

飲料中のエチルアルコールの定量分析法（第3報）

渡辺 惣汰*, 松本 健志*, 八木 潤*, 野口 大*, 松本 啓嗣**

Study of a quantitative analytical method for ethyl alcohol content in beverages (third report)

WATANABE Sota*, MATSUMOTO Tsuyoshi*, YAGI Jun*, NOGUCHI Hiroshi* and MATSUMOTO Yoshitsugu**

*Tokyo Customs Laboratory 2-7-11 Aomi, Koto-ku, Tokyo, 135-8615 Japan

**Central Customs Laboratory, Ministry of Finance 6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba, 277-0882 Japan

In the Customs Tariff Law, beverages with an alcohol content of over 0.5 % are classified as liquors and are subject to higher tariff than those with an alcohol content of 0.5 % or less. Thus, it is necessary to accurately quantify alcohol content. However, the current ethanol quantitative analytical method by using gas chromatograph (GC) for Customs has some points for which modification would be desirable. For example, measurements must be converted three times. To establish a new analytical method, we have verified the mechanical oscillator densitometer method and the new GC analytical method. This time, we report new insights by measuring a larger number of samples. Regarding the densitometer method, there is a possibility that components other than ethanol that existed after distillation affected the test results. On the other hand, the current GC analytical method could be modified by changing a column and plotting the calibration curve by using measurements of the mechanical oscillator densitometer. In addition, this method was able to use nitrogen as the GC carrier gas instead of helium. Therefore, the modified GC analytical method is expected to be used for Customs analysis.

1. 緒 言

飲料中には、酒類以外にも少量のエチルアルコールが含まれている場合がある。例えば、果実飲料には、発酵や無気呼吸等により原料である果実中に天然で存在しているものや、添加された香料の溶剤に由来するエチルアルコールが含まれていることがある^{1), 2)}。関税率表第22類注2及び注3の規定では、温度20°Cでエチルアルコールの容量分（以下、アルコール分と略記する。）が0.5%以下のものを、アルコールを含有していない飲料としている。過去には、アルコールを含有していないものとされるジュースを分析したところ、アルコール分が0.5%を超過していたため、高関税率の酒類に分類することが適当とされた事例もある。したがって、適切な関税分類のためには、低濃度のアルコール分を正確に定量する必要がある。

税関で行われている飲料中のアルコール分の定量分析法の1つに、飲料を直接蒸留した後にガスクロマトグラフ（以下、GCと略記する。）で測定する手法があるが、次のような改善すべき点が存在する。①酒精度計を用いて標準エチルアルコール水溶液の濃度を測定するが、多量の液量を15°Cに合わせる必要があるため、時間と手間がかかる。②平成23年4月の特定計量器検定検査規則の改正により、改正以前の規格の酒精度計を使用する場合は、その測定値を改正後の値に換算する必要が生じる。③重量でサンプリングするため、重量百分率を容量百分率に換算する過程があり、換算回数の増加を招いている。④極性の高いエチルアルコール

の分析であるにも関わらず、微極性カラムの使用を規定している。極性試料に対しては、液相と試料との間で水素結合等の複数の分子間相互作用が働くため保持力が大きい極性カラムが適しており³⁾、微極性カラムでは、保持力が不足する可能性がある。

これまで我々は、新たなアルコール分の定量分析法を検討し、適切な関税分類に貢献することを目的として様々な実験を行い、その結果を報告してきた。第1報では、国内の公定分析法である国税庁所定分析法（以下、国税法と略記する。）を参考に、新たなGC分析法を考案した⁴⁾。現行法からの変更点は次のとおりである。①標準エチルアルコール水溶液の濃度を振動式密度計で測定する。振動式密度計は、測定液量が少ないので、温度設定が容易である等のメリットがある。②容量でサンプリングし、換算回数を削減する。③極性カラムを使用する。加えて、国税法を参考にすると、試料を蒸留せずに直接GCで分析できる可能性も考えられた。

第2報からは、国税法に規定されている振動式密度計法にも着目した。この手法では、試料を直接蒸留あるいは水蒸気蒸留してから振動式密度計による測定を行う。GCを用いず、測定が迅速かつ簡便という利点がある。第2報において、オレンジジュースを測定し、第1報のGC分析法と振動式密度計法の検証を行った結果、直接蒸留した後に第1報の条件によるGC分析を行うことで、現行法と同等の結果が得られた。一方で、蒸留を省略した第1報のGC分析法及び振動式密度計法では、定量値が現行法に近似しない可能性が考えられた⁵⁾。ただし、1種類の飲料のみについての考察であり、より多くの飲料を用いた検証が求められた。

本報では、第2報よりも多くの飲料を用意して測定し、更なる

* 東京税関業務部 〒135-8615 東京都江東区青海2-7-11

** 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉6-3-5

検証を進めた。また、蒸留方法について、第2報と同様の国税法に従った直接蒸留に加えて、水蒸気蒸留を実施した。さらに、国税法に従った直接蒸留と、税関で行われている現行の直接蒸留は一部の操作が異なっている、という点に着目した。国税法では、現行法よりも丸底フラスコへ移し替えるまでに使用する水の量が少なく、最終的に採取する留液量も少なくなる。水量の多い現行法の方が、焦げ付きやすい飲料や粘性の高い飲料で有利のように思われるが、アルコール分の回収について等、具体的に検証した文献は見当たらない。一方で、国税法の直接蒸留に対しては、複数の検証が実施されている⁵⁾⁻⁷⁾。本報では、粘性の高い飲料に対し、国税法及び現行法の直接蒸留を行い、得られた留液のアルコール分を定量することで、2つの直接蒸留方法を比較した。加えて、これまでGCのキャリヤーガスをヘリウムとしてきたが、将来入手困難となる恐れがあるため、窒素に変更してヘリウムと同等の分析が可能かについても検証した。

