

表 21. 高濃度 L-アスコルビン酸用検量線の測定値 (DTT 無添加)

L-アスコルビン酸濃度	初期値	終点値	差	平均
50ppm	7.93	7.46	0.47	0.48
	7.63	7.07	0.56	
	8.60	8.20	0.40	
100ppm	8.43	7.50	0.93	0.93
	8.18	7.31	0.87	
	8.03	7.05	0.98	
250ppm	8.02	6.01	2.01	2.08
	7.88	5.80	2.08	
	8.09	5.95	2.14	

高濃度アスコルビン酸検量線

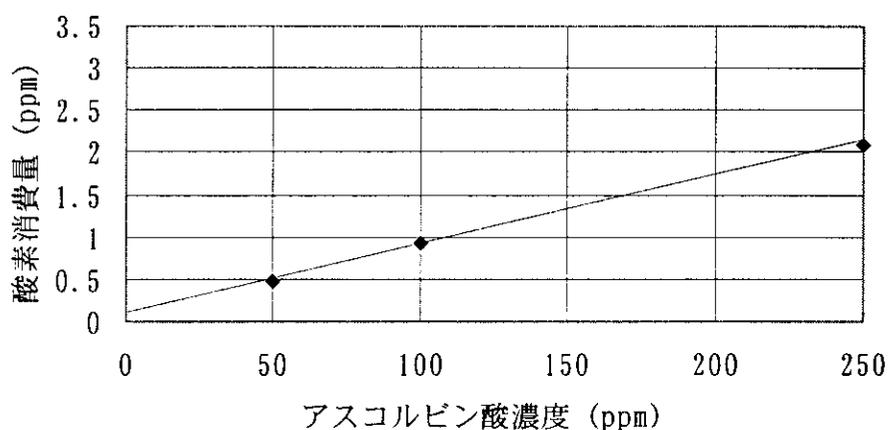


図 8. 高濃度アスコルビン酸の検量線  $Conc = 126.2x + -13.12$

#### 8.2.4.考察

低濃度 L-アスコルビン酸、高濃度 L-アスコルビン酸の DTT 添加、無添加とも直線性を示した。この検量線を、使用し換算の行うことにした。

## 9.アスコルビン酸添加実験

### 9.1.研究目的

市販のジュースにアスコルビン酸を添加し、改良酵素法の正確さを調べることを研究目的とした。

### 9.2.研究方法

#### 1)使用したジュース

- (1) ドールグレープジュース
- (2) くだもの好きの100%ジュース 洋なし
- (3) くだもの好きの100%ジュース 赤りんご 青りんご
- (4) スウィートオレンジ

#### 2)測定操作

1) L-アスコルビン酸は、50ppm 増量となるように調整した。

- ①くだもの好きの100%ジュース 洋なし
- ②くだもの好きの100%ジュース 赤りんご 青りんご
- ③スウィートオレンジ

L-アスコルビン酸 0.0100g をジュースで溶かし 100mL にした。この溶液を 2%メタリン酸で 2 倍希釈した。8.測定操作法に従い、得られた測定値は高濃度総アスコルビン酸及び高濃度アスコルビン酸の検量線を用いて L-アスコルビン酸の量を得た。

#### ④ドールグレープジュース

L-アスコルビン酸 0.0107g をジュースで溶かし 100mL にした。この溶液 0.2%メタリン酸で 2 倍希釈した。8.測定操作法に従い、得られた測定値は低濃度濃度総アスコルビン酸及び低濃度濃度アスコルビン酸の検量線を用いて L-アスコルビン酸の量を得た。

### 9.2.3.研究結果

#### 1) くだもの好きの 100%ジュース 洋なし

##### (1) 総 L-アスコルビン酸 (DTT 添加)

表 22. くだもの好きの 100%ジュース 洋なしの消費酸素量 (ppm)

初期値	終点値	差	差の平均
8.14	6.97	1.07	1.14
7.97	6.74	1.23	
8.49	7.37	1.12	

#### 2) L-アスコルビン酸 (DTT 無添加)

表 23. くだもの好きの 100%ジュース 洋なしの消費酸素量 (ppm)

