

## マカロニ類の粗たん白質（ケルダール法）測定手順書

	ページ
パルナスワグナー型蒸留	1
塩入奥田式蒸留	7
自動蒸留	13
共同試験結果	20

# マカロニ類の粗たん白質測定手順書 (ケルダール法・パルナスワグナー型蒸留)

## 1. 適用範囲

この測定方法（ケルダール法・パルナスワグナー型蒸留）は日本農林規格におけるマカロニ類に適用する。

## 2. 測定方法の概要

試料に硫酸、分解促進剤を加え分解した後、水酸化ナトリウムを加え、水蒸気蒸留する。ほう酸溶液で留液を捕集し、硫酸で滴定して、滴定に要した硫酸の量から全窒素含有量を算出し、たん白換算係数 5.7 を乗じて粗たん白質とする。

## 3. 注意事項

- (a) 硫酸、水酸化ナトリウム及び水酸化ナトリウム溶液を使用する際には、保護メガネ及びそれらの試薬に耐性のある手袋を使用すること。
- (b) 分解は耐酸性ドラフト内で行うこと。

## 4. 試薬等

### 4.1 測定に使用する試薬等

- (a) 水：蒸留法もしくはイオン交換法によって精製した水又は逆浸透法、蒸留法、イオン交換法などを組み合わせた方法によって精製したもので、JIS K8008 に規定する A2 以上の品質を有するもの。
- (b) 硫酸：日本工業規格に規定される（JIS K8951）特級、又はそれらと同等以上のもの。
- (c) 硫酸カリウム：JIS K8962 に規定される特級、又はそれらと同等以上のもの。
- (d) 硫酸銅（Ⅱ）五水和物：JIS K8983 に規定される特級、又はそれらと同等以上のもの。
- (e) 二酸化チタン：純度 98.5 %以上 アナターゼ型
- (f) ほう酸：JIS K8863 に規定される特級又は同等以上のもの。
- (g) 水酸化ナトリウム：JIS K8576 に規定される特級、又はそれらと同等以上のもの。
- (h) ブロモクレゾールグリーン：JIS K8840 に規定される特級、又はそれらと同等以上のもの。
- (i) メチルレッド：JIS K8896 に規定される特級、又はそれらと同等以上のもの。
- (j) エタノール (95)：JIS K8102 に規定されている一級、又はそれらと同等以上のもの。
- (k) 沸騰石：沸騰石もしくは同様の作用をするもの

### 4.2 滴定溶液の標定に使用する試薬

- (a) ブロモフェノールブルー：JIS K8844 に規定される特級、又はそれらと同等以上のもの

もの。

(b) エタノール (95) : 「4.1 (j)」と同様のもの。

(c) 炭酸ナトリウム : JIS K8005 に規定される容量分析用標準物質を用いる。

## **5. 器具及び装置**

### **5.1 測定に使用するもの**

(a) 電子天びん : 小数第4位 (0.0001 g) まではかりとることのできるもの。ただし6及び7において秤量を実施する際に、小数第4位まで正確にはかりとる指示がなく、またはかりとる必要がない場合は、はかりとることのできる最小桁が小数第3位 (0.001 g) 以上の電子天びんを用いてもよい。

(b) 分解用容器 : 300mL 容ケルダールフラスコを用いる。

(c) 分解装置

出力可変式分解台 : 出力可変式でケルダールフラスコを熱することのできるもので、ビーカーに沸石を2～3個と水100 mLを入れ、10分間最大出力に保った熱源にのせたとき、5分以内に沸騰させる能力を有すること

(d) 水蒸気蒸留装置 (図1参照) :

パルナスワグナー型蒸留装置 ; 蒸留管 (真空瓶)、蒸気だまり (排気筒)、冷却管、水蒸気発生用のフラスコ等及び加熱装置、供試液及び水酸化ナトリウム水溶液を注ぎ込むための漏斗等、トラップ球、ピンチコック等

冷媒による冷却装置 (流水含む) ;

(e) ビュレット/自動ビュレット : 25 mL 容。JIS R3505 に規定されているクラス A 又は同等以上のもの。ため付ビュレット含む。

(f) 薬包紙

(g) 全量ピペット : 40 mL 容、蒸留に用いる。JIS R3503 に規定されているクラス A 又は同等以上のもの。

(h) 全量フラスコ : 100 mL 容、JIS R3503 に規定されているクラス A 又は同等以上のもの

### **5.2 滴定溶液の標定に使用するもの**

(a) るつぼ : 白金又は磁器のものを用いる。

(b) デシケーター : JIS K8001 に規定するもの。すなわち、乾燥剤として JIS Z0701 に規定するシリカゲル (A 形1種) を入れたデシケーターを用いる。シリカゲルは塩化コバルト (II) で着色したものとし、その色に変色したときには約 130 °C で加熱して再生する。

(c) マッフル炉 : 600 °C 以上まで乾燥できるもの。

(d) 全量ピペット : 10 mL 容。JIS R3505 に規定されているクラス A 又は同等以上のもの。

(e) 全量フラスコ : 500 mL 容。JIS R3505 に規定されているクラス A 又は同等以上のもの。

## 6. 試薬の調製

同一の組成や濃度の市販品等を用いる場合、及びファクターが与えられている市販の滴定液を利用し、その値を用いる場合、当該試薬の調製及び標定は不要である。

### 6.1 ブロモフェノールブルー溶液

ブロモフェノールブルー 0.10 g を 95 % エタノール水溶液 50 mL で溶解し水で 100 mL にする。

### 6.2 滴定液の調製及び標定

ファクターが小数第 3 位以下まで求められている、0.01 mol/L 硫酸を滴定液として用いる。すでに調製されている滴定液を下記 6.3 (b) により標定し、ファクターを計算してもよい。

### 6.3 0.01 mol/L 硫酸

#### (a) 調製

水を 830 mL ビーカー等に量りとり、硫酸 0.5 mL をかき混ぜながら徐々に加えて放冷した後、気密容器に入れて保存する。

#### (b) 標定

炭酸ナトリウムの必要量をるつぼに入れて 600 °C で約 60 分加熱した後、デシケーターに入れて放冷する。その中から、1.0 ~ 1.2 g を電子天びんで小数第 4 位まで量りとり、炭酸を含まない水に溶解して 500 mL とする。その 10 mL を全量ピペットでフラスコに正確にとり、炭酸を含まない水 35 mL およびブロモフェノールブルー溶液を 2 ~ 3 滴加えて 0.01 mol/L 硫酸で滴定する。