2. 実験

2.1 試料及び試薬

2.1.1 試料（全て市販品）

りんごジュース（果汁100%）

ぶどうミックスジュース（ぶどう、りんご、果汁100%）

クランベリーミックスジュース

（クランベリー、ぶどう、りんご、果汁100%）

トマトジュース（トマト100%）

ピーチネクター（果汁30%）

ノニジュース（発酵果実100%）

2.1.2 試薬

エチルアルコール（純正化学、1級）

エチルアルコール

（国立研究開発法人 産業技術総合研究所 認証標準物質、

認証値：1.000%（w/w）、拡張不確かさ：0.001%（w/w））

n-ブチルアルコール（和光純薬、試薬特級）

イソブチルアルコール（和光純薬、試薬1級）

酪酸（純正化学、純正特級）

n-カプロン酸（和光純薬、アミノ酸自動分析用）

n-カプリル酸（和光純薬、試薬1級）

2.2 装置及び測定条件

2.2.1 振動式密度計

装置：DMA-4500（Anton Paar社製）

測定温度：20°C

2.2.2 GC

以下、第1報に基づく条件をGC分析法(a)、現行の条件をGC分析法(b)とする。

装置：7890A（Agilent Technologies社製）

分離カラム：(a) HP-INNOWAX（Agilent Technologies社製）、
30 m × 0.25 mm i.d., 膜厚0.25 μm

(b) HP-Ultra2（Agilent Technologies社製）、

25 m × 0.2 mm i.d., 膜厚0.33 μm

検出器：水素炎イオン化型検出器

検出器温度：(a) 250°C, (b) 310°C

注入口温度：(a) 250°C, (b) 300°C

注入量：0.5 μL

スプリット比：(a) 30:1, (b) 20:1

キャリヤーガス：ヘリウム

カラム流量：(a) 1.25 mL/min, (b) 0.65 mL/min

カラム温度：(a) 40°C (4 min) - (15°C/min) - 210°C

ポストラン 250°C, 3 min

(b) 80°C (15°C/min) - 300°C

内標準溶液（約1%（w/v））：(a) n-ブチルアルコール水溶液又は
イソブチルアルコール水溶液
(b) n-ブチルアルコール水溶液

2.2.3 ガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）

装置：7890B/5977A MSD（Agilent Technologies社製）

分離カラム：DB-WAX（Agilent Technologies社製）、

30 m × 0.25 mm i.d., 膜厚0.25 μm

注入口温度：250°C

注入量：1.0 μL

スプリット比：20:1

キャリヤーガス：ヘリウム

カラム流量：2.2 mL/min

カラム温度：50°C (3 min) - (10°C/min) - 240°C (13 min)

2.3 実験方法

2.3.1 振動式密度計法及びGC分析法の比較

2.3.1.1 模擬試料及び測定検液の調製

(1) 模擬試料の調製

500 mL以上用意した試料のうち、約400 mLの試料を500 mLメスフラスコに移し入れ、20°Cの恒温槽中に静置した。また、エチルアルコール及び試料の残余も同じ恒温槽中に静置した。2時間程度静置した後、500 mLメスフラスコ中の試料に対し、2.5 mL又は5 mL正確に量り採ったエチルアルコールを添加し、試料の残余を標線まで加えた。

(2) 模擬試料の蒸留

(1)で調製した模擬試料に対し、国税法3-4-1⁹⁾に従い、直接蒸留及び水蒸気蒸留を実施した。

(3) GC分析法(a)の検量線用検液の調製

50 mLメスフラスコを用いて、エチルアルコール水溶液を調製した。濃度に関しては、測定対象の濃度を挿むように5つ用意した。例えば、アルコール分0.5%程度のサンプルを測定する場合、約0.2, 0.4, 0.6, 0.8及び1.0%のエチルアルコール水溶液を調製した。この水溶液の20°Cにおける密度を振動式密度計で測定し、国際アルコール表¹⁰⁾からアルコール分を求めた。次に、それぞれの水溶液から1 mL採取し、内標準溶液9 mLと混合して検量線用検液とした。なお、内標準溶液は、ノニジュースから調製した模擬試料の測定の際にはイソブチルアルコール水溶液を使用し、他

は全て n-ブチルアルコール水溶液を使用した。

(4) GC 分析法(a)の検液の調製

(1) の模擬試料及び(2)で得た 2 種類の留液 1 mL に対し、9 mL の内標準溶液を加えた。内標準溶液は、(3)と同様の溶液を使用した。また、トマトジュースから調製した模擬試料を蒸留せずに測定する場合、内標準溶液と混合した後に孔径 0.45 μm のメンブレンフィルターによるろ過を行った。

(5) GC 分析法(b)の検量線用検液の調製

まず、エチルアルコール 50 mL を正確に量り採り、純水で 500 mL に定容して標準エチルアルコール水溶液を調製した。この水溶液の 15 °C におけるエチルアルコールの容量百分率を酒精度計で測定し、現在の規格に合わせた換算、20 °C への換算及び重量百分率への換算を行った。そして、標準エチルアルコール水溶液約 1.0, 2.0, 3.0 及び 4.0 g に対し、内標準溶液 10 mL を加え、純水で 20 mL に定容したものを検量線用検液とした。

(6) GC 分析法(b)の検液の調製

(2) で得た留液を約 20 g 量り採り、内標準溶液を 10 mL 加えた。

2.3.1.2 振動式密度計及び GC による測定

(1) 振動式密度計による測定

2.3.1.1 (2) で得た留液の 20 °C における密度を振動式密度計により測定し、国際アルコール表からアルコール分に換算した。測定は 1 試料あたり 5 回行い、平均値を求めた。

(2) GC による測定

2.3.1.1 (3)-(6) で調製した検液をそれぞれ 1 mL 量り採り、2 mL 容スクリューバイアルに移した後、GC 分析法(a)又は(b)の条件による測定を行った。この測定は、1 検液あたり 5 回繰り返し実施した。GC 分析法(a)では、国税法 3-4-5⁹ に従ってアルコール分を求めた。GC 分析法(b)では、検量線用溶液のクロマトグラムから内標準物質とエチルアルコールのピーク面積比を求め、エチルアルコールの重量百分率に対してプロットし、検量線を作成した。この検量線より、模擬試料のエチルアルコール濃度を重量百分率で算出し、国際アルコール表を用いて容量百分率に換算することでアルコール分を求めた。

2.3.1.3 定量値の検証

容量百分率からエチルアルコールの添加回収率を計算した。なお、飲料中に元からエチルアルコールが含まれている場合、国税法 3-4-1 に従って直接蒸留し、2.3.1.1 (3)-(6) 及び 2.3.1.2 に準じた測定を行ってアルコール分を求め、回収率の計算に使用した。ノニジュースに関しては、直接蒸留だけでなく、蒸留をせずに測定した場合及び水蒸気蒸留した場合の測定も実施した。

2.3.2 蒸留方法の比較

(1) 模擬試料の調製

500 mL 以上用意した試料のうち、約 400 mL の試料を 500 mL メスフラスコに移し入れ、20 °C の恒温槽中に静置した。また、エチルアルコール及び試料の残余も同じ恒温槽中に静置した。2 時間程度静置した後、500 mL メスフラスコ中の試料に対し、25 mL 又は 50 mL 正確に量り採ったエチルアルコールを添加し、試料の残余を標線まで加えた。

(2) 模擬試料の蒸留

国税法 3-4-1 に従った直接蒸留及び水蒸気蒸留の他に、税関分析で一般的な直接蒸留法による蒸留を行った。まず、20 °C の恒温槽でしばらく静置した模擬試料を 100 mL メスフラスコの標線まで移し入れた。次に、約 50 mL の純水をビーカーに採り、100 mL メスフラスコ内の模擬試料全量を加え、試料採取したメスフラスコを純水約 50 mL で十分に洗浄して、洗液を先のビーカーに移し入れた。これを 500 mL 容丸底フラスコに移し入れ、沸騰石を加えて直接蒸留した。蒸留時の受器は試料採取に用いた 100 mL メスフラスコとし、標線の近傍まで留液を採取した。この 100 mL メスフラスコを 20 °C の恒温槽中に静置した後、同様に 20 °C の恒温槽中に静置した純水を標線まで加えた。

