倍重量の 5 %メタリン酸を加えて粉砕均質化する。

8．試験溶液の調製

均質化した試料の秤量　0.5～5 g　(100 ml 容褐色抽出瓶)

↓

酸分解・抽出

＋ 1 mol/L 塩酸　5 ml

＋ 10 %チオ尿素溶液　1 ml

＋ イオン交換水　45 ml

沸騰水浴中，15 分（時々，攪拌）

↓

酵素分解

pH 4.5 に調整*1

＋2.5 %タカヂアスターゼ溶液　3 ml

酢酸緩衝液(pH 4.5)で定容

38～42 ℃，16 時間放置*2

↓

ろ過・適宜希釈*3

↓

精　製*4　①パームチットカラム
②ミニカラム
③カラムスイッチング

↓

ＨＰＬＣ

*1 酢酸ナトリウム溶液及び 50 %酢酸溶液を用いて，pH 4.5 に調整し，pH 試験紙(BCG)で確認する。

*2 休日等で 16 時間経過後速やかに試験できない場合は，定容時にトルエンを 3 滴程度加え，16 時間後に 5℃になる様にタイマーセットし，冷蔵保存する。

*3 希釈溶媒は，酢酸緩衝液(pH 4.5, 0.1 %チオ尿素含有)を用いる。

*4 精製は，8.1 精製に従う。

8.1 精製

8.1.1　パームチットカラム

前準備

50 ml 容ビーカーにパームチットを 1.6～1.7 g 量り，15～20 ml(パームチットが浸る位)のイオン交換水を加え半日ほど放置し，付着している気泡や細かい粒子を浮き上がらせておく。カラム管にガラスウールを詰め(穴が開かない程度)，コックにワセリンを適量塗る。

カラム準備

パームチットを浸していたイオン交換水を捨て，更にもう一度イオン交換水で洗い流した後，パームチットをカラム管に流し込む(パームチットは活性を損ねない様，常にイオン交換水に浸るようにしておく)。

吸着

試験溶液(pH 4.5 に調整されたものに限る)2～25 ml をホールピペットで正確にカラム管に加え，1 ml/分(約 3 秒に 1 滴)の速度で流し，吸着させる。5 ml 程度のイオン交換水を用い，カラム管の壁についた試料溶液も流し込み，吸着させる。パームチットのチアミン(ビタミン B1)吸着可能量は，20 ・g までとする。

精製

沸騰させたイオン交換水 50～60 ml をカラム管に流し入れ，チアミン(ビタミン B1)測定上妨害となる蛍光物質を流出させる。

脱着

カラムの受け器を 25 ml 容メスフラスコに換え，カラムが冷めないうちに，あらかじめ温めておいた 25 %塩化カリウム含有 0.1 mol/L 塩酸溶液を流し込み，チアミン(ビタミン B1)を脱着し回収する。

定容

25 ml 容メスフラスコを室温に戻した後，25 %塩化カリウム含有 0.1 mol/L 塩酸溶液で定容したものを，HPLC 用試験溶液とする。

パームチット活性度試験

パームチットのロットが新しくなるときに行う。新旧ロットのパームチットをそれぞれ　　2 本ずつカラムに詰め，チアミン塩酸塩及びヒドロキシエチルチアミン塩酸塩の標準溶液の濃度が 0.1 ・g/ml となるように(例；0.5 ・g/ml に希釈したものを 5 ml)カラムにかけて，その脱着液を HPLC で測定する。それまで使用していたロットとの面積比率が 0.95～1.05 以内であることを確認出来たら，新しいロットを使用可とする。

8.1.2　ミニカラム

カラム準備

マニホールドに BOND ELUT SCX　500 mg 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，イオン交換水，pH4.5 酢酸緩衝液の順に 5 ml ずつ流し，カラムのコンディショニングを行う。

吸着

試験溶液(pH 4.5 及び pH 1 溶液共に使用可能)2～25 ml をホールピペットで正確に加え，減圧下で吸引しながらカラムに吸着させる。イオン交換水 5 ml を用いてカラム管の壁についた試料溶液も流し込み，吸着させる。ミニカラムのチアミン(ビタミンB1) 及びHET(ヒドロキシエチルチアミン)の吸着可能量は，20 ・g とする。

脱着

カラムの受け器を 20 ml 容メスフラスコに換え，20 %メタノール及び 25 %塩化カリウム含有 0.1 mol/L 塩酸の混液 10 ml を，続けて 25 %塩化カリウム含有 0.1 mol/L 塩酸溶液 10 ml を流し，チアミン(ビタミンB1)及びHET(ヒドロキシエチルチアミン)を脱着させ回収する。

定容

25 %塩化カリウム含有 0.1 mol/L 塩酸溶液で定容し(定容時の検液組成は 10 %メタノール及び 25 %塩化カリウム含有 0.1 mol/L 塩酸の混液となる)，HPLC 用試験溶液とする。

8.1.3　カラムスイッチング(HPLC カラム内で自動的に精製操作が行われるように設定している)

カラム準備

イオン交換水でコンディショニング

吸着

試験溶液を注入

脱着

HPLC 用移動相で脱着させ分析カラムへ送る

9．定量操作

標準溶液 Std2～6，Std7～11 又は Std13～17 及び試験溶液 15～30 ・1 の一定量につき，以下の条件で HPLC により試験を行い，標準溶液 Std2～6，Std7～11 又は Std13～17 の直線性を確認した後，標準溶液 Std4 及び 5，Std9 及び 10 又は Std15 及び 16 のピーク面積(あるいは高さ)から得た検量線を用いて試料溶液の濃度を求め，チアミン塩酸塩及びヒドロキシエチルチアミン塩酸塩(HET)の合計値を，チアミン塩酸塩として提出する。

＜高速液体クロマトグラフ操作条件例＞

機　種：LC-10AS[株式会社 島津製作所]

検出器：蛍光分光光度計 RF-10AXL[株式会社 島津製作所]

カラム：L-column ODS，φ4.6 mm×15 cm [財団法人 化学物質評価研究機構]

及び L-column ODS，φ4.6 mm×25 cm [財団法人 化学物質評価研究機構]

カラム温度：40 ℃

HPLC 移動相：0.01 mol/L リン酸二水素ナトリウム含有 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)

流　量： 1.0 ml/min

蛍光励起波長：375 nm

蛍光測定波長：440 nm

ポストカラム：反応コイル；ステンレス管，φ0.25 mm×50 cm

HPLC 反応液；0.01 %フェリシアン化カリウム含有 15 %水酸化ナトリウム溶液

反応液流量 ；0.5 ml/min

反応温度　；40 ℃

チアミン塩酸塩(mg/100g)=(F1×A+F2)/W×V×N×100/1000

ヒドロキシエチルチアミン塩酸塩(HET)(mg/100g)=(F1×A+F2)/W×V×N×100/1000×0.8845*

F1：検量線の傾き

F2：検量線の切片

A：試験溶液のピーク面積(あるいは高さ)

W：試料採取量(g)

V：定容量(ml)

N：希釈率

* 0.8845；ヒドロキシエチルチアミン塩酸塩(HET)量をチアミン塩酸塩量に換算する換算係数

１０．検出限界

標準溶液 Std6，Std11 又は Std17 の濃度を最小検出限界とし，以下の様に算出される。

0.002 ・g/ml /1000×100 ml /2 g×100=0.01 mg/100g

以　上

別紙３－１５

宇宙日本食認証に係るビタミンＣ定量の操作手順

2006年11月

1．概要

申請食品のビタミンCの定量は，「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について」（平成11年4月26日 衛新第13号，Analytical Methods for Nutrition Labeling in Japan）に準拠する。すなわち，メタリン酸存在下でホモジナイズし，インドフェノール処理にてアスコルビン酸（還元型）をデヒドロアスコルビン酸（酸化型）に換えた後，誘導体（オサゾン）化して高速液体クロマトグラフ法で定量する方法である。

