

## しょうゆの全窒素分（ケルダール法）測定手順書（2014）

	ページ
塩入・奥田式蒸留	1
パルナス・ワグナー型蒸留	7
自動蒸留	15

## しょうゆの全窒素分測定手順書（塩入・奥田式蒸留）

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、しょうゆの日本農林規格に規定する「しょうゆ」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、試料容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：JIS K 0557 に規定する A2 以上の品質を有するもの。
- (b) 硫酸：JIS K 8951 に規定する特級、又はこれと同等以上のもの。
- (c) 硫酸カリウム：JIS K 8962 に規定する特級、又はこれと同等以上のもの。
- (d) 硫酸銅（Ⅱ）五水和物：JIS K 8983 に規定する特級、又はこれと同等以上のもの。
- (e) ほう酸：JIS K 8863 に規定する特級、又はこれと同等以上のもの。
- (f) 水酸化ナトリウム：JIS K 8576 に規定する特級、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：JIS K 8840 に規定する特級、又はこれと同等以上のもの。
- (h) メチルレッド：JIS K 8896 に規定する特級、又はこれと同等以上のもの。
- (i) エタノール（95）：JIS K 8102 に規定する 1 級、又はこれと同等以上のもの。

#### 4.2 滴定溶液の標定に使用する試薬等

- (a) ブロモフェノールブルー：JIS K 8844 に規定する特級、又はこれと同等以上のもの。
- (b) エタノール（95）：「4.1 (i)」と同様のもの。
- (c) 炭酸ナトリウム：JIS K 8005 に規定す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、空気中の二酸化炭素を遮り、冷却したもの。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) 試料採取用体積計：ピストンを備えた空気置換式若しくは直接置換式のもので、JIS K 0970 に従い、1 mL の設定容量における系統誤差、偶然誤差を求め、それぞれ ± 1.0 % 以内、0.3 % 以下であるもの。
- (c) ケルダールフラスコ：100 mL 容～300 mL 容のもの。
- (d) 出力可変式分解台：ケルダールフラスコを熱することができるもので、ケルダールフラスコに沸騰石 3 個～5 個と水 50 mL を入れ、10 分間最大出力に保った熱源に乗せたとき、5 分以内に沸騰させる能力を有するもの。
- (e) 蒸留装置：水蒸気蒸留装置（図 塩入・奥田式蒸留装置）を使用する。
- (f) 三角フラスコ：300 mL 容のもの。
- (g) 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 のものでクラス A のもの、又はこれと同等以上のもの。

### 5.2 滴定溶液の標定に使用するもの

- (a) るつぼ：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ロデシケーターで、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) マップル炉：600 °C 以上まで加熱できるもの。
- (d) 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。
- (e) 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 4.5 g と硫酸銅（Ⅱ）五水和物 0.5 g を混合する<sup>(1)</sup>。

(1) 市販のタブレット状の混合分解促進剤を使用してもよい。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 1 錠である。

### 6.2 水酸化ナトリウム水溶液（アンモニアガス遊離用）

水溶液 1 L 中に水酸化ナトリウム 250 g ～ 450 g が溶解しているように調製する<sup>(2)</sup>（25 % ～ 45 %（w/v）水酸化ナトリウム水溶液）。

(2) 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、氷水で冷却しながら水を 1 L 加える。若しくは、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 ブロモクレゾールグリーン-メチルレッド溶液

エタノール(95) 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 を含むように調製する。

### 6.4 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<sup>(3)</sup>（1 % ～ 4 %（w/v）ほう酸水溶液）。

(3) 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）。

### 6.5 0.05 mol/L 硫酸（滴定溶液）

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て「8.4 滴定」を行う場合は、以下の調製、標定を実施する必要はない。なお、標定は、以下に示した標定方法によるほか、JIS K 8001 若しくは日本薬局方に記載する方法により実施してもよい。

#### (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、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 g ～ 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二酸化炭素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。

#### (c) 計算

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

- $w$  : 炭酸ナトリウムひょう取量 (g)  
 $p$  : 炭酸ナトリウム純度 (% (w/w))  
 $V$  : 滴定値 (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)