初期値	終点値	差	差の平均
8.16	7.46	0.70	0.77
8.18	7.42	0.76	
8.30	7.54	0.86	

#### 2) くだもの好きの 100%ジュース 洋なし

##### (1) 総 L-アスコルビン酸 (DTT 添加)

表 24. くだもの好きの 100%ジュース 赤りんご 青りんごの消費酸素量 (ppm)

初期値	終点値	差	差の平均
8.00	7.49	0.51	0.46
8.58	8.14	0.44	
8.44	7.98	0.46	

(2)L-アスコルビン酸 (DTT 無添加)

表 25. くだもの好きの 100%ジュース 赤りんご 青りんごの消費酸素量 (ppm)

初期値	終点値	差	差の平均
8.54	8.51	0.03	0.04
8.72	8.69	0.03	
8.42	8.37	0.05	

3) スウィートオレンジ

(1) 総 L-アスコルビン酸 (DTT 添加)

表 26. スウィートオレンジの消費酸素量 (ppm)

初期値	終点値	差	差の平均
8.23	6.11	2.12	2.13
8.18	6.00	2.18	
8.53	6.44	2.09	

(2)L-アスコルビン酸 (DTT 無添加)

表 27. スウィートオレンジの消費酸素量 (ppm)

初期値	終点値	差	差の平均
7.57	5.90	1.60	1.60
8.06	6.42	1.64	
8.01	6.44	1.56	

#### 4) ドールグレープジュース

##### (1) 総L-アスコルビン酸 (DTT 添加)

表 28. ドールグレープジュースの消費酸素量 (ppm)

初期値	終点値	差	差の平均
8.37	7.17	1.20	1.10
8.61	7.72	0.89	
8.47	7.25	1.22	

##### (2) L-アスコルビン酸 (DTT 無添加)

表 29. ドールグレープジュースの消費酸素量 (ppm)

初期値	終点値	差	差の平均
7.89	7.70	0.19	0.15
8.32	8.21	0.10	
8.45	8.30	0.15	

#### 5) 添加回収試験で得られた L-アスコルビン酸

表 30. 添加回収試験で得られた L-アスコルビン酸濃度 (ppm)

試料名	L-アスコルビン酸濃度
くだもの好き洋なし	33.6
くだもの好きりんご	39.2
スウィートオレンジ	53.8
ドールグレープ	19.9

6) 添加回収試験で得られた L-アスコルビン酸の検出率

表 31. 添加回収試験で得られた L-アスコルビン酸検出率

食品名	検出量%
くだもの好きの洋なし	67
くだもの好きのりんご	78
スウィートオレンジ	108
ドールグレープ	40

9.5.考察

市販の飲料水にアスコルビン酸を添加し、酵素法により測定した。スウィートオレンジ以外は、検出量が低くその中でも、グレープジュースは、明らかに半分以下の検出率であった。これは、食品中の成分が酵素反応に影響したためと思われる。

## 10.ヒドラジン法

### 10.1.研究目的

本酵素法と従来から用いられていたの化学的方法とでは、いずれが秀でているかを検討することにした。化学的方法として最もよく用いられているヒドラジン法を対照として選んだ。

### 10.2.研究方法

ヒドラジン法で標準物質による検量線が必要となるので、その検量線を作成した。

#### 1) 試薬

- (1) 5%メタリン酸溶液
- (2) アスコルビン酸
- (3) ヒドラジン溶液
- (4) インドフェノール溶液
- (5) 1%塩化第一スズ溶液
- (6) 85%硫酸溶液