2．器具及び装置

高速液体クロマトグラフ(以下「HPLC」と略す)：紫外可視光光度計付き
化学天秤
汎用天秤
ミル
ホモジナイザー
遠心管(50 ml)
メスフラスコ(20，50，100，200 ml，1 L)
共栓付きメスシリンダー(1 L)
メスシリンダー(50，100，300 ml)
オートビュレット
自動ピペッター(5，12.5，50 ml)
マイクロピペット
振とう機
遠心分離機
恒温器(38～42 ℃)
ウォーターバス
メスピペット(2，10，20 ml)
ホールピペット(2，5，10，20 ml)
コマゴメピペット(5 ml)
ガラスビーカー(100 ml，5 L)
三角フラスコ(50 ml，1 L)
ロート
ろ紙
バイアル
バイアル立て

3．試薬

メタリン酸(特級)

酢酸エチル(残留農薬試験用)

ヘキサン(残留農薬試験用)

酢酸(特級)

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(特級)

チオ尿素(特級)

2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(特級)

硫酸(特級)

塩酸(特級)

エタノール(残留農薬試験用)

無水硫酸ナトリウム(特級)

4．試液とその調製法

20 %メタリン酸溶液

汎用天秤を用いてメタリン酸 1000 g を 5 L ガラスビーカーに量りとりイオン交換水を加え溶解させた後，5 L にあわせる。(冷蔵保存 3 ヶ月)

5 %メタリン酸溶液

20 %メタリン酸溶液 250 ml を 1 L 共栓付きメスシリンダーにとりイオン交換水で 1 L とする。(冷蔵保存 3 ヶ月)

0.2 %ジクロロフェノールインドフェノール溶液

汎用天秤を用いて 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 0.4 g を 200 ml 容褐色メスフラスコに量りとり，熱したイオン交換水で溶解後 200 ml に定容する。No.6 のろ紙でろ過する。(冷蔵保存 2 ヶ月)

2 %チオ尿素-5 %メタリン酸溶液

汎用天秤を用いてチオ尿素 20g を 1 L 容メスフラスコに量りとり，5 %メタリン酸溶液を加え定容し，N0.2 のろ紙でろ過する。(冷蔵保存 3 ヶ月)

4.5 mol/L 硫酸

1 L 容メスシリンダーにイオン交換水 750 ml をとり 1 L 容ガラス三角フラスコに半量ほど入れ，300 ml 容メスシリンダーを用いて硫酸 250 ml を徐々に加え混合し，残りのイオン交換水を加える。(室温保存 6 ヶ月)

2 %2,4-ジニトロフェニルヒドラジン-4.5 mol/L 硫酸

汎用天秤を用いて 100 ml 容ビーカーに 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン 40g を量りとり，4.5 ml/L 硫酸溶液で 1 L 容褐色メスフラスコにロートを使ってあけこみ定容する。(冷蔵保存 6 ヶ月)

HPLC 用移動相 [ヘキサン-酢酸エチル-酢酸-イオン交換水(40 : 60 : 5 : 0.05)]

メスシリンダー, メスピペットを用いてガロンビンにそれぞれ加え混合する。(室温保存 6 ヶ月)

5．標準品

アスコルビン酸標準品(日本薬局方標準品，冷蔵保存，使用期限入手後 3 年間)

6．標準原液及び標準溶液の調製とその検定方法

6.1 調製方法

標準原液(1000 μg/ml) : 化学天秤を用いて標準品 0.1g を 100 ml 容褐色メスフラスコに量りとり 5 %メタリン酸溶液で定容する(冷蔵保存 1 ヶ月)。

標準溶液 St1(200 μg/ml) : 標準原液を 5 倍希釈する。(冷蔵保存 1 ヶ月)

標準溶液 St2(100 μg/ml) : 標準原液を 10 倍希釈する。(冷蔵保存 1 ヶ月)

標準溶液 St3(10 μg/ml) : St2 を 10 倍希釈する。(冷蔵保存 1 ヶ月)

標準溶液 St4(1 μg/ml) : St3 を 10 倍希釈する。(冷蔵保存 1 ヶ月)

標準溶液 St5(0.4 μg/ml) : St3 を 25 倍希釈する。(冷蔵保存 1 ヶ月)

標準溶液の希釈例

St1(200 μg/ml) : 標準原液をホールピペットで 20 ml とり 5 %メタリン酸溶液で 100 ml に定容する。

St2(100 μg/ml) : 標準原液をホールピペットで 20 ml とり 5 %メタリン酸溶液で 200 ml に定容する。

St3(10 μg/ml) : St2 をホールピペットで 20 ml とり 5 %メタリン酸溶液で 200 ml に定容する。

St4(1 μg/ml) : St3 をホールピペットで 20 ml とり 5 %メタリン酸溶液で 200 ml に定容する。

St5(0.4 μg/ml) : St3 をホールピペットで 4 ml とり 5 %メタリン酸溶液で 100 ml に定容する。

6.2 検定方法

標準原液及び標準溶液調製時には，HPLC を用いて新・旧標準溶液を測定する。ピーク高さ(あるいは面積)の新旧比が 0.97～1.03 であれば合格とし，標準溶液管理簿に記録する。

7．検体の調製

検体全量をミルで粉砕し均質化する。ミルによる均質化で不十分な場合には，検体及び検体と同重量または 2 倍重量の 5 %メタリン酸を加えて粉砕均質化する。

8．試験溶液の調製

試料秤量　　均質化した試料 1～5 g　(50 ml 容遠心管)
　　＋ 5 %メタリン酸溶液
ホモジナイザー抽出
定　容　　50 ml(5 %メタリン酸溶液)
遠心分離 (1,500rpm，5 分)　　ろ過(No.3 のろ紙)
　　ろ液を適宜希釈後　1 ml を小試験管に分注する。(マイクロピペット)
　　＋ 5 %メタリン酸溶液 1 ml で共洗いをする。
酸　化　　＋ 0.2 %ジクロロフェノールインドフェノール溶液　100 μl *1
　　(5 ml 容自動ピペッター)
　　＋ 2 %チオ尿素-5 %メタリン酸溶液　2 ml(50 ml 容自動ピペッター)
オサゾン生成　　＋ 2 %2,4-ジニトロフェニルヒドラジン-4.5 mol/L 硫酸　0.5 ml
　　(12.5 ml 容自動ピペッター)
　　38～42 ℃の恒温器に約 16 時間静置
転　溶　　＋ 酢酸エチル　3 ml(50 ml 容自動ピペッター)
　　振とう 60 分間
ＨＰＬＣ　　酢酸エチル層*2 を注入

*1　100 μl で足りない場合は，ピンク色が 1 分間保つ量を適宜加える。
*2　無水硫酸ナトリウムを適量加え，脱水する。

9．定量操作

HPLC 用標準溶液 St1～5 及び試料溶液 10 μl につき，以下の条件で HPLC により試験を行ない，標準溶液 St1～5 の直線性を確認した後，標準溶液 St2，3，4 のピーク高さ(あるいは面積)から得た検量線を用いて試料溶液の濃度を求める。

