

# 果実飲料のエタノール分共同試験（ガスクロマトグラフ法） 測定手順書

## 1. 適用範囲

この手順書は、日本農林規格に定める果実飲料及びそれらの周辺食品に適用する。

## 2. 測定方法の概要

果実飲料を希釈しろ過した後、内部標準を用いて又は用いないで、水素炎イオン化検出器付きガスクロマトグラフを用いてエタノール分を測定する。

## 3. 注意事項

- (a) 試験実施にあたっては、保護メガネや使用する試薬に耐性のある手袋を使用する等、安全に注意すること。
- (b) エタノール、2-プロパノール及び2-ブタノールは、引火性があり有害なので、特に火気を避け、蒸気を吸入しないようにし、粘膜及び皮膚に付着しないようにすること。
- (c) ガスクロマトグラフ使用前に、ガス配管の接続部や、その他流路系からのガス漏れがないかどうかを十分に検査すること。特に水素ガスを使用する場合は、厳重に検査し、使用後はボンベの栓を確実に閉めること。また可能であれば、ボンベは室外に設置し、室内に流入するガスの最大流量を制限する装置を設置するか、水素ガス発生装置を用いること。
- (d) ガスクロマトグラフ使用中は、注入口部、検出器部が高温になっているので、火傷をす  
るおそれがあるため手を触れないこと。

## 4. 試薬等

試験に用いる水及び試薬は、次のとおりとする。

- (a) 水：イオン交換法によって精製した水又は逆浸透膜法、蒸留法、イオン交換法などを組み合わせた方法によって精製したもので、JIS K 8008 に規定する A2 以上の品質を有するもの。
- (b) エタノール：JIS K 8101 に規定するもの又はこれと同等以上のもの。
- (c) 2-プロパノール：JIS K 8839 に規定するもの又はこれと同等以上のもの。
- (d) 2-ブタノール：JIS K 8812 に規定するもの又はこれと同等以上のもの。

## 5. 器具及び装置等

試験に用いる器具及び装置は、次のとおりとする。

### 5.1 試料溶液の調製及び測定に使用する器具及び装置

- (a) 電子天びん：1 mg の桁まで量ることができるもの。
- (b) 全量ピペット：呼び容量 1 mL。JIS R 3505 に規定するクラス A 又はそれ以上のグレードのもの。
- (c) 全量フラスコ：呼び容量 25 mL。JIS R 3505 に規定するクラス A 又はそれ以上のグ

レードのもの。

- (d) **メンブランフィルター**：親水性のもの（親水性 PTFE、セルロースアセテート）で、孔径が 1 mm 以下のもの<sup>(1)</sup>。
- (e) **ガスクロマトグラフ**：JIS K 0114 に規定するもので、水素炎イオン化検出器付きのもので、パックドカラムが使用可能なもの。
- (f) **カラム**：ガラスカラム等にポーラスポリマービーズ又はポリエチレングリコールを含む担体を充填したもの、又は同等以上の分離能をもつもの

(1) パルプ等を含む試料をろ過する場合、目詰まりを起こすので、直径の大きいもの（25 mm程度）を使用するとよい。

## 5.2 標準溶液調製に使用する器具

- (a) **電子天びん**：0.1 mg の桁まで量ることができるもの。
- (b) **全量ピペット**：呼び容量 2 mL、5 mL、10 mL、15 mL。JIS R 3505 に規定するクラス A 又はそれ以上のグレードのもの。
- (c) **全量フラスコ**：呼び容量 50 mL、100 mL。JIS R 3505 に規定するクラス A 又はそれ以上のグレードのもの。

## 6. 試薬の調製

試薬の調製は、次のとおり行う。試薬作製量は必要に応じて変更してよい。

### (a) 2 % 2-プロパノール溶液

2-プロパノール 2 g を全量フラスコ（100 mL）に量りとり、水で定容する。Tenax TA を充填したパックドカラムで測定する際の内部標準に使用する。

### (b) 2 % 2-ブタノール溶液

2-ブタノール 2 g を全量フラスコ（100 mL）に量りとり、水で定容する。Chromosorb 101 を充填したパックドカラムで測定する際の内部標準に使用する。