(3) GC 及び振動式密度計による測定

2.3.1.1 (3)-(6) 及び 2.3.1.2 に準じてアルコール分を定量した。ただし、GC 分析法(b)の測定用検液に関しては、(2)で得た留液を約 2 g 量り採り、内標準溶液を 10 mL 加えて調製した。

2.3.3 GC 分析法(a)のキャリヤガスを窒素に変更した場合の検証

2.3.3.1 メソッドの作成

GC 分析法(a)の一部条件を次のように変更したメソッドを作成し、GC 分析法(c)とした。

キャリヤガス：窒素

カラム流量：0.75 mL/min

カラム温度：40 °C (4 min) - (10 °C /min) - 210 °C

2.3.3.2 認証標準物質のエチルアルコールを使用した検証

認証標準物質のエチルアルコールを 0.5 mL 又は 1 mL ホールビペットで正確に量り採り、それぞれ 100 mL メスフラスコへ移し入れ、重量を記録した。次に、純水で 100 mL に定容後、再度全体の重量を記録して水溶液中のエチルアルコールの重量百分率を求めた。この水溶液に対し、2.3.1.1 (3), (4) 及び 2.3.1.2 (2) の GC 分析法(a) の内容に準じて GC 分析法(c) による定量を行い、エチルアルコールの重量百分率及び回収率を求めた。その際、検量線用のエチルアルコール水溶液の測定密度を国際アルコール表により重量百分率に換算し、検量線を作成した。また、測定は 1 検液あたり 10 回繰り返し行い、平均値を求めた。

2.3.3.3 ノニジュースから調製した模擬試料の測定

2.3.1.1 (1) 及び (2) で調製したノニジュースの模擬試料及びその蒸留留液に対し、2.3.1.1 (3), (4) 及び 2.3.1.2 (2) の GC 分析法(a) の内容に準じて GC 分析法(c) による測定を行い、アルコール分及びエチルアルコールの回収率を求めた。

2.3.4 直接蒸留液中の成分の定性

2.3.4.1 GC-MS による定性

100 mL の分液漏斗に、模擬試料の直接蒸留液 25 mL を入れ、クロロホルムを 25 mL 加えてよく攪拌した後、クロロホルム層を回収した。この抽出は 2 度行い、得られたクロロホルム層を全て混ぜ合わせた。回収したクロロホルム層をロータリーエバポレーターでおよそ 10 分の 1 量程度になるまで減圧濃縮し、2 mL 容スクリューバイアルに移して GC-MS による分析を行った。

2.3.4.2 ノニジュースの直接蒸留液に対するGCによる定性

酪酸, n-カプロン酸及びn-カプリル酸をそれぞれ 10 μ L 量り取り, エチルアルコールで全量を約 1 mL とした。この溶液とノニジュースの直接蒸留液を, 以下のようにカラム温度を変更したGC分析法(c)で測定し, クロマトグラムを比較した。

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C (4 min) - (10 $^{\circ}$ C /min) - 250 $^{\circ}$ C (3 min)

3. 結果及び考察

3.1 振動式密度計法及びGC分析法の比較

3.1.1 ノニジュース以外の試料による検証

(1) 試料中のアルコール分の定量

2.1.1 に示したノニジュース以外の各試料に対し, GC分析法(a)及び(b)の測定を行った結果, 得られたクロマトグラムを Fig.1 及び2 に示す。りんごジュース, ぶどうミックスジュース及びピーチネクターでは, エチルアルコールが確認され, それ以外の成分のピークは非常に微弱であった。一方で, Fig.3 に Fig.1 の一部を拡大したクロマトグラムを示すが, クランベリーミックスジュース及びトマトジュースではエチルアルコールのピークも微弱であるか存在しなかつたため, エチルアルコールを含有しないものとして扱うこととした。それ以外の試料のアルコール分の定量結果を Table 1 に示す。りんごジュース, ぶどうミックスジュース及びピーチネクターでは, 0.1 %弱のアルコール分が確認された。

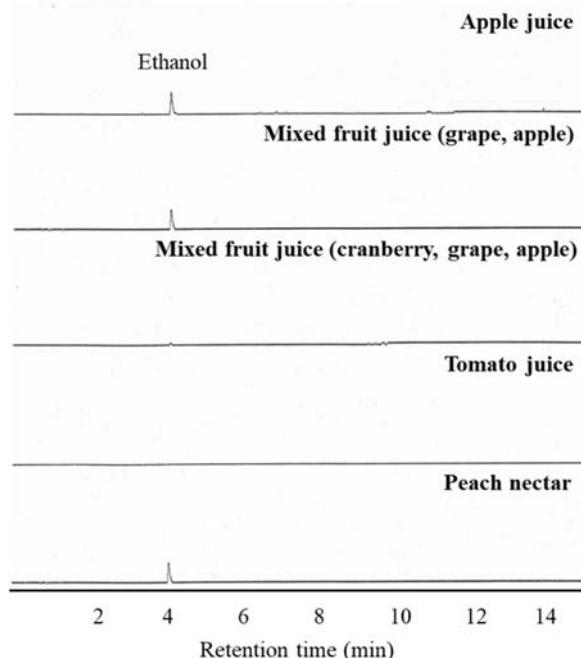


Fig.1 Chromatograms of distilled beverages by GC analytical method (a).

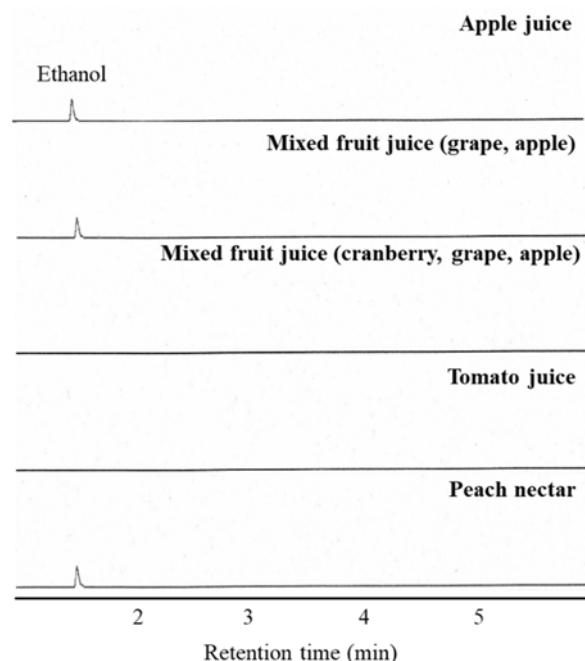


Fig.2 Chromatograms of distilled beverages by GC analytical method (b).

