

## 技術論文

電位差滴定に基づく醸造酢の酸度測定法の  
室間共同試験による妥当性確認橋本 佳子<sup>®1</sup>, 忠田 吉弘<sup>1,3</sup>, 鈴木 忠直<sup>1,2</sup>, 安井 明美<sup>2</sup>

日本農林規格（JAS 規格）の見直しに係る醸造酢の酸度の測定方法の検討を行い、次いで、検討した方法の妥当性確認のため室間共同試験を実施した。JAS 分析法ではフェノールフタレインを指示薬とした水酸化ナトリウム溶液による滴定法を規定しているが、醸造酢の種類によってはフェノールフタレインでの終点が判断しづらい場合があるため、試料の採取方法等も含めて pH 計及び電位差滴定装置を用いた方法を検討した。pH 計と電位差滴定装置の比較試験では、醸造酢 8 試料を用い各 5 点併行で測定した。その結果、F 検定では有意差が認められなかったが、t 検定では有意差が認められる試料があった。しかしながら、その試料の平均値の差は酸度で 0.01～0.03% であり、JAS 規格検査の分析には問題はないと判断されることから 14 試験所で 6 種類の試料を用いて共同試験を実施した。なお、pH 計を用いた試験所は 9 箇所、電位差滴定装置を用いた試験所は 5 箇所とした。その結果、併行相対標準偏差（RSD<sub>r</sub>%）は 0.10～0.17% となり、室間再現相対標準偏差（RSD<sub>R</sub>%）は 0.32～0.48% となった。また、HorRat は 0.11～0.15 となり、電位差滴定に基づく醸造酢の酸度測定法の妥当性が確認された。

## 1 緒 言

農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律<sup>1)</sup>（JAS 法）において、食品等の品質の改善、生産の合理化、取引の単純公正化及び使用又は消費の合理化を図り、もって公共の福祉の増進に寄与することを目的として日本農林規格（JAS 規格）が定められている。平成 19 年 7 月現在、72 品目 220 規格が定められ、そのうち飲食物品及び油脂については 39 品目 169 規格が定められている。JAS 規格は、平成 12 年度から社会情勢の変化、国際規格の動向を考慮することとなり、少なくとも 5 年に一度は規格見直しを行うこととなった。更に、平成 17 年度から始まった 2 巡目の見直しにおいては、規格基準値の分析法について、技術の進歩に対応した新たな分析法の検討及び分析法の妥当性確認等を行う方針となった。

通常、分析法の妥当性確認には、① 試験室間の共同試験、② 標準物質の利用、③ 標準添加回収試験の実施、④ 公定法あるいは標準的方法を用いて得られた結果との比較、⑤ 合成試料の利用等の方法があり、そのうち一つあるいは幾つかの組み合わせにより行う<sup>2)</sup>。JAS 規格に規

定されている分析法（JAS 分析法）は規格適合性の判断のためのものであることから、分析法の性能特性の一つである室間再現精度を求める必要がある。そのため、特に新規の分析法の場合、試験室間の共同試験により妥当性確認試験を行わなければならない。

平成 20 年度までの見直しの対象となっている品目に醸造酢があり、その規格項目に酸度、全窒素分及び無塩可溶性固形分等が定められている<sup>3)</sup>。そのうち酸度の測定方法は、指示薬にフェノールフタレインを用いた滴定を採用しているが、器具、試薬及び手順の詳細が記載されていない。また、例えば原料由来の色を帯びている果実酢の場合、終点の判断に熟練を要することがあり、従来の測定方法を改良する必要がある。一方、現在では酸・塩基滴定には迅速な電位差滴定装置による自動滴定法<sup>4)</sup>もある。

したがって、醸造酢の酸度測定の見直しは、従来の滴定法を改良するとともに、新たに自動滴定法を検討し、次いで室間共同試験により妥当性確認試験を行うことを目的とした。なお、一般的な試験室間の共同試験の考え方等は食品総合研究所ホームページ<sup>5)</sup>を参考にした。

## 2 実 験

## 2.1 試 薬

水は日本工業規格（JIS 規格）で規定されている A3<sup>6)</sup>に準拠しているもの（純水製造装置 Elix, MILLIPORE 製）を用いた。0.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液には滴定用溶

<sup>1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター：330-9731 埼玉県さいたま市中央区新都心 2-1

<sup>2</sup> 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所：305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

<sup>3</sup> 現在所属 農林水産省：100-8950 東京都千代田区霞が関 1-2-1

液(和光純薬製又は関東化学製)を用い、pH標準液には中性リン酸塩pH標準液及びホウ酸塩pH標準液(和光純薬製)を用いた。また、アミド硫酸には容量分析用標準物質(関東化学製)を用いた。0.1%プロモチモールブルー溶液及び1.0%フェノールフタレイン溶液は滴定用(和光純薬製)を用いた。

