

報 文

サイクリックフローインジェクション法による
果実飲料及び清涼飲料水中の酸度の定量善木 道雄^{®1}, 片山 裕章¹, 横山 崇¹

果実飲料や清涼飲料水中の酸度の定量やモニタリングに、サイクリックフローインジェクション (FIA) 法を適用した。試薬キャリアー溶液は、 1.5×10^{-4} M キシレノールオレンジ (XO) と 12% のスクロースを含む 0.01 M リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) を用い、400 nm の XO の変色をモニターしてクエン酸濃度 (%、g/100 mL) として酸度を求めた。スクロースは、試薬キャリアー溶液と試料溶液間の屈折率の違いによる検出ピークの妨害を相殺するために添加し、これにより試料を希釈等の前処理をすることなく、直接システム内に注入し定量することができた。検量線は、クエン酸濃度 0~2.5% までの範囲で良好な直線性を示し、市販の果実飲料や清涼飲料水を分析した結果、公定法である中和滴定法との間によい一致が見られた。更に 50 回の連続定量や間欠的な繰り返し実験でも良好な結果が得られ、本法は酸度のモニタリング法としても有効なことが分かった。

1 緒 言

天然の果実飲料 (フルーツジュース) には、多くの有機酸が含まれている。また清涼飲料水 (ソフトドリンク) と呼ばれるものには、食品添加物として認可されている数種の有機酸が人工的に添加されている。有機酸類は独特の味や風味を与えるだけでなく、保存剤、酸化防止剤、pH 調整剤、安定 (相乗) 剤としての役割も果たしている。通常、果実飲料や清涼飲料水中の有機酸類含量を表す指標として酸度が用いられ、クエン酸がその有機酸の主成分を占めているので、無水クエン酸含有量 (%、g/100 mL) として表されている。したがって、果実飲料や清涼飲料水の製造現場では、製品の品質を確保するために日常的な酸度の定量やモニタリングが必要である。

公定法¹⁾では、果実飲料やソフトドリンクの酸度は、中和滴定法によって行われている。しかしながら、中和滴定法は操作がめんどうで長い分析時間を要するうえ測定値に個人差が生じやすい。更に試料及び試薬溶液の消費量が多く、多量の廃液を生じる欠点がある。フローインジェクション分析法 (FIA) は、1975 年に Ruzicka ら²⁾によって提案されて以来、あらゆる化学分析の分野で目覚ましい発展を遂げてきたが、滴定法の自動化にも極めて有効であることが示された³⁾。近年、果実飲料中の酸度の定量にも、FIA の適用が行われ、Grudpan ら⁴⁾は、電気伝導度法と吸光光度法を用いる二つの異なった検出方法で、果実飲料中

の酸度を定量する FIA を提案した。そして更にこれを発展させたシーケンシャルインジェクション法 (SIA) を報告している⁵⁾⁶⁾。また、小谷ら⁷⁾は、電流計測型のポータブル酸度計を開発し報告している。

著者らは、これまで試薬を循環して再利用するサイクリック FIA を提案し、沈殿、錯生成、酸化還元滴定へ応用できることを示した⁸⁾。また、メチルオレンジと酢酸塩緩衝液を試薬キャリアー溶液とする強酸・強塩基の定量⁹⁾、クエン酸 (酸度) の定量¹⁰⁾へも応用できることを示した。サイクリック FIA は、迅速、簡便、連続定量に適し、少量の廃液しか生じないクリーンな分析法である。今回、キシレノールオレンジ (XO) とリン酸塩緩衝液を試薬キャリアー溶液とするサイクリック FIA を果実飲料や清涼飲料水中の酸度の定量に応用した。一般に試料の希釈は余分な操作で煩雑な上、誤差の原因にもなる。したがって、本法では希釈せず直接試料を注入して酸度を定量する方法について検討した。その際試薬溶液と試料溶液の間の屈折率の相違に基づく妨害が大きな問題となるが、これは試料と合致したマトリックスの試薬溶液を循環させることで解決した。

2 実 験

2.1 装 置

試薬だめ、ポンプ、サンプルインジェクター、フローセル付き検出器、背圧コイルを直列に配置したシングルライン FIA 装置を組み立てた⁹⁾。背圧コイルの末端は元の試薬だめに接続して循環式 FIA システムを構築した。パリス

¹ 岡山理科大学理学部化学科 : 700-0005 岡山県岡山市理大町 1-1

タポンプは倉橋技研製 CRP-01, 可視分光光度検出器は相馬光学製 S-3250 (フローセル長 1 cm, 内容量 8 μ L), サンプルインジェクターは Rheodyne 製 9725 (サンプリング内容量 5 μ L), 記録計は日本電子科学製 U-228 を用いた. 各装置の接続には内径 0.5 mm のテフロンチューブを用いた.