## 7. 試験用試料の調製

市販の製品をかき混ぜ、そのまま試料とする。

## 8. 測定手順

### 8.1 試料採取

試料 1 mL を試料採取用体積計で正確に量りとり、ケルダールフラスコに採取する<sup>(4)</sup>。空試験として空のケルダールフラスコを用意し、以降は試料を入れたケルダールフラスコと同様に扱う。

(4) 空気置換式体積計を試料の採取に用いる場合は、リバースピペット法（ブローアウトを含めた2段階で液体を排出するピペットにおいて、ブローアウト分まで試料溶液を吸引し、1段階目までの排出により、ブローアウト分の試料溶液をチップ内に残し、設定体積を採取する方法）による。なお、試料採取用体積計が利用できない場合は、試料の密度をJIS K 0061に従い測定し、試料約1.0 g～1.3 gを0.1 mgの単位まで正確に量りとることにより、試料採取量 (mL) を算出する。

### 8.2 分解

試料を入れたケルダールフラスコに分解促進剤 5 g 及び硫酸 8 mL を加える。出力可変式分解台で泡立ちが穏やかになるまで弱く加熱し、その後出力を最大にする。分解液が清澄になった後、約 90 分間出力最大のまま分解を続ける。全分解時間は 2 時間以上とする。分解終了後、室温まで放冷し、分解液に水 20 mL ～ 50 mL 程度を加える<sup>(5)</sup>。

(5) 蒸留を容易にするため、使用するケルダールフラスコ容量に適した量の水を放冷後すみやかに加え、ふりまぜておく。

### 8.3 蒸留

以下の説明は、図の塩入・奥田式蒸留装置を例としている。

#### (a) 蒸留の準備

水蒸気発生フラスコ (A) に沸騰石と水を適量入れ、a を開け、b を閉じ 10 分間以上沸騰させ<sup>(6)</sup>、冷却管 (E) を冷却装置又は水道水により冷却する。

(6) 揮発性成分を除去するため。

#### (b) 流路の洗浄

少量の水を入れたケルダールフラスコ (C) を装着して、b を開け、a 及び c を閉

じ、蒸気だまり（B）、ケルダールフラスコ（C）及び冷却管（E）に水蒸気を送って5分間以上洗浄する。

(c) 蒸留開始

cを開き、続いてaを開きbを閉じる。三角フラスコ（300 mL、F）にほう酸水溶液 25 mL～30 mL<sup>(7)</sup>、ブロモクレゾールグリーン-メチルレッド溶液を2、3滴加え、冷却管（E）の先端をその液中に浸す。次に、分解液の入ったケルダールフラスコ（C）を装着して、eを閉じdを開き、漏斗等（G）から16 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<sup>(7)</sup>を入れる。素早くdを閉じ、bを開け、aを閉じて、蒸気だまり（B）に水蒸気を通し、eを開け、cを閉じて蒸留を開始する<sup>(8)</sup>。

(7) 試薬使用例：アンモニア捕集液として4%（w/v）ほう酸水溶液25 mL、アンモニアガス遊離用のアルカリ試薬として40%（w/v）水酸化ナトリウム水溶液40 mLなど。

(8) 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℃を超えない範囲で蒸留を行う。

(d) 蒸留終了

三角フラスコ（F）の留液が約100 mL<sup>(9)</sup>以上になるまで蒸留を続けた後、三角フラスコ（F）を下げて冷却管（E）の先端を液面から離し、水で冷却管（E）の先端を洗いながら三角フラスコ（F）を取り出す。蒸留を終える時は、まずcを開き、続いてaを開き、bを閉じる。

(9) 留液は100 mLで十分である。ただし、測定値の変動、かたよりを小さくするため、留液量は空試験も含めて同量とする。

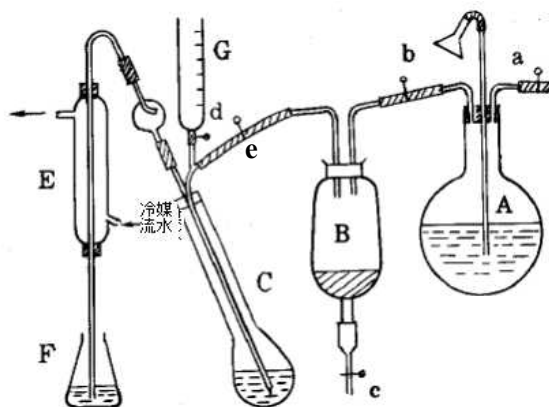


図 塩入・奥田式蒸留装置

8.4 滴定

蒸留で得られた留液を0.05 mol/L 硫酸でビュレット／自動ビュレットを用いて滴定する。留液が緑色→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。滴定値を小数第2位まで記録する。