水は15分間煮沸し、空気を遮断した状態で室温にして用いた。0.5 mol/L水酸化ナトリウム溶液はアミド硫酸を用い標定<sup>7)</sup>した。

## 2.2 器具及び装置

ビーカー(容量: 200 mL)及び三角フラスコ(容量: 200 mL)にはJIS規格に規定されているもの<sup>8)</sup>を用いた。自動ビュレット(容量: 25 mL)、全量ピペット(容量: 3, 10, 25 mL)、全量フラスコ(容量: 250 mL)及びメスシリンダー(容量: 100 mL)にはJIS規格に規定されているクラスA<sup>9)</sup>のものを用いた。電子てんびんにはAX504(最小表示0.1 mg, メトラ・トレド製)を用いた。pH計にはF-22(HORIBA製)を用いた。電位差滴定装置にはAT510(付属ビュレット20 mL, 京都電子工業製)を用いた。

## 2.3 検討用試料

東京近郊で販売されている醸造酢を購入した。

この論文での醸造酢の名称はJAS規格の定義<sup>3)</sup>に基づいており、「米酢」及び「米黒酢」以外の穀物酢を「穀物酢」とし、「りんご酢」及び「ぶどう酢」以外の果実酢を「果実酢」とし、穀物酢及び果実酢以外の醸造酢を「醸造酢」としている。ただし、これらの醸造酢の中で希釈して使用するものは「高酸度酢」としている。

## 2.4 測定方法

200 mLビーカーに水100 mLと攪拌子かくはんを入れた後、試料10 mLを全量ピペットで加えた(試験液)。酸度の高い試料にあつては、滴定量が10~20 mLとなるように試料を採取した。pH計を用いた場合は、25 mLビュレットを用い0.5 mol/L水酸化ナトリウム溶液で滴定し、pH 8.2 ± 0.3の範囲に30秒以上入ったところを終点とした(手滴定法)。電位差滴定装置を用いた場合は、終点をpH 8.2に設定し、0.5 mol/L水酸化ナトリウム溶液で滴定した(自動滴定法)。なお、滴定時にかき混ぜることにより発生する渦の深さは、試験液の液面から8 ± 1 mmとした。また、滴定は試料採取後30分以内に行うこととした。空試験は、水100 mLのみを用い試験液と同様の操作を行った。滴定量は小数第2位まで記録した。

酸度は、試料中に含まれる有機酸等を酢酸含量として下記の計算式により算出した。

$$\text{酸度 (\%)} = \{(T - B) \times f \times 3.00 \times 10^{-2}\} / S \times 100$$

$T$ : 試料における0.5 mol/L水酸化ナトリウム溶液の滴定量(mL),  $B$ : 空試験における滴定量(mL),  $f$ : 0.5 mol/L水酸化ナトリウム溶液のファクター,  $3.00 \times 10^{-2}$ : 0.5 mol/L水酸化ナトリウム溶液1 mLに相当する酢酸の質量(g),  $S$ : 試料採取量(mL)。

## 3 共同試験

### 3.1 共同試験材料(マテリアル)

共同試験には、次の試料をマテリアルとして用いた。マテリアル1: りんご酢, マテリアル2: 米酢, マテリアル3: 穀物酢, マテリアル4: 米黒酢, マテリアル5: ぶどう酢, マテリアル6: 高酸度酢。

マテリアル1~5は、東京近郊で販売されている醸造酢を購入した。マテリアル6は(株)ミツカンから提供していただいた。

### 3.2 マテリアルの準備と均一性確認試験

試料をよく振り混ぜ、マテリアル1~5は13~14 mLずつ、マテリアル6は4 mLずつ、それぞれ50瓶に小分けし、栓をしてパラフィルムを巻いた。試料名及び酸度を非明示とし、マテリアル1から6まで重複のないランダムな番号を付した。マテリアルの均一性はIUPACの技能試験プロトコルの均一性試験<sup>10)</sup>に基づき行った。小分けした各マテリアル50瓶の中から、それぞれランダムに10瓶ずつ取り出し、各瓶から2回採取し自動滴定法で測定した。なお、マテリアル1~5は1瓶につき5 mLずつ採取し、マテリアル6は1瓶につき1.5 mLずつ採取した。均一性試験結果はコ克蘭検定で外れ値を除いた後、均一性判定式により統計量を算出し判定基準と比較した。

### 3.3 共同試験の実施及び評価

試験室間の共同試験はIUPACの共同試験プロトコル<sup>11)</sup>に基づき、(独)農林水産消費技術センター(現在: (独)農林水産消費安全技術センター)分析調査課(事務局)で作成した実施要領(報告期限、実施期間等を記載)及び測定手順書に従い14試験所で実施した。そのうち9試験所は手滴定法、他の5試験所は自動滴定法により実施した。各試験所には1~6のマテリアルを各2瓶ずつ配付した。また、マテリアル1~5は1瓶につき10 mL、マテリアル6は1瓶につき3 mL採取するように指示した。

