

第 7 章

その他の備考欄収載成分

42 硝酸イオン

42-1. 高速液体クロマトグラフ法

適 用

野菜類に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

高速液体クロマトグラフ（紫外可視吸光光度検出器付き）

(2) 試 薬

硝酸カリウム

硝酸イオン標準原液：硝酸カリウム407 mg をイオン交換水に溶解して500 mL 定容とする（500 µg/mL）。

測定用硝酸イオン標準溶液：標準原液をイオン交換水で適宜希釈し，1～50 µg/mL の標準溶液を調製する。

高速液体クロマトグラフ用溶離液：リン酸水素二ナトリウム・12水塩1.79 g，リン酸二水素ナトリウム・2水塩0.78 g 及び過塩素酸ナトリウム・1水塩14.04 g をイオン交換水に溶解して1000 mL に定容する。

(3) 操 作

1) 試料溶液の調製

細切りした試料 5 g (*W*) をポリエチレン又はポリプロピレンなどのプラスチック製容器にとり，イオン交換水100 mL を加えて1時間振り混ぜて抽出する。

ろ紙（JIS 5種C）でろ過したろ液，あるいは遠心分離した上澄み液をとり，試料溶液（*V*）とする。

2) 高速液体クロマトグラフィー

[操作条件例]

カラム：内径4.6 mm，長さ250 mm，アミノカラム（例えば Asahipak NH₂P-50・4E）

移動相：上記溶離液

流速：0.8 mL/分

温度：50℃

波長：210 nm

3) 測 定

試料溶液 5 µL を高速液体クロマトグラフに注入し，硝酸イオンのピーク面積を測定する。あらかじめ標準溶液を用いて作成した検量線から試料溶液中の硝酸イオンの濃度を求める。

(4) 計 算

$$\text{硝酸イオン含量 (mg/100 g)} = \frac{A \times V}{W \times 1000} \times 100$$

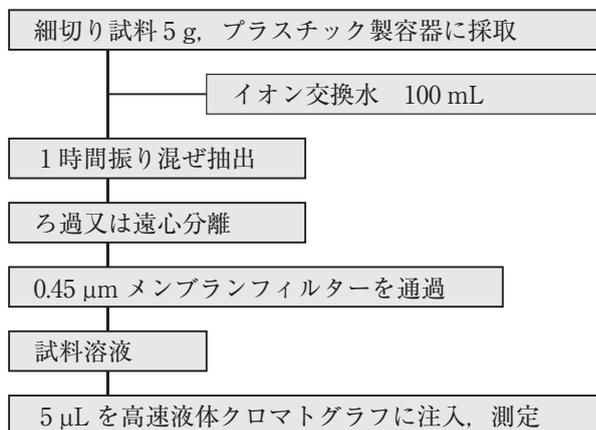
A：検量線から求めた試料溶液中の硝酸イオン濃度 (μg/mL)

V：試料溶液量 (mL)

W：試料採取量 (g)

$$\text{硝酸態窒素含量 (mg/100 g)} = \text{硝酸イオン含量 (mg/100 g)} \times 0.226$$

硝酸イオン定量法・フローチャート —高速液体クロマトグラフ法—



42-2. イオンクロマトグラフ法

適用

野菜類に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

イオンクロマトグラフ (電気伝導度検出器又は紫外可視吸光度検出器付き)

(2) 試薬

硝酸イオン標準溶液：市販のイオンクロマトグラフ用硝酸イオン標準溶液を、イオン交換水で適宜希釈し、1～5 μg/mL の標準溶液を調製する。

イオンクロマトグラフ用溶離液 (1.8 mmol/L 炭酸ナトリウム, 1.7 mmol/L 炭酸水素ナトリウム溶液)：下記の溶液を調製する。この溶離液は AS4A-SC (Thermo Fisher Scientific Inc.) に適した溶離液である。現在はさまざまな種類の分離カラムが市販されているため、装置やカラムに適した溶離液を選択すること。

0.1 mol/L 炭酸ナトリウム溶液：炭酸ナトリウム10.6 g をイオン交換水に溶解して1000 mL に定容する。

0.1 mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液：炭酸水素ナトリウム8.4 g をイオン交換水に溶解して1000 mL に定容する。

0.1 mol/L 炭酸ナトリウム溶液18 mL 及び0.1 mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液17 mL を、脱気したイオン交換水に溶解して1000 mL に定容し溶離液とする。

(3) 操 作

1) 試料溶液の調製

細切りした試料 5 g (W) をプラスチック製容器にとり、約 80 °C のイオン交換水 50 mL を加えた後、ディスペンサーで破碎する。さらに約 80 °C のイオン交換水 50 mL でディスペンサーを洗いながら加えて、100 mL に定容 (V) する。80 °C で 1 時間振り混ぜ、抽出する。ろ紙 (JIS 5 種 A) でろ過したろ液、又は遠心分離した上澄み液をとり、適宜希釈 (N) し、0.45 μm のマイクロフィルターを通したものを試料溶液とする。

2) イオンクロマトグラフィー

[操作条件例]

装置：DIONEX ICS-1500

検出器：電気伝導度検出器又は紫外可視吸光光度検出器

サンプルループ容量：25 μL

カラム：IonPac AG4A-SC (ガードカラム)

：IonPac AS4A-SC (分離カラム)

溶離液：上記の溶離液

流量：1.0 mL/分

サプレッサー：AERS-500

3) 測 定

試料溶液 25 μL を陰イオン分析用のカラム及び電気伝導度検出器又は紫外可視吸光光度検出器を装備したイオンクロマトグラフに注入する。あらかじめ標準溶液を用いて作成した検量線から試料溶液中の硝酸イオンの濃度を求める。

(4) 計 算

$$\text{硝酸イオン含量 (mg/100 g)} = \frac{A \times N \times V \times 100}{W \times 1000}$$

A ：検量線から求めた試料溶液中の硝酸イオン濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

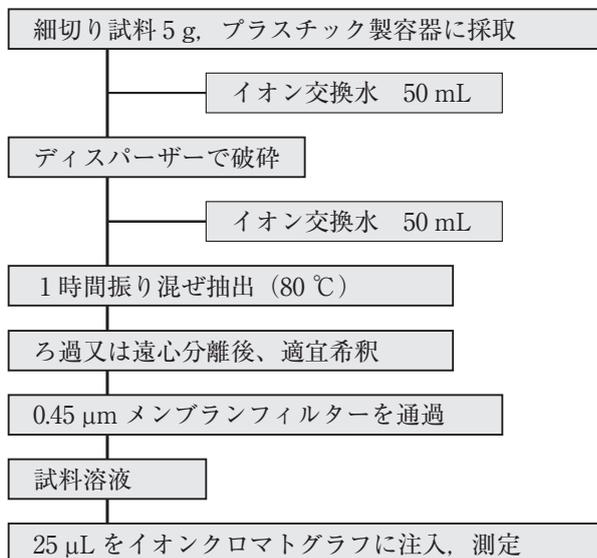
N ：希釈倍数

V ：定容量 (mL)

W ：試料採取量 (g)

$$\text{硝酸態窒素含量 (mg/100 g)} = \text{硝酸イオン含量 (mg/100 g)} \times 0.226$$

硝酸イオン定量法・フローチャート
—イオンクロマトグラフ法—



43 アルコール

43-1. 浮ひょう法 (注1)

適用

清酒・合成清酒、しょうちゅう、みりん、ビール、果実酒、ウイスキー、スピリッツ類、リキュール類などアルコール飲料類、酒かすに用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