## 9. 計算

次の式により全窒素分% (w/v) <sup>(10)</sup>を算出する。

$$\text{全窒素分\% (w/v)} = ((T - B) \times F \times M \times A \times 2 / 1000V) \times 100$$

*T* : 試料における滴定値 (mL)

*B* : 空試験における滴定値 (mL) <sup>(11)</sup>

*F* : 滴定溶液のファクター

*M* : 窒素の原子量 (= 14.007)

*A* : 滴定溶液の濃度 (= 0.05 mol/L)

*V* : 試料採取量 (mL)

(10) 小数第4位を四捨五入し、小数第3位まで算出する。

(11) 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、空試験における滴定値を0 mLとする。

## しょうゆの全窒素分測定手順書（パルナス・ワグナー型蒸留）

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、しょうゆの日本農林規格に規定する「しょうゆ」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：JIS K 0557 に規定する A2 以上の品質を有するもの。
- (b) 硫酸：JIS K 8951 に規定する特級、又はこれと同等以上のもの。
- (c) 硫酸カリウム：JIS K 8962 に規定する特級、又はこれと同等以上のもの。
- (d) 硫酸銅（Ⅱ）五水和物：JIS K 8983 に規定する特級、又はこれと同等以上のもの。
- (e) ほう酸：JIS K 8863 に規定する特級、又はこれと同等以上のもの。
- (f) 水酸化ナトリウム：JIS K 8576 に規定する特級、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：JIS K 8840 に規定する特級、又はこれと同等以上のもの。
- (h) メチルレッド：JIS K 8896 に規定する特級、又はこれと同等以上のもの。
- (i) エタノール（95）：JIS K 8102 に規定する 1 級、又はこれと同等以上のもの。

#### 4.2 滴定溶液の標定に使用する試薬等

- (a) ブロモフェノールブルー：JIS K 8844 に規定する特級、又はこれと同等以上のもの。
- (b) エタノール（95）：「4.1 (i)」と同様のもの。
- (c) 炭酸ナトリウム：JIS K 8005 に規定す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、空気中の二酸化炭素を遮り、冷却したもの。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) 試料採取用体積計：ピストンを備えた空気置換式若しくは直接置換式のもので、JIS K 0970 に従い、1 mL の設定容量における系統誤差、偶然誤差を求め、それぞれ ± 1.0 % 以内、0.3 % 以下であるもの。
- (c) ケルダールフラスコ：50 mL 容～ 300 mL 容のもの。
- (d) 出力可変式分解台：ケルダールフラスコを熱することができるもので、ケルダールフラスコに沸騰石 3 個～ 5 個と水 50 mL を入れ、10 分間最大出力に保った熱源に乗せたとき、5 分以内に沸騰させる能力を有するもの。
- (e) 蒸留装置：水蒸気蒸留装置（図 パルナス・ワグナー型蒸留装置）を使用する。
- (f) 三角フラスコ：300 mL 容のもの。
- (g) 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 のものでクラス A のもの、又はこれと同等以上のもの。
- (h) 全量フラスコ：「8.3 (a)」により、分解液の一部を蒸留する場合は、JIS R 3505 に規定する呼び容量が 100 mL のものでクラス A のもの、又はこれと同等以上のもの。
- (i) 全量ピペット：「8.3 (a)」により、分解液の一部を蒸留する場合は、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。

### 5.2 滴定溶液の標定に使用するもの

- (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) マップル炉：600 °C 以上まで加熱できるもの。
- (d) 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。
- (e) 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 4.5 g と硫酸銅（II）五水和物 0.5 g を混合する<sup>(1)</sup>。

(1) 市販のタブレット状の混合分解促進剤を使用してもよい。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1錠である。

## 6.2 水酸化ナトリウム水溶液（アンモニアガス遊離用）

水溶液 1 L 中に水酸化ナトリウム 250 g ～ 450 g が溶解しているように調製する<sup>(2)</sup>（25 % ～ 45 %（w/v）水酸化ナトリウム水溶液）。