2.2 試薬

キシレノールオレンジ (XO), リン酸二水素ナトリウム, リン酸一水素二ナトリウム, スクロース, クエン酸は和光純薬製特級を用いた.

試薬キャリアー溶液: 1.5×10^{-4} M XO と 12% (g/100 mL) スクロースを含む 0.01 M リン酸二水素ナトリウム-リン酸一水素二ナトリウム緩衝液 (pH 8.0). 通常の実験には 100 mL 調製した.

クエン酸標準溶液: 12% スクロースを添加した種々のクエン酸標準溶液を調製した.

果実飲料及び清涼飲料水: 市販品をメンブランフィルター (0.45 μ m, セルロースエステル) で汙過して固形物を除去後, 直ちに測定に用いた.

2.3 FIA 操作

XO, スクロース, リン酸塩緩衝液を含む試薬キャリアー溶液を, ポンプで 1.0 mL/min の流量で送液し, フローシステム内を循環させた. サンプルインジェクターから 5 μ L の試料を 2 分間に 1 試料の分析速度で注入し, 400 nm の吸光度を記録した. 12% スクロースを含有するクエン酸標準溶液を用いて, あらかじめ検量線を作成し酸度を求めた. フローセルを通過した溶液は, 5 m の背圧コイルを通過して試薬だめに戻し, 再び試薬キャリアー溶液として使用した.

2.4 中和滴定による酸度の定量

シュウ酸を標準物質として標定した 0.10 M 水酸化ナトリウム溶液を用いて, 目視法によりフェノールフタレインを指示薬として滴定を行った¹⁾.

3 結果と討論

3.1 緩衝液, pH 指示薬の選択

本法の定量原理¹¹⁾¹²⁾は, 緩衝液中に共存させた pH 指示薬の吸光度変化を測定するので, 緩衝液, pH 指示薬の選択は重要である. 公定法¹⁾との相関性を考慮して, 公定法がフェノールフタレイン終点を採用していることから, 弱アルカリ性緩衝液を検討しリン酸二水素ナトリウム-リン酸一水素二ナトリウム系を選び, pH は 8.0 に設定した. 緩衝液の濃度は, 感度と繰り返し定量回数に大きな影響を与える. 市販の果実飲料中の酸度がおよそ 1.5% 以内^{4)~7)}

であると考えられるので, 1.5% までのクエン酸が測定できるに十分な感度を持つように検討した結果, 緩衝液の濃度は 0.01 M に設定した. また, pH 指示薬はフェノールフタレインと同じ変色域を示し水溶性を持つものの中から, α -ナフトールフタレイン, チモールブルー, クレゾールレッド, ニュートラルレッド, XO の 5 種類を選び検討した. α -ナフトールフタレインは変色が不安定で, チモールブルー, クレゾールレッドは変色域が狭くバックグラウンドが大きいので検討から除外した. ニュートラルレッドは変色域も広くバックグラウンドも小さく良好な指示薬であるが, フローセルに吸着してベースラインが時間とともに低下する傾向があるので適当ではなかった. 検討した指示薬の中では, XO がこれらの欠点を持たず最適と判断されたので, 以後の実験ではこれを用いることとした. XO は鉛, 亜鉛, ランタニド金属イオン等の金属指示薬としてよく知られているが¹³⁾¹⁴⁾, 果実飲料や清涼飲料水中にはこれらの金属イオンは含まれていないので, 本法での使用は問題ないと考えられる. XO は多くの酸解離基を持ち, 本法では, 赤紫色 ($\lambda_{\max} = 580$ nm) から黄色 ($\lambda_{\max} = 400$ nm) の変色を利用している ($pK_{a7} = 6.40$, $pK_{a8} = 10.5$)¹³⁾¹⁴⁾. 極大吸収波長は 580 nm にあり吸光度変化も大きい, 試薬空試験値も大きい. 実際の測定には, 酸性度の増加とともに吸光度が増大する 400 nm の波長を測定波長に選んだ.