## 7. 標準溶液の調製

調製は、次のとおり行う。

Tenax TA を充填したパックドカラムで測定する場合は、2 % 2-プロパノール溶液を用いて調製する。Chromosorb 101 を充填したパックドカラムで測定する場合は、2 % 2-ブタノール溶液を用いて調製する。内部標準を使用しない Polyethylene glycol 6000 を充填したパックドカラムを使用する場合は、内部標準は添加しないで、標準溶液 I ～IV を調製する。

前述の充填剤を用いて測定する場合において、他に適する内部標準があれば、その内部標準を用いてよい。また、前述以外の充填剤を用いて測定する場合は、それぞれ適した内部標準を用いるか又は用いないで測定する。

調製した標準溶液等は、密封し冷蔵で保存すれば、2 週間程度使用可能である。

### (a) 標準溶液原液（エタノール 5 g/L (0.5 w/v%)）

エタノール 0.5 g を全量フラスコ（100 mL）に 0.1 mg の桁まで量りとり、水で定容する。

(b) 標準溶液Ⅰ (エタノール0.2 g/L (0.02 w/v%))

全量ピペット (2 mL) で標準溶液原液を全量フラスコ (50 mL) に入れる。これに全量ピペット (2 mL) で2% 2-プロパノール溶液又は2% 2-ブタノール溶液2 mLを加え水で定容する。

(c) 標準溶液Ⅱ (エタノール0.5 g/L (0.05 w/v%))

全量ピペット (5 mL) で標準溶液原液を全量フラスコ (50 mL) に入れる。これに全量ピペット (2 mL) で2% 2-プロパノール溶液又は2% 2-ブタノール溶液2 mLを加え水で定容する。

(d) 標準溶液Ⅲ (エタノール1 g/L (0.1 w/v%))

全量ピペット (10 mL) で標準溶液原液を全量フラスコ (50 mL) に入れる。これに全量ピペット (2 mL) で2% 2-プロパノール溶液又は2% 2-ブタノール溶液2 mLを加え水で定容する。

(e) 標準溶液Ⅳ (エタノール1.5 g/L (0.15 w/v%))

全量ピペット (15 mL) で標準溶液原液を全量フラスコ (50 mL) に入れる。これに全量ピペット (2 mL) で2% 2-プロパノール溶液又は2% 2-ブタノール溶液2 mLを加え水で定容する。

(f) 感度確認用エタノール溶液 (エタノール0.02 g/L (0.002 w/v%))

全量ピペット (5 mL) で標準溶液原液を全量フラスコ (50 mL) に入れ水で定容する。この溶液を全量ピペット (2 mL) で全量フラスコ (50 mL) に入れ水で定容する。

## 8. 測定手順

### 8.1 試料溶液の調製

- (a) 試料5 gを全量フラスコ (25 mL) に1 mgの桁まで量りとる。
- (b) 全量ピペット (1 mL) で2% 2-プロパノール溶液又は2% 2-ブタノール溶液1 mLを加え、水で定容し、よく混合する。2% 2-プロパノール溶液又は2% 2-ブタノール溶液は、定量に用いる標準溶液を調製した時加えたものと同一のものを使用する。
- (c) (b)の液をメンブランフィルターでろ過し、試料溶液とする。
- (d) 調製した試料溶液は、密封し冷蔵で保存すれば、2週間程度使用可能である。

### 8.2 試料溶液の測定

- (a) 試料溶液をガスクロマトグラフに一定量注入する。
- (b) 標準溶液と試験溶液の注入量は同一とする。
- (c) 同一条件により測定したときの標準溶液のエタノール及び内部標準と保持時間を比較し、一致したものをエタノール及び内部標準とする。

