

Megazyme

www.megazyme.com

統合型総食物繊維測定キット 取扱説明書

(難消化性澱粉および
難消化性オリゴ糖を測定対象に含む分析法)

K-INTDF 04/20

対応分析法:

AOAC Method 2009.01 & 2011.25

&

AACC Method 32-45.01 & 32-50.01

(100 分析/キット)



はじめに

一般的に食物繊維の摂取量が増えると、便秘、糖尿病、肥満、冠状動脈性心疾患などの疾患が軽減されると考えられています¹⁻³。1970年代にTrowellが提唱した食物繊維の定義は、1976年に次のように整理されました³。

食物繊維とは、ヒトの消化酵素では分解されない、可食性植物細胞の残渣、多糖類、リグニンおよびそれらに関連する成分から構成される。本定義が対象とする食品の主要構成成分には、セルロース、ヘミセルロース、リグニン、ガム、化工セルロース、粘質多糖類、オリゴ糖、ペクチンに加え、ワックス、クチン、スベリンなどの関連微量成分が含まれる。

この定義に基づき、食物繊維を測定するための適切な分析法が欧州および米国の研究者コンソーシアムによって開発されました³。これにより、AOAC 985.29法(Prosky法)^{4,5}が確立され、さらに緩衝液を変更したAOAC 991.43法⁴など、後続の改良法へと発展しました。これらの方法は、植物性食品および食品原料に含まれる総食物繊維量を正確に測定する目的で開発されました。具体的には、澱粉およびタンパク質を加水分解して除去することを目的としています。脂肪は、未加水分解物を回収する際に用いられる溶媒によって除去されます。また、当初から、すべてのタンパク質が完全には加水分解されるわけではないことが認識されていたため、各試料は2反復で分析し、残渣を回収して秤量します。これらの残渣の一方は灰分含量の定量に、もう一方はタンパク質の定量に用いられます。定量した灰分とタンパク質の重量を、2反復の残渣重量の平均値から差し引きます。また、この分析法では澱粉も完全には加水分解・除去されないことが認められました。このことが、いわゆる「難消化性澱粉」の発見につながりました。そこで問題となったのは、難消化性澱粉を測定して総食物繊維量に加えるべきか、もしくは分析操作で除去して対象外とすべきか、という点でした。難消化性澱粉はヒトの小腸で消化されずに通過するため、これを正確に測定して総食物繊維量に含めるべき、というのが一般的な合意事項となりました。1990年代の研究では、AOAC 991.43法が難消化性澱粉を過小評価することが示され、この成分を測定する代替法が開発・評価されました。これらの新規分析法の多くは、さまざまな難消化性澱粉含有試料において類似した結果を示しましたが、室間共同試験の厳密な評価を通過したのは、McClearyらの方法⁶(AOAC 2002.02法)のみでした。AOAC 2002.02法で得られた分析値は、回腸ストーマ患者から得られた結果とも一致していました。

1990年代半ばには、難消化性オリゴ糖が生理学的に食物繊維と同様の挙動を示すことから、これらも食物繊維に含めるべきであるとの合意が形成されました。これを受け、以下の成分を対象とした特異的な分析法が開発されました。

フルクトサン(およびフラクトオリゴ糖、AOAC 997.08法および999.03法)^{7,8}、ガラクトオリゴ糖(AOAC 2001.03法)⁹、難消化性マルトデキストリン(AOAC 2001.03法)¹⁰、ならびにポリデキストロース(AOAC 2000.11法)¹¹。これらの分析法の開発は、特定成分を測定する原料開発者、食品メーカー、および分析者にとって極めて有用でした。しかしながら、試料中の総食物繊維含量の測定では新たな問題が生じました。これらの特異的分析法の対象となる炭水化物(難消化性澱粉、イヌリン、難消化性マルトデキストリンなど)の多くは、その一部が従来のAOAC 985.29法および991.43法でも測定されてしまいます。そのため、特異的分析法で定量した値を総食物繊維値にそのまま加算すると、成分の一部が重複測定されることになります。この重複測定の問題を図1に示します。

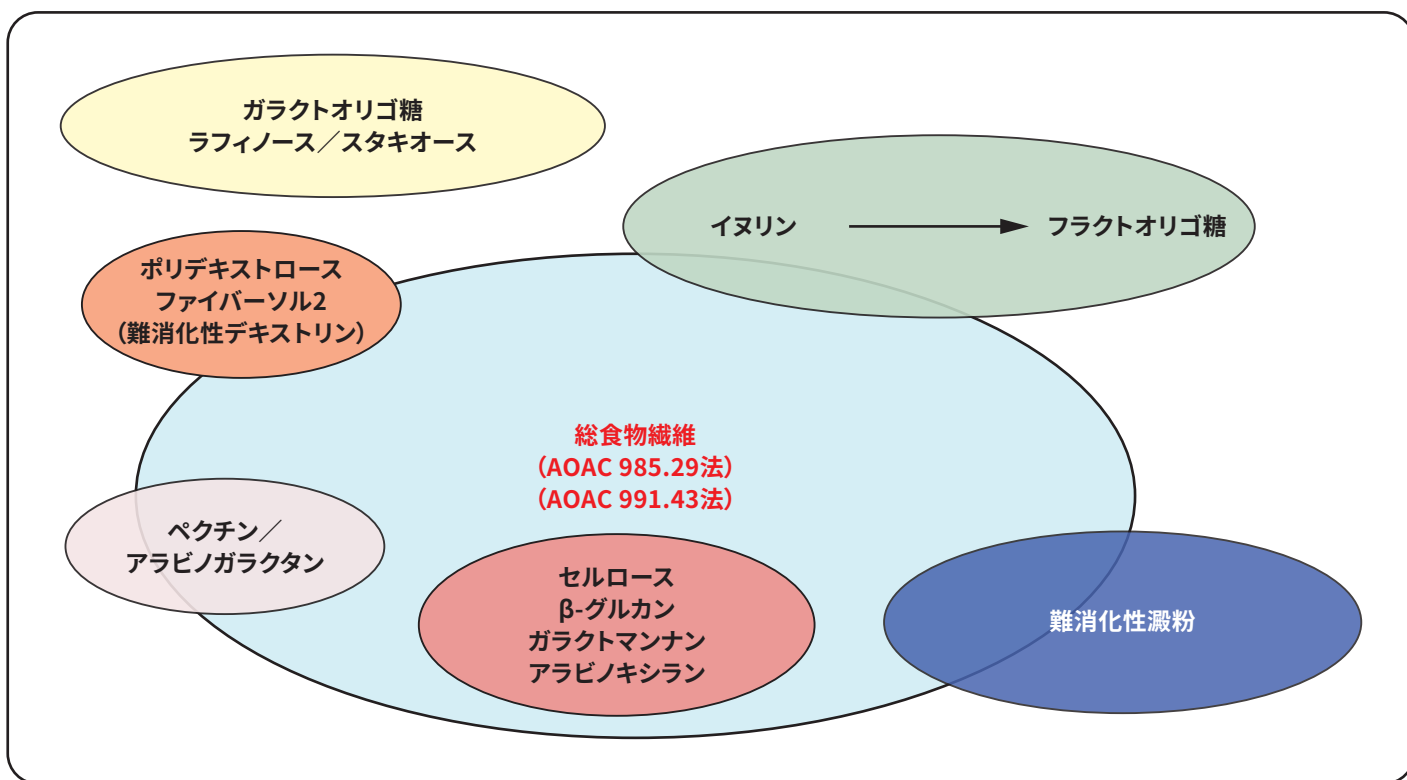


図1. AOAC 985.29法および991.43法により定量される成分および定量されない成分

この重複測定の問題を踏まえ、難消化性澱粉および難消化性オリゴ糖を含む総食物繊維を定量できる分析手法の研究・開発が進められました。開発された統合型総食物繊維分析法を図2に示します。本法は、AOAC 2002.02法（難消化性澱粉）、991.43法（総食物繊維）、および2001.03法（難消化性マルトデキストリン）を基に設計されています。本法の原理はMcCleary (2007)¹²に詳述されており、AOAC Internationalによる室間共同試験を経て、その妥当性が確認されています（AOAC 2009.01法）¹³。また、不溶性食物繊維（IDF）、水溶性で78 %エタノールに沈殿する食物繊維（SDFP）、および水溶性で78 %エタノールに沈殿しない食物繊維（SDFS）を別々に定量する改良法も評価され、その妥当性が確認されています（AOAC 2011.25法）¹⁴。SDFPは以前は、高分子量水溶性食物繊維（HMWSDF）と呼ばれ、SDFSは低分子量水溶性食物繊維（LMWSDF）と呼ばれていました。SDFSは難消化性オリゴ糖とも呼ばれます。

フラクトオリゴ糖を完全に測定および消化性マルトデキストリンの完全な除去を目的としたいくつかの改良については、McClearyら（2013）¹⁵により報告されており、RS4（リン酸架橋澱粉粒）の測定に関する課題についても言及しています。