#### 2) 測定操作

L-アスコルビン酸を 50mg ( $f = 0.978$ ) 取り 5%メタリン酸溶液で 100mL にした。この溶液を標準溶液とした。標準溶液を 2mL、3mL、4mL、5mL 取りそれぞれに 5%メタリン酸溶液を加え 100mL にした。希釈した溶液を 2mL ずつ 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A, 5B、8本の試験管に入れた。A、B 試験管にインドフェノール溶液を数滴赤色になるまで添加、混和した。8 本全ての試験管に塩化第一スズ溶液を 2mL 加え混和した。A の試験管にヒドラジン溶液を 1mL 加え混和した。各試験管は、ウォーターバスを使用し 37℃で3時間加温した。加温後ウォーターバスから取り出し直ちに氷冷した。8 本全ての試験管に 85%硫酸溶液を発熱しないように氷冷しながら 5mL 加えた。B の試験管にヒドラジン溶液を 1mL 加え混和後、室温になるまで放置した。全ての溶液を 540nm で吸光度を測定した。

### 10.2.研究結果

ヒドラジン法による L-アスコルビン酸標準溶液を用いてヒドラジン法による検量線を作成した。得られたヒドラジン法による吸光度を表 32 に示した。

この数値をもとに検量線を作成した (図 9)。

表 32. ヒドラジン法検量線の吸光度 (Abs)

	吸光度	A - B
2A	0.168	
2B	0.008	0.160
3A	0.246	
3B	0.006	0.240
4A	0.321	
4B	0.007	0.314
5A	0.404	
5B	0.003	0.401

L-アスコルビン酸の検量線

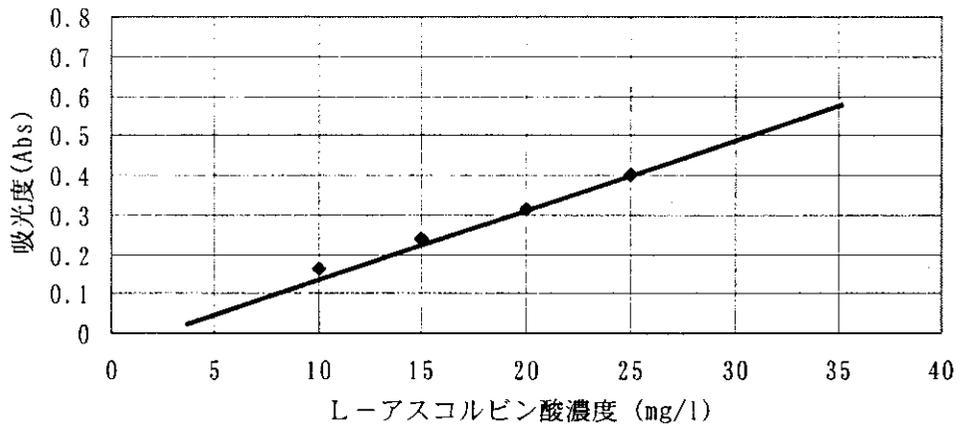


図 9. ヒドラジン法検量線  $Conc = 61.36x + 0.0122$

#### 10.4. 考察

検量線が、直線性を示したためこの検量線を使用し、今後のヒドラジン法の定量をした。

## 11. 酵素法とヒドラジン法の比較

### 11.1. 研究目的

ヒドラジン法と酵素法とでは、どちらがより優れているを調べるために標準物質を使用して検討を行った。

### 11.2. 研究方法

#### 1) 試薬

- (1) 2%メタリン酸溶液
- (2) L-アスコルビン酸
- (3) ジチオトレイトール溶液
- (4) *N*-エチルマレイミド溶液
- (5) アスコルビン酸オキシダーゼ溶液
- (6) リン酸緩衝液 (pH8)

#### 2) 測定操作

##### ① L-アスコルビン酸標準試料溶液の調整

L-アスコルビン酸試液：0.0107g ( $f = 1.07$ ) 酸を取り 2%メタリン酸で 20mL にした。この溶液を 100ppm に希釈した。

##### ② 酵素法による総 L-アスコルビン酸量

リン酸緩衝液 0.9mL、L-アスコルビン酸溶液 0.1mL、DTT 溶液 0.01mL を加え攪拌しながら 5 分間放置した。NEM 溶液 0.01mL 加えアルゴンを充填し 5 分間放置した後、ASOD 溶液 1  $\mu$  L を加えて反応させた。(反応温度 25  $^{\circ}$ C)