### 8.3 定量

試料は、以下の条件を満たす検量線を用いて定量する。

- (a) ガスクロマトグラフのFID点火後は、各溶液測定の間では消火しない。消火した場合は、点火後、再度標準溶液と試料溶液を測定し定量する。
- (b) 同一測定日の測定結果を用いて定量する。ただし、オートサンプラーを用いて、シーケンス、バッチ処理等により終夜運転を行った場合は、標準溶液と試料溶液の測定日は同一でなくてもよい。

#### 8.4 検出下限

ノイズ幅の10倍を検出下限とする。ピーク高さがベースラインのノイズ幅の10倍以上のピークについて定量する。

#### 8.5 ガスクロマトグラフによる測定について

##### (a) ガスクロマトグラフの測定条件設定

ガスクロマトグラフの取扱説明書に従い、測定条件を設定する。参考として以下に測定条件例を記載する。

内部標準を使用しない場合は、標準溶液及び試料溶液の注入は、オートサンプラーを使用する。それ以外のカラムを使用する場合においても、オートサンプラーがガスクロマトグラフに付属している場合は、オートサンプラーを使用する。

##### 測定条件例1

装置：GC-2014（島津製作所）

カラム：内径3.2 mm×長さ1 mのガラスカラムにTenax TA (60/80 mesh) を充填したものの

カラム恒温槽温度：90 °C

試料注入口温度：200 °C

キャリアーガス及び流量：窒素、40 mL/分

検出器及び検出器温度：水素炎イオン化検出器 (FID)、200 °C

注入量：1 mL

内部標準：2-プロパノール

##### 測定条件例2

装置：GC-2014（島津製作所）

カラム：内径3.2 mm×長さ1.6 mのガラスカラムにChromosorb 101 (60/80 mesh) を充填したものの

カラム恒温槽温度：120 °C

試料注入口温度：220 °C

キャリアーガス及び流量：窒素、40 mL/分

検出器及び検出器温度：水素炎イオン化検出器 (FID)、230 °C

注入量：1 mL

内部標準：2-ブタノール

##### 測定条件例3

装置：GC-2014（島津製作所）

カラム：内径3.2 mm×長さ2.1 mのガラスカラムにPolyethylene glycol 6000 (10%、60/80 mesh) を充填したものの

カラム恒温槽温度：85 °C

試料注入口温度：150 °C

キャリアーガス及び流量：窒素、30 mL/分

検出器及び検出器温度：水素炎イオン化検出器（FID）、150 °C

注入量：1 mL

(b) ガスクロマトグラフの性能確認

ガスクロマトグラフの測定条件を設定した後、以下の項目について確認する。

① ベースラインの安定性

ベースラインにドリフト等がなく、安定していることを確認する。

② ピーク分離

標準溶液IVについて、エタノールと2-プロパノール又は2-ブタノールのピークが重複しないことを確認する。重複する場合は、ピーク間の谷の高さが低い方のピークの高さの30%未満となるように、カラム恒温槽温度、流量等を調整する。また、試料溶液を測定し、試料成分由来のピークとエタノール及び内部標準のピークが重複している場合は、ピーク間の谷の高さがエタノール又は内部標準のピークの高さの50%未満となるように、カラム恒温槽温度、流量等を調整する。

③ 保持時間の変動確認

標準溶液I～IVのいずれかを3回注入し、エタノールのピークの保持時間の最大値と最小値の差が、最大値の5%以下とする。

④ 感度

感度確認用エタノール溶液を測定し、ピーク高さがベースラインのノイズ幅の10倍以上のピークであることを確認する。ノイズ幅及びピーク高さの確認方法は、JIS K 0114 図 11 による。参考として図 1 にピーク高さ対ノイズ比の求め方を記載する。