全量フラスコ：容量100 mL

シリンダー：容量100 mL

丸底フラスコ：容量300～500 mL

冷却管

マントルヒーター

浮ひょう：酒精度用、検定合格品又は基準器検査合格品

(2) 操作

15℃で試料を容量100 mL (注2) 全量フラスコの標線までとり、これを丸底フラスコに移し、この全量フラスコを毎回15 mLの水で2回洗い、洗液を丸底フラスコ内に合わせ、冷却管に連結し、試料採取に用いた全量フラスコを受器として蒸留する (注3)。留液が約70 mLに達した時点で蒸留を止め (注4)、水を加えて15℃において標線まで満たし、よく振り混ぜてシリンダーに移した後、15℃において酒精度浮ひょうを用いてその示度を読み、アルコール分 (注5) の度数とする。

アルコール分 (度 = v/v) を100 g当たりのアルコール (エタノール) 濃度に換算する場合、以下のとおり計算する。

$$\text{アルコール分 (g/100 g)} = \text{アルコール分 (v/v)} \times \frac{0.794}{\text{比重}}$$

注解

(注1) 浮ひょう法は簡便であるが、少なくとも100 mL以上の試料量を必要とし、アルコール分が2度以下の場合には誤差が大きくなり、そのような試料には用いられない。

(注2) 試料の採取量は、浮ひょうを浮かべたとき、浮ひょうの胴部からシリンダーの内面まで5 mm以上の距離がなければならない。100 mLの留液を用いて測定するので、胴径が20 mm以下の浮ひょうを用いる。胴径が大きい場合は適宜容量を増やしてもよい。しょうちゅう (エキス分を含まない) は蒸留操作をしないで、試料を直接シリンダーに採取して、浮ひょうを用いて測定する。50度を超えるものは希釈して測定後、その希釈倍率を乗じて算出する。酒かすは100 gをはかりとり、水300 mLを加えてよく混合してから蒸留する。

(注3) 焦げ付きのおそれのあるものは水蒸気蒸留法を用いてもよい。

(注4) フラスコへの洗い込み水量はエキス分が高いものは液量を多くし、留液を多くとる。また、アルコール度数の高いものは留液の採取量を多くする。

例：みりん (洗い込み水量：40 mL 2回、留液採取量80 mL)

ウイスキー (希釈後測定、洗い込み水量：15 mL 2回、留液採取量98 mL)

(注5) 酒税法によるアルコール分とは温度15℃において、原容量100分中に含有するエチルアルコールの容量をいい、計量法でいう15℃のもとにおける酒精と水の混合液中の酒精の体積百分率で、濃度を表す値の酒精度と一致する。

43-2. ガスクロマトグラフ法

適用

試料量が少なく、浮ひょう法が適用できないか、又はアルコール分が2度以下の試料に用いる(注1)。

測定方法

(1) 装置及び器具

ガスクロマトグラフ(水素炎イオン化検出器付き)

ねじ蓋試験管：容量15～20 mL

(2) 試 薬

エタノール標準溶液：試薬特級品を水で希釈し、20% (v/v) 溶液とする。

アセトン溶液：試薬特級品を水で希釈し、1% (v/v) 溶液とする。

(3) 操 作

15℃において、エタノール標準溶液0.5 mLを試験管にとり、これにアセトン溶液10 mLを正確に加えてよく混合し、この1～2 μLをガスクロマトグラフに注入し、得られるアセトンとエタノールのピーク面積から、次式により補正係数(F)を算出する。

$$\text{補正係数 (F)} = \frac{\text{アセトンのピーク面積}}{\text{エタノールのピーク面積}}$$

次に、試料0.5 mLを同様に処理して得られるアセトンとエタノールのピーク面積から、次式により試料中のアルコール分を求める。

$$\text{アルコール分 (度)} = F \times \frac{\text{エタノールのピーク面積}}{\text{アセトンのピーク面積}} \times 20$$

1) ガスクロマトグラフィ(注2)

[操作条件例]

カラム：内径3 mm，長さ2 m，ポーラスポリマー系(例えば，Gasukuropack55など)

温度：注入口及び検出器250℃，カラム125℃

ガス流量(圧力)：ヘリウム(キャリアーガス)100 kPa，水素60 kPa，空気50 kPa

注 解

(注1) アルコール分が40度以下及びエキス分が20度以下の試料について適用する。したがって、アルコール分が40度，エキス分が20度を超える試料は，あらかじめ，アルコール分が40度，エキス分が20度以下になるように希釈しなければならない。

(注2) 国税庁所定分析法では，カラム充填剤にはポリエチレングリコール1000(10%，60～80メッシュ)，注入口温度が150～200℃，カラム温度100℃，キャリアーガスは窒素，流速30～40 mL/分となっている。使用するガスクロマトグラフによって分析条件が異なるので，あらかじめ，適宜10回程度の繰り返し試験を実施し，定量値の相対標準偏差が1%以内となるように分析条件を設定する。

43-3. 振動式密度計法

適用

43-1. 浮ひょう法に同じ。

測定方法

(1) 装置及び器具

全量フラスコ：容量100 mL

丸底フラスコ：容量300～500 mL

冷却管

マントルヒーター

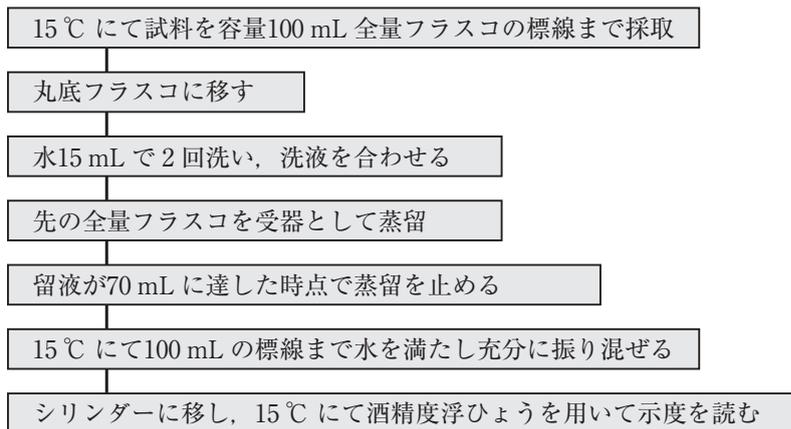
振動式密度計

(2) 操作

43-1. 浮ひょう法と同様に試料を蒸留し、定容する。得られた留液を、振動式密度計を用いて測定し、密度を求め、アルコール度数を算出する。

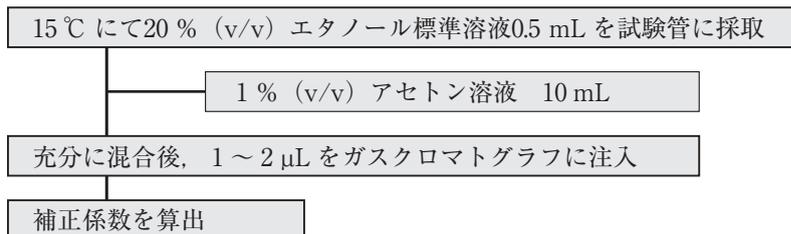
アルコール分定量法・フローチャート

43-1. 浮ひょう法



43-2. ガスクロマトグラフ法

[補正係数の算出]



[定 量]

