

風味調味料の全窒素分（ケルダール法・自動蒸留）測定手順書

独立行政法人農林水産消費安全技術センター

1. 適用範囲

この測定手順書は、風味調味料の日本農林規格に規定する風味調味料に適用する。

2. 測定方法の概要

試料に硫酸及び分解促進剤を加え、加熱分解する。これにより、試料中の窒素分は硫酸アンモニウムとなる。この分解液に水酸化ナトリウムを加え、アルカリ性にして水蒸気蒸留することで発生するアンモニアをほう酸溶液で捕集する。得られた留液を硫酸で滴定し、滴定に要した硫酸の量から全窒素量を求め、試料重量に対する百分比を算出する。

3. 注意事項

- (a) 硫酸及び水酸化ナトリウムを使用する際には、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、イオン交換法等を組み合わせた方法によって精製した水で、JIS K 0557に規定されるA2以上の品質を有するもの。
- (b) 硫酸：JIS K 8951に規定される特級、又はこれと同等以上のもの。
- (c) 硫酸カリウム：JIS K 8962に規定される特級、又はこれと同等以上のもの。
- (d) 硫酸銅（Ⅱ）五水和物：JIS K 8983に規定される特級、又はこれと同等以上のもの。
- (e) ほう酸：JIS K 8863に規定される特級、又はこれと同等以上のもの。
- (f) 水酸化ナトリウム：JIS K 8576に規定される特級、又はこれと同等以上のもの。
- (g) ブロモクレゾールグリーン⁽¹⁾：JIS K 8840に規定される特級、又はこれと同等以上のもの。
- (h) メチルレッド：JIS K 8896に規定される特級、又はこれと同等以上のもの。
- (i) メチレンブルー：JIS K 8897に規定される特級、又はこれと同等以上のもの。
- (j) エタノール（95）：JIS K 8102に規定される1級、又はこれと同等以上のもの。

(1) 「6.4 指示薬溶液」に必要なものを(g)、(h)、(i)のうちから用いる。

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 K 8844に規定される特級、又はこれと同等以上のもの。

- (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 K 8005 に規定される容量分析用標準物質を用いる。
- (d) 二酸化炭素を含まない水：4.1 (a)の水をフラスコに入れ 15 分間沸騰させた後、空气中の二酸化炭素を遮り、冷却する。この水は使用時に調製すること。

5. 器具及び装置

5.1 測定に使用するもの

- (a) 電子天びん：最小表示桁数が 0.1 mg のもの、又はこれと同等以上のもの。
- (b) 分解用容器：呼び容量が 250 mL ～ 300 mL のケルダール分解チューブを用いる。
- (c) 加熱ブロック分解装置：ケルダール分解チューブに沸騰石 2 個～ 3 個と水 50 mL を入れ、あらかじめ 400 °C ～ 420 °C のうち 8.2 の分解に使用する温度に加熱したブロックに乗せたとき、水を 150 秒以内に沸騰させる能力を有するもの。排気マニホールドが付属するもの。
- (d) 蒸留装置：自動蒸留装置（蒸留の制御・実施を自動的に行う装置）を用いる。（自動蒸留装置と自動滴定装置が一体となった装置を含む。）
- (e) 三角フラスコ：JIS R 3503 に規定する三角フラスコのうち、呼び容量が 300 mL 容のもの。（ビュレットを用いた滴定を行う場合に蒸留の受け器として用いる。）
- (f) 滴定装置：I 又は II のいずれかを用いること。
 - I ビュレット／自動ビュレット：JIS R 3505 に規定する呼び容量が 25 mL 又は 50 mL のものでクラス A のもの、又はこれと同等以上のもの。
 - II 自動滴定装置：呼び容量が 20 mL 以上のもの。（中和滴定を行う自動分析装置）