＜高速液体クロマトグラフ条件例＞

ポンプ： LC-10AS［株式会社 島津製作所］

検出器：紫外-可視分光光度計 SPD-10AV［株式会社 島津製作所］

カラム：silica-1100-N φ4.6 mm×100 mm［株式会社　センシュー科学］，
Fine pak SIL-5 φ4.6 mm×250 mm［日本分光　株式会社］あるいは同等品

移動相：酢酸エチル，ヘキサン，酢酸及びイオン交換水の混液［60：40：5：0.05］

測定波長：495 nm

流速： 1.5 ml/min

温度： 40 ℃

洗浄液：酢酸エチル

総アスコルビン酸(mg/100 g)=(F1×H+F2)×V×N×100/W×1/1000

F1：検量線の傾き

F2：検量線の切片

H：試験溶液のピーク高さ(あるいは面積)

W：試料採取量(g)

V：定容量(ml)

N：希釈率

１０．検出限界

St5(0.4 μg/ml)の濃度を最小検出濃度とし，以下のように算出される。

0.4 μg/ml×50 ml×100/2 g×1/1000=1 mg/100 g

以　上

別紙３－１６

宇宙日本食認証に係るナトリウム定量の操作手順

2006年11月

1．概要

申請食品のナトリウムの定量は，「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について」（平成11年4月26日 衛新第13号，Analytical Methods for Nutrition Labeling in Japan）に準拠する。すなわち，高温で有機物を燃焼除去し，残さ（灰）を1%塩酸に溶解して測定溶液を調製し，原子吸光光度法で定量する方法である。

2．器具及び装置

・検体調製器具
・天秤（0.01g又は0.0001gまで秤量できるもの）
・ろ紙（ADVANTEC 5A又は同等品）
・石英ビーカー
・電気コンロ
・電気炉
・ホットプレート（約100℃に設定したもの）
・ポリメスフラスコ
・ホールピペット
・駒込ピペット
・ポリロート
・原子吸光光度計

3．試薬

・水（イオン交換水又は同等以上のもの）
・20%塩酸（精密分析用）
・ナトリウム標準液（原子吸光分析用　1000mg/l）

4．試液

・10%塩酸：水500mlに20%塩酸500mlを加えて調製する。
・ 1%塩酸：水9500mlに20%塩酸500mlを加えて調製する。

5．操作

以下に操作の流れをフローシートで示すとともに、それぞれの操作における注意事項を箇条書きで示す。

試料約 1～10g を石英ビーカー*1 に精密に採取

(A)ホットプレート上で水分を蒸発*2

電熱器上で予備灰化*3

電気炉中で灰化

残　さ
- 水少量*4
- 10%塩酸 5ml*5

ホットプレート上で蒸発乾固
- 10%塩酸 5～10ml(定容時に 1%塩酸溶液となるように)
- 水適量

ホットプレート上で加温*6

(B)ろ過 (ADVANTEC 5A) *7

ろ　液
- 水

定　容*8

試験溶液*9

原子吸光光度計で測定

測定波長： 589.6nm 又は 589.0nm
バーナー： 10 cm
フレーム： 空気—アセチレン

空試験溶液：試料を採取せずに同様の操作を行う*10

【操作上の注意事項】

*1　ガラス製容器ではナトリウムが溶出してくるため。パイレックスビーカー等のガラスは，ソーダ石灰ガラスといい網目形成体（SiO_2）の構造中に網目修飾体（又はイオンの）Na, K, Mg, Ca, Ba 等が入り安定な構造をとる。これに対して，石英ビーカーは SiO_2 の網目状構造のみで，網目修飾イオンはない。Na 含有量の少ない場合では，パイレックスビーカーからの溶出が問題となり，K の場合ではビーカーに吸着されるため低濃度分析に影響がある。

*2　乾燥状態の試料はこの操作を省略してよい。

*3 ドラフトの中で黒く炭化して煙が出なくなるまで灰化する。熱を加えると飛散するものはろ紙を帽子状にしてかぶせて徐々に灰化する。糖分の多いものは加熱すると膨張してビーカーからあふれることがあるためガラス棒で攪拌しながら注意して灰化する。

*4 残さを少量の水で湿らす。

*5 塩酸を加えて発泡する場合は，時計皿をかぶせてゆっくりと操作する。カルシウム剤など高カルシウム含有検体に起こりやすい。大量に酸を消費するものに対しては，10%塩酸溶液ではなく 20%塩酸溶液を使用する。その際，反応促進に超音波にかけると良い。発泡しなくなったら，時計皿についた液をビーカーに洗い落とす。
　また，黒く固まっている場合は塩酸を入れた後テフロン棒等で崩すと以下の操作がしやすくなる。

*6 加温し過ぎると塩酸が揮散するため注意する。

*7 健康食品などで灰化しにくいものについては残さについて(A)～(B)の操作を繰り返し，ろ液を合わせる。

*8 ポリメスフラスコを使用する。ポリメスフラスコは，壁面に気泡が付きやすいので気泡を除いてから定容する。

*9 希釈の必要なものは 1%塩酸を用いて希釈する。

*10 ビーカーから汚染，灰化中の雰囲気からの汚染，ろ過操作による汚染が考えられるため，空試験を行う。

6．検量線

ナトリウム標準液を1%塩酸で適宜希釈し，20，15，10，4，2，1及び0.4μg／mlの濃度列を作成する。これらの濃度列について原子吸光光度計による測定（試験溶液と同一条件）を実施し，検量線を得る。

7．計算

試料中のナトリウム含有量（mg/100g）＝（A－A_0）×B×C×F×1/W×1/10

A：試験溶液のナトリウム濃度（測定値）（μg/ml）

A_0：空試験溶液のナトリウム濃度（測定値）（μg/ml）

B：希釈倍率

C：定容量（ml）

F：標準溶液のファクター

W：試料採取量（g）

8．単位

「7．計算」により得られた結果について，1000mg/100g 未満の場合にはそのまま報告値とし，1000mg/100g以上の場合は試験結果を1000で除してg/100gに換算したものを報告値とする。

9．検出限界

試験溶液の測定下限を0.05μg/mlとし，試料に係る検出限界を下記のとおり算出する。

ナトリウム の検出限界（mg/100g）＝

0.05μg/ml×100ml×1.000×1/5g×1/10 = 0.1mg/100g

（ここで，標準溶液のファクター1.000，試料採取量5g，定容量100ml）

10．有効数字

提出値は有効数字3桁とし，最小桁数は小数点以下1桁(mg)とする。

以　上

別紙３－１７

宇宙日本食認証に係る
リン，鉄，カルシウム定量の操作手順

2006年11月

1．概要

申請食品のリン，鉄，カルシウムの定量は，「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について」（平成 11 年 4 月 26 日 衛新第 13 号，Analytical Methods for Nutrition Labeling in Japan）に準拠する。すなわち，高温で有機物を燃焼除去し，残さ（灰）を 1%塩酸に溶解して測定溶液を調製し，誘導結合プラズマ（ICP）発光分析法で定量する。

2．器具及び装置

・検体調製器具
・天秤(0.001g 又は 0.0001g まで秤量できるもの)
・ホットプレート
・電気コンロ又は高温ホットプレート
・電気炉
・パイレックス製ビーカー(50ml,30ml)又は同等品
・ホールピペット又は同等品
・駒込ピペット
・メスフラスコ
・時計皿
・ロート
・ろ紙(ADVANTEC 5A 又は同等品)
・ICP 発光分析装置

