

9 果実酒

9-1 試料の採取

3-1 による。ただし、発泡のおそれのあるものは綿栓をして、速やかに試験に供する。

9-2 性 状

3-2 による。別に試料及び貯蔵容器において、皮膜の状態についても観察する。

9-3 ガ ス 圧

8-3 に準じて測定する。

9-4 検体の調製

ガスを含むときは8-4 によってガス抜きを行う。

9-5 比 重

5-3 による。

9-6 アルコール分

5-4 による。

9-7 エキス分

3-7 による。ただし、S は9-5 による比重とする。

9-8 全 糖 分

9-8-1 試薬

濃塩酸

10%水酸化ナトリウム溶液

メチレン・ブルー溶液

3-9-3 による。

フェーリング溶液

3-9-3 による。

この試薬の力価 F の標定は、5-12-1 による。

9-8-2 試験操作

検体 5 ml に水 45 ml 及び濃塩酸 1.5 ml を加え、 $65 \pm 1^\circ\text{C}$ で 20 分間転化した後急冷し、フェノールフタレインを指示薬として 10%水酸化ナトリウム溶液で淡桃色になるまで中和し、水を加えて 100 ml とする。この液 50 ml をビュレットにとり、5-12-2 に倣って滴定する。この滴定値に力価 F を乗じ、この数値より第 4 表（付表）を用いて転化

糖として求めた値を a とし、次式によって検体中の全糖分量を求める。

$$\text{全糖分 (g/100 ml)} = a \times \text{希釈倍率} / 1000$$

9-9 還元糖

9-9-1 試薬

メチレン・ブルー溶液

3-9-3 による。

フェーリング溶液

3-9-3 による。

この試薬の力価 F の標定は次による。

(標定法) フェーリング溶液 10 ml を 200 ml 容三角フラスコにとり、ブドウ糖標準溶液約 18 ml を加えて沸騰させ、なお沸騰を続ける程度に火力を弱めて 2 分間沸騰を続けた後、ビュレットよりブドウ糖標準溶液を滴下し、硫酸銅の青色がほとんど無くなってから、メチレン・ブルー溶液 4 滴を加え煮沸しつつ更に液を滴下し、青色が消失したところを終点とする。

滴定は沸騰を始めてから 3 分以内に終わらせる。使用したブドウ糖標準溶液の全量を a ml とすれば、力価 F は次式によって求められる。

$$F = 24.9 / a$$

ブドウ糖標準溶液はブドウ糖(特級)2 g を水に溶かして 1 l とする。

9-9-2 試験操作

検体を糖分 2 mg/ml 程度になるように適宜希釈し、50 ml をビュレットにとり、9-9-1 の力価の標定法に倣って滴定する。この滴定値に力価 F を乗じ、この数値より第 4 表(付表)を用いてブドウ糖として求めた値を b とし、次式によって検体中の還元糖量を求める。

$$\text{還元糖 (g/100 ml)} = b \times \text{希釈倍率} / 1000$$

(注) 3-9 B) に倣い、ブドウ糖標準溶液による逆滴定法によっても差し支えない。

9-10 総酸(遊離酸)

9-10-1 試薬

N/10 水酸化ナトリウム溶液

3-5-1 による。

9-10-2 試験操作

検体 10 ml をとり、pH 計 (pH 計を備えた自動滴定装置を含む) を用いて、N/10 水酸化ナトリウム溶液で pH 8.2 になるまで滴定する。この滴定値を a ml とし、3-5-2 と同じ式によって酸度として表示する。必要に応じて、炭酸を含まない水を 100 ml まで加えて滴定しても良い。

酒石酸として算出する場合は、次式による。

$$\text{酒石酸 (g/100 ml)} = \text{酸度} \times 0.075 \quad (\text{小数点以下 2 けたを四捨五入})$$