試料0.5 mL を試験管に採取

1 % (v/v) アセトン溶液 10 mL

十分に混合後, 1 ~ 2 μ L をガスクロマトグラフに注入, 測定

先に求めた補正係数とピーク面積比からアルコール分を算出

43- 3 . 振動式密度計法

15 $^{\circ}$ C で試料を容量100 mL 全量フラスコの標線まで採取

丸底フラスコに移す

水15 mL で2回洗い, 洗液を合わせる

先の全量フラスコを受器として蒸留

留液が70 mL に達した時点で蒸留を止める

15 $^{\circ}$ C にて100 mL の標線まで水を満たし十分に振り混ぜる

15 $^{\circ}$ C にて振動式密度計を用いて密度を求め, アルコール分を算出

44 酢 酸

44-1. 直接滴定法

適 用

食酢類に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

三角フラスコ：容量200 mL

ビュレット

(2) 試 薬

0.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液

フェノールフタレイン溶液

(3) 操 作

試料10 g (注1) を三角フラスコにはかりとり、約20 mL の水を加えて希釈する。次にフェノールフタレイン溶液を数滴加えた後、ガラス棒でかき混ぜながら、0.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で微赤色になるまで滴定する。

(4) 計 算

$$\text{酢酸含量 (g/100 g)} = 0.03 \times \frac{A \times f}{10} \times D \times 100$$

A : 0.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の滴定量 (mL)

f : 0.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクター

0.03 : 0.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 1 mL に相当する酢酸の g 数

D : 希釈倍数

注 解

(注1) 希釈倍数が表示されているもの(高酸度酢)にあっては、その希釈倍数に応じて、水を用いて正確に希釈したものを試料とする。また、ぶどう酢など、色が濃すぎて終点が見えにくいものにあつては、次のようにしてもよい。試料10 g を容量100 mL ビーカーにはかりとり、水40 mL を加え、pHメーターを用い、マグネチックスターラーでかき混ぜながら、0.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を滴下する。pH 8.2を示すところを滴定の終点とする。

44-2. 水蒸気蒸留-滴定法

適 用

ドレッシング類、ソース類、トマト加工品類に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

水蒸気蒸留装置

丸底フラスコ：容量150~200 mL

全量ピペット：容量100 mL

全量フラスコ：容量500 mL
三角フラスコ：容量300 mL
ビュレット：容量25 mL，0.1 mL 目盛

(2) 試 薬

塩化ナトリウム
0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液
フェノールフタレイン溶液

(3) 操 作

試料を10 g (注1) になるように丸底フラスコにはかりとり，塩化ナトリウム40 g 及び水約50 mL を加え，水蒸気蒸留装置に接続し，全量フラスコを受器とし，留液が約500 mL になるまで蒸留する (注2)。全量フラスコの標線まで水を満たした後，よく混合し，この中から全量ピペットで100 mL を三角フラスコにはかりとる。フェノールフタレイン溶液を数滴加えた後，かき混ぜながら，0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で微赤色になるまで滴定する。

(4) 計 算

$$\text{酢酸含量 (g/100 g)} = 0.006 \times \frac{A \times f}{10} \times D \times 100$$

A : 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の滴定量 (mL)

f : 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクター

0.006 : 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 1 mL に相当する酢酸の g 数

D : 分取率 (ここでは500 mL/100 mL = 5)

注 解

(注1) ドレッシング類の中には，分離液状タイプのもがあり，そのままでは均質化がきわめて難しいものがある。この場合は，ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル (ポリソルベート80，商品名；Tween80) などの乳化剤を0.2~0.3 % になるように正確に加えてよく混合し，もとのドレッシングとして10 g になるように採取する。

(注2) このとき，丸底フラスコ中の水量が一定，かつ塩化ナトリウムの結晶が残る状態になるように丸底フラスコの加熱を調節しなければならない。

44-3. 高速液体クロマトグラフ法 (41-1. 参照)

酢酸定量法・フローチャート

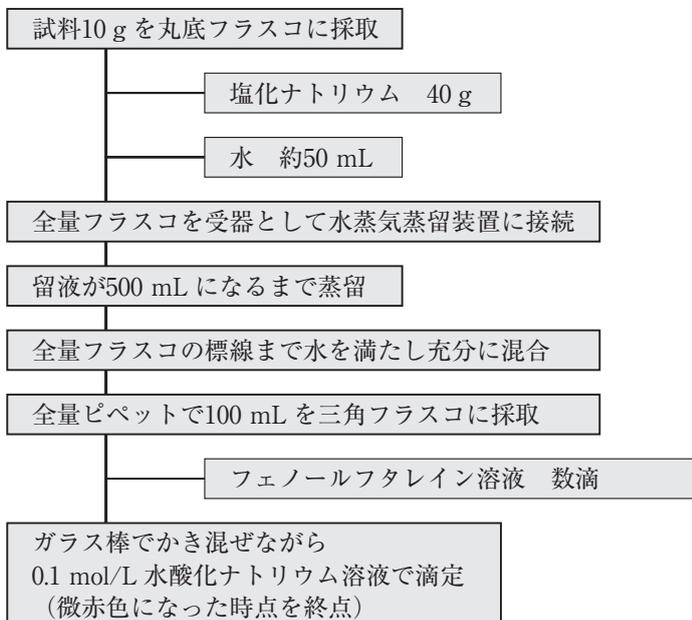
44-1. 直接滴定法

試料10 g を三角フラスコに採取し，水約20 mL で希釈

フェノールフタレイン溶液 数滴

ガラス棒でかき混ぜながら
0.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で滴定
(微赤色になった時点を終点)

44-2. 水蒸気蒸留-滴定法



45 カフェイン

45-1. 高速液体クロマトグラフ法 (1)

適用

緑茶類, 発酵茶類 (紅茶, ウーロン茶), コーヒーに用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

高速液体クロマトグラフ (紫外可視吸光光度検出器付き)

振り混ぜ機

ロータリーエバポレーター

全量フラスコ: 容量100 mL, 1 L, 2 L

共栓遠心管: 容量200 mL

なす形フラスコ: 容量300 mL

(2) 試薬

カフェイン標準原液: カフェイン (105 °C, 1時間乾燥) 100 mg を正確にはかりとり, 内標準物質含有メタノールに溶かして100 mL に定容し, 標準原液 (1000 µg/mL) とする。

カフェイン標準溶液: 標準原液50 mL 及び25 mL を容量100 mL 全量フラスコに正確にはかりとり, 内標準物質含有メタノールに溶かして100 mL に定容し, 標準溶液① (500 µg/mL) 及び② (250 µg/mL) とする。別に, 容量100 mL 全量フラスコにベンゾトリアゾール10 mg を正確にはかりとり, 内標準物質含有メタノールを加えて溶かした後, 標準原液10 mL を正確に加え, さらに内標準物質含有メタノールを加えて定容し, 標準溶液③ (ベンゾトリアゾール100 µg/mL, カフェイン100 µg/mL) とする。さらに, 標準溶液①から10 mL, ②から4 mL を容量100 mL 全量フラスコに正確にはかりとり, 内標準物質含有メタノールを加えて定容し, 標準溶液④ (50 µg/mL) 及び⑤ (10 µg/mL) とする。標準溶液④から10 mL を容量100 mL 全量フラスコに正確にはかりとり, 内標準物質含有メタノールを加えて定容し, 標準溶液⑥ (5 µg/mL) とする。

内標準物質含有メタノール溶液: β-フェネチルアルコール8.00 g をメタノール2.0 L に溶解する (4.00 mg/mL)。

ベンゾトリアゾール溶液: ベンゾトリアゾール0.5 g を正確にはかりとり, 1% (w/v) 水酸化ナトリウムに溶解して1.0 L とする。

n-ヘキサン-酢酸エチル混液 (2 : 8 v/v)