#### (c) 計算

$$\text{硫酸水溶液のファクター} = \frac{1000 \times w \times p}{V \times A \times M} \times \frac{10}{500}$$

w : 炭酸ナトリウム秤量値 (g)

p : 炭酸ナトリウムの純度

V : 滴定に要した 0.01 mol/L 硫酸の体積 (mL)

A : 滴定に使用した硫酸の濃度 (= 0.01 mol / L)

M : 炭酸ナトリウムの式量 (= 105.99)

※(a) 及び (b) を日本薬局方に準じて実施しても良い。

### 6.4 分解促進剤の調製 ((a) 及び (b) のいずれかを用いる。)

(a) 硫酸カリウム 9 g と硫酸銅 (II) 五水和物 1 g を混合する。(1)

(b) 硫酸カリウム 10 g、硫酸銅 (II) 五水和物 0.3 g、二酸化チタン 0.3 g を混合する(1)

### 6.5 ブロモクレゾールグリーン-メチルレッド混合指示薬溶液の調製

95 %エタノール 200 mL 中に、ブロモクレゾールグリーン 0.15 g 及びメチルレッド 0.10 g を含むように調製されたもの。

#### 6.6 水酸化ナトリウム水溶液の調製

水酸化ナトリウム 250 ~ 450 g につき水 500 mL で溶解し、さらに水を加えほぼ 1 L に希釈する。(25 ~ 45 % (w/V) 水酸化ナトリウム水溶液)

#### 6.7 ほう酸水溶液の調製

ほう酸を水で加温溶解し、1 L 中に 10 ~ 40 g 含まれるように調製する。

### 7. 測定手順

試料としてマカロニ類と空試験用試料を分析する。

配付された試料は試験時まで室温で保管する。

#### 7.1 試料採取

- (a) 電子天びんにより、薬包紙に試料約 0.5 g を小数第 4 位まで正確に量りとる。小数第 5 位以下まではかることのできる天びんの場合は小数第 5 位を四捨五入する。
- (b) 薬包紙ごと、試料をケルダールフラスコに入れる。
- (c) 空試験用試料として薬包紙のみをケルダールフラスコに入れる。以降の操作はマカロニ類の試料と同様に行う。

#### 7.2 分解

- (a) 試料を入れたケルダールフラスコに分解促進剤<sup>(1)</sup>及び硫酸 10 mL を加え、あらかじめ保温しておいた出力可変式分解台<sup>(2)</sup>の熱源の上に設置する。
- (b) はじめ、弱く加熱し、泡立ちがおさまったら、出力を上げ最大にする。
- (c) 時々、分解液を振り混ぜてフラスコの壁面についた炭化物をできるだけ洗い落とす。
- (d) 分解液が青色透明（二酸化チタンが含まれている場合は青緑透明）になった後、約 90 分間そのまま沸騰させる。全分解時間は 2 時間以上とする。
- (e) 分解終了後、室温まで放冷する。
- (f) 分解液を 100 mL 容全量フラスコに水で 3 回以上洗い込み、これを供試液とする。  
なお固形物がある場合はこれを溶解し（洗い込みと並行して行ってもよい）、ケルダールフラスコに水を入れて熱くなった場合は、放冷した後に全量フラスコに洗い込む。

#### 7.3 蒸留（図1参照）

あらかじめ、水蒸気発生用フラスコ等（A）中に水を入れ、これに硫酸を少量加えて微酸性にし、沸石等を入れて沸騰させておく。また冷却装置と冷媒又は流水により冷却管を冷やしておく。

三角フラスコ等(F)にほう酸水溶液 25 ~ 40 mL をとり、ブロモクレゾールグリーン-メチルレッド溶液を 2 ~ 3 滴を加え、冷却装置で冷やしている冷却管（E）の先端が液中に深く入るように固定する。ピンチコック（a）を開け、（b）を閉じた後、ピンチコック（c）及びピンチコック（d）を開き、漏斗等（G）から供試液 40 mL を全量ピペッ

トで蒸留管 (C) へ注ぎ入れ、漏斗 (G) から 6.4 g 以上の水酸化ナトリウムを含む 25 ~ 45 % (w/V) 水酸化ナトリウム水溶液<sup>(3)</sup> を流入させアルカリ性にし、(G) を 10 mL 程度以下の水で洗い (d) を閉じる。ピンチコック (b) を開け、(a) を閉じて、蒸気だまり (B) に水蒸気を通す。(B) の中に水蒸気が満たされたら、(c) を閉じて水蒸気を (C) に通し、蒸留を行う<sup>(4), (5)</sup>。

三角フラスコ等 (F) の留液が 100 mL 以上になるまで蒸留を続けた後、三角フラスコ等 (F) を下げて冷却管の先端を液面から離し、水で冷却管の先端を洗いながら三角フラスコ等 (F) を取り出す。(a) を開き、(b) を閉じて蒸留を終える。

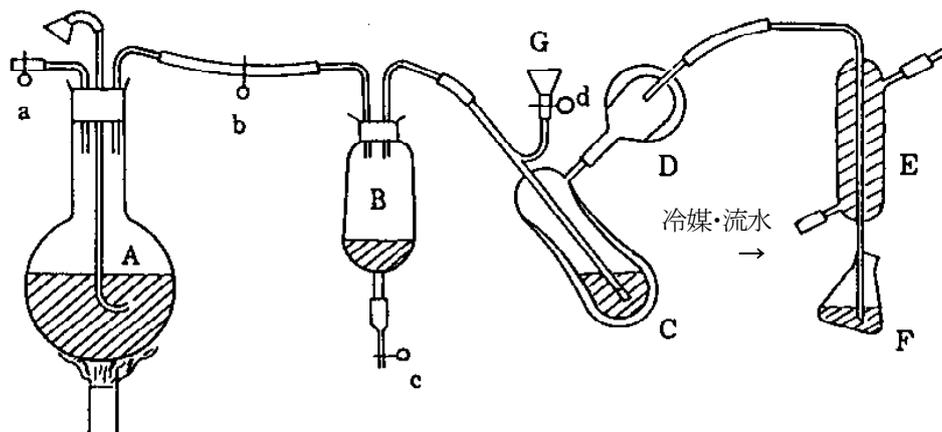


図1 パルナスワグナー型蒸留

#### 7.4 滴定

0.01mol/L 硫酸により滴定する。

- (a) ビュレットで滴定する。
- (b) 留液が緑色→汚無色→うすい灰赤色を呈したところを終点とする。
- (c) 滴定値は小数第2位までを記録する。

#### 8. 計算

$$\text{粗たん白質}^{(6)} (\%) = ((T - B) \times F \times A / W) \times 5.70^{(7)} \times 100 \times (100 / 40)$$