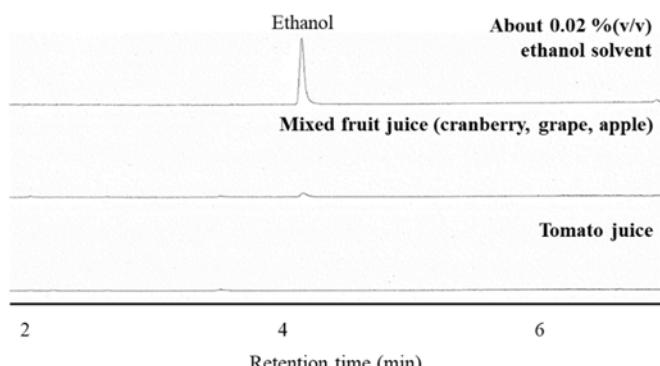


Fig.3 Enlarged chromatograms of distilled mixed fruit juice (cranberry, grape, apple) and tomato juice by GC analytical method (a).

Table 1 Results of quantitative analysis of three beverages (measured 5 times).

Sample	Analytical method	Alcoholic strength (%(v/v))	RSD (%)
Apple juice	GC analytical method (a)	0.076	0.177
	GC analytical method (b)	0.086	0.312
	Densitometer method	0.078	4.192
Mixed fruit juice (grape, apple)	GC analytical method (a)	0.068	0.350
	GC analytical method (b)	0.079	1.487
	Densitometer method	0.063	-
Peach nectar	GC analytical method (a)	0.077	0.193
	GC analytical method (b)	0.090	1.811
	Densitometer method	0.076	-

(2) 模擬試料の測定

ノニジュース以外の模擬試料の GC 分析法(a), (b)及び振動式密度計法によるアルコール分の定量結果を Table 2 に示す。GC 分析法(a)において、蒸留をせずに測定した場合、蒸留した場合よりも定量値が高くなる傾向があり、特にピーチネクターでは顕著に高い値が得られた。一方で、直接蒸留又は水蒸気蒸留を実施してから測定すると、回収率は概ね 98-102 % 程度であり、GC 分析法(b)に近い定量値が得られた。この結果は、蒸留せずに測定すると誤差が生じる可能性がある、ということを示唆する。そのような誤差の原因として考えられるのは、飲料によって異なるエキス分等の存在である。今回使用した試料は、エキス分による粘性や固

形物等の影響で均質なサンプリングが妨げられることが多いあり、そこで誤差が生じた可能性がある。また、GC に注入した際、マトリックス効果により、標準エチルアルコール水溶液よりも検出感度が高くなってしまい、クロマトグラムに影響した可能性もある。特に今回の検証は低濃度領域であったため、これらの要因が結果に与える影響は大きいことが推測される。いずれにしても、蒸留を行うことで解決するため、GC による低濃度のアルコール分の正確な定量には蒸留が必要であると考える。

振動式密度計法に関しては、クランベリーミックスジュースで振動式密度計法のアルコール分及び回収率が顕著に低くなる等、GC 分析法よりも精度が良好ではなかった。

Table 2 Comparison of GC analytical method (a), (b) and a mechanical oscillator densitometer method by measuring the content of ethanol in the five simulated samples (measured 5 times).

Sample	Analytical method	Pretreatment	2.5 mL Ethanol / 500 mL Sample			5.0 mL Ethanol / 500 mL Sample		
			Alcoholic strength (%(v/v))	RSD (%)	Recovery rate (%)	Alcoholic strength (%(v/v))	RSD (%)	Recovery rate (%)
Apple juice	GC analytical method (a)	None	0.587	0.361	102.3	1.092	0.461	101.7
		Direct distillation	0.579	0.173	100.7	1.065	0.413	99.0
		Steam distillation	0.574	0.335	99.7	1.059	0.587	98.4
	GC analytical method (b)	Direct distillation	0.585	0.499	99.9	1.081	0.342	99.6
		Steam distillation	0.584	0.737	99.6	1.081	0.192	99.6
	Densitometer method	Direct distillation	0.586	-	101.6	1.070	-	99.2
		Steam distillation	0.572	-	98.8	1.063	-	98.5
Mixed fruit juice (grape, apple)	GC analytical method (a)	None	0.580	0.883	102.4	1.068	0.742	100.0
		Direct distillation	0.565	1.051	99.4	1.052	0.417	98.4
		Steam distillation	0.560	0.511	98.4	1.049	0.773	98.1
	GC analytical method (b)	Direct distillation	0.575	0.300	99.3	1.063	1.155	98.5
		Steam distillation	0.569	0.635	98.1	1.061	0.622	98.3
	Densitometer method	Direct distillation	0.558	-	99.0	1.056	-	99.3
		Steam distillation	0.558	-	99.0	1.049	-	98.6
Mixed fruit juice (cranberry, grape, apple)	GC analytical method (a)	None	0.512	1.719	102.4	1.006	0.295	100.6
		Direct distillation	0.493	0.664	98.6	0.992	0.271	99.2
		Steam distillation	0.497	0.262	99.4	0.994	0.485	99.4
	GC analytical method (b)	Direct distillation	0.493	1.568	98.7	0.993	1.161	99.4
		Steam distillation	0.494	1.240	98.8	0.999	0.394	99.9
	Densitometer method	Direct distillation	0.473	0.662	94.6	0.973	0.322	97.4
		Steam distillation	0.474	-	94.8	0.979	-	97.9
Tomato juice	GC analytical method (a)	None	0.499	0.538	99.8	1.007	0.272	100.7
		Direct distillation	0.492	0.947	98.4	0.994	0.430	99.4
		Steam distillation	0.489	0.860	97.8	0.987	0.402	98.7
	GC analytical method (b)	Direct distillation	0.498	0.632	99.7	0.993	0.637	99.3
		Steam distillation	0.492	0.583	98.5	0.992	0.474	99.2
	Densitometer method	Direct distillation	0.488	-	97.6	0.986	-	98.6
		Steam distillation	0.480	0.653	96.0	0.979	-	97.9
Peach nectar	GC analytical method (a)	None	0.605	1.217	105.7	1.127	0.535	105.1
		Direct distillation	0.583	0.395	101.3	1.078	0.527	100.2
		Steam distillation	0.583	0.260	101.3	1.072	0.709	99.6
	GC analytical method (b)	Direct distillation	0.578	0.747	97.6	1.082	1.649	99.2
		Steam distillation	0.575	0.965	97.1	1.074	1.103	98.4
	Densitometer method	Direct distillation	0.572	-	99.2	1.063	-	98.7
		Steam distillation	0.572	-	99.2	1.063	-	98.7