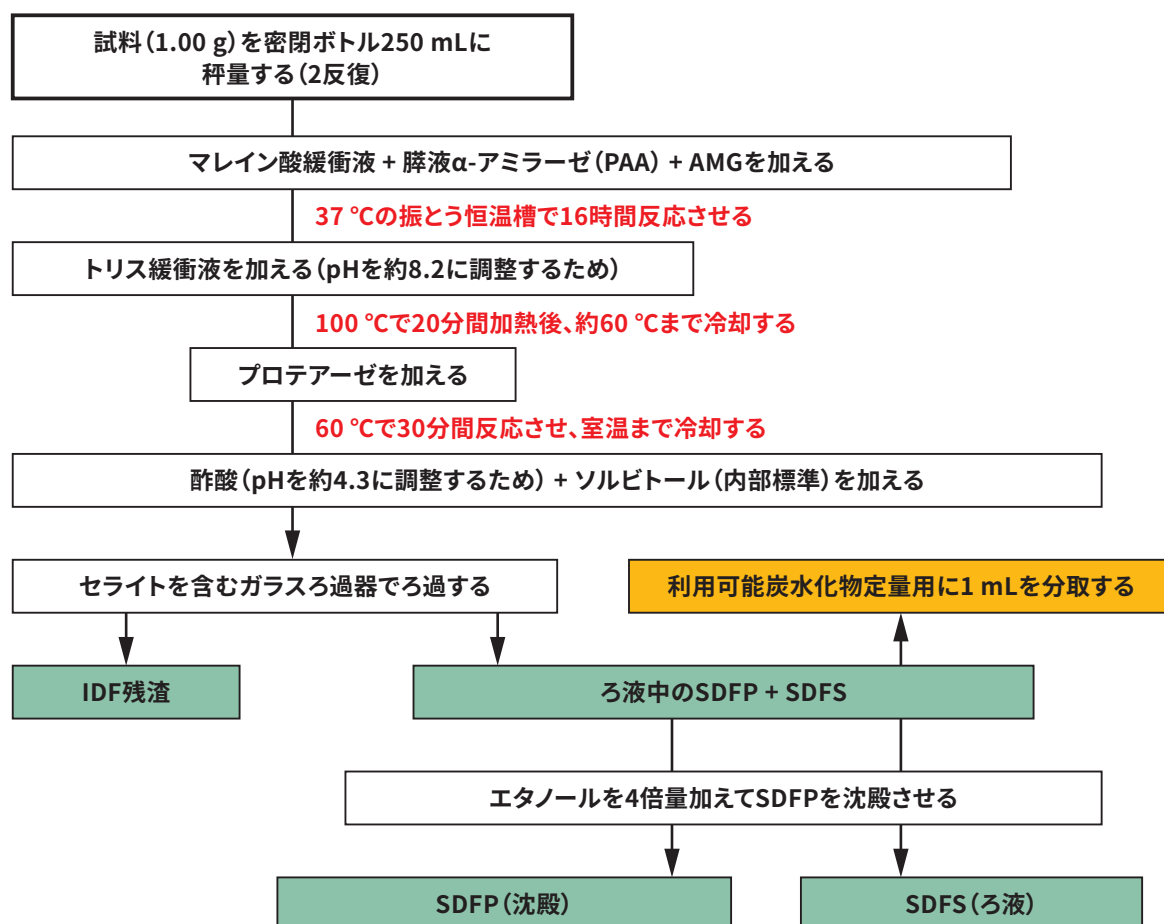


図2. CODEX準拠の統合型総食物繊維定量法の原理（IDF、SDFP、SDFSの個別定量）

2008年11月、CODEX栄養・特殊用途食品部会（CCNFSDU）において、食物繊維の国際的な定義が確立されました。この定義は2009年にCODEX委員会（CAC）で正式承認され（FAO, 2009）¹⁶、国際的に受け入れられています。

「食物繊維」とは、人間の消化管に内在する酵素で加水分解されない以下の分類に属する、10又はそれ以上の単量体からなる炭水化物ポリマーをいう：

摂取される食品に天然に存在する食用の炭水化物ポリマー（難消化性でんぷんを含む）

食品原料から物理的、酵素的又は化学的手段により得られ、管轄当局に対して一般に受け入れられる科学的根拠により実証された、健康への生理学的な効果を有することが示されている炭水化物ポリマー

管轄当局に対して一般に受け入れられる科学的根拠により実証された、健康への生理学的な効果を有することが示されている合成炭水化物ポリマー

a) 植物由来の場合、食物繊維には、植物細胞壁中の多糖類と密接に結合しているリグニン画分および／またはその他の成分が含まれる。ただし、これらの成分が食物繊維分析のためのAOAC重量分析法によって定量される場合に限られる。これには、AOAC 991.43法において植物多糖類と密接に関連して存在するリグニン画分およびその他の成分（タンパク質画分、フェノール性化合物、ワックス、サポニン、フィチン酸、クチン、フィステロール等）が含まれる。

植物原料に由来する場合、食物繊維にはリグニンの分画あるいは植物の細胞壁に由来する多糖類に関連したその他の成分が含まれる。また、これらの成分は食物繊維のための特定の分析方法により測定される。しかしながら、抽出後に食品中に再導入された場合、これらの成分は食物繊維の定義に含まれない。

b) 3から9の単量体からなる炭水化物を含めるかどうかの判断は各国当局に委ねる。」

本取扱説明書に記載した統合型総食物繊維測定法は、2007年に最初に公開され¹²、AOAC Internationalによる室間共同試験を経て、その妥当性が確認されています(AOAC 2009.01法¹³および2011.25法¹⁴)。さらに、CODEX委員会によりType I Methodとして採用されています(2011年3月)。

適用範囲

本法は、難消化性澱粉および難消化性オリゴ糖(低分子量水溶性食物繊維、SDFSとも呼ばれる)を含むすべての食物繊維含有試料に適用されます。適用例: 穀類、果物・野菜、穀類加工品、果実加工品、各種食品。

統合型総食物繊維測定キット

100回測定用の試薬キットを提供しています。本キットには、以下の試薬が同梱されています。

- ボトル1** : 濃縮 α -アミラーゼ(豚膵臓由来)(**E-PANAA**) ; 4 g、75,000 U/g (Ceralpha法)
乾燥状態で-10 °C以下で保管する場合、5年以上安定
- ボトル2** : アミログルコシダーゼ (*Aspergillus niger* 由来) (**E-AMGDF**) ; 20 mL、3,300 U/mL
4 °Cで3年以上安定
- ボトル3** : プロテアーゼ サブチリシンA (*Bacillus licheniformis* 由来) (**E-BSPRT**) ; 10 mL、350 U/mL (チロシン相当量として)
-10 °C以下で3年以上安定
- ボトル4** : LC保持時間標準溶液[マルトデキストリン + マルトース (4:1)、約5 g] 室温で密閉保管する場合、3年以上安定
- ボトル5** : D-ソルビトール(約12 g、乾燥品) 室温で密閉保管する場合、3年以上安定
- セライト(酸洗浄済み、500 g、G-CEL-500G)は別売りです。

統合型総食物繊維測定法(難消化性澱粉および難消化性オリゴ糖を測定対象に含む分析法)

A. 測定原理

難消化性澱粉および重合度が3以上の低分子量水溶性食物繊維(SDFS、すなわち難消化性オリゴ糖)を含む統合型総食物繊維測定法(AOAC 2009.01法および2011.25法)について記載します。本法は、AOAC公定分析法 2002.02、985.29、991.43、2001.03の主な特長を組み合わせたものです。試料は2反復で調製し、密閉した250 mLボトルに入れます。振とう恒温槽(10ページ、図3)内で懸濁状態を維持できる十分な強度で16時間、37 °Cで攪拌しながら、 α -アミラーゼ(豚膵臓由来)(PAA)およびアミログルコシダーゼ(AMG)と反応させます。あるいは、水中でも使用可能な2mag Mixdrive 15[®] マグネチックスターラー(www.2mag.de)を使用することもできます(10ページ、図4)。この工程では、2種類の酵素の作用により、非難消化性澱粉が可溶化され、D-グルコース、マルトースおよび微量の部分的に難消化性を示すマルトデキストリンへと加水分解されます。これらの一部耐性を示すマルトデキストリンは、HPLCによるSDFS分析の前にさらに加水分解されます^{15,17}。反応は、pHを8.2に調整した後、短時間に加熱することで停止させます。試料中のタンパク質は変性させた後、プロテアーゼで消化します。各食物繊維画分の測定は、以下のとおり行います。

i. 不溶性食物繊維(IDF)、高分子量水溶性食物繊維(SDFP)および低分子量水溶性食物繊維(SDFS)の定量(AOAC 2011.25法)

IDFは、酵素処理後の反応液をろ過して回収する。回収した残渣は洗浄、乾燥後に秤量する。ろ液中のSDFPはエタノールまたは工業用変性アルコール(IMS)で沈殿させ、回収、乾燥後に秤量する。IDFおよびSDFP残渣はいずれも、タンパク質、灰分およびブランク値で補正し、最終計算に用いる。SDFP画分の含水エタノールろ液を濃縮、脱塩後、HPLCを用いてSDFSを分析する。

ii. 高分子量食物繊維(HMWDF)およびSDFSの総量の定量(AOAC 2009.01法)