3．試薬

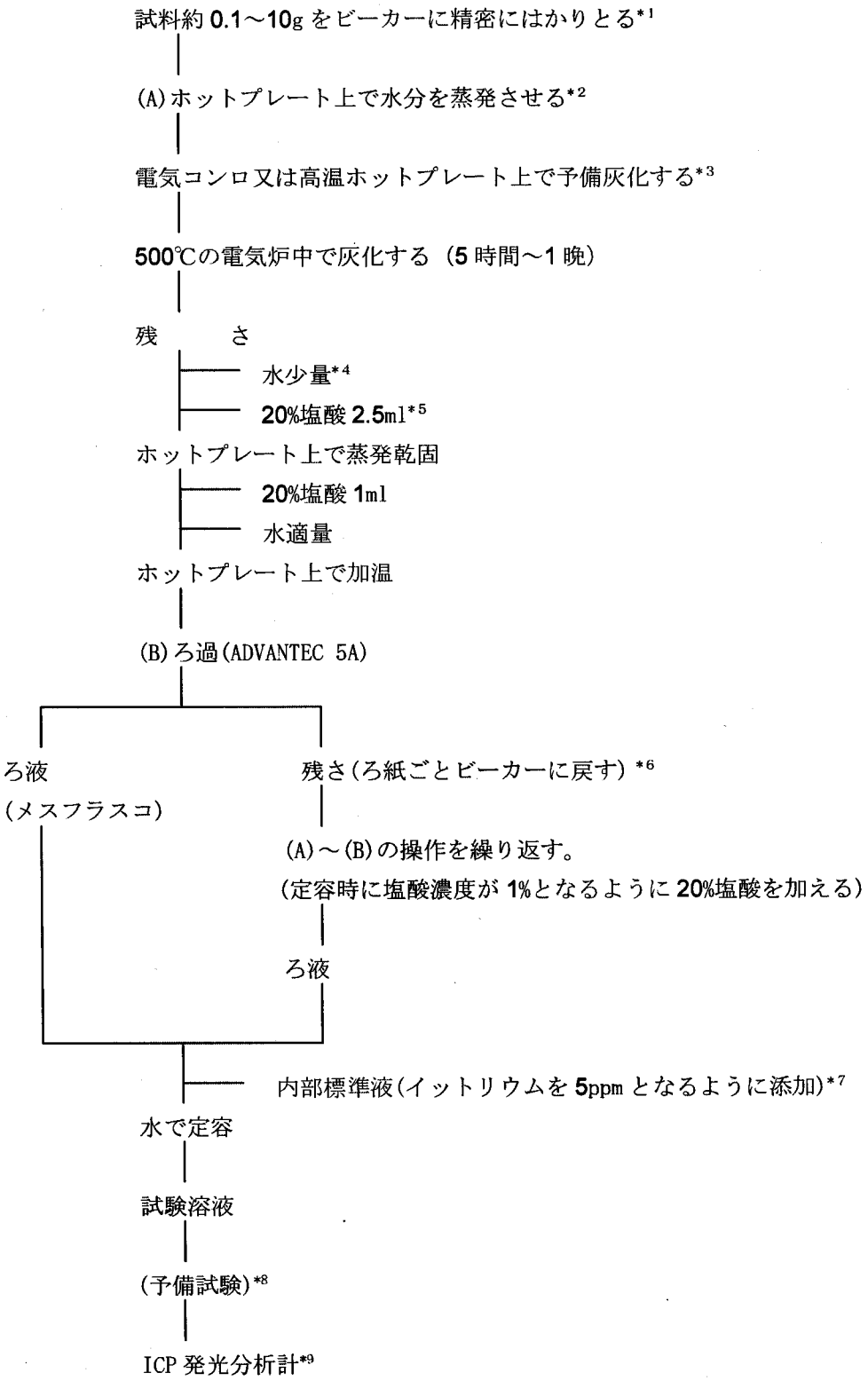
・リン，鉄及びカルシウム標準溶液
・水(イオン交換水又は同等以上のもの)
・ 20%塩酸(精密分析用)
・ イットリウム標準液

4．検量線用標準溶液の調製

リン，鉄，及びカルシウム標準液を 1%塩酸で適宜希釈し，混合標準溶液を作成する。調製濃度は５.操作 表-1 に従う。

5．操作

以下に操作の流れをフローシートで示すとともに，それぞれの操作における注意事項を箇条書きで示す。


試料約 0.1～10g をビーカーに精密にはかりとる*1
(A)ホットプレート上で水分を蒸発させる*2
電気コンロ又は高温ホットプレート上で予備灰化する*3
500℃の電気炉中で灰化する (5 時間～1 晩)
残　　さ
水少量*4
20%塩酸 2.5ml*5
ホットプレート上で蒸発乾固
20%塩酸 1ml
水適量
ホットプレート上で加温
(B)ろ過(ADVANTEC 5A)
ろ液
(メスフラスコ)
残さ(ろ紙ごとビーカーに戻す) *6
(A)～(B)の操作を繰り返す。
(定容時に塩酸濃度が 1%となるように 20%塩酸を加える)
ろ液
内部標準液(イットリウムを 5ppm となるように添加)*7
水で定容
試験溶液
(予備試験)*8
ICP 発光分析計*9

【操作上の注意事項】

*1 カルシウムやケイ素などの含有量が多く処理が困難な場合や検体量が少ない場合は，1g以下で採取してもよい。また目的元素の含有量が少ないもの(測定時に希釈を行わないもの)は，空試験として空ビーカーを試料と併行して処理する。

*2 煙がでなくなる程度まで行う。なお，乾燥状態の試料はこの操作を省略してよい。

*3 ドラフトの中で黒く炭化して煙が出なくなるまで灰化する。熱を加えると発砲するものはろ紙を帽子状にしてかぶせて徐々に灰化する。糖分の多いものは加熱すると膨張してビーカーからあふれることがあるため，ガラス棒で攪拌しながら注意して灰化する。

*4 残さを少量の水で湿らす程度加える。

*5 塩酸を加えて発泡する場合は，時計皿をかぶせてゆっくりと操作し，やや多めに塩酸を加えるとよい。カルシウム剤など高カルシウム含有検体に起こりやすい。また，黒く固まっている場合はガラス棒等で崩してから行うと以降の操作がしやすくなる。

*6 鉄やマンガンは有機物に吸着されるため，再灰化を行う。

*7 測定に際しては，検体のマトリックスに注意を払う。特定の無機成分が高濃度含有されている場合の微量成分の測定においては測定の妨害が起こりやすい。その場合，内部標準の補正を行う。また複数波長での測定，標準添加法も有効な方法である。

*8 必要に応じて予備試験を実施し，試験溶液の濃度が検量線範囲を超える場合には1%塩酸溶液となるように希釈を行う。

*9 作成した標準溶液をもとに表-1 に示した濃度範囲ごとに検量線を作成し，それぞれの相関係数が 0.999 以上であること確認する。分析波長は表-2 に従う。また試験溶液の濃度が検量線より低濃度の場合には，試料採取量を増やして再試験を行う。

表-1　検量線濃度範囲

分析項目	(0)*1, 0.1, 0.5, 1 (・g/ml)	(0) *2, 1, 5, 10 (・g/ml)	10, 50, 100, (・g/ml)
リン	—	○	○
カルシウム	—	○	○
鉄	○	○	—

*1 鉄は 0ppm を含めて検量線を作成する。

*2 リン及びカルシウムは 0ppm を含めて検量線を作成する。

表-2　分析波長

分析項目	分析波長(nm) *1	予備波長(nm)	予備波長(nm)	予備波長(nm)
リン	213.618	253.561	214.914	—
カルシウム	317.933	393.366	422.673	315.887
鉄	238.204	259.940	234.350	—