T : 終点までの滴定に要した滴定液の体積 (mL)

B : 空試験値 (mL)<sup>(8)</sup>

F : 滴定液のファクター

W : 試料の測定重量 (g)

A : 0.00028 (0.01 mol/L 硫酸滴定液 1 mL に相当する窒素の重量(g))

#### 留意事項

- (1) 6.4(a) で硫酸カリウムと硫酸銅 (II) ・五水和物が均一に混合されたとされる分解促進剤が無い

場合は硫酸カリウムを9 g、硫酸銅（Ⅱ）・五水和物を1 g、それぞれ、ケルダールフラスコに採取し、振り混ぜる。同様に6.4(b)で硫酸カリウムと硫酸銅（Ⅱ）・五水和物、二酸化チタンが均一に混合されたと思われる分解促進剤が無い場合は硫酸カリウムを10 g、硫酸銅（Ⅱ）・五水和物を0.3 g、二酸化チタンを0.3 gそれぞれ、ケルダールフラスコに採取し、振り混ぜる。

- (2) 分解台は一連の実験を通じ、ドラフトの排気の仕方を含め同じ条件で使用する。
- (3) 使用例：40 %水酸化ナトリウム水溶液16 mLを加える。
- (4) ほう酸水溶液のアンモニアの捕集率の低下を防ぐため、水溶液の温度が40°Cを超えないように蒸留を行う。
- (5) 蒸留管の容量に対し、水酸化ナトリウム水溶液量やGの洗液量が多いと、蒸留時に反応液が蒸留管から溢れる場合がある。このような事象が生じないように蒸留を行うこと。
- (6) 粗たん白質は小数第2位を四捨五入し、小数第1位まで求める。
- (7) 5.70は窒素－たん白質換算係数である。
- (8) 空試験の滴定で、1滴で明らかに終点を越えたと判断できた場合は、空試験の滴定値を0とする。

## **試験用試料の調製**

市販の製品をブレンダー等で粉碎する。次に粉碎されたものを目の開きが 850  $\mu\text{m}$  と 500  $\mu\text{m}$  のふるい（JIS Z8801-1）でふるい、850  $\mu\text{m}$  のふるいを通り、500  $\mu\text{m}$  のふるいの目の上に残ったものを試料とする。

# マカロニ類の粗たん白質測定手順書 (ケルダール法・塩入奥田式蒸留)

## 1. 適用範囲

この測定方法（ケルダール法・塩入奥田式蒸留）は日本農林規格におけるマカロニ類に適用する。

## 2. 測定方法の概要

試料に硫酸、分解促進剤を加え分解した後、水酸化ナトリウムを加え、水蒸気蒸留する。ほう酸溶液で留液を捕集し、硫酸で滴定して、滴定に要した硫酸の量から全窒素含有量を算出し、たん白換算係数 5.7 を乗じて粗たん白質とする。

## 3. 注意事項

- (a) 硫酸、水酸化ナトリウム及び水酸化ナトリウム溶液を使用する際には、保護メガネ及びそれらの試薬に耐性のある手袋を使用すること。
- (b) 分解は耐酸性ドラフト内で行うこと。

## 4. 試薬等

### 4.1 測定に使用する試薬等

- (a) 水：蒸留法もしくはイオン交換法によって精製した水又は逆浸透法、蒸留法、イオン交換法などを組み合わせた方法によって精製したもので、JIS K8008 に規定する A2 以上の品質を有するもの。
- (b) 硫酸：日本工業規格に規定される（JIS K8951）特級、又はそれらと同等以上のもの。
- (c) 硫酸カリウム：JIS K8962 に規定される特級、又はそれらと同等以上のもの。
- (d) 硫酸銅（Ⅱ）五水和物：JIS K8983 に規定される特級、又はそれらと同等以上のもの。
- (e) 二酸化チタン：純度 98.5 %以上 アナターゼ型
- (f) ほう酸：JIS K8863 に規定される特級又は同等以上のもの。
- (g) 水酸化ナトリウム：JIS K8576 に規定される特級、又はそれらと同等以上のもの。
- (h) ブロモクレゾールグリーン：JIS K8840 に規定される特級、又はそれらと同等以上のもの。
- (i) メチルレッド：JIS K8896 に規定される特級、又はそれらと同等以上のもの。
- (j) エタノール (95)：JIS K8102 に規定されている一級、又はそれらと同等以上のもの。
- (k) 沸騰石：沸騰石もしくは同様の作用をするもの

### 4.2 滴定溶液の標定に使用する試薬

- (a) ブロモフェノールブルー：JIS K8844 に規定される特級、又はそれらと同等以上のもの

もの。

(b) エタノール (95) : 「4.1 (j)」と同様のもの。

(c) 炭酸ナトリウム : JIS K8005 に規定される容量分析用標準物質を用いる。

## **5. 器具及び装置**

### **5.1 測定に使用するもの**

(a) 電子天びん : 小数第4位 (0.0001 g) まではかりとることのできるもの。ただし6及び7において秤量を実施する際に、小数第4位まで正確にはかりとる指示がなく、またはかりとる必要がない場合は、はかりとることのできる最小桁が小数第3位 (0.001 g) 以上の電子天びんを用いてもよい。