3.1.2 ノニジュースによる検証

(1) ノニジュース中のアルコール分の定量

ノニジュースに対し、GC分析法(a)及び(b)の測定を行った結果、得られたクロマトグラムをFig.4に示す。Fig.1及び2と比較して、多数のピークが確認された。また、GC分析法(a)では、分離の良いクロマトグラムが得られたのに対し、(b)では全体的にピーク形状が悪化し、エチルアルコールのピークが他の成分のピークと重複する等、分離も悪化している。前述のとおり微極性カラムを使用して極性物質を分析していることが原因と考えられる。アルコール分の定量結果を示したTable 3を見ると、GC分析法(b)の定量値はGC分析法(a)よりも0.05%程度高くなつた。最適でないカラムを使用したことで、エチルアルコールのピーク面積が過大に求められた結果、定量値が高くなつたと推測される。

Table 3より、振動式密度計法では、GC分析法(a)よりも0.05%程度高い値が得られた。Fig.4より、直接蒸留後でもエチルアルコ

ール以外の成分が豊富であることは明らかであり、密度を直接アルコール分に換算した値の信頼性は低いものと考えられる。

以上の考察より、ノニジュースの定量には、GC分析法(a)が最適であると考えられる。

(2) 模擬試料の測定

Table 4にノニジュースから調製した模擬試料のGC分析法(a),(b)及び振動式密度計法によるアルコール分の定量結果を示す。回収率の計算に使用するエチルアルコール未添加のノニジュースのアルコール分に関しては、(1)より、GC分析法(a)以外の定量値が過大である可能性が高いと考えられたため、GC分析法(a)の定量値を用いた。振動式密度計法の定量値は(1)と同様にGC分析法よりも0.05%程度高くなつた。一方で、GC分析法(a)と(b)の値は近似した。(1)よりもエチルアルコールのピーク面積が大きくなつた結果、他のピークの重複の影響が小さくなつた可能性が考えられる。

Table 3 Results of quantitative analysis of noni juice (measured 5 times).

Analytical method	Pretreatment	Alcoholic strength (%(v/v))	RSD (%)
	None	0.392	0.223
GC analytical method (a)	Direct distillation	0.392	0.114
	Steam distillation	0.391	0.256
GC analytical method (b)	Direct distillation	0.436	1.857
	Steam distillation	0.447	0.299
Densitometer method	Direct distillation	0.436	-
	Steam distillation	0.454	-

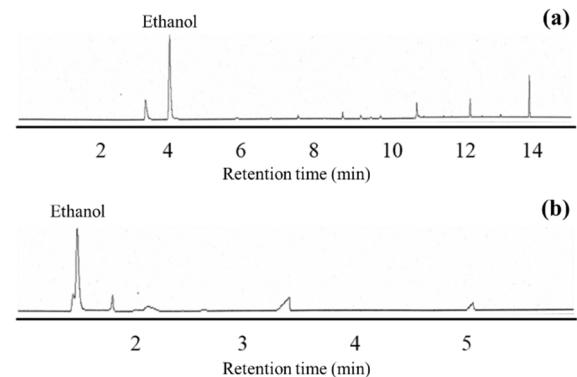


Fig.4 Chromatograms of distilled noni juice by GC analytical method (a) and (b).

Table 4 Comparison of GC analytical method (a), (b) and a mechanical oscillator densitometer method by measuring the content of ethanol in simulated samples made from noni juice (measured 5 times).

Analytical method	Pretreatment	2.5 mL Ethanol / 500 mL Sample			5.0 mL Ethanol / 500 mL Sample		
		Alcoholic Strength (%(v/v))	RSD (%)	Recovery rate (%)	Alcoholic Strength (%(v/v))	RSD (%)	Recovery rate (%)
GC analytical method (a)	None	0.893	0.123	100.2	1.386	0.232	99.4
	Direct distillation	0.902	0.099	102.0	1.400	0.163	100.8
	Steam distillation	0.898	0.100	101.4	1.405	0.071	101.4
GC analytical method (b)	Direct distillation	0.896	0.848	100.8	1.361	0.297	99.5
	Steam distillation	0.908	0.620	103.2	1.399	0.205	100.9
Densitometer method	Direct distillation	0.937	-	109.1	1.400	-	100.9
	Steam distillation	0.944	-	110.5	1.442	-	105.1

3.2 蒸留方法の比較

トマトジュース及びピーチネクターから調製した模擬試料に対し、国税法の直接蒸留、現行法の直接蒸留及び水蒸気蒸留を行ってGC分析法(a), (b)及び振動式密度計法による測定を実施した結果をTable 5に示す。蒸留方法の違いによる定量値の差異はほぼ見られず、3つの手法で近似した値が得られた。また、実験操作に関して、現行法では最終的な水量が多いため、焦げ付きにくくなると考えられたが、実際は国税法と違いを感じられなかった。例えば、ピーチネクターの直接蒸留は、いずれの手法でも加熱温度に注意しなければ焦げ付いた。蒸留時間に関しては、焦げ付きに注意して実施したところ、いずれも40分弱要し、大きな差はなかった。水蒸気蒸留では、どの飲料であっても焦げ付くことはなく、1回当たり15分弱で蒸留可能であったが、水蒸気発生装置が利用可能になるまで1時間程度要した。以上のことから、蒸留の手法に関しては飲料の性状に合わせていずれか最適なものを選択すべきであると考える。直接蒸留は、焦げ付きの可能性がない場合は、国税法と現行法を等しく利用できるが、焦げ付きの可能性がある場合、水蒸気蒸留を活用すべきである。

3.3 キャリヤーガスを窒素に変更した場合の検証

キャリヤーガスを窒素に変更するにあたり、カラム効率に関する理論段高さを考慮すると、ヘリウムの場合よりもカラム流量を抑える必要があった。そのため、今回は、ヘリウムと同等の理論段高さとなるように、カラム流量を1.25 mL/minから0.75 mL/minに変更した。また、昇温速度を遅くすることで、クロマトグラムが類似した形になるように調節し、GC分析法(c)とした。

エチルアルコールと1-ブチルアルコールの混合液と、ノニジュースの直接蒸留液をGC分析法(a)及び(c)により測定し、得られたクロマトグラムをFig.5及び6に示す。分析時間がヘリウム使用時と比較して6分程度長くなるものの、GC分析法(a)と(c)は類似した分離パターンとなった。

GC分析法(c)を用いて、希釈した認証標準物質のエチルアルコールを測定した結果をTable 6に示す。認証値が重量百分率で示されていたため、それに合わせて測定値も重量百分率で求めた。その結果、回収率は99%程度となり、良好な結果が得られた。更に、ノニジュースから調製した模擬試料のGC分析法(c)による測定結果をTable 7に示すが、こちらも良好な回収率を示し、Table 4のヘリウムの定量値ともほぼ差がなかった。

以上より、キャリヤーガスを窒素に変更した場合でも、ヘリウムと同等の良好な分析が可能であると考えられる。

Table 5 Comparison of distillation methods by measuring simulated samples (measured 5 times).