5.2 滴定溶液の標定に使用するもの（6.6で標定を行う場合に使用する）

- (a) るつぼ：JIS H 6201 に規定する白金のもの、又は JIS R 1301 に規定する磁器のもの、又はこれと同等以上のもの。
- (b) デシケーター：JIS R 3503 に規定する、デシケーター又は上口に栓若しくはコックを付けた上口デシケーターで、乾燥剤としてシリカゲルを入れたもの。デシケーター本体と蓋のすり合わせ部分にはグリース又はワセリンを塗り、気密とさせる。デシケーターの中に湿度計又は湿度インジケーターを入れ、デシケーター内部の湿度を管理する。湿度が 10 %を超えたときにはシリカゲルを交換すること。
- (c) 湿度計又は湿度インジケーター：湿度が 10 %を超えているかどうかを判断できるもの。
- (d) マッフル炉：600 °C以上まで加熱できるもの。
- (e) 全量ピペット：JIS R 3505 に規定する呼び容量が 25 mL のものでクラス A のもの、又はこれと同等以上のもの。
- (f) 全量フラスコ：JIS R 3505 に規定する呼び容量が 250 mL のものでクラス A のもの、又はこれと同等以上のもの。

6. 試薬の調製

同組成、同濃度の市販品を用いる場合は以下の調製を必要としない。

6.1 分解促進剤

硫酸カリウム 9 g と硫酸銅（Ⅱ）五水和物 1 g を粉碎混合する⁽²⁾。

(2) 市販のタブレット状の混合分解促進剤を使用しても良い。Kjeltabs KPC®（硫酸カリウム 4.5 g と硫酸銅（Ⅱ）五水和物 0.5 g が混合された錠剤、Thompson & Copper社製）を使用する場合の分解促進剤の必要量は、1検体あたり2錠である。

6.2 中和用水酸化ナトリウム水溶液

水溶液 1 L 中に水酸化ナトリウム 250 ～ 450 g が溶解しているように調製する⁽³⁾（25 % ～ 45 %（w/v）水酸化ナトリウム水溶液）。

(3) 調製例：水酸化ナトリウム 800 g を呼び容量が 2 L の三角フラスコに量りとり、氷水で冷却した上で、攪拌しながら水を 1 L 加える。もしくは、呼び容量が 2 L の三角フラスコに水 1 L を入れ、氷水で冷却した上で水酸化ナトリウム 800 g を攪拌しながら加える。完全に溶かした後、攪拌しながら水を加え 2 L にする（40 %（w/v）水酸化ナトリウム水溶液）。水酸化ナトリウム水溶液を調製する操作は、溶液が発熱し蒸気等が発生するため、ドラフト内で行うこと。

6.3 ほう酸水溶液

ほう酸を水で加温溶解し、1 L 中に 10 g ～ 40 g 含まれるように調製する⁽⁴⁾。

(4) 調製例：ほう酸 120 g を呼び容量が 3 L の三角フラスコに量りとり、水を 2 L 加えホットプレート等で 40 °C ～ 60 °C に加温しながら溶解させる。完全に溶かした後、攪拌しながら水を加え 3 L にする（4 %（w/v）ほう酸水溶液）。

6.4 指示薬溶液

(a) ビュレットによる滴定の場合

ブロモクレゾールグリーンーメチルレッド溶液（エタノール(95)を溶媒として、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）を用いる。

(b) 自動滴定装置による滴定の場合

ブロモクレゾールグリーンーメチルレッド溶液（「6.4(a)」と同様のもの）又はメチルレッドーメチレンブルー溶液（エタノール(95)を溶媒として、200 mL 中にメチルレッド 0.10 g 及びメチレンブルー 0.10 g を含むように調製されたもの）のいずれかのうち装置に適した溶液を用いる⁽⁵⁾。

(5) 指示薬については各装置に適した溶液を用いる。上記の製法と異なる場合、あらかじめ硫酸アンモニウム等を用いて蒸留から滴定までの操作を行い、アンモニアが十分回収されることを確認すること。

6.5 アンモニア捕集液

(a) ビュレットによる滴定の場合

三角フラスコに 0.3 g 以上のほう酸を含む「6.3 ほう酸水溶液」⁽⁶⁾に「6.4(a) 指示薬溶液」を 2、3 滴加える。

(b) 自動滴定装置による滴定の場合

各装置に適した 0.3 g 以上のほう酸を含むほう酸溶液に「6.4(b) 指示薬溶液」を加えた溶液又は加えない溶液を用いる。

(6) 三角フラスコ中のほう酸水溶液は、冷却管の先端を液中に浸し、得られたアンモニアを捕集することが可能な量であること。溶液中にほう酸を 0.3 g 以上含む量を用いること。例えば、三角フラスコ中の捕集液のほう酸水溶液に 4 % (w/v) ほう酸水溶液 25 mL を用いる等。なお、空試験、試料共に同じ量のほう酸水溶液を加えること。