各試験所の共同試験結果をコ克蘭検定、シングルグループ検定、ペアグループ検定の順に外れ値検定を行った後、併行相対標準偏差(RSD<sub>r</sub>%)、室間再現相対標準偏差(RSD<sub>R</sub>%)等を求めた。また、RSD<sub>R</sub>%と予測RSD<sub>R</sub>(修正Horwitz式<sup>12)</sup>を使用)からHorRatを算出した。

Table 1 Effects of standing period from sampling to titration and time of addition of water on determination of total acid ( $n = 4$ )

Sample	Control	Condition 1	Condition 2	Condition 3	Condition 4
	Mean $\pm$ SD, %				
Grain vinegar	4.3030 $\pm$ 0.0040	4.2662 $\pm$ 0.0030	4.209 $\pm$ 0.012	4.2977 $\pm$ 0.0050	4.2910 $\pm$ 0.0040
Cider vinegar	5.0857 $\pm$ 0.0012	5.0497 $\pm$ 0.0029	5.0257 $\pm$ 0.0072	5.0782 $\pm$ 0.0064	5.0707 $\pm$ 0.0029

Condition 1: Stood for 30 minutes after sampling. Then titrated after addition of water.

Condition 2: Stood for 60 minutes after sampling. Then titrated after addition of water.

Condition 3: Added water after sampling. Then titrated after standing for 30 minutes.

Condition 4: Added water after sampling. Then titrated after standing for 60 minutes.

## 4 結果及び考察

### 4.1 測定方法の検討

**4.1.1 試料採取量** ビュレットは、通常、精度面及び実用性から容量 25 mL のものが用いられている。また、電位差滴定装置に付属したビュレットユニットには一般的に容量 20 mL のものが用いられている。したがって、本法では手滴定法のビュレット容量を 25 mL とし、自動滴定法のビュレットユニットを 20 mL とした。

滴定用溶液の濃度は、実用面から市販されているファクターが既知の 0.1, 0.5, 1 mol/L から選択することにし、試料採取量は、滴定量が 10~20 mL になるように決定した。滴定量の下限値はビュレットの精度の面から、上限値はビュレットユニットの容量から決定した。

JAS規格値を確実に網羅する酸度範囲 (3.5~5.0%) で、滴定量が 10~20 mL の範囲に収まるのは、水酸化ナトリウム溶液の濃度と試料採取量の組み合わせが、0.1 mol/L と 2 mL 及び 0.5 mol/L と 10 mL の 2 通りであり、滴定量は 12~17 mL であった。しかし、0.1 mol/L では高酸度酢における滴定量がビュレット容量を超過するため、水酸化ナトリウム溶液の濃度は 0.5 mol/L とした。それに伴い採取量を 10 mL とし、高酸度酢においては滴定量が 10~20 mL となるように採取量を選択することとし、今回用いた高酸度酢 (酸度: 15%) の採取量は 3 mL に設定した。

**4.1.2 空気中の二酸化炭素の影響** 本法では滴定の際、マグネチックスターラーを用い試験液をかき混ぜるが、かき混ぜる速さを統一しないと、空気中の二酸化炭素の影響で測定値がばらつく可能性がある。マグネチックスターラーの装置本体の目盛による統一では機種によりかき混ぜる速さが異なるため、かき混ぜる際に生じる渦の深さに定めることにし、その深さを  $8 \pm 1$  mm とした。

**4.1.3 試料採取の方法** 醸造酢の酸性物質には揮発性成分が含まれている。そのため、試料採取から滴定までに時間を要した場合、酸度が低くなると考えられ、試料採取から滴定までの方法及び経過時間による影響を明確にする必要がある。したがって、試料採取から滴定までの経過時間及び水の添加時期を次の 5 つに分類し、比較実験を行

った。試料には穀物酢とりんご酢の 2 種類を用い各 4 点併行で行った。

- ① 試料採取直後に水を加え速やかに滴定する (コントロール)。
- ② 試料採取後、30 分間放置した後に水を加え滴定する。
- ③ 試料採取後、60 分間放置した後に水を加え滴定する。
- ④ 試料採取後、速やかに水を加え、30 分間放置し滴定する。
- ⑤ 試料採取後、速やかに水を加え、60 分間放置し滴定する。

その結果を Table 1 に示す。試料採取後 30 分間放置した後、水を加えたものは、コントロールより 0.04% 低い値となった。また、試料採取後 60 分間放置した後、水を加えたものはコントロールより 0.06~0.09% 低い値となった。一方、採取後に速やかに水を加え 30 分間放置したものはコントロールより 0.01% 低い値となった。また、採取後に速やかに水を加え 60 分間放置したものはコントロールより 0.01~0.02% 低い値となった。以上のように水を加えずに試料を採取した場合、時間が経過するほど酸度への影響が顕著となった。よって、揮発による測定値への影響を低くするため、容器に水を入れた後に試料を加えることとし、更に採取後 30 分以内に滴定することとした。