*1 分光干渉が認められる場合には予備波長を用いて測定する。ただし，高濃度領域では元素によって光飽和現象が発生するため，使用できない場合がある。

6．計算

試料中の元素含有量(mg/100g) = C×V×P×F×1/W×1/10

C：試験溶液中の測定元素濃度(・g/ml)

V：定容量(ml)

P：希釈率

7．単位

「6．計算」により得られた結果について，1000mg/100g 未満の場合にはそのまま報告値とし，1000mg/100g以上の場合は試験結果を1000で除してg/100gに換算したものを報告値とする。

8．検出限界

各元素の測定下限濃度（下表第 2 欄）を基準とし，試料に係る検出限界（下表第 4 欄）を下記のとおり算出する。

各元素の検出限界(mg/100g)＝

各元素の測定下限濃度(μg/ml)×50ml×1/5～10g×1/10 ＝検出限界(mg/100g)

(ここで，定容量 50ml)

第1欄	第2欄	第3欄	第4欄
分析項目	測定下限濃度 (μg/ml)	試料採取量 (g)	検出限界 (mg/100g)
リン	1	5	1
カルシウム	1	5	1
鉄	0.1	5	0.1

9．有効数字

提出値は有効数字3桁とし，最小桁数は小数点以下1桁(mg)とする。

以　　上

別紙４－１

宇宙日本食認証に係る品質検査の操作手順
（水分活性検査編）

2011年5月

1．概要

水分活性（Water Activity，Aw）とは，食品中の微生物が増殖に際して利用できる水分，すなわち食品中の遊離水分（自由水）の割合を示す指数である。無水物では Aw＝0，純水では Aw＝1 であり，通常の食品では 0＜Aw＜1 となる。

水分活性の測定法には，平衡蒸気圧法，凍結法，膨潤圧法などがあるが，平衡蒸気圧法が一般的である。さらに，平衡蒸気圧法には下記の２種があるが，申請食品の水分活性の測定では，AOAC Official Method 978.18 の方法に準拠し，下記の①を基本原理とする電気抵抗式湿度測定法を採用する。

①一定温度の密閉空間に試料を置いて平衡状態にした時の当該空間中の相対湿度（RH）を測定するか，逆に空間中の相対湿度を一定にして試料中の水分の増減を測定する。

②一定の温度で試料を真空下に置いたときの平衡水蒸気圧（Ｐ）を直接測定し，同一温度における純水の飽和水蒸気圧（P_0）との比より求める。このとき，水分活性は次式で表される。

Aw ＝ Ｐ（一定温度下の当該試料の蒸気圧）／P_0（一定温度下の純水の蒸気圧）

＝ ＲＨ（相対湿度）／100

なお，エタノール，酢酸，揮発性アミン類，香料などの揮発性物質，あるいはグリセリンやポリオール類を多く含む食品の場合は，それらの妨害による測定誤差を生じ易い。

2．機器

・電気抵抗式水分活性測定装置

3．試薬

・測定装置点検用湿度標準液（塩類飽和液）：予想される試料の水分活性値に近い数値を有する塩類の飽和溶液を下表の中から選択する。予想される試料の水分活性が１に近いときは純水を用いてもよい。

表１　各種試薬（塩類）の飽和水溶液が25℃で示す水分活性値

試　薬	水分活性	試　薬	水分活性
塩化リチウム（$LiCl \cdot H_2O$）	0.110	硝酸ナトリウム（$NaNO_3$）	0.737
酢酸カリウム（CH_3COOK）	0.224	塩化ナトリウム（NaCl）	0.752
塩化マグネシウム（$MgCl_2 \cdot 6H_2O$）	0.330	臭化カリウム（KBr）	0.807
炭酸カリウム（$K_2CO_3 \cdot 2H_2O$）	0.427	塩化カリウム（KCl）	0.842
硝酸リチウム（$LiNO_3 \cdot 3H_2O$）	0.470	塩化バリウム（$BaCl_2 \cdot 2H_2O$）	0.901
硝酸マグネシウム（$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$）	0.528	硝酸カリウム（KNO_3）	0.924
臭化ナトリウム（$NaBr \cdot 2H_2O$）	0.577	硫酸カリウム（K_2SO_4）	0.969
塩化ストロンチウム（$SrCl_2 \cdot 6H_2O$）	0.708	重クロム酸カリウム（$K_2Cr_2O_7$）	0.980

４．検体数

①検体必要量

包装完全性試験に合格したもの３検体以上。

但し、検体（内容物）重量の合計が30gに満たない場合は、30g以上に相当する検体数を検査に供すること。

②試料の準備

上記①で準備した３検体をよく混合した検査試料を１つ準備する。

５．操作

試料の適量（試料室の全容量の2/3程度に相当する量）を密閉容器の試料室中に置く。必要に応じて保護フィルタ（酢酸フィルタ，アルコールフィルタなど）を取り付ける。容器を湿度センサー付き測定ヘッドで密閉し，所定の温度（25℃）に設定した恒温器中に置く。15，30，60，90及び120分後の数値を記録する。30分間隔での測定値の変化が許容範囲内（Aw＝0.005）になった場合，安定値とみなす。（許容範囲内にない場合には，許容範囲内となるまで，その後も30分間隔で記録を続ける）

装置に付属の点検用標準液（塩類飽和液），あるいは上記「３．試薬」で選んだ点検用湿度標準液（塩類飽和液）を用いて電気抵抗式湿度センサーの点検を行う。なお，操作の詳細については装置に付属の測定マニュアルを参照すること。

参考文献

AOAC Official Method 978.18，AOAC Official Method of Analysis，Chapter 42，P.2（1995）

以　上

別紙４－２

宇宙日本食認証に係る品質検査の操作手順
（粘度検査編）

2011年5月

１．概要

本手順書は、宇宙日本食の認証に係る粘度の測定の操作手順を示すものである。

粘度の測定法には、低粘度の液体に用いられる毛細管粘度計など、様々なものがあるが、ここでは、回転粘度計を用いる。

２．試験方法

２．１　機器

（１）　B 型粘度計：アナログ式、デジタル式を問わないが、毎分 12 回転の設定で測定できるものを使用する。

（２）　試料容器：粘度計メーカーが少量測定用に用意しているアダプター容器、又は粘度計のローター(あるいはスピンドル)が入る深さの任意の容器(例えば 500ml 容以上のビーカー等)を用意する。

（３）　温度計

水銀温度計、サーミスタ温度計など 20℃近辺が測定できるもの。

２．２　検体数

①検体必要量

包装完全性試験に合格したもの３検体以上。

但し、検体（内容物）重量の合計が 30g に満たない場合は、30g 以上に相当する検体数を検査に供すること。

②試料の準備

上記①で準備した３検体をよく混合した検査試料を１つ準備する。

２．３　操作

（１）　粘度計の回転軸を鉛直に固定し、装置のゼロ補正を行う。時々は粘性既知のオイル(粘度校正に市販されている JS10 から JS100 くらいのものが推奨される)等で校正する。

（２）　ローターと、U 字型ガードを取り付ける。少量試料アダプターを用いる場合は、ガードは必要ない。ローターの装置定数を確かめる。下に述べる基準の、12rpm において 1500mPa・s 付近の粘度測定には、#2 ローターが適すが、より低粘度では大きいローター、高粘度のものには小さいローターを用いる。