##### ③ 酵素法による L-アスコルビン酸量

リン酸緩衝液 0.9mL、アスコルビン酸標準溶液 0.1mL を加えアルゴンを充填し、5 分間放置した後、ASOD 溶液 1  $\mu$  L を加えて反応させた。(反応温度 25  $^{\circ}$ C)

##### ④ ヒドラジン法による L-アスコルビン酸量

L-アスコルビン酸溶液 3mL を 5%メタリン酸溶液で 100mL にした。この希釈した溶液を 2mL ずつ、A, B, C, D の各試験管に入れた。

A, B の試験管にインドフェノール溶液を数滴赤色になるまで添加、混和した。

4 本の試験管に塩化第一スズ溶液を 2mL 加え混和した。A, C の試験管にヒドラジン溶液を 1mL 加え混和した。4 本の試験管は、ウォーターバスで 37  $^{\circ}$ C で 3 時間加温した。加温後、ウォーターバスから取り出し直ちに氷冷した。4 本の試験管に 85%硫酸溶液を発熱しないように氷冷しながら 5 mL 加えた。B, D の試験管にヒドラジン溶液を 1mL 加え混和し、室温になるまで放置した。

全ての溶液を 540nm で吸光度を測定した。

### 11.3.研究結果

1) 酵素法による DTT 無添加時における酸素消費量と ASA 量 (ppm) を下表に示した。

表 33. 酵素法 (DTT 無添加) による酸素消費量と ASA 量 (ppm)

初期値	終点値	差	差の平均	ASA 測定量
8.22	7.27	0.95		
7.96	7.00	0.96		
7.74	6.80	0.96	0.96	108

2) 酵素法による DTT 添加時における酸素消費量と ASA 量 (ppm) を下表に示した。

表 34. 酵素法 (DTT 添加) による酸素消費量と ASA 量 (ppm)

初期値	終点値	差	差の平均	ASA 測定量
7.61	5.67	1.94		
8.17	6.75	1.42		
7.93	6.28	1.65	1.67	134

3) ヒドラジン法による測定値 (Abs) を下表に示した。

表 35. ヒドラジン法測定値 (Abs)

	吸光度
A 試験管	0.261
B 試験管	0.002
C 試験管	0.002
D 試験管	0.015

$$A - B = 0.259 \quad C - D = -0.013$$

ASA 濃度 159ppm

#### 4) 酵素法とヒドラジン法の比較

表 36. 酵素法とヒドラジン法の比較

	DTT	検出%
酵素法	無添加	101
	添加	125
ヒドラジン法		149

#### 11.4.考察

ヒドラジン法の値がおかしいので酵素法との比較はしがたいが、酵素法の DTT 無添加は、3回の測定数値が安定していたため数値は信頼できると思われる。

## 12.市販食品中のビタミンC測定

### 12.1.研究目的

ヒドラジン法と酵素法を比較するために、実際の食品を用いて検討を行った。

### 12.2.研究方法

#### 12.2.1 試料

研究に用いた市販食品は、各食品別に下記に記載した。

#### 1.試薬

- (1) インドフェノール溶液
- (2) ヒドラジン溶液
- (3) 85%硫酸溶液
- (4) 1%塩化第一スズ溶液
- (5) ジチオトレイトール溶液
- (6) *N*-エチルマレイミド溶液
- (7) 4000U/mL L-アスコルビン酸オキシダーゼ溶液
- (8) リン酸緩衝液 (pH8)

#### 2.酵素法で使用した市販食品

##### 1) 固形試料

- (1) 温州みかん

長崎みかん

信マルノブ柑橘組合

等級 秀

階級 M

- (2) 富有柿

JA はしもと市

井撰 和歌山 秀 2L

TEL 0736-34-1998

- (3) 富有柿

滋賀県愛知郡愛知川町愛知川 1033-7

塩田 繁喜方の庭先

##### 2) オレンジジュース

(1) スウィートオレンジ

品 名 天然果汁（濃縮果汁還元）  
果 実 名 バレンシアオレンジ、みかん混合  
原材料名 果汁、香料  
販 売 者 グリコ共同乳業株式会社  
東京都昭島市武蔵野 2-14-1