反応混合物に95 %エタノールを4倍量加え、攪拌する。反応混合物からSDFPを沈殿させた後、懸濁液をろ過する。ガラスろ過器上に回収されたHMWDF(IDFおよびSDFPを含む)は、洗浄、乾燥後に秤量する。この残渣重量は、タンパク質、灰分およびブランク値で補正し、最終計算に用いる。含水エタノールろ液を濃縮、脱塩、再濃縮後、HPLCを用いてSDFSを分析する。**あるいは、この画分については、K-RINTDF(AOAC 2017.16法)に示される簡便な脱塩法を使用して分析することもできる。**

これらの分析法で使用される酵素は極めて高純度で、 β -グルカン、ペクチンおよびアラビノキシランを分解する夾雑酵素活性は認められません。フラクトオリゴ糖およびガラクトオリゴ糖などの難消化性オリゴ糖は加水分解されません。また、ポリデキストロースおよびファイバーソル2[®]の加水分解度は、供給元から提供されている情報と一致しています。

適切な酵素活性が確保されており、かつ不要な酵素活性が含まれていないことを確認するため、下記に示す標準試料(K-TDFC)を用い、試験手順全体に沿った評価試験を行います。新規ロットの酵素試薬はすべて評価試験を行う必要があり、また、過去6ヶ月以内に評価試験を実施していない酵素試薬についても、同様に試験を実施します。

標準試料	評価対象となる酵素	試料重量 (g)	想定回収率 (%)
ペクチン(柑橘類由来)	ペクチナーゼ ^c	0.1	87 ^c
β-グルカン(大麦由来)	β-グルカナナーゼ ^a	0.1	95~100
澱粉(小麦由来)	アミラーゼ ^b	1.0	0~2
カゼイン	プロテアーゼ ^b	0.3	0~2
ハイアミロース澱粉 ^d	α-アミラーゼ	1.0	約48
ガラクトン(カラマツ由来)	ペクチナーゼ ^c	0.1	約84 ^c

a 本試験において、存在してはいけない酵素の活性。

b 本試験において、十分機能していなければならない酵素の活性。

c 低分析値は主に試料の水分含量の影響によるものです。

酵素を加えない場合でも、AOAC 991.43法では同様の値が得られます。

d 本標準試料には酵素分解に耐性を持つ澱粉が高レベルで含まれます。

この値は、AOAC 991.43法で得られる総食物繊維値(29.3 %)よりも高い値を示します。

B. 装置

- 粉砕機**—遠心式、12歯ローターおよび0.5 mmふるい付き、または同等品。試料の過熱を防ぐため十分な気流または冷却機能を備えている場合に限り、少量試料にはサイクロンミルを使用できる。
- 酵素反応用ボトル**—250 mL Fisherbrand® ソーダガラス製広口瓶、ポリビニルライナー付きキャップ(cat. no. FB73219、www.fisher.co.uk)。
- るつぼ形ガラスろ過器**—Corning社 No. 32940-50C (Pyrex® 50 mL、pore size : Coarse、ASTM 40-60 μm) もしくは同等品

各試料につき4個のガラスろ過器を次のように準備する。

- マッフル炉で525 °Cにて一晩灰化する。破損を最小限に抑えるため、ガラスろ過器を取り出す前に炉内温度を130 °Cまで冷却する
- 吸引しながら、残留するセライトおよび灰分を完全に除去する。
- 2 % Micro-90洗浄液[C(r)] に室温で1時間浸漬する。
- ガラスろ過器を水および脱イオン水で洗浄する。
- 最終洗浄として、15 mLアセトンで洗浄し自然乾燥させる。
- 約1.0 gのセライトをガラスろ過器に加え、130 °Cで恒量になるまで乾燥させる。
- デシケーター内で約1時間冷却後、セライトを含むガラスろ過器の質量を記録する。

- 吸引ろ過用フラスコ**—側管付き1 Lブフナーフラスコ(14ページ、図11)。
- ゴム製アダプター**—ガラスろ過器と吸引ろ過瓶の接続用(14ページ、図11)。
- 真空装置**—真空度調整機能付き真空ポンプまたはアスピレーター(例: Edwards XDS 10、単相115/230V、製品コードA72601906)。
- 恒温槽**—回転式(150 rpm)、大容量(20~24 L)、カバー付きで37 ± 1 °Cおよび60 ± 1 °Cを維持できるもの(例: Grant® OLS 200振とう恒温槽)(10ページ、図3)。あるいは、恒温槽と2mag Mixdrive 15® 水中マグネチックスターラー(170 rpm設定)を併用し、30 x 7 mm 攪拌子と組み合わせて使用してもよい(10ページ、図4)。
- 天秤**—読取限度0.1 mg、正確で精密に量り取れるもの。
- 送風定温乾燥機**—2台、それぞれ103 ± 2 °Cおよび130 ± 3 °Cに設定する。
- タイマー**
- デシケーター**—気密性があり、シリカゲルまたは同等の乾燥剤を使用。乾燥剤は130 °Cで隔週一晩乾燥し使用する。
- pHメーター**
- ポジティブディスプレイメント式ピペット**—例: Eppendorf Multipette®
 - 5.0 mL Combitip® (0.1 mLおよび0.3 mLのAMGおよび0.1 mLのプロテアーゼ溶液分注用)。
 - 25 mL Combitip® (0.75 Mトリス緩衝液3 mLおよび2 M酢酸4 mL分注用)。

- n. **分注用／計量用器具**— (1) 78 % (v/v) エタノール (またはIMS)、95 % (v/v) エタノールおよびアセトン15 ± 0.5 mL、または (2) 緩衝液40 ± 0.5 mLを分注可能なもの。
- o. **メスシリンダー**— 目盛付き。100 mLおよび500 mL。
- p. **マグネチックスターラーおよび攪拌子**— (7 x 30 mm、プレーン型、VWR International cat.no. 442-0269)。
- q. **ゴム製スパチュラー**— VWR International cat. no. 53801-008 (14ページ、図11)
- r. **マッフル炉**— 525 ± 5 °C
- s. **ポリプロピレンカラム**— Bio-Rad社製、Econo-Pac™ ディスポーザブルクロマトグラフィーカラム (cat. no. 732-1010) およびAlltech社製 One-Way Stopcock (cat. no. 211524) (12ページ、図7)。
- t. **液体クロマトグラフ (LC)**— カラム温度90 °Cを維持できるオープンおよび50 µLインジェクションループ付き。マルトースとマルトリオースを分離できるシステムであること。
- u. **ガードカラム (またはプレカラム)**— Waters Guard Pak® LC プレカラムインサート (part no. WAT015209) または同等品。
- v. **LCカラム**— Waters Sugar-Pak® 6.5 x 300 mmカラム (part no. WAT085188) または同等品。移動相：蒸留水 + エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムカルシウム塩 (Na₂CaEDTA) (50 mg/L) [C(l)]、流速 0.5 mL/min、カラム温度 90 °C、カラムを十分に洗浄するため、分析時間は30分とする。
- w. **検出器**— 示差屈折率検出器 (RI)、50 °Cに維持する。
- x. **データインテグレーターまたはコンピューター**— ピーク面積測定用。
- y. **ディスポーザブルシリンジ用フィルター**— Millipore社製 Millex® シリンジドリブンフィルターユニット0.45 µm (低タンパク吸着Durapore PVDF)、25 mmまたは13 mm、もしくは同等品。
- z. **水用フィルター**— Millipore社製、0.45 µm Durapore® メンブレンフィルターHVLPタイプ、47 mm。
- aa. **フィルター装置**— 47 mm、0.45 µmフィルター [B(z)] を保持し、大容量の水をろ過できるもの。
- bb. **シリンジ**— 10 mL、ディスポーザブル、プラスチック製。
- cc. **シリンジ**— Hamilton® 100 µL、710SNR シリンジ。
- dd. **ロータリーエバポレーター**— Heidolph Laborota® 4000または同等品。
- ee. **温度計**— 110 °Cまで測定可能なもの。

C. 試薬

- a. **95 % (v/v) エタノール (またはIMS)**
- b. **78 % (v/v) エタノール (またはIMS)**— 1 Lメスフラスコに95 % (v/v) エタノール (またはIMS) 821 mLを入れる。脱イオン水で定容する。十分に混合する。液面位置を確認し、必要に応じ脱イオン水を加えて1 Lに調整し使用する。
- c. **アセトン (試薬特級)**
- d. **アミログルコシダーゼ (AMG) ストック溶液**— (ボトル2、3ページ) 3,300 U/mL、50 % (v/v) グリセロール溶液。溶液は粘性が高いため、ポジティブディスプレイメント方式のピペットを用いて分注すること。(注：酵素活性の1ユニットとは、40 °C、pH 4.5において1分間に可溶性澱粉から1 µmolのD-グルコースを遊離させるのに必要な酵素量です。) AMG溶液は、β-グルカナーゼ、β-キシラナーゼ、および検出可能なレベルの遊離D-グルコースを実質的に含まないものであること。4 °Cまたは -10 °C以下で5年以上安定である。
- e. **α-アミラーゼ (豚膵臓由来) (50 U/mL) / アミログルコシダーゼ (3.4 U/mL) 混合液**— 使用直前に、0.20 gのα-アミラーゼ (豚膵臓由来) (75,000 U/g、AOAC 2002.01法) (ボトル1、3ページ) を290 mLのマレイン酸ナトリウム緩衝液 (50 mM、pH 6.0 + 2 mM CaCl₂および0.02 %アジ化ナトリウム) [C(h)] に溶解し、5分間攪拌する。次いでAMG [C(d)] 0.3 mLを加える。-10 °C以下で2年以上安定である。
- f. **50% (v/v) グリセロール中プロテアーゼ [50 mg/mL、350 U/mL (チロシン相当量として)]**— (ボトル3、3ページ) 溶液は粘性が高いため、ポジティブディスプレイメント方式のピペットを用いて分注すること。プロテアーゼは、α-アミラーゼを含まず、またβ-グルカナーゼおよびβ-キシラナーゼを実質的に含まないこと。希釈せずそのまま使用する。4 °Cで3年以上安定である。
- g. **脱イオン水**
- h. **マレイン酸ナトリウム緩衝液**— 50 mM、pH 6.0 + 2 mM CaCl₂および 0.02 %アジ化ナトリウム。11.6 gのマレイン酸を1600 mLの脱イオン水に溶解し、4 M (160 g/L) NaOH溶液でpHを6.0に調整する。0.6 gの塩化カルシウム二水和物 (CaCl₂・2H₂O) および0.4 gのアジ化ナトリウムを加え、全量を2 Lに調整する。4 °Cで1年以上安定である。