- (注)1 発泡性があり炭酸ガスの影響が考えられる検体については、4-3-2 に倣い検体を調製したのち 4-3-3 と同様に pH 計を用いて、N/10 水酸化ナトリウム溶液で pH 8.2 になるまで滴定しても良い。
- 2 着色の少ない検体については、3-6-1 によるフェノールフタレイン指示薬を検体に数滴加え、N/10 水酸化ナトリウム溶液で淡桃色を呈するまで滴定しても良い。

9-11 揮発酸

9-11-1 試薬

N/10 水酸化ナトリウム溶液

3-5-1 による。

フェノールフタレイン指示薬

3-6-1 による。

9-11-2 試験操作

検体 10 ml を 300 ml 容フラスコにとり水蒸気蒸留を行って、留液約 100 ml をとる。留液を約 60℃ に温め、これについてフェノールフタレイン指示薬を数滴加え N/10 水酸化ナトリウム溶液で薄桃色を呈するまで滴定する。その滴定値を a ml とし、次式により揮発酸度として表示する。

$$\text{揮発酸度} = a \times F$$

酢酸として算出するときは、次式による。

$$\text{酢酸 (g/100 ml)} = \text{揮発酸度} \times 0.06$$

9-12 着色度

3-8 による。ただし、白ブドウ酒のような赤色を呈さないものは 420 nm、赤ブドウ酒のような赤色を呈するものは 420 nm 及び 530 nm における吸光度を測定する。濃色の検体は、2 mm など短い光路長の吸収セルを使用して測定し、水による希釈は行わないこと。

9-13 酢酸

9-13-1 試薬

A 液 (リンゴ酸溶液)

トリエタノールアミン塩酸塩を 5.6 g、L-リンゴ酸を 280 mg、塩化マグネシウム ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) を 140 mg それぞれとり、水 80 ml に溶解し、2N 水酸化カリウム溶液で pH 8.4 に調整後、水で 100 ml とする。

B 液 (ATP、CoA、NAD 混合溶液)

アデノシン-5'-トリフォスフェイト ($\text{ATP-Na}_2\text{H}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) を 175 mg、コエンザイム A (CoA) を 18 mg、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) を 86 mg それぞれとり、水 7 ml に溶解する。

C 液 (リンゴ酸脱水素酵素、クエン酸合成酵素混合溶液)

リンゴ酸脱水素酵素を約 2800 単位、クエン酸合成酵素を約 700 単位とり、約 3 M の硫酸アンモニウム溶液 1 ml に溶解する。

D 液(アセチル-CoA 合成酵素溶液)

アセチル-CoA 合成酵素を約 40 単位とり、水 1 ml に溶解する。

9-13-2 試験操作

酢酸濃度が 10~150 μ g/ml となるよう検体を希釈し、その 0.1 ml を光路長 10 mm の吸収セル(340 nm の吸収のないもの)にとり、A 液を 1.0 ml、B 液を 0.2 ml 及び水 1.9 ml をそれぞれ添加混和後、340 nm における吸光度(E0)を測定する。次に C 液を 0.01 ml 加えて混和し、約 3 分後吸光度(E1)を測定する。更に D 液を 0.01 ml 混和し、20~25°C で約 20 分間反応し、吸光度(E2)を測定する。

別に検体の代わりに、水を用いた空試験を行い、ブランクの吸光度 Eb0、Eb1、Eb2 をそれぞれ測定し、検体中の酢酸量を次式によって計算する。

$$\text{酢酸 (mg/l)} = 308 \times \left[\left(E2 - E0 - \frac{(E1 - E0)^2}{(E2 - E0)} \right) - \left(Eb2 - Eb0 - \frac{(Eb1 + Eb0)^2}{(Eb2 + Eb0)} \right) \right] \times \text{希釈倍率}$$

(注) 1 リンゴ酸脱水素酵素の 1 単位は、pH 7.5、25°C の条件で、オキサロ酢酸と NADH から 1 分間に 1 μ mol のリンゴ酸と NAD を生成する力価。