(b) 分解用容器 : 300 mL 容ケルダールフラスコを用いる。

(c) 分解装置

出力可変式分解台 : 出力可変式でケルダールフラスコを熱することのできるもので、ビーカーに沸石を2～3個と水100 mLを入れ、10分間最大出力に保った熱源にのせたとき、5分以内に沸騰させる能力を有すること

(d) 水蒸気蒸留装置 (図2参照)

塩入・奥田式蒸留装置 : 導入管、蒸気だまり (排気筒)、冷却管、水蒸気発生用のフラスコ等及び加熱装置、水酸化ナトリウム水溶液を注ぎ込むためのガードル等、トラップ球、ピンチコック等

冷媒による冷却装置 (流水含む)

(e) ビュレット/自動ビュレット : 25 mL 容。JIS R3505 に規定されているクラス A 又は同等以上のもの。ため付ビュレット含む。

(f) 薬包紙

### **5.2 滴定溶液の標定に使用するもの**

(a) るつぼ : 白金又は磁器のものを用いる。

(b) デシケーター : JIS K8001 に規定するもの。すなわち、乾燥剤として JIS Z0701 に規定するシリカゲル (A 形1種) を入れたデシケーターを用いる。シリカゲルは塩化コバルト (II) で着色したものとし、その色に変色したときには約 130 °C で加熱して再生する。

(c) マッフル炉 : 600 °C 以上まで乾燥できるもの。

(d) 全量ピペット : 25 mL 容。JIS R3505 に規定されているクラス A 又は同等以上のもの。

(e) 全量フラスコ : 250 mL 容。JIS R3505 に規定されているクラス A 又は同等以上のもの。

## **6. 試薬の調製**

同一の組成や濃度の市販品等を用いる場合、及びファクターが与えられている市販の滴定液を利用し、その値を用いる場合、当該試薬の調製及び標定は不要である。

### 6.1 ブロモフェノールブルー溶液

ブロモフェノールブルー 0.10 g を 95 %エタノール水溶液 50 mL で溶解し水で 100 mL にする。

### 6.2 滴定液の調製及び標定

ファクターが小数第 3 位以下まで求められている、0.025 mol/L 硫酸を滴定液として用いる。すでに調製されている滴定液を下記 6.3(b)により標定し、ファクターを計算してもよい。

### 6.3 0.025 mol/L硫酸

#### (a) 調製

水 2 L をビーカー等に量りとり、硫酸 3 mL をかき混ぜながら徐々に加えて放冷した後、気密容器に入れて保存する。

#### (b) 標定及びファクターの計算

炭酸ナトリウムの必要量をるつぼに入れて 600 °C で約 60 分加熱した後、デンケータに入れて放冷する。その中から、0.5 ~ 0.6 g を電子天びんで小数第 4 位まで量りとり、炭酸を含まない水に溶解して 250 mL とする。その 25 mL を全量ピペットで 200 mL 容三角フラスコ等に正確にとり、炭酸を含まない水 20 mL およびブロモフェノールブルー溶液を 2 ~ 3 滴加えて 0.025 mol/L 硫酸で滴定する。

#### (c) 計算

$$\text{硫酸水溶液のファクター} = \frac{1000 \times w \times p}{V \times A \times M} \times \frac{25}{250}$$

w : 炭酸ナトリウム秤量値 (g)

p : 炭酸ナトリウムの純度

V : 滴定に要した 0.025 mol/L 硫酸の体積 (mL)

A : 滴定に使用した硫酸の濃度 (= 0.025 mol / L)

M : 炭酸ナトリウムの式量 (= 105.99)

※①及び②を日本薬局方に準じて実施しても良い。

### 6.4 分解促進剤の調製 ((a) 及び (b) のいずれかを用いる。)

(a) 硫酸カリウム 9 g と硫酸銅 (II) 五水和物 1 g を混合する<sup>(1)</sup>。

(b) 硫酸カリウム 10 g、硫酸銅 (II) 五水和物 0.3 g、二酸化チタン 0.3 g を混合する<sup>(1)</sup>。

### 6.5 指示薬溶液 (ブロモクレゾールグリーン-メチルレッド溶液) の調製

95 %エタノール 200 mL 中に、ブロモクレゾールグリーン 0.15 g 及びメチルレッド 0.10 g を含むように調製されたもの。

## 6.6 水酸化ナトリウム水溶液の調製

水酸化ナトリウム 250 ~ 450 g につき水 500 mL で溶解し、さらに水を加えほぼ 1 L に希釈する。(25 ~ 45% (w/V) 水酸化ナトリウム水溶液)

## 6.7 ほう酸水溶液の調製

ほう酸を水で加温溶解し、1 L 中に 10 ~ 40 g 含まれるように調製する。

## 7. 測定手順

試料としてマカロニ類と空試験用試料を分析する。

配付された試料は試験時まで室温で保管する。

### 7.1 試料採取

- (a) 電子天びんにより、薬包紙に試料約 0.5 g を小数第 4 位まで正確に量り取る。小数第 5 位以下まではかることのできる天びんの場合は小数第 5 位を四捨五入する。
- (b) 薬包紙ごと、試料をケルダールフラスコに入れる。
- (c) 空試験用試料として薬包紙のみをケルダールフラスコに入れる。以降の操作はマカロニ類の試料と同様に行う。

### 7.2 分解

- (a) 試料を入れたケルダールフラスコに分解促進剤<sup>(1)</sup>及び硫酸 10 mL を加え、あらかじめ保温しておいた出力可変式分解台<sup>(2)</sup>の熱源の上に設置する。
- (b) はじめ、弱く加熱し、泡立ちがおさまったら、出力を上げ最大にする。
- (c) 時々、分解液を振り混ぜてフラスコの壁面についた炭化物を洗い落とす。
- (d) 分解液が青色透明になった後、約 90 分間そのまま沸騰させる。全分解時間は 2 時間以上とする。
- (e) 分解終了後、室温まで放冷する。
- (f) 分解液に水を 50 mL 加え、固形物がある場合はこれを溶解する。