(2) くだもの好きの 100%ジュース（みかんオレンジ）

品 名 天然果汁（濃縮果汁還元）  
果 実 名 バレンシアオレンジ、みかん混合  
原材料名 果汁、香料  
販 売 者 グリコ共同乳業株式会社  
東京都昭島市武蔵野 2-14-1

栄養成分表示 1 本（200mL）当たり

エネルギー	90kcal
たんぱく質	1.5g
炭水化物	21.3g
脂質	0g
ナトリウム	0mg
ビタミン C	72mg

(3) デルモンテオレンジジュース

品 名 天然果汁（濃縮果汁還元）  
果 実 名 バレンシアオレンジ  
原材料名 果汁、香料  
販 売 者 キッコーマン株式会社  
千葉県野田市野田 339

(4) トロピカーナオレンジ

品 名 天然果汁（濃縮果汁還元）  
果 実 名 バレンシアオレンジ  
原 材 料 名 果汁  
果汁含有率 果汁 100%  
販 売 者 キリンビバレッジ株式会社 WK07  
東京都千代田区神田和泉町 1 番地

(5) ドールオレンジジュース 100%

品 名 天然果汁（濃縮果汁還元）

果実名 バレンシアオレンジ  
果汁含有率 100%  
原材料名 果汁、香料  
販売者 雪印乳業株式会社 615  
札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

(6) こたつで蜜柑（こたつでみかん）

品名 果粒入り果実飲料  
果実分含有率及び果粒含有率 果実分45%（さのう10%）  
原材料名 うんしゅうみかん果汁、  
みかんさのう、  
果糖、香料、酸味料、ビタミンC

販売者 宝酒造株式会社  
京都市伏見区竹中町609

成分標準値 100g当たり  
エネルギー 43Kcal  
たんぱく質 0g  
脂質 0g  
ナトリウム 0g  
シヨ糖 1.4g

(7) ベルチャンオレンジ

品名 果汁入り清涼飲料水  
果実名 バレンシアオレンジ、温州みかん混合  
果汁含有率 果汁30%  
原材料名 果汁、糖類（ぶどう糖果糖液糖、砂糖）、酸味料、  
ビタミンC

販売者 山口県酪農農業協同組合 NI  
山口県下関市田中町3番4号 TEL 0832 (23) 4321

(8) スノーピーオレンジ

品名 天然果汁（濃縮果汁還元）  
果実名 バレンシアオレンジ  
果汁含有率 果汁100%  
原材料名 果汁、香料  
製造者 雪印乳業株式会社 愛知工場  
愛知県宝飯郡小坂井町大字伊奈字南山新田350番79