注：pH調整が完了するまでアジ化ナトリウムを加えないこと。アジ化ナトリウムは酸化により有毒ガスを発生する。アジ化ナトリウムおよびマレイン酸は、SDSを確認したうえで、適切な個人用保護具およびドラフトチャンバーを使用し、慎重に取り扱うこと。

- i. **トリス緩衝液、0.75 M**—約 800 mLの脱イオン水 (pH 約10.5) に90.8 gのTRIS緩衝剤粉末 (**B-TRIS500**) を加えて溶解する。全量を1 Lに調整する。室温で1年以上安定である。
- j. **酢酸溶液、2 M**—1 Lメスフラスコに115 mLの氷酢酸 (Fluka 45731) を加える。脱イオン水で1 Lに希釈する。室温で1年以上安定である。
- k. **塩酸溶液、150 mM**—25 mLの濃塩酸 (Sigma社製 cat. no. 258148 - 2.5 L, 37 % v/v, 12 M) を1.9 Lの蒸留水に加え、2.0 Lに調整する。室温で3年以上安定である。
- l. **Na₂CaEDTA含有脱イオン水 (50 mg/L)**—1 Lねじ口瓶に50 mgのNa₂CaEDTAを秤量し、脱イオン水に溶解して1 Lとする。毎週新たに調製する。使用前に0.45 µmフィルター [B(z)] でろ過する。
- m. **アジ化ナトリウム溶液 (0.02 % w/v)**—1 Lの脱イオン水に0.2 gのアジ化ナトリウムを加え、攪拌して溶解する。室温で2年以上安定である。

注: 酸性溶液にアジ化ナトリウムを加えないこと。アジ化ナトリウムは酸化により有毒ガスを発生する。アジ化ナトリウムは、SDSを確認したうえで、適切な個人用保護具およびドラフトチャンバーを使用し、慎重に取り扱うこと。

- n. **D-グルコースLC 標準液 (5, 10, 20 mg/mL)**—高純度 (> 99.5 %) D-グルコース (Sigma社製 cat. no. G5767) 0.5、1.0、2.0 gをそれぞれ正確に秤量し、3つの100 mLメスフラスコに移す。各フラスコに内部標準溶液[C(o)] 10 mLを分取する。0.02%アジ化ナトリウム溶液[C(m)] で定容する。溶液を100 mLねじ口瓶に移す。室温で1年間安定である。
- o. **D-ソルビトール (SugarPak® カラム用内部標準)**—アジ化ナトリウム (0.02 % w/v) を含む100 mg/mL溶液。分析グレード (> 99 %) のD-ソルビトール (**ボトル5**、3ページ) 10 gを100 mLメスフラスコに秤量する。0.02 % (w/v) アジ化ナトリウム溶液80 mL[C(m)] に溶解し、0.02 %アジ化ナトリウム溶液で定容する。十分に混合する。室温で2年以上、または -10 °C 以下で4年以上安定である。

注: アジ化ナトリウムは、SDSを確認したうえで、適切な個人用保護具およびドラフトチャンバーを使用し、慎重に取り扱うこと。

- p. **LC保持時間標準溶液**—LCで分析したオリゴ糖 (重合度3以上) 分布を示すコーンシロップ固形分 (DE 25、松谷化学工業株式会社、兵庫県伊丹市、www.matsutani.com) とマルトースを4:1 (w/w) の比率で混合した標準品。2.5 gのオリゴ糖混合物 (**ボトル4**、3ページ) を0.02 %アジ化ナトリウム水溶液80 mL[C(m)] に溶解し、100 mLメスフラスコに移す。フラスコに内部標準溶液[C(o)] 10 mLを分取する。0.02 %アジ化ナトリウム水溶液[C(m)] で定容する。溶液を50 mLポリプロピレン製保管ボトルに移す。室温で1年以上、または -10 °C 以下で4年以上安定である。
- q. **pH標準液**—pH 4.0、7.0、10.0
- r. **洗浄液**—Micro-90® (International Products Corp., USA、www.ipcol.com) 脱イオン水で2 %溶液を調製し使用する。
- s. **各分析用混合イオン交換樹脂**—
 - (1) m-1—Amberlite® FPA53 (OH⁻) 樹脂 約4 g、または同等品 (Rohm and Haas社、France S.A.S.)。イオン交換容量は1.6 meq/mL以上 (メーカー提供のR-OH交換容量データに基づく)。
 - (2) m-2—Ambersep® 200 (H⁺) 樹脂 約4 g、または同等品 (Rohm and Haas社、France S.A.S.)。イオン交換容量は1.6 meq/mL以上。各分析の直前に2種類の樹脂を混合し、Bio-Rad社製ディスパーザブルクロマトグラフィーカラム[B(s)] に充填する (12ページ、図7参照)。混合・充填後、樹脂の上に薄い脱脂綿層 (詰め物) を重ね、20 mLの脱イオン水で樹脂を洗浄する。
- t. **セライトー酸洗浄済み、前洗浄済み (G-CEL-500)**。

D. 分析用試料の調製

試料は喫食形態となるよう採取し、通常の調理方法に従って処理します。例えばベーキングミックスは生地を調製後、焼成し、パスタは茹でるなどの処理を行います。脂肪含量が10 %を超える場合は、AOAC 985.29法に従って脱脂します。高水分試料 (> 25 %) では、凍結乾燥を行うことが望ましい場合があります。約50 gを粉砕機[B(a)] で粉砕し、0.5 mmのふるいを通す粒度とします。全量を広口のプラスチック容器に移して密閉し、振とうおよび転倒混和により十分に混合します。乾燥剤と共に保管します。

E. 酵素の純度

不純物酵素が含まれていないこと、および酵素活性が有効であることを確認するため、酵素のロットが変更になる都度、または酵素を6ヶ月以上保管した後に、標準品 (**K-TDFC**) を用いた試験を実施します。

F. 試料の酵素消化 (AOAC 2009.01法および2011.25法)

(1) ブランク試験

各測定時に、試薬由来の残渣の測定値への影響を考慮するため、試料と並行でブランク試験を2反復で実施する。

(2) 試料

- (a) **秤量 (2反復)**—250 mL Fisherbrand® ソーダガラス製広口瓶 [B(b)] に、試料1.000 ± 0.005 gを2反復で正確に秤量する。
- (b) **酵素の添加**—試料を1.0 mLのエタノールで湿らせ、各ボトルに40 mLの α -アミラーゼ (豚膵臓由来) / アミログルコシダーゼ混合液 [C(e)] を加える。ボトルのキャップを閉める。ボトルをGrant OLS 200振とう恒温槽 (または同等品) [B(g)] に移し、振とう台のバネでボトルを固定する。あるいは、2mag Mixdrive 15® 水中マグネチックスターラー [B(g)] と 7 x 30 mm 攪拌子を使用する (10ページ、図3,4)。
- (c) **α -アミラーゼ (豚膵臓由来) / アミログルコシダーゼによる反応**—反応液を、振とう恒温槽 [B(g)] にて 37 °C、150 rpm の旋回振とうで反応させる。あるいは、2mag Mixdrive 15® 水中マグネチックスターラーにて 170 rpm で (完全に懸濁させるため)、正確に 16 時間反応させる (例: 午後5時から午前9時まで)。
- (d) **pH 約 8.2 (pH 7.9~8.4) への調整、 α -アミラーゼ (豚膵臓由来) / アミログルコシダーゼの失活**—16 時間後、振とう恒温槽からすべての試料ボトルを取り出し、直ちに 3.0 mL の 0.75 M トリス緩衝液 [C(i)] を加えて反応を停止させる。(同時に、使用できる振とう恒温槽が 1 台のみの場合は、プロテアーゼ反応工程に備えて恒温槽の温度を 60 °C に昇温する。) 試料ボトルのキャップをわずかに緩め、直ちに 95~100 °C の恒温槽 (非振とう) に入れ、時々 (手で) 振りながら 20 分間反応させる。温度計を使用し、ボトル内容物の最終温度が 90 °C 以上であることを確認する (確認は 1 本のみで差し支えない)。
- (e) **冷却**—熱水浴からすべての試料ボトルを取り出し (適切な手袋を使用する)、約 60 °C まで冷却する。
- (f) **プロテアーゼ処理**—ポジティブディスプレイメント方式のピペットを用いて、プロテアーゼ溶液 [C(f)] 0.1 mL を加える (溶液は粘性が高い)。60 °C で 30 分間反応させる。
- (g) **pH 調整**—各ボトルに 4.0 mL の 2 M 酢酸 [C(j)] を加え、混合する。これにより、最終 pH は約 4.3 となる。
- (h) **内部標準溶液**—各ボトルに 1.0 mL の D-ソルビトール内部標準溶液 (100 mg/mL) [C(o)] を加え、十分に混合する。
- (i) **HMWDF/SDFS の定量 (AOAC 2009.01法)** は、手順 [G(a)] へ、**IDF/SDFP/SDFS の定量 (AOAC 2011.25法)** は、手順 [H(a)] へ進む。