(2)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、氷水で冷却しながら水を1 L加える。若しくは、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 ブロモクレゾールグリーン—メチルレッド溶液

エタノール(95)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 を含むように調製する。

## 6.4 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<sup>(3)</sup>（1 % ～ 4 %（w/v）ほう酸水溶液）。

(3)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）。

## 6.5 0.025 mol/L硫酸（滴定溶液）（「8.3 (a)」により、分解液の一部を蒸留する場合）

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て「8.4 滴定」を行う場合は、以下の調製、標定を実施する必要はない。なお、標定は、以下に示した標定方法によるほか、日本薬局方に記載する方法により実施してもよい。

### (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、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、0.5 g ～ 0.6 g を 0.1 mg の桁まで量りとり、全量フラスコを用いて二酸化炭素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 0.025 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。

**(c) 計算**

$$0.025 \text{ mol/L 硫酸のファクター} = (1000 \times w \times p / 100) / (V \times A \times M) \times (25 / 250)$$

$w$  : 炭酸ナトリウムひょう取量 (g)

$p$  : 炭酸ナトリウム純度 (% (w/w))

$V$  : 滴定値 (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)

**6.6 0.05 mol/L硫酸（滴定溶液）（「8.3 (b)」により、分解液の全部を蒸留する場合）**

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て「8.4 滴定」を行う場合は、以下の調製、標定を実施する必要はない。なお、標定は、以下に示した標定方法によるほか、JIS K 8001 若しくは日本薬局方に記載する方法により実施してもよい。

**(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、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 g ~ 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二酸化炭素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。

**(c) 計算**

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

$w$  : 炭酸ナトリウムひょう取量 (g)

$p$  : 炭酸ナトリウム純度 (% (w/w))

$V$  : 滴定値 (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)

**7. 試験用試料の調製**

市販の製品をかき混ぜ、そのまま試料とする。

**8. 測定手順****8.1 試料採取**

試料 1 mL を試料採取用体積計で正確に量りとり、ケルダールフラスコに採取する<sup>(4)</sup>。  
空試験として空のケルダールフラスコを用意し、以降は試料を入れたケルダールフラスコと同様に扱う。

(4) 空気置換式体積計を試料の採取に用いる場合は、リバースピペット法（ブローアウトを含めた2段階で液体を排出するピペットにおいて、ブローアウト分まで試料溶液を吸引し、1段階目までの排出により、ブローアウト分の試料溶液をチップ内に残し、設定体積を採取する方法）による。なお、試料採取用体積計が利用できない場合は、試料の密度をJIS K 0061に従い測定し、試料約1.0 g～1.3 gを0.1 mgの単位まで正確に量りとり、試料採取量（mL）を算出する。

## 8.2 分解

試料を入れたケルダールフラスコに分解促進剤 5 g 及び硫酸 8 mL を加える。出力可変式分解台で泡立ちが穏やかになるまで弱く加熱し、その後出力を最大にする。分解液が清澄になった後、約 90 分間出力最大のまま分解を続ける。全分解時間は 2 時間以上とする。分解終了後、室温まで放冷し、分解液に水 20 mL ～ 50 mL 程度を加える<sup>(5)</sup>。

(5) 蒸留を容易にするため、使用するケルダールフラスコ容量や蒸留に用いる分解液量に適した量の水を放冷後すみやかに加え、ふりまぜておく。

## 8.3 蒸留

以下の説明は、図のパルナス・ワグナー型蒸留装置を例としている。(a) 又は (b) のうちどちらかで蒸留を行う。

### (a) 分解液の一部を蒸留する場合

#### ① 蒸留の準備

分解液を 100 mL 容全量フラスコに水で 3 回以上洗い込み、定容する（供試液）<sup>(6)</sup>。  
ケルダールフラスコに水を入れて熱くなった場合は、放冷した後に定容する。

水蒸気発生フラスコ（A）に沸騰石と水を適量入れ、a を開け、b を閉じ 10 分間以上沸騰させ<sup>(7)</sup>、冷却管（E）を冷却装置又は水道水により冷却する。