2 クエン酸合成酵素の 1 単位は、pH 8.0、37°C の条件で、オキサロ酢酸とアセチル-CoA から 1 分間に 1 μ mol のクエン酸を生成する力価。

3 アセチル-CoA 合成酵素の 1 単位は、pH 7.5、37°C の条件で、酢酸、ATP 及び CoA から 1 分間に 1 μ mol のアセチル-CoA を生成する力価。

9-14 メチルアルコール

11-7 による。ただし、B) ガスクロマトグラフ分析法で測定する場合、必要に応じて 9-6 による留液を用いても良い。

9-15 ソルビン酸

添加回収試験で定量性が確認されれば、9-15-1~9-15-3 に示す以外的高速液体クロマトグラフ(HPLC)分析法によっても良い。

9-15-1 試薬

ソルビン酸標準溶液

ソルビン酸カリウム 0.268 g を水に溶かして 100 ml とする。この試薬 1 ml はソルビン酸 2 mg を含む。この試薬を必要に応じて希釈し、ソルビン酸 0.02~0.4 mg/ml を含む標準溶液系列を作成する。

内部標準溶液

デヒドロ酢酸 1 g を 8 ml の 1N NaOH に溶解した後、水で 100 ml とする。

メチルアルコール

アセトニトリル

5 mM クエン酸緩衝液 (pH 4.0)

クエン酸 ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 7.0 g とクエン酸三ナトリウム ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) 6.0 g を水に溶かして 1000 ml にする。用事 10 倍希釈し、 $1.0 \mu m$ メンブランフィルターでろ過する。

9-15-2 装置及び分析条件

紫外外部吸収検出器を備えた HPLC 装置

カラム

オクタデシルシリル (ODS) カラム ($4.0 \sim 6.0 \text{ mm} \times 150 \sim 250 \text{ mm}$) とする。

移動相

メチルアルコール : アセトニトリル : 5 mM クエン酸緩衝液 (pH 4.0) = 1 : 2 : 7、流量 $0.75 \sim 1.0 \text{ ml/分}$ (カラムの使用限界を超えない程度) とする。

検出波長

240 nm とする。

カラム槽温度

室温とする。

9-15-3 試験操作

ソルビン酸標準溶液と内部標準溶液を 9 : 1 で混合し、孔径 $0.45 \mu m$ の親水性メンブランフィルターを通して懸濁粒子を除き、その $10 \mu l$ を HPLC に注入する。得られるデヒドロ酢酸とソルビン酸のピーク面積から次式によって面積比率 (R) を求める。

面積比率 (R) = ソルビン酸のピーク面積 / デヒドロ酢酸のピーク面積

各濃度のソルビン酸標準溶液について面積比率を求め、ソルビン酸濃度と面積比率との間で、検量線を作成する。

次に、検体を同様に処理して得られる面積比率から、検量線を用いて検体中のソルビン酸量を求める。

(注) カラムに吸着する可能性のある成分を含む場合は、内部標準溶液を添加した検体を 1 N NaOH で中和し、水で 2 倍に希釈した後、オクタデシル (C18) 固相抽出カラムを通し、素通り画分を HPLC 分析に用いても良い。

9-16 亜硫酸

一般には A) 通気蒸留・滴定法を用いるが、着色の少ない検体の総亜硫酸のみを測定する場合には B) 酵素法を用いても良い。

A) 通気蒸留・滴定法

9-16-1 試薬

0.3% 過酸化水素水

3% 過酸化水素水 10 ml を水に溶かして 100 ml とする。

メチル・レッド、メチレン・ブルー混合指示薬

0.1 g のメチル・レッドを 100 ml のエチルアルコールに溶解した後、0.05 g のメチレン・ブルーを加えて溶解し、密栓して保存する。メチル・レッドが溶解しにくい場