### 7.3 蒸留 (図2参照)

まず、水蒸気発生用フラスコ (A) 中の水に硫酸を少量加えて微酸性にし、沸石等を入れて沸騰させておく。また冷却装置と冷媒により冷却管 (E) を冷やしておく。

ピンチコック (b) を開け、(a) 及び (c) を閉じ、あらかじめ蒸気だまり (B)、(C)、(E) に水蒸気を送ってよく洗浄した後 (C には分解液の入っていないケルダールフラスコを装着させておく)、ピンチコック (a) 及び (c) を開け、(b) を閉じる。三角フラスコ等 (F) にほう酸水溶液を 25 ~ 30 mL とり、ブロモクレゾールグリーン-メチルレッド溶液を 2 ~ 3 滴を加え、(E) の先端が液中に深く入るように固定する。

次に、分解液の入ったケルダールフラスコを (C) の位置に接続し、ピンチコック (d) を開き、ガードル等 (G) から 16 g 以上の水酸化ナトリウムを含む 25 ~ 45% (w/V) 水酸化ナトリウム水溶液<sup>(3)</sup>を流入させアルカリ性にし、ピンチコック (d) を閉じ、ピンチコック (b) を開け、(a) を閉じて、蒸気だまり (B) に水蒸気を通し、ピンチコック (c) を閉じて水蒸気をケルダールフラスコに通し、蒸留を行う<sup>(4)</sup>。

三角フラスコ等 (F) の留液が 100 mL 以上になるまで蒸留を続けた後、三角フラスコ等 (F) を下げて冷却管の先端を液面から離し、水で冷却管の先端を洗いながら三角フラスコ等 (F) を取り出す。ピンチコック (a) を開き、(b) を閉じて蒸留を終える。

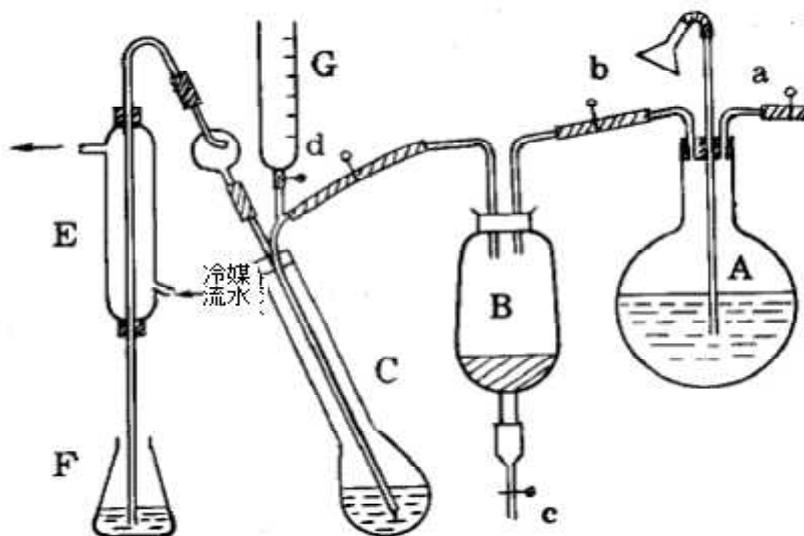


図2 塩入・奥田式蒸留装置

#### 7.4 滴定 (ビュレットによる滴定の場合)

0.025 mol/L 硫酸により滴定する。

- (a) ビュレットで滴定する。
- (b) 留液が緑色→汚無色→うすい灰赤色を呈したところを終点とする。
- (c) 滴定値は小数第2位までを記録する。

### 8. 計算

$$\text{粗たん白質 (\%)}^{(5)} = ((T - B) \times F \times A / W) \times 5.70^{(6)} \times 100$$

T : 終点までの滴定に要した滴定液の体積 (mL)

B : 空試験値 (mL)<sup>(7)</sup>

F : 滴定液のファクター

W : 試料の測定重量 (g)

A : 0.0007 (0.025 mol/L 硫酸滴定液 1 mL に相当する窒素の重量 (g))

### 留意事項

- (1) 6.4(a)で硫酸カリウムと硫酸銅(Ⅱ)・五水和物が均一に混合されたと思われる分解促進剤が無い場合は硫酸カリウムを9 g、硫酸銅(Ⅱ)・五水和物を1 g、それぞれ、ケルダールフラスコに採取し、

振り混ぜる。同様に6.4(b)で硫酸カリウムと硫酸銅(Ⅱ)・五水和物、二酸化チタンが均一に混合されたと思われる分解促進剤が無い場合は硫酸カリウムを10 g、硫酸銅(Ⅱ)・五水和物を0.3 g、二酸化チタンを0.3 gそれぞれ、ケルダールフラスコに採取し、振り混ぜる。

- (2) 分解台は一連の実験を通じ、ドラフトの排気の仕方を含め同じ条件で使用する。
- (3) 使用例：40 %水酸化ナトリウム水溶液40 mLを加える。
- (4) ほう酸水溶液のアンモニアの捕集率の低下を防ぐため、水溶液の温度が40 °Cを超えないように蒸留を行う。
- (5) 粗たん白質は小数第2位を四捨五入し、小数第1位まで求める。
- (6) 5.70は窒素-たん白質換算係数である。
- (7) 空試験の滴定で、1滴で明らかに終点を越えたと判断できた場合は、空試験の滴定値を0とする。

## **試験用試料の調製**

市販の製品をブレンダー等で粉砕する。次に粉砕されたものを目の開きが 850 μm と 500 μm のふるい (JIS Z8801-1) でふるい、850 μm のふるいを通り、500 μm のふるいの目の上に残ったものを試料とする。

# マカロニ類の粗たん白質測定手順書 (ケルダール法・自動蒸留)

## 1. 適用範囲

この測定方法（ケルダール法・自動蒸留）は日本農林規格におけるマカロニ類に適用する。

## 2. 測定方法の概要

試料に硫酸、分解促進剤を加え分解した後、水酸化ナトリウムを加え、水蒸気蒸留する。ほう酸溶液で留液を捕集し、硫酸で滴定して、滴定に要した硫酸の量から全窒素含有量を算出し、たん白換算係数 5.7 を乗じて粗たん白質とする。

## 3. 注意事項

- (a) 硫酸、水酸化ナトリウム及び水酸化ナトリウム溶液を使用する際には、保護メガネ及びそれらの試薬に耐性のある手袋を使用すること。
- (b) 分解は耐酸性ドラフト内で行うこと。