(9) バヤリースオレンジ 果汁10%

品名 果汁入り清涼飲料

果実名 バレンシアオレンジ

原材料名 果汁、ぶどう糖果糖液糖、酸味料、香料、着色料（カロチン、パプリカ色素）、ビタミンC

製造者 アサヒ飲料株式会社

東京都墨田区吾妻橋 1-23-1

### 3) リンゴジュース

(1) スノーピーりんご 果汁 100%

品名 天然果汁（濃縮果汁還元）

果実名 りんご

果汁含有率 果汁 100%

原材料名 果汁、香料、酸化防止剤（ビタミンC）

製造者 雪印乳業株式会社 愛知工場

愛知県宝飯郡小坂井町大字伊奈字南山新田 350 番 79

(2) くだもの好きの 100%ジュース赤りんご 青りんご

品名 天然果汁（濃縮果汁還元）

果実名 りんご

原材料名 果汁、香料

販売者 グリコ共同乳業株式会社

東京都昭島市武蔵野 2-14-1

1本（200mL）当たり（成分表示）

エネルギー 94Kcal

たんぱく質 0g

脂質 0g

炭水化物 23.4g

ナトリウム 14mg

(3) デルモンテアップルジュース

品名 天然果汁（濃縮果汁還元）

果実名 りんご

原材料名 果汁、香料、酸味料、酸化防止剤（ビタミンC）

販売者 キッコーマン株式会社

千葉県野田市野田 339

(4) ドールアップルジュース 100%

品名 天然果汁（濃縮果汁還元）

果汁名 りんご

果汁含有率 100%

原材料名 果汁、香料、酸化防止剤（ビタミンC）

製造者 雪印乳業株式会社 615  
札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

(5) トロピカーナアップル

品名 天然果汁（濃縮果汁還元）  
果実名 りんご  
果汁含有率 100%  
原材料名 果汁、香料、酸化防止剤（ビタミンC）  
販売者 キリンビバレッジ株式会社 WK07  
東京都千代田区神田和泉町1番地

(6) ベルチャンアップル

品名 果汁入り清涼飲料  
果実名 りんご  
果汁含有率 30%  
原材料名 果汁、糖類（ぶどう糖果糖液糖、砂糖）、酸味料、香料  
販売者 山口県酪農農業協同組合 NI  
山口県下関市中町3番4号 TEL0832（23）4321

(7) アップル30 ビタミンA.C入りポケットモンスター

品名 果汁入り清涼飲料  
果実名 りんご  
果汁含有率 30%  
原材料名 果汁、糖類（果糖ぶどう糖液糖、砂糖）酸味料、香料、  
ビタミンC、ビタミンA  
販売者 明治乳業株式会社  
東京都中央区京橋2-3-6

栄養成分 1本（190g）当たり

エネルギー	78Kcal
たんぱく質	0g
脂質	0g
炭水化物	19.4g
ナトリウム	2.2mg
ビタミンA	380IU
ビタミンC	38mg

4) グレープフルーツ

(1) くだもの好きの100%ジュース グレープフルーツ 洋なし  
品名 天然果汁（濃縮果汁還元）  
果実名 グレープフルーツ洋なし混合

原 材 料 果汁、香料  
販 売 者 グリコ共同乳業株式会社  
東京都昭島市武蔵野 2-14-1

1 本（200mL）当たり  
エネルギー 80Kcal  
たんぱく質 0g  
炭水化物 21.1g  
ナトリウム 0mg  
ビタミンC 34mg

(2) ドールグレープフルーツジュース  
品 名 天然果汁（濃縮果汁還元）  
果 実 名 グレープフルーツ  
果汁含有率 果汁 100%  
原 材 料 名 果汁、香料  
製 造 者 雪印乳業株式会社 615  
札幌市東区苗穂町 6 丁目 1 番 1 号

(3) デルモンテグレープフルーツジュース  
品 名 天然果汁（濃縮果汁還元）  
果 実 名 グレープフルーツ  
原 材 料 名 果汁、香料

販 売 者 キッコーマン株式会社  
千葉県野田市野田 399

#### 5) その他

(1) デルモンテパイナップルジュース  
品 名 天然果汁（濃縮果汁還元）  
果 実 名 パインアップル  
原 材 料 名 果汁  
販 売 者 キッコーマン株式会社  
千葉県野田市野田 399

(2) ドールパイナップルジュース  
品 名 天然果汁（濃縮果汁還元）  
果 実 名 パインアップル  
果汁含有率 100%  
原 材 料 名 果汁、香料  
製 造 者 雪印乳業株式会社 AGN