合は、50°C程度の湯煎で加温して溶解する。引火性があるため、火気に注意して取り扱い扱う。

25%リン酸

リン酸を水で薄めて25%溶液とする。

N/100 水酸化ナトリウム溶液

5-8-1 による。

9-16-2 装置

代表的な亜硫酸測定装置は下図のとおりである。

- A 50 ml 容梨型二口フラスコ
- B 50 ml 容丸底フラスコ又はナス型フラスコ
- C 二重冷却管
- D バーナー

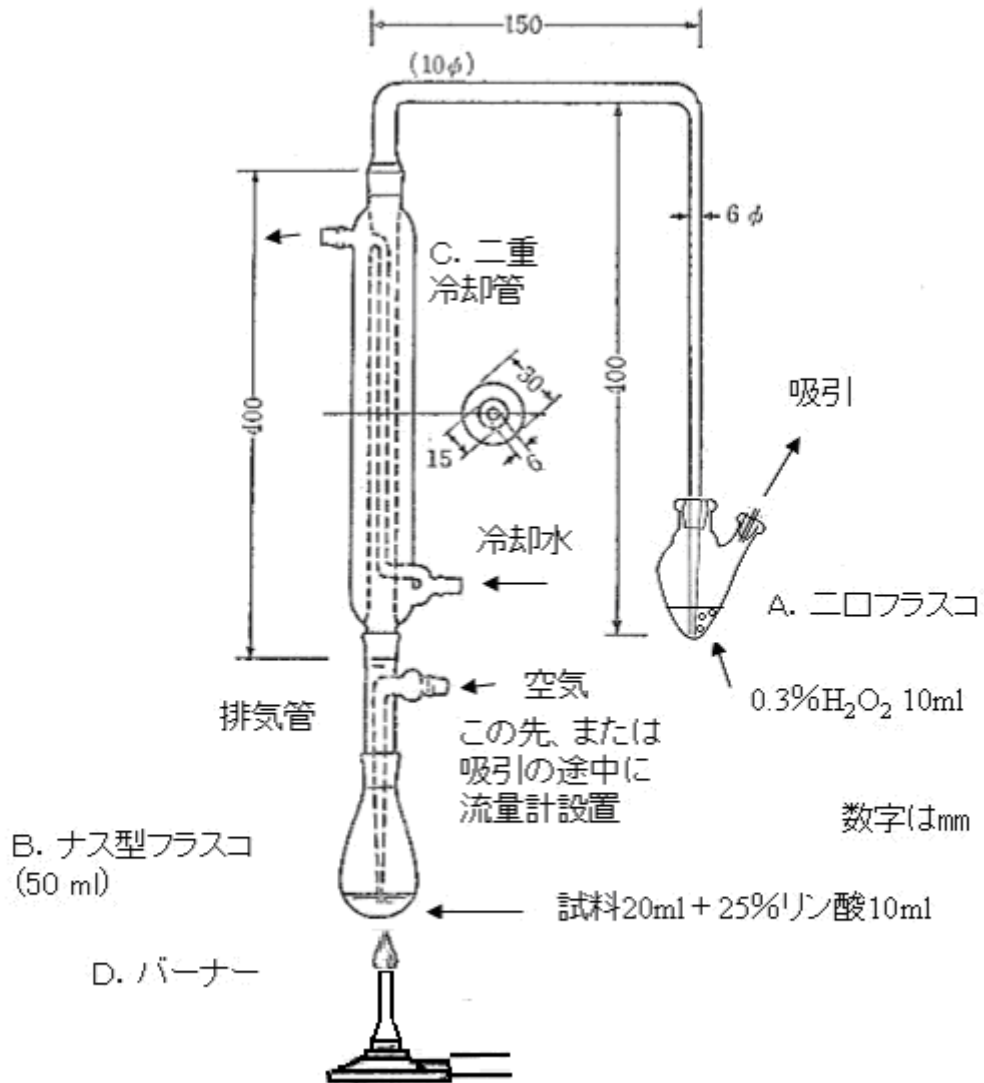


図 亜硫酸測定装置の例

9-16-3 試験操作

A-1) 遊離型亜硫酸定量試験

0.3%過酸化水素水 10 ml をフラスコ(A)にとり、指示薬数滴を加え(紫色になる)N/100 水酸化ナトリウム溶液で緑褐色を呈するまで調製した後、装置に取り付ける。次に検体 20 ml 及び 25%リン酸 10 ml をフラスコ(B)にとり、冷却器の下部に取り付ける。水流ポンプ等により 1000 ml/分程度で 15 分間吸引する(指示薬は紫色に戻る)。検体の温度は、製造場で果実酒が保存される温度に合わせることが望ましい。フラスコ(A)を取りはずし、水で付着した液を洗い入れ、内容物を N/100 水酸化ナトリウム溶液で緑褐色を呈するまで滴定し、この滴定値を a ml とする。

検体中の遊離型亜硫酸量は次式によって求められる。

$$\text{亜硫酸}(\text{SO}_2 \text{ mg/l}) = a \times 0.32 \times 1000 / V \times F$$

V: 検体の採取量

F: N/100 水酸化ナトリウム溶液の力価

A-2) 結合型亜硫酸定量試験

遊離型亜硫酸測定を通気蒸留終了後、遊離型亜硫酸定量と同様に、指示薬を加えて緑褐色に中和した 0.3%過酸化水素水 10 ml を入れたフラスコ(A)を付け替え、フラスコ(B)の検体を静かに煮沸させながら同様に 15 分間吸引した後、A-1)遊離型亜硫酸定量試験と同様に定量する。加熱は実験用ガスバーナーの炎の先端がフラスコ(B)の底部に接触する程度とする。

A-3) 総亜硫酸定量試験