## 4. 試薬等

### 4.1 測定に使用する試薬等

- (a) 水：蒸留法もしくはイオン交換法によって精製した水又は逆浸透法、蒸留法、イオン交換法などを組み合わせた方法によって精製したもので、JIS K8008 に規定する A2 以上の品質を有するもの。
- (b) 硫酸：日本工業規格に規定される（JIS K8951）特級、又はそれらと同等以上のもの。
- (c) 硫酸カリウム：JIS K8962 に規定される特級、又はそれらと同等以上のもの。
- (d) 硫酸銅（Ⅱ）五水和物：JIS K8983 に規定される特級、又はそれらと同等以上のもの。
- (e) 二酸化チタン：純度 98.5 %以上 アナターゼ型
- (f) ほう酸：JIS K8863 に規定される特級又は同等以上のもの。
- (g) 水酸化ナトリウム：JIS K8576 に規定される特級、又はそれらと同等以上のもの。
- (h) ブロモクレゾールグリーン：JIS K8840 に規定される特級、又はそれらと同等以上のもの。
- (i) メチルレッド：JIS K8896 に規定される特級、又はそれらと同等以上のもの。
- (j) エタノール（95）：JIS K8102 に規定されている一級、又はそれらと同等以上のもの。
- (k) 沸騰石：沸騰石もしくは同様の作用をするもの

### 4.2 滴定溶液の標定に使用する試薬

- (a) ブロモフェノールブルー：JIS K8844 に規定される特級、又はそれらと同等以上のもの

もの。

(b) エタノール (95) : 「4.1 (j)」と同様のもの。

(c) 炭酸ナトリウム : JIS K8005 に規定される容量分析用標準物質を用いる。

## 5. 器具及び装置

### 5.1 測定に使用するもの

(a) 電子天びん : 小数第 4 位 (0.0001g) まではかりとることのできるもの。ただし 6 及び 7 において秤量を実施する際に、小数第 4 位まで正確にはかりとる指示がなく、またはかりとる必要がない場合は、はかりとることのできる最小桁が小数第 3 位 (0.001g) 以上の電子天びんを用いてもよい。

(b) 分解用容器 : 300 mL 容ケルダールフラスコ又は 250 ~ 300 mL ケルダール分解チューブを用いる。

(c) 分解装置 : I 又は II のどちらかを用いる。

I 出力可変式分解台 : 出力可変式でケルダールフラスコを熱せられるもので、ビーカーに沸石を 2 ~ 3 個と水 100 mL を入れ、10 分間最大出力に保った熱源にのせたとき、5 分以内に沸騰させる能力を有すること

II 加熱ブロック分解装置 : あらかじめ 400 °C に加熱したブロックに、水 50 mL と沸騰石 2 ~ 3 個を入れたケルダール分解チューブを載せた時、150 秒以内に沸騰させる能力を有すること。

(d) 蒸留装置 : I 又は II のどちらかを用いる。

I 水蒸気蒸留装置 (塩入・奥田式蒸留装置等)

II 自動蒸留装置 (蒸留の制御・実施を自動的に行う装置。自動蒸留装置と自動滴定装置が組み合わさった装置を含む。)

(e) ビュレット / 自動ビュレット : 25 mL 容。JIS R3505 に規定されているクラス A 又は同等以上のもの。

(f) 自動滴定装置 : 中和滴定を行う自動分析装置。滴定液の濃度に応じて 10 mL 容以上もしくは 20 mL 容以上のビュレット容量のものを用いる。

(g) 薬包紙

### 5.2 滴定溶液の標定に使用するもの

(a) るつぼ : 白金又は磁器のものを用いる。

(b) デシケーター : JIS K8001 に規定するもの。すなわち、乾燥剤として JIS Z0701 に規定するシリカゲル (A 形 1 種) を入れたデシケーターを用いる。シリカゲルは塩化コバルト (II) で着色したものとし、その色が変色したときには約 130 °C で加熱して再生する。

(c) マッフル炉 : 600 °C 以上まで加熱できるもの。

(d) 全量ピペット : 25 mL 容。JIS R3505 に規定されているクラス A 又は同等以上のもの。

(e) 全量フラスコ : 250 mL 容。JIS R3505 に規定されているクラス A 又は同等以上のもの。

## 6. 試薬の調製

同一の組成や濃度の市販品等を用いる場合、及びファクターが与えられている市販の滴定液を利用し、その値を用いる場合、当該試薬の調製及び標定は不要である。

### 6.1 ブロモフェノールブルー溶液

ブロモフェノールブルー 0.10 g を 95 %エタノール水溶液 50 mL で溶解し水で 100 mL にする。

### 6.2 滴定液の調製及び標定

ファクターが小数第 3 位以下まで求められている、0.025、0.05 もしくは 0.1 mol/L 硫酸のいずれかを滴定液として用いる（ただし、自動滴定装置を用いない場合は 0.025 mol/L 硫酸のみを用いる）。すでに調製されている滴定液を下記 6.3 ～ 6.5 により標定し、ファクターを計算してもよい。

### 6.3 0.025 mol/L硫酸

#### (a) 調製

水 2 L をビーカー等に量りとり、硫酸 3 mL をかき混ぜながら徐々に加えて放冷した後、気密容器に入れて保存する。

#### (b) 標定及びファクターの計算

炭酸ナトリウムの必要量をるつぼに入れて 600 °C で約 60 分加熱した後、デシケータに入れて放冷する。その中から、0.5 ～ 0.6 g を電子天びんで小数第 4 位まで量りとり、炭酸を含まない水に溶解して 250 mL とする。その 25 mL を全量ピペットで 200 mL 容三角フラスコ等に正確にとり、炭酸を含まない水 20 mL およびブロモフェノールブルー溶液を 2 ～ 3 滴加えて 0.025 mol/L 硫酸で滴定する。

#### (c) 計算

$$\text{硫酸水溶液のファクター} = \frac{1000 \times w \times p}{V \times A \times M} \times \frac{25}{250}$$

w : 炭酸ナトリウム秤量値 (g)

p : 炭酸ナトリウムの純度

V : 滴定に要した 0.025 mol/L 硫酸の体積 (mL)

A : 滴定に使用した硫酸の濃度 (= 0.025 mol / L)