1% (w/v) 水酸化ナトリウム溶液

硫酸ナトリウム (無水): 特級

(3) 操作

できるだけ細かく粉碎した試料0.1~0.2 g (*W*) を遠心管にはかりとり, ベンゾトリアゾール溶液5 mL を加え (注1), 混合する。次いで, *n*-ヘキサン-酢酸エチル混液100 mL を加え, 振り混ぜ機で5分間振り混ぜた後, 静置する。上澄み液を別の容器に移し替え, 残留物に水酸化ナトリウム溶液1 mL を加えて混合し, さらに, *n*-ヘキサン-酢酸エチル混液100 mL を加え, 先と同様に操作し, 上澄み液を合わせる。漏斗の脚部に綿栓をし, 硫酸ナトリウム (無水) 約70 g をのせ, 先の上澄み液をろ過する (受器: なす形フラスコ)。容器と遠心管を少量の *n*-ヘキサン-酢酸エチル混液で洗浄し, 洗液

もすべてろ過する。ロータリーエバポレーターで *n*-ヘキサン-酢酸エチル混液を留去（減圧，40℃）し，残留物に内標準物質含有メタノール溶液 10～20 mL（注2）を加えて溶かし，試料溶液（*V*）とする。試料溶液 15 μL を高速液体クロマトグラフに注入する。

1) 高速液体クロマトグラフィー

[操作条件例]

カラム：内径4.6 mm，長さ250 mm，逆相型カラム（例えば，Nucleosil C₁₈（10 μm））

移動相：① 水-メタノール-1 mol/L 過塩素酸（800：140：50 v/v/v）

② 0.1 mol/L リン酸水素ナトリウム緩衝液（pH 5.8）-アセトニトリル（850：50 v/v）（注3）

流速：移動相①；1.5 mL/分，移動相②；2.0 mL/分

カラム温度：50℃

測定波長：270 nm

2) 検量線の作成

カフェイン標準溶液①，②，③，④，⑤及び⑥の15 μL を高速液体クロマトグラフに注入し，内標準物質として加えてある β-フェネチルアルコールとカフェインのピーク高の比を求めて作成する。

(4) 計 算

$$\text{カフェイン量 (mg/100 g)} = \frac{A \times V}{W \times 1000} \times 100$$

A：検量線から求めた試料溶液中のカフェイン濃度（μg/mL）

V：試料溶液量（mL）

W：試料採取量（g）

注 解

（注1）ベンゾトリアゾールの添加は抽出操作による損失を検定するために加えるものである。最終試料溶液中のベンゾトリアゾールの濃度をみることにより，試験操作における回収率を検定することができる。

（注2）試料溶液の液量は検量線の範囲に収まるように適宜増減する必要があるが，液量は正確でなければならない。

（注3）移動相は2種類あるが，最初に①を用いて試験する。このとき，カフェインの保持時間付近にピークが現れたときは，②を用いて再度試験をしてカフェインのピークであることを確認する必要がある。同一条件の高速液体クロマトグラフを2台用意しておき，それぞれ異なる移動相で同時に試験すると便利である。

45-2. 高速液体クロマトグラフ法（2）

適 用

緑茶類，発酵茶類（紅茶，ウーロン茶），コーヒーの浸出液に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

高速液体クロマトグラフ（紫外可視吸光光度検出器付き）

全量フラスコ：容量10 mL，100 mL，1 L，2 L

(2) 試 薬

カフェイン標準原液：45-1. 高速液体クロマトグラフ法（1）に同じ。

カフェイン標準溶液：45-1. 高速液体クロマトグラフ法（1）に同じ。

内標準物質含有メタノール溶液：45-1. 高速液体クロマトグラフ法（1）に同じ。

（3）操 作

試料0.5～0.8 g (W) を容量10 mL 全量フラスコに正確にはかりとり，内標準物質含有メタノール溶液を加え10 mL (V) に定容する。十分に振り混ぜた後，15 μ L を高速液体クロマトグラフに注入する。

1) 高速液体クロマトグラフィー

45-1. 高速液体クロマトグラフ法（1）に同じ。

2) 検量線の作成

45-1. 高速液体クロマトグラフ法（1）に同じ。

（4）計 算

$$\text{カフェイン含量 (mg/100 g)} = \frac{A \times V}{W \times 1000} \times 100$$

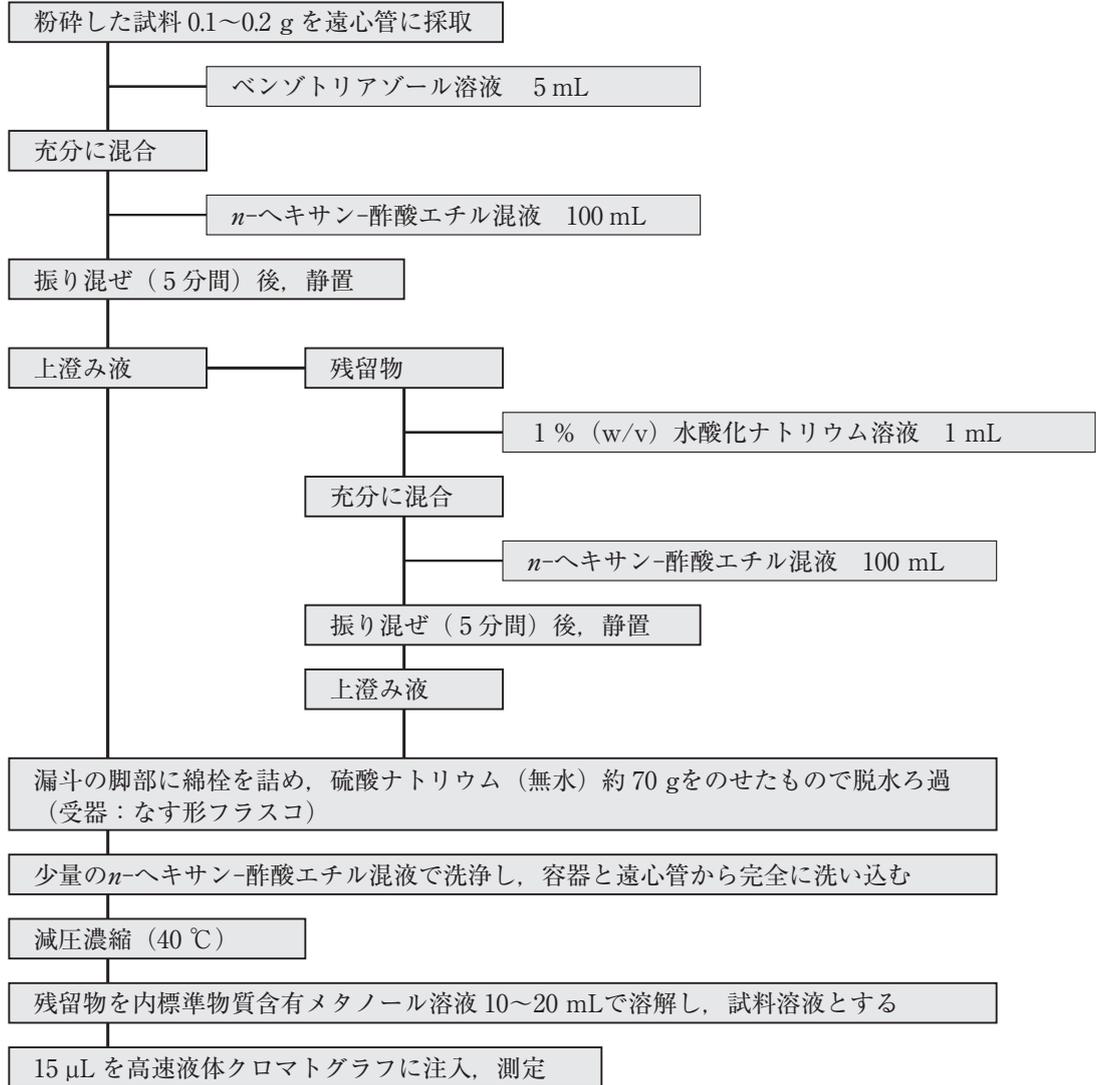
A ：検量線から求めた試料溶液中のカフェイン濃度 (μ g/mL)