3.2 屈折率の影響除去

品質管理分析のようなルーチン分析においては, 試料はできるだけ前処理を行うことなく直接分析に供することが望ましい. しかしながら, 果実飲料中には固形物質が存在し, 汙過操作は省略することができない. したがって, 汙過後の試料を直接フロー系内へ注入する方法について検討した. 試薬溶液の流れの中へ果実飲料を注入すると, ベースラインの上下に大きなピークが観測され測定を妨害する. これは波長を変えて測定しても同じである. この原因は, 試薬溶液と試料との間の屈折率及び粘度の差異に基づく^{15)~17)}. 市販の果実飲料や清涼飲料水中には, そのラベル表示から 10~15% のスクロース (ショ糖) が含有 (添加) されている. 分光光度法を用いてこの含有範囲内で, XO の変色変化に及ぼすスクロースの添加の影響について調べた結果, 全く影響しないことが分かった. したがって, 屈折率の影響を除去するため, 試薬キャリアー溶液中へ果実飲料の平均的含有量のスクロース 12% を添加して, 試料溶液との間の屈折率の相違を相殺することにした. 本法は, 試薬キャリアー溶液を循環, 再利用するので, 高濃度のスクロース添加も問題にならず, その消費量も最低限に保つことができる. これもサイクリック FIA の長所のひとつである.

Table 1 Optimum conditions for the assay of acidity in fruit juices and soft drinks by cyclic FIA

Parameter	Optimal value
Reservoir volume	100 mL
Sucrose	12% (w/v)
Xylenol Orange	1.5×10^{-4} M
Phosphate buffer	0.01 M
pH	8.0
Sample volume	5 μ L
Sample frequency	30 h ⁻¹
Reaction coil length	65 cm
Backpressure coil length	5 m
Flow rate	1.0 mL min ⁻¹
Wavelength	400 nm

Table 2 Acidities of various fruit juices and soft drinks determined by cyclic FIA and titrimetry

Juice	Acidity, %	
	Cyclic FIA ^{a)}	Titrimetry ^{b)}
Apple	0.34 \pm 0.003	0.32
Orange	1.05 \pm 0.009	0.87
Grape fruit	0.97 \pm 0.003	1.15
Soft drink A	0.20 \pm 0.006	0.22
Soft drink B	0.23 \pm 0.004	0.22
Soft drink C	0.14 \pm 0.003	0.18
Soft drink D	0.10 \pm 0.003	0.15

a) Mean of five determinations; b) Mean of three determinations

Table 3 Recovery test of citric acid from fruit juices and soft drinks

Juice	Acidity, % (w/v)	Citric acid added, % (w/v)	Recovery, %
Apple	0.34	1.0	103.8
Grape fruit	0.97	1.0	99.0
Soft drink A	0.20	0.50	96.0
Soft drink B	0.23	0.50	96.1
Soft drink C	0.14	0.50	103.4

3.3 検量線

FIA の最適化を行って得られた結果を Table 1 に示す。この条件下で 12% スクロースを添加して調製したクエン酸標準溶液を用いて検量線を作成した結果、クエン酸含量 0~1.25% の範囲内で吸光度との間に良好な直線関係 $y = 0.4042x + 0.0108$ ($R = 0.9962$) が得られた。ここで、 y は吸光度、 x はクエン酸濃度 (%) である。また、0.25% のクエン酸標準溶液を連続 20 回注入して求めた相対標準偏差 (RSD) は 1.40% ($n = 20$) であった。

0.25% クエン酸標準溶液に、果実飲料中に共存すると推察される塩化ナトリウム、ソルビトール、L-アスコルビン酸、L-リンゴ酸、D-(L)乳酸を添加してその影響を調べた。塩化ナトリウムについては 1.2%、ソルビトールは 1.0% まで共存させてもピーク高は変動しなかったため、これらは本法を妨害しない。L-アスコルビン酸は 0.1% まで妨害が見られなかったが、リンゴ酸、乳酸は 0.05% 以上共存すると妨害する。しかしながら、これらの有機酸は酸度の中に加えられるものであり問題ないと考えられる。