**4.1.4 滴定方法の比較** JAS規格及び AOAC ではフェノールフタレイン溶液を用いた滴定が規定されており<sup>3)13)</sup>、試験液が薄紅色 (pH 8.2)<sup>14)</sup>に着色する付近を終点としている。しかし、米黒酢等のように色が濃いものや、りんご酢やぶどう酢等のように滴定の際の pH の変化により試料自体が変色するものは、正確な終点の色の判別に熟練を要することがある。そのため、終点の判断には、試料の色に左右されることのない pH を指標として採用することとし、装置としては pH 計又は電位差滴定装置を用いることとした。その際、JAS規格や AOAC の測定方法<sup>3)13)</sup>との終点検知の違いによる差が生じないように、終点 pH をフェノールフタレインが薄紅色となる pH 8.2<sup>14)</sup>とした。

醸造酢 2 試料, 穀物酢 1 試料, 米黒酢 1 試料, りんご酢 2 試料, ぶどう酢 2 試料を用い, pH 計による手滴定法と電位差滴定装置による自動滴定法によりそれぞれ 5 点併

Table 2 Comparison of titration with pH meter and potentiometric titrator ( $n = 5$ )

Sample	Titration with pH meter	Potentiometric titration	F-test (two-sided)	t-test (two-sided)
	Mean $\pm$ SD, %	Mean $\pm$ SD, %	$p$ -value	$p$ -value
Vinegar	6.312 $\pm$ 0.015	6.3037 $\pm$ 0.0075	0.23	0.34
	4.6932 $\pm$ 0.0049	4.7074 $\pm$ 0.0061	0.68	$7.1 \times 10^{-3}$
Grain vinegar	4.3008 $\pm$ 0.0031	4.2750 $\pm$ 0.0067	0.16	$1.1 \times 10^{-4}$
Komekuro-zu	4.467 $\pm$ 0.015	4.4764 $\pm$ 0.0050	0.058	0.28
Cider vinegar	5.0751 $\pm$ 0.0036	5.0683 $\pm$ 0.0046	0.65	0.048
	3.4998 $\pm$ 0.0031	3.4899 $\pm$ 0.0033	0.87	$2.5 \times 10^{-3}$
Wine vinegar	5.0762 $\pm$ 0.0038	5.0598 $\pm$ 0.0032	0.76	$1.8 \times 10^{-4}$
	5.1420 $\pm$ 0.0050	5.1119 $\pm$ 0.0021	0.12	$4.1 \times 10^{-6}$

Significant differences:  $p < 0.05$ 

行で測定し比較検討した。その結果 (Table 2), F検定 (両側, 有意水準5%) では有意差は認められなかったが, t検定 (両側, 有意水準5%) では6試料で有意差が認められ, それぞれの平均値の差は0.01~0.03%となった。しかし, 酸度のJAS規格値は小数第1位までとなっているため, それぞれの差は規格値に影響しないと判断し, 両法とも同じ共同試験で妥当性を確認することにした。

**4.1.5 指示薬添加による影響** 試料によっては終点付近でpHが急激に変動するため, 未知試料を手滴定法で測定する際には, 慎重な操作が求められ, 時間を要する。そこで, 試験液にフェノールフタレイン指示薬を加えて, 終点判断の目安となるか調べた。指示薬を入れ過ぎると, 試験液のpHが変化する可能性があるため, 添加量は2~3滴とした。通常の醸造酢の場合には, フェノールフタレインの添加が終点判断の目安となることが明らかであったため, 今回, 滴定時に試験液の変色が特に顕著であったりんご酢とぶどう酢にも適用可能か, 試験液に指示薬を加えて滴定した。

あるりんご酢の場合, 水酸化ナトリウム溶液の滴下ごとに試験液が徐々に黄色に変色するため, pH 8.2付近では指示薬の薄紅色と混ざり, この試料独自の終点の判別が必要となった。また, あるぶどう酢の場合には赤紫色から薄こげ茶色 (約pH 7), 黄黒色 (約pH 8) と試験液が変色していくため, りんご酢と同様にこの試料独自の終点判別が必要であった。しかしながら, 水酸化ナトリウム溶液の滴下直後における指示薬の変色度合いは終点判断の目安となり, 滴定操作の迅速化につながると考えられた。

次にフェノールフタレイン指示薬を添加することにより, 結果に影響を及ぼすか調べるため, 試験液のみと試験液に指示薬2滴を加えたものを自動滴定法で測定した。試料はりんご酢及びぶどう酢を用い各5点併行で行った。その結果, F検定 (両側, 有意水準5%) では, それぞれ  $p$  値が0.092, 0.46となり, 有意差は認められなかった。t検定 (両側, 有意水準5%) においては, それぞれ  $p$  値