V ：定容量 (mL)

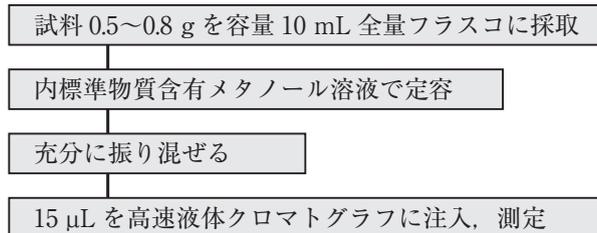
W ：試料採取量 (g)

カフェイン定量法・フローチャート

45-1. 高速液体クロマトグラフ法 (1)



45-2. 高速液体クロマトグラフ法 (2)



46 タンニン

46-1. 酒石酸鉄吸光光度法

適用

緑茶類に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

水浴

三角フラスコ：容量150～200 mL

全量フラスコ：容量25 mL, 100 mL

(2) 試 葉

没食子酸エチル標準溶液：没食子酸エチルの5～25 mg/100 mL 溶液を5 mg おきに5段階調製する。

酒石酸鉄試薬：硫酸第一鉄100 mgと酒石酸カリウムナトリウム500 mgを水に溶かして100 mLとする。

リン酸緩衝液：1/15 mol/L リン酸水素ナトリウム溶液 (11.867 g/L) と1/15 mol/L リン酸二水素カリウム溶液 (9.073 g/L) を84：16の割合で混合し、pHメーターでpH 7.5になるように微調整する。

(3) 操 作

試料0.1 g (*W*) を三角フラスコにはかりとり、熱水50～60 mL を注加し、80℃以上の水浴中で30分間加熱する。冷却後、全量フラスコに移して100 mL に定容 (*V*) する (注1)。ろ紙 (JIS 5種 A) を用いてろ過し、最初のろ液約20 mL を捨て、以後のろ液から5 mL (*B*) を容量25 mL 全量フラスコに採取する。酒石酸鉄試薬5 mL を加え、リン酸緩衝液で定容する。水5 mL を用いた試薬空試験を対照として、540 nm の吸光度を測定し、検量線から没食子酸エチル量を求め、その値を1.5倍してタンニン量とする。

1) 検量線の作成

容量25 mL 全量フラスコに水5 mL 及び没食子酸エチル標準溶液各5 mL をとり、これに酒石酸鉄試薬5 mL を加えた後、リン酸緩衝液で定容する。540 nm の吸光度を測定し、没食子酸エチル量に対する吸光度をプロットして検量線を作成する。没食子酸エチル1 mg の示す吸光度は茶タンニン1.5 mg に相当する。

(4) 計 算

$$\text{タンニン含量 (mg/100 g)} = \frac{A \times 1.5 \times V}{W \times B} \times 100$$

A：検量線から求めた没食子酸エチル量 (mg)

V：定容量 (mL)

B：分取量 (mL)

W：試料採取量 (g)

注 解

(注1) 試料が茶浸出液の場合は5～10 g をとり、水を加えて100 mL とした後、茶葉と同様に操作する。

46-2. フォーリン・デニス法

適 用

発酵茶類, コーヒーに用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

分光光度計

遠心分離機

水浴

三角フラスコ：容量150～200 mL

全量フラスコ：容量100 mL

共栓遠心管：容量25 mL

(2) 試 薬

タンニン酸標準溶液：タンニン酸の0.5～2.0 mg/100 mL 溶液を0.5 mg おきに4段階調製する(注1)。

フォーリン試薬：タングステン酸ナトリウム25 g, リンモリブデン酸5 g, リン酸12.5 mL に水180 mL を加えて2時間煮沸還流し, 冷却後, 水で1 L とする。

10% (w/v) 炭酸ナトリウム溶液：用時調製

(3) 操 作

試料1～5 g (W) を三角フラスコにはかりとり, 熱水50～80 mL を注加し, 80℃以上の水浴中で50～60分間, 還流抽出する。冷却後, 全量フラスコに移して100 mL に定容 (V) とする(注2)。ろ紙(JIS 5種A) を用いてろ過し, 最初のろ液約20 mL を捨て, 以後のろ液から5 mL (B) (注3), 水, タンニン酸標準溶液それぞれ5 mL ずつを遠心管にとり, フォーリン試薬5 mL を加えて3分間放置する。炭酸ナトリウム溶液5 mL を加えて60分間放置後, 遠心分離(3000回転/分, 5分間) し, 上澄み液の700 nm 又は760 nm の吸光度を測定する。タンニン酸の量は同時に操作して得た検量線から求める。

(4) 計 算

$$\text{タンニン含量 (タンニン酸として mg/100 g)} = A \times D \times \frac{V}{W} \times \frac{100}{B}$$

A ：検量線から求めたタンニン酸量 (mg)

V ：定容量 (mL)

B ：分取量 (mL)

D ：希釈倍数

W ：試料採取量 (g)

注 解

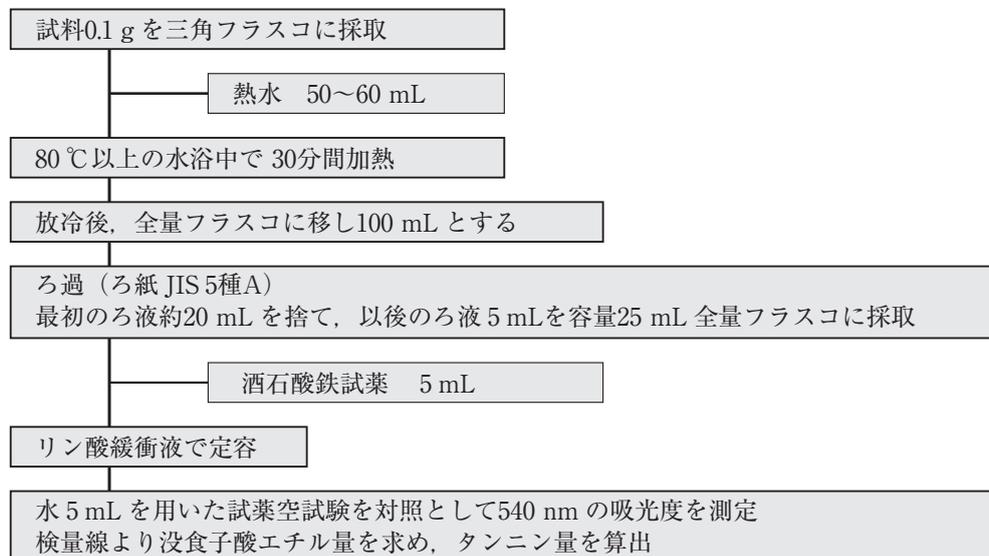
(注1) タンニン酸は分子中に n 個の水分子を含むので, あらかじめ, カールフィッシャー法により水分を測定し, 水分補正係数を乗じた量を採取して, 無水物として正確に0.5～2.5 mg になるようにしなければならないが, 計算式に補正係数を組み込んでもよい。