Sample	Analytical method	Pretreatment	25 mL Ethanol / 500 mL Sample			50 mL Ethanol / 500 mL Sample		
			Alcoholic strength (%(v/v))	RSD (%)	Recovery rate (%)	Alcoholic strength (%(v/v))	RSD (%)	Recovery rate (%)
Tomato juice	GC analytical method (a)	Direct distillation (NTA method*)	5.005	0.068	100.1	9.893	0.135	99.0
		Direct distillation (current method)	4.961	0.066	99.3	9.883	0.155	98.9
		Steam distillation	4.977	0.117	99.6	9.887	0.085	98.9
	GC analytical method (b)	Direct distillation (NTA method)	4.935	0.269	98.7	9.879	0.098	98.8
		Direct distillation (current method)	4.980	0.409	99.6	9.868	0.150	98.7
		Steam distillation	4.953	0.366	99.1	9.854	0.086	98.6
	Densitometer method	Direct distillation (NTA method)	4.998	0.140	100.0	9.903	-	99.1
		Direct distillation (current method)	5.005	-	100.1	9.894	-	99.0
		Steam distillation	4.998	-	100.0	9.894	-	99.0
Peach nectar	GC analytical method (a)	Direct distillation (NTA method)	5.058	0.091	99.6	10.017	0.091	99.4
		Direct distillation (current method)	5.026	0.111	99.0	9.916	0.156	98.4
		Steam distillation	5.029	0.072	99.1	9.940	0.067	98.7
	GC analytical method (b)	Direct distillation (NTA method)	5.155	0.757	101.3	10.127	0.317	100.4
		Direct distillation (current method)	5.183	0.904	101.9	10.020	0.915	99.3
		Steam distillation	5.159	0.353	101.4	10.018	0.697	99.3
	Densitometer method	Direct distillation (NTA method)	5.019	-	98.9	9.935	0.044	98.6
		Direct distillation (current method)	5.029	0.076	99.1	9.986	-	99.1
		Steam distillation	5.019	-	98.9	9.946	-	98.7

* NTA method means the method prescribed by the National Tax Agency.

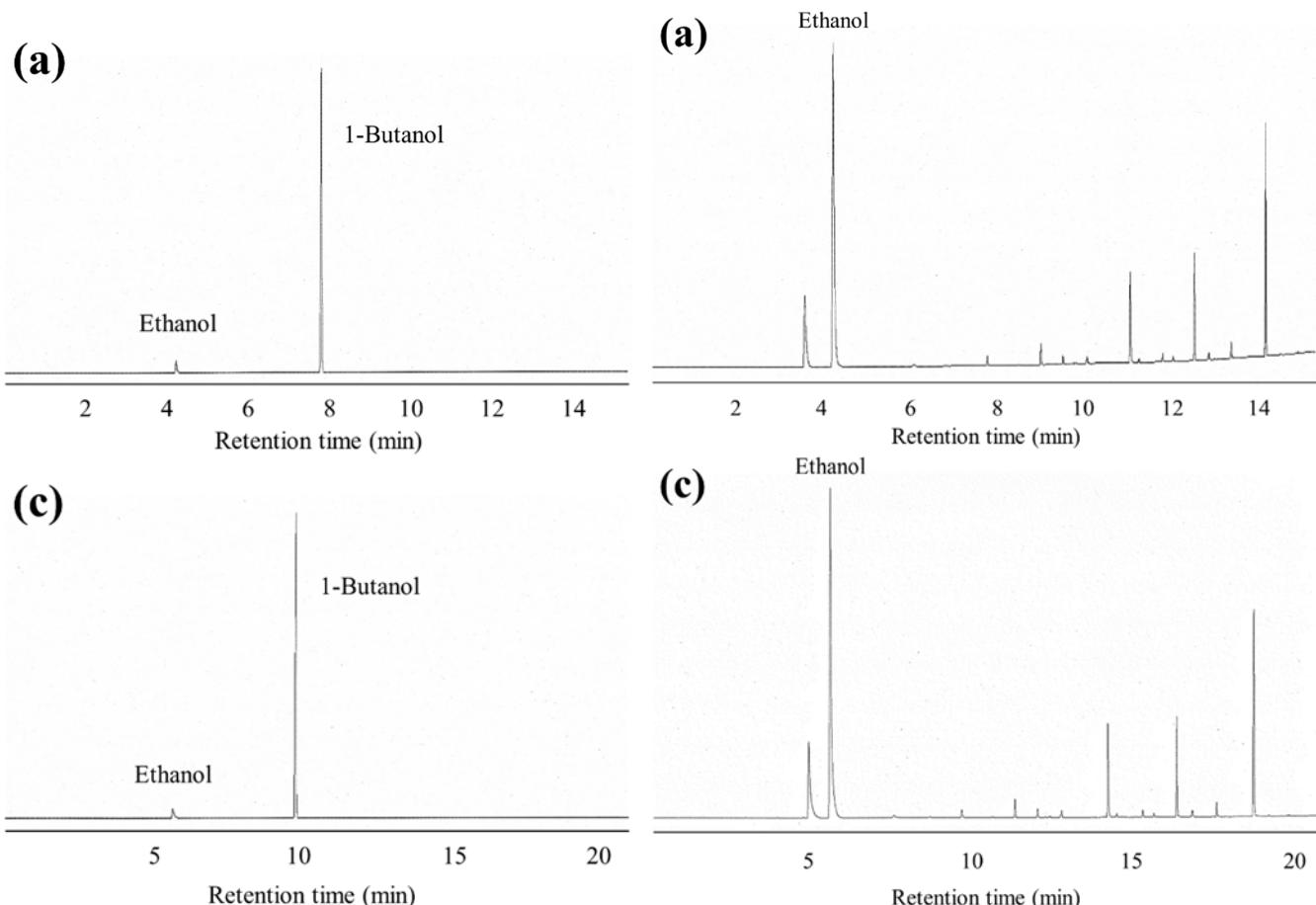


Fig.5 Chromatograms of ethanol and 1-butanol by GC analytical method (a) and (c).

Fig.6 Chromatograms of direct distilled noni juice by GC analytical method (a) and (c).

Table 6 Results of quantitative analysis of ethanol (National Metrology Institute of Japan Certified Reference Material) solution (measured 10 times).

Prepared sample (%w/w)	Quantitative value (%w/w)	RSD (%)	Recovery rate (%)
0.388	0.384	0.123	99.0
0.777	0.771	0.143	99.2

Table 7 Results of GC analytical method (c) by measuring the content of ethyl alcohol in simulated samples made from noni juice.