3.4 市販の果実飲料及び清涼飲料水中の酸度の測定

市販の果実飲料 3 種及び清涼飲料水 4 種について、本法を適用して酸度を求め、同時に比較のため、公定法¹⁾の中和滴定法でも酸度を求めた。結果を Table 2 に示す。オレンジジュースでは、FIA 法で求めた値は公定法の値と比較すると約 21% 高い値が得られたが、これは試料の強い着色が原因と考えられる。その他の試料では両法の間によい

一致が見られた。

3.5 添加回収実験

市販の果実飲料 2 種、清涼飲料水 3 種についてクエン酸を添加し回収実験を行った。結果を Table 3 に示す。96.0~103.8% の範囲内で良好な回収率が得られた。

3.7 連続測定、モニタリング

品質管理分析では、正確な酸度の定量値を求めるより、決められた範囲内に酸度が保持されていることを確認する方法が現場では要求される。したがって、長時間の連続定量やモニタリングに適した方法でなければならない。市販のアップルジュースと清涼飲料水を 2 分間に 1 試料の分析速度で連続 50 回定量した結果を Fig. 1 に示す。測定回数に比例してかなりのベースラインの上昇が見られるが、初回と 50 回測定後のピーク高 (吸光度) の変動は見られず、定量に問題はないと考えられる。ベースラインの上昇は、試薬キャリアー溶液の調製量が 100 mL と少なく緩衝能が不足したためで、試薬調製量を増やせば上昇を抑えることができる。また、50 回連続定量の相対標準偏差は 1.50~1.76% であった。

Fig. 2 は、果実飲料 (3 種) と清涼飲料水 (3 種) 及びクエン酸標準溶液 (0.5%) を 3 回ずつ注入し、それを間欠的に 3 回繰り返した結果のフローシグナルである。試薬キャリアー溶液は 500 mL 調製した。ベースラインの上昇もほとんど見られず、繰り返し精度も良好で、品種の異なる

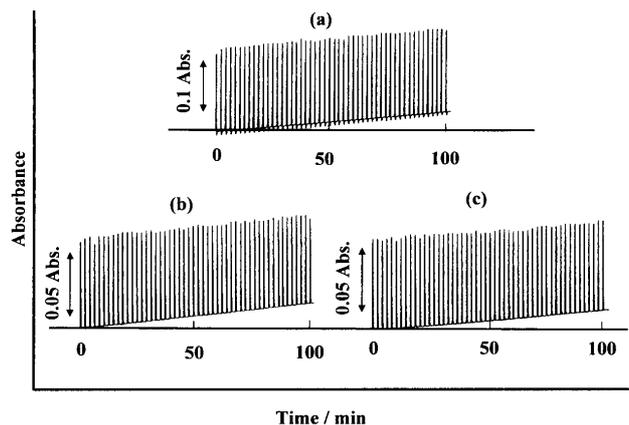


Fig. 1 Flow signals of apple juice and soft drinks for 50 consecutive determinations

(a) apple juice ; (b) soft drink A ; (c) soft drink B

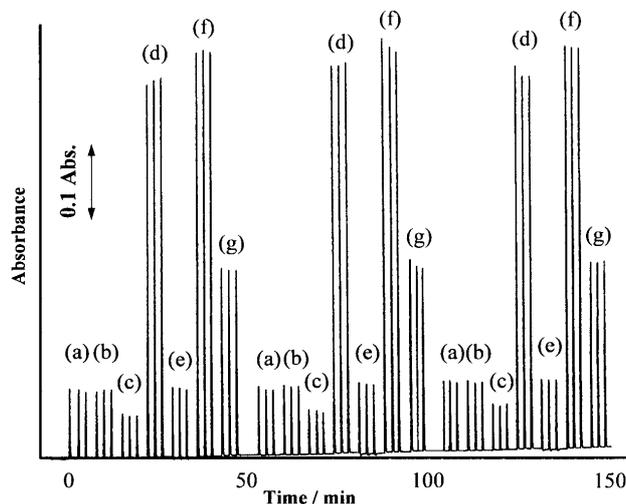


Fig. 2 Flow signals obtained by repeatable injections of fruit juices and soft drinks

(a) soft drink A ; (b) soft drink B ; (c) soft drink C ; (d) orange juice ; (e) apple juice ; (f) grape fruit juice ; (g) 0.5% (w/v) citric acid solution