⑤ 検量線作成

標準溶液I～IVを測定し、検量線を作成する。内部標準を用いない測定方法の場合は絶対検量線法で、内部標準を用いた測定方法の場合は、内部標準法で作成する。内部標準法による検量線は、濃度と、エタノールの2-プロパノール又は2-ブタノールに対するピーク面積比又はピーク高さ比について直線回帰分析を行い、検量線  $y=ax+b$  ( $y$ : エタノールの内部標準に対するピーク面積比又はピーク高さ比、 $x$ : 濃度) の傾き  $a$  と切片  $b$  を求めることにより作成する。また、検量線には原点を含めない。直線性の指標である相関係数が 0.99 以上であることを確認する。

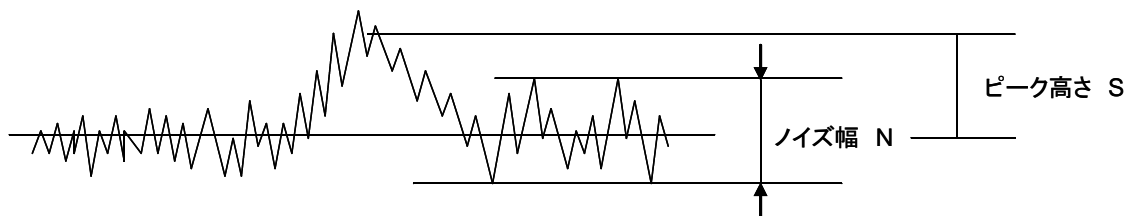


図1 ピーク高さ対ノイズ比の求め方 (JIS K 0114を参照)

※ノイズの上端と下端の間をノイズ幅N、ベースラインとピークトップの間をピーク高さSとし、S/Nをピーク高さ対ノイズ比とする。

## **9. その他の事項**

### **9.1 カラムについて**

新しいカラムを使用する場合は、コンディショニングを行う。また、長期間使用していない場合は、使用前にコンディショニング又はカラムの最高使用温度程度に1～数時間保ち、カラム内の汚れを除く。設定方法については、ガスクロマトグラフの取扱説明書に従い操作すること。

### **9.2 シリンジの洗浄及び洗浄用溶液について**

シリンジは、標準溶液、試料溶液測定毎に十分に洗浄する。果実飲料は、糖分が多いため、洗浄用溶液には水を用いると操作しやすい。

### **9.3 ピークの積分**

ピークの裾を拡大して、以下のようにしてピークの切り方（積分）を確認する。ピークが重複している場合は、JIS K 0114 11.3(b)の備考に記載されている方法によりピークを分割する。

#### **(a) 標準溶液**

自動で積分すると、濃度によってピークの切り方が異なる場合があるので注意する。異なった場合にはマニュアル積分等でベースラインの引き方を修正する。

#### **(b) 試料**

目的のピークにきょう雑ピークが近接する場合、目的のピークがきょう雑ピークのベースラインの影響を受けるときがある。その場合、マニュアル積分等で検量線のベースラインと同じように引く。

## **10. 計算**

検量線から、試料溶液中のエタノール濃度を求め、次式により試料1 kg中のエタノール分を算出する。

$$\text{エタノール分 (g/kg)} = \text{試料溶液中のエタノール濃度 (g/L)} \times \frac{25}{1000} \times \frac{1000}{W}$$

W：試料重量 (g)

25：溶液容量 (mL)

## **試験用試料の調製**

製品をよく振り混ぜて均質化し試料とする。

## 共同試験結果

果実飲料のエタノール分（ガスクロマトグラフ法）

- (1) 参加試験室数：10
- (2) マテリアル数：5
- (3) 濃度：1.0 g/kg ～ 5.3 g/kg
- (4) 併行標準偏差 ( $S_r$ )：0.006 g/kg ～ 0.097 g/kg
- (5) 室間再現標準偏差 ( $S_R$ )：0.13 g/kg ～ 0.39 g/kg
- (6) 併行相対標準偏差 ( $RSD_r$ )：0.6 %～ 2.4 %
- (7) 室間再現相対標準偏差 ( $RSD_R$ )：5.7 %～ 12.7 %