Pretreatment	2.5 mL Ethanol / 500 mL Sample			5.0 mL Ethanol / 500 mL Sample		
	Alcoholic Strength (%v/v)	RSD (%)	Recovery rate (%)	Alcoholic Strength (%v/v)	RSD (%)	Recovery rate (%)
None	0.900	0.253	101.6	1.387	0.302	99.5
Direct distillation	0.898	0.061	101.2	1.395	0.082	100.3
Steam distillation	0.895	0.326	100.6	1.392	0.180	100.0

3.4 直接蒸留液中の成分

各模擬試料の直接蒸留液のクロロホルム抽出分を GC-MS で測定し、得られた全イオン電流クロマトグラムを Fig.7 に、そこから同定した成分の一覧を Table 8 に示す。主に、脂肪酸、アルコール、アルデヒド及びエステル類といった揮発性の高い成分が確認された。ノニジュース以外の結果を見ると、ぶどうミックスジュースではアントラニル酸メチル、ピーチネクターではラクトン類等、原料である果実に特徴的な香気成分¹¹⁾が複数見られた。また、クランベリーミックスジュース及びトマトジュース等では、フルフラールやベンジルアルコール等の比重が 1 よりも大きい成分が複数検出された。そのような成分が含まれていると、振動式密度計法ではアルコール分が低く算出される恐れがある。クランベリーミックスジュース及びトマトジュースのアルコール分の定量結果を Table 3 より確認すると、現行法と比較して、前者は 0.02%，後者は 0.01% 程度振動式密度計法による定量値が低く、比重が 1

を超える揮発性成分が誤差の原因となっているものと考えられる。

ノニジュースでは、他の飲料よりも多数の成分が検出され、多くは果実中に含有することが知られているものであった¹²⁾。その中で、特に注目すべきは酪酸、カプロン酸及びカプリル酸の存在である。これらは比重が 1 よりも小さいため、振動式密度計法でアルコール分が高く求められる原因となる。また、Fig.8 に、250 °C まで昇温し、通常の測定時にはポストランで除かれていたピークも含めて測定した GC 分析法(c)のクロマトグラムを示すが、酪酸、カプロン酸及びカプリル酸の試薬と同じ保持時間のピークが明確に現れており、3 種の脂肪酸は直接蒸留液中に比較的多く含まれているものと考えられる。したがって、他の飲料と異なり、振動式密度計法によるアルコール分の定量値が GC 分析法よりも高くなったのは、脂肪酸の影響を強く受けたためと考えられる。

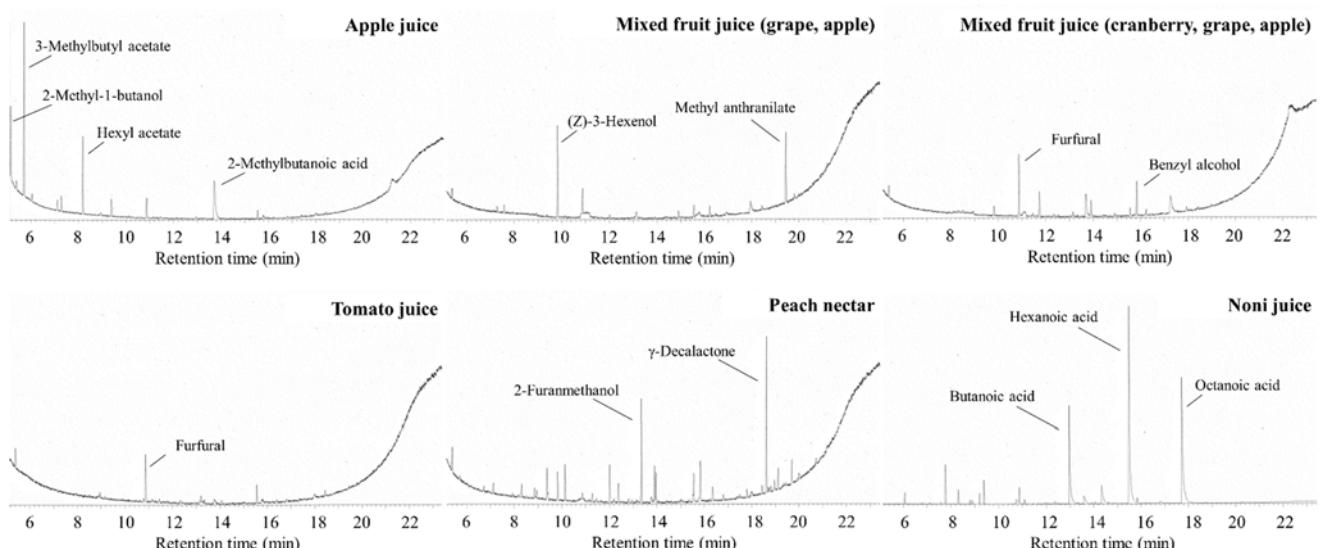


Fig.7 Total ion current chromatograms of direct distilled beverages.

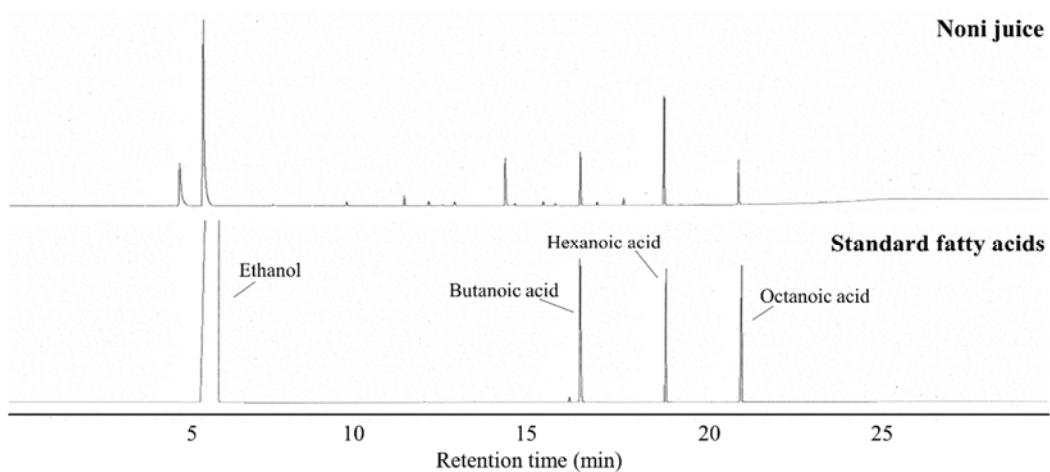


Fig.8 Chromatograms of noni juice by GC analytical method (c) (up to 250 °C).

Table 8 The identified components of direct distilled beverages measured by GC-MS.