6.6 滴定溶液

ビュレットによる滴定の場合は 0.05 mol/L 硫酸を用い、自動滴定装置による滴定の場合は 0.05 mol/L か 0.1 mol/L 硫酸のいずれかを用いる。

なお、ファクターが小数第 3 位まで求められている市販品を用いる場合は、標定する必要はない。

6.6.1 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 を攪拌し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 分間加熱した後、デシケーターに入れて放冷する。その中から 1.0 ~ 1.3 g を 0.1 mg の桁まで量りとり、全量フラスコを用いて炭酸を含まない水に溶解して 250 mL とする。その 25 mL を全量ピペットを用いて 200 mL 容三角フラスコ等に正確に採取し、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 をエタノール(95) 50 mL で溶解し水で 100 mL にしたもの）を 2、3 滴加えて 0.05 mol/L 硫酸で滴定する。青色から黄色に変色したところを終点とし、滴定値を小数第 2 位まで記録する。

（JIS K 8001 もしくは日本薬局方に準じて実施してもよい。）

(c) 計算

$$0.05 \text{ mol/L の硫酸のファクター} = \frac{w \times (p / 100)}{M \times 250} \times 25 \div \left(A \times \frac{V}{1000} \right)$$

w : 炭酸ナトリウム秤取量 (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）

6.6.2 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 を攪拌し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 分間加熱した後、デシケーターに入れて放冷する。その中から 2.0 ~ 2.6 g を 0.1 mg の桁まで量りとり、全量フラスコを用いて炭酸を含まない水に溶解して 250 mL とする。その 25 mL を全量ピペットを用いて 200 mL 容三角フラスコ等に正確に採取し、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 をエタノール(95) 50 mL で溶解し水で 100 mL にしたもの）を 2、3 滴加えて 0.1 mol/L 硫酸で滴定する。青色から黄色に変色したところを終点とし、滴定値を小数第 2 位まで記録する。

（JIS K 8001 もしくは日本薬局方に準じて実施してもよい。）

(c) 計算

$$0.1 \text{ mol/L の硫酸のファクター} = \frac{\frac{w \times (p / 100)}{M \times 250} \times 25}{A \times \frac{V}{1000}}$$

w：炭酸ナトリウム秤取量（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）

7. 試験用試料の調製

風味調味料（顆粒状のものを除く）を熱による水分変化が起こらないように注意しながらミキサー等で粉砕し、均質化したものを測定用試料とする⁽⁷⁾。顆粒状のものは、この操作は行わずに「8. 測定手順」から行う。

(7) 調製例：ミキサーで約10秒間粉砕した試料を袋にひとまとめにし、よく混ぜたものを測定用試料とする。

8. 測定手順

8.1 試料採取

試料をよく混合し、0.5 g を正確に薬包紙に量りとり、分解用容器に薬包紙ごと入れる。採取量は 0.45 g ~ 0.54 g とし、0.1 mg の桁まで記録する。空試験は分解用容器に

薬包紙のみを入れ、「8.2 分解」以降の操作を試料と同様に行う。

8.2 分解

試料を入れた分解用容器に分解促進剤 10 g を加える。次に、ドラフト内で硫酸 15 mL を加え、振り混ぜる。次に、あらかじめ 200 °C に保温しておいたブロック分解装置で 30 分間加熱する。その後 400 °C ～ 420 °C に設定し、分解液が清澄になった後、400 °C ～ 420 °C の状態で約 60 分間分解を続ける。分解終了後、室温まで放冷し、その後速やかに分解液に水 20 mL を加え、振り混ぜる⁽⁸⁾。空試験にも同じ量を加える。水を加える際に発熱するので注意深く行うこと。

(8) 蒸留を容易にするため。水の量は 20 mL 以上でもかまわないが、加える水の量が 20 mL 以上 50 mL 以下の場合、「8.3 蒸留」の際に加える水の量を調整（分解液に加える水の合計量を 50 mL とする。）して、以後の蒸留操作を行うこと。加える水の量が 50 mL を超える場合は、あらかじめ硫酸アンモニウム等を用いて蒸留操作を行い、アンモニアが十分に回収される蒸留時間等を確認しておくこと。試験を数日間に分ける場合、この段階で試験を中断してもよい。中断する場合ごみやほこり等が入らないよう分解用容器の上にラップをかけ、常温で放置する。3日程度は中断可能である。