(6) 定容を行う際は、時折、円を描くように振り混ぜながら水を加える。

(7) 揮発性成分を除去するため。

#### ② 流路の洗浄

b を開け、a 及び c を閉じ、蒸気だまり（B）、蒸留管（C）及び冷却管（E）に水蒸気を送って 5 分間以上洗浄する。

#### ③ 蒸留開始

c を開き、続いて a を開き b を閉じる。三角フラスコ（300 mL、F）にほう酸水溶液 25 mL ～ 30 mL<sup>(8)</sup>、プロモクレゾールグリーン—メチルレッド溶液を 2、3 滴加え、冷却管（E）の先端をその液中に浸す。d を開き、漏斗等（G）から供試液 25 mL

を全量ピペットで蒸留管（C）へ注ぎ入れ、漏斗等（G）から4 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<sup>(8)</sup>を入れる。素早くdを閉じ、bを開け、aを閉じて、蒸気だまり（B）に水蒸気を通す。cを閉じて蒸留を開始する<sup>(9)</sup>。

(8) 試薬使用例：アンモニア捕集液として4 %（w/v）ほう酸水溶液25 mL、アンモニアガス遊離用のアルカリ試薬として40 %（w/v）水酸化ナトリウム水溶液10 mLなど。

(9) 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を超えない範囲で蒸留を行う。

#### ④ 蒸留終了

三角フラスコ（F）の留液が約100 mL<sup>(10)</sup>以上になるまで蒸留を続けた後、三角フラスコ（F）を下げて冷却管（E）の先端を液面から離し、水で冷却管（E）の先端を洗いながら三角フラスコ（F）を取り出す。蒸留を終える時は、まずcを開き、続いてaを開き、bを閉じる。

(10) 留液は100 mLで十分である。ただし、測定値の変動、かたよりを小さくするため、留液量は空試験も含めて同量とする。

#### (b) 分解液の全部を蒸留する場合

##### ① 蒸留の準備

水蒸気発生フラスコ（A）に沸騰石と水を適量入れ、aを開け、bを閉じ10分以上沸騰させ<sup>(11)</sup>、冷却管（E）を冷却装置又は水道水により冷却する。

(11) 揮発性成分を除去するため。

##### ② 流路の洗浄

しょうゆの全窒素分測定手順書（パルナス・ワグナー型蒸留）の「8.3 (a) ② 流路の洗浄」と同じ。

##### ③ 蒸留開始

cを開き、続いてaを開きbを閉じる。三角フラスコ（300 mL、F）にほう酸水溶液25 mL～30 mL<sup>(12)</sup>、ブロモクレゾールグリーン-メチルレッド溶液を2、3滴加え、冷却管（E）の先端をその液中に浸す。dを開き、漏斗等（G）から分解液全量を蒸留管（C）へ3回以上洗い込みながら注ぎ入れ、漏斗等（G）から16 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<sup>(12)</sup>を入れる。素早くdを閉じ、bを開け、aを閉じて、蒸気だまり（B）に水蒸気を通す。cを閉じて蒸留を開始する<sup>(13)</sup>。