G. HMWDF (IDF + SDFP) の定量: (AOAC 2009.01法)

- (a) **SDFP の沈殿**—試料を 60 °C に加温し、室温で計量して 60 °C に加温した 95 % (v/v) エタノール (または IMS) 192 mL を加える。十分に混合し、室温で 60 分間静置して沈殿させる。
- (b) **ろ過の準備**—セライトを含むガラスろ過器 ([B(c)]、4 ページ参照) の風袋重量を 0.1 mg の精度で秤量する。洗浄瓶から 15 mL の 78 % (v/v) エタノールまたは IMS を加え、ガラスろ過器内のセライト層を湿らせて均一にする。吸引により、セライトをガラスろ過器上に均一な層として形成させる (14 ページ、図 11 参照)。
- (c) **ろ過**—吸引しながら、沈殿した酵素処理液 [G(a)] をガラスろ過器を通してろ過する。78 % (v/v) エタノール (または IMS) [C(b)] を入れた洗浄瓶を用いて、残存する粒子をすべてガラスろ過器に定量的に移す。ろ液および洗浄液を保持し、8 ページの **手順 [I(a)]** に従って **SDFS** を定量する。
- (d) **洗浄**—吸引しながら、以下の溶媒 (15 mL ずつ 2 回) を用いて残渣を順次洗浄する。78 % (v/v) エタノール (または IMS)、95 % (v/v) エタノール (または IMS)、およびアセトン。
- (e) 残渣を含むガラスろ過器を 105 °C の乾燥機で一晩 **乾燥** させる。送風乾燥機を使用する場合は、乾燥試料の損失を防ぐため、ガラスろ過器をアルミホイルで覆う。
- (f) **ガラスろ過器** をデシケーター内で約 1 時間 **放冷** する。食物繊維残渣およびセライトを含むガラスろ過器を 0.1 mg の精度で秤量する。残渣重量を求めるため、風袋重量 (乾燥後のガラスろ過器およびセライトの重量) を差し引く。
- (g) **タンパク質および灰分の定量**—2 反復の残渣のうち一方をタンパク質分析に使用し、もう一方を灰分分析に供する。残渣のタンパク質分析は、ケルダール法または燃焼法で行う (燃焼法分析装置を用いて残渣中のタンパク質を分析する際は注意が必要である。試料から揮散したセライトが装置の移送ラインを詰まらせる可能性がある)。タンパク質量 (mg) の算出には、すべての場合において窒素換算係数 6.25 を用いる。灰分分析では、2 番目の残渣を 525 °C で 5 時間灰化する。デシケーター内で放冷し、0.1 mg 単位で秤量する。ガラスろ過器およびセライトの重量を差し引き、灰分量を求める。
- (h) **HMWDF の定量**—平均残渣重量から灰分およびタンパク質を差し引き、**手順 [J]** に従って **HMWDF** を算出する。

H. IDFおよびSDFPの分画定量(AOAC 2011.25法)

IDF

- (a) **ろ過の準備**—セライトを含むガラスろ過器([B(c)], 4ページ参照)の風袋重量を0.1 mgの精度で秤量する。洗浄瓶から15 mLの78 % (v/v) エタノール(またはIMS) [C(b)]を加え、ガラスろ過器内のセライト®層を湿らせて均一にならす。吸引により、セライト®をガラスろ過板上に均一な層として形成させる(14ページ、図11参照)。
- (b) **ろ過**—吸引しながら、手順[F(h)]の酵素処理液をガラスろ過器を通してろ過する。60 °Cの脱イオン水を入れた洗浄瓶を用い、反応用ボトルを最小限の水(約10 mL)ですすぐ。続いて、ゴム製スパチュラを用いて容器壁面の粒子をすべてかき落とす。この懸濁液をガラスろ過器に移す。さらに60 °Cの水10 mLでボトルを洗浄し、同様にガラスろ過器へ移す。ろ液と洗浄液を合わせて回収し、液量を70 mLに調整したうえで、**SDFP**[H(f)]および**SDFS**[I(a)]の定量用に保持する。
- (c) **洗浄**—吸引しながら、以下の洗浄液15 mLずつを用いて残渣を順次2回洗浄する。78 % (v/v) エタノール(またはIMS)、95 % (v/v) エタノール(またはIMS)、およびアセトン。洗浄液は廃棄する。
- (d) **乾燥**—残渣を含むガラスろ過器を105 °Cの乾燥機で一晩乾燥させる。
- (e) **ガラスろ過器**をデシケーター内で約1時間放冷する。IDF残渣およびセライトを含むガラスろ過器を0.1 mgの精度で秤量する。残渣重量を求めるため、風袋重量(乾燥後のガラスろ過器およびセライト®の重量)を差し引く。IDFの算出:9ページに示す**手順[J]**に従い、算出する。

SDFP

- (f) **SDFPの沈殿**—各試料のろ液(約70 mL)を60 °Cに加温し、室温で計量して60 °Cに加温した95 % (v/v) エタノール(またはIMS) [C(a)] 280 mLを加え、十分に混合する。室温で60分間静置し、沈殿させる。
- (g) **SDFPおよびSDFSの回収**—7ページの**手順[G(b)]**から**[G(h)]**に従って進める。
- (h) **SDFSの定量**—8~9ページの**手順[I(a)]**から**[I(f)]**に従って進める。

I. SDFSの定量:

注1:統合型総食物繊維測定法の開発・公表以降、総食物繊維測定法はさらに改良され、迅速統合型の総食物繊維測定法(AOAC 2017.16法、**K-RINTDF**)が開発されました。ネオジェンは、分析を簡便化し、より生理学的妥当性の高い結果を得るため、迅速統合型総食物繊維測定法の使用を強く推奨しています。

注2:SDFSを正確に定量するには、適切な脱塩処理が不可欠です。—脱塩処理の前に、まず塩がクロマトグラムの中のどの位置に出現するかを確認します。塩化ナトリウム10 mgを脱イオン水9 mLに溶解し、LC内部標準溶液[C(o)] (100 mg/mL) 1 mLを加えます。その後、手順[I(c)]のLC分析用試料の調製(溶液を10 mLディスポーザブル…)に従ってこの溶液を測定します。使用するイオン交換樹脂が十分な脱塩能力を有していることを確認するため、塩化ナトリウム10 mgを脱イオン水1 mLに溶解します。この塩溶液にLC内部標準溶液[C(o)] (100 mg/mL) 1 mLを加え、手順[I(b)](この溶液2 mLを……の上部に注ぐ)に進みます。この溶液のLCクロマトグラムで、重合度3以上の炭水化物に相当する時間範囲にピークが検出されなければ、イオン交換樹脂の脱塩性能は適切です。

- (a) **ろ液の回収および濃縮**—2反復で調整した試料のうち、一方のろ液[G(c)]は、こぼれなどの実験トラブルやSDFSデータの重複測定が必要な場合に備えて、予備として保管します。2反復のうち、もう一方の試料のろ液[G(c)]の半量を500 mLナス型フラスコ(ロータリーエバポレーター用)に移し、60 °Cの減圧下で蒸発乾固させる。
- (b) **試料の脱塩処理**—ナス型フラスコに5 mLの脱イオン水を加え、約2分間、フラスコを円を描くように回して試料を溶解する。溶液を密閉可能なポリプロピレン製20 mL容器に移す。この溶液2 mLを、使用直前に調製し十分に混合したAmberlite FPA 53(OH⁻) [C(s)]およびAmbersep 200(H⁺) [C(s)]を各4 g含むBio-Radディスポーザブルカラム[B(c)]の上部に注ぐ(12ページ、図7参照)。カラムの溶出は1.0 mL/minの速度で行い、溶出液を100 mLねじ口瓶に回収する。試料が樹脂層に入り切った時点で、蒸留水2 mLをカラム上部に加え、樹脂に浸透させる。続いて、脱イオン水約20 mLをカラム上部に加え、1.0 mL/minの速度で溶出を続ける。溶出液を250 mLナス型フラスコ(ロータリーエバポレーター用)に移し、60 °Cの減圧下で蒸発乾固させる。フラスコに脱イオン水2 mLを加え、約2分間旋回させて糖を再溶解する。パストゥールピペットを用いて、溶液をポリプロピレン製保管容器に移す。
- (c) **LC分析用試料の調製**—溶液を10 mLディスポーザブルシリンジ[B(bb)]に移し、0.45 μmフィルター[B(y)]でろ過する。100 μLのLC用ガラスシリンジ[B(cc)]を用いて、LC[B(t)]の50 μLインジェクションループに充填する。この分析は2反復で行う。カラム:Waters Sugar-Pak®カラム(6.5 x 300 mm)。溶媒:Na₂Ca-EDTA含有蒸留水(50 mg/L)。流速:0.5 mL/min。温度:90 °C。
- (d) **D-グルコースの応答係数の決定**—D-グルコースは、SDFSを構成する難消化性オリゴ糖と同等のLC示差屈折(RI) 応答を示すため、D-グルコースでLCを校正し、その応答係数によりSDFSの質量を算出します。各標準D-ソルビトール/D-グルコース溶液について、100 μLのLC用シリンジを用いて50 μLインジェクションループに充填する。各溶液を3回注入する。得られた3つのクロマトグラムから、D-グルコースおよび内部標準のピーク面積を求める。D-グルコースのピーク面積/D-ソルビトール内部標準のピーク面積の比(y軸)と、D-グルコースの質量/D-ソルビトールの質量の比(x軸)をプロットして得られる傾きの逆数が「応答係数」である。平均応答係数を求める(D-ソルビトールの場合、通常0.97)。