る試料でも連続して測定できることを示している。試薬キャリアー溶液は、緩衝能が維持できれば1週間は連続使用が可能¹⁸⁾と考えられるが、かび発生の可能性もあり用事調製が必然と考えられる。

4 結 言

本法では、果実飲料、清涼飲料水中の酸度を測定するために、XOとスクロース及びリン酸緩衝液を試薬キャリアー溶液とする循環式FIAを構築することができた。最も単純な装置で迅速かつ効率的であり、試薬の消費量も排出される廃液量も少なく、特に、短時間に多数の試料を連続して自動分析できる点で、ルーチン分析として有用であると考えられる。

(2008年5月16日、第69回分)
析化学討論会において一部発表

文 献

- 1) 日本農林規格協会：“果実飲料の日本農林規格”，p. 22 (2006).
- 2) J. Ruzicka, E. H. Hansen：“Flow Injection Analysis”，2 ed., (1988), (John Wiley & Sons, New York).
- 3) 石橋信彦，今任稔彦：*J. Flow Injection Anal.*, **1**, 2 (1984).
- 4) K. Grudpan, P. Sritharathikhun, J. Jakmunee：*Anal. Chim. Acta*, **363**, 199 (1998).
- 5) J. Jakmunee, L. Pathimapornlert, S. K. Hartwell, K. Grudpan：*Analyst*, **130**, 299 (2005).
- 6) J. Jakmunee, T. Rujiralai, K. Grudpan：*Anal. Sci.*, **22**, 157 (2006).
- 7) 小谷 明，菊池郁美，永吉 力，井上正清，楠 文代：分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **57**, 199 (2008).
- 8) 善木道雄：分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **53**, 245 (2004).
- 9) 善木道雄，中北吉彦，小松愛可，横山 崇：分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **49**, 121 (2000).
- 10) M. Zenki, M. Kojima, T. Yokoyama：*J. Flow Injection Anal.*, **25**, 69 (2008).
- 11) T. Imato, N. Ishibashi：*Anal. Sci.*, **1**, 481 (1985).
- 12) N. Ishibashi, T. Imato：*Z. Anal. Chem.*, **323**, 244 (1986).
- 13) K. L. Cheng, K. Ueno, T. Imamura：“*Handbook of Organic analytical reagents*”，p. 231 (1982), (CRC Press, Boca Raton).
- 14) 小友 允：分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **21**, 436 (1972).
- 15) E. A. G. Zagatto, M. A. Z. Arruda, A. O. Jacintho, I. L. Mattos：*Anal. Chim. Acta*, **234**, 153 (1990).
- 16) T. Yamane, M. Saito：*Talanta*, **39**, 215 (1992).
- 17) 善木道雄，小谷正人，桐榮恭二：分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **41**, T23 (1992).
- 18) M. Zenki, K. Minamisawa, T. Yokoyama：*Talanta*, **68**, 281 (2005).

Determination of Acidity in Fruit Juices and Soft Drinks by Cyclic Flow Injection Analysis

Michio ZENKI¹, Hiroaki KATAYAMA¹ and Takashi YOKOYAMA¹

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Okayama University of Science, 1-1, Ridai-cho, Okayama-shi, Okayama 700-0005

(Received 20 June 2008, Accepted 20 August 2008)

A cyclic flow injection analysis is proposed for the determination of acidity (expressed as citric acid content) in fruit juices and soft drinks. The method is based on acid-base neutralization for detecting the color change of a pH indicator. A reagent carrier solution consisting of 1.5×10^{-4} M Xylenol Orange (XO) and 12% (w/v) sucrose in 0.01 M phosphate buffer (pH 8.0) was continuously circulated in a single-line cyclic flow system. Into the stream, a 5 μ L sample solution was injected, and the color change of XO was monitored spectrophotometrically at 400 nm. Sucrose is added to the reagent carrier solution in order to compensate both the differences in the refractive index and the viscosity between the carrier and the sample solutions, which make the sample injection direct without any dilution process. Several parameters were optimized, resulting in a simple, fast, effective and economical acidity monitor. The procedure has been applied to determine acidity in fruit juices and soft drinks.

Keywords : acidity ; cyclic FIA ; fruit juice ; soft drink ; repetitive determination ; monitoring.