（３）試料は測定温度(20±2℃)に十分長時間保つ。表面からの水分蒸発を防ぐため、ラップなどで測定直前まで覆っておく。

（４）　試料容器の中央に粘度計のローターをローター軸の目盛り線の深さまで入れる。12rpm で回転させ、2 分後の粘度計の示度を読む。示度は粘度計の測定範囲に対して 80%前後を指すときが最も誤差が小さくなる。極端に低い示度の場合は、より大きいローターに取り替える必要がある。

３．注意

（１）　粘度は測定温度依存性が大きい(1℃違うと値は大きく異なる)ので、恒温水槽中に試料容器を漬ける必要がある。一般に低温ほど粘度は高くなる。本基準では測定のしやすい 20±2℃(測定中の温度変化は最大でも 0.5℃以下に抑えること)で測定する。

（２）均質な液状だけではなく、液体中に小さい硬い固形物が存在する試料の場合は値のばらつきが大きくなる。均質な場合以上に繰り返し測定を行う。固形物が

存在する試料には、ローターとガード、または装置添付のアダプター内壁間との距離が小さいとうまく測定できない。

（3） 一定の外力(降伏値)が働くまでは流動しない試料、粘性値が時間と共に変化し、回転を上げていった場合と高速回転から下げてきた場合とで同じ回転数条件下でも見かけの粘性値が異なる試料も多い。本法は回転を上げ 12rpm に達してから 2 分後の値を読むこととしている。

（4） ゾル中に固形物を含む場合(固形物の重量比率が 50%以下でなければならない)は混合系全体を測定する。

5．報告

試料の粘度を以下の式により求める。

粘度(mPa・s)＝粘度計の示度の平均値×装置定数

参考文献

神山かおる：食品総合研究所食品機能性研究マニュアル

以　上

別紙４－３

宇宙日本食認証に係る品質検査の操作手順
（官能検査編）

2013年7月

1．　概要（Scope）

本手順書は，宇宙食の認証に係る官能検査の操作手順等を示すものである。すなわち，申請食品の（a）外観，（b）色，（c）におい，（d）風味，及び（e）食感を官能的に評価する際の手順等を示すものである。また，“水戻し（re-hydration）”後に食する食品にあっては，“水戻し”後の状態についても評価する。

2．　試験方法（Test Method）

官能検査は，JIS Z 9080「官能評価分析－方法（2004）」に定める採点法（尺度法）（ISO 4121 尺度を用いる方法による食品の官能評価分析に対応。）によって実施する。なお，用いる尺度は９段階尺度とし，別紙１に示す「宇宙日本食認証・官能検査 質問・回答用紙」を用いて実施する。

2.1 試験結果の判定（Evaluation of Test Results）

９段階尺度を用いる官能評価において，総合評価の平均点が「６」未満であった候補品は宇宙食として「不適」と判定する。ただし，有人サポート委員会宇宙食分科会が「適」と判定する場合には，後者の判定を優先する。

3．　試験実施に係る要求事項（Procedural Requirements）

3.1 検査パネル（Technical Panel）

五基本味（甘味，酸味，塩味，苦味，旨味）ならびに臭気に係る能力評価試験で選抜された 12 名以上のパネリスト（ただし，官能検査の訓練を受けた者３名以上を含む。）で構成されるパネルを用いる。

3.2 試験品（食品）の調製（Food Preparation）

試験品は，実際に宇宙船や宇宙ステーション内で食するのと同じ温度や状態で供試する必要がある。すなわち，

（ａ）缶詰，レトルトパウチ食品の場合：そのまま開封（開缶）した後に，あるいは湯浴（80℃）中で所定の時間加温した後に開封して供試する。なお，白飯用ソース類等については，別途に白飯を準備して食する。

（ｂ）凍結乾燥食品の場合：開封して所定の温度の水を加え，所定の時間置いて“水戻し”し，“水戻し”が完了している（試食できる状態になっている）のを確認してから供試する。ただし，“水戻し”完了後，30 分以内に供試すること。また，“水戻し”後の状態を 3.3 に示す手順で評価すること（ただし，官能検査の訓練を受けたパネリストのみで実施）。

（ｃ）菓子，デザート類の場合：そのまま開封して供試する。

（ｄ）調味料類の場合：基本的には、そのまま開封し供試するが、食品の種類によっては、喫食方法を適宜判断する。

3.3 “水戻し”後の状態の評価 (Rehydration Test Procedures)

凍結乾燥食品の“水戻し”後の状態の適否を評価するため，以下の試験を２食分あるいは３食分を用いて実施する。

3.3.1 柔軟性のあるフィルム容器（４×4.5 inches）に１食分を移し入れる。

3.3.2 当該フィルム容器に水を注ぎ入れるための“注ぎ口”を造る。

3.3.3 “注ぎ口”から所定の温度の水を所定量加える。

3.3.4 容器を閉じる。（締め金等で液漏れを防ぐこと。）

3.3.5 “水戻し”の所定時間に達するまでの間，容器を上下にひっくり返したり，容器をもんだりして水が当該食品全体に行き渡るようにする。

3.3.6 所定の時間に達したら，容器の中身を適当な食器の上に取り出し，“水戻し”が不十分な部分や具材が無いかどうかを目視で調べる。

3.3.7 評価の結果は，“水戻しは満足できる状態”あるいは“水戻しは不満足な状態”の何れかで表す。ここに言う“水戻しは不満足な状態”とは次の（１），（２）の何れかに該当する場合である。

（１）食品の一部に堅かったり，乾燥している部分や具材（乾燥肉片，乾燥野菜，乾燥果実など）が残っている場合。

（２）当該食品では通常見られない状態，すなわち分離や接合が起こっていたり，固まりが多過ぎたり，粉っぽかったり，あるいは粘り過ぎる場合など。

3.3.8 結果を別紙１に記録する。

3.4 試験品（食品）の供試量 (Sample Size for Organoleptic Test)

各パネリストが，それぞれの候補食品について，宇宙食としての適否を公平に評価できるだけの十分量を供試すること。

４． 試験の報告／記録 (Reporting／Recording)

９段階尺度法による平均点が「６」以上であれば，宇宙食として「適」であると判定する。この他，試験の報告／記録に必要なものを，(a) 外観，(b) 色，(c) におい，(d) 風味，及び (e) 食感に係る採点の「平均値」，「範囲（最大値と最小値の差）」及び「標準偏差」とする。

別紙１：宇宙食認証・官能検査 質問・回答用紙

年　月　日

試験品（名称）：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

氏名 ＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

A．外観，風味等の評価　　試食量：＿＿＿＿＿＿g

試験品の外観，色，におい，風味，および食感について下記の９段階の尺度で評価し，評価値の箇所に○印を記して下さい。

尺　度	9	8	7	6	5	4	3	2	1
	最も良い	かなり良い	少し良い	わずかに良い	良いとも悪いとも言えない	わずかに悪い	少し悪い	かなり悪い	最も悪い
外　観									
色									
におい									
風　味									
食　感									
総合評価									
コメント									

B．“水戻し”後の状態の評価

・“水戻し”に使用した水量：＿＿＿＿＿＿ml（水温：＿＿＿＿℃）
・“水戻し”時間：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿min
・“水戻し”後の状態：　① 満足できる状態　② 不満足な状態　③ どちらとも言えない