(12) 試薬使用例：アンモニア捕集液として4 %（w/v）ほう酸水溶液25 mL、アンモニアガス遊離用のア

ルカリ試薬として40 % (w/v) 水酸化ナトリウム水溶液40 mLなど。

(13) 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を超えない範囲で蒸留を行う。

#### ④ 蒸留終了

しょうゆの全窒素分測定手順書（パルナス・ワグナー型蒸留）の「8.3 (a) ④ 蒸留終了」と同じ。

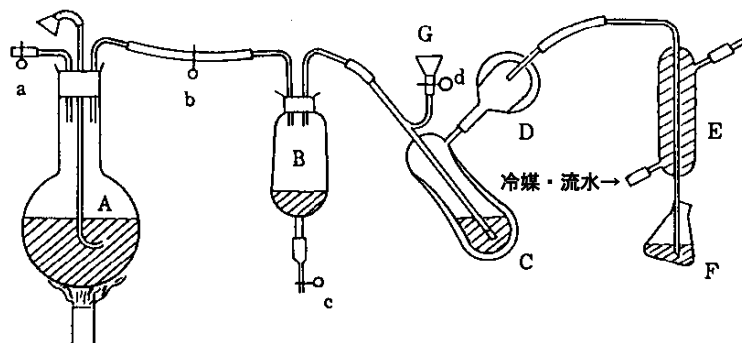


図 パルナス・ワグナー型蒸留装置

### 8.4 滴定

「8.3 (a)」により、分解液の一部を蒸留する場合は、蒸留で得られた留液を 0.025 mol/L 硫酸でビュレット／自動ビュレットを用いて滴定し、「8.3 (b)」により、分解液の全部を蒸留する場合は、蒸留で得られた留液を 0.05 mol/L 硫酸でビュレット／自動ビュレットを用いて滴定する。留液が緑色 → 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。滴定値を小数第2位まで記録する。

## 9. 計算

9.1 「8.3 (a)」により、分解液の一部を蒸留した場合  
次の式により全窒素分% (w/v)<sup>(14)</sup>を算出する。

$$\text{全窒素分\% (w/v)} = ((T - B) \times F \times M \times A \times 2 / 1000V) \times 100 \times (100 / 25)$$

$T$ : 試料における滴定値 (mL)

$B$ : 空試験における滴定値 (mL)<sup>(15)</sup>

$F$ : 滴定溶液のファクター

$M$ : 窒素の原子量 (= 14.007)

$A$ : 滴定溶液の濃度 (= 0.025 mol/L)

$V$ : 試料採取量 (mL)

(14) 小数第4位を四捨五入し、小数第3位まで算出する。

(15) 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、空試験における滴定値

を0 mLとする。

9.2 「8.3 (b)」により、分解液の全部を蒸留した場合  
次の式により全窒素分% (w/v) <sup>(16)</sup>を算出する。

$$\text{全窒素分\% (w/v)} = ((T - B) \times F \times M \times A \times 2 / 1000V) \times 100$$

*T* : 試料における滴定値 (mL)

*B* : 空試験における滴定値 (mL) <sup>(17)</sup>

*F* : 滴定溶液のファクター

*M* : 窒素の原子量 (= 14.007)

*A* : 滴定溶液の濃度 (= 0.05 mol/L)

*V* : 試料採取量 (mL)

(16) 小数第4位を四捨五入し、小数第3位まで算出する。

(17) 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、空試験における滴定値を0 mLとする。

## しょうゆの全窒素分測定手順書（自動蒸留）

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、しょうゆの日本農林規格に規定する「しょうゆ」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：JIS K 0557 に規定する A2 以上の品質を有するもの。
- (b) 硫酸：JIS K 8951 に規定する特級、又はこれと同等以上のもの。
- (c) 硫酸カリウム：JIS K 8962 に規定する特級、又はこれと同等以上のもの。
- (d) 硫酸銅（Ⅱ）五水和物：JIS K 8983 に規定する特級、又はこれと同等以上のもの。
- (e) ほう酸：JIS K 8863 に規定する特級、又はこれと同等以上のもの。
- (f) 水酸化ナトリウム：JIS K 8576 に規定する特級、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：JIS K 8840 に規定する特級、又はこれと同等以上のもの。
- (h) メチルレッド：JIS K 8896 に規定する特級、又はこれと同等以上のもの。
- (i) エタノール（95）：JIS K 8102 に規定する 1 級、又はこれと同等以上のもの。

#### 4.2 滴定溶液の標定に使用する試薬等

- (a) ブロモフェノールブルー：JIS K 8844 に規定する特級、又はこれと同等以上のもの。
- (b) エタノール（95）：「4.1 (i)」と同様のもの。
- (c) 炭酸ナトリウム：JIS K 8005 に規定す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、空気中の二酸化炭素を遮り、冷却したもの。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) 試料採取用体積計：ピストンを備えた空気置換式若しくは直接置換式のもので、JIS K 0970 に従い、1 mL の設定容量における系統誤差、偶然誤差を求め、それぞれ ± 1.0 % 以内、0.3 % 以下であるもの。
- (c) 分解用容器：300 mL 容ケルダールフラスコ又は 250 mL ～ 300 mL 容ケルダール分解チューブを用いる。
- (d) 加熱分解装置：「8.2 分解」において①又は②のどちらかを用いる。
  - ① 出力可変式分解台：分解用容器を熱することができるもので、分解用容器に沸騰石 3 個～5 個と水 50 mL を入れ、10 分間最大出力に保った熱源に乗せたとき、5 分以内に沸騰させる能力を有するもの。
  - ② 加熱ブロック分解装置：420 °C において分解チューブに入れた 50 mL の水を 2 分 30 秒以内に沸騰させる能力を有するもの。
- (e) 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）を使用する。（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。）
- (f) 三角フラスコ：300 mL 容のもの。
- (g) 滴定器具・装置：「8.4 滴定」において①又は②のどちらかを用いる。
  - ① 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 のものでクラス A のもの、又はこれと同等以上のもの。
  - ② 自動滴定装置：中和滴定を行う自動分析装置。20 mL 容以上のビュレット容量のものを用いる。