が0.52, 0.061となり有意差は認められなかった。以上のことから, 滴定の際にフェノールフタレイン指示薬を加えてもよいこととした。

#### 4.2 共同試験

**4.2.1 マテリアルの選択** JAS規格の酸度規格値は醸造酢で4.0%以上, 穀物酢で4.2%以上, 果実酢で4.5%以上と定められている<sup>3)</sup>。したがって, マテリアルには酸度4.0%以下のもの, 4.0~4.5%のもの, 4.5%以上のものを含めることにした。また, その種類としては穀物酢, 米黒酢, 米酢, りんご酢, ぶどう酢を用いることにした。

マテリアルとする試料の選択は市販品の調査により決定した。市販されている醸造酢39試料を自動滴定法により2点併行で測定した結果, 38試料が3.5~5.1%の範囲に入った (Table 3)。したがって, マテリアル1~5については上述した5種類を含み, かつJAS規格値を担保し市販品もほぼ網羅する酸度範囲となるように, その市販品の中から試料 (Table 3のNo. 5, 6, 28, 35, 38) を選択し, これらを再度購入してマテリアルとした。更に, 業務用として高酸度酢があることから, マテリアルに高酸度酢 (マテリアル6) を加えた。

**4.2.2 試料の安定性** 共同試験中に試料の酸度が変化することが考えられるため, 一定期間保存後, 酸度が変化するか調べた。試料には穀物酢とりんご酢を用い, 開栓後ポリプロピレン製広口瓶に入れ, 栓をした後パラフィルムを巻いて冷蔵で3か月間保存した。開栓直後の試料と3か月経過した試料を自動滴定法により5点併行で測定した結果, 穀物酢は開栓直後で  $4.2750 \pm 0.0075\%$ , 3か月経過で  $4.293 \pm 0.018\%$  となった。有意差検定を行った結果, F検定 (両側, 有意水準5%) では  $p$  値は0.11となり, t検定 (両側, 有意水準5%) では  $p$  値は0.082となり有意差は認められなかった。

一方, りんご酢では開栓直後で  $5.0683 \pm 0.0051\%$ , 3か月経過で  $5.084 \pm 0.021\%$  となった。有意差検定を行った

Table 3 Total acid of commercially available vinegars ( $n = 2$ )

No.	Item	Standard	Total acid, %	
1	Vinegar	—	3.84	
2		—	4.68	
3		—	4.69	
4		—	6.30	
5	Grain vinegar	JAS	4.27	
6	Rice vinegar	—	4.01	
7		—	4.26	
8		Organic JAS	4.45	
9		JAS	4.54	
10		JAS	4.55	
11		JAS	4.58	
12		Organic JAS	4.64	
13		—	4.69	
14		Komekuro-zu	Organic JAS	4.24
15			—	4.31
16			JAS	4.31
17			JAS	4.32
18			JAS	4.34
19	—		4.41	
20	Organic JAS		4.42	
21	—		4.42	
22	JAS		4.48	
23	—		4.49	
24	—		4.54	
25	JAS		4.55	
26	JAS		4.56	
27	—		4.56	
28	Organic JAS		4.56	
29	—		4.57	
30	—		4.57	
31	—		4.62	
32	—		4.86	
33	JAS	5.08		
34	Fruit vinegar	—	3.58	
35	Cider vinegar	—	3.49	
36		—	4.60	
37		JAS	5.07	
38	Wine vinegar	JAS	5.06	
39		—	5.11	

—: Non-JAS or non-Organic JAS

結果, F 検定 (両側, 有意水準 5%) では  $p$  値は 0.019 となり, 有意差が認められた.  $t$  検定 (両側, 有意水準 5%) では  $p$  値は 0.17 となり有意差は認められなかった. りんご酢では, F 検定で有意差が認められたが, 標準偏差を確認すると 3 か月経過した試料においても 0.021% と非常に小さいため, 結果に影響を及ぼさない. よって, ふたをしてパラフィルムを巻き冷蔵保存を行えば, 3 か月程度までは酸度への影響を及ぼさないことを確認した. したがって, 共同試験は試料開栓後 3 か月以内に終了することにした.

**4・2・3 測定方法** 今回, 測定方法の標準化を一つの目的としているため, 共同試験を実施するに当たり, 測定

手順書を作成し, 試薬, 器具及び装置について一定の基準を設けた. 試薬は JIS 規格で規定されているもの, 又はそれと同等のものを用いること, ガラス製体積計においては JIS 規格で規定されているクラス A<sup>9)</sup>, 又はそれと同等以上の精度を有するものを用いること等とした. 更に, pH 計, 電位差滴定装置についても JIS 規格に適合するもの<sup>15)16)</sup>を用いることとした. 実際に各試験所で使用した装置は, 次のとおりである. pH 計は F-12, F-21, F-22, F-24 (HORIBA 製) のいずれかを用いた. 電位差滴定装置は, COM-1600 (平沼産業製), AT-400, AT-510 (京都電子工業製), AUT-301, AUT-501 (東亜ディーケーケー製) のいずれかを用いた.