M : 炭酸ナトリウムの式量 (= 105.99)

※ JIS K8001 もしくは日本薬局方に準じて実施しても良い。

### 6.4 0.05 mol/L硫酸

#### (a) 調製

水 1 L をビーカー等に量りとり、硫酸 3 mL をかき混ぜながら徐々に加えて放冷し

た後、気密容器に入れて保存する。

**(b) 標定及びファクターの計算**

炭酸ナトリウムの必要量をるつぼに入れて 600 °C で約 60 分加熱した後、デシケータに入れて放冷する。その中から、1.0 ～ 1.2 g を電子天びんで小数第 4 位まで量りとり、炭酸を含まない水に溶解して 250 mL とする。その 25 mL を全量ピペットで 200 mL 容三角フラスコ等に正確にとり、炭酸を含まない水 20 mL およびブロモフェノールブルー溶液を 2 ～ 3 滴加えて 0.05 mol/L 硫酸で滴定する。

**(c) 計算**

$$\text{硫酸水溶液のファクター} = \frac{1000 \times w \times p}{V \times A \times M} \times \frac{25}{250}$$

w : 炭酸ナトリウム秤量値 (g)

p : 炭酸ナトリウム純度

V : 滴定に要した 0.05 mol/L 硫酸の体積 (mL)

A : 滴定に使用した硫酸の濃度 (= 0.05 mol / L)

M : 炭酸ナトリウムの式量 (= 105.99)

※ JIS K8001 もしくは日本薬局方に準じて実施しても良い。

**6.5 0.1 mol/L硫酸**

**(a) 調製**

水 1 L をビーカー等に量りとり、硫酸 6 mL をかき混ぜながら徐々に加えて放冷した後、気密容器に入れて保存する。

**(b) 標定**

炭酸ナトリウムの必要量をるつぼに入れて 600 °C で約 60 分加熱した後、デシケータに入れて放冷する。

その中から、2.0 ～ 2.5 g を小数第 4 位まで量りとり、炭酸を含まない水に溶解して 250 mL とする。その 25 mL を全量ピペットで 200 mL 容三角フラスコ等に正確にとり、炭酸を含まない水 20 mL およびブロモフェノールブルー溶液を 2 ～ 3 滴加えて 0.1 mol/L 硫酸で滴定する。

**(c) 計算**

$$\text{硫酸水溶液のファクター} = \frac{1000 \times w \times p}{V \times A \times M} \times \frac{25}{250}$$

w : 炭酸ナトリウム秤量値 (g)

p : 炭酸ナトリウム純度

V : 滴定に要した 0.1 mol/L 硫酸の体積 (mL)

A : 滴定に使用した硫酸の濃度 (= 0.1 mol / L)

M : 炭酸ナトリウムの式量 (= 105.99)

※ JIS K8001 もしくは日本薬局方に準じて実施しても良い。

#### 6.6 分解促進剤の調製 ((a)及び(b)のいずれかを用いる。)

- (a) 硫酸カリウム 9 g と硫酸銅 (II) 五水和物 1 g を混合する<sup>(1)</sup>。
- (b) 硫酸カリウム 10 g、硫酸銅 (II) 五水和物 0.3 g、二酸化チタン 0.3 g を混合する<sup>(1)</sup>。

#### 6.7 指示薬溶液の調製

以下の (a) もしくは (b) 及び (c) を用いる。

##### (a) ブロモクレゾールグリーン-メチルレッド溶液

95 %エタノール 200 mL 中に、ブロモクレゾールグリーン 0.15 g 及びメチルレッド 0.10 g を含むように調製されたもの。

##### (b) ブロモクレゾールグリーン溶液

95 %エタノール 100 mL 中に、ブロモクレゾールグリーン 0.1 g を含むように調製されたもの (6.9 (c)でのみ用いる)。

##### (c) メチルレッド溶液

95 %エタノール 100 mL 中に、メチルレッド 0.1 g を含むように調製されたもの (6.9 (c)でのみ用いる)。

#### 6.8 水酸化ナトリウム水溶液の調製

水酸化ナトリウム 250 ~ 450 g につき水 500 mL で溶解し、さらに水を加えほぼ 1 L に希釈する。(25 ~ 45% (w/V) 水酸化ナトリウム水溶液)

#### 6.9 ほう酸水溶液の調製 ((a)、(b)もしくは(c)のいずれかを用いる)

- (a) ほう酸を水で加温溶解し、1 L 中に 10 ~ 40 g 含まれるように調製する。
- (b) ほう酸を水で加温溶解し、1 L 中に 10 ~ 40 g 含まれるように調製する。この水溶液 3 L につき、上記 6.7 (b) のブロモクレゾールグリーン-メチルレッド溶液を 40 mL を加える。
- (c) ほう酸を水で加温溶解し、1 L 中に 10 ~ 40 g 含まれるように調製する。この水溶液 1 L につき、上記 6.7 (b)、(c)のブロモクレゾールグリーン溶液を 10 mL、メチルレッド溶液を 7 mL 加える。

## 7. 測定手順

試料としてマカロニ類と空試験用試料を分析する。

配付された試料は試験時まで室温で保管する。

### 7.1 試料採取

電子天びんにより、薬包紙に試料約 0.5 g を小数第 4 位まで正確に量り取る。小数第 5 位以下まではかることのできる天びんの場合は小数第 5 位を四捨五入する。薬包紙ごと、試料を分解用容器 (出力可変式分解台を用いる場合はケルダールフラスコ、加熱ブロッ

ク分解装置を用いる場合はケルダール分解チューブ)に入れる。

空試験用試料として薬包紙のみを分解用容器に入れる。以降の操作はマカロニ類の試料と同様に行う。

## 7.2 分解

(a) 又は (b) のうちどちらかで分解を行う。

### (a) 出力可変式分解台を用いた場合

- ① 試料を入れたケルダールフラスコに分解促進剤<sup>(1)</sup>及び硫酸 10 mL を加え、あらかじめ保温しておいた出力可変式分解台<sup>(2)</sup>の熱源の上に設置する。
- ② はじめ、弱く加熱し、泡立ちがおさまったら、出力を上げ最大にする。
- ③ 時々、分解液を振り混ぜてフラスコの壁面についた炭化物を洗い落とす。
- ④ 分解液が青色透明になった後、約 90 分間そのまま沸騰させる。全分解時間は 2 時間以上とする。
- ⑤ 分解終了後、室温まで放冷する。