$$\text{応答係数}(R_i) = (\text{PA-IS}) / (\text{PA-Glu}) \times (\text{Wt-Glu} / \text{Wt-IS})$$

PA-IS = 内部標準 (D-ソルビトール) のピーク面積

PA-Glu = D-グルコースのピーク面積

Wt-Glu = 標準溶液中のD-グルコースの質量

Wt-IS = 標準溶液中のD-ソルビトールの質量

(e) 低分子量水溶性食物繊維測定用クロマトグラムの面積の校正 – 100 μLのLC用シリンジ[B(cc)]を用いて、保持時間標準溶液[C(p)]で50 μLインジェクションループを充填する。各溶液を2回注入する。重合度2と重合度3のオリゴ糖(二糖類マルトースと、それ以上のオリゴ糖)の境界点を決定する(14ページ、図10参照)。

(f) 試料抽出物のクロマトグラムにおけるSDFSのピーク面積(PA-SDFS)および内部標準のピーク面積(PA-IS)の算出 – 試料抽出物[I(c)]をLCに注入する。重合度2／重合度3境界点より大きい重合度のピーク面積をすべて記録し、PA-SDFSとする。内部標準のピーク面積を記録し、PA-ISとする。

注: インライン脱塩手順が公開されています¹⁷。本法はより簡便ですが、ディスパーザブル脱塩カートリッジが高価であること、また1つのカートリッジで処理できる試料数が比較的少ないことが制約となっています。

J. HMWDF、IDFおよびSDFPの計算:

ブランク(B)の定量(mg):

$$= \frac{BR_1 + BR_2}{2} - PB - PA$$

BR₁およびBR₂=2反復でそれぞれ測定したブランク残渣質量(mg)。

PBおよびPA=第1および第2ブランク残渣中のタンパク質および灰分の質量(mg)。

HMWDF、IDFまたはSDFP(mg/100 g):

$$= \frac{\frac{R_1 + R_2}{2} - PB - PA - B}{\frac{M_1 + M_2}{2}} \times 100$$

ここで:

R₁ = M₁からの残渣質量1(mg)。

R₂ = M₂からの残渣質量2(mg)。

M₁ = 試料質量1(g)、M₂ = 試料質量2(g)。

PA = R₁からの灰分質量(mg)、PB = R₂からのタンパク質質量(mg)。

$$\text{HMWDF}(\%) = \text{HMWDF}(\text{mg}/100 \text{ g}) / 1000$$

$$\text{IDF}(\%) = \text{IDF}(\text{mg}/100 \text{ g}) / 1000$$

$$\text{SDFP}(\%) = \text{SDFP}(\text{mg}/100 \text{ g}) / 1000$$

K. SDFSの計算

SDFS(mg/100 g)

$$= R_f \times (\text{Wt-IS, mg}) \times (\text{PA-SDFS}) / (\text{PA-IS}) \times 100/M$$

ここで:

R_fは応答係数である(8～9ページ参照)。

Wt-ISは試料混合物に分取した内部標準溶液1 mLに含まれる内部標準の重量(mg)である(100 mg)。

PA-SDFSはSDFSのピーク面積である。

PA-ISは内部標準(D-ソルビトール)のピーク面積である。

Mはろ液を濃縮してLCで分析した試料の質量(g)である(M₁またはM₂)

L. 統合型総食物繊維の計算

$$\text{統合型総食物繊維 (\%)} = \text{HMWDF (\%)} + \text{SDFS (\%)}$$

注:これらの計算は、Megazymeウェブサイト (www.megazyme.com) の製品ページからダウンロード可能な「Megazyme Mega-Calc™」を利用することで簡略化できます。



図3. Grant® OLS 200振とう恒温槽内で、37 °Cにて試料を旋回運動により混合している様子を示す写真



図4. カスタムメイドの恒温槽内に設置された2mag Mixdrive 15® 水中マグネチックスターラーを示す写真。これにより、15検体を速度170 rpm、37 °Cで攪拌できる。

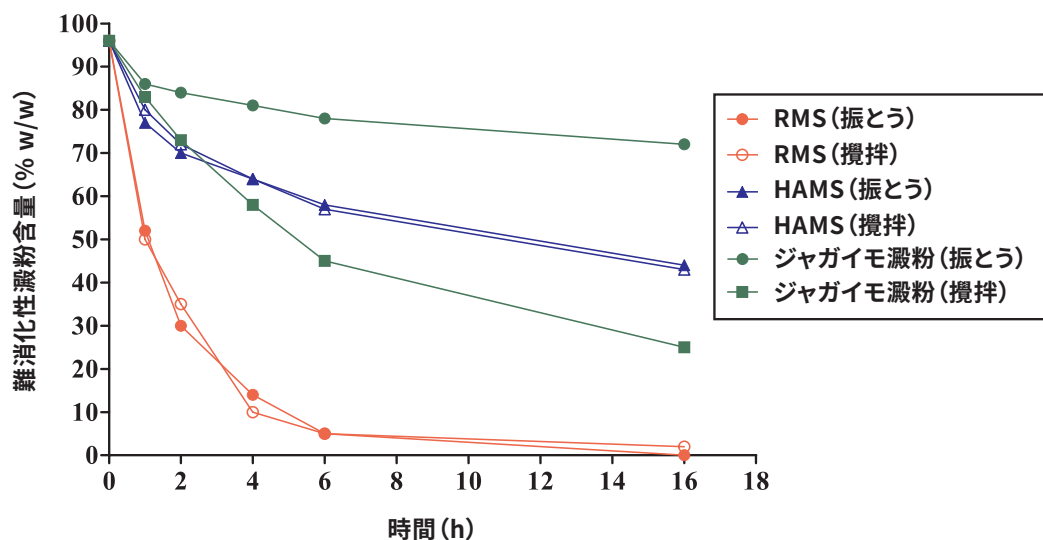


図5. トウモロコシ澱粉 (RMS)、高アミローストウモロコシ澱粉 (HAMS)、およびネイティブジャガイモ澱粉 (PS) を37 °Cで α -アミラーゼ/AMGとともに反応させた際の加水分解速度 (および見かけの難消化性澱粉含量) を、Duran® ボトルをGrant® OLS 200振とう恒温槽 (図3) で150 rpmにて巡回振とうした条件と、Fisherbrand® ボトルを37 °C恒温水槽中で2mag Mixdrive 15® 水中マグネチックスターラー (図4) により170 rpmで攪拌した条件で比較した。**注:** HAMSおよびRMSでは、振とうと攪拌で同等値が得られた。この傾向は、澱粉粒子が壊れやすいジャガイモ生澱粉を除き、検討したすべての試料で認められた。