Sample	Identified components	
Apple juice	Acids	Esters
	· 2-Methylbutanoic acid	· 3-Methylbutyl acetate
	Alcohols	· Hexyl acetate
	· 2-Methyl-1-propanol	· Butoxyethoxyethyl acetate
	· 3-Methyl-1-butanol	
	Aldehydes	
	· 1-Hexenal	
	· 2-Hexenal	
	· Furfural	
Mixed fruit juice (grape, apple)	Alcohols	Esters
	· (Z)-3-Hexenol	· Ethyl hexanoate
	· Phenylethanol	· Butoxyethoxyethyl acetate
	Aldehydes	· Methyl anthranilate
Mixed fruit juice (cranberry, grape, apple)	· 3-Furaldehyde	· Methyl methanthranilate
	Acids	Aldehydes
	· 2-Methylbutanoic acid	· Benzaldehyde
	Alcohols	· Furfural
	· (Z)-3-Hexenol	· 5-Methyl-2-furfural
	· 3-Cyclohexene-1-methanol	Esters
	· Benzyl alcohol	· Diethyl carbonate
	· 2-Phenylethanol	· Butoxyethoxyethyl acetate
		· Methyl 3-phenyl-2-propenoate
Tomato juice	Aldehydes	Esters
	· Furfural	· Butoxyethoxyethyl acetate
Peach nectar	· Benzeneacetaldehyde	· Diisobutyl hexadionate
	Acids	Esters
	· 3-Methylbutanoic acid	· Diethyl carbonate
	Alcohols	· cis-3-Hexenyl acetate
	· 1-Hexenol	· Diethyl maronate
	· 2-Hexenol	· Diisobutyl hexanedioate
	· (Z)-3-Hexenol	· Butoxyethoxyethyl acetate
	· 2-Ethyl-1-hexanol	Ketones
	· Linalool	· 3-Hydroxy-2-butanone
	· α -Terpineol	· 2-Methyl-5-(1-methylethyl)-cyclohexanone
	· 2-Furanmethanol	Lactones
	· Geranyl alcohol	· γ -Hexanolactone
	· Benzyl alcohol	· γ -Decalactone
	· 1-Heptadecanol	· δ -Undecalactone
		· γ -Undecalactone
Noni juice	Acids	Aldehydes
	· Methyl octanoic acid	· 2-Fufural
	· Acetic acid	Esters
	· Propanoic acid	· Methyl hexanoate
	· 2-Methyl-propanoic acid	· Ethyl hexanoate
	· Butanoic acid	· Diethyl carbonate
	· Pentanoic acid	· Ethyl pentanoate
	· Hexanoic acid	· Ethyl lactate
	· Heptanoic acid	· Ethyl octanoate
	· Octanoic acid	· Ethyl 3-hydroxybutyrate
	Alcohols	· Ethyl 3-hydroxyoctanoate
	· 1-Butanol	Ketones
	· 2-Methyl-1-buthanol	· 2-Heptanone
	· 2-Pentanol	· 3-Hydroxy-2-butanone
	· 3-Methyl-3-buten-1-ol	Phenols
	· 1-Hexanol	· Phenol
	· 2-Furanmethanol	· 4-Methylphenol
	· Epoxylinalool	· Eugenol
	· Benzyl alcohol	Others
	· Phenylethanol	· 2-Acetyl furan
	· Linalool oxide	

4. 要 約

本報では、第2報に引き続き、飲料中のエチルアルコールの定量分析法として、国税法を参考とした第1報のGC分析法及び振動式密度計法が税関分析で活用できるか、市販飲料から調製した模擬試料を測定することにより検証した。加えて、同一の模擬試料に対し、国税法の直接蒸留、現行法の直接蒸留及び水蒸気蒸留を行い、アルコール分を定量することで、蒸留方法の違いが定量結果に与える影響について検証した。さらに、これまでGCのキャリヤーガスはヘリウムしてきたが、窒素に変更した場合でも飲料中のアルコール分が定量可能であるかについても検証した。

GC分析法は、現行法でも第1報に基づく方法であっても、直接蒸留あるいは水蒸気蒸留を実施してから測定することで、良好な結果が得られた。ただし、ノニジュースの測定を行う場合、現行法ではエチルアルコールのピークが単離できないという欠点があった。これはカラムの極性が原因と考えられることから、現行法のカラムは変更することが望ましい。

直接蒸留方法の違いによる定量値の差異はほぼ認められず、水蒸気蒸留後の定量値とも近似した。したがって、蒸留方法につい

ては、サンプルの性状に合わせて選択することが望ましい。国税法と現行法の直接蒸留は焦げ付かなければ等しく活用できるが、焦げ付きやすい場合には、水蒸気蒸留を選択すべきである。

第1報に基づくGC分析法は、キャリヤーガスを窒素に変更することも可能であり、今後ヘリウムが入手困難になった場合にも対応できると考えられる。

振動式密度計法では、飲料によって定量値が低くなる場合もあれば高くなる場合もあった。直接蒸留液のGC-MSによる定性結果より、このような結果となる原因が飲料由来の高揮発性成分によるものと推測された。比重が1よりも大きい高揮発性成分が含まれていると定量値が低くなり、1よりも小さい成分が含まれていると定量値が高くなるものと考えられる。特に、エチルアルコールが低濃度であると、蒸留で得られた留液中に存在する他の成分の影響が大きくなる可能性がある。GC分析法と比べて測定が迅速かつ簡便であるという利点があるため、スクリーニングを目的として実施することは可能だと考えられる。

結論として、飲料を直接蒸留又は水蒸気蒸留し、第1報に基づくGC分析法による測定を実施することで、現行法よりも良好なアルコール分の定量が可能であると考えられる。

文 献

- 1) 本間直子、川井英雄、細貝祐太郎：食品衛生学雑誌、**26**, 674-678 (1985).
- 2) 高橋邦彦、星野庸二、徳丸雅一：食品衛生学雑誌、**33**, 619-622 (1992).
- 3) (社) 日本分析化学会ガスクロマトグラフィー研究懇談会：“キャビラリーガスクロマトグラフィー -基礎と応用-”，P.21 (2004), (朝倉書店) .
- 4) 坂東健太郎、藤原健逸、徳島将光、五十嵐智大、松本啓嗣：関税中央分析所報、**60**, 57-60 (2020).
- 5) 川島宏、朝蔭博之、井上博、田中利雄、中村欽一、池田瑛：日本醸造協会雑誌、**55**, 614-610 (1960).
- 6) 川島宏、朝蔭博之、井上博、田中利雄、中村欽一、池田瑛：日本醸造協会雑誌、**55**, 734-731 (1960).
- 7) 川島宏、朝蔭博之、井上博、田中利雄、中村欽一、池田瑛：日本醸造協会雑誌、**56**, 86-84 (1961).
- 8) 渡辺惣汰、松本健志、八木潤、野口大、松本啓嗣：関税中央分析所報、**61**, 45-53 (2021).
- 9) 国税庁：国税庁所定分析法（令和2年6月24日付け一部改正）.
- 10) 國際法定計量機関（OIML）：国際アルコール表（1975）.
- 11) 社団法人 全国清涼飲料工業会、財団法人 日本炭酸飲料検査協会：“改定新版・ソフトドリンクス”，P.113-118 (1989), (光琳) .
- 12) Alison D. Pawlus, A. Douglas Kingborn : *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **59**, 1587-1609 (2007).