### (b) 加熱ブロック分解装置を用いた場合

- ① 試料を入れたケルダール分解チューブに分解促進剤及び硫酸 10 mL を加え、あらかじめ保温しておいたブロック分解装置に設置する。
- ② 最初は 200 °C で加熱し泡立ちがおさまったら 400 °C にする。分解液が青色透明になってから約 90 分間分解し、放冷する。

## 7.3 蒸留

装置の操作法に従い蒸留する。ほう酸水溶液 25 ~ 50 mL (ブromokreszoolグリーン及びメチルレッドを含んでいない場合はブromokreszoolグリーン-メチルレッド溶液を 2 ~ 3 滴を加える) 中に留液の出口が入っているようにする<sup>(3)</sup>。

分解液に水を 50 mL、16 g 以上の水酸化ナトリウムを含む 25 ~ 45 % (w/V) 水酸化ナトリウム水溶液<sup>(4)</sup>を加え分解液をアルカリ性にし、留液が 100 mL 以上得られるように蒸留を行う<sup>(5)</sup>。蒸留後、水で留液の出口の先端を洗いながら三角フラスコ等を取り出す<sup>(6)</sup>。

## 7.4 滴定

(a) 又は (b) のうちどちらかで滴定を行う。

### (a) ビュレットによる滴定の場合

0.025 mol/L 硫酸によりビュレットを用いて滴定する。留液が緑色→汚無色→うすい灰赤色の順に変色するので、うすい灰赤色を呈したところを終点とする。滴定値は小数第 2 位までを記録する。

### (b) 自動滴定装置による滴定の場合

0.05 または 0.1 mol/L 硫酸により、装置の使用法に従い自動滴定装置で滴定する<sup>(7)</sup>。0.05 mol/L 硫酸の場合はビュレット容量 20 mL 容以上、0.1 mol/L 硫酸の場合はビュレット容量 10 mL 容以上のものを用いる。終点までの滴定量を記録する。

## 8. 計算

$$\text{粗たん白質}^{(8)} (\%) = ((T - B) \times F \times A / W) \times 5.70^{(9)} \times 100$$

T：終点までの滴定に要した滴定液の体積 (mL)

B：空試験値 (mL) <sup>(10)</sup>

F：滴定液のファクター

W：試料の測定重量 (g)

A：滴定液の濃度により下記のいずれかの値を用いる

0.025 mol/L 硫酸：0.0007 (滴定液1 mLに相当する窒素の重量(g))

0.05 mol/L硫酸：0.0014 (滴定液1 mLに相当する窒素の重量(g))

0.1 mol/L硫酸：0.0028 (滴定液1 mLに相当する窒素の重量(g))

## 留意事項

- (1) 6.6(a)で硫酸カリウムと硫酸銅(Ⅱ)・五水和物が均一に混合されたと思われる分解促進剤が無い場合は硫酸カリウムを9 g、硫酸銅(Ⅱ)・五水和物を1 g、それぞれ、ケルダールフラスコに採取し、振り混ぜる。同様に6.6(b)で硫酸カリウムと硫酸銅(Ⅱ)・五水和物、二酸化チタンが均一に混合されたと思われる分解促進剤が無い場合は硫酸カリウムを10 g、硫酸銅(Ⅱ)・五水和物を0.3 g、二酸化チタンを0.3 gそれぞれ、ケルダールフラスコに採取し、振り混ぜる。
- (2) 分解台は一連の実験を通じ、ドラフトの排気の仕方を含め同じ条件で使用する。
- (3) ほう酸水溶液のアンモニアの捕集率の低下を防ぐため、水溶液の温度が40℃を超えないように蒸留を行う。
- (4) 調製例：自動蒸留装置の場合は16 g(40%水酸化ナトリウム水溶液を40 mL)を加え蒸留を行っていた。
- (5) 水酸化ナトリウム水溶液と並行して水蒸気をケルダール分解チューブに送りこんでもよい。
- (6) 自動蒸留装置と自動滴定装置が組み合わさった装置等で、留液を捕集したほう酸水溶液の入った専用容器等内で滴定が実施される場合はこの操作は不要である。
- (7) 自動蒸留装置と自動滴定装置が組み合わさった装置等を用いている場合、蒸留終了前に滴定を開始しても良い。
- (8) 粗たん白質は小数第2位を四捨五入し、小数第1位まで求める。
- (9) 5.70は窒素-たん白質換算係数である。
- (10) 空試験の滴定で、1滴で明らかに終点を越えたと判断できた場合は、空試験の滴定値を0とする。

## 試験用試料の調製

市販の製品をブレンダー等で粉砕する。次に粉砕されたものを目の開きが 850 μm と 500 μm のふるい (JIS Z8801-1) でふるい、850 μm のふるいを通り、500 μm のふるいの目の上に残ったものを試料とする。

## 共同試験結果

マカロニ類の粗たん白質（ケルダール法）共同試験結果

	マカロニ類	マカロニ類	マカロニ類	マカロニ類	マカロニ類
参加試験室数	10	10	10	10	10
有効試験室数	9	10	8	8	8
粗たん白質 (%)	14.50	12.86	11.35	11.38	10.29
併行標準偏差 ( $S_r$ , %)	0.079	0.064	0.061	0.029	0.060
室間再現標準偏差 ( $S_R$ , %)	0.20	0.19	0.13	0.17	0.15
併行相対標準偏差 ( $RSD_r$ , %)	0.54	0.50	0.53	0.25	0.59
室間再現相対標準偏差 ( $RSD_R$ , %)	1.4	1.5	1.2	1.5	1.5
HorRat value	0.39	0.43	0.32	0.41	0.41

報文：

Interlaboratory Study on the Determination of Crude Protein in Macaroni Products on JAS by Kjeldahl Method Using Copper Catalysts, Akiko HAKODA, Yusuke Ii, Tadanao SUZUKI and Akemi YASUI, *Food Sci. Technol. Res.*, **15**(5), 531–536 (2009)