ご協力有り難うございました。

別紙５

宇宙日本食認証に係る保存試験手順

2006年11月

1．範囲（Scope）

本文書は宇宙日本食認証に係る保存手順について定めたものである。

2．設備及び器具

2．1　保管庫

試験食品は、2～35℃±2℃の温度調節が可能な定温庫に保存する。

2．2　温度記録計

庫内温度の測定は、週に1回以上実施する。温度センサーの設置場所は、庫内の中間部2箇所とする。測定結果は、保存記録書に記録する。

3．保存状況記録

週に1回、目視により保管状況を調査し、保存記録書に記録する。

4．低温及び高温試験

保存中に、2℃の低温を1日、35℃を2日間、30℃を6日間の高温に保管庫の温度を変動させること。この実施については、保存記録に記録する。

5．保存記録

保存記録は別記様式とし、宇宙日本食認証申請書に写しを添付すること。

宇宙日本食認証用保存記録

食品名称		企業名	
保存開始日	年　月　日	保存終了日	年　月　日

年月日	庫内温度①	庫内温度②	状態（異常の有無と処置結果）	低温・高温実施状況	検印

別紙６

宇宙日本食認証に係る調理等適合検査手順

2013年7月

1．範囲（Scope）

本文書は宇宙日本食認証に係るISS搭載調理器具との適合性の検証について定めたものである。

2．検査器具

㈱エイ・イー・エス社製　　宇宙食加温器
　　宇宙食注湯器

デジタルスケール(秤)

3．検査方法：

1食品を3名の検査員により、別添評価票を用いて検査する。

① 評価品を選ぶ。
② 評価票に所要事項を記入する。
③ 器具にセットして加温・加水する。
④ 器具から取り外し、外観を目視で観察する。
　とくに加水食品の水漏れ検査する。
⑤ 触感（温度・重量）を検査する。
⑥ 開封
⑦ 試食
⑧ 食事途中での容器の検査をする。
⑨ 評価結果を評価票に記入する。
⑩ 残渣の重量をデジタルスケールで測定する。

4．食品残渣の試験法について

食品残渣の試験法については、以下の考え方に基づき実施するものとする。

① 食品残渣の評価基準は、下表のとおりとする。

表　食品残渣の評価点

食品残渣の割合	1%未満	1～5%未満	5～10%未満	10～20%未満	20%以上
評価点	5	4	3	2	1

② スパウト付パッケージやチューブタイプパッケージの様に、通常の喫食では食品残渣の結果に、個人差が含まれてしまう食品の場合には、手で軽く押しだした後に残渣を測定する。

宇宙日本食　調理等適合検査　評価票　〔レトルト食品〕

検査日時	年　月　日（　）　時　分～　時　分					
検査場所						
食品名称						
食品形態						
加温設定	℃　分間					
加温後の状態	項　目	評　価				
	触感（温度感）	5 容易に持てる	4 熱さを感じず持てる	3 熱さを感じるが持てる	2 熱くて持ち続けられない	1 熱くて持てない
	触感（重量感）	5 容易に持てる	4 重さを感じず持てる	3 重さを感じるが持てる	2 重くて持ち続けられない	1 重くて持てない
	開封の容易度	5 極めて容易に開封できる	4 容易に開封できる	3 面倒だが開封できる	2 開封しにくい	1 開封に失敗した
	食べやすさ	5 極めて容易に口に運べる	4 容易に口に運べる	3 工夫すれば口に運べる	2 ややこぼれる	1 多くがこぼれる
	食事中の容器の安定度	5 極めて安定	4 ほぼ安定	3 工夫すれば置ける	2 途中で転倒	1 全く置けない
	食品残渣の割合	5 １%未満	4 １～５%	3 ５～１０%	2 １０～２０%	1 ２０%以上
	食用後の容器の処理しやすさ	5 極めて容易に処理できる	4 容易に処理できる	3 工夫すれば処理できる	2 処理できるが手指が汚れる	1 処理できない
その他特記事項						
検査員氏名						

写真添付

宇宙日本食　調理等適合検査　評価票　〔加水食品（固形）〕

検査日時	年　月　日（　）　時　分～　時　分					
検査場所						
食品名称						
食品形態						
加水設定	℃　ml					
加水後の状態	項　目	評　価				
	触感（温度感）	5	4	3	2	1
		容易に持てる	熱さを感じず持てる	熱さを感じるが持てる	熱くて持ち続けられない	熱くて持てない
	触感（重量感）	5	4	3	2	1
		容易に持てる	重さを感じず持てる	重さを感じるが持てる	重くて持ち続けられない	重くて持てない
	注水部からの水漏れ	5	4	3	2	1
		全く無い	ややにじむ	ややにじんで漏れる	にじんで漏れる	漏れが止まらない
	開封の容易度	5	4	3	2	1
		極めて容易に開封できる	容易に開封できる	面倒だが開封できる	開封しにくい	開封に失敗した
	食べやすさ	5	4	3	2	1
		極めて容易に口に運べる	容易に口に運べる	工夫すれば口に運べる	ややこぼれる	多くがこぼれる
	食事中の容器の安定度	5	4	3	2	1
		極めて安定	ほぼ安定	工夫すれば置ける	途中で転倒	全く置けない
	食品残渣の割合	5	4	3	2	1
		１%未満	１～５%	５～１０%	１０～２０%	２０%以上
	食用後の容器の処理しやすさ	5	4	3	2	1
		極めて容易に処理できる	容易に処理できる	工夫すれば処理できる	処理できるが手指が汚れる	処理できない
その他特記事項						
検査員氏名						

写真添付

宇宙日本食　調理等適合検査　評価票　〔加水食品（液体）〕

検査日時	年　月　日（　）　時　分～　時　分					
検査場所						
食品名称						
食品形態						
加水設定	℃　ml					
加水後の状態	項　目	評　価				
	触感（温度感）	5 容易に持てる	4 熱さを感じず持てる	3 熱さを感じるが持てる	2 熱くて持ち続けられない	1 熱くて持てない
	触感（重量感）	5 容易に持てる	4 重さを感じず持てる	3 重さを感じるが持てる	2 重くて持ち続けられない	1 重くて持てない
	注水部からの水漏れ	5 全く無い	4 ややにじむ	3 ややにじんで漏れる	2 にじんで漏れる	1 漏れが止まらない
	開栓のし易さ	5 極めて容易に開栓できる	4 容易に開栓できる	3 工夫すれば開栓できる	2 開栓しにくい	1 開封できない
	気泡の有無	5 全く無い	4 少しあるが支障は無い	3 かなりあるが飲用できる	2 気泡のため飲用しにくい	1 気泡のため飲用できない
	内容物の飲み口の通り易さ	5 極めて容易に通過できる	4 容易に通過できる	3 工夫すれば通過できる	2 通過しにくい	1 通過できない
	飲み易さ	5 極めて容易に飲用できる	4 容易に飲用できる	3 工夫すれば飲用できる	2 飲用しにくい	1 飲用できない
	内容物の温度	5	4	3	2	1
	温水	適温	ややぬるい	やや熱い	熱くて飲みづらい	熱くて飲めない
	冷水	適温	やや生ぬるい	やや冷たい	冷たくて飲みづらい	冷たくて飲めない
	飲用途中の再栓	5 極めて容易に再栓できる	4 容易に再栓できる	3 工夫すれば再栓できる	2 再栓しにくい	1 際栓できない
	食事中の容器の安定度	5 極めて安定	4 ほぼ安定	3 工夫すれば置ける	2 途中で転倒	1 全く置けない
	食品残渣の割合	5 １%未満	4 １～５%	3 ５～１０%	2 １０～２０%	1 ２０%以上
	食用後の容器の処理しやすさ	5 極めて容易に処理できる	4 容易に処理できる	3 工夫すれば処理できる	2 処理できるが手指が汚れる	1 処理できない
その他特記事項						
検査員氏名						