### 5.2 滴定溶液の標定に使用するもの

- (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―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) マップル炉：600 °C 以上まで加熱できるもの。
- (d) 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。
- (e) 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。なお、「8.4 (b)」により、自動滴定装置を用いる場合は、その装置に適した滴定用指示薬溶液及び適した濃

度の滴定溶液（硫酸）を調製する。

### 6.1 分解促進剤

硫酸カリウム 4.5 g と硫酸銅（Ⅱ）五水和物 0.5 g を混合する<sup>(1)</sup>。

(1) 市販のタブレット状の混合分解促進剤を使用してもよい。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1錠である。

### 6.2 水酸化ナトリウム水溶液（アンモニアガス遊離用）

水溶液 1 L 中に水酸化ナトリウム 250 g ～ 450 g が溶解しているように調製する<sup>(2)</sup>（25 % ～ 45 %（w/v）水酸化ナトリウム水溶液）。

(2) 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、氷水で冷却しながら水を 1 L 加える。若しくは、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 ブロモクレゾールグリーン-メチルレッド溶液

エタノール(95) 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 を含むように調製する。

### 6.4 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<sup>(3)</sup>（1 % ～ 4 %（w/v）ほう酸水溶液）。

(3) 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）。

### 6.5 0.05 mol/L 硫酸（滴定溶液）

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て「8.4 滴定」を行う場合は、以下の調製、標定を実施する必要はない。なお、標定は、以下に示した標定方法によるほか、JIS K 8001 若しくは日本薬局方に記載する方法により実施してもよい。

#### (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、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 g～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二酸化炭素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。

### (c) 計算

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

$w$  : 炭酸ナトリウムひょう取量 (g)

$p$  : 炭酸ナトリウム純度 (% (w/w))

$V$  : 滴定値 (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)

## 7. 試験用試料の調製

市販の製品をかき混ぜ、そのまま試料とする。

## 8. 測定手順

### 8.1 試料採取

試料1 mLを試料採取用体積計で正確に量りとり、分解用容器に採取する<sup>(4)</sup>。

空試験として空の分解用容器を用意し、以降は試料を入れた分解用容器と同様に扱う。

(4) 空気置換式体積計を試料の採取に用いる場合は、リバースピペット法（ブローアウトを含めた2段階で液体を排出するピペットにおいて、ブローアウト分まで試料溶液を吸引し、1段階目までの排出により、ブローアウト分の試料溶液をチップ内に残し、設定体積を採取する方法）による。なお、試料採取用体積計が利用できない場合は、試料の密度をJIS K 0061に従い測定し、試料約1.0 g～1.3 gを0.1 mgの単位まで正確に量りとることにより、試料採取量 (mL) を算出する。

### 8.2 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る場合

試料を入れた分解用容器に分解促進剤5 g及び硫酸8 mLを加える。出力可変式分解台で泡立ちが穏やかになるまで弱く加熱し、その後出力を最大にする。分解液が清澄になった後、約90分間出力最大のまま分解を続ける。全分解時間は2時間以上とする。分解終了後、室温まで放冷し、分解液に水20 mL～50 mL程度を加える<sup>(5)</sup>。