(注2) 試料が浸出液の場合は5～10 g をはかりとり, 水を加えて100 mL とした後, 茶葉またはコーヒー豆と同様に操作する。

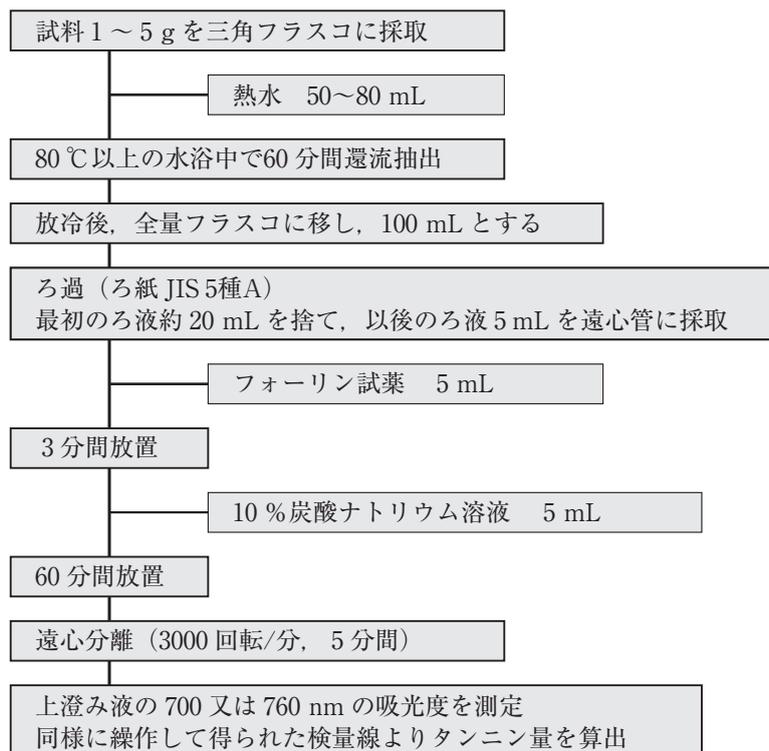
(注3) タンニン酸の量として10～15 $\mu\text{g/mL}$ 程度が精度よく測定できるので, 濃度が高い場合は希釈する必要がある。また, 濃度が低い場合は試料採取量を増やして最初から操作をやり直す。

タンニン定量法・フローチャート

46-1. 酒石酸鉄吸光度法



46-2. フォーリン・デニス法



47 テオブロミン

47-1. 高速液体クロマトグラフ法

適用

ピュアココア（純ココア）、ミルクココア（インスタントココア）に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

高速液体クロマトグラフ（紫外可視吸光光度検出器付き）

振り混ぜ機

遠心分離機

水浴

メンブランフィルター（0.45 μm）

全量フラスコ：容量100 mL，500 mL

共栓遠心管：容量50 mL

三角フラスコ：容量200～300 mL

(2) 試薬

テオブロミン標準溶液：テオブロミン（試薬特級）0.050 gを正確にはかりとり、水500 mLで定容し、標準原液とする（100 μg/mL）。原液を水で希釈して、テオブロミン80 μg/mL，50 μg/mL，20 μg/mL，10 μg/mL，及び5 μg/mLの標準溶液を調製する。

(3) 操作

試料0.6～1.0 g（*W*）を遠心管にはかりとり、石油エーテル30 mLを加え、振り混ぜ機で30分間振り混ぜる。遠心分離（2000回転/分，10分間）後、石油エーテル層を除去し、沈澱物に再び石油エーテル30 mLを加え、前と同じ操作を繰り返す（注1）。わずかに残った石油エーテルは水浴中で完全に揮散させる。残留物を水で三角フラスコに移し、さらに水を加えて90～95 mLとした後、沸とう石を入れ、100℃で25分間加熱する。冷却後、全量フラスコに移し100 mLに定容（*V*）する。よく混合した後、その50～60 mLを遠心管に分取し、遠心分離（2000回転/分，10分間）後、上澄み液をメンブランフィルターでろ過し、ろ液を試料溶液とする。試料溶液15 μLを高速液体クロマトグラフに注入する。試料溶液の濃度が高い場合は、標準溶液の濃度範囲に収まるように試料溶液を水で適宜希釈する（*D*）。

1) 高速液体クロマトグラフィー

[操作条件例]

カラム：内径4.6 mm，長さ250 mm，逆相型カラム（例えば，Nucleosil C₁₈（10 μm））

移動相：水-メタノール-1 mol/L 過塩素酸（800：140：50 v/v/v）

流速：1.5 mL/分

カラム温度：50℃

測定波長：270 nm

2) 検量線の作成

テオブロミン標準溶液それぞれの15 μL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ピーク高とテオブロミン濃度の関係をプロットして作成する。

(4) 計 算

$$\text{テオブロミン含量 (mg/100 g)} = \frac{A \times V}{W \times 1000} \times D \times 100$$

A：検量線から求めた試料溶液中のテオブロミン濃度 (μg/mL)

V：定容量 (mL)

W：試料採取量 (g)

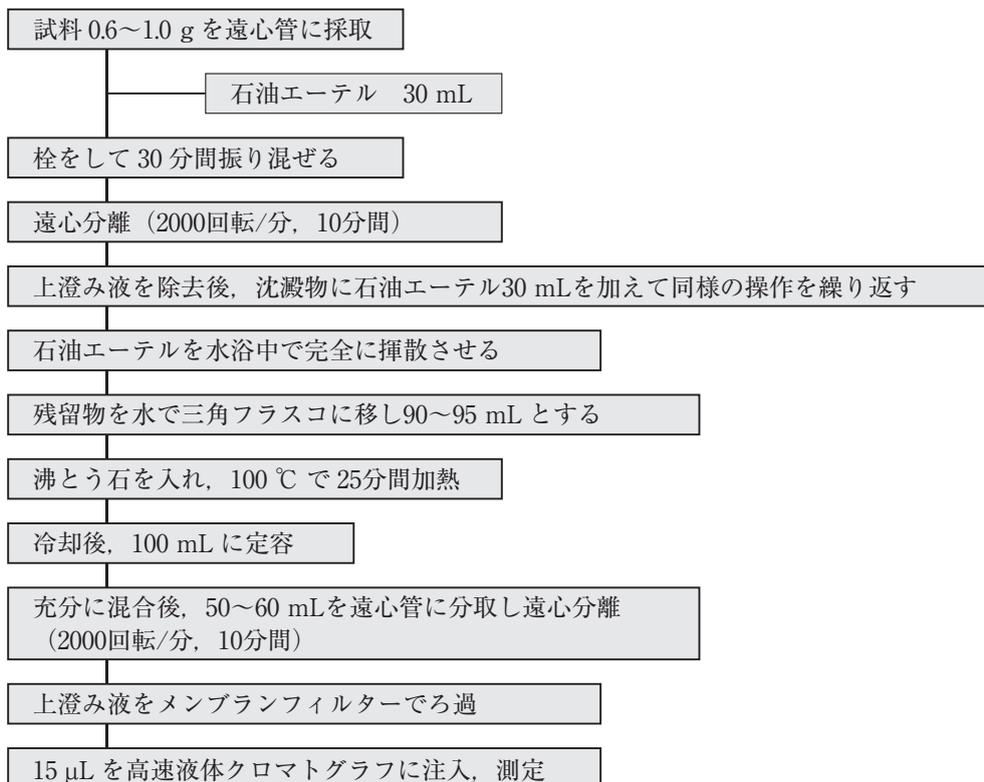
D：希釈倍率

注 解

(注1) 石油エーテルを加えて振り混ぜるのは脱脂のためであり、試料を石油エーテルに十分に分散させた後に振り混ぜる。遠心分離後に石油エーテルを除去するには駒込ピペットを用い、沈澱物を舞い上がらせないように注意深く行う必要がある。テオブロミンは石油エーテルにはほとんど不溶で沈澱物とともに存在する。