**4・2・4 マテリアルの均一性評価** マテリアルの均一性試験の結果を Table 4 に示した. すべてのマテリアルにおいて, コ克蘭検定による外れ値は生じなかった. よってすべてのデータを用いて, IUPAC の技能試験プロトコル<sup>10)</sup>に従い均一性を評価した結果, すべてのマテリアルの均一性が確認された.

**4・2・5 共同試験結果** 各試験所から報告された共同試験結果を Table 5 に示した. 試験所 n については実施要領違反があったため, 試験所 1 のマテリアル 3, 5 と試験所 g のマテリアル 4 のデータについては手順書違反があったため, 外れ値検定を行う前にデータから除いた.

次にコ克蘭検定による外れ値検定を行ったところ, マテリアル 3 で試験所 a, マテリアル 5 で試験所 e, マテリアル 6 で試験所 g が外れ値となった. シングルグラフス及びペアグラフス検定による外れ値は生じなかった.

ただし, マテリアル 6 の高酸度酢については, 手順書で終点範囲を pH 8.2 ± 0.3 としているが, この範囲に入らなかったデータも用いた. これは高酸度酢の場合, 終点の前後での pH の変化が大きく, この範囲に入らない場合があったからである. したがって, 高酸度酢の場合のみ, 終点である pH 8.2 前後のデータでより終点に近い値を用いた.

**4・2・6 測定方法の精度評価** 外れ値を除いた報告データを基に統計解析を行った. その結果を Table 6 に示す. すべてのマテリアルの RSD<sub>r</sub>% は 0.10 ~ 0.17% となり, RSD<sub>R</sub>% は 0.32 ~ 0.48% となった. この結果により, JAS 規格値における小数第 1 位までの精度を担保できることが確認された. また, HorRat は 0.11 ~ 0.15 の範囲となり, Codex の基準では HorRat は 2 以内<sup>17)</sup>であることがよいとされていることから, 本法は室間共同試験により, 酸度 3.55 ~ 15.12% の範囲で妥当性が確認された.

## 5 ま と め

現行の JAS 規格の醸造酢の酸度測定法は, フェノールフタレインを指示薬とした手滴定が規定されている. この方法は, 色を呈している果実酢や米黒酢等の滴定の終点判断に熟練を要する場合がある. そこで, 今回, 終点判断を指

Table 4 Total acid of vinegars determined by proposed method in the homogeneity test for interlaboratory study

Sample No.	Material 1, %		Material 2, %		Material 3, %		Material 4, %		Material 5, %		Material 6, %	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1	3.54	3.55	4.01	4.01	4.25	4.24	4.40	4.41	5.04	5.05	15.13	15.08
2	3.54	3.54	4.02	4.02	4.24	4.25	4.39	4.40	5.02	5.03	15.11	15.08
3	3.54	3.54	4.01	4.01	4.25	4.25	4.40	4.40	5.04	5.02	15.15	15.10
4	3.54	3.55	4.00	4.02	4.24	4.24	4.40	4.41	5.03	5.03	15.13	15.11
5	3.54	3.54	4.02	4.01	4.26	4.25	4.40	4.41	5.03	5.03	15.10	15.12
6	3.54	3.54	4.02	4.02	4.25	4.25	4.40	4.40	5.03	5.03	15.11	15.12
7	3.54	3.53	4.03	4.04	4.25	4.24	4.41	4.40	5.03	5.02	15.12	15.13
8	3.54	3.54	4.02	4.03	4.24	4.25	4.41	4.40	5.03	5.03	15.12	15.13
9	3.55	3.55	4.02	4.03	4.25	4.25	4.41	4.40	5.03	5.02	15.12	15.15
10	3.54	3.54	4.01	4.01	4.25	4.25	4.42	4.41	5.03	5.02	15.12	15.13
Grand mean, %	3.54		4.02		4.25		4.40		5.03		15.12	
S <sub>r</sub>	4.8 × 10 <sup>-3</sup>		8.1 × 10 <sup>-3</sup>		4.5 × 10 <sup>-3</sup>		6.0 × 10 <sup>-3</sup>		6.8 × 10 <sup>-3</sup>		1.9 × 10 <sup>-2</sup>	
RSD <sub>r</sub> , %	0.13		0.20		0.11		0.14		0.14		0.13	
S <sup>2</sup> <sub>sam</sub>	5.9 × 10 <sup>-6</sup>		2.7 × 10 <sup>-5</sup>		5.7 × 10 <sup>-6</sup>		1.0 × 10 <sup>-6</sup>		2.3 × 10 <sup>-5</sup>		1.0 × 10 <sup>-4</sup>	
Critical value	4.7 × 10 <sup>-3</sup>		5.8 × 10 <sup>-3</sup>		6.3 × 10 <sup>-3</sup>		6.7 × 10 <sup>-3</sup>		8.4 × 10 <sup>-3</sup>		5.5 × 10 <sup>-2</sup>	

S<sup>2</sup><sub>sam</sub> : Between sample variance ; S<sup>2</sup><sub>sam</sub> < Critical value : The material is sufficiently homogeneous.