遊離型亜硫酸量と結合型亜硫酸量の和を総亜硫酸量とする。または、初めから加熱して通気蒸留しても良い。

なお、酢酸の含有量が 1.2 g/l 以上の場合は、検体に 3%過酸化水素水を数滴添加し、亜硫酸を硫酸に酸化した後に測定した値を揮発酸のブランクとして測定値から差し引く。

B) 酵素法

9-16-4 試薬

A 液

0.6 M トリエタノールアミン緩衝液 (pH 8.0)

B 液

NADH 0.4 mg/ml (A 液)

C 液

NADH-ペルオキシダーゼ溶液 10 単位/ml

D 液

亜硫酸オキシダーゼ溶液 2.5 単位/ml

9-16-5 試験操作

光路長 10 mm の吸収セル(340 nm の吸収のないもの)に、亜硫酸を 3~30 μg 含むよ

う調整した検体を 0.10 ml、B 液を 1.0 ml、C 液を 0.01 ml 及び水を 1.9 ml それぞれ添加混和し、5 分後に 340 nm における吸光度 (E1) を測定する。次に D 液を 0.05 ml 加えて混和し、20~25℃ で約 30 分間反応し、吸光度 (E2) を測定する。

別に検体の代わりに、水を用いた空試験を行い、ブランクの吸光度 Eb1、Eb2 をそれぞれ測定し、検体中の総亜硫酸量を次式によって計算する。

$$\text{総亜硫酸濃度 (SO}_2 \text{ mg/l)} = 311 \times ((E1 - E2) - (Eb1 - Eb2)) \times \text{希釈倍率}$$

(注) 1 1500 $\mu\text{g/ml}$ 以上の L-アスコルビン酸を含む検体は、亜硫酸濃度が低く測定されるため、アスコルビン酸オキシダーゼでアスコルビン酸を除去する。

2 NADH-ペルオキシダーゼの 1 単位は、pH 8.0、25℃ の条件で、NADH と H₂O₂ を基質に、1 分間に 1 μmol の NADH を消費する力価。

3 亜硫酸オキシダーゼの 1 単位は、pH 8.0、25℃ の条件で、SO₂ と O₂ を基質に、1 分間に 1 μmol の O₂ を消費する力価。

4 この分析法は赤ブドウ酒には適用できない。