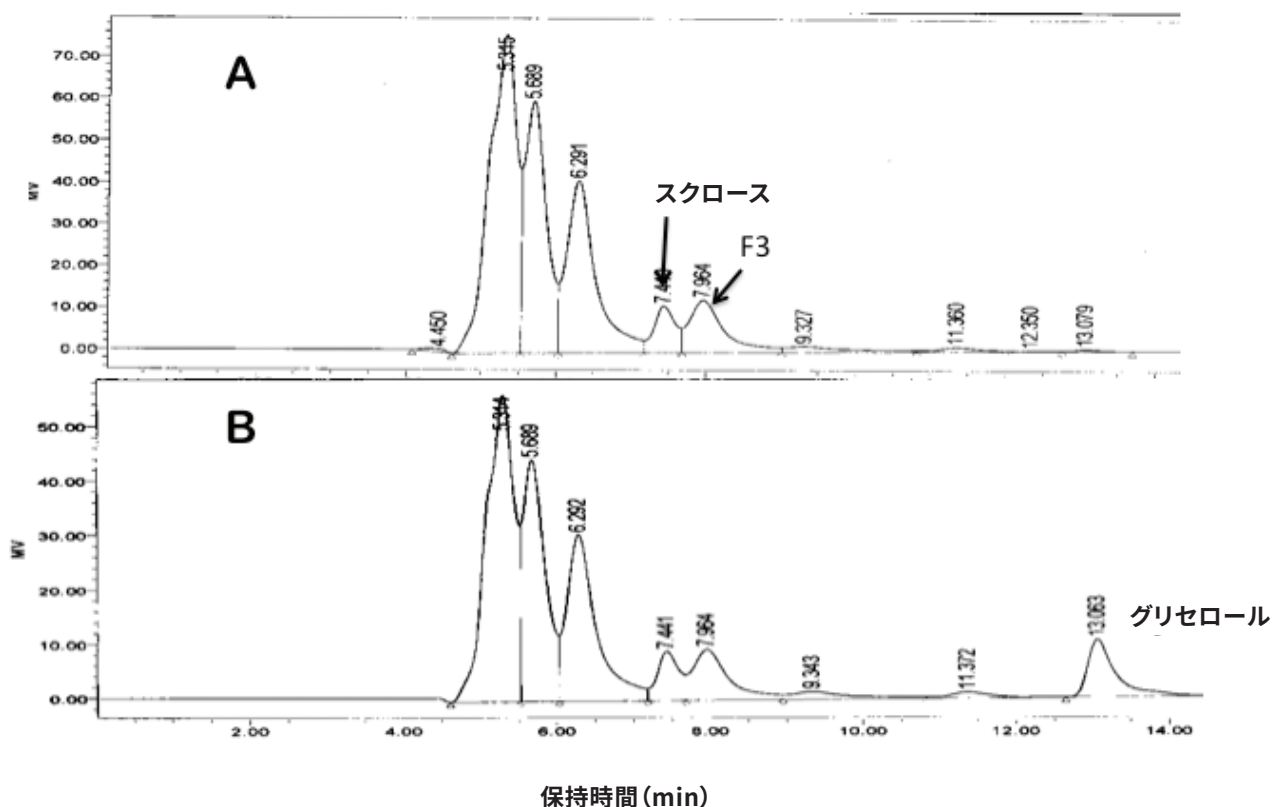


図6. Raftilose P-95® を水に溶解して直接HPLC分析した場合 (A) と、統合型総食物繊維測定法によりSDFS画分として回収した場合 (B) のクロマトグラム。カラム: Waters Sugar-Pak® カラム (6.5 x 300 mm)。溶媒: Na₂Ca-EDTA含有蒸留水 (50 mg/L)、流速: 0.5 mL/min、温度: 90 °C。**注:** フラクトオリゴ糖の分解は認められない。また、F3 (加水分解されたイヌリン由来のフラクトトリオース) はスクロースの後 (ラクトースと同じ位置) に溶出することに留意する。F3を含む試料の分析には、HPLCの前に別途前処理が必要である (14ページ、図10参照)。



図7. Gilson Minipuls® Evolutionポンプに接続したBio-Rad Econo-Pac® ディスポーザブルクロマトグラフィーカラム〔混合イオン交換樹脂：約4 g Amberlite® FPA53 (OH⁻) および約4 g Ambersep® 200 (OH⁺)〕を用いた試料の脱イオン化。

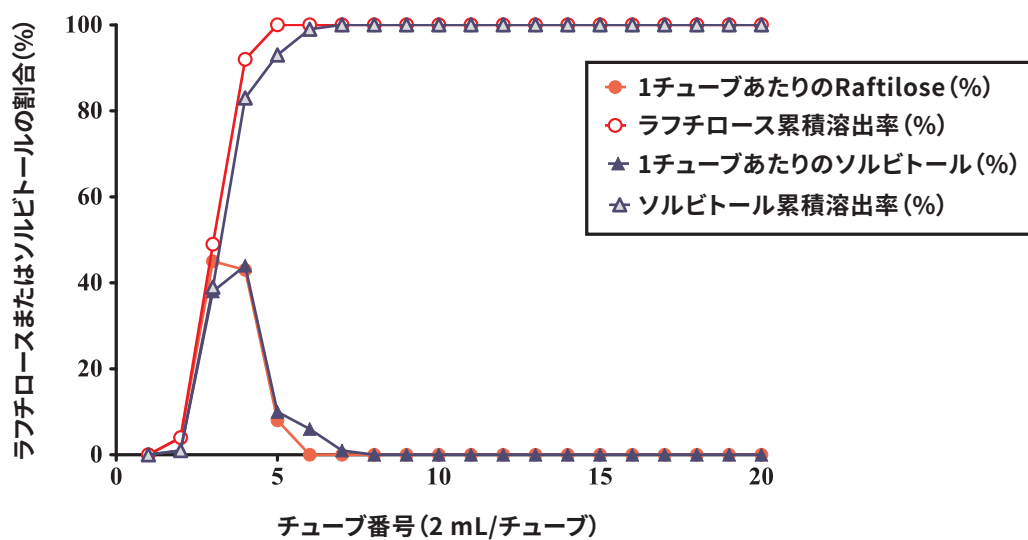


図8. 混合イオン交換樹脂カラムにおけるD-ソルビトールおよびフラクトオリゴ糖の溶出。D-ソルビトールとフラクトオリゴ糖は同じ速度で溶出し、炭水化物のほぼすべてが20 mLの水で溶出されることに注意すること。

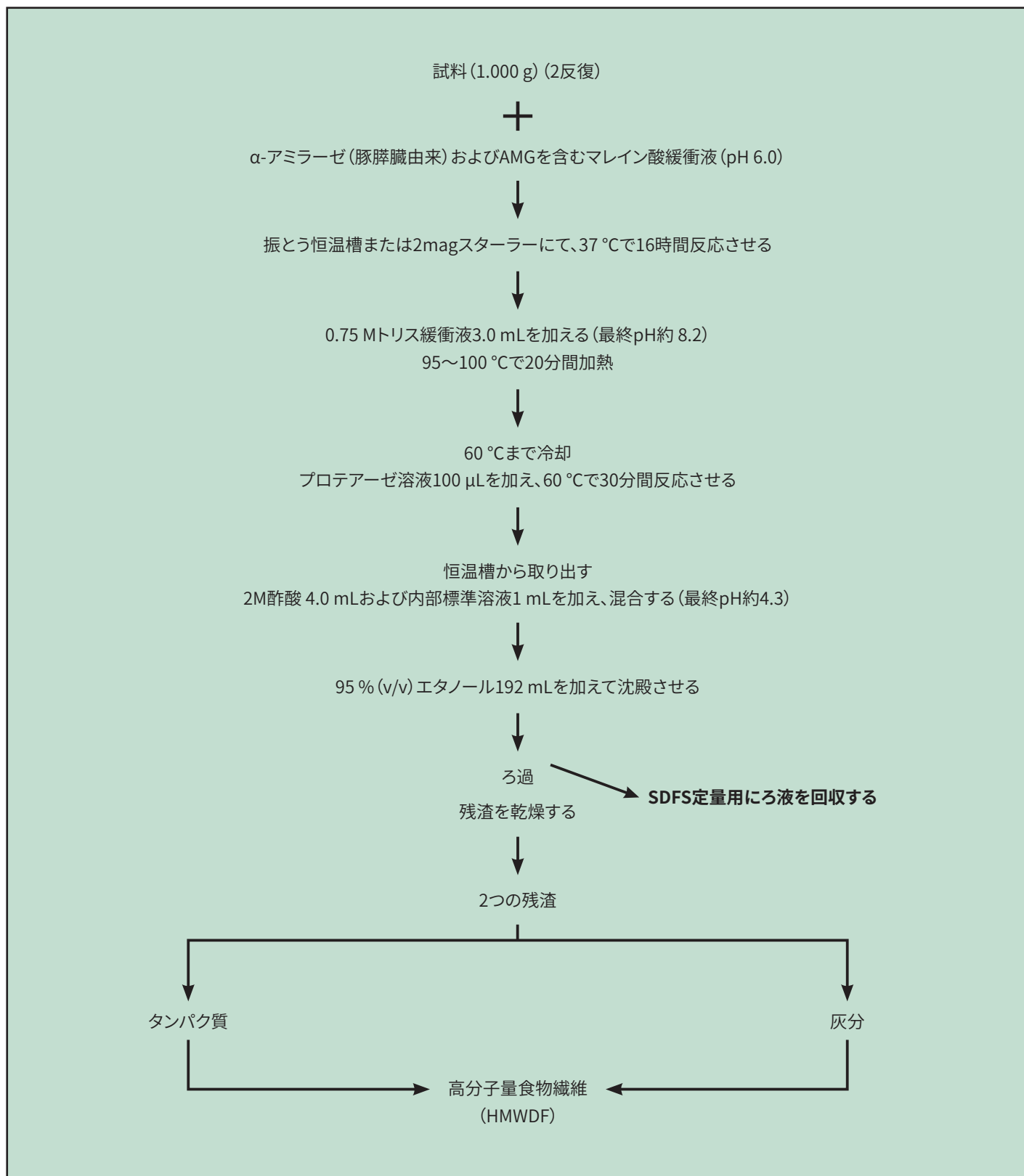


図9. HMWDF (IDF + SDFP) および SDFS の定量に関する分析フロー。IDF と SDFP を分画定量する場合は、エタノールまたは IMS を加える前に反応混合物をろ過する。フィルター上に捕集された残渣が IDF である。ろ液に 4 倍量のエタノールまたは IMS を加えて SDFP を沈殿させ、セライトフィルター上で回収する。ろ液には SDFS が含まれる。