Table 5 Total acid of vinegars determined by proposed method in interlaboratory study

Laboratory	Material 1, %		Material 2, %		Material 3, %		Material 4, %		Material 5, %		Material 6, %	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
a	3.56	3.55	4.02	4.02	4.26 <sup>a)</sup>	4.34 <sup>a)</sup>	4.43	4.43	5.04	5.07	15.15	15.10
b	3.54	3.54	4.01	4.02	4.25	4.26	4.42	4.42	5.04	5.03	15.07	15.05
c	3.56	3.56	4.05	4.03	4.27	4.26	4.44	4.44	5.05	5.05	15.23	15.22
d	3.56	3.56	4.03	4.03	4.27	4.27	4.43	4.43	5.06	5.05	15.10	15.13
e	3.54	3.56	4.04	4.03	4.29	4.29	4.42	4.44	5.07 <sup>a)</sup>	5.37 <sup>a)</sup>	15.14	15.12
f	3.54	3.54	4.00	4.00	4.26	4.26	4.41	4.40	5.04	5.04	15.15	15.14
g	3.56	3.55	4.05	4.04	4.28	4.26	4.43 <sup>b)</sup>	4.44	5.05	5.06	15.24 <sup>a)</sup>	15.15 <sup>a)</sup>
h	3.54	3.54	4.02	4.02	4.26	4.26	4.43	4.43	5.04	5.04	15.11	15.12
i	3.54	3.54	4.02	4.00	4.25	4.25	4.41	4.43	5.02	5.00	15.09	15.07
j	3.53	3.53	4.01	4.01	4.24	4.23	4.41	4.40	5.02	5.02	15.08	15.08
k	3.55	3.55	4.02	4.02	4.24	4.26	4.42	4.42	5.04	5.03	15.09	15.10
l	3.57	3.56	4.04	4.04	4.31 <sup>b)</sup>	4.28	4.46	4.45	5.06 <sup>b)</sup>	5.06 <sup>b)</sup>	15.18	15.18
m	3.52	3.53	3.99	4.00	4.21	4.22	4.40	4.40	5.01	5.01	15.09	15.08
n	3.55 <sup>b)</sup>	3.71 <sup>b)</sup>	4.03 <sup>b)</sup>	4.02 <sup>b)</sup>	4.26 <sup>b)</sup>	4.27 <sup>b)</sup>	4.42 <sup>b)</sup>	4.42 <sup>b)</sup>	5.03 <sup>b)</sup>	5.07 <sup>b)</sup>	15.91 <sup>b)</sup>	15.18 <sup>b)</sup>

a) Cochran outlier ; b) Invalid data that were removed prior to statistical analysis.

Table 6 Results of interlaboratory study for determination of total acid of vinegars by proposed method

Material No.	No. of Lab (outlier)	Mean, %	S <sub>r</sub> <sup>a)</sup>	S <sub>R</sub> <sup>b)</sup>	RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> , %	RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> , %	2.8 × S <sub>r</sub> <sup>e)</sup>	2.8 × S <sub>R</sub> <sup>f)</sup>	Predicted RSD <sub>R</sub> , %	HorRat
1	13 (0)	3.547	0.0055	0.013	0.16	0.36	0.016	0.036	3.3	0.11
2	13 (0)	4.022	0.0068	0.016	0.17	0.41	0.019	0.046	3.2	0.13
3	11 (1)	4.256	0.0074	0.020	0.17	0.48	0.021	0.057	3.2	0.15
4	12 (0)	4.424	0.0068	0.016	0.15	0.37	0.019	0.046	3.2	0.12
5	11 (1)	5.037	0.0088	0.018	0.17	0.36	0.025	0.051	3.1	0.12
6	12 (1)	15.120	0.015	0.048	0.10	0.32	0.041	0.13	2.6	0.12

a) Repeatability standard deviation ; b) Reproducibility standard deviation ; c) Repeatability relative standard deviation ; d) Reproducibility relative standard deviation ; e) Repeatability tolerance ; f) Reproducibility tolerance ; HorRat = RSD<sub>R</sub>/Predicted RSD<sub>R</sub>

示薬の色から pH に変更する等の改良を行ったことにより, これらの測定が容易となった. また, 電位差滴定装置による自動滴定法により, 酸度測定を迅速に行えるようになった.

なお, 規格値付近の試料の場合には, 今回の室間共同試験により求めた測定精度を考慮して規格適合の可否を判断することが必要と考えられる.