写真添付

別紙７－１

宇宙日本食認証に係る容器包装要求基準

2009年6月

1．範囲（Scope）

本文書は宇宙日本食認証に係る容器包装要求基準について定めたものである。

2．形態及びサイズ

宇宙日本食に用いる容器包装は、以下の形態・サイズであること。

	用途	形態	セプタム（注1）	スパウト（注2）	サイズ
1	温度安定化食品	平袋	なし	なし	幅130×長さ180mm以下
2		スタンド	なし	なし	幅130×長さ180×厚さ35mm以下
3		缶詰	なし	なし	幅、長さ、直径、高さの最大値が120mm以下
4	加水食品	平袋	あり	なし	幅100×長さ162mm以下
5		ガセット	あり	なし	幅100×長さ162×厚さ38mm以下
6		平袋	あり	あり	幅100×長さ218mm以下
7		ガセット	あり	あり	幅100×長さ218×厚さ38mm以下
8	調味料	小袋(注3)	なし	なし	原則として1回で使い切るサイズ

注1　セプタムはISS搭載のニードルアダプターとインターフェースがとれていること。

注2　スパウトは内容物が残った状態で飲食を中断しても内容物の遺漏が無い機能を有すること。

注3　キャップを付属する場合は、本体と紐等で結合すること。

注4　№3～7については、Alを積層したフィルム包装で外装すること。

3．強度及び材質

（1）強度

食品衛生法及びその関連規則の要求を満足すること。

但し、突き刺し強度試験においては、最大荷重は温度安定化食品（缶詰を除く）は12N、加水食品用は18N以上であること。

（2）材質

食品衛生法及びその関連規則の要求を満足すること。

また、別紙7－2に示すオフガス試験に合格すること。

4．その他

（1）内容物の摂食がしにくくないこと。

（2）内容物が食べきりやすいこと。

（3）宇宙船内で扱いにくくないこと。

（4）輸送容器に収納効率が悪くないこと。

（5）重量が重くないこと。

（6）缶詰については、廃棄物の重量・体積の削減に配慮したものであること。

（7）市販品パッケージを用いる場合は企業名等が目立たないこと。

これらの項目は、開発済みの容器を基準に、認証機関が評価する

以　上

別紙７－２

宇宙日本食認証に係る容器包装試験手順

2009年6月

1．範囲（Scope）

本文書は宇宙日本食認証に係る容器包装試験手順について定めたものである。

試験 1：オフガス試験

・試験概要

試験結果に影響を与えるようなガスを発生しないことが確認されたチャンバ内に供試体は設置される。チャンバ内は純空気で満たされた後 49℃で 72 時間加熱される。その際発生したオフガスを分析装置を用いて定性、定量分析し、オフガスの成分と量の評価を行なう。

・最小必要供試体量

総面積 2000cm^2 あるいは 40g

・設備概要

小型チャンバ装置

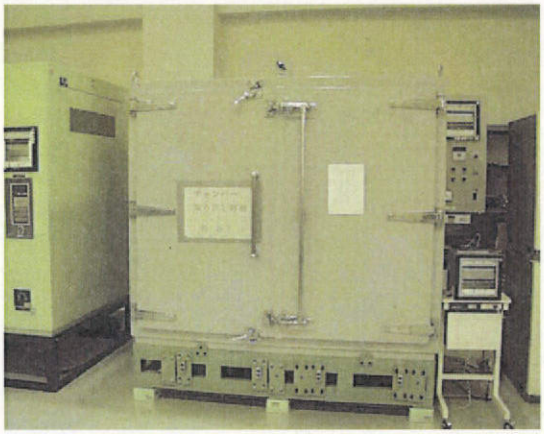
比較的小型な供試体からオフガス発生を行なうための装置で以下の機器により構成される。

1)小型チャンバ

2,4,10,20,100,400,800,1000L の各チャンバ

2)恒温槽

チャンバを一定温度に加熱。



3)加圧真空装置

チャンバ内純空気置換用

4)搬送装置

チャンバ輸送用

・分析装置

1)ガスクロマトグラフ

主にオフガスの定量分析を行なう。

2)ガスクロマトグラフ質量分析計

主にオフガスの定性分析を行なう。

3)フーリエ変換赤外分光光度計

主にオフガス中のアンモニアの定量・定性分析を行なう。

・試験手順

チャンバ サーティフィケーション	●チャンバクリーニング ●リークチェック ●清掃度チェック

↓

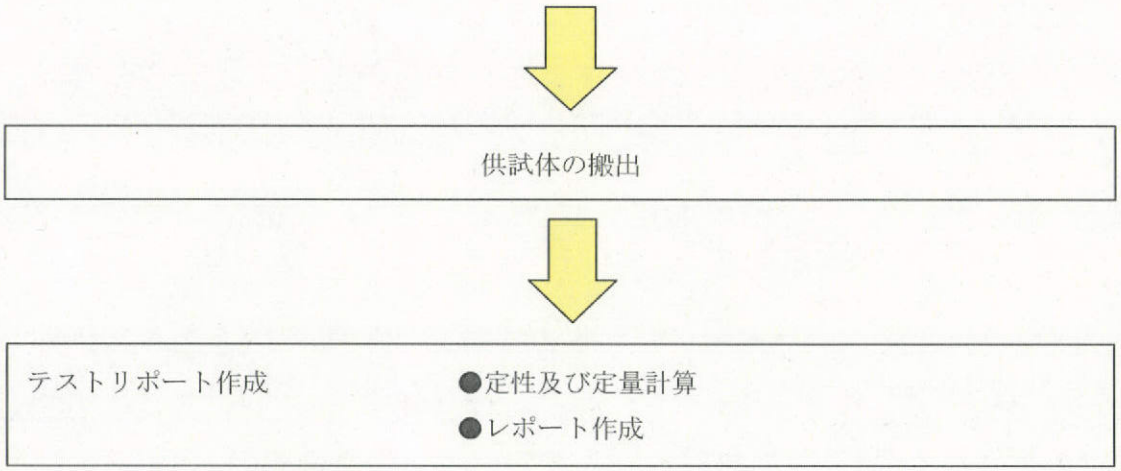
供試体の受入 ローディング	●受入検査 ●ローディング

↓

オフガス発生	●自由度体積測定 ●純空気置換 ●加熱 49℃72 時間 ●圧力測定

↓

オフガス成分の分析	●主要オフガス全般の定量：ｷｬﾋﾟﾗﾘｶﾞｽｸﾛﾏﾄｸﾞﾗﾌ ●メタン及び低沸点化合物の定量：ﾊﾟｯｸﾄﾞｶﾞｽｸﾛﾏﾄｸﾞﾗﾌ ●一酸化炭素の定量：ﾒﾀﾝｶﾞｽｸﾛﾏﾄｸﾞﾗﾌ ●硫黄化合物の定量：ＦＰＤｶﾞｽｸﾛﾏﾄｸﾞﾗﾌ ●水素及び無機物の定量：ＴＣＤｶﾞｽｸﾛﾏﾄｸﾞﾗﾌ ●窒素化合物の定量：ＦＴＤｶﾞｽｸﾛﾏﾄｸﾞﾗﾌ ↓ ●定性分析：ｶﾞｽｸﾛﾏﾄｸﾞﾗﾌ質量分析計 ↓ ●アンモニアの定量、定性分析：フーリエ変換赤外分光光度計



以　上