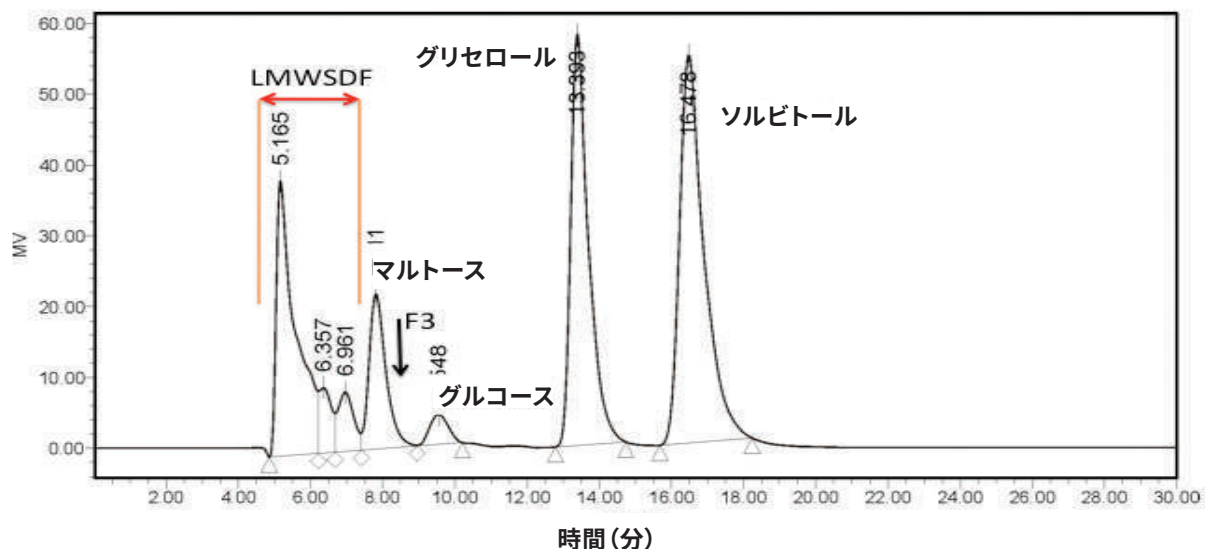


図10. マルトデキストリン、マルトース、D-ソルビトールおよびグリセロール混合物のクロマトグラフィー (Waters Sugar-Pak® カラム、6.5 × 300 mm)。溶媒: Na₂Ca-EDTA含有蒸留水 (50 mg/L)、流速: 0.5 mL/min、温度: 90 °C。矢印は重合度2 (マルトース) と重合度3 (より高分子のマルトデキストリン) との分離点を示す。**注:** F3 (エンドイヌリナーゼまたは酸によりイヌリンを加水分解して生成されるフラクトシルトリサッカライド) は、Sugar-Pak® カラムにおいてマルトースの後に溶出する (上図の矢印F3および図6を参照)。HPLCパターンから容易に識別されるこのオリゴ糖 (F3) を含む試料は、スクラーゼ/マルターゼ/β-ガラクトシダーゼによる前処理を必要とする [詳細はFAQまたはMcClearyら (2013)¹⁵を参照のこと]。

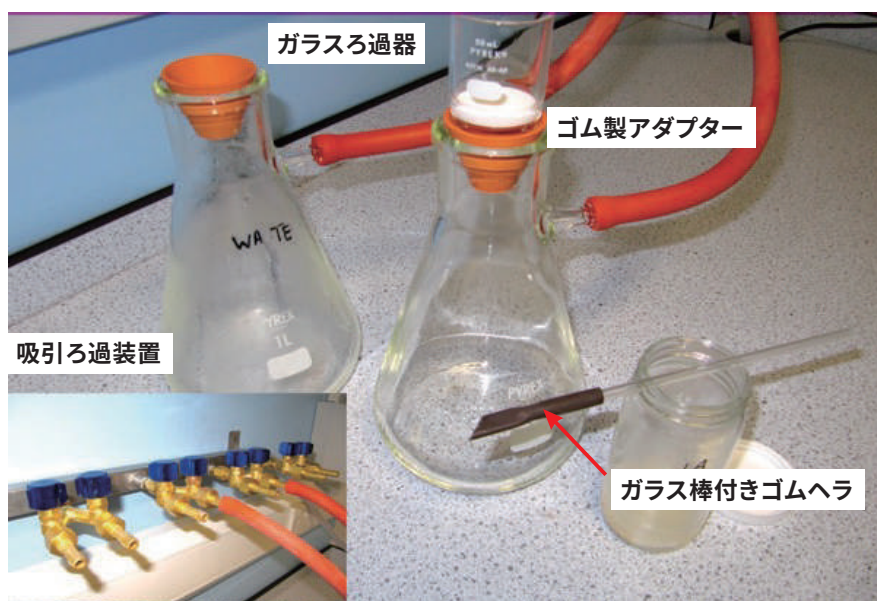


図11. 食物繊維試料のろ過に用いるブフナーフラスコ、ガラスろ過器、ゴム製アダプターおよび吸引ろ過装置の構成。写真には試料ボトルおよびガラス棒付きゴムヘラも写っている。

M. 参考文献

1. Hipsley, H. (1953). *Br. Med. J.*, **2**, 420-422.
2. Burkitt, D. P., Walker, A. R. P. & Painter, N. S. (1972). *Lancet* **ii**, 1408-1412.
3. Trowell, H. C., Southgate, D. A. T., Wolever, T. M. S., Leeds, A. R., Gassull, M. A. & Jenkins, D. J. A. (1976). *Lancet* **a**, 967.
4. Official Methods of Analysis of AOAC International (W. Horwitz, Ed.), 18th Ed 2005. AOAC International, Gaithersburg, USA.
5. Prosky, L., Asp, N.-G., Furda, I., DeVries, J. W., Schweizer, T. F. & Harland, B. F. (1985). *J. AOAC Int.*, **68**, 677-679.
6. McCleary, B. V., McNally, M. & Rossiter, P. (2002). *J. AOAC Int.*, **85**, 1103-1111.
7. Hoebregs, H. (1997). *J. AOAC Int.*, **80**, 1029-1037.
8. McCleary, B. V., Murphy, A. & Mugford, D. C. (2000). *J. AOAC Int.*, **83**, 356-364.
9. De Slegte, J. (2002). *J. AOAC Int.*, **85**, 417-423.
10. Gordon, D. T. & Okuma, K. (2002). *J. AOAC Int.*, **85**, 435-444.
11. Craig, S. A. S., Holden, J. F. & Khaled, M. J. (2000). *J. AOAC Int.*, **83**, 1006-1012.
12. McCleary, B. V. (2007). An integrated procedure for the measurement of total dietary fibre (including resistant starch), non-digestible oligosaccharides and available carbohydrates. *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**, 291-308.
13. McCleary, B. V., DeVries, J. W., Rader, J. I., Cohen, G., Prosky, L., Mugford, D. C., Champ, M. & Okuma, K. (2010). Determination of Total Dietary Fiber (CODEX Definition) by Enzymatic-Gravimetric Method and Liquid Chromatography: Collaborative Study. *J. AOAC Int.*, **93**, 221-233.
14. McCleary, B. V., Sloane, N., Draga, A. & Lazewska, I. (2013). Measurement of total dietary fiber using AOAC method 2009.01 (AACC method 32-45.01): evaluation and updates, *Cereal Chemistry*, **90**, 394-414.
15. FAO 2009. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Guidelines for the use of nutrition claims: Table of conditions for nutrient contents (part b) dietary fibre. ALINORM 09/32/26. Appendix II, page 46.
16. Brunt, K. & Sanders, P. (2013). Improvement of AOAC 2009.01 total dietary fibre method for bread and other high starch containing matrices. *Fd. Chem.*, **140**, 547-580.
17. Post, B. E., Marshak, M. R. & DeVries, J. W. (2010). Simultaneous ion removal and quantitation of low-molecular-weight dietary fiber from high-molecular-weight dietary fiber filtrates using liquid chromatography. *J. AOAC Int.*, **93**, 234-242.



免責事項

本取扱説明書に記載された情報は、当社の知る限り正確かつ信頼できるものですが、使用条件は当社の管理外にあるため、本書に記載された推奨事項または提案について、明示または黙示を問わず、いかなる保証も行いません。また、本製品の使用が第三者の特許権を侵害しないことを保証するものではありません。なお、本取扱説明書は原文（英語版）を参考として和訳したものです。内容の正確性には十分配慮しておりますが、翻訳内容と原文との間に相違または解釈上の差異が生じた場合には、英語版原文を正式なものとして優先するものとします。

掲載の内容は、2026年8月現在のものです
NEOGEN, Megazymeは、Neogen社の商標です。

ネオジェンジャパン株式会社

<https://www.neogen.jp/>

NEO-465-A(0826)e.

Please Recycle. Printed in Japan.
© Neogen Corporation. All rights reserved.