(注2) 試料採取量は適宜変更してもよい。

テオブロミン定量法・フローチャート



48 ポリフェノール

48-1. フォーリン・チオカルト法

適用

チョコレート類，ココアに用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

分光光度計

振り混ぜ機

遠心分離機

ロータリーエバポレーター

蒸気乾燥機

ソックスレー抽出器

恒温水槽

褐色全量フラスコ：容量50 mL，100 mL

共栓遠心管：容量250 mL

なす形フラスコ：容量100 mL

クロマト用ガスタイトシリンジ

円筒ろ紙

(2) 試 薬

エピカテキン標準溶液：エピカテキン100 mg を容量100 mL 褐色全量フラスコに正確にはかりとり，15 mL のメタノールで溶解後，水15 mL を加え，50 % メタノールで定容する。50 % メタノールで希釈して，0.05～0.4 mg/mL の標準溶液を調製する。

n-ヘキサン：特級

メタノール：特級

フォーリン・チオカルト，フェノール試薬

20 % 炭酸ナトリウム溶液：特級，70～80 °C で加温して溶解する。

(3) 操 作

1) 脱 脂

a. バッチ法 (1)

試料約10 g (*W*) を遠心管に正確にはかりとり，*n*-ヘキサン50 mL を加え，振り混ぜ機で30分間振り混ぜる。遠心分離 (3000回転/分，15分間) 後，上澄みの *n*-ヘキサン溶液をあらかじめ質量をはかった容量100 mL のなす形フラスコ (注1) にとる (必要なら，JIS 5種B のろ紙を通過させる)。この操作を2回繰り返す。脱脂試料は，風乾，又は60 °C 以下の蒸気乾燥機内でヘキサンを完全に除去し，ポリフェノール抽出用試料とする。抽出脂質含有 *n*-ヘキサンはロータリーエバポレーターを用いて減圧濃縮し，試料と同様に蒸気乾燥機内で *n*-ヘキサンを完全に除去し，デシケーター内に30分以上静置後質量をはかり，試料中の脂質量 (*Lg*) を測定する。

b. バッチ法 (2)

試料約1 g (*W*) を遠心管に正確にはかりとり，上記と同様に処理し，その全量をポリフェノール抽

出用試料とする。水分が多い試料でも水分、脂質の補正を必要としない方法である。

c. ソックスレー法

試料約 5 g (W) をろ紙 (JIS 5種B, 直径185 mm) に正確にはかりとり、円筒ろ紙 (No.84, 28 × 100 mm) に挿入し、ソックスレー抽出器により、ヘキサン抽出 (恒温水槽温度 83~85 °C) を12時間行う。バッチ法 (1) と同様に脂質質量 (L g) を測定し、脱脂試料を得る。

2) 抽出

バッチ法 (1) 又はソックスレー法で得られたポリフェノール抽出試料を 0.5 g (W_1)、バッチ法 (2) は全量を容量 100 mL のなす形フラスコにはかりとり、50 % メタノール 50 mL を加え、82~85 °C で1時間還流抽出を行う。冷却、静置後、50 % メタノール層を遠心管に移し、3000回転/分で15分間遠心分離し、上澄み液を 100 mL (V) 全量フラスコに移す。35~40 mL の50 % メタノールを用いて、遠心管の残留物を先のなす形フラスコに戻す。再度還流抽出を1時間行い、冷却、遠心分離し、先の 100 mL 全量フラスコに移して50 % メタノールで定容し、試料溶液とする。

3) 測定

50 mL 全量フラスコに水約 35 mL 及び先の試料溶液 0.5 mL (注2) を正確にはかりとる。次にフォーリン・チオカルト、フェノール試薬を 5 mL 加え、かき混ぜ、静置 1 分後に 20 % 炭酸ナトリウム溶液を 5 mL 加え (発泡するので注意する)、直ちに水で定容する。混合後 1 時間静置し、分光光度計で 765 nm の吸光度を測定する。あらかじめ、検量線作成用エピカテキン標準溶液 (注3) から 0.5 mL (注4) を正確にはかりとり、上記と同様に測定して作成した検量線から試料溶液中のポリフェノール濃度 (A) を求める。

4) 水分測定

水分による補正を行うため、試料を別に採取して水分を測定し、水分値 (M) を得る。また、ポリフェノール抽出用試料を別にはかりとって水分を測定し、水分値 (M_1) を得る (注5)。

(4) 計算

$$\text{ポリフェノール含量 (mg/100 g)} = \frac{A \times V}{W} \times \frac{[W(100 - M) / 100 - L]}{[W_1(100 - M_1) / 100]} \times 100$$

ただし、脱脂にバッチ法 (2) を用いる場合は、以下の計算式を使用する。

$$\text{ポリフェノール含量 (mg/100 g)} = \frac{A \times V}{W} \times 100$$

A : 検量線から求めた抽出試料溶液中のポリフェノール濃度 (mg/mL)

V : 試料溶液量 (mL)

W : 試料採取量 (g)

W_1 : ポリフェノール抽出用試料採取量 (g)

M : 水分値 (g/100 g)

M_1 : ポリフェノール抽出用試料の水分値 (g/100 g)

L : 脂質質量 (g)

注 解

(注1) 質量を正確にはかりとるために容量 100 mL のなす形フラスコの恒量を前もって得ておく必要がある。

(注2) クロマト用ガスタイトシリンジが全量ピペットより正確に採取可能である。または試料溶液を水で10倍希釈した溶液 5 mL を全量ピペットで正確に採取してもよい。