札幌市東区苗穂町 6 丁目 1 番 1 号

(3) ドールグレープジュース

品 名 天然果汁（濃縮果汁還元）

果 実 名 マスカット、ぶどう混合

果汁含有率 100%

原 材 料 名 果汁、香料

製 造 者 雪印乳業株式会社 AGN

札幌市東区苗穂町 6 丁目 1 番 1 号

(4) サントリーの銘茶 品質本位 茶 緑茶

品 名 緑茶（清涼飲料水）

原材料名 緑茶、ビタミン C

販 売 者 サントリー株式会社 WK07

大阪市北区堂島浜 2 丁目 1-40

(5) 伊藤園 おーいお茶 一番茶使用 緑茶

品 名 煎茶（清涼飲料水）

原材料名 緑茶（煎茶）、ビタミン C

販 売 者 株式会社 伊藤園 B30

東京都渋谷区本町 3-47-10

(6) 特選野菜 ふくれん 緑の野菜&フルーツ 九州産旬野菜

果汁+野菜汁= 100% 果汁 80%

品 名 果汁入り混合飲料

果 実 名 りんご パインアップル バレンシアオレンジ混合

原材料名 果汁、野菜（ほうれん草、ケール、セロリ）、ガラクトマンナン、  
香料、クチナシ色素、紅花色素

製 造 者 福岡県農業協同組合連合会 FRN

福岡市中央区天神 4 丁目 5 番 23 号

栄養成分表示

1 個（200mL）当たり

エネルギー 85Kcal

たんぱく質 0.6g

脂質 0.2g

糖質 20.2g

ナトリウム 12mg

食物繊維 1.0g

鉄 0.6g

ビタミン C 62mg

### 12.2.3 共通操作方法

#### 1) ヒドラジン法

試料を A, B, C, D 4本の試験管に 2mL 入れ、A, B にインドフェノール溶液を赤くなるまで添加した。4本全ての試験管に塩化第一スズ溶液を 2mL 加えた。A, C の試験管にヒドラジン溶液を 1mL 加え混合した。ウォーターバスにて 37℃、時間放置した。ウォーターバスから取りだしすぐ氷冷した。4本全ての試験管に 85%硫酸溶液を 5mL 加熱しないように氷冷しながら加えた。C, D の試験管にヒドラジン溶液を 1mL 加えた。室温になるまで放置した。540nm の吸光度を測定した（ヒドラジン法の数値はすべて Abs）。

#### 2) 酵素法

##### (1) 高濃度総 L-アスコルビン酸の測定

反応そうにリン酸緩衝液 0.9mL、試料 0.1mL、DTT10  $\mu$  L を加え 5 分間攪拌しながら放置した。攪拌後、NEM10  $\mu$  L を加えアルゴンガスで充填し蓋をして 5 分間放置し、ASOD1  $\mu$  L を加え反応させた。

##### (2) 高濃度 L-アスコルビン酸の測定

反応そうにリン酸緩衝液 0.9mL、試料 0.1mL、加えアルゴンガスで充填し 5 分間攪拌しながら放置した後、ASOD1  $\mu$  L を加え反応させた。

##### (3) 低濃度での測定

反応そうに入れるリン酸緩衝液 0.5mL、試料 0.5mL にした。その後の操作は、高濃度と同一にした（酵素法の数値はすべて ppm ）

3) 市販食品の個別の操作方法は、便宜上、研究結果と同一場所に記載した。

## 12.3.研究結果

### 1)温州みかん

#### (1)酵素法

##### ①試料調整

温州みかんの外皮をむいたみかん 48.77g に 2%メタリン酸 (100-48.77) mL を加え、ホモジナイザー 500rpm、3 分間粉碎した。粉碎したみかんを 3000rpm、10 分間で遠心分離し上澄みを取った。上澄み液に対し同量の 2%メタリン酸を加え混和しこれを試料とした。

##### ②測定操作

高濃度の酵素法で測定を行った。

##### ③酵素法による総 L-アスコルビン酸の測定結果

表 37. 温州みかん 総 L-アスコルビン酸の消費酸素量 (ppm)

初期値	終点値	差	差の平均
8.25	6.58	1.67	1.75
7.74	6.08	1.66	
7.96	6.04	1.92	

##### ④アスコルビン酸の測定結果

表 38. 温州みかん L-アスコルビン酸の消費酸素量 (ppm)

初期値	終点値	差	差の平均
8.27	7.04	1.23	1.24
8.03	6.76	1.27	
7.92	6.69	1.23	

#### (2)ヒドラジン法

##### ①試料調整

温州みかんの皮をむいたみかん 6.80g に 5%メタリン酸を (100-6.8) mL を加えた。ホモジナイザー 500rpm、3min 粉碎した。粉碎したみかんを 3000rpm、10min で遠心分離し上澄みを試料とした。