(5) 蒸留を容易にするため、「8.4 滴定」において使用する滴定器具・装置に適した量の水を放冷後すみやかに加え、ふりまぜておく。

#### (b) 加熱ブロック分解装置を用いる場合

試料を入れた分解チューブに分解促進剤 5 g 及び硫酸 8 mL を加える。あらかじめ 200 °C に保温しておいたブロック分解装置で泡立ちが穏やかになるまで加熱する<sup>(6)</sup>。その後 420 °C にする。分解液が清澄になった後、約 90 分間分解を続ける。全分解時間は 2 時間以上とする。分解終了後、室温まで放冷し、分解液に水 20 mL ～ 50 mL 程度を加える<sup>(7)</sup>。

(6) 発生する硫酸ミストに対応する排気マニホールド等を備え、安全な分析環境が確保できる場合は、硫酸添加後、30 % 過酸化水素約 1 mL を加えることにより、420 °C から分解を開始することができる。発泡等により分解液の漏出のおそれがある場合は、加熱を中止し、発泡が収まるまで放冷した後、再び加熱を開始する。

(7) 蒸留を容易にするため、「8.4 滴定」において使用する滴定器具・装置に適した量の水を放冷後すみやかに加え、ふりまぜておく。

### 8.3 蒸留

「8.4 (a)」により、ビュレット／自動ビュレットを用いる場合は、300 mL 容三角フラスコにほう酸水溶液 25 mL ～ 30 mL<sup>(8)</sup>、ブロモクレゾールグリーン-メチルレッド溶液を 2、3 滴加え、留液の出口をその液中に浸す。「8.4 (b)」により、自動滴定装置を用いる場合は、その装置に適した容器に適量のほう酸水溶液、滴定用指示薬溶液を加え、留液の出口をその液中に浸す。次に分解液に 16 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<sup>(8)</sup>、その装置の操作法に従い蒸留する。留液が 100 mL 以上得られるように蒸留を行う<sup>(9)</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の容器を取り出す。

(8) 試薬使用例：アンモニア捕集液として 4 % (w/v) ほう酸水溶液 25 mL、アンモニアガス遊離用のアルカリ試薬として 40 % (w/v) 水酸化ナトリウム水溶液 40 mL など。

(9) 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 を超えない範囲で蒸留を行う。

### 8.4 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／自動ビュレットを用いる場合

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。留液が緑色 → 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 位までを記録する。

#### (b) 自動滴定装置を用いる場合

装置の使用法に従い自動滴定装置で滴定する。終点までの滴定量を記録する。

## 9. 計算

次の式により全窒素分<sup>(10)</sup>を算出する。

$$\text{全窒素分\% (w/v)} = ((T - B) \times F \times M \times A \times 2 / 1000V) \times 100$$

*T*：試料における滴定値（mL）

*B*：空試験における滴定値（mL）<sup>(11)</sup>

*F*：滴定溶液のファクター

*M*：窒素の原子量（= 14.007）

*A*：滴定溶液の濃度（mol/L）

*V*：試料採取量（mL）

(10) 小数第4位を四捨五入し、小数第3位まで算出する。

(11) 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、空試験における滴定値を0 mLとする。

履歴

年月日	改訂内容等
2009/02/09	規格の記載に比べて詳細な手順書（2008年版）を用いた「しょうゆの全窒素分（ケルダール法）共同試験（2008/10）」の結果を食品分析妥当性委員会において評価し、測定方法の妥当性が確認された。
2009/07/10	妥当性が確認された方法を基にした「ケルダール法によるしょうゆの全窒素分測定法（案）」は、パブリックコメントを考慮した結果、農林物資規格調査会総会において規格への採用は見送られた。
2013/01/30	「ケルダール法によるしょうゆの全窒素分測定法（案）」の変更を検討し、その結果を妥当性確認調査検討・評価委員会において評価し、変更の問題は認められないこととなった。
2014/08/29	農林物資規格調査会（2014）の議決を受けて、しょうゆの日本農林規格の全窒素分測定方法が改正された。
2014/09/08	<p>手順書（2014）公表。</p> <p>（手順書（2008年版）から手順書（2014）への主な変更点）</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・出力可変式分解台を用いる場合に使用可能なケルダールフラスコの容量の拡張</li> <li>・パルナス・ワグナー型蒸留装置による蒸留分解液量の拡張・加熱ブロック分解装置を用いる場合の分解開始温度の拡張</li> <li>・試料採取用体積計の変更</li> <li>・試料採取用体積計が利用できない場合の試料採取法の追加</li> </ul>