8.3 蒸留

装置の操作法に従って蒸留する。分解液に水 30 mL、24 g 以上の水酸化ナトリウムを含むよう 25 % ～ 45 % (w/v) 水酸化ナトリウム水溶液を加え⁽⁹⁾、分解液をアルカリ性にする。アンモニア捕集液中に留液が 150 mL 以上得られるように蒸留を行う⁽¹⁰⁾。

(9) 実施例：40 % (w/v) 水酸化ナトリウム水溶液を 60 mL 加える。なお、空試験でアルカリ性になることが確認できれば 24 g 以下でもかまわないが、空試験、試料共に同じ量の水酸化ナトリウム水溶液を加えること。

(10) アンモニア捕集液中に留液の出口が入っているようにする。捕集液のアンモニアの捕集率の低下を防ぐため、捕集液の温度が 40 °C を超えない範囲で蒸留を行う。ビュレットでの滴定を行う場合、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。

8.4 滴定

(a) ビュレットによる滴定の場合

蒸留で得られた留液を 0.05 mol/L 硫酸でビュレットを用いて滴定する。留液は緑色 → 汚無色 → 微灰赤色の順に変色するが、微灰赤色を呈したところを終点とする。滴定値は小数第 2 位まで記録する。

(b) 自動滴定装置による滴定の場合

装置の使用法に従い自動滴定装置で滴定する⁽¹¹⁾。終点までの滴定量を記録する。

(11) あらかじめ硫酸アンモニウム等を用いて蒸留から滴定までの操作を行いアンモニアが十分回収されることを確認したのち行うこと。

9. 計算

次の式により全窒素分⁽¹²⁾を算出する。

$$\text{全窒素分 \% (質量分率)} = \frac{\left(\frac{(T - B)}{1000} \times A \times F \times 2 \right) \times N}{W} \times 100$$

T ：試料における滴定値 (mL)

B ：空試験における滴定値 (mL) ⁽¹³⁾

A ：滴定に用いた硫酸の濃度 (mol/L)

F ：滴定液のファクター

N ：窒素の原子量 (14.007)

W ：試料の採取重量 (g)

(12) 小数第4位を四捨五入し、小数第3位まで算出する。

(13) 空試験の滴定において、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。

風味調味料の全窒素分（ケルダール法）共同試験結果（2011年実施）

- (1) 参加試験室数：12
- (2) マテリアル数：6
- (3) 全窒素分：2.149 %～5.213 %
- (4) 併行標準偏差 (S_r)：0.010 %～0.037 %
- (5) 室間再現標準偏差 (S_R)：0.016 %～0.064 %
- (6) 併行相対標準偏差 (RSD_r)：0.48 %～1.4 %
- (7) 室間再現相対標準偏差 (RSD_R)：0.74 %～2.2 %

履歴

| 年月日 | 改訂内容等 |
|------------|---|
| 2006/03/02 | 規格の記載に比べて詳細な手順書(2005年版)を用いた共同試験(2005/12)の結果を妥当性確認調査検討・評価委員会で評価し、測定方法の妥当性が確認された。 |
| 2007/11/27 | 風味調味料の日本農林規格の全窒素分測定方法改正。 |
| 2012/02/15 | <p>風味調味料全窒素分の測定方法への燃焼法の追加検討に際し、従来法との同等性の確認が必要となったことから、従来法についても共同試験(2011/12)を実施し、その結果を妥当性確認調査検討・評価委員会で評価し、測定方法の妥当性が確認された。</p> <p>共同試験の際は、手順書(2005年版)の内容を若干修正した手順書(2011年版)を使用した。</p> <p>(手順書の2005年版から2011年版への主な変更点)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・分解温度範囲の拡張 ・自動滴定装置による滴定の際の指示薬の種類を追加。 ・ほう酸溶液や水酸化ナトリウム溶液の使用量を規定せず、ほう酸や水酸化ナトリウムの量で規定。 ・自動滴定の硫酸水溶液濃度範囲を拡張。 |
| 2013/04/01 | 風味調味料の日本農林規格の全窒素分測定方法改正。 |
| 2013/09/10 | 手順書 2013 新規作成。(手順書(2011年版)の体裁の変更) |
| | |