本研究は農林水産省の平成 18 年度 JAS 規格等検査・分析手法妥当性確認事業の一環として実施しました. 共同試験による測定方法の設計及び結果の評価は, JAS 分析手法妥当性確認検討委員会で行いました. 検討委員として協力いただいた, 信州大学農学部応用生命科学科教授後藤哲久博士, (独)農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所食品分析研究領域品質情報解析ユニット主任研究員内藤成弘博士, (財)日本冷凍食品検査協会試験事業本部試験技術部上席専門役森曜子氏, (財)日本穀物検定協会連絡調整グループ長川瀬高明氏, (財)日本食品分析センターテクニカルサービス部 JAS 審査課長齋藤紀子氏, 昭和産業(株)生産センター糖質技術部長弥武経也氏に感謝します. また, 試料を提供していただいた(株)ミツカングループ本社, 共同試験にご協力いただいたタマノイ酢(株), マルカン酢(株), (株)ミツカングループ本社, (株)半田ミツカン, (株)ミツカンサンミ委託管理センター, (財)全国調味料・野菜飲料検査協会(東京検査所, 大阪検査所), (独)農林水産消費技術センター(本部, 小樽センター, 仙台センター, 横浜センター, 名古屋センター, 神戸センター, 岡山センター, 門司センター)の担当の皆様へ感謝します.

## 文 献

### 1) 農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法

- 律(昭和 25 年 5 月 11 日法律第 175 号, 最終改正平成 19 年 3 月 30 日法律第 8 号).
- 2) 安井明美: *The Chemical Times*, **191**, 13 (2004).
- 3) 醸造酢の日本農林規格(昭和 54 年 6 月 8 日農水告第 801 号, 最終改正平成 16 年 6 月 23 日農水告第 1215 号).
- 4) 菅原龍幸, 前川昭男監修: “新食品分析ハンドブック”, p. 240 (2000), (建帛社).
- 5) 内藤成弘: “分析法の妥当性確認に関するガイダンス”, <<http://www.nfri.affrc.go.jp/yakudachi/datosei/index.html>>.
- 6) JIS K 8008, 生化学試薬通則 (1992).
- 7) JIS K 8001, 試薬試験方法通則 (1998).
- 8) JIS R 3503, 化学分析用ガラス器具 (1994).
- 9) JIS R 3505, ガラス製体積計 (1994).
- 10) M. Thompson, S. L. R. Ellison, R. Wood: *Pure Appl. Chem.*, **78**, 145 (2006).
- 11) W. Horwitz: *Pure Appl. Chem.*, **67**, 331 (1995).
- 12) M. Thompson: *Analyst*, **125**, 385 (2000).
- 13) AOAC Official Method 930.35, Vinegars (1).
- 14) JIS K 8799, フェノールフタレイン(試薬) (1992).
- 15) JIS Z 8805, pH測定用ガラス電極 (1978).
- 16) JIS K 0113, 電位差・電流・電量・カールフィッシャー滴定方法通則 (2005).
- 17) Codex Alimentarius: “Recommendations for a checklist of information required to evaluate methods of analysis submitted to the Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling for endorsement”, Vol. 13, p. 129 (1994).

## Method Validation for Determination of Total Acid in Vinegar Based on Potentiometric Titration by Interlaboratory Study

Yoshiko HASHIMOTO<sup>1</sup>, Yoshihiro CHUDA<sup>1,3</sup>, Tadanao SUZUKI<sup>1,2</sup> and Akemi YASUI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, 2-1, Shintoshin, Chuo-ku, Saitama-shi, Saitama 330-9731

<sup>2</sup> National Food Research Institute, 2-1-12, Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8642

<sup>3</sup> Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 1-2-1, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8950

(Received 7 December 2007, Accepted 21 April 2008)

An interlaboratory study was performed to evaluate a method for determining total acid in Jozo-su (vinegar), for revision of the Japanese Agricultural Standard (JAS). Methods using titration with a pH meter or a potentiometric titrator were optimized based on the JAS analysis method. The optimum conditions were sampling a test portion after putting 100 mL of water into a 200 mL beaker, and titrating with 0.5 mol/L NaOH until pH 8.2, using a pH meter or a potentiometric titrator. Then, fourteen laboratories (pH meter, 9 labs; potentiometric titrator, 5 labs) participated and analyzed 6 test materials as blind duplicates with this method. After removing outliers statistically, the repeatability (RSD<sub>r</sub>) and the reproducibility (RSD<sub>R</sub>) of this method were 0.10~0.17% and 0.32~0.48%, respectively. HorRat (RSD<sub>R</sub>/predicted RSD<sub>R</sub>) for the reproducibility showed 0.11 to 0.15. This method was shown to have an acceptable precision by the present study.

**Keywords** : method validation ; interlaboratory study ; total acid ; vinegar ; potentiometric titration.