(注3) 検量線作成用エピカテキン標準溶液の濃度範囲は0.05~0.4 mg/mLが望ましい。

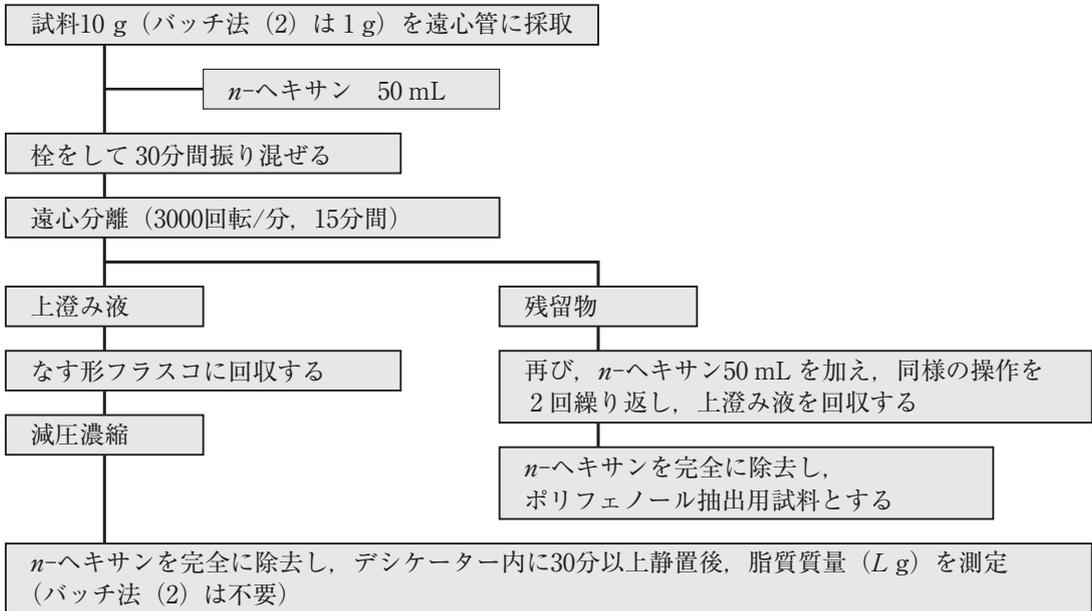
(注4) (注2) で5 mLはかりとった場合は、標準溶液も水で10倍希釈し、5 mLはかりとる。

(注5) バッチ法(2)は全量使用するため、脱脂後の水分値測定は不要。

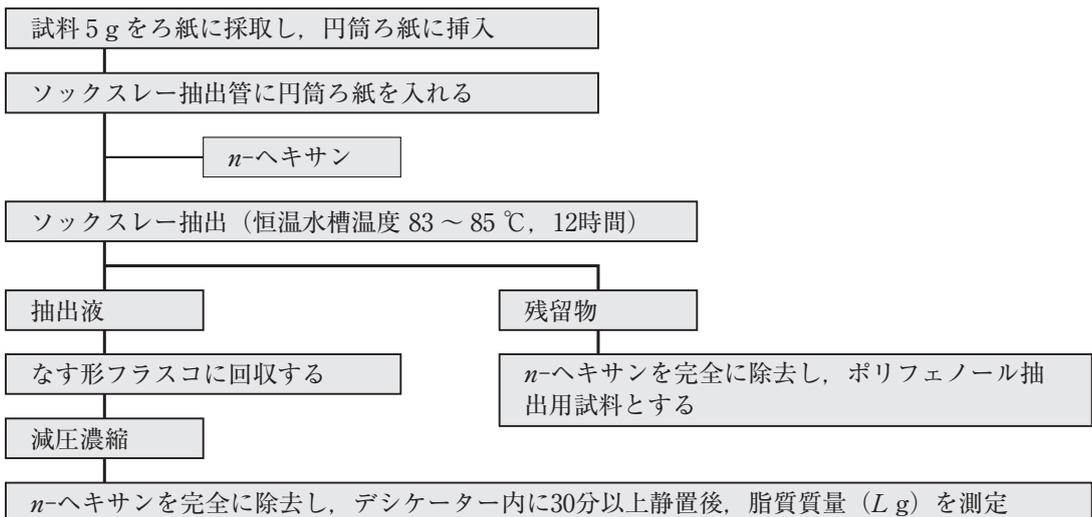
ポリフェノール定量法・フローチャート

1) 脱脂

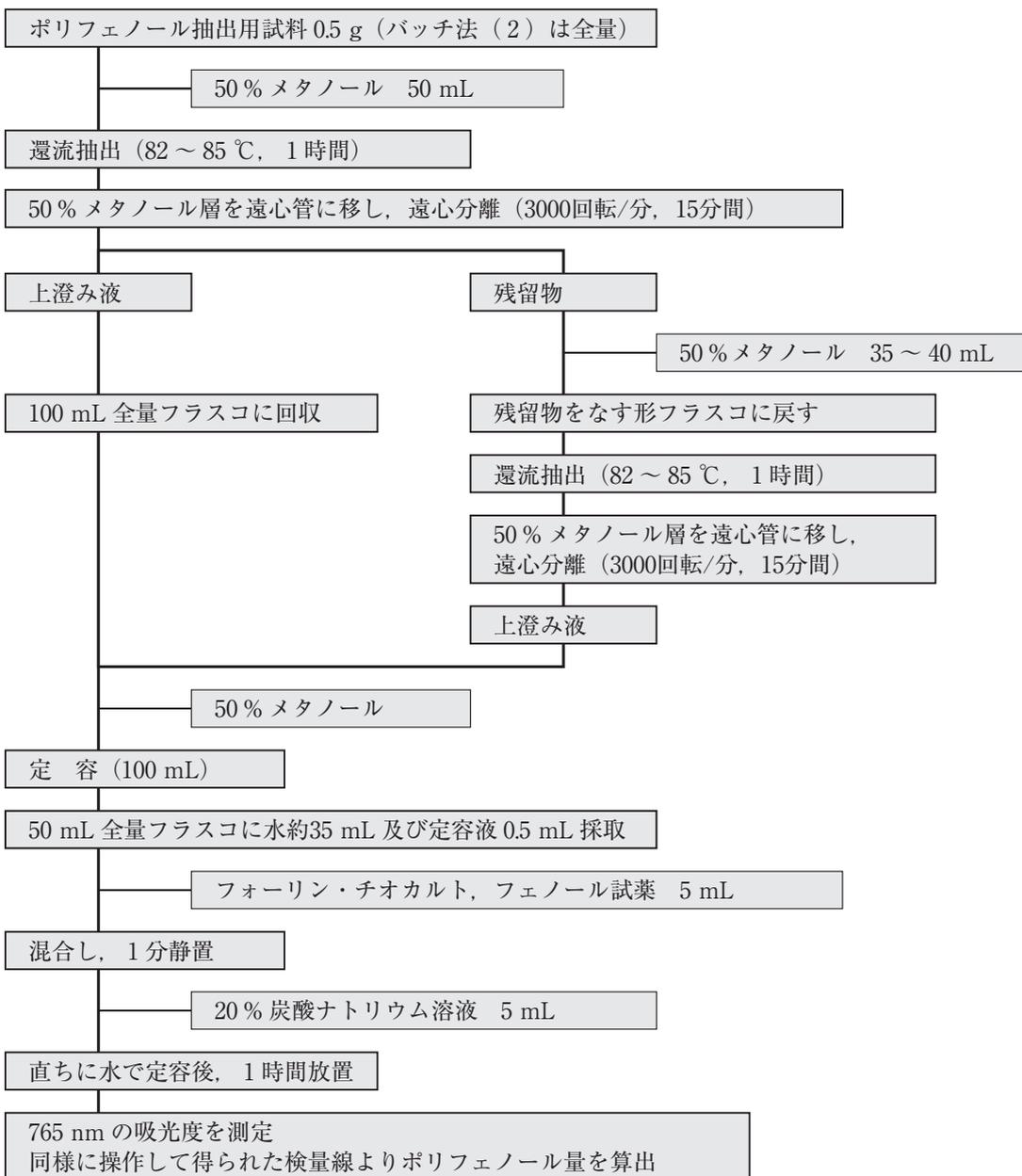
a. バッチ法(1), b. バッチ法(2)



c. ソックスレー法



2) 抽出・測定



別途、水分による補正が必要なため、試料を別に採取して水分を測定し、水分値 (M) を得る。また、ポリフェノール抽出用試料の水分値 (M_1) も測定する (バッチ法 (2) は脱脂後の